

Mikro RNS-expressziók vizsgálata nyelőcső- és gyomordaganatokban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Stánitz Éva

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs, 2015.

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezető: Prof. Dr. Kiss István

Mikro RNS-expressziók vizsgálata nyelőcső- és gyomordaganatokban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Stánitz Éva

Pécs, 2015.

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. Epidemiológia	9
3.1.1. Előfordulás és halálozás	9
3.1.2. Kockázati tényezők	15
3.2. Epigenetika. A mikro RNS rendszerről általában	17
3.2.1. miR-ekről részletesen	19
3.2.2. miR-ek biogenezeise	19
3.2.3. miR-ek funkciójáról	21
3.2.4. miR-ek és a daganatok	22
3.2.5. miR-ek onkogén és szupresszor szerepben	23
3.2.6. Vizsgálatunkhoz választott miR-ekről	25
4. CÉLKITŰZÉSEK	31
5. METODIKA	32
5.1. Beteganyag	32
5.2. RNS kivonás	33
5.3. Reverz transzkripció	33
5.4. qRT-PCR analízis	34
5.5. Statisztikai analízis	35
6. EREDMÉNYEK	36
6.1. Nyelőcső laphámrákos betegek mintái	36
6.2. Gyomorrákos betegek mintáiból végzett vizsgálatok	48
6.3. miR és túlélés kapcsolata	54
7. MEGBESZÉLÉS	59
7.1. Nyelőcsőrák és normál szövet	59
7.2. Gyomorrák és normál szövet	60
7.3. Környezeti tényezők hatása	61
7.4. miR expresszió és túlélés	64
8. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK	65
9. IRODALOMJEGYZÉK	68

10.KÖZLEMÉNYEK	82
11.NYILATKOZAT	84
12.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	85

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANXA1	Annexin1 gén
BNO	Betegségek nemzetközi osztályozása
C15	Nyelőcső rosszindulatú daganata (BNO XI. versio)
C16	Gyomor rosszindulatú daganata (BNO XI. versio)
CDH1	Cadherin (E-cadherin) 1 gén
CDK6	Cyclin dependent kinase 6
cMyc	cell-Myelocytomatosis oncogene
CTGF	Connection tissue growth factor
CYP2E1	Cytochrom P450 family (ethanol inducible) polypeptid gene
CYR61	Cystein-rich angiogenic inducer 61
deltaNp	Np63 alfa protein in epidermic
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha
DNA	Desoxiribonucleinacid
cDNA	CopyDesoxiribonucleinacid
ERBB	Epidermal growth factor receptors (B)
ERK1	Extracellular regulation kinase
EC	Esophagus carcinoma
EC-1 és EC9706	Esophagus carcinoma cell lines
EMT	Epithelial- mesenchymal cell transition
ESCC	Esophagus squamosus cell carcinoma
FASL	Fas and its natural ligand
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded

GC	Gastric cancer
GSTP1	Glutathione S-transferases protein
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
qRT-PCR	Quantitativ real time-polymerase chain reaction
PDCDN	Programmed cell death
PSA	Prosztata specifikus antigén
PTEN	Phosphatase and tensine homolog
RECK	Reversion-inducing-cystein-rich protein
RNS	Ribonukleinsav
s rRNS	Standard riboszóma RNS (ribonukleinsav)
mRNS	messengerRNS
miR	mikroRNS (ribonukleinsav)
SNP	Single nucleotid polymorphism
SPRY 1,2	Sprotuty homolog 1,2
STMN1	Stathmin protein/oncoprotein
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor
TP53INP1	Tumor-protein 53 inducible nuclear-protein 1
ZEB2	Zink-finger E-box homeobox 2

2. BEVEZETÉS

A rosszindulatú daganatos megbetegedések száma, valamennyi daganatfélét figyelembe véve, világszerte vagy növekvő, vagy néhány típusnál is csak mérsékelten csökkenő tendenciát mutat. Különösen nagy jelentőségük van a korai halálozásban betöltött tényerésüknek. A valamennyi szervet/szervrendszert, változó mértékben érintő betegségcsoport, a különböző és egyre eredményesebb gyógy módok ellenére, rendkívüli egyéni, közösségi és osztársadalmi betegségterhet, testi és lelki szenvedést okoz. Az egyes szerveket érintő, többféle szövettani alcsoportba sorolható rosszindulatú daganatok, más-más gyakorisággal fordulnak elő. Elterjedtségük életkor és nemek szerint, földrajzilag, népcsoporti érintettségükben, de kialakulásukat előidéző kockázati háttérrel tekintve is különböző (1,2). A dolgozat témájául szolgáló kutatás emésztő szervrendszeri karcinómák, azon belül is a nyelőcső- és gyomorrák molekuláris vizsgálatával kapcsolatos. A rosszindulatú daganatok iniciációja és progressziója háttérében a külső tényezők szerepét genetikai hatásában vizsgáló kutatások egyre több kapcsolati összefüggést tárnak fel. A kutatások megerősítő eredményei és az ilyen irányú gondolkodás felértékelte a megelőző szemléletben a személyes és társadalmi felelősség kérdéseit, és a prevenciós technikák fejlesztését, elterjesztését.

Az elmúlt kb. 15 év rendkívüli technikai fejlődése lehetővé tette olyan molekuláris vizsgálatok kivitelezését, amellyel felgyorsult a sejten belüli fiziológiás és patogén folyamatok analízise és ezzel genetikai azonosítások is lehetségesek a külső tényezők, beleértve környezeti, életmódi noxák hatásainak leírása. A DNS szekvencián kívüli, azon túlmutató szabályozási mechanizmusok összességét az ismert gének, az öröklött szituáció módosításának lehetőségét feltérképező új tudományág is született: az epigenetika (3).

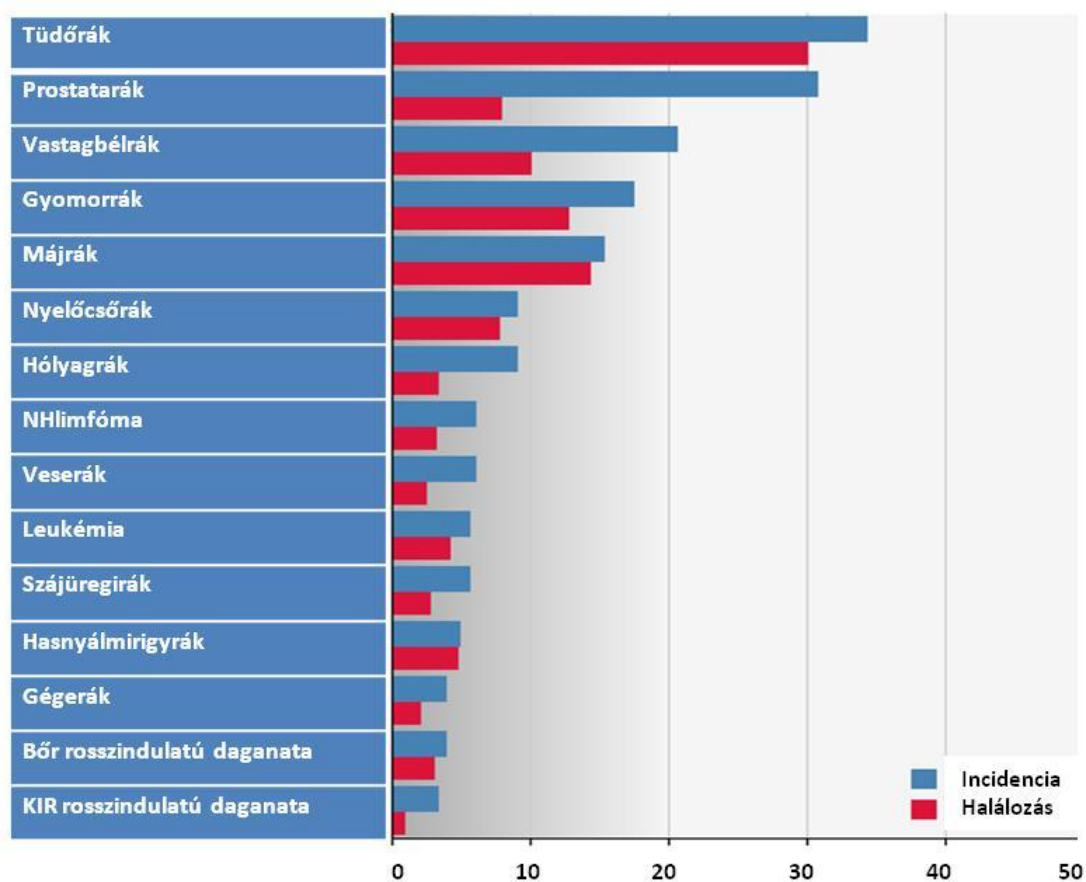
Dolgozatom a PTE Általános Orvostudományi Kar Orvosi Népegészségtani Intézetében végzett vizsgálatok összegzése, amelyben nyelőcső- és gyomorrákos betegek anyagában vizsgáltuk, hogy van-e különbség azonos szövettani diagnózisú betegek egyik jelentős, nagy reményekre jogosító genetikai jellemzőjében, a beteg anyagokból származó mikro RNS-ek expressziójában a normál szövetekhez képest, illetve néhány életmódi különbség a betegcsoportok között megmutatkozik-e a vizsgált mikro RNS-ek szintkülönbségeiben.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

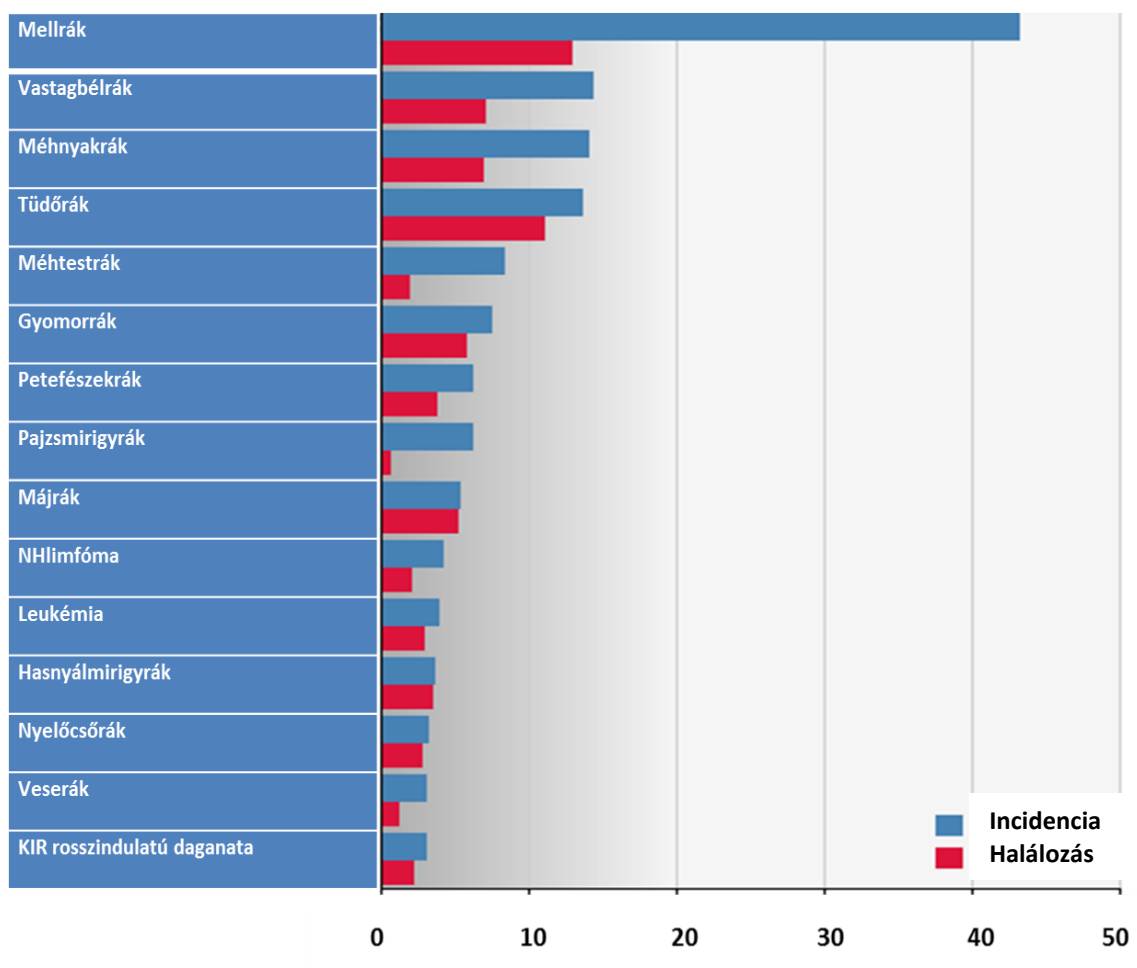
3.1.Epidemiológia

3.1.1.Előfordulás és halálozás

A nyelőcsőrák és a gyomorrák a vezető daganatos halálozások körébe tartozik, a világ népességét figyelembe véve, gyakoriságuk számottevő (1,2,4). (1. 2. grafikon)



1. grafikon: Karcinoma incidencia és mortalitás a világ lakosságában, életkorra standardizálva, 100 000 főre. Férfiak 2012.(2)



2. grafikon: Karcinoma incidencia és mortalitás a világ lakosságában, életkorra standardizálva, 100 000 főre. Nők 2012. (2)

Nyelőcsőrák

Évente világszerte 450.000 körüli új esetet regisztrálnak, és 400.000 főt néhány ezerrel meghaladja a halálozások száma. Ezzel a férfiak hatodik, a nők tizenharmadik leggyakoribb rosszindulatú daganata volt 2010-ben. Az érintettek körében a férfi/nő arányban a többi, mindkét nemre jellemző daganathoz képest itt a legnagyobb a nemek közötti differencia. Szövettani besorolás szerint a nyelőcsőrák két alaptípusa a laphámrák

és a mirigyhámrák, a földrajzi eloszlással összefüggésben van. A nyelőcső laphámrák a világ lakosságában követett elterjedését tekintve a különböző földrajzi területeken 21-szeres különbséget is mutat. A rendkívül nagy geográfiai különbségek 0,8/100000 aránytól 17/100000 arányig terjednek. Legnagyobb arányban a „nyelőcsőrák övezetnek” is nevezett területeken, Ázsia középső területein élők, a Kelet-Közép Kína tartományi lakosságot, továbbá Észak-India, Irán, Afganisztán lakosságát érinti. Ezeken a területeken tehát elsősorban a laphámrák elterjedtsége jellemző, míg a Nyugati országokban, Észak-Amerikában és az Európai országokban a Barrett esophagitis talaján kialakult mirigyhámrák van túlsúlyban (1,2,4,5).

Gyomorrák

A gyomorrák a Föld lakosságát tekintve a negyedik leggyakoribb a férfiak, és hatodik leggyakoribb daganatféleség a nők körében, 2010-ben. A nemek megbetegedés rátája férfi/nő vonatkozásban: 2:1. Szövettani besorolás szerint nagyrészt mirigyhámrák. 2012-es adatok szerint 951.000 új esetet, és 723.100 halálozást regisztráltak a világ országaiban (1,2). A jelentős számú megbetegedés ellenére a világ számos pontján mérhető az incidencia egyenletes csökkenése. Manapság kiemelkedő számú megbetegedés Kelet-Ázsiában, főleg Korea Japán, Kína lakossága körében van, 2008-2010 között 11 százezrelék felett, de Közép- és Kelet-Európa lakosságát is érinti az emelkedett betegszám. Ez utóbbi országok gyomorrák incidenciája 7,4-11,0 százezrelék, 2008-2010 években. Közepesen súlyos érintettséggel jellemezhetők. A legkedvezőbb helyzetben lévő észak-amerikai és nyugat-európai országok lakosságát a 2,8-4 százezrelék közötti éves incidencia jellemzi, 2008-2010 évek vonatkozásában (1,2,4,5).

A magyar népesség kedvezőtlen egészségi állapota széles körben ismeretes. A születéskor várható átlagos élettartam (minden javulás ellenére) és különösen a korai halálozás, ez által az elvesztett életévek mértéke tekintetében is negatívok az adatok (6). Az adatgyűjtés és azok nemzetközi összehasonlítása alapján nagyobb és kisebb ívű szűrési programok, népegészségügyi tervek születtek az elmúlt 20 évben (6,7).

Változtak egy-egy betegségcsoporton belüli gyakoriságok is. Néhány szűrési koncepció beváltotta a hozzá fűzött reményeket, mások kevésbé voltak sikeresek. Az évek óta várt népegészségügyi szűrési modell, a vastag- és végbéldaganatok kiterjesztett lakossági szűrése nem került mai napig bevezetésre, másról pl. a prosztatatarák szűrésként gyakran alkalmazott PSA vérmintából történő meghatározásról kiderült, hogy a prosztatatarák halálozást csökkentő eredményt nem hozott (8).

A genomikai és epigenetikai kutatások tükrében felértékelődik az elsődleges prevenció onkológiai jelentősége, annál is inkább, mert a lakosság halálozását az úgynevezett fejlett országokban, második leggyakoribb módon és növekvő arányban a rosszindulatú daganatos megbetegedésből származó halálozások okozzák (9,10,11).

Magyarországon a daganatos megbetegedések okozta halálozás 2011-ben közel másfélszerese az 50 évvel korábbinak (12). (I. táblázat)

Halálozás főbb okok szerint	1960	2011
	év	
Fertőző és elősdiok okozta betegségek	3898	521
Daganatos betegségek	17 386	33 076
Keringési rendszer betegségei	45 249	65 819
Légzőrendszer betegségei	8933	6524
Emésztőrendszer betegségei	4162	7739
Balesetek	3352	4301
Öngyilkosság	2493	2492
Egyéb	16 052	9 984
Összesen:	101525	130456

I. táblázat: A halálozások számának alakulása, halálokok szerint 1960. és 2011. (12)

Azon túlmenően, hogy minden betegségcsoport közül a daganatos halálozás nőtt legnagyobb mértékben, a daganatos halálozáson belül az érintett szervek- szervrendszerek dominanciája is változott. A tüdőrák okozta halálozás okozza a legmagasabb mortalitást, 2000-2012 között. Incidenciája ugyanezen idő intervallumban csak a 40-59 éves korú férfiaknál mérséklődött kis mértékben, de a női mortalitás erősen emelkedett (13). S mindez úgy, hogy abszolút értékben az esetszám is növekszik.

A gasztrointesztinális traktus daganatai közül a vastag-és végbélrák a 80 év feletti korcsoportban vezető, egyéb korcsoportokban második halálokok úgy a férfiak, mint a nők körében, enyhén emelkedő tendenciájú (13).

Ehhez képest a nyelőcsőrák és gyomorrák gyakoriság és az ebből eredő halálozás lényegesen alacsonyabb incidenciájú. Összehasonlítva az évtizedekig jellemző korábbi gyakoriságokkal kedvező trend írható le (10,11,13). (II. táblázat)

Daganat	Rövidítés	Férfiak		Nők	
		Incidencia	Halálozás	Incidencia	Halálozás
Nyelőcsőrák	ESCC	9,0	7,7	3,1	2,7
Gyomorrák	GAC	17,4	12,8	7,5	5,7

II. táblázat: Nyelőcső- és gyomorrák incidencia és halálozás 100 000 főre 2010-ben Magyarországon (1)

Világszerte tapasztalható kedvezőtlen jellemzője mindkét daganatféleségnek: az átlagos túlélési idő, amely különösen a nyelőcsőrák esetében, rendkívül alacsony. A daganat diagnózisának stádiumától függően változó, de nyelőcsőrák esetén az 5 éves túlélés 7%, gyomorrák esetében pedig 20% (2). Mindazok ellenére, hogy a diagnosztika eszköztára soha nem látott módon fejlődött az elmúlt évtizedekben. A terápiás eszköztár is precízebb lett, új farmakokinetikájú gyógyszerekkel és sok tapasztalattal bővült. A betegek nagy része azonban előrehaladott stádiumban kerül az egészségügyi ellátórendszerbe. Ennek oka lehet a betegségek kezdetének tünetszegény volta, de hozzájárul ehhez az érintettek betegség megelőzési szemléletének teljes hiánya, a betegség kialakulásában feltehetően szerepet játszó kockázati tényezők élethosszig tartó figyelmen kívül hagyása is.

Az elmúlt másfél évtizedben a molekuláris genetika kutatásai alapján jelentős szemléletbeli változás következett be a daganatos megbetegedések kialakulását, molekuláris megközelítését tekintve. Mindehhez hozzájárult a 2000-dik évet követően, az emberi genom strukturális feltérképezése után, a funkcionális genomika részleteinek kutatása, amelyhez kapcsolódva jelentős szerepet kapott a környezeti tényezők hatásának vizsgálata.

A soklépcsős daganatképződési folyamat kapcsolata és a környezeti, életmódi tényezők összefüggése mindig is ismert volt. A genetikai alap kutatások sokáig az egyes gének mutációja, bázis sorrend megváltozása mentén gondolkodva modellezték a kialakult betegségeket (14). Az új felfedezések, kutatások nyomán a sejten belüli jelátviteli rendszerek fiziológiás és patológias módoszatainak részletezése, a dinamikus változások, együtthatások értelmezése került a fókuszba.

3.1.2. Kockázati tényezők

A nyelőcsőrák szövettani típusait tekintve mirigyhámrák (adenokarcinoma) és laphámrák (squamosus karcinoma). Európában és Észak- Amerikában az előző típus nagyobb arányban fordul elő a másikkal szemben. Prekancerosus állapota a Barrett-féle nyelőcső, ami mirigyhám metaplázia a normál körülmények között laphámmal bélelt nyelőcső alsó szakaszán. Ennek a jelenléte 50-100 szoros kockázat növekedést jelent nyelőcső mirigyhámrák kialakulásában (15). Néhány kórállapot, ami az idült gyulladásra, következményesen rák rizikóra hajlamosít még a laphám rákot is beleértve.

- Gasztroösofageális reflux
- Obezitás
- Diszplázia
- Minden olyan medikális beavatkozás, ami gyengíti a gyomor felső záróizom funkcióját

Néhány a felsoroltak közül egymás hatását erősítik, illetve egymásból következő rizikók (15). A nyelőcsőráknak egyértelműen igazolható összefüggése van a szociális státusszal, valamint az alkohol és dohánytermék használatával, különösen az együttes használatával (15,

16). Nagy jelentősége lehet az alkohol, de más étel és ital magas hőfokon való fogyasztásának is. Ez utóbbi rizikók főleg a laphámrák kialakulásának kockázatát emelik.

