

Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Program 1. Főirány: Életminőség javítása

**NKFP1/48/2001**

*Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium  
a daganatos halálozás csökkentésére*

2001. május 15.-2004. december 31.

# **Zárójelentés**

**Dr. Tímár József**  
projektvezető

## ***Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium a daganatos halálozás csökkentésére 2001-2004, Összefoglaló***

### *Bevezetés*

A 2001-ben indult Nemzeti Kutatásfejlesztési Program alkalmat adott arra, hogy megalakuljon egy igen széles szakmai palettát képező kutatás-fejlesztési hálózat a hazánkban működő, az onkológiának különböző területeit képviselő szervezetekből (a Nemzeti Onkológiai Konzorcium) melynek az Országos Onkológiai Intézet lett a koordináló Intézete. A Konzorcium szakmai képviselői mellett (4 országos Intézet, a 4 hazai orvosegyetem) igen fontos fejlemény volt, hogy a Konzorciumba sikerült integrálni a hazai onkológiai gyógyszerpiac vezető külföldi képviselőit is. A közösen kialakított tudományos program és ennek révén az elnyert 4 éves pályázati támogatás alkalmat adott arra, hogy korábban példa nélküli mértékben összefogott kutatásfejlesztés induljon el az onkológia kiemelt területein. A jelentős állami és saját források arra ösztökéltek bennünket, hogy a szűkebb kormányzati hivatalos út mellett a szélesebb szakmai közvélemény számára is bemutassuk munkánkat. Ennek megfelelően a Konzorcium működésének első éves eredményei közül az alábbiakat emeljük ki.

### *Epidemiológia*

A hererák esetében eddig még nem volt ismert örökletes genetikai tényező, mint kockázatonövelő faktor, pedig az epidemiológiai adatok erre utáltak, ugyanis hererákos családok utódaiban a hererák rizikója jelentősen megemelkedett a hazai 293 eset analízise alapján. A hererákosok 2-5%-ban kétoldali daganat alakul ki, ami páros szervek esetében mindig érzékeny indikátora szokott lenni a genetikai tényező jelenlétére. A kandidátus gének között felmerült a c-kit onkogén aktiváló mutációjának szerepe. E célból a munkacsoportunk egy nemzetközi konzorciummal közösen nagyszámú egyoldali és kétoldali hererákos esetben vizsgálta a c-kit 816 codon mutációját és azt találtuk, hogy ez az eltérés az egyoldali hererákban igen ritka, míg a kétoldali esetekben 93% gyakoriságú. A c-kit gén etiológiai szerepének pontosabb tisztázására 93 hererákos családot vizsgáltunk a c-kit gén szomatikus mutációira (exon 10,11,17, amely a GIST tumorokban érintett). Ötféle mutációt észleltünk és ezek az egyoldali tumorokban ritkák voltak (2/116) míg a kétoldaliakban gyakoribbak (2/7).

Az epidemiológiai vizsgálatok eredményei szerint a méhnyakrák miatti halálozás jelentősen magasabb Budapesten, mint az országos átlag. Veszélyeztetett területnek számít még Miskolc, Szolnok, Debrecen, Szeged, Székesfehérvár a Dunántúl és a Duna-Tisza köze is, mivel ezeken a területeken az átlagosnál jóval gyakoribb a méhnyakrákos megbetegedések miatti halálozások száma. Ugyanakkor a méhnyakrákos esetek száma Borsod és Szabolcs, valamint Bács-Kiskun és Csongrád megyékben a legalacsonyabb. Az országos átlagtól való jelentős többlethalálozás csökkentése tehát kiemelt feladat mind a megelőzés, mind a gyógyítás számára. A HPV kutatások során azt találtuk, hogy a HPV-pozitív nők férfi partnereinél a tünetmentes glans penis hámjában 52.4%-ban volt HPV fertőzés kimutatható olyan típus-megoszlásban, mint amit a méhnyak hámjában is megfigyeltünk, igazolva a fertőzés eredetét. Igazoltuk, hogy a HPV negatív és pozitív fej-nyaki laphámrákok elkülönítése prognosztikai jelentőségű. A HPV pozitív verrucosus és basaloid laphámrákok kedvezőbb túlélési arányt mutatnak, mint a HPV negatív típusos laphámcarcinomák. A hasonló módszerekkel végzett analízisek a prosztataraák

vonatkozásában igazolták, hogy hasonlóan az emlőrákhoz, Budapesten, BAZ és JNSZ megyékben a prosztatrákos halálozásban is jelentős halmozódások mutathatók ki. Ugyanakkor hasonló góccok találhatóak ezek mellett Zala-, Pest-, Fejér- és Bács-Kiskun megyékben is ahol a magyar lakosság 25%-a él.

#### *Emlőrákkal kapcsolatos kutatások*

Szakmai és társadalmi szempontból kiemelt érdeklődés a hazánkban népbetegségnek számító *emlőrákkal* kapcsolatos kutatásokat övezi. A hazai emlőrákbetegség molekuláris epidemiológiájára irányuló vizsgálatok eredményeiből kiemelendő hogy a hazai DNS bank 337 emlődaganatos család/személy DNS mintájával gyarapodott. 100 új daganatos család esetében végeztünk szindróma-analízist, A vizsgálatok kezdete óta 31 különböző BRCA1/2 mutációt azonosítottunk, ebből hatot (5 BRCA1 és, 1 BRCA2 mutáció) az elmúlt félévben. Megállapítható, hogy a Magyarországon megismert BRCA1 mutációk 95%-a, a BRCA2 mutációk 78%-a ún. alapító (közös ősökre visszavezethető, több családban előforduló) DNS szekvenciaváltozás.

A program keretében elvégeztük az emlőrák miatti halálozás területi halmozódásának vizsgálatát térinformatikai elemző módszerekkel (régió- és klaszter analízis, 21,29) az 1986-1997, illetve ezen belül 1986-91 és 1992-97 közötti években. A magyarországi halálozási adatok elemzésekor megállapítható, hogy az országos szintnél magasabb halálozás figyelhető meg Budapesten, Csongrád megye egyes területein, valamint Borsod-Abaúj-Zemplén és Jász-Nagykun-Szolnok megye területén. Kiemelésre érdemes még ezek mellett a Fejér megyei emlőrákos halandóság növekedése, amely szintén a megfigyelés második szakaszában vált jelentősebbé (1992-97).

A carcinogenezis folyamatát a tumor szuppresszor gének inaktiválása kíséri. A gén inaktiválás epigenetikus úton is kialakulhat a gén-promoter régió hypermetilációjával. Meghatároztuk az emlődaganatok tumorszuppresszor génjeinek metiláció inaktiválását (BRCA1, APC), valamint a szerreisztenciában szerepet játszó MGMT és hMLH1 epigenetikus inaktivációját. A vizsgálat sorozat egyik alapvető célkitűzése annak eldöntése, hogy a metilációs markerek keringő daganatsejtek, illetve szérumban megjelenő tumor DNS kimutatására is alkalmasak-e. A metilált gének analízisét a primer emlő daganatokban, keringő daganatsejtekben és szérumban DNS mintákon is elvégeztük. Az emlő daganatok epigenetikus vizsgálata alapján bebizonyosodott, hogy a daganat sejtek metilációs mintázatának meghatározása elősegítheti a daganat progresszió nyomonkövetését, a terápia monitorizálását, a daganatok molekuláris stagingjét. A promoter regio hypermetilációja 100%-os biztonsággal kimutatható mind a tumorszövetben, mind a szérumban, eloszlása nem random, költség hatékony és gyors eljárás, ezért a hypermetilált DNS ideális tumor markernek tekinthető.

Sporadikus emlőrákokban vizsgálva a DNS repair-gének LOH frekvenciáját megállapítottuk, hogy a jobb prognózisú lobuláris carcinomában ritkább, ugyanakkor a ductalis carcinomákban elsősorban a DNS repair-géneket érinti. A csontáttétek képződésének képességével járó primer tumorokban csökkent NM23 és fokozott c-met, Her2 és p53 expressziót tapasztaltunk. A Her2 amplifikáció sajátosságait vizsgálva felhívtuk a figyelmet arra, hogy a primer tumor Her2 genotípusa nem feltétlenül jellemzi a csontáttétét, s ha az műtetre kerül célszerű újra meghatározni a költséges Herceptin terápia előtt. Másrészt bemutattuk, hogy a ductalis carcinomák két csoportra oszthatók erezettség alapján és a jól erezett daganatok áttéteinek kemoterápiája angioszuppresszív hatással is jár. Kimutattuk, hogy a chip technológia kombinálása kvantitatív PCR módszerrel jelentős segítséget jelenthet az emlőrákok Taxán, Antraciklin és Herceptin érzékenységének objektív felmérésében és a terápia individualizálásában. Kísérleti rendszerekben kimutattuk a GnRH analógok