A nyelőcsőrák számának nagyon feltűnő földrajzi különbözősége miatt kézenfekvő az érintett népcsoportokra jellemző genetikai polimorfizmusok feltételezése is (17).

A gyomorrák kialakulását megelőző állapotok is ismertek az orvostudományban, ezek megléte fokozott kockázatot jelenthetnek a rosszindulatú daganat kialakulása szempontjából:

- Atrófiás gasztritisz
- Anémia perniciosa
- Helikobakter pylori fertőzöttség (antralis terület)
- Ventrikularis fekély

Ezek a klinikai kórképek változó gyakorisággal fordultak elő az elmúlt évtizedekben, de fennállásuk kifejezett rizikót jelentettek gyomorrák potenciális kialakulására. A gyomorrák döntő többsége a fedőhámából kiinduló mirigyhámrák. A gyomorbetegeket diétás előírásokkal is gyógyították még a prekancerózusnak tekintett betegségekben, felismerve a külső tényezők hatását. Mindenekelőtt a fűszeres, sós ételektől és valamennyi nyálkahártyát irritáló hatású termékek eltiltásával próbáltak gyógyítani. A gyomorrák előállapota, a manapság is érvényes tudományos megítélés szerint a gasztritisz, melynek talaján alakul ki az a kezdetben atrofiát okozó folyamat, amely a parietális sejtek eltűnését okozza. Ez később intesztinális metaplásia terjedésébe megy át. A parietális sejtek eltűnése achlorhydriát is okoz. A folyamat elindítója az antralis szakaszon megtelepedő Helikobakter pylori. A folyamat már önfenntartóvá válik, a Helikobakter pylori nem is mutatható ki minden esetben. Más oldalról, a gyulladásos szövet áteresztőképességének

növekedése a karcinogén hatású termékek, mint a nitrozamin, hatásának nyit kaput. A nitrozamin, a nitrit-nitrát tartalmú termékek, a füstölt áruk, a dohányfüst komponensei jelenthetik a külső veszélyforrást (18).

A gyomorrák hátterében rizikó tényezőként a már említett tartósító eljárásként alkalmazott füstölés, a *Helikobakter pylori* jelenléte és a dohányzás, mint tökéletlen égéstermék forrása, nyálkahártyát közvetlenül károsító hatása emelhető ki.

Külön említést érdemel a két legfontosabb saját döntési körben választott rizikófaktor a dohányzás és erős alkoholfogyasztás együttes jelenlétének szinergista hatása. A szinergista hatás mechanizmusa is multifaktoriális. Egyik oldalról az acetaldehid helyi hatása a mukosában. Az acetaldehid az alkohol lebontás köztterméke és a DNS adduktjaként válik karcinogén hatásúvá. A dohányosok nyálában is magas az acetaldehid koncentráció, amellett hogy a dohánytermékben számos közvetlenül karcinogén anyag van, például a benzpirén, ez alkoholban oldva magas koncentrációban közvetlenül kerül a nyálkahártya mukosához. Másrészt a CYP 2E1 aktiválása az alkohol révén lehet a szinergista hatás fontos tényezője (19,20).

3.2. Epigenetika. A mikro RNS rendszerről általában.

Ma a tudományos állásfoglalás szerint a rosszindulatú daganatos megbetegedések legnagyobb része olyan genetikai megbetegedés, amely környezeti, civilizációs eredetű ártalmak károsító hatása következtében alakulnak ki. A daganat kialakulásának, többlépcsős modellje alapján a folyamat évtizedekig is tarthat, változhat, és a génekben bekövetkezett mutáció többszörös volta okozza aztán a kialakuló betegséget (14).

A legutóbbi másfél, két évtized kutatásainak előterébe új típusú kutatások és kissé más megközelítésű tudományos gondolkodás került. A génmutációk, akár egyes, akár mindkét

allélra kiterjedő bázis sorrend változásai vagy a nukleinsavhoz kapcsolódó káros termékek kutatásán túl a transzkripció szintű és a posttranszkripció folyamatokra koncentráló kutatások új összefüggéseket találtak, amelyek igazolhatóan a környezeti tényezők jelenlétével korrelálnak. Az epigenetika tehát ezeknek a közvetlen, adott bázis sorrendet tartalmazó információs egységeken túli, azokon kívüli folyamatokkal foglalkozik (21). A genetikai szabályozásról alapvetően megváltozott a tudományos álláspont, amikor az addig a tudományos érdeklődésen kívül maradó, vagy azt eredménytelenül kutató DNS szakaszcsoportokról derült ki, hogy alapvető szabályozó elemeket kódol (21,22). Az addig csak „hulladék” DNS-nek tartott szakaszt, ami amúgy a DNS molekula több mint 98%-a, evolúciós maradványnak, felesleges, vagy molekulastabilizáló, helykitöltő funkcióra hivatottnak gondolták. Ezzel szemben az erről a szakaszcsoportokról átíródó rövidláncú RNS molekuláknak döntő szerepe van a posttranszkripció folyamatszabályozásban (23,24).

A miR-ek másik része az intronok belsejéből kódolódik (21). Az epigenetikai kutatások magyarázatot adtak nem csak a környezeti hatások emberi szervezetre gyakorolt közvetlen hatására, de egy-egy környezeti tényező hatásának örökletes voltát is magyarázzák. Ugyanakkor nem kizárólagosan a miR-el kapcsolatos vizsgálatok képezik az epigenetikához köthető eredményeket, a DNS metiláció vagy a hiszton fehérjék génexpressziókat befolyásoló hatásai is az intenzív kutatások tárgya (25, 26).

A kutatások rendkívüli intenzitással folynak világszerte, különösen amióta 2006-ban Nobel-díjat kaptak a téma kutatói az RNS interferencia jelenségének leírásáért. Először népszerű néven „gén-csendesítés” elnevezéssel illetett új szabályozó rendszerrel kapcsolatosan évi közel 10.000 publikáció jelenik meg.

3.2.1. miR-ekről részletesen

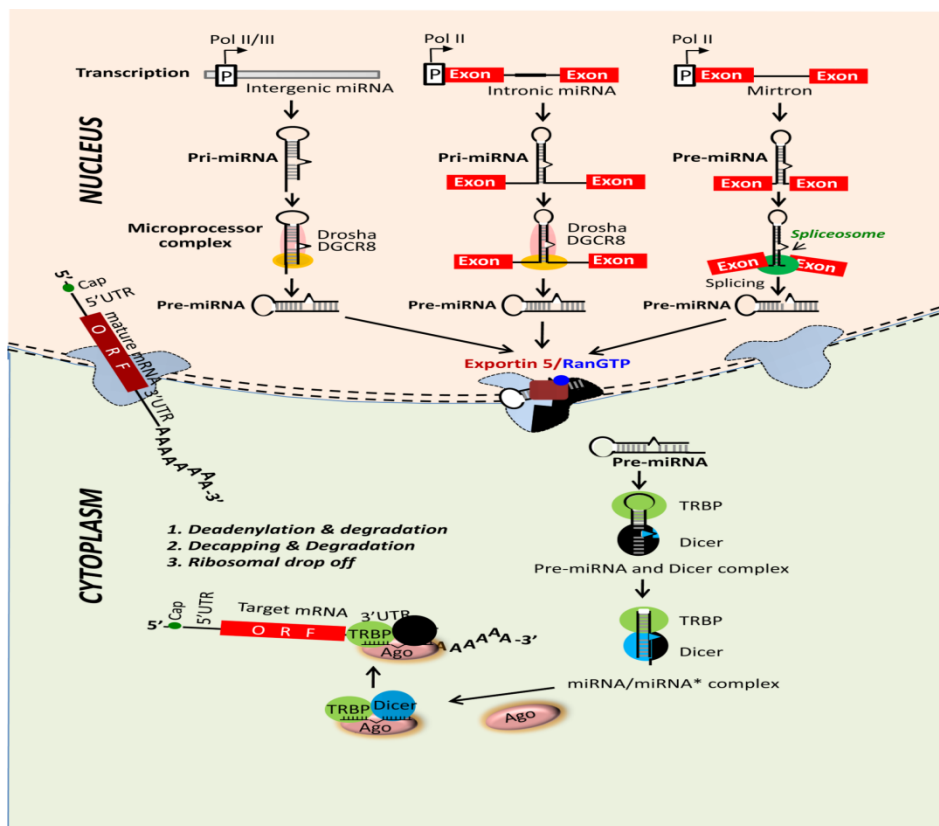
A miR-ek a DNS fehérjét nem kódoló részéről átíródó 19-23 nukleotidból álló egyszálú RNS molekulák. Expressziójuk a posttranszkripció szabályozás alapja. Az eredeti genetikai kódot továbbító mRNS-hez interferálva gyakorlatilag megakadályozzák a transzláció létrejöttét. A miR-eket kódoló gének gyakorta vannak a kromoszómák töréspontjai közelében, már azonosított, betegségeket kódoló gének mellett (26,27).

A miR-ek azon túl, hogy rövidláncúak, más szerkezeti tulajdonságban is különböznek az RNS család tagjaitól. Jellemezőjük, hogy érési folyamatuk elején kettős láncúak, majd a prekursor formák átalakuláson esnek át. Az interferencia jelensége minden bizonnyal evolúciósan fixált mechanizmus (28,29,30).

3.2.2. miR-ek biogenezeise

A miR-ek transzkripciója az RNS polimeráz II. közreműködésével történik, egy hajtű alakú prekursor keletkezik: ez a pri-miR. Az érési folyamatban a következő lépés a hurok leválasztása egy endoribonukleáz (III.) a DROSHA működésével. Egy kofaktoral együttműködve hat. Így keletkezik egy közti termék a pre-miR, ami még több tíz nukleotid hosszú. A folyamat eddig a pontig a sejtmagban játszódik. Speciális exportin és kofaktora révén a citoplazmába jut a pre-miR, ahol egy ribonukleoprotein komplexbe épül be. Következő lépésben egy ribonukleáz DICER és kofaktora a terminális hurok eltávolítását végzi. A komplexben kettéválk az addig dupla szál, amiből az egyik degradálódik. A miRISC effektor működését az Argonauta fehérje család tagjai végzik (25,31). Az érett miR a mRNS 3' végéhez kötődik. A transzláció gátlása humán vonatkozásban ily módon valósul meg. Egyéb fajokban az egész, az interferenciában részt vevő mRNS degradáció is megtörténhet. Ennek előfeltétele a teljes komplementeritás az interferenciakor. Az

eukarióta sejtekben a csendesítéshez nem feltétel a száz százalékos komplementaritás megléte. A hatástalanítás így is megtörténik (26,32,33). (1. ábra)



1. ábra: miR érési folyamatának molekuláris mechanizmusa (21)

A miR-ek kutatása rohamléptekkel halad. Az egyes miR-ek azonosítása, funkciójuk kutatása adatbázis létrehozását tették szükségessé. A www.mirbase.org honlapon a legfontosabb ismérvek összefoglalóját megtalálhatjuk az egyes, számmal jelzett miR-ek vonatkozásában, úgy a pri-, pre-, mint az érett miR jellemzői szerepelnek.

Az érett miRNS-ek száma 2014-ben már az 1500-hoz közelített, és a szám folyamatosan bővül az alapkutatások eredményeit összefoglalva illetve bővítve. Nagy valószínűséggel mondható, hogy a gének legkevesebb 30%-a miR szabályozás alatt áll. A helyzet rendkívül komplex, mert egy-egy miR számos target mRNS-hez képes kapcsolódni, illetve egy-egy mRNS 3'UTR szakaszához több miR is kapcsolódhat (29). Ezáltal a szabályozásnak

rendkívül sok variációja lehetséges. A miR és a cél mRNS kapcsolódásának lehetőségei azonban, bár ismert jó néhány szabályszerűség és összefüggés, még nem teljes körűen feltárt. Sőt a lehetőségek számossága miatt leginkább csak bioinformatikai módszerekkel lesznek becsülhetők és követhetők az interferenciák hatásai (33).

3.2.3. miR-ek funkciójáról

Egy mondattal kifejezve: feladatuk, vagy működésük értelme a gének finomhangolása. A koreguláció abban is megnyilvánul, hogy funkcionálisan összetartozó gének, azonos útvonalhoz tartozóan nem véletlenszerűen, hanem összehangoltan lépnek működésbe. Az egyes miR családok maguk is együtt, clusterba rendeződve jutnak érvényre (34). A miR-ek a cél mRNS-en hatásukat csak nagymértékű expressziójukkal képesek kifejteni, ez 1,5-4 szerez mennyiséget jelent a target mRNS-hez képest. Működésük nem egyenletes expresszióval történik, elválasztódásukat feltehetően számos külső körülmény befolyásolja (35).

A miR-ek az egész élővilágban, beleértve az egysejtűeket is jelentős élettani szereppel bírnak, és a törzsfajlás egyes szintjein alapvető hasonlóságot mutatnak felépítésükben, hatásukban. A biológiai kutatások eredményei ezért jól egyesíthetők és részben adoptálhatók a humán genetikai kutatásokra is (35,36).

Mindemelett a gének száma az egyes törzsfajlás szinten álló élőlényekben és az ismert miR-ek száma ugyanazokban, egymáshoz képest más nagyságrendet képvisel (37).

(III.táblázat)

	Gének száma	miR-ek száma
Ecetmuslinca	14 000	kb. 150
Egér	23 000	kb. 500
Ember	21 000	kb. 1500

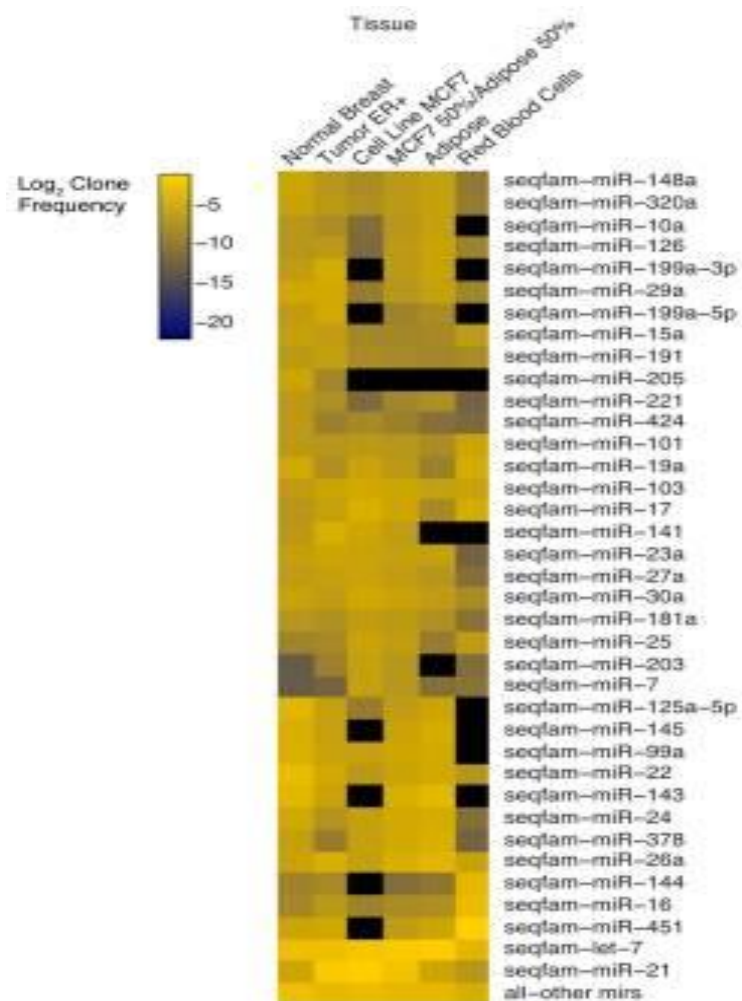
III. táblázat: Példák a gének és miR-k számváltozására az evolúció során (37)

Az élettani hatásai az egyedfejlődés, a sejt differenciálódás, területén is szóba jön. Fontosak az immunológiai, a hormonális szabályozás területén is. Külön-külön vizsgálatok és miR azonosítások történnek különböző betegségekben, de talán mindennél intenzívebb kutatások folynak az egyes daganatok miR mintázatának azonosítására és változásainak mérésére a betegség lefolyása során.

3.2.4. miR-ek és a daganatok

A miR-k azonosítása után hamarosan fény derült integráló szerepükre a sejtszaporodás folyamataiban, ezért a tumorkutatások egyik vezető helyére kerültek. Felfedezésük kezdetétől adódott, hogy kapcsolatban állhatnak a tumorgenezissel, már csak azért is, mert a kromoszómák töréspontjaihoz közeli helyekről kódolódnak. Továbbá hamar észlelték, hogy eltérő expressziók mérhetők a különböző daganatokban (35).

A szervek összetétele heterogén, sokféle sejtből állnak. Valamennyi sejt típusnak a többitől elkülöníthető génexpressziós programja van. A betegségek nem csak az általuk érintett sejt típus génexpressziós mintázatát, de a sejt típusok addigi összetételét is befolyásolják. A leginkább jellegzetesek és eltérőek a normáltól a tumorminták profiljai (35). Az ugyanazokat a miR kifejeződéseket meghatározva különböző szövetekben, jellegzetes az azonos miR kifejeződések különbsége. (2. ábra)



2. ábra: Néhány szövet miR profiljának mennyiségi különbsége (35)

3.2.5. miR-ek onkogén és szupresszor szerepben

A miR-ek tumorgenezisben kifejtett hatásának lehetséges értelmezése szerint hatásuk felfogható, mint tumor szupresszor és tumor onkogén szerep annak megfelelően, hogy a target mRNS onkogén vagy szupresszor gén transzkriptuma. A mRNS és a miR interferencia eredményeként ugyanis az eredeti transzkriptum kód nem jut érvényre. A gének legkevesebb 30%-ban, de egyes szerzők szerint 60%-ban állnak a miR rendszer szabályozása alatt (26). A miR-ek alul vagy felül reguláló hatása mérhető a különböző rosszindulatú daganatokban. Egy-egy daganattípusban vannak teljesen következetesen

felülmérhető, vagy alulreprezentált miR-ek. Ugyanakkor a miR expresszió nem kifejezetten látszik oki tényezőnek a tumorgenezisben. De a miR-k alul- vagy felülmérthelettsága sok esetben összefüggést mutat egyes daganatokkal. Nem egyszer a daganat klinikai stádiumával és szövettani besorolásával is. Expressziójuk clusterekben történik. Az egyik legtöbbet vizsgált a miR17-92 cluster. Magas expressziójuk markáns oncomir hatású többféle tumorban mérhető. Mégis a miR család tagjai közül van egy eltérő viselkedésű és alulregulált néhány tumorfélében. A többitől eltérően supresszor funkciónak látszik a hatása (26).

Vizsgálatok sokasága méri a különböző tumorokban a miR szinteket és változásokat. Különböző tumorokkal egészen végzett kísérletek vagy sejtenyészetekkel végzett kísérletek igazolták különböző mértékű és változó expressziójukat (31,35). (IV. táblázat)

miR	Tumor	Diagnosztikus jel
155,182,197	Tüdőrák	overexpresszió
378,451	Veserák	overexpresszió
215,299	Emlőrák	overexpresszió
143,222,452	Hólyagrák	overexpresszió

IV. táblázat: Egy-egy gyakori daganat és egyes miR expressziók kapcsolata

A miR-k kimutathatók a testvázadékokban, de szöveti szinten is mérhetőek, a paraffinba ágyazott szövetekből standardizált eljárással kivonhatóak, és úgy mérhetőek.

3.2.6. Vizsgálatunkhoz választott miR-ekről

A nyelőcső- és gyomorrákok kialakulási folyamatában számos miR vizsgálata történt, és került azonosításra. A kétféle tumor eseteiben általunk is vizsgált miR-ek kiválasztása a szakirodalmi hivatkozások alapján történt úgy, hogy a daganat kialakulási folyamatban, a diszregulációban több szignálúthoz is kötődjön.

Továbbá a választásnál figyelemmel voltunk arra, hogy az egyes életmódi és környezeti tényezők hatása a miR expresszióra hogyan függ össze más szerzők vizsgálatai szerint (38, 39). Ez utóbbi témában alig találtunk közleményt, azok is többnyire csak dohányzásra vonatkoztak.

Nyelőcsőrákos betegek esetében a kiválasztott betegek szövettani mintáiban miR-21, miR-143, miR-196a, miR-203, miR-205, miR-221 szinteket később részletezendő összehasonlításokban mértünk, míg a gyomorrákos betegek esetében a miR-21, miR-34a, miR-93, miR-143, miR-203, miR-205, miR-223 expressziókat hasonlítottunk össze.

A nyelőcsőrákot genetikai szempontból, különösen a laphámrákot, csak az utóbbi időben vizsgálják részletesebben, de ma sem tartozik a kutatások elsővonalbeli témái közé. Nyilván, a mérsékeltebb gyakorisága, esetleg földrajzi koncentrációja miatt. Utóbbi években azonban az ázsiai, távol-keleti kutatók éppen a terület érintettsége folytán már nagy számban kiterjesztették kutatásaikat erre a betegségre is.

Összefoglalóan ki lehet jelteni, hogy a miR szabályozás kiterjed minden olyan génre, amelyek részt vesznek a sejtproliferáció, az apoptózis, a sejt migráció, vagyis a metasztázis képződés, de az érújráképződés folyamataiban is.

A miR-21 sejtproliferációt serkentő hatású, az Eca109 sejtvonalon igazolható, az ERK1/2/MAPK jelút aktiválása eredményezi ezt (40).

Li és munkatársai úgy találták, hogy a miR-21 magas szintje a nyelőcső laphámrák progresszióját okozza, a PTEN szupresszor gén szabályozott fehérje termelés csökkentése útján (41). Wang és munkatársai által végzett kutatásban a miR-21 inhibitort EC-1 és EC9706 sejtekbe juttatva megfigyelhető volt, hogy megnövekedett a Fas és természetes ligandja, valamint a RECK és TIMP 3. Mindezek a tumornecrozist mozdítja elő (42). Indirekt módon igazolja a miR-21 onkomiR természetét.

Ni és munkatársai a miR-143 vonatkozásában igazolták, hogy a nyelőcsőrákos sejtvonalon a magas miR-143 szint fokozza az apoptózist, és visszafogja a sejtproliferációt (43). Más szerzők az alacsony miR-143 és miR-145 mellett az ESCC sejtek inváziós és migrációs készségének növekedését tapasztalták (44). Az azonos összecsengésű eredmények a miR-143 target génjének hatásával érthetők. Az FSCN1 az actin építőfehérje génje, s mint ilyen a filamentumok, sejtheadheziók erősségét biztosítja. Nélküle, a stabilitás hiányában az invázió, a metasztázis folyamatai erősödhetnek.

A miR-196a az ANXA1 vagy p53 alulreprezentáltságát okozva a nyelőcsőrák tumorgenezisének korai jele. Már 2004-ben igazolták (HU és munkatársai) hogy ezen Ca és phospholipid kötő fehérje hiánya a nyelőcsőrák korai jele illetve már kifejezett dysplasiában is mérhető Annexin A1 veszteség. Tehát a miR196a és ANXA A1 inverz kapcsolatban állnak (45).

A miR-200-s család egy nagyon sokat kutatott részterület, számos daganatban leírták kulcsszerepüket. Clusterba rendeződésük és együttthatásuk is az egyik elsőként leírt és igazolt működési elem a miR-ek körében. A homeotikus szektorgének targetjei, olyan transzkripciós faktorok kifejeződését szabályozzák, amik az epitel-mesenhimális átalakulásra, a proliferáció mértékére, vagy az apoptózis folyamataira is hatással vannak (46,47). Az együttes elválasztódás nem jelent feltétlenül azonos hatást.

miR-203 a nyelőcső laphámrákos szövetben, illetve sejtvonalakban indukálja az apoptózist, visszafogja a sejtproliferációt, a migrációt és inváziót, és fékezi a miR-21 hatást (48).

Ha a nyelőcsőrákos sejteket miR-203 hatásnak tették ki, a sejtproliferáció mérséklődését tapasztalták. Ez a hatás deltaNp63 targetálásával jön létre. Ez a tumor fehérje a p63 promótere és blokkolása antiproliferációs hatással rendelkezik (49).

A miR-205 az epitel-mesenchimális sejt átalakulást (EMT) gátolja, a ZEB2 útján, az E-kadherin kötőfehérje termelését növelve. A fehérje a CDH1 szupresszor gén terméke (50).

A miR-221 is egy gyakran vizsgált, onkogén hatású miR. A PTEN szupresszor gén hatás blokkolása révén, a nyelőcső laphámrákban is az apoptózis, a proliferáció, és az invázió befolyásolásával fejti ki hatását (51).

Gyomorrákban szenvedő betegek mintáiban miR-34a expressziót mérték. A miR-34a-c szintén egy miR családnak tekinthető és tagjainak hatása in vitro és in vivo is igazolható volt. A miR-34a eltérő expressziója többféle tumorban is mérhető volt a gastrointestinalis rendszerben, így a gyomorcarcinomában is (52). Magas expressziója onko-szupressziós hatásként értékelhető, a szupresszióban kiemelkedő hatású p53 gén mediálásában, a cMyc és CDK6 targetálásával. A Sirtuin1 gén fehérjék inhibitorának is tűnik, így fontos befolyásolója sejten belüli anyagcsere folyamatoknak (54,55).

A miR-21 szerepét, már a nyelőcsőrákkal kapcsolatos felsorolás is tartalmazta. Szinte valamennyi szerző megemlíti, hogy a daganatképződésben kulcsszerepet betöltő miR kifejezett onkogén, (onkomiR) hatással rendelkezik, amit a ventriculáris mirigyhámrákok esetében is többszörösen igazoltak. Gátolja a PTEN gén kifejeződését, ugyancsak negatívan hat a PDCD4, a SPRY1, a SPRY2 működésre, zavarja az apoptózis és a sejt proliferáció normál folyamatait (56,57). Zhang és munkatársai úgy találták, hogy a

gyomorkarcinoma kifejezett progressziója idézhető elő a miR-21 overexpressziójakor mert, a RECK tumorszupresszor gén által közvetített regulációt zavarja. Sőt, kapcsolatot találtak a magas miR-21 expresszió, a *Helikobakter pylori* és gyomor carcinoma között is (58).

Kutatásunk során anyagainkban vizsgáltuk a miR-93 jelenlétének mértékét is. Ez a miR a miR-106B-25 család tagja, erősíti a daganatnövekedést és az érújráképződést az emberi daganatokban feltehetően az integrin-Béta8 befolyásolásával, a Cdk inhibitor fehérje-család tagjainak gátlásával, a G1 fázis sejtjeire hatva. Cél génje a p21 (58,59).

A miR-143 vizsgálatával kapcsolatban kiderült, hogy a gastrointesztinális tumorokban, főként vastagbél és nyelőcső érintettségben, alacsonyabb expressziót találtak. A KRAS és a DNMT3A géneket blokkolja (60,61,62).

A miR-223 direkt targetjeként szerepel a TP53INP1 (22). A miR-223 szerepét számos daganatban leírták, alulexpresszálságát kolorektális, hepatocelluláris tumorokban és gyomorrákban is észlelték, ahol a STMN1 feltételezett targetjeként azonosították (64). A miR-203, miR-205 szerepét a nyelőcső vizsgálatnál részleteztem. A gyomor adenokarcinoma eseteiben, mindkettő a ZEB1 és az ERBB gének hatását szuprimálva, mint szupresszor gén működik. De vizsgálták a normál epiteliális struktúrában fenntartott szerepét is (65). A vizsgálatok váltakozó eredményt mutatnak magas és alacsony kifejeződésükről. A miR-205, a PTEN gátlása útján, a CYR 61 és a CTGF befolyásolásával, a tumor iniciációt, progressziót idézi elő gyomorrákban (66).

A tumoros és normál szövetek, külön a soliter és külön a hemopoetikus eredetű tumorok miR mintázat különbségét számos fenn is hivatkozott tanulmány kutatta.

A környezeti tényezők és egyes tumorok összefüggései a miR mintázat változás vonatkozásában jóval kevesebb tanulmány tárgya volt. Az irodalomban is inkább epidemiológiai vizsgálatok olvashatók a kockázat növelő tényezőkről. Az azonos vagy közel azonos klinikai stádiumú, és azonos szövettani besorolást mutató daganatos betegségben szenvedő betegek szövettani anyagait az anamnézisben fellelhető környezeti, életmódi hatások alapján összehasonlító miR expresszió differencia kifejezetten kevés számú kutatás tárgya volt eddigiekben.

A környezeti faktorok kockázat növelő szerepe az egyes tumorok patogenezisében, elsősorban epidemiológiai vizsgálatok alapján, tankönyvi tény.

Az epigenetikai modifikáció révén befolyásoló külső tényezők tisztázása nagyon jelentős lehetőség a prevenciók technikák meghatározásában. A gyomor-béltraktus tumorainál a táplálkozás és az általánosan negatív hatású életmódi tényezők szerepe biztosnak látszik. Az étrendi hibák, az alkoholvási és dohányzási szokások, de a stressz, bizonyos infekciók, mint epigenetikai moduláló faktorok jönnek szóba (67).

Takanabe és munkatársa (2008) egerek mezenterialis zsírszövetében megnövekedett miR-143 szintet talált, magas zsírtartalmú étrendes etetés után (68).

A mikronutriensek szerepét, különösen az E-vitamin, és a folsav hiányára, állatmodellekben, de emberi szövetben is kutatták Marsit és munkatársai 2006-ban. A miR-ek szintjének megemelkedését írták le a folsav hiány eseteire (69). Más szerzők az E-vitaminhiányos étrend hatását vizsgálták patkányok májában. A miR-122-125 cluster csökkent expresszióját találták (70). Hosszantartó alkoholhatás a miR-34a, miR-103, miR-107, miR-122 emelkedését, valamint a miR-19b és miR-200b csökkent szintjét okozta patkány májszövetben (71). A miR-212 emelkedett szintjét találta Tang és munkacsoportja alkoholos májbetegségben szenvedő páciensek epiteliális sejtjeiben (72).

A dohányzással összefüggő miR mintázat változást tüdőrákos szövetben Seike és munkatársai találtak összesen 36 fajta miR-t vizsgálva. A dohányzási anamnézissel összefüggő kapcsolatot írtak le miR-29b, miR-30b, miR-96, miR-145, miR148a, miR-155, miR-191, miR-210, miR-223 vizsgálata során (73). Avissar és munkatársai a miR expressziók és alkohol fogyasztás kapcsolatát kutatták fej-nyak tumoros páciensekben. A miR-375 magas szintjét írták le a fogyasztással összefüggésbe, illetve a miR-21 magas szintjét a rossz prognózissal kapcsolatban (74). Yang és munkatársai 2013-as közleményében a nyelőcsőrákos betegek szövetmintáinak eltérő miR mintázatát találták a rizikó faktorok szerint. Életkort, étrendi szokásokat, dohányzást, alkoholfogyasztást vizsgáltak. Csökkent expressziót találtak miR-139p, és miR-338p esetében, az emelkedett mértékű rizikókkal összefüggésben, és kifejezett emelkedett miR szinteket miR-21, miR-183, miR-574p, miR-601p mérésekor. Szignifikáns volt a kapcsolat az erősen ivó és a miR-21 emelkedésének mértéke között (75).

A gyomorrák vonatkozásában több vizsgálatot is végeztek az alacsony szociális státusz, valamint az ezzel részben összefüggő *Helikobakter pylori* fertőzések kapcsolatáról. A dohányzás, az alkoholfogyasztás, és néhány demográfiai adat: életkor, nem, lakóhely magas rizikóját találták a gyomor adenokarcinoma kialakulásában (76,77).

Zhang és munkatársai azonosítottak olyan GSTP1 allél variánst, amelynél gyakoribb a dohányos, nagyivó páciens és a *Helikobakter pylori* előfordulása a gyomorrákos esetek előzményében (78). Történtek vizsgálatok kínai népcsoportban, ahol egyes polimorfizmusok mellett kapcsolatot találtak a daganatos kimenet és a dohányzási valamint az alkoholfogyasztási szokás között (79).

4. CÉLKITŰZÉSEK

1. A Vas megyei Markusovszky Egyetemi Oktatókórházban kezelt nyelőcsőrákban és gyomorrákban szenvedő betegek mintáiban található-e eltérés a normál szöveti mintákhoz képest a kiválasztott mikro RNS- expressziók tekintetében?
2. Nyelőcsőrákban, a kórelőzményekben fellelhető környezeti tényezők, úgymint: lakóhely, dohányzási szokás, alkoholvás alapján képzett betegcsoportok mintáiban mérhető-e mikro RNS-expressziós különbség az azonos vagy közel azonos szövettani besorolás esetén?
3. Gyomorrákban a kórelőzményekben fellelhető környezeti tényezők, úgymint: lakóhely, dohányzási szokás, alkoholvás alapján képzett betegcsoportok mintáiban mérhető-e mikro RNS-expressziós különbség azonos vagy közel azonos szövettani besorolás esetén?
4. A betegek kórelőzményéből ismert két rizikófaktor (dohányzás és alkoholfogyasztás) együttes jelenléte változtat-e az egyesével előforduló rizikók mikro RNS-expresszió mintázatában?
5. A szociális státusz okozta különbség mérhető-e a mikro RNS-expresszió változásban?
6. A mikro RNS-expresszió összefüggésben áll-e az azonos vagy közel azonos szövettani stádiumú betegségben szenvedő betegek túlélésével?

5. METODIKA

5.1. Beteganyag

Vizsgálatainkhoz a betegminták és ezekhez adatok a szombathelyi székhelyű Markusovszky Egyetemi Oktatókórházból származnak.

A gyomorrákos vizsgálathoz 39 páciens mintáit használtuk (25 férfi és 14 nő). Az átlagéletkor (a műtét idején) 62.12 év volt. A páciensek 2005 és 2010 között operált, gyomor-eltávolításon átesett azon betegek közül kerültek ki, akiknek diagnózisa adenokarcinoma volt. Klinikai stádiumaik az alábbiak voltak: III. stádium–29 beteg, IV. stádium–10 beteg. A kórház MedSol betegnyilvántartói rendszeréből kerültek leválogatásra.

Nyelőcsőrákos betegminta 20 állt rendelkezésünkre. Szövettanilag ezek mind laphámrákok voltak. 20 páciens (17 férfi és 3 nő), átlagéletkoruk 61.5 év. A diagnózis idején III. vagy IV. stádiumban voltak.

Kontrollként mikroszkóposan a normál szerkezetű gyomor és nyelőcső szövetminták szolgáltak. A gyomor normál szöveti minták betegek műtési anyagából, az ép szöveti részből kerültek kimetszésre. A nyelőcső normál szerkezetű szövettani anyagait nem minden esetben tudtuk ugyanabból a betegből származtatni.

Az epidemiológiai adatok részben a kórházi adatbázisból, az ott nem szereplők pedig a páciensek házi orvosaitól származnak. E tekintetben vizsgáltuk a dohányzási szokásokat (két kategória: dohányzó [a diagnózis felállítása előtt legalább 10 évig dohányzott] és nem dohányzó), az alkoholfogyasztási szokásokat (két kategória: napi több mint két egység alkoholfogyasztás ellentétben ennél kevesebb), és a szociális helyzetet (magas vagy alacsony [munkanélküli és/vagy rokkant és/vagy minimálbér, mint jövedelem]). Egy

egység alkoholfogyasztásnak tekintettük a máj által egy óra alatt lebontható mennyiséget (8-12 mg)

Az e tekintetben létrehozott csoportok (epidemiologiai adatok) között sem az életkor, sem a betegség stádiuma tekintetében nem volt szignifikáns különbség.

Minden tevékenységünk jogi, továbbá a kórházi és a tudományos életben előírt etikai szabályok figyelembe vételével történt (1997. évi CXLVII. tv. 21.§.). Tudományos kutatási engedély: (0/31-0/2011).

5.2. RNS kivonás

A nukleinsavat, mint alapanyagot a kórszövettani feldolgozáshoz használt, formalinban történt fixálás után, paraffinba ágyazott blokkokból nyertük. 10 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyekből deparaffinálással jutottunk a vizsgálandó ribonukleinsavakhoz. A deparaffinálást proteinase előkezelést követően xylol-ethanol felhasználásával végeztük. A RNS extrakcióhoz a High Pure FFPE RNA Micro Kit-et (Roche, Németország) használtuk, a gyártó előírásainak megfelelően. Az ily módon izolált miRNA koncentrációját és tisztaságát abszorpciós fotometriával, 260/280nm-en ellenőriztük. Az optikai denzitások hányadosai 1,9-2,1 voltak.

5.3. Reverz transzkripció

Mikro-RNS-ből cDNS előállításához Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit-et használtunk (Roche, Németország). A 20 µL revers transcriptase keverék 2 µL miRNS templátot, 2 µL véletlenszerű hexamer primert, 4 µL revers transcriptase reakció puffert, 0,5 µL revers transcriptase transcriptort, 2 µL deoxynucleotid keveréket, 0,5 µL RN-áz gátlót és 9 µL H₂O –t tartalmazott.

A reakcióelegyet 30 percig 55°C -on inkubáltuk, amelyet a reverz transkripciónak 80°C -on történő, öt perces inaktivációja követett.

5.4. qRT-PCR analízis

A valós idejű, mennyiségi láncreakciót (quantitative real time polymerase chain reaction = qRT-PCR) Light Cycler 480 Light Cycler rendszerrel, SYBR Green Kit-tel végeztük (Roche, Németország). A 20 µL PCR elegy a következő összetevőket tartalmazta: 5 µL template cDNA, 2 µL szekvencia specifikus primer, 10 µL Master Mix és 3 µL H₂O.

A miR-specifikus primereket (miR-21, miR-34a, miR-93, miR-143, miR-203, miR-205, miR-223) a TIB Molbiol cég készítette, melyek részletesen a következők voltak:

miR-21

forward: 5'-GCTTATCAGACTGATGTTGACTG-3',

reverse: 5'-CAGCCCATCGACTGGTG-3';

miR-34a

forward: 5'- TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTG-3',

reverse 5'-GGCAGTATACTTGCTGATTGCTT-3';

miR-93

forward 5'-AAGTGCTGTTCGTGCAGGT-3',

reverse: 5'-CTCGGGAAGTGCTAGCTCA-3';

miR-143

forward: 5'-TGAGGTGCAGTGCTGCATC-3',

reverse:5'- GCTACAGTGCTTCATCTCAGACTC-3';

miR-196a

forward 5'- TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG-3',

reverse: 5'- ATCGGGTGGTTTAATGTTG-3';

miR-203

forward:5'-TCCAGTGGTTCTTAACAGTTCA-3',

reverse:5'-GGTCTAGTGGTCCTAAACATTTTC-3';

miR-205

forward: 5'- CCTTCATTCCACCGGAGT-3',

reverse:5'- GAACTTCACTCCACTGAAATCTG-3';

miR-221

forward:5'- CCTGGCATAACAATGTAGATTTCTG-3',

reverse:5'- AAACCCAGCAGACAATGTAGCT-3',

miR-223

forward:5'- CCGTGTATTTGACAAGCTGAGT-3',

reverse:5'-TGGGGTATTTGACAAACTGACA-3'.

5s rRNS

forward: 5'-ACGCGCCCGATCTCGTCTGAT-3',

reverse: 5'-GCCTACAGCACCCGGTATTCCC-3'.

5.5. Statisztikai analízis

A kapott eredmények statisztikai elemzését független kétmintás t-próbával, 18.0 és 21.0 verziójú SPSS programokkal végeztük. A különbség mértékét a szokásos $p < 0.05$ értéken fogadtuk el szignifikánsnak.

A túlélés és az egyes miR értékek összefüggésének vizsgálatakor a qRT-PCR során kapott eredményeket minden egyes miRNS median értékei alapján dichotomizáltuk. A median értékek következők voltak: miR-21 – 0.591, miR-34a – 0.147, miR-93 – 0.181, miR-143 – 0.321, miR-203 – 0.252, miR-205 – 0.252, miR-223 – 0.202.

A Kaplan-Meier túlélési görbéket – minden egyes miR-re log rank teszttel készítettük.

6. EREDMÉNYEK

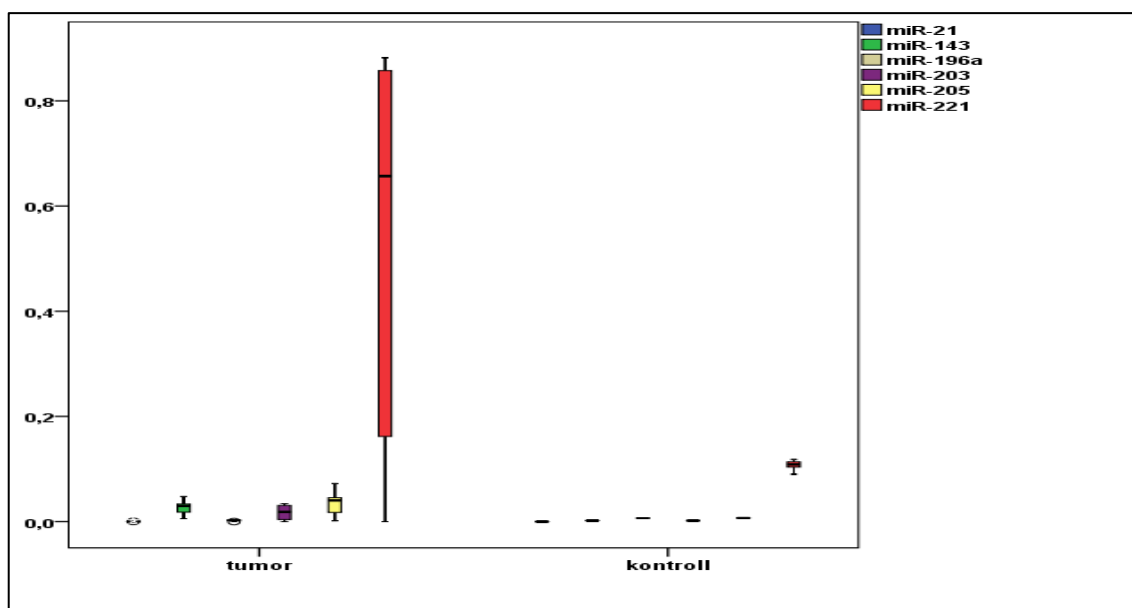
6.1. Nyelőcső laphámrákos betegek mintái

Quantitatív valós idejű PCR vizsgálattal hasonlítottuk össze az előző fejezetben ismertetett szempontok alapján a hat választott mikro-RNS (miR-21, miR-143, miR-196a, miR-203, miR-205, miR221) expressziót **normál és nyelőcsőrákban szenvedő betegek mintáiban**. Aztán a tumoros mintákból képeztünk csoportokat a **dohányzási és alkoholfogyasztási** szokások szerint. De összehasonlítottunk miR expressziókat a betegek **szociális helyzete és lakóhelye** szerint is.