potenciális szerepét a steroid receptor negatív emlőrákok kezelésében: a Zoladex kezelés hatását cyclinB és Bax expresszió fokozódással és G2/M blokkal jellemeztük. Célunk az volt, hogy az emlő daganatok kialakulását és progresszióját kísérő genetikai utakat DNS chip technológiával feltérképezzük és ezáltal elősegítsük a daganatok molekuláris diagnózisát, prognózisát és az individuális terápiás terv kialakítását. A vizsgálatsorozat lehetővé teszi, hogy a daganatokat a genetikai lenyomat alapján alcsoportokba soroljuk és új terápiás célpontokat azonosítsunk.

Az emlő daganatos minták génexpressziós mintázatának meghatározására az alábbi cDNS chipeket használtuk 245 emlő daganatos betegből izolált RNS minta felhasználásával: 1. Growth Factor Gene Array, 2. Tumor Metastasis Gene Array, 3. Angiogenesis Gene Array, 4. Cancer Drug Resistance & Metabolism Gene Array, 5. DNA Damage Signaling Pathways Gene Array. Az általunk alkalmazott cDNS chip vizsgálatok alkalmasak a daganatok HER2 statusának és az ehhez társuló metasztázis kaszkád enzimek analizisére is. A vizsgálatok elősegíthetik új kombinációs terápiás eljárások kifejlesztését (kináz gátlók, antiangiogenetikus terápia). Vizsgálataink szerint a HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok genetikai lenyomata jelentős mértékben különbözik egymástól, amely főleg a metasztázist elősegítő proteázok emelkedett szintjében a transzport fehérjék fokozott expressziójában nyilvánul meg. Adataink alátámasztják és magyarázatul szolgálnak a HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok eltérő tumor biológiai sajátosságára és elősegíthetik az optimális terápiás terv kialakítását.

Vizsgálatainkban 65 Taxán rezisztens és 165 szenzitív emlő daganatos mintából RNS-t, DNS-t izoláltunk. A Taxoter transzportban szerepet játszó MDR1 gén polimorfizmust (Exon 12 C1236T) SSCR és DNS szekvencia analízissel vizsgáltuk. Az MRP1-MRP5, valamint HER2 és EGFR expresszió mértékét cDNS chip segítségével határoztuk meg. Vizsgálataink szerint a Taxoter rezisztencia kialakulásához a transzport fehérjék polimorfizmusa (MDR1) transzport gének közül az MDR1, MRP1 emelkedett expressziója, valamint az EGFR, HER2 gének overexpressziója járul hozzá. Az általunk végzett génpolimorfizmus és cDNS chip vizsgálatok elősegítik a Taxán rezisztencia mechanizmus megismerését és a hatékonyabb kombinációs terápiás eljárások kifejlesztését.

Az emlő tumoros betegek kezelésének meghatározásakor ma már nélkülözhetetlen a mikrometasztázisok kimutatása, amit érzékeny molekuláris technikákkal lehet megvalósítani. 470 emlőtumoros beteg vérmintáinak és 145 emlőtumoros beteg csontvelő mintáinak analízise alapján megállapítottuk, hogy a betegek 28,5%-ban keringő daganatsejtek jelenléte igazolható. Másrészt a csontvelő minták 32%-ában is kimutattunk daganatsejteket. Ezen esetek közel harmadában a HER-2 illetve a Topo II szint szignifikánsan megemelkedett, ami a tumorsejtek Taxol- illetve antraciklin rezisztenciáját idézheti elő. Ezen "microstaging" eljárás nemcsak a daganat pontos stádium-meghatározását segítheti elő, hanem a terápia helyes megválasztását is.

### *Colorectalis daganatok*

Népegészségügyi szempontból hasonlóan nagyjelentőségű a *colorectális daganatok* területe, ahol a hatékony szűrési technológia alapja a bélvérzés kimutatása. Kidolgoztuk a vérkimutató érzékenyítését a haemoglobin és albumin párhuzamos immunkémiai kimutatásával. Ugyanakkor a colorectális daganatok 20%-a nem vérzik a vizsgálatkor, ezek székletből történő kimutatására az u.n. „ektópiás” lactoferrin vizsgálatot dolgoztuk ki. Több mint 10000 tünetmentes egyén esetében alkalmaztuk a rejtett bélvérzés kimutatására a haemoglobin (H), albumin (A), lactoferrin (L) és casein (C) kimutatásának újonnan kifejlesztett immunkémiai módszerét. Az eljárást az

OLI nyilvántartásba vette. A program 21 rákos esetet igazolt, amely kimutatásában a H+A kombináció látszik a legigéretesebbnek. A szűrés a bélvérzés kimutatására alapozódik, amelyről azonban bebizonyosodott, hogy nem eléggé daganat specifikus. Az Országos Onkológiai Intézet Központi Laboratóriumában olyan új immunkémiai módszert dolgoztak ki, amely segítségével a vastagbél daganatok jelenléte nagyobb biztonsággal, nagyobb gyakorisággal mutatható ki. Az új szűrési eljárás lényege az anti-hemoglobin és anti-albumin szérum együttes alkalmazása a széklet minták analizésére, amely hatékonyságát 6805 50 év feletti személy vizsgálatával ellenőriztünk. A kettős immunkémiai fehérje kimutatás alapján 30%-kal több vastagbél volt azonosítható, mint a bélvérzés kimutatásán alapuló módszerrel. Az eljárás szabadalmi bejelentése megtörtént. Az új kettős immunkémiai szűrési módszer alkalmazásától a vastagbél daganatok hatékonyabb szűrése és ezáltal a betegek gyógyulási esélyének javulása várható.

Az epidemiológiai program keretében 2003-ban a hazai kolorektális daganatok epidemiológiáját és térségi eloszlását vizsgáltuk. Megállapítható, hogy a colorectális daganatok miatti halandóság mindkét nemben Európa országai közül hazánkban a leggyakoribb és emelkedő tendenciát mutat. A férfiak colorectális daganat miatti halálozása az életkorral exponenciálisan nő. A fiatal korcsoportok klasztereinek térbeli megjelenése egymástól és az idősebb korcsoportok klasztereinek megjelenésétől szignifikánsan eltér, az aggregáció mértéke alacsony fokú, a megjelenés véletlenszerű. Az 55 évnél idősebb korcsoportok klaszterei térben szignifikánsan azonos helyeken fordulnak elő (Budapest, Heves, Jász-Nagykun-Szolnok, Nógrád, Komárom-Esztergom, Baranya megye).

A nőknél is kimutatható a halálozás exponenciális növekedése az életkor függvényében. A klaszterek elhelyezkedése nagyon hasonló a férfiakéhoz. A nők esetében a vastagbél daganat növekedésének üteme kifejezett az időségek között, míg a végbél daganatok miatti halálozás mind a közép- mind az idős korúak körében csökken. A halálozás területi eloszlása fiatalabb korban egyenletesebb, idősebb korban figyelhető meg területi halmozódás: a vastagbél daganatok az ország középső megyéiben, míg a végbél daganatok a Dunántúl egyes részein halmozódnak. A területi halmozódás mindkét nemben hasonlóan alakult.

72 vastagbél daganat esetében végeztük el az APC gén inaktivációjának vizsgálatát, amiből kiderült, hogy döntően mutáció, másodlagosan allélvesztés révén következik be, amit keringő daganatsejtek kimutatására is fel lehet használni. A hazai vastagbél daganatok mikroszatellita analízise rámutatott arra, hogy ezek egyharmada MSI-low csoportú, ez esetben pedig a genetikai változás vagy a hMLH1 gén hipermetilációja, vagy a hMSH2 gén allélvesztése. Csaknem 300 vastagbélrák metilációs analízise alapján kiderült, hogy az APC és Ecadherin szuppresszor gének gyakran hipermetiláltak, de ugyanez történik az esetek negyedében egy apoptózis-génnel is (DAPK). Az alkiláló szerekkel szembeni érzékenységet az MGMT gén expressziójának detektált polimorfizmusa illetve fokozott metiláltsága a sporadikus vastagbél daganatok esetében jelentősen befolyásolhatja, ezért ennek vizsgálata prediktív/prognosztikus szempontból ajánlott.