Normál és nyelőcsőrákos szövetek összehasonlítása: (Az expressziós értékek az 5s rRNA-ra standardizálva vannak megadva). Szignifikáns mértékű felül reguláltságot mértünk a miR-21 ($p=0,015$), a miR-143 ($p=0,0001$), a miR-203 ($p=0,0001$), a miR-205 ($p=0,0001$) és a miR-221 ($p=0,001$) esetében. (V. táblázat és 3. grafikon)

	Daganat (Átlag±szórás)	Kontroll (Átlag±szórás)	Változás (x)	p érték
hsa-miR-21	0.0002±0.0003	$1 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-7}$	+20.000	0.015
hsa-miR-143	0.0272±0.0118	$0.0019 \pm 5 \times 10^{-5}$	+14.315	0.0001
hsa-miR-196a	0.0059±0.0124	0.0065±0.0005	-1.101	0.831
hsa-miR-203	0.0176±0.0135	$0.0017 \pm 5 \times 10^{-5}$	+10.352	0.0001
hsa-miR-205	0.0345±0.0195	$0.0069 \pm 1 \times 10^{-5}$	+5.000	0.0001
hsa-miR-221	0.6005±0.5608	0.1081±0.0069	+5.555	0.001

V. táblázat: Nyelőcsőrákos és normál szövetek miR expressziója

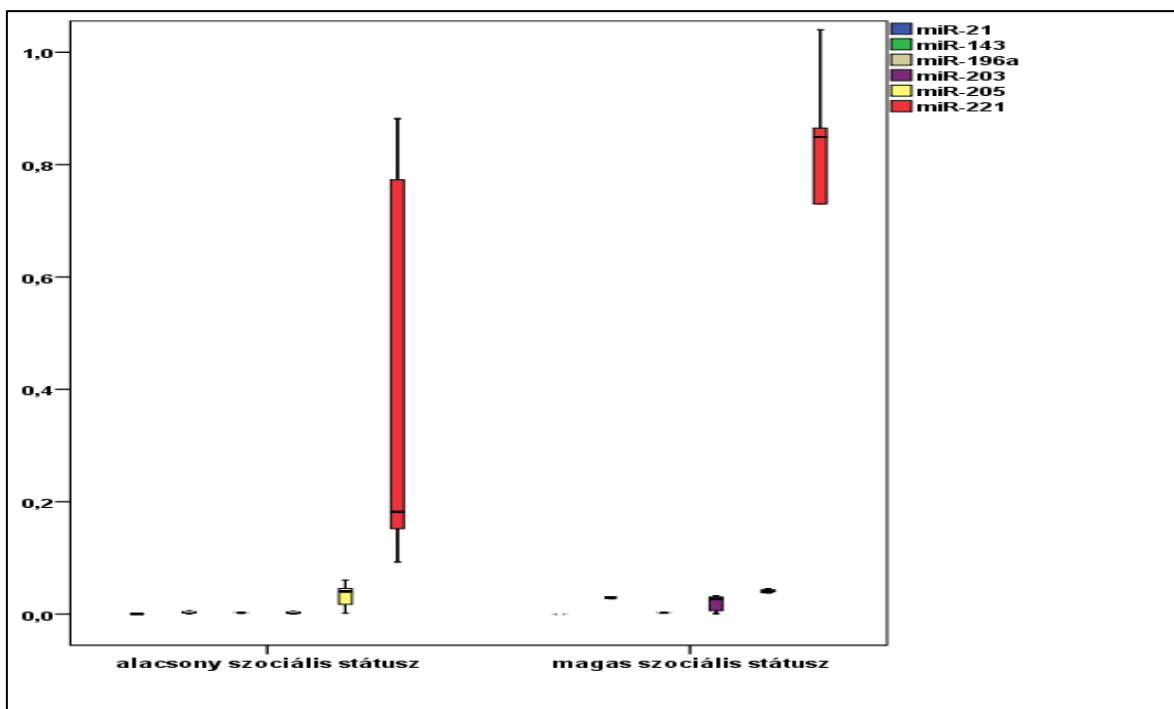


3. grafikon: Nyelőcsőrákos és normál szövetek miR expressziója

Mértük nyelvcsőrákos betegek köréből képezett csoportok között a **szociális helyzet alapján** a miR különbségeket. Jelentős miR143, ($p=0,0001$) és mérsékeltebb miR 203 ($p=0,001$) szignifikanciával alul expresszálságot mértünk a rossz szociális státuszú nyelvcsőrákos betegek mintáiban. (VI. táblázat és 4. grafikon)

	Szociális helyzet		Változás (x)	p érték
	Rossz szociális helyzet (Átlag±szórás)	Megfelelő szociális helyzet (Átlag±szórás)		
hsa-miR-21	0.0001±0.0001	0.0002±0.0005	-2.000	0,432
hsa-miR-143	0.0037±0.0023	0.0304±0.0093	-8.216	0,0001
hsa-miR-196a	0.0041±0.0057	0.0082±0.0177	-2.000	0,475
hsa-miR-203	0.0034±0.0026	0.0205±0.0136	-6.029	0,001
hsa-miR-205	0.0329±0.0196	0.0366±0.0204	-1.112	0,684
hsa-miR-221	0.4386±0.3453	0.914±0.6564	-2.083	0,052

VI. táblázat: Nyelőkcsőrákban nem megfelelő és megfelelő szociális státusz miR expressziója

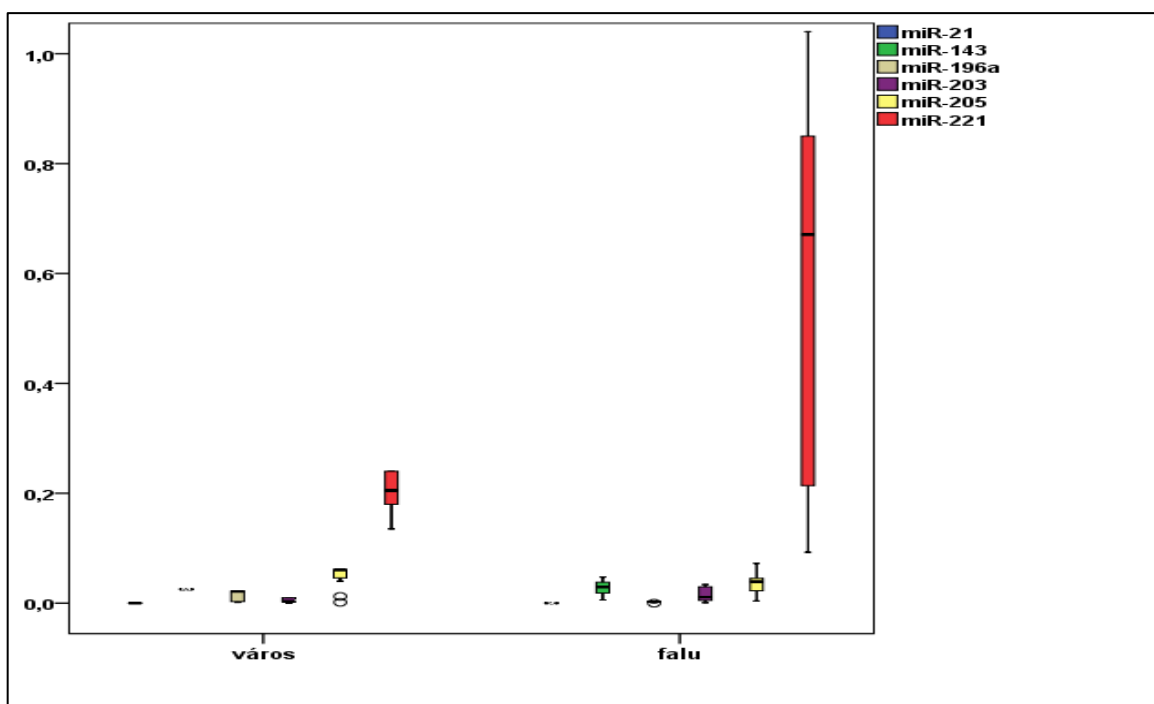


4. grafikon: Nyelőcsőrákban nem megfelelő és megfelelő szociális státusz miR expressziója

Nem találtunk szignifikáns különbséget a miR expressziós mintázatban, amikor összehasonlítottuk az ESCC-s betegek mintáit, **lakóhely szerint**. A városi és vidéki lakosok között nem volt értékelhető különbség ebben a tekintetben. (VII. táblázat, 5. grafikon)

	Lakóhely		Változás (x)	p érték
	város (Átlag±szórás)	vidék (Átlag±szórás)		
hsa-miR-21	$6 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5}$	0.0002±0.0004	+3.333	0.117
hsa-miR-143	0.0251±0.0060	0.0281±0.0133	+1.119	0.482
hsa-miR-196a	0.0147±0.0094	0.0063±0.0148	+2.333	0.088
hsa-miR-203	0.0094±0.0122	0.0164±0.0132	-1.744	0.167
hsa-miR-205	0.0495±0.0195	0.0342±0.0196	+1.447	0.051
hsa-miR-221	0.3377±0.2893	0.7002±0.6328	-2.073	0.064

VII. táblázat: Nyelőcsőrákos városi és vidéki lakosok miR expressziója

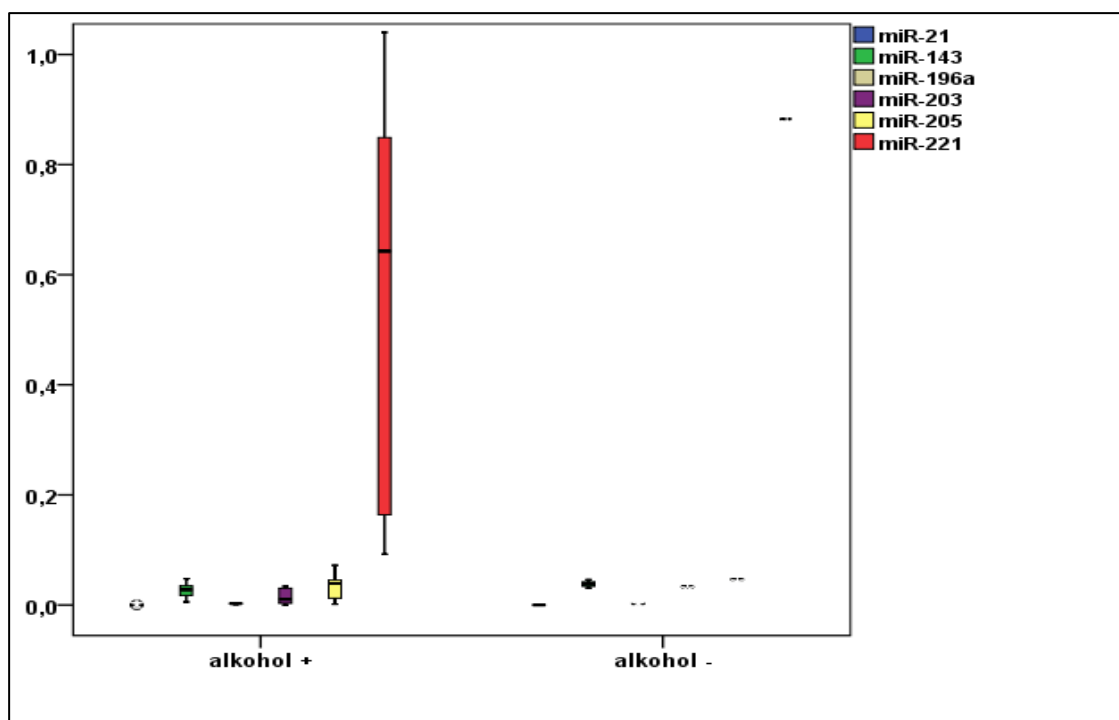


5. grafikon: Nyelőcsőrákos városi és vidéki lakosok miR expressziója

Vizsgáltuk az **alkoholfogyasztás** feltételezett hatását a miR expressziós mintázatra az nyelvőcsőrákos betegek között. Szignifikánsan alacsonyabb volt a miR-143 ($p=0,002$) a miR-203 ($p=0,0001$) és a miR-205 ($p=0,016$) szintje azokban a szövetekben, amik az anamnézis szerint erős ivók mintái voltak. (VIII. táblázat, 6. grafikon)

	Alkoholfogyasztás		Változás (x)	p érték
	nagyivó (Átlag±szórás)	nem ivó (Átlag±szórás)		
hsa-miR-21	0.0002±0.0003	0.0001±4x10 ⁻⁶	+2.000	0.421
hsa-miR-143	0.0264±0.0127	0.0381±0.0049	-1.443	0.002
hsa-miR-196a	0.0065±0.0134	0.0026±2x10 ⁻⁵	+2.500	0.249
hsa-miR-203	0.0153±0.0134	0.0327±0.0011	-2.137	0.0001
hsa-miR-205	0.0327±0.0207	0.0463±0.0009	-1.415	0.016
hsa-miR-221	0.6133±0.5905	0.8811±0.0043	-1.436	0.08

VIII. táblázat: Nyelőcsőrákos erős és mérsékelt vagy nem ivók miR expressziója

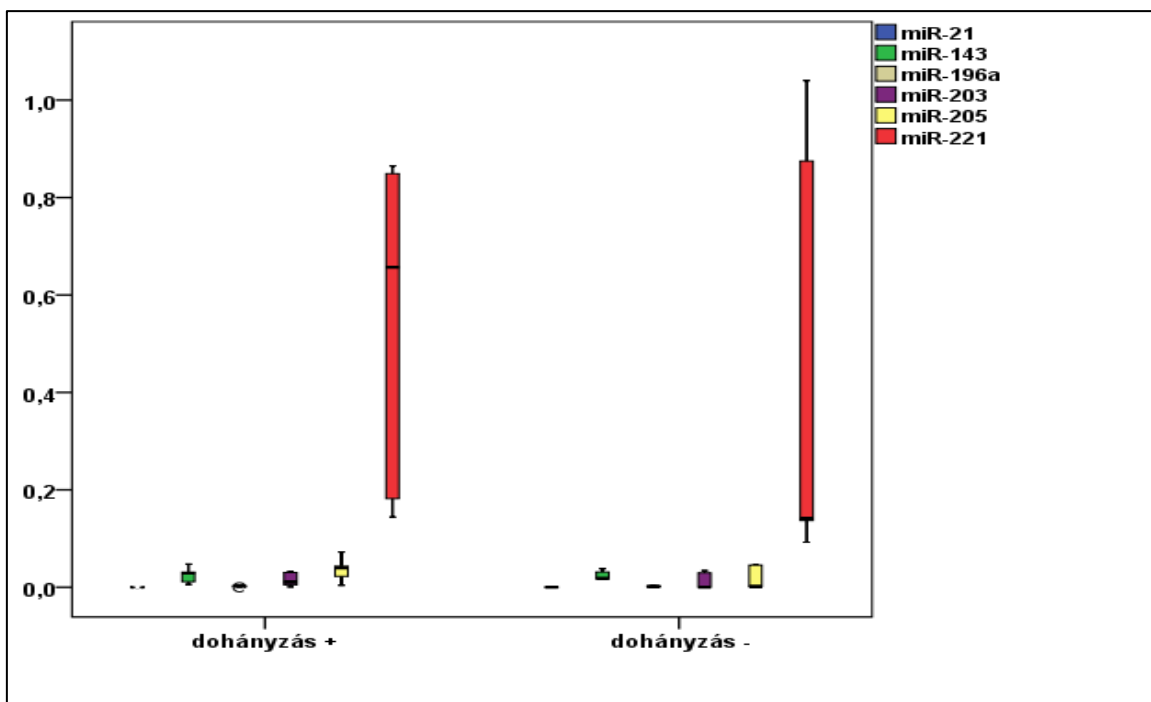


6. grafikon: Nyelőcsőrákos erős és mérsékelt vagy nem ivók miR expressziója

A **dohányzási szokás** alapján is képeztünk csoportosítást a nyelvőcső tumorban szenvedők között. A miR-205 felülreprezentációja kétszeres volt a dohányos csoportban ($p=0,009$). A többi expressziós különbség a szignifikáns szintet nem érte el. (IX. táblázat, 7. grafikon)

	Dohányzás		Változás (x)	p érték
	dohányos (Átlagn±szórás)	nem dohányos (Átlagn±szórás)		
hsa-miR-21	0.0002±0.0004	$6 \times 10^{-5} \pm 6 \times 10^{-5}$	+3.333	0.072
hsa-miR-143	0.0259±0.0133	0.0231±0.0076	+1.121	0.51
hsa-miR-196a	0.0073±0.0148	0.0019±0.0007	+3.842	0.192
hsa-miR-203	0.0164±0.0125	0.0091±0.0148	+1.802	0.196
hsa-miR-205	0.0358±0.0193	0.0145±0.0204	+2.468	0.009
hsa-miR-221	0.6535±0.6125	0.3583±0.3698	+1.823	0.135

IX. táblázat: Nyelőcsőrákos dohányzók és nem dohányzók miR expressziója

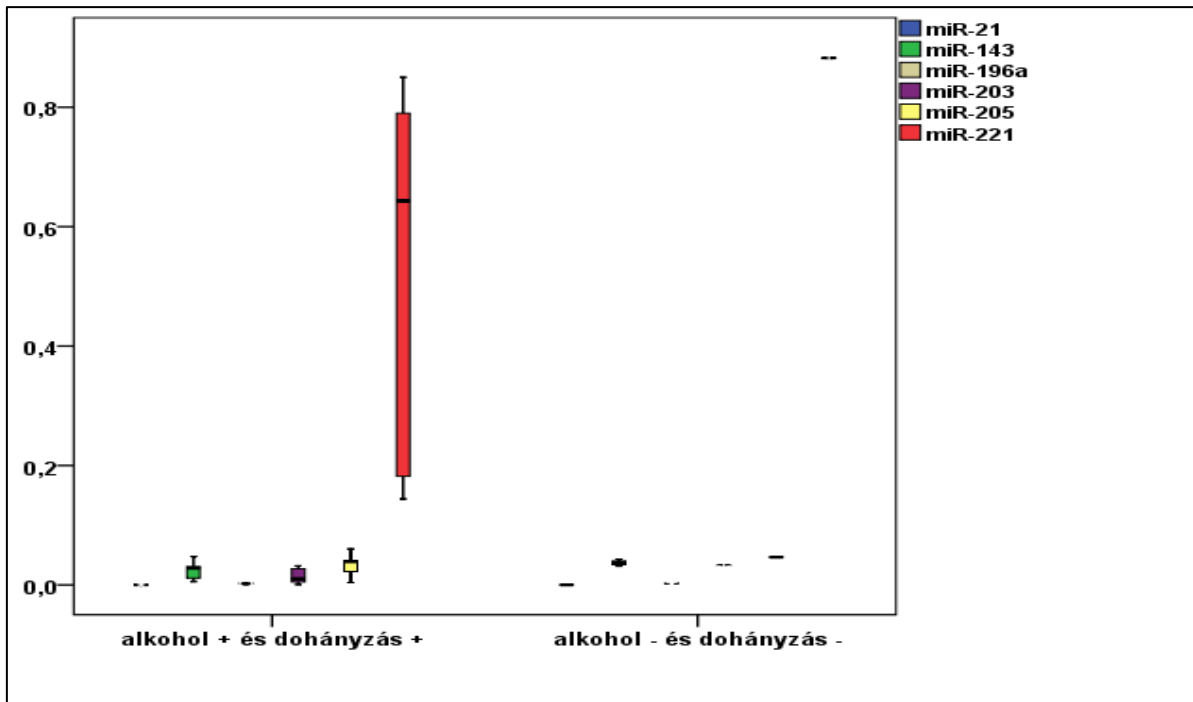


7. grafikon: Nyelőcsőrákos dohányzók és nem dohányzók miR expressziója

Szignifikáns alulexpressziót találtunk azokban a nyelőcsődagatanatos betegmintákban, akiknél **kombinált abúzus (1)** fordult elő a miR-143 ($p=0,012$) és még erősebben a miR-203 ($p=0,0001$) esetén. (X. táblázat, 8. grafikon)

	Dohányzási és alkohol fogyasztási szokások (1)		Változás (x)	p érték
	nagyivó és dohányos (Átlag±szórás)	nem nagyivó, nem dohányos (Átlag±szórás)		
hsa-miR-21	0.0002±0.0004	0.0001±3×10 ⁻⁶	+2.000	0.328
hsa-miR-143	0.0255±0.0138	0.0373±0.0038	-1.462	0.012
hsa-miR-196a	0.0077±0.0153	0.0026±1×10 ⁻⁵	+2.961	0.253
hsa-miR-203	0.0149±0.0123	0.0327±0.0009	-2.194	0.0001
hsa-miR-205	0.0352±0.0203	0.0463±0.0004	-1.315	0.068
hsa-miR-221	0.6373±0.6338	0.8819±0.0015	-1.383	0.189

X. táblázat: Nyelőcsőrákos mintákban kombinált abúzus (1) miR expressziója

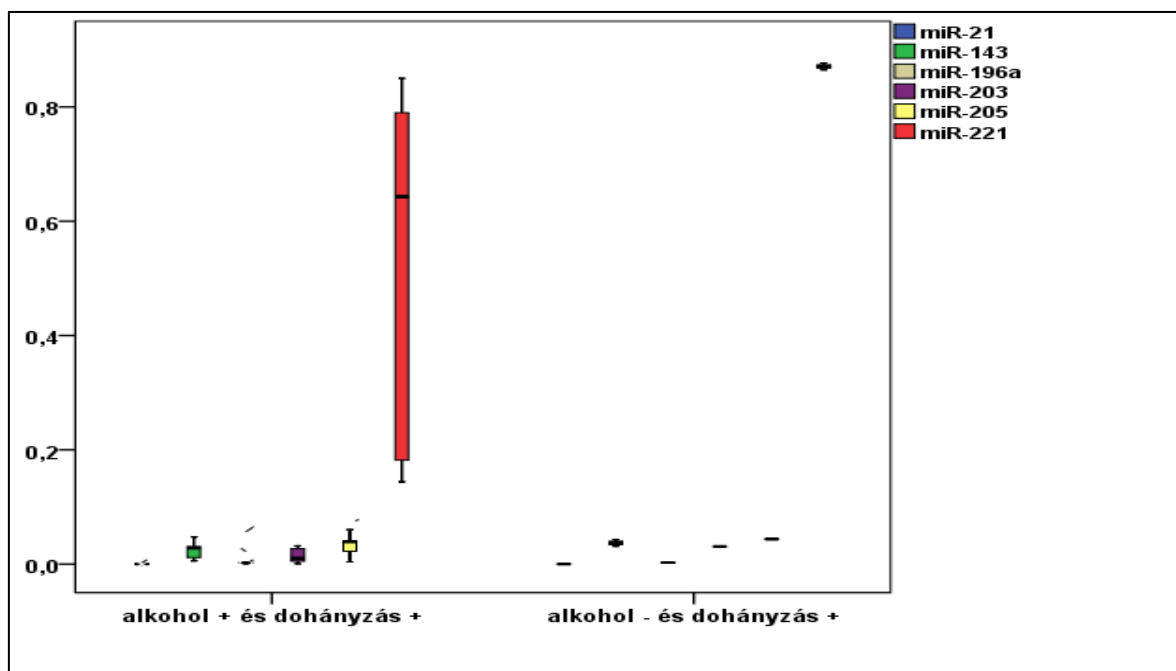


8. grafikon: Nyelőcsőráros mintákban kombinált abúzus (1) miR expressziója

Összehasonítottuk a páciensek mintáit olyan bontásban is, akik **kombinált abúzusban** (2) szenvedtek, az életmódi tényezők tekintetében, míg a másik csoportban csak egyik vagy másik életmódi tényező szerepelt. A kombinált szereket használók miR-143 ($p=0,012$) és miR-203 ($p=0,001$) szintek voltak szignifikánsan alacsonyabbak, mint a dohányos, de nem ivó csoporté. Az ivó és dohányos csoportban a miR expressziót több mint négyszeres arányban találtuk nagyobbak a miR-205 ($p=0,001$) esetében, mint abban a kombinációban, amikor a páciensek alkoholfogyasztók voltak, de nem dohányoztak. (XI., táblázat, 9. grafikon és XII. táblázat, 10. grafikon)