A HNPCC típusú örökletes vastagbél daganatok kialakulására hajlamosító hMLH1, hMSH2 mutációk vizsgálatát 24 beteg esetében végeztük el. A vizsgálat sorozat kiemelkedő eredménye 4 új, csak Magyarországon előforduló, hMLH1, illetve hMSH2 mutáció azonosítása. Vizsgálataink hozzájárulnak a magyarországi HNPCC szindrómás betegek mutációs spektrumának meghatározásához és ezáltal elősegítik ezen genetikai betegséget hordozó családtagok azonosítását.

A szerin hidroximetil-transzferáz (SHMT) egy kulcsfontosságú folát anyagszere enzím. A vizsgált kontrollpopuláció SHMT1 C1420T genotípus megoszlása nem tér el az ismert kaukázusi populációs eloszlásától. A vizsgált kolorektális daganatos (CRC) populáció SHMT1 genotípus frekvenciái szignifikánsan eltérnek a kontroll populációtól, azonban ezen genotípus és a CRC-re való hajlam közötti összefüggés még további vizsgálatot igényel. A timidilát szintáz (TS) mRNS két végén található génpolimorfizmusok vizsgálata és kombinált értékelése a CRC-s betegek esetében az adjuváns kezelésre adott terápiás válasz, a betegségmentes- és teljes túlélés predikcióját teszi lehetővé és ezzel a rossz prognózisú esetekben az 5-fluorouracil kezelés más gyógyszerrel (irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab) történő kiegészítésének szükségességét jelzi. Az metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmus meghatározása a 5-fluoropirimidin kezeléssel metasztatikus colorectalis betegek esetében prognosztikai értékkel bír. Ezen felül segítséget nyújthat a személyre (csoportra) szabott terápia megtervezésére (pl. a rosszabb prognózisú CC genotípusú betegek esetében a szekvenciális kemoterápia /első vonalban 5-FU+LV, második vonalban 5-FU+LV+Irinotecan/oxaliplatin alkalmazása/, vagy ha egyéb kontraindikáció nincs, az első vonalbeli 5-FU+LV+Irinotecan majd 5-FU+LV+oxaliplatin kombináció javasolható). Genetikai vizsgálataink szerint az alacsony dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD) aktivitás és vagy IVS14+1G→A mutáció esetén fluoropirimidin terápia alkalmazása tilos, helyette más gyógyszert (pl. irinotecan) kell alkalmazni.

Nagyszámú kolorektális daganat vizsgálata alapján kimutattuk, hogy a timidilát szintáz (TS) polimorfizmusai daganatra való fogékonyságot befolyásoló tényezők valószínűleg a TS1494del6 polimorfizmussal kombinálódva. Azt is kimutattuk, hogy a TS (tumorszuppresszor-szerűen) LOH-re hajlamos (a daganatok közel 40%-ban). Ez az eltérés prognosztikus értékű is, mert incidenciája nő a daganatos progresszióval (Dukes stádium). Felmerül az is, hogy a microsatellita instabil genotípust a TS microsatellita helyek analízisével is meg lehet határozni. A génpolimorfizmusok esetében a TS aktivitásra gyakorolt hatást is meghatároztuk igazolva a 3R/3R és a 6-/6- homozigotáság jelentőségét. A 3R/3R genotípus lassabb áttétképzéssel és hosszabb túléléssel társul, szemben a 6-/6- polimorfizmussal. A kolorektális daganatok kezelésének fő komponense az 5-FU, melyet a DPD bont el. Vizsgálataink szerint ezt a folyamatot a veseműködés zavarai jelentősen befolyásolják, aminek klinikai jelentősége van. Kimutattuk azt is, hogy az újabban bevezetett kemoterapiás szerek nem befolyásolják az 5FU terápiás hatékonyságát/fakmakokinetikáját. Az 5FU molekuláris hatásait vizsgálva kimutattuk annak kétfázisú voltát: a korai citotoxikus szakban az érzékeny sejtekben a TS expresszió lecsökkenését, majd a második hullámban a relatíve rezisztens sejtekben fokozottan expresszálódó TS FdUMP 5FU-metabolit általi funkcionális inaktiválását.