	Dohányzási és alkoholfogyasztási szokások (2)		Változás (x)	p érték
	nagyivó és dohányos (Átlag±szórás)	dohányos nem nagyivó (Átlag±szórás)		
hsa-miR-21	0.0002±0.0004	0.0001±3x10 ⁻⁶	+2.000	0.403
hsa-miR-143	0.0255±0.0138	0.037±0.0038	-1.450	0.012
hsa-miR-196a	0.0077±0.0153	0.0026±3x10 ⁻⁵	+2.961	0.251
hsa-miR-203	0.0149±0.0123	0.0307±0.0003	-2.060	0.001
hsa-miR-205	0.0352±0.0200	0.0439±0.0003	-1.247	0.145
hsa-miR-221	0.6373±0.6338	0.8710±0.0038	-1.366	0.208

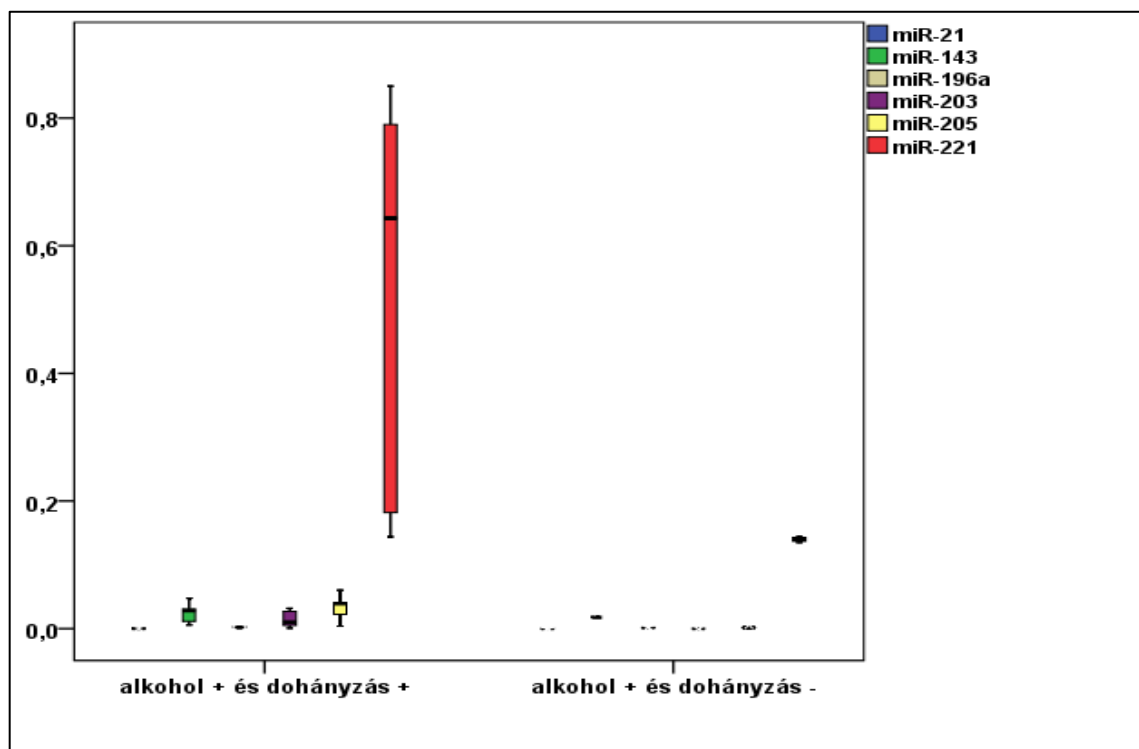
XI. táblázat: Nyelőcsőrákos mintákban kombinált abúzus (2) miR expressziója



9. grafikon: Nyelőcsőrákos mintákban kombinált abúzus (2) miR expressziója

	Dohányzási és alkoholfogyasztási szokások (3)		Változás (x)	p érték
	nagyívó és dohányos (Átlag±szórás)	nagyívó és nem dohányos (Átlag±szórás)		
hsa-miR-21	0.0002±0.0004	$2 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5}$	+10.000	0.061
hsa-miR-143	0.0255±0.0138	0.0215±0.0071	+1.186	0.362
hsa-miR-196a	0.0077±0.0153	0.0017±0.0007	+4.529	0.186
hsa-miR-203	0.0149±0.0123	0.0051±0.0121	+2.921	0.051
hsa-miR-205	0.0352±0.0203	0.0087±0.0164	+4.045	0.001
hsa-miR-221	0.6373±0.6338	0.2617±0.3108	+2.435	0.067

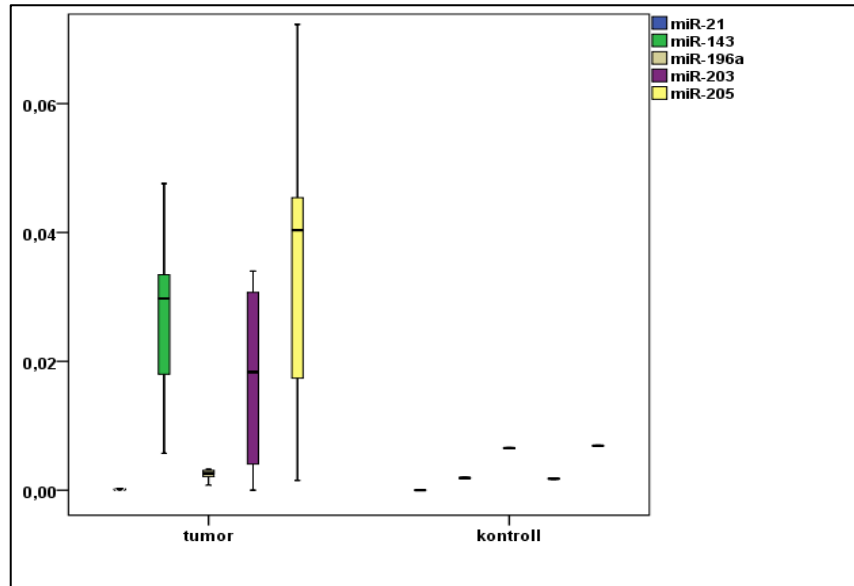
XII. táblázat: Nyelőcsőrakos mintákban kombinált abúzus (3) miR expressziója



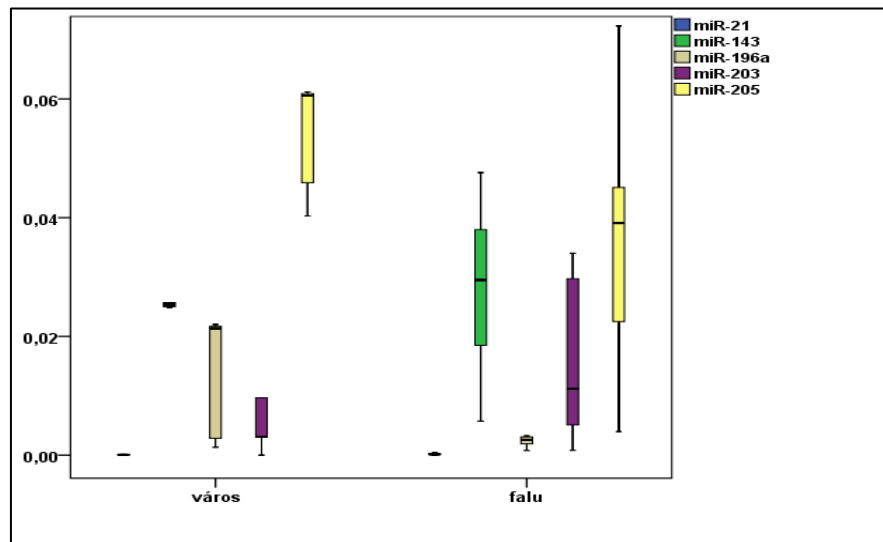
10. grafikon: Nyelőcsőrakos mintákban kombinált abúzus (3) miR expressziója

11. (A-F) grafikon: miR 221 expresszió ábrázolása nélkül

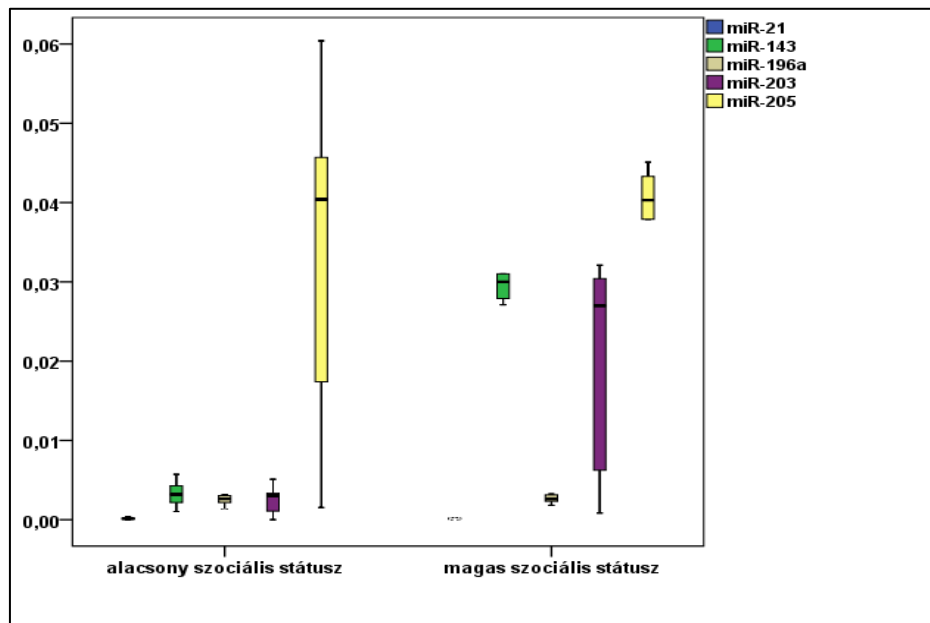
(jobb szemléltethetőség)



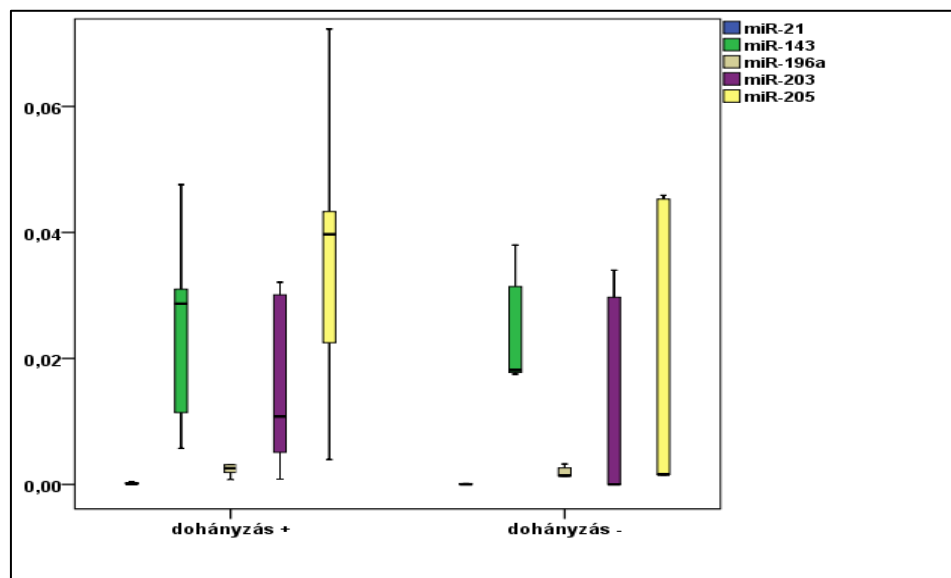
A. beteg és normál szövetek miR-mintázat különbsége



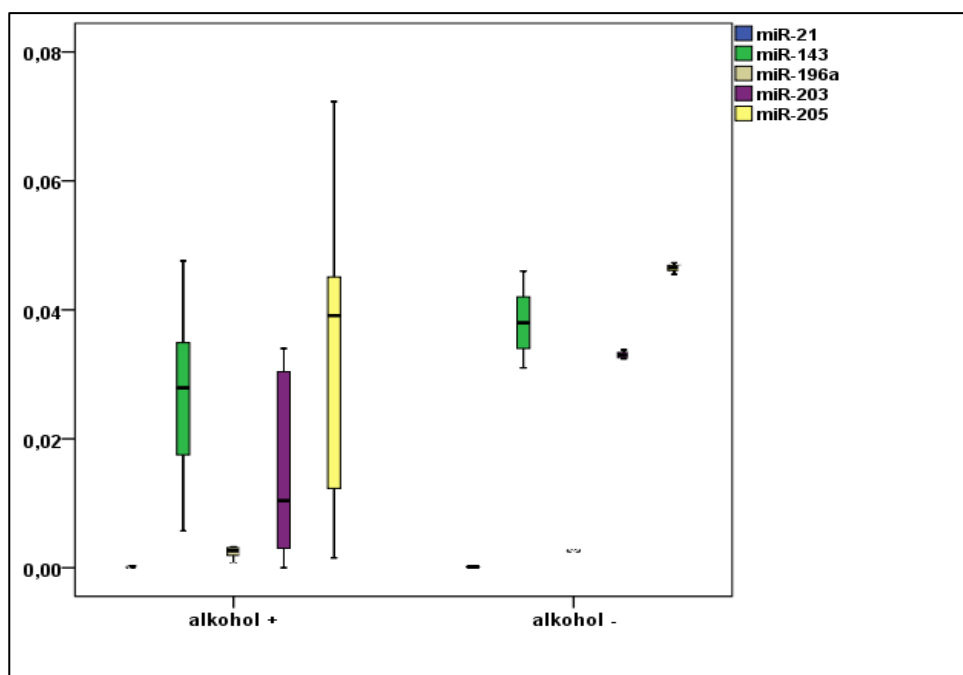
B. városi és falun élő betegek miR mintázat különbsége



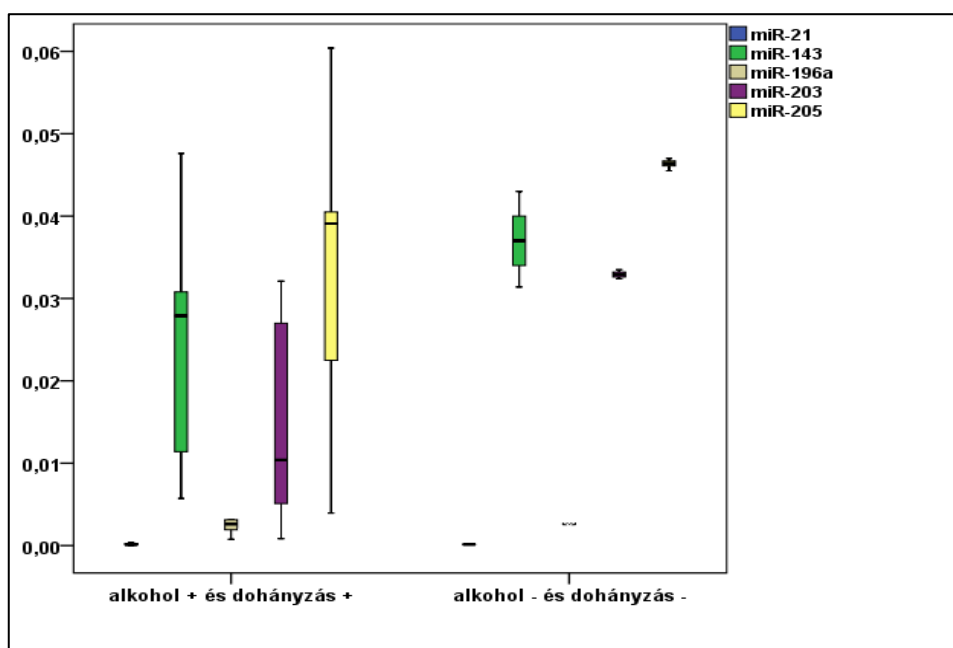
C. miR mintázat különbség szociális helyzet szerint



D. miR expressziós minták különbsége dohányzás szerint



E. miR expressziós minták alkoholfogyasztás szerint



F. miR expressziója kombinált abúzusban

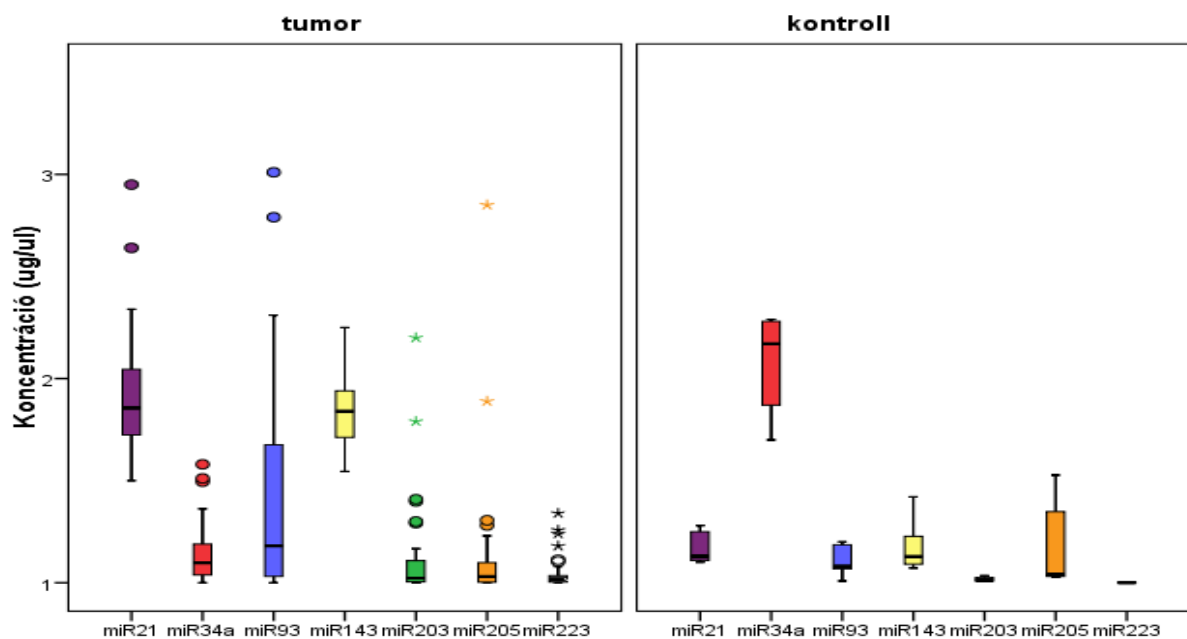
6.2. Gyomorrákos betegek mintáiból végzett vizsgálatok

A gyomorrákos mintákban megvizsgáltuk a betegminták és normál szövetek közötti miR-ek expressziós különbségét. A betegek mintáiból képzett csoportok közötti miR mintázat különbséget a lakóhely, szociális státusz, a dohányzási és alkoholfogyasztási szokások különbözősége szerint osztva. A vizsgált miR-ek: miR-21, miR-34a, miR-93, miR-143, miR-203, miR-205, miR-223.

Tumoros és normál szövet. Szignifikáns ($p=0,001$) különbséget találtunk a tumoros szövetben a miR-21 és miR-143 esetén, míg a miR-34a a kontroll szövetben volt ($p=0,001$) volt felülreprezentált. (XIII. táblázat és 12. grafikon)

	p érték	átlag különbség	std hiba különbség	Különbség megbízhat.tart. 95%	
				alsó	felső
miR-21	,001	,766269444	,123685142	,516292449	1,016246440
miR-34a	,001	-,931963611	,072517897	-1,078527747	-,785399475
miR-93	,137	,345581056	,227520379	-,114254783	,805416894
miR-143	,001	,657252781	,073024443	,509664877	,804840685
miR-203	,299	,106699167	,101415705	,098269620	,311667953
miR-205	,797	-,036902000	,142314295	-,324529919	,250725919
miR-223	,165	,047320956	,033486567	-,020357921	,114999832

XIII. táblázat: Gyomorrák és normál szövet miR expressziója



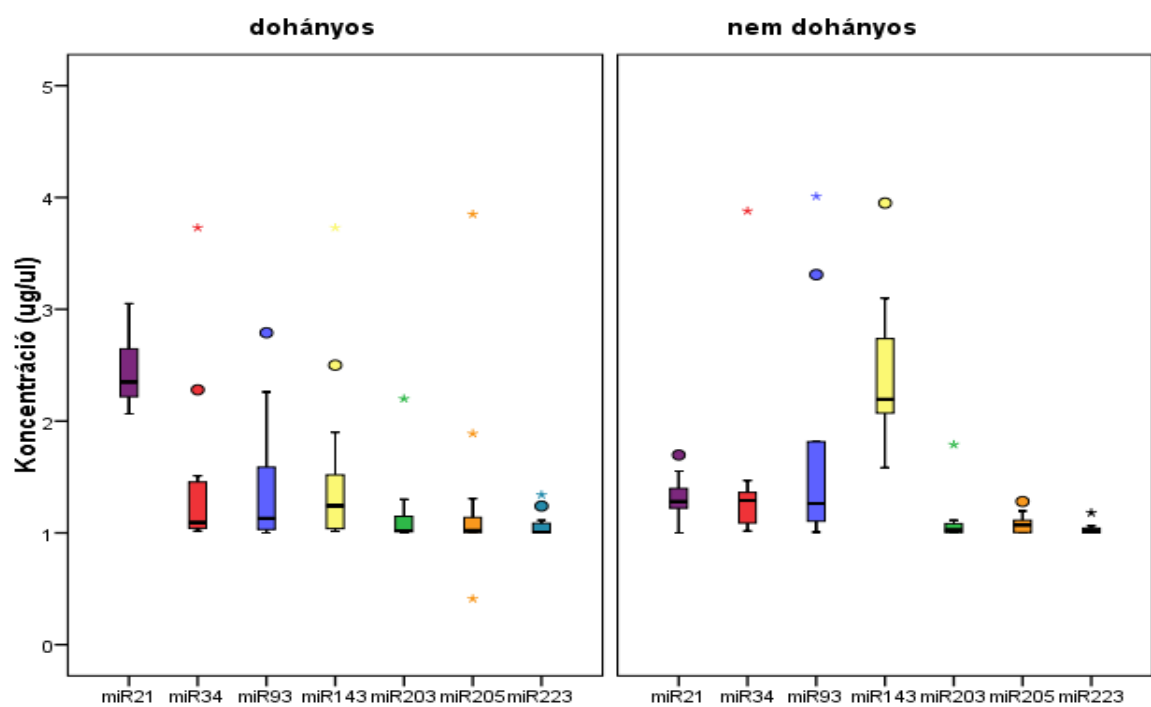
12. grafikon: Gyomorrák és normál szövetek miR expressziója

Dohányzás

Magasabb miR-21 volt detektálható a dohányos daganatosokban, ($p=0,001$), a miR-143 pedig szignifikánsan ($p=0,004$) alacsonyabb volt ugyanitt. Többi miR tekintetében a mért különbség nem volt szignifikáns. (XIV. táblázat, 13. grafikon)

	p érték	átlag különbség	std. hiba különbség	Különbség megbizhat. tart. 95%	
				alsó	felső
miR-21	,001	1,14110000	,116770000	,898930000	1,383260000
miR-34a	,769	-,099516151	,334100106	-,792397363	,593365061
miR93	,206	-,430372821	,330116469	-1,114992477	,254246834
miR-143	,004	-1,002503571	,307936354	-1,641124483	-,363882659
miR203	,799	,031438270	,122255953	-,222105058	,284981597
miR-205	,526	,168821943	,262064633	-,374666841	,712310728
miR-223	,499	,025472269	,037064319	-,051394425	,102338962

XIV. táblázat: Dohányzó és nem dohányzó gyomorrákos betegek miR expressziója



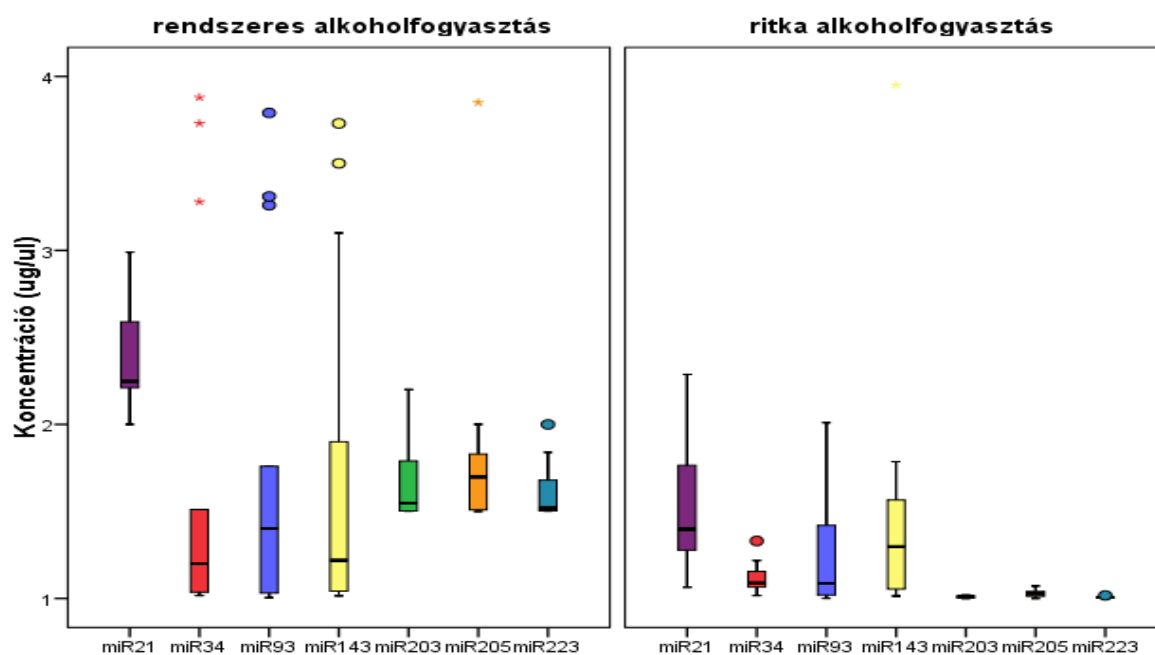
13. grafikon: Dohányos és nem dohányos gyomorrákos betegek miR expressziója

Alkoholfogyasztás

Szignifikáns miR szintkülönbségeket mértünk az alkoholfogyasztási szokások szerint megosztott két csoport között. miR-21 ($p=0,001$), miR-203 ($p=0,001$), miR-205 ($p=0,003$), miR-223 ($p=0,001$) esetében. (XV. táblázat, 14. grafikon)

	p érték	átlag különbség	std.hiba különbség	Különbség megbiz.tart. 95%	
				alsó	felső
miR-21	,001	,84591000	,16587000	,49873000	1,193090000
miR-34a	,175	,576351905	,408979156	-,279651307	1,432355116
miR-93	,254	,455033190	,3386560820	-,354047903	1,264114284
miR-143	,828	,101692857	,4620944603	-,865481962	1,068867676
miR-203	,001	,635459714	,076620230	,475091730	,795827699
miR-205	,003	,790991714	,232196364	,304999139	1,276984289
miR-223	,001	,594559214	,059987380	,469004186	,720114243

XV. táblázat: Alkoholfogyasztó és nem fogyasztó gyomorrákos betegek miR expressziója



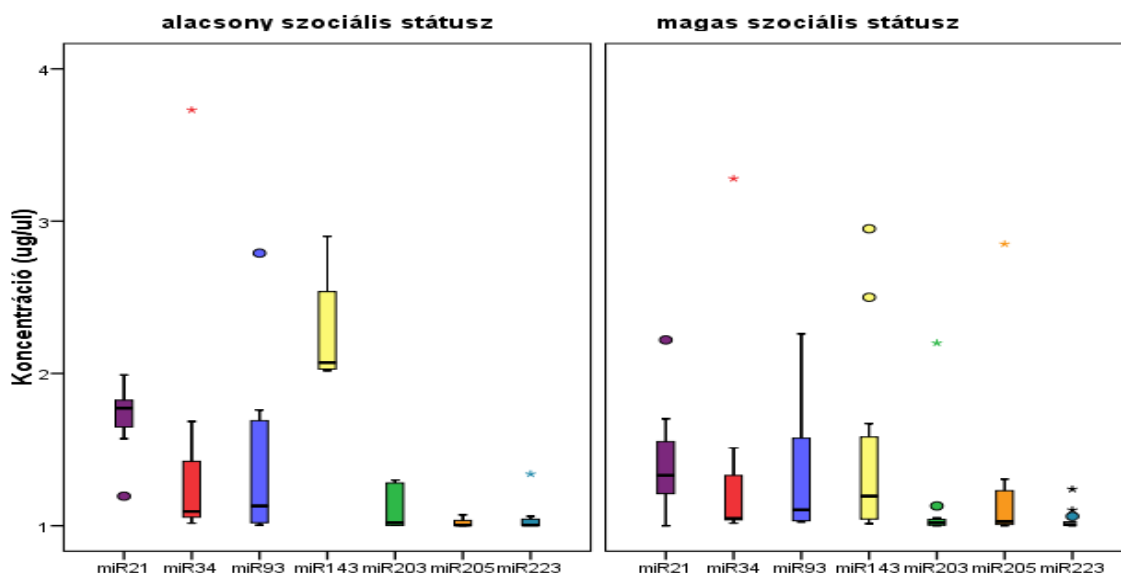
14. grafikon: Alkoholfogyasztó és nem fogyasztó gyomorrákos betegek miR expressziója

Szociális helyzet

Az alacsony szociális helyzetű betegek mintáiban szignifikáns mértékű ($p=0,049$) magasabb kifejeződést mértünk a miR-21, és ugyancsak szignifikáns különbség volt ($p=0,003$) az alacsonyabb miR-143 expresszió esetén. (XVI. táblázat, 15. grafikon)

	p érték	átlag különbség	std.hiba különbség	Külömbőség megbizh.tart. 95%	
				alsó	felső
miR-21	,049	,297840000	,14139000	,00079000	,594890000
miR-34a	,533	,226331832	,356218236	-,522054912	,974718575
miR-93	,545	,146569396	,237398671	-,352186705	,645325496
miR-143	,003	,856748901	,254623241	,321805322	1,391692480
miR-203	,939	,010169011	,131726047	-,266577145	,286915167
miR-205	,308	-,201619398	,192097307	-,605200865	,201196620
miR-223	,582	,023744744	,042399823	-,065333980	,112823467

XVI. táblázat: Megfelelő és nem megfelelő szociális helyzetű gyomorrákos betegek miR expressziója

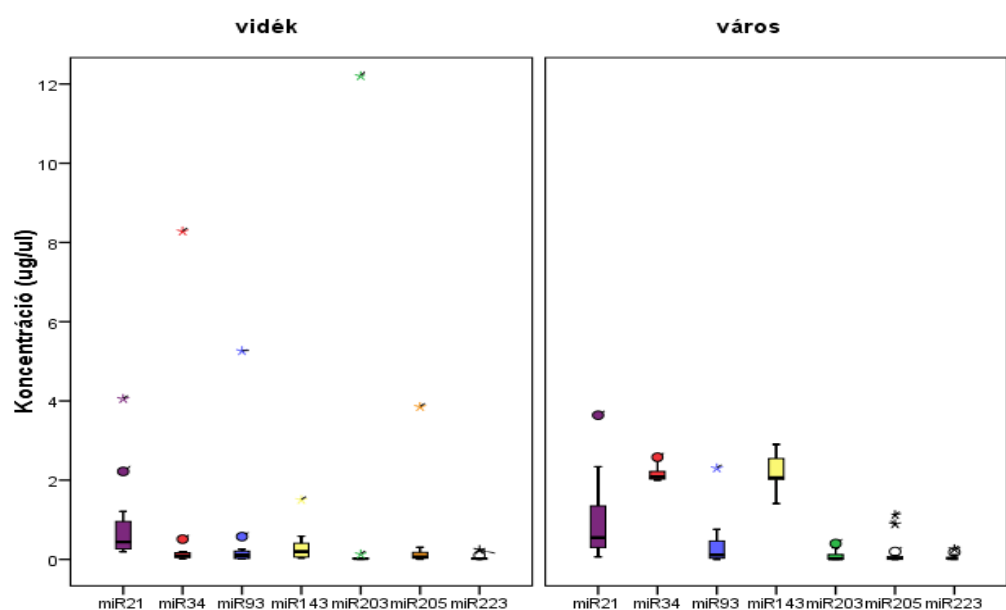


15. grafikon: Megfelelő és nem megfelelő szociális helyzetű gyomorrákos betegek miR expressziója

Vizsgáltuk, hogy **lakóhely** szerint van-e kimutatható miR expressziós különbség a gyomorrákos betegek között. Falun lakó betegekből származó mintákban szignifikáns különbséget detektáltunk. A miR-34a ($p=0,032$) és miR-143 ($p=0,001$) voltak alacsonyabbak. (XVII. táblázat, 16. grafikon)

	p érték	átlag különbség	std.hiba különbség	Különbség megbizhat.tart. 95%.	
				alsó	felső
miR-21	,698	,20822000	,532290000	-,87601000	1,292460000
miR-34a	,032	-1,631918333	,727892850	-3,112827472	-,151009194
miR-93	,969	,035298429	,907931313	-1,811901716	1,882498574
miR-143	,001	-2,544247625	,691385922	-3,950882860	-1,137612390
miR-203	,298	,797838038	,753544452	-,739026003	2,334702080
miR-205	,352	,263495657	,278202795	-,307329329	,834320642
miR-223	,562	-,018315167	,031230757	-,082096882	,045466549

XVII. táblázat: Városi és vidéki gyomorrákos betegek miR expressziója



16. grafikon: Városi és vidéki gyomorrákos betegek miR expressziója

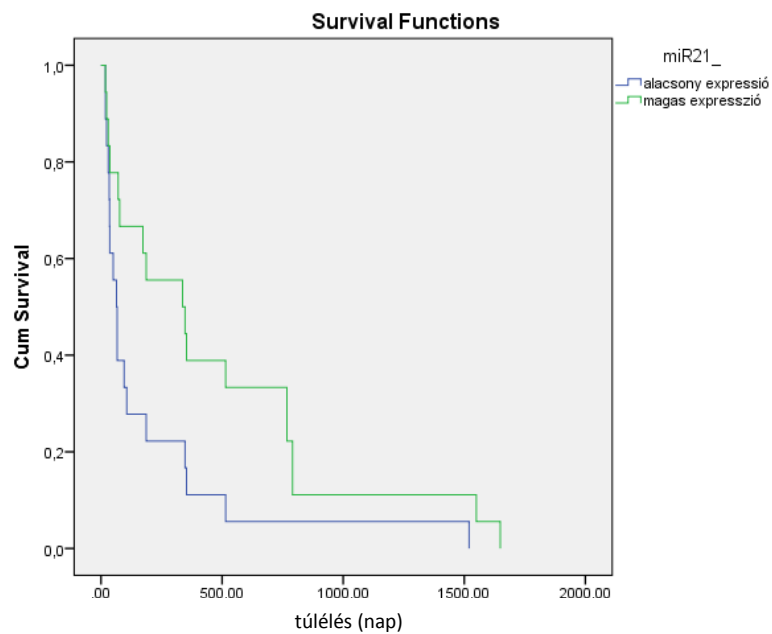
6.3. miR és túlélés kapcsolata

A miR expresszió különböző mérhető jellemzőinek, illetve mintázatának kapcsolata szoros összefüggést mutat a tumorgenezis általános folyamatán kívül a nyelőcsőrák és a gyomorrák progressziójával és prognózisával is.

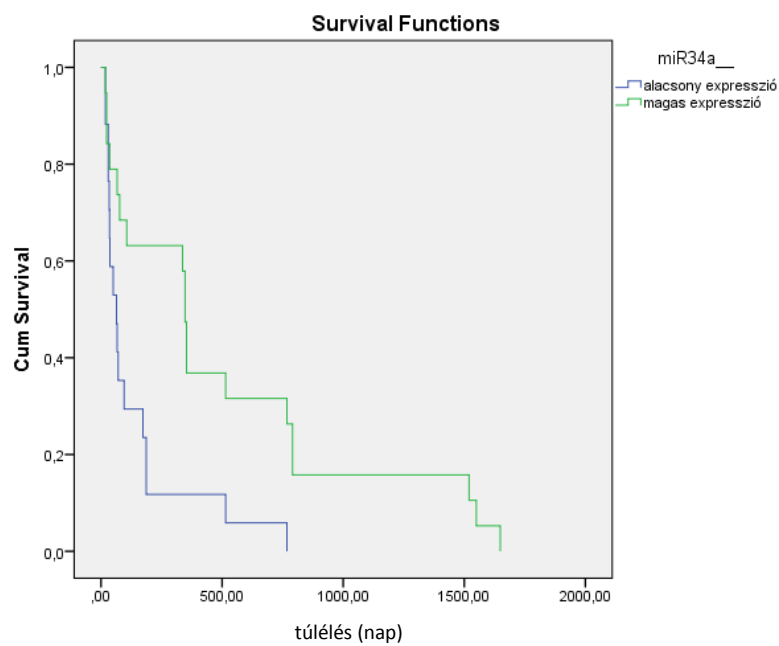
Vizsgálatunkban a gyomorrákos mintákban mért miR-k és a túlélés vonatkozásában szignifikáns eredményeket a miR-21, a miR-34a és a miR-205 találtunk. A többi miR esetében nem volt az eredmény összefüggése szignifikáns mértékű. (XVIII. táblázat, 17. 18., 19., 20., 21., 22., 23. grafikon)

	Chi négyzet	df	Sig.
miR-21	4,934	1	0,026
miR-34a	7,955	1	0,005
miR-93	2,088	1	0,148
miR-143	2,769	1	0,096
miR-203	0,428	1	0,513
miR-205	3,898	1	0,048
miR-223	0,087	1	0,768

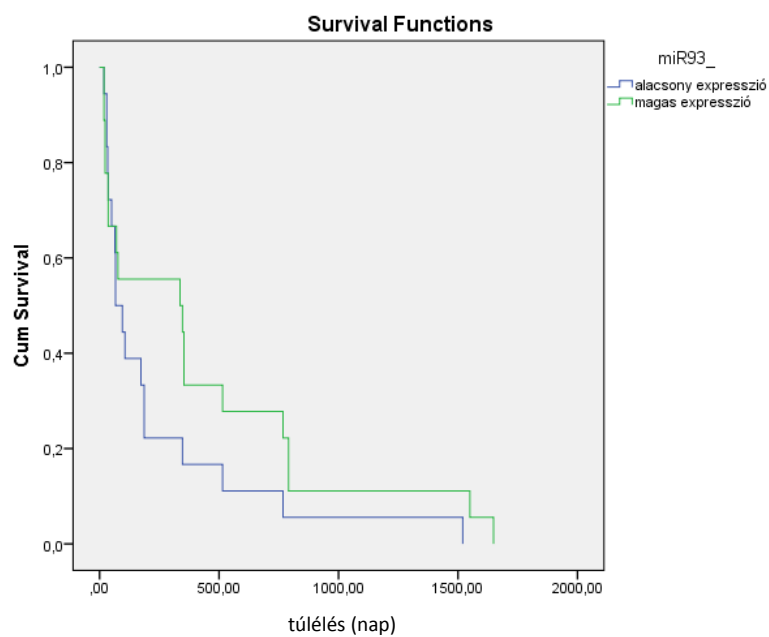
XVIII. táblázat: Vizsgált miR-ek és átlagos túlélés összefüggésének vizsgálata gyomorrák mintákban



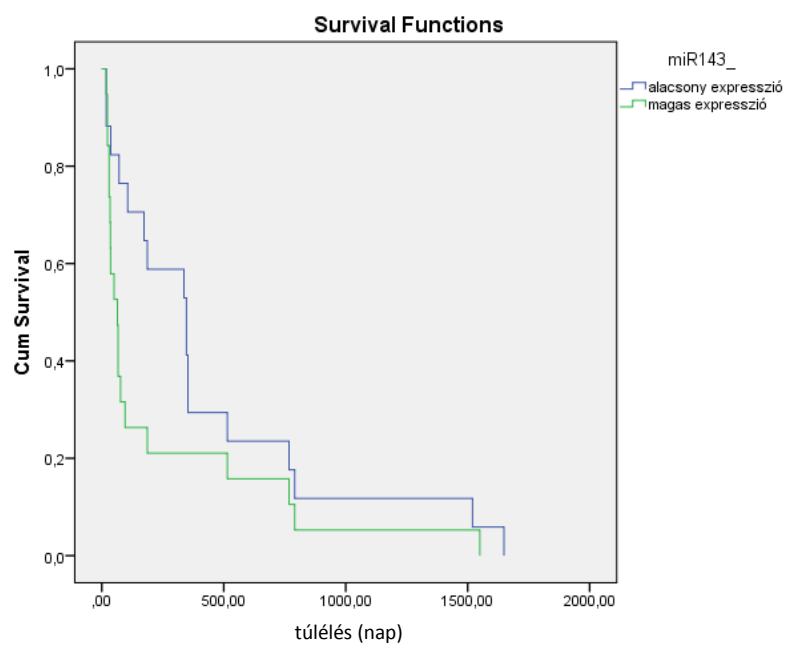
17. grafikon: miR 21 expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata



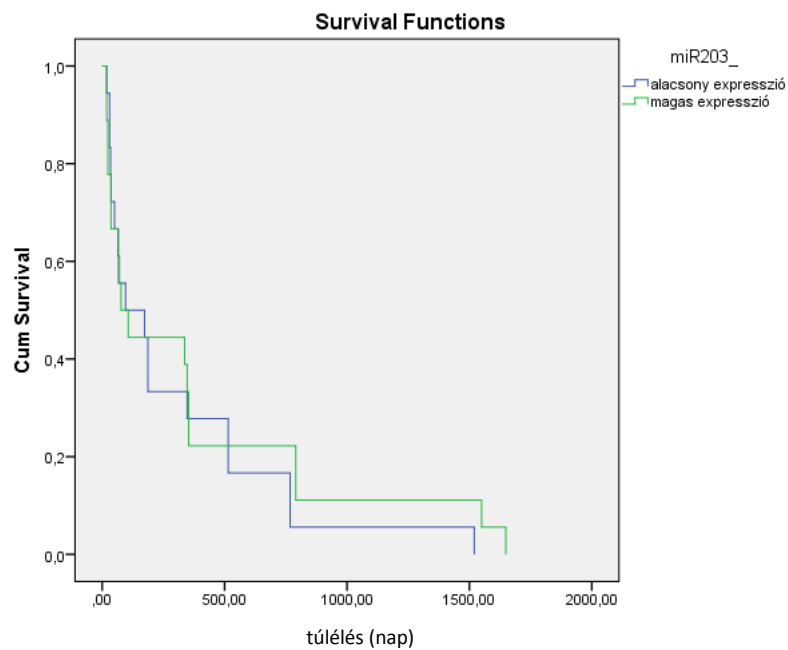
18. grafikon: miR 34a expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata



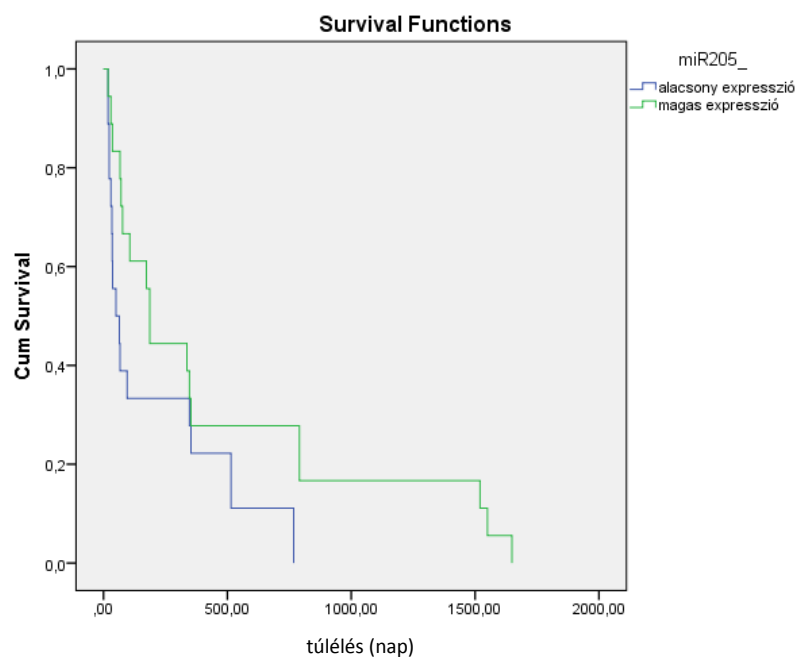
19. grafikon: miR-93 expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata



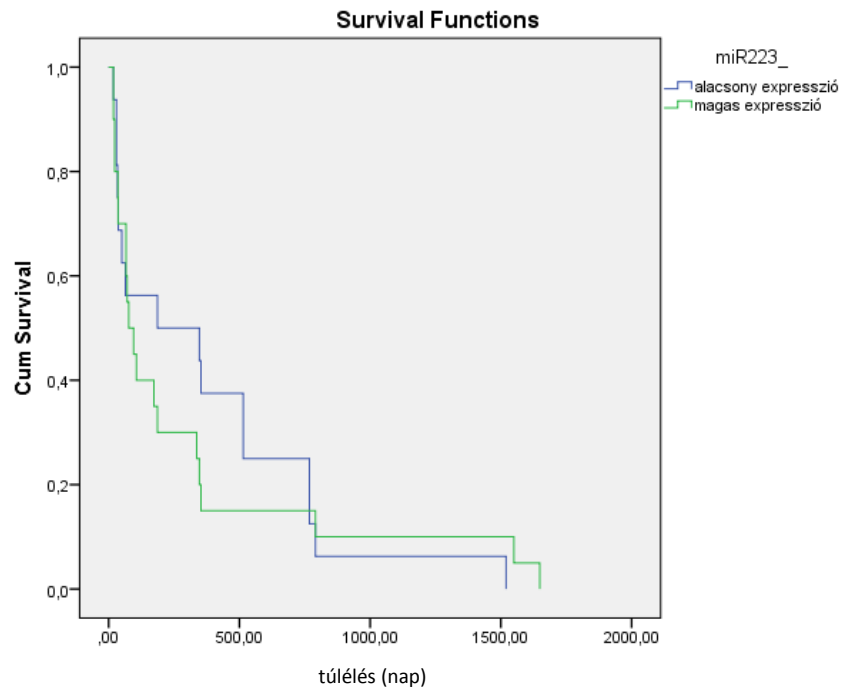
20. grafikon: miR-143 expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata



21. grafikon: miR-203 expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata



22. grafikon: miR-205 expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata



23. grafikon: miR-223 expresszió és túlélés összefüggésének vizsgálata

A nyelőcsőrák esetében egyetlen mintában mért miR esetén sem találtunk értelmezhető összefüggést az expresszió mértéke és a túlélés között. Ennek magyarázata, egyrészt minden bizonnyal abban áll, hogy a nyelőcsőrákban szenvedő betegeink, még a III. vagy IV. stádiumos helyzetüknél várhatóanál is, átlagos túlélésüket tekintve, igen rövid időtartamot éltek, másrészt, hogy alacsony esetszámmal dolgoztunk.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. Nyelőcsőrák és normál szövet

A vizsgált hat miR közül öt esetében volt a különbség mértéke szignifikáns. Mind az öt miR-nél a daganatos szövetben felülregulált miR-ket mértünk.