#### *Fejnyaki daganatok*

Hazánkban az elmúlt években drámai módon nőtt a *fejnyaki daganatos* halálozás ezért a program kiemelten kezeli ezt a területet is. A korábban már említett regionális daganatos halálozási analízis kimutatta, hogy hazánk bortermező vidékein szignifikánsan fejnyakdaganatos halálozási többlet mutatható ki ami párhuzamba állítható az alkoholos májbetegség miatti halálozási többlettel. Molekuláris epidemiológiai vizsgálataink kimutatták, hogy konvencionális kromoszóma analízis alapján az aberrációt hordozó sejtek aránya a daganatos betegekben, alkoholistákban és az egészséges dohányzóknál egyaránt magasabb, mint a nem dohányzó kontroll populációban. A mutagén érzékenység viszont a daganatos és alkoholistákban

betegcsoportokban szignifikánsan emelkedett a dohányzó és nemdohányzó csoportokhoz képest. Ugyanakkor megállapítható, hogy a hazai kontroll személyek 42-49%-a mutagén érzékeny, amely érték kétszerese az amerikai és nyugat-európai adatoknak. Ez utóbbi jelenség hátterében xenobiotikum-metabolizáló enzimek polimorfizmusa vehető fel. Előzetes vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az adott mutagén-érzékenységet jelentős mértékben meghatározó XRCC1 DNS repair-enzim gén 280-as kodonjának polimorfizmusa a reparációs kapacitás csökkenését jelentheti azoknál a személyeknél, akik magas kromoszóma-aberrációs értékekkel rendelkeznek. Ugyanakkor ezen gén 399-es kodonjának polimorfizmusa kedvezőbb reparációs készséggel járhat együtt.

További vizsgálataink egy újabb etiológiai tényezőt azonosítottak a hazai fejnyaki daganatok esetében: 157 daganat vizsgálata alapján megállapítható, hogy ezen tumorok 40%-ában HPV vírus mutatható ki, elsősorban annak ún. onkogén 16-os variánsa. Klinikai kutatásaink során fény derült másrészt arra, hogy a fejnyaki daganatok mintegy 50%-ában autentikus ösztrogén és progeszteron receptor expresszió mutatható ki, ami felveti annak lehetőségét, hogy ez a daganatfejlés is hormonfüggő lenne.

Epidemiológiai adatok a hazai fejnyaki daganatok gyakoriságának exponenciális növekedését mutatják, aminek genetikai háttere is lehet. Az egyéni rákkockázat vizsgálatára a belomycin tesztet használják. Ezt vizsgáltuk közel 300 nemdaganatos dohányzó, vagy nemdohányzó egyedben és 156 fejnyaki daganatos betegben. Kiderült hogy a módszer önmagában nem használható hazánkban a rákkockázat becslésre, mert a nemdaganatos populációban is igen magas a mutagén-érzékenység, aminek hátterében detoxikáló és/vagy karcinogén metabolizáló enzimek esetleges polimorfizmusa állhat. Ennek vizsgálatára a DNS repairben érintett XRCC1/3, a metilációban érintett MTHFR és az ismert tumor szuppresszor p53 polimorfizmusait határoztuk meg 204 daganatos beteg és 218 egészséges egyénben PCR-RFLP illetve olvadáspont-analízissel. Az XRCC1 gén c194/TT polimorfizmusát védő hatásának gondoljuk. Dohányosokban az MTHFR c1298 CC polimorfizmusa gyakoribb volt a nemdohányzó csoportnál hasonlóan a XRCC1 c399 AA polimorfizmusához, ami az életmódbeli sajátosságokkal kombinálódó genetikai predispozíció lehetőségét veti fel. A fejnyaki daganatok prognózisát feltételezhetően immunológiai tényezők is befolyásolják, ezt vizsgáltuk 72 szájrákos beteg mintájában és jellemeztük a gyulladáshoz és immunológiai sejtek összetételét. A fejnyaki daganatos betegekben igen gyakran mutattuk ki az individuális immunszuppressziót, aminek érzékeny jele lehet a jelentősen lecsökkent lokális CD4/CD8 arány (<1). Fejnyaki daganatok terápiájának alapja az irradiáció aminek sikeressége számos tényezőtől függhet, feltételezésünk szerint az érzéketlenségtől is. 55 daganat pre- és postirradiációs mintájának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a terápia hatásossága (RFS és teljes túlélés) megjósolható a kezelés során a daganat érzéketlenségének szignifikáns csökkenéséből. Kísérleti humán metasztatizis modellen bemutattuk, hogy szuboptimális besugárzás és alacsony dózisú taxán kezelés a daganat áttétképző képességének fokozódásával járhat. Márpedig ilyen körülmények klinikailag igen gyakoriak lehetnek a rosszul vaszkularizált daganatokban, tehát az ilyen modalitásokat célszerű volna előzetesen kísérletesen tesztelni.

A fejnyaki daganatok prognózisára, terápiás érzékenységük jellemzésére p16, p53, XPD, EGFR génpolimorfizmus, illetve a p16 és p53 gének mutációs analízisét végeztük el 152 tumoros szövet minta, illetve 204 vérminta felhasználásával. Megállapítottuk, hogy p53 mutáció vizsgálata fejnyaki daganatokban előre jelzi a másodlagos daganatok és recidívák megjelenésének veszélyét. A fejnyaki daganatok

terápiás érzékenységeinek predikciójára meghatároztuk a CisPt érzékenységben szerepet játszó XPD polimorfizmust, a hMLH1 gén metilációs státuszát, valamint az EGFR expressziót szabályozó intron1 polimorfizmust. Vizsgálataink lényeges megállapítása az, hogy a terápiás érzékenységet szabályozó gén inaktiváció gyakorisága különböző anatómiai lokalizációban megjelenő daganattípusokban egymástól eltérő. A CisPt érzékenységet szabályozó XPD gén polimorfizmus a garat daganatokban a legmagasabb, amely fokozott szerérezékenységgel társulhat. A tirozin kináz gátlókkal szembeni érzékenységet jelző EGFR polimorfizmus a szájüregi daganatokban a legmagasabb, amely fokozott EGFR expressziót és fokozott szerérezékenységet eredményezhet. Az általunk végzett polimorfizmus vizsgálatok hozzájárulhatnak a fej-nyak daganatos betegek individuális terápiás tervének kialakításához és ezáltal a betegek gyógyulási esélye javulhat.

#### *Gyermekonkológiai program*

A Konzorcium *gyermekonkológiai programja* keretében a leggyakoribb szolid gyermekkori daganat a neuroblasztóma szűrésére megtörténtek az első szervezeti lépések, az alkalmazandó vizelet-VMA kimutatási módszer validálása. Bevezetésre került a neuroblasztóma molekuláris prognosztikai markerének az N-myc onkogénnek kvantitatív meghatározására szolgáló módszer is. Klinikai kutatások kimutatták, hogy a sporadikus gyermekkori nephroblastomás (Wilms tumor) esetekben onkogén HPV expresszió van a tumorban jelen, ami az anyai HPV fertőzés epidemiológiai szerepét veti fel ezen daganatféleség esetében. A leggyakoribb gyermekkori malignus daganat az akut limfoblasztos leukémia epidemiológiájának vonatkozásában megállapítottuk, hogy annak előfordulása a 90-es évek elejétől lassan csökken. Ugyanakkor a hazai gyermekkori ALL-ben a jó prognózisú hiperdiploid illetve t(12:21) génmarkerűek aránya a nemzetközi értékekhez képest jóval alacsonyabb (22,23). Bevezetésre került a gyermekkori ALL molekuláris monitorozásának módszere a WT1 gén perifériás vérben történő meghatározása segítségével, mely alkalmas volt arra, hogy az esetleges recidívákat a klinikai recidíva észlelését megelőzően hónapokkal előbb jelezze. Az ALL lehetséges új prognosztikai faktorait vizsgálva a CD44v6 variáns expressziójának potenciális prognosztikus szerepére mutattunk rá (17). A gyermekkori leukémiák csontvelőátültetéssel történő kezelése során gyakran kerül alkalmazásra GCSF illetve GM-CSF citokín kezelés, melynek potenciális daganatstimuláló hatásaira a jelen kutatási periódusban derült fény (1). Ugyanakkor bemutattuk, hogy különböző gyermekkori daganatokban az IFN- $\alpha$  kezelés kedvező eredménnyel járhat.