A miR-21 mindenképpen egy kulcsfontosságú, onkogén hatású miR, amint azt nyelőcsőrák vonatkozásban is számos szerző megállapította (80,81,82). Mi is láttuk ezt az összefüggést.

A miR-143 emelkedett szintjét találta nyelőcsőrákban a normál szövethez képest Liu és munkatársai (83). A miR-205 magas szintjét észlelték a tumoros szövetben Kimura és munkatársai (84). Ugyanezt tapasztalta kutatásai során Matsushima munkacsoportja is. Tanulmányaikban közölték, hogy extrém miR-205 expressziót mértek, a miR-21 magas szintjei mellett, a nyelőcsőlaphámrákos szövetekben (85). Ugyanakkor Feber és munkatársai, továbbá Santhos és munkatársai vizsgálataikkal nyelőcsőrákban kifejezett, 4-5-szörösen alulexpresszált miR- 203-at és miR-205-t találtak (86,87).

A miR-205, és miR-203 alteráló expressziója is leírásra került már. Huszonegy nyelőcsőrákos beteg és normál nyelőcső minták összehasonlításakor. A miR-203 overexpressziója, addig a miR-205 alulexpresszáltasága volt megfigyelhető más soliter tumorokban (85). Nyelőcsőrákban a miR-196a relatíve magas szintjét találták (45). Mi nem tudtunk szignifikánshoz közeli differenciát sem igazolni a nyelőcsőrákos és normál szövetmintáink között a miR-196a vonatkozásában, pedig egyes szerzők nyelőcső specifikus miR-nek is véleményezték, igaz ezeknek a vizsgálatoknak többsége kínai populáció körében történt, ahol jellemző polimorfizmus befolyásolhatja az eredményeket.

A miR-221, onkomir esetében, abszolút értékben is, extrém magas értékeket mértünk minden egyes vizsgált miR-nél a tumoros mintákban.

7.2. Gyomorrák és normál szövet

Hét miR esetében vizsgáltunk expressziós különbséget.

A szolid tumorok miR vizsgálatai közül elsők között, már 2005-ben vizsgálták a gyomor adenokarcinoma miR profilját a normál szövetéhez képest (88). A hat szoliter tumorból származó összesen 540 mintából a gyomorkarcinomára vonatkozóan megállapították, hogy összesen huszonkettő miR magas szinten választódott el, illetve hat alulregulált miR jellemezte. Az általunk is vizsgált miR-21 teljes mértékben, míg egyes, a 200-as clusterből származók mutattak hasonló összefüggést vizsgálatunkkal.

Osawa és munkatársai analizáltak miR oligochippel közel kilencszáz miR-t paraffinba ágyazott metszetekből kivonva. Ezek a minták gyomorrákban szenvedő betegekből származtak. A miR-21 felülregulációját találták gyomor tumoros szövetben, ez összhangban van a mi eredményeinkkel. Ez a kutatócsoport az általunk regisztrált eredménnyel ellentétben a miR-34, és miR-143 szintjét alulreguláltnak mérte a tumoros szövetekben (89).

Több más vizsgálattal is igazolták és megerősítették a miR-21 erős onkogén szerepével harmonizáló vizsgálati eredményeket, és ugyanők úgy határozták meg ezt a miR-t, mint potenciális biomarkert a ventrikuláris adenokarcinomában (90,91).

A felülregulált miR-223-ról gyakran közöltek változó mértékű expressziót, a mi vizsgálatunkban nem volt szignifikáns expressziós különbség a kétféle mintában. Hasonlóan a miR-203 és miR-205 mérések sem adtak szignifikáns differenciát, de különbség azért mérhető volt (92,93).

A miR-93 vizsgálatunkban szignifikáns közeli különbséget mutatott a tumoros és normál minták között, de az értékek szórást jeleztek. A miR-93, lokalizáció szerint vizsgálva a gyomorrákokat mindegyikben jelen van, és több gén targetjeként működik (94,95).

7.3. Környezeti tényezők hatása

Környezeti tényezők jelenléte és a közel hasonló szövettani besorolású daganatok közötti miR expresszió különbségre vonatkozó kérdés felvetést, majd az erre adott válaszokat, megállapításokat tekintettük a kutatásunk újdonságának, hiszen az általunk ismert szakirodalomban adatot, konkrétan ebben az összefüggésben, alig találtunk. Természetesen vizsgáltak egy-egy epigenetikai tényező hatására bekövetkező miR eltéréseket, de elsősorban állatkísérletben, vagy csak egy-egy miR vonatkozásban. Az életmódi tényezők szerepét is mutációk, SNP, vagy egyéb szignálút befolyásoló hatásokra mérték széles körben.

Lalond korszakalkotó összefoglaló tanulmánya óta vált közismertté, hogy a szociális helyzet, beleértve az (iskolázottságot és a foglalkoztatottságot) szoros összefüggésben van az egészségállapottal (96).

Az egyes betegségekben szenvedő betegek mintáiból az életmódi és életkörülményi adatok alapján két csoportot képeztünk és vizsgáltuk a miR expressziós különbségeket.

Nyelőcsőrák eseteiben az alacsony szociális helyzetben szignifikánsan alacsonyabb miR-143-at és miR-203-at mértünk, mint a megfelelő szociális helyzetűek mintáiban. Ez az összefüggés pontosan ugyanazt mutatta, amit a kombinált abúzus esetén mértünk a dohányos és erősen ivó betegek mintáiban. Kifejezett szignifikáns kapcsolat volt a miR-143, miR-203, miR-205 alulexpresszáltságában az erős ivók esetén. Eredményünket azért is figyelemre méltónak tartottuk, mert Navarro és munkatársai nagy esetszámú epidemiológiai vizsgálata szerint a nyelvőcső laphámrákos páciensekben nem sikerült igazán bizonyítani az alkohol rizikó szerepét a betegségükben. A nagyszabású multicentrikus eset-kontroll vizsgálatban, amiben számos rizikó faktor szerepét vizsgálták a felső gastrointestinális traktus vonatkozásában, arra a megállapításra jutottak, hogy a nyelvőcsőrákban szenvedők dohányzási és alkoholfogyasztási szokása együttes előfordulása

miatt nagyon nehéz csoportokat képezni (97,98). Ezzel a problémával mi is küzdöttünk. Szinte nem volt alkoholt egyáltalán nem fogyasztó páciensünk. Ennek ellenére az alkohol fogyasztás mennyisége illetve időbelisége alapján sikerült csoportokat képezni (38).

A dohányos csoportban a nem dohányzókéhoz képest egyedül a miR-205 volt szignifikánsan magasabb. Különbségeket azonban mértünk más miR-ek esetében is. A már hivatkozott eset-kontroll tanulmányban (97) nyelőcső laphámrákban a dohányzást állapította meg a betegség első számú rizikójának. Vizsgáltunk összefüggést a rizikók kombinációjával is. A dohányos vagy nagyívó csoportot néztük a mindkét rizikóval élőkével összevetve. A kombinált rizikóval élők alacsonyabb miR-143 és miR-203 szintet mutattak, mint a nagyívó, de nem dohányos mintákból származó miR szintek. Emelkedett miR-205-t találtunk a nemdohányzó, de nagyívó csoportban lévő mintákhoz képest. A dohányzás és erős alkoholizálás szinergista hatását, amelyet más vizsgálatok, elsősorban epidemiológiai módszerekkel igazoltak, a miR expressziós mintázat is igazolni látszik. Vannak különbségek a rizikók használatának együttes vagy külön-külön domináló használata kapcsán.

Elsősorban Japán kutatók foglalkoztak az elmúlt néhány évben a témával és megállapították, a kombinált, szinergista módon káros hatású élvezeti cikkek használata a p53 gén fehérje expressziójával összefügg. A p53 gén, mint cél gén, néhány általunk is vizsgált miR-nek a targetje, illetve a p53-ig vezető szignálút részeihez kapcsolódnak hatásukkal. (miR-21, miR-200 cluster tagjai). Korai jelnek tartják a p53 fehérje változásait nyelőcső laphámrákban, de szoros kapcsolatban lehet valamennyi felső emésztőszervi és felső légúti daganat ezzel a p53 gén fehérje szintváltozással (109,99,100).

A kombinált rizikók jelenléte is leírható miR mintázat különbséggel, ami szignifikáns mértékű, és vannak ahhoz nagyon közeli értékek, amivel kapcsolatban azt gondoljuk, hogy

önmagában a mintaszám emeléssel a statisztikai erő növekedhetett volna. A vizsgálatainkat elvégezni azonban nagyobb elemszámmal nem volt lehetőség.

A gyomorrákos és alacsony szociális státuszú betegek szövetmintáiban a miR expresszió a magasabb szociális állapothoz képest, miR-21 markánsan magasabb szintjét mértük. Ugyanezt találtuk a dohányosokban is. Mint már hivatkoztunk a miR-21 kulcsszerepére és a dohányzás közismerten súlyos potencírozó szerepére a karcinogenezis feltehetően több pontján is. A dohányzási szokás azonban az általunk vártnál kisebb mértékben adott jellegzetes mintázat különbséget a kutatás egészében.

A gyomorrákos páciensek között a falun vagy városban lakás összevetésében is találtunk különbséget a kifejeződésben. A városban lakók miR-34a és miR-143 szignifikánsan magasabb volt. A miR-143, és annak overexpressziója az EGFR szignálútján kapcsolódhat a tumorgenezishez Sakari Knuutila Helsinki Egyetem vizsgálatai szerint (101). Ez az aktivációs út lehetséges az alkohol és dohányzás hatásaként is értelmezhető (102).

A gyomorrákos betegminták a miR-203, miR-205, és miR-223 szintje az erősen ivó páciensek mintáiban szignifikánsan magasabb volt, a nemivókéhoz képest, ami egyezést mutat a rendszeres ivókra vonatkozó epidemiológiai vizsgálatokban kimutatott relatív rizikónövekedési értékek egy részével (103). Ezekben a nagyobb esetszámú prospektív tanulmányokban csak az erősebb alkoholfogyasztás (2 egységnél több/nap) mutatott rizikónövekedést, vagy még azt sem az Ázsiai populációban, de egyértelműen okozott rizikónövekedést az európaiak körében (104, 105).

2005-ben Lu és munkatársai próbálták kutatásukban tumorspecifikus profilt összeállítani, solid tumorokban 217-féle miR méréssel. A kutatásban megállapították, hogy nem csak a normál és szervfüggő daganatos szövetekben van miR expresszió különbség. Az egyes szerveken belüli szövettani altipusok illetve a metasztázisok, vagyis a betegség stádiuma, így az átlagos túlélés között is van összefüggés, amit azóta több kutatás is igazolt (106,107).

7.4. miR expresszió és túlélés

A miR kutatás egyik központi kérdése a hasznosíthatóság területén, hogy az egyes miR-k változó expressziója, illetve szokásostól eltérő miR megjelenése a betegség lefolyásának alkalmas monitoringja-e? Mutatnak-e kapcsolatot a betegség lefolyásával, betegek túlélésével? Több tanulmány rámutatott arra, hogy a miR expresszió mértéke szoros korrelációt mutat a gyomorrák progressziójával és prognózisával. Értelemszerűen a tumorszuppresszorként funkcionáló miR-k magasabb szintje hosszabb túlélést eredményez, míg az onkomiR-ek overexpressziója negatív előjelű. Ezek elválasztásának mértéke és annak jelentősége, nem minden ponton tisztázott még (108, 109).

Gyomorrákban, az általunk is vizsgált miR-ek közül a miR-21 és a miR-223 magas expressziója független prediktív jele volt a betegség progressziójának és ezzel együtt túlélésnek. Vizsgálatok csaknem minden szolid tumorra és összesen 40 feletti miR expresszióra terjedtek ki. A miR-21 és a miR-221, és miR-91-re vonatkozóan is igazolást nyert, hogy expressziójuk a rövidebb túléléssel állt összefüggésben gyomorrákos betegek mintáiban (110).

Ugyancsak a miR-21, de mellette a miR-93 és a miR-221 megnövekedett szintjének összefüggését állapították meg kutatásukban Jiang és Chen és munkatársaik (111, 112).

A miR 196a megemelkedett szintje a betegséggel, a betegség kiújulásának jelével azonosítható (113). A miR 34a mások mellett biomarker szerepű a gyomorrák diagnózisban és összefügg a daganat stádiumával és a progresszió szintjével (114).

8. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK

Vizsgálatunk jelentőségét, illetve újszerűségét abban látjuk, hogy azonos klinikai diagnózisú, ugyanazt a szervet érintő és azonos szövettani típusú karcinomákban, amelyek stádium besorolása is közel azonos, az anamnezisből ismert külső, környezeti, életmódi faktorok hatását alig, vagy egyáltalán nem vizsgálták a miR expressziós különbségek vonatkozásában.

Kutatásunkkal igazoltuk, hogy ezen faktorok mentén is sikerül miR-expressziós differenciát megállapítani, vagyis az epigenetikai hatás miR eltérésekkel is leírható. Ezen kívül reprodukáltuk a daganatos és normál szövetek miR expressziós különbségeit az általunk választott miR-ek esetében nyelőcső- és gyomorrákban. Ezeket a miR-eket, ebben az összeállításban nem vizsgálták magyarországi beteg anyagon.

A célkitűzések (4. fejezet) sorrendjében megfogalmazottak szerinti válaszok:

1. Nyelőcsőrák minták eseteiben a leghatározottabban sikerült igazolni a feltételezést, mely szerint a daganatos szövetekben a vizsgált miR-ek markánsan különböznek a normál nyelőcső szöveti mintákban mérhető miR mennyiségektől.

A miR-21, miR-143, miR-203, miR-205, miR-221 erős szignifikanciával magasabb a tumoros mintákban.

2. Az eltérés a normál és gyomor mirigyhámrákos szövetminták miR szintjében megmutatkozott, de nem a várt mértékben. Szignifikáns mértékű különbség a miR-21 és miR-143, valamint a miR-34a értékében volt. A miR-93, miR-203, miR-205 és miR-223 differenciája nem volt szignifikáns.

3. Mindkét tumor esetében találtunk expressziós különbséget, a károsító hatású életmódi tényezőkkel élés tekintetében. Az alkohol hatására létrejött miR

expresszió szignifikáns jelenléte a miR-203, miR- 205, miR-221, miR-223 vonatkozásában is következetesen jelen van, mindkét daganatféleségben.

4. A dohányzási szokás hatását kevésbé átütőnek mértük a saját mintáinkba, de volt értékelhető különbség. A miR-205, a miR-21 szignifikánsan magasabb szintjét mértük, míg a miR-143 alacsonyabb voltát detektáltuk.
5. A szociális helyzet különbözősége szintén mérhető miR szintkülönbséget mutatott, vagyis a társadalom egy bizonyos kohorsza, összefüggésben a foglalkoztatottság hiányával, nem egyszer az iskolázottság, vagy általános életviteli ismeretek hiányával, önmagában epigenetikai hatású, de ez a helyzet együttjárhat a károsító életmódi tényezők fokozott mértékű alkalmazásával is. A lakóhely vidéki vagy városi volta további rétegezés nélkül nem hozta ki markánsan ezt az életmóddal is kapcsolatban állható különbséget.

A kombinált, káros életmódi tényező használata a nyelőcsőlaprákban szenvedő betegek mintáiban is inkább az alkohol hatását fejezte ki az expressziós különbségmérésnél. Gyomorráknál a kombinációt nem vizsgáltuk.

Nem tapasztaltuk a kombinált abúzus használatnál az esetlegesen markánsabban, vagy együttesen több miR vonatkozásban is mérhető különbség jelenlétét.

Több összefüggésben is igazoltuk a miR-21 fontos szerepét a tumoros szövetekben. Szinte mindenütt bebizonyosodott ennek az oncomiR-nek a felülreprezentáltsága. Tapasztaltuk a miR-34a tumorszupresszor gén alulreprezentáltságát is, a daganatos mintákban. Azonban ismert, hogy az egyes miR szintek nem mindig ilyen egyszerű összefüggésben regulálódnak. Éppen ezeknek méréseknek, kutatásoknak gyűjtése folyik világszerte.

6. A miR expresszió és a betegek túlélésével kapcsolatban kutatásunkban megtaláltuk három miR-el összefüggésben az irodalmi adatokban is taglalt relevanciát.

Vizsgálatunkkal epigenetikai hatások jelenlétét és fontosságát igazolni tudtuk. Igazoltuk, hogy az általunk vizsgált betegségekben és a választott mintákban a kórállapotok nem függetlenek külső tényezőktől. Rávilágítottunk arra, hogy az epigenetikai hatások, a külső, nem öröklött tényezők genetikai következménnyel járnak és ezek, mivel tudatosan befolyásolható elemeket tartalmaznak az életmóddal egyéni döntéssel nagy valószínűséggel szabályozhatók.

A tudatos döntéseinken alapuló életmód és annak változtatása irányítható esélyeket jelenthet betegségek elkerülésére, vagy kockázatuk csökkentésére.

A nem saját döntési körben megnyilvánuló környezeti tényezők károsító hatásait, a kockázat mértékét pedig az élet minden területén figyelembe kell venni az abban döntési kompetenciával rendelkezőknek.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>[accessed 12/07/2012].
2. Ferlay J, Soerjomaaram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, Globocan 2012.
3. Suva ML, Riggi N, Bernstein BE: Epigenetic reprogramming in cancer Science márc.29. 339 (6127):1567-70
4. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer. 2013 Mar 1;132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012 Jul 26. Jemal A, Bray F, Ferlay J, Ward E, Formann D: Global cancer statistic CA Cancer J Clin 61 (2):62-90, 2011.
5. Jemal A, Bray F, Ferlay J, Ward E, Formann D: Global cancer statistic CA Cancer J Clin 61 (2):62-90, 2011.
6. Ádány R. : A magyar lakosság egészségállapota az ezredfordulón Medicina Budapest 223. old. 2003.
7. Az egészség évtizedének Johan Béla Nemzeti Programja 2003 46/2003. (IV. 16.) OGY-határozat, Egészségügyi Közlöny, 10. pp. 1556–1614.
8. Otis W. Brawley: Prostata cancer screening, What we know, don't know and believe American College of Physicians 2013.
9. Sharma S, Kelly T, Jones P: Epigenetics in cancer. Carcinogenesis 31: 27-36, 2010

10. United Nations, Population division. World population prospects, the 2010. revision.
Available from: <http://www.un.org/esa/population/unpop.htm> [accessed 12/09/2011].
11. Jensen, O.M., Estève, J., Møller, H., and Renard, H.: Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer*. 1990; 26: 1167–1256
12. Molnár T.: Demográfiai jellemzők Magyarországon és az Európai Unióban, különös tekintettel a daganatos megbetegedések okozta halálozásra *Statisztikai Szemle* 90. évf. 6. szám 545-558. 2013.
13. Halálloki struktúra változásai Magyarországon KSH 2014. május
14. Ember István Szerk.: Népegészségügyi orvostan Dialóg Kampus kiadó 190-192 2011.
15. Yuwei Zang: Epidemiology of esophageal cancer *World Journal of Gastroenterology*. 19. (34)5598-5606 2013.
16. Pennathur A., Gibson M. Blair A. Jobe J. Luketh: Oesophageal carcinoma www.thelancet.com. Vol. 381 feb.2 2013.
17. Wen-jing Ma, Guo-dong Lv, Aierziguli Tuersun, Qing Liu, Hui Liu Shu-tao-Zheng, Cong-gai Huang, Jung-guo Feng, Xing Wang, Ren-young Lin Ilyar Sheyhidan, Xiao-mei Lu: Role of microRNA-21 and effect on PTEN In Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma *Mol. Biol Rep*. 38: 3253-3260. 2011.
18. de Martel C¹, Forman D, Plummer M.: Gastric cancer: epidemiology and risk factors *Gastroenterology Clin. North. Am.* 2013. 42. (2):219-40. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.003. Epub. March 29.2013.
19. Fan G.D, Xin-Di Su, Almet C.C. et al: Prospective study of risk factors for esophageal and gastric cancers in China *International Journal of Cancer* Vol. 113. Issues:3 456-463. 2005.

20. Masaru Morita et al.: Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention *Journal Clin. Oncol.* 15:126-134 2010.
21. Shikia C. Girish, Singh J. Barik S.: MicroRNAs: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions *Mol. Cell pharmacol*, 3(3) 83.92. 2011.
22. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843–854. [
23. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al.: The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403:901–906.
24. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T.: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* ;294:853–858. 2001.
25. Bartel D.P.: MikroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*,116. 281-297 2004.
26. Schoof C-R-G.,Botelho E. L., de Silva,Izotti A., Vasques L: dos Reis: MicroRNAs in cancer treatment and prognosis *Am. J. Cancer Res.* 2(4) 414-433. 2012.
27. Jenisch R, Bird A Epigenetic regulation of gene expression, how the genom integrates intrinsic and enviromental factors *Nat. Genet* 33. suppl: 245-254. 2003.
28. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T.: Identification of novel genes coding small expressed RNAs *Science*, 294 :853-858. 2009.
29. Ying SY, Lin SL: Intron-mediated RNA interference and microRNA biogenesis *Methods Mol. Biol.*; 487:387-413.2009.
30. Kim VN: MicroRNA biogenesis: coordinated cropping, and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell. biol.* 6. 376-385. 2005.

31. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond SM, and Hannon GJ: Role for the bidentate ribonuclease in the initiation step of the RNA interference Nature 409:363-366. 2001.
32. Kral J. Loedige I. Filipowicz W: The widespread regulation of mikroRNA function, biogenesis and decay Nat. Rev.19) 597-610 2010.
33. Gaidatzis D. van Nimwegen E. Hausser J. Zavolan M: Interferencia of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. BMC Bioinformatics 2007.8;69
34. Sevignani C, Cahen G.A, Siracusa L.D. Croce CM: Mammalian mikroRNAs: a small world for fine tuning gene expression Mamm. Genom 17. 189-202. 2006.
35. T. A. Farazi., P. Morozov, J. I. Spitzer Th. Tuschl: mikroRNAs in human cancer Journal of Pathology 2011. 223; 102-115
36. Alvarez Garcia, Milla E. A.: Mikro RNA function in animal development and human disease Development 2005. 132. 4653-4662
37. Falus A., Molnár V.: A génszabályozás és a génhálózatok evolúciója Magyar tudomány 117. évf. 4. sz. 407-413. 2010.
38. Stánitz E., K. Juhász, K. Gombos, K. Göcze, Cs. Tóth, I. Kiss: Alteration of miRNA expression in esophageal carcinoma correlates with lifestyle, social, and environmental determinants Anticancer Research (2). 1091-1097, 2015.
39. Stanitz E., K. Juhász, K. Gombos, K. Göcze, I. Ember: Evaluation microRNA pattern of gastric adenocarcinoma associated with environmental factors Anticancer Research (8) 3007-3015. 2013.
40. Liu F, Zheng S, Liu T, Liu Q, Liang M, Li X, Sheyhidin I, Lu X and Liu W: Micro RNA21 promotes proliferation and inhibits apoptosis In ECa109 via activating ERK1/2/MAPK pathway. Mol Cell Biochem. 381(1-2): 115-125, 2013.

41. Li P, Mao WM, Zheng ZG, Dong ZM AND Ling ZQ: Down-regulation of PTEN expression modulated by dysregulated miR-21 contributes to the progression of esophageal cancer. *Dig Dis Sci.*58(12): 3483-3493, 2013.
42. Wang N, Zhang CQ, He JH, Duan XF, Wang YY, Ji X, Zang WQ, Li M, Ma YY, Wang T., Zhao GQ: MiR-21 down-regulations up presses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FASL, TIMP3, and RECK genes in esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci.*58(7): 1863-1870, 2013.
43. Ni Y, Meng L, Wang L, Dong W, Shen H, Wang G, Liu Q and Du J: MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Gene* 517(2): 197-204, 2013.
44. Wu BL, Xu LY, Du ZP, Liao LD, Zhang HF, Huang Q, Fang GQ and Li EM: MiRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of miR-143 and miR-145. *World J Gastroenterol* 17(1): 79-88, 2011.
45. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, Broaddus RR, Rashid A and Albarracin CT: MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 27(52): 6667-6678, 2008.
46. Szeberényi J.: Molekuláris sejtbológia *Dialog Campus* 2011. 57-58, 188-190
47. S. David, S.J. Meltzer: MicroRNA involvement in esophageal carcinogenesis NIH Public Access 2011. 11(6) 612-616
48. Zhang F, Yang Z, Cao M, Xu Y, Li J, Chen X, Gao Z, Xin J, Zhou S, Zhou Z, Yang Y, Sheng W and Zeng Y: MiR-203 suppresses tumor growth and invasion and down-regulates MiR-21 expression through repressing ran in esophageal cancer. *Cancer Lett.* 342(1): 121-129, 2014.

49. Yuan Y, Zeng ZY, Liu XH, Gong DJ, Tao J, Cheng HZ and Huang SD: MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing Δ Np63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*11: 57, 2011.
50. Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, Inoue N, Machida H, Nakayama T, Hayashi T, Kunizaki M, Hidaka S, Nagayasu T, Nakashima M, Ujifuku K, Mitsutake N, Ohtsuru A, Yamashita S, Korpai M, Kang Y, Gregory PA, Goodall GJ, Kohno S and Nakao K: MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Transl Med*.9: 30, 2011.
51. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, Kosuga T, Iitaka D, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K. and Otsuji E.: Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br.J. Cancer*105(1): 104-111, 2011.
52. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J. and Hermeking H: Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7(16): 2591-600, 2008.
53. Soshi Osawa es mktrs.: Micro RNAs profiling of gastric cancerpetients from formalin fixed paraffin embedded samples *Oncology letters* 2: 613-619 2011.
54. Yamakuchi M, Ferlito M and Lowenstein CJ: miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*105(36): 13421-6, 2008.
55. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G. and Hermeking H.: Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6(13): 1586-93, 2007.

56. Buscaglia LE and Li Y: Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J. Cancer* 30(6): 371-80, 2011.
57. Selcuklu SD, Donoghue MT and Spillane C.: miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem. Soc. Trans.* 37 (4): 918-25, 2009.
58. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S and Lu H.: miR-21 plays a privotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab. Invest.* 88 (12): 1358-66, 2008.
59. Young-Kook Kim, Jieun Yu et all: Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by micro RNA clusters in gastric cancer *Nucleic Acids Reasearch* 2009. Vol 37. No 5.
60. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J. and Zhang CY: Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 28(10): 1385-92, 2009.
61. Ng EK, Tsang WP, Ng SS, Jin HC, Yu J, Li JJ,Röcken C, Ebert MP, Kwok TT and Sung JJ: MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br.J. Cancer* 101(4): 699-706, 2009.
62. Wu BL, Xu LY, Du ZP, Liao LD, Zhang HF, Huang Q, Fang GQ and Li EM: MiRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of miR-143 and miR-145. *World J Gastroenterol* 17(1): 79-88, 2011.
63. Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, Sun L, Ji G, Shi Y, Han Z, Han S, Nie Y, Chen X, Zhao Q, Ding J, Wu K and Daiming F.: miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor supressor EPB41L3. *Mol Cancer Res* 9(7): 824-33, 2011.

64. Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val, Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G., and Candi E: miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ* 15(7): 1187-95, 2008.
65. Chiang Y, Song Y, Wang Z, Chen Y, Yue Z, Xu H, Xing C. and Liu Z: Aberrant expression of miR-203 and its clinical significance in gastric and colorectal cancers. *J Gastrointest Surg* 15(1): 63-70, 2011.
66. Qin AY, Zhang XW, Liu L, Yu JP, Li H, Wang SZ, Ren XB and Cao S: MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *Eur J Cell Biol* 92(2): 54-60, 2013.
67. Mathers JC, Strathdee G. and Relton CL: Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. *Adv Genet.* 71: 3-39, 2010.
68. Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, Kita T, Satoh N, Shimatsu A and Hasegawa K: Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(4): 728-732, 2008.
69. Marsit CJ, Eddy K and Kelsey KT: MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res.* 66(22): 10843-10848, 2006.
70. Gaedicke S, Zhang X, Schmelzer C, Lou Y, Doering F, Frank J. and Rimbach G: Vitamin-E dependent microRNA regulation in rat liver. *FEBS Lett.* 582(23-24): 3542-3546, 2008.
71. Dippold RP, Vadigepalli R, Gonye GE, Patra B and Hoek JB: Chronic ethanol feeding alters miRNA expression dynamics during liver regeneration. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 37(1): 59-69, 2013.
72. Tang Y, Banan A, Forsyth CB, Fields JZ, Lau CK, Zhang LJ. and Keshavarzian A: Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 32(2): 355-364, 2008.

73. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM and Harris CC: MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(29):12085-12090, 2009.
74. Avissar M, McClean MD, Kelsey KT and Marsit CJ: MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. *Carcinogenesis* 30(12): 2059-2063, 2009.
75. Yang M, Liu R, Sheng J, Liao J, Wang Y, Pan E, Guo W, Pu Y and Yin L: Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*29(1): 169-176, 2013.
76. Binici DN, Koca T. and Dursun H: Dietary habits, demographical, and socio-economical risk factors of the newly diagnosed gastric cancers in the Eastern Anatolia Region of Turkey: an endemic upper gastrointestinal cancer region. *Dig Dis Sci* 54(12): 2629-33, 2009.
77. Nagel G, Linseisen J, Boshuizen HC, Pera G, Del Giudice G, Westert GP, Bueno-de-Mesquita HB, Allen NE, Key TJ, Numans ME, Peeters PH, Sieri S, Siman H, Berglund G, Hallmans G, Stenling R, Martinez C, Arriola L, Barricarte A, Chirlaque MD, Quiros JR, Vineis P, Masala G, Palli D, Panico S, Tumino R, Bingham S, Boeing H, Slimani N, Jenab M, Norat T, Riboli E and González CA: Socioeconomic position and the risk of gastric and oesophageal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int. J. Epidemiol.* 36(1): 66-76, 2007.
78. Zhang Y, Sun LP, Xing CZ, Xu Q, He CY, Li P, Gong YH, Liu YP and Yuan Y: Interaction between GSTP1 Val allele and H. pylori infection, smoking and alcohol consumption and risk of gastric cancer among the Chinese population. *PLoS One* 7(10): e47178, 2012.

79. Duarte MC, Colombo J, Rossit AR, Caetano A, Borim A.A, Wornrath D and Silva AE: Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J. Gastroenterol* 11(42): 6593-600, 2005.
80. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M and Baba H: MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15(6): 1915-1922.
81. Mathé E. A, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, Braun R, Reimers M, Kumamoto K, Hughes D, Altorki NK, Casson AG, Liu CG, Wang XW, Yanaihara N, Hagiwara N, Dannenberg AJ, Miyashita M, Croce CM and Harris CC: MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin. Cancer Res.* 15(19): 6192-6200, 2009.
82. Ogawa R, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Katada T, Harata K, Tanaka T and Fujii Y: Expression profiling of micro-RNAs in human esophageal squamous cell carcinoma using RT-PCR. *Med. Mol. Morphol.* 42(2): 102-109, 2009.
83. Liu SG, Qin XG, Zhao BS, Qi B, Yao WJ, Wang TY, Li HC and Wu XN: Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. *Oncol Lett.* 5(5): 1639-1642, 2013.
84. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K. and Itoh H: Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol. Rep.* 23(6):1625-1633, 2010.
85. Kayoko Matsushima, Hajime Isomoto, Sigheru K, Kazuhiko Nakao: Micro RNAs and Esophageal Squamous Cell Carcinoma *Digestion* 2010;82:138-144

86. Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE and Little VR: MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135(2): 255-260, 2008.
87. Santosh Kumar Patnaik, Reema Mallick, and Sai Yendamuri: MicroRNAs and esophageal cancer *J. Gastrointest. Oncol.* 2010; (1) 55-63
88. S. Volinia, G.A. Calin, Chang-Con Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorino, C. Roldo, M. Ferracin, R. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. Harris, C. Croce: A micro RNA signature of human solid tumors defines cancer gene targets *Genetics* february 14. Vol.103, no.7 2257-2261 2006.
89. Osawa S, Shimada Y, Sekine S, Okumura T, Nagata T, Fukuoka J. and Tsukada K: MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Oncol. Lett.* 2(4): 613-619, 2011.
90. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S and Lu H.: miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab. Invest* 88(12): 1358-66, 2008.
91. Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D and Wang Y: Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus nontumorous tissues. *J. Gastroenterol Hepatol* 24(4): 652-7, 2009.
92. Yao Y, Suo AL, Li ZF, Liu LY, Tian T, Ni L, Zhang WG, Nan KJ, Song TS and Huang C: MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol Med Rep* 2(6): 963-70, 2009.
93. Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, Sun L, Ji G, Shi Y, Han Z, Han S, Nie Y, Chen X, Zhao Q, Ding J, Wu K. and Daiming F: miRNA-223 promotes gastric

- cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res* 9(7): 824-33, 2011.
94. Yao Y Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, Yee AJ, Ang LC, He C, Shan SW and Yang BB: MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene* 30(7): 806-21, 2011.
 95. Espinosa Parella Y et al.: Genetic association of gastric cancer with miRNA clusters including the cancer-related genes MIR29, MIR25, MIR93 and MIR106: results from the EPIC-EURGAST study. *International journal of cancer* Nov.1:135 (9) 2065-76 2014.
 96. Lalond: New Perspective on the Health of Canadians: a Working Document House of Commons on April 1, 1974.
 97. S.A. Navarro et al.: Diet and lifestyle factors and risk of subtypes of esophageal and gastric cancers : classification tree analysis. *Annals of epidemiology* 24 (2014)50-57
 98. Lee CH, Wu DC, Lee JM. et al.: Carcinogenetic impact of alcohol intake on squamous cell carcinoma risk in relation to tobacco smoking. *EuR J Cancer* 43:1188-1199. 2007.
 99. Liu R. Liao J. Sheng J. Yang H. et al.: The cluster of miR-143 and miR-145. Affects the risk for esophageal squamous cell carcinoma through co-regulating Fascin Homolog 1 *PlosOne* www. plosone.org. Vol.7, Is.3. March 2012. 33987.
 100. Saeki H., Ohno S., Araki K. et al: Alcohol consumption and cigarette smoking in relation to high frequency of p53 protein accumulation in oesophageal squamous cell carcinoma in the Japanese. *Br.J. Cancer* 82:1892-1894; 2000.
 101. Saeki H., Ohno S., Miyazaki M. et al: p53 accumulation in multiple oesophageal squamous cell carcinoma relationship to risk factors *Oncology* 62: 175-179. 2002.
 102. www.knuuitula.uppsala. 2012.

- 103.Y. Maehara: Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of ESCC J. Clin Oncol. 15-125. 2010.
- 104.Sadegh Massarrat, Manfred Solte: Development of gastric cancer and its prevention Arch. Iran Med. 17(7):514-520. 2014.
- 105.Tramacere I, Negri E., Pelucchi C, Bagnardi V, Rota M, Scotti L et al. Meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. Ann. Oncol 23. 28-36 2012.
- 106.Shimazu T, Tjusi I, Inoue M, Wakai K, Nagata C, Mizoue T. et al: Alcohol drinking and gastric cancer risk an evaluation based on systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. Reasearch Group for the development and evaluation of Cancer prevention Strategies in Japan Jpn: J. Clin Onc.38: 8-25, 2008.
- 107.Lu J., Getz G., Miska E.A et al: MicroRNA expression profiles classify human cancers Nature 435:834-8, 2005.
- 108.J. Wilmott, Xu Zhang, P. Hersey, R.A. Scolyer: The emerging important role of microRNAs in the pathogenesis, diagnosis and treatment of human cancers Pathology 43(6) 657-671. 2011.
- 109.X. Xu, X. Yang, Ch. Xing, Sh. Zhang, J. Cao: miRNA: nemesis of gastric cancer (Review) Oncology letters 6: 631-641, 2013.
- 110.Ueda T. Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al: Relation between microRNA expresson and progression and prognosis of gastric cancer: a micro RNA analysis Lancet Oncol 11136-146, 2010.
- 111.L. Chen, G. Li, Y Diao, J. Li: Prognostic value of miR-93 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas Acta Gastro-enterologica Belgica 75(1):22-27. 2012.
- 112.Li X, Zhang Y, Ding J., Wu K., Fan D.: Survival prediction of gastric cancer by a seven- micro-RNA signature Gut 59, 579-585. 2010.

113. Tsai K. W et al.: Aberrant expression of miR-196a in gastric cancers and correlation with recurrence Genes. Chromosomes cancer 51, 394-401. 2012.
114. Liu R., Zhang C., Hu Z., Li G., Wang C., Yang C., Huang D., Chen X., Zhang H., Zhuang R.: A five micro-RNAs signature identified from genom-wide serum micro-RNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis Eur. J. cancer 47, 784-791. 2011.

10. KÖZLEMÉNYEK

1. Stanitz E., Juhasz K., Gombos K., Gocze K., Toth C., Kiss I.
Alteration of miRNA Expression Correlates with Lifestyle, Social and Environmental Determinants in Esophageal Carcinoma.
ANTICANCER RESEARCH 35:(2) pp. 1091-1097. (2015)
Impakt faktor: 1,872
2. Stanitz E., Juhasz K., Toth C., Gombos K., Natali PG., Ember I.
Evaluation of MicroRNA Expression Pattern of Gastric Adenocarcinoma Associated with Socioeconomic, Environmental and Lifestyle Factors in Northwestern Hungary.
ANTICANCER RESEARCH 33:(8) pp. 3195-3200. (2013)
Független idéző: 9, függő idéző: 1, Összesen: 10
Impakt faktor: 1,826
3. Juhász Krisztina, Stánitz Éva, Horváth Tibor, Ember István
Humán nyelöcső és gyomor daganatok epidemiológiai és genomikai elemzése
MAGYAR EPIDEMIOLOGIA 8:(4) p. S. 55. (2011)
Összesített impakt faktor: 3,698

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Stánitz Éva, Tompity Tünde, Ungvári Erika, Pászti Judit
Endémiás MRSA-kolonizáció felderítése időskorúak otthonában
LEGE ARTIS MEDICINAE 23:(3-4) pp. 198-202. (2013)
2. Stánitz Éva, VollaintMária, Pászti Judit
Endémiás MRSA kolonizáció időskorúak otthonában
MAGYAR EPIDEMIOLOGIA 8: p. S. 48. (2011)
3. Schneider Ferenc, Stánitz Éva, Kalácska Judit, Tompity Tünde, Gábor Beáta
Pertussis egy szombathelyi középiskolában. Egy járvány tanulságai
ORVOSI HETILAP 150:(33) pp. 1557-1561. (2009)
4. Bognár E., Nádas E., Dombi Zs., Végh Gy., Stánitz É., Fehér K., Szepes É., Farkas B., Ember I.
A bőrrák megelőzési lehetőségei magyar iskoláskorú populációban: Nyugat-Magyarországi vizsgálatok
MAGYAR EPIDEMIOLOGIA 2:(1) pp. 29-36. (2005)

5. Bognár Enikő, Nádas Edit, Dombi Zsuzsanna, Végh György, Stánitz Éva, Fehér Katalin, Szepes Éva, Farkas Beatrix, MinaLomuscio, Ember István
A bőrrák megelőzési lehetőségei magyar iskoláskorú populációban: Nyugat-Magyarországi vizsgálatok
MAGYAR EPIDEMIOLOGIA 2: p. 30. (2005)
6. Stánitz É., Hadarits F.
Funkcionális anatómia: Tanulási segédanyag egészségтанtanár szakos hallgatóknak
Szombathely: Berzsenyi Dániel Főiskola, 2003. 134 p.
(ISBN:ISBN 963 9290 94 7)

11. NYILATKOZAT

DOKTORI ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSA ÉS NYILATKOZAT A DOLGOZAT

EREDETISÉGÉRŐL

Alulírott

név: Dr. Stánitz Éva
születési név: Stánitz Éva
anyja neve: Moldoványi Katalin
születési hely, idő: Szombathely, 1955.10.27.

„Mikro RNS expressziók vizsgálata nyelőcső-és gyomordaganatokban” című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a PTE-ETK Doktori Iskola Mikro-RNS vizsgálatok témacsoportjához

Témavezető(k) neve: Prof. Dr. Kiss István

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: 2015. február

.....
Dr. Stánitz Éva sk.
doktorjelölt aláírása

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan emlékezem néhai Prof. Dr. Ember Istvánra, aki javasolta felvételemet, majd témavezetőm volt a Doktori Iskolában. Lehetővé tette az intézetében működő munkacsoportban a kutatás elvégzését. A kezdeti idők minden megtorpanása ellenére bízott bennem és további munkára biztatott.

Köszönöm Prof. Dr. Kiss Istvánnak, aki témavezetőként folytatta velem a munkát, vállalta ezt, annak ellenére, hogy már egy kijelölt úton haladtak a vizsgálatok. Köszönöm, hogy minden segítséget megadott a befejezésig.

Nagy szeretettel gondolok a PTE ÁOK Megelőző Orvostani Intézet molekuláris epidemiológiai kutatócsoportjára, fiatal munkatársaira, és hálásan köszönöm nekik a közös munkát, segítséget, türelmet. Név szerint is kiemelve: Juhász Krisztina, Gombos Katalin, Gőcze Kata kollégáimat. Természetesen köszönök minden közreműködést az asszisztenseknek, titkárnőknek.

Köszönettel tartozom a Vas megyei Kormányhivatal Népegészségügyi Főosztályán Dryja Jánosnénak.

Végül köszönöm a kitartást és támogatást férjemnek, Dr Hadarits Ferencnek.