A gyermekkori malignus tumorok között hazánkban (is) az ALL áll első és a neuroblastoma a 2. helyen ezért a project ezek vizsgálatára koncentrál. Az ALL-es betegek gyógyulási esélye hazánkban az elmúlt 10 év analízise alapján gyakorlatilag azonos nyugat-Európai társaikéhoz. Emiatt egyre nagyobb jelentősége van a minimális reziduális betegség vizsgálatának, amiért molekuláris módszereket vezettünk be, (kvantitatív PCR-t, és a FISH vizsgálatokat), amelyeket azonban széles körben el kell terjeszteni. Hasonlóan nagy a jelentősége a terápiás érzékenység predikciójának, aminek céljából in vitro MTT tesztet dolgoztunk ki. Kimutattuk, hogy az ALL ezen sajátossága a klasszikus klinikai rizikócsoportha sorolással nem függ össze. Klinikai körülmények között teszteltük az IFN $\alpha$  és reténsav kiegészítő kezelést leukémiás és szolid tumoros gyermekekben. A biztató eredmények alapján széleskörű fázis-vizsgálatokat javasolunk. Preklinikai modellben sikerrel alkalmaztuk a bcl2-antiszenz génterápiát leukémia kezelésére. A WT1 ALL marker szerepét tovább vizsgálva 4 új, eddig még nem ismert splice variánsát azonosítottuk, amelyek

prognosztikus szerepére nézve pozitív adatokat nyertünk. 174 neuroblastomás gyermek vizeletmintájának VMA vizsgálata során kilenc esetben észleltünk magas VMA/kreatinin arányt, ami 5%-nak felel meg. A magas VMA/kreatinin arányt az alacsony kreatinin érték okozta, ami a vizeletgyűjtés nem megfelelő voltából adódott (túlzott folyadékbevitel a gyűjtés előtt). Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy neuroblastomára utaló kórosan magas VMA indexet egyik minta sem mutatott. Ez összhangban van a betegség alacsony incidenciájával. A neuroblastoma incidenciáját figyelembe véve 500 alatti esetszámnál még nem feltétlenül várható pozitív eset. Mégis hasznosnak ítéljük az elvégzett vizsgálatokat, mivel segítséget nyújtottak a gyermekkori vizeletgyűjtés problémáját megoldó random vizeletből való mérési technika kidolgozásában. Meghatároztuk a hazai egészséges gyermekpopulációra a VMA index referencia tartományát, amely közel azonos a HPLC-s analízissel kapottal. A 20%-ban előforduló kóros leletek megerősítik a (kis)gyermekkori szűrő jellegű kvalitatív vizeletvizsgálatok jelentőségét. E vizsgálatok jelentősen javítanak az 1-3 éves korosztályban fellépő húgyúti fertőzések, egyéb vesebetegségek és a diabetes mellitus korai felismerését. Vizsgálataink szerint az N-myc génamplifikációt mutató neuroblastomás betegek túlélése valamivel kedvezőtlenebb volt mint azoké a betegeké, amelyek tumorában az N-myc nem volt amplifikált. Azoknak a betegek a túlélése sokkal kedvezőbb volt, amelyek tumora egy sejtpopulációból épült fel mint azoké a betegeké, amelyeknek tumora két vagy több aneuploid sejtpopulációt tartalmazott, vagyis globális genomiális instabilitás állott fenn.

#### *Agydaganatok*

Az *agydaganatok génterápiáját* célzó nagyívű program első lépéseként elkészült a daganatok érzékenyítésére felhasználható GM-CSF-et kódoló adenovírus vektor-rendszer, melynek emberi agydaganat-sejtvonalakat fertőző képességét is igazoltuk in vitro. Különböző kísérleti rendszerekben igazoltuk a génterápiás eljárás hatásosságát. A targetként szolgáló emberi agydaganatok molekuláris sajátosságainak megfelelően un. alternatív adenovírus-vektor-rendszert is kialakítottunk, amely az esetleges vírus-receptor hiányában is képes a terápiás gént a daganatsejtekbe bejuttatni. A fentiek alapján elkészült a klinikai fázis-I vizsgálatok szakmai protokollja.

Rágcsáló glioma sejtek 5-FU/Ganciklovir terápia érzékenyítését értük el a daganatsejtek UPRT génbevitelével adenovírus vektor segítségével. A genetikai módosítás csak az 5FU/sugárkezelés esetében volt hatásos. Egy másik vizsgálatban azt tanulmányoztuk, hogy a rágcsáló glioma sejtek immunogenitása fokozható-e un. kostimulációs molekula (B7-1) forszírozott expresszióját végző glioma sejt vakcinával. A vizsgálatok azt mutatják, hogy heterotopikus környezetben (bőr alatt) az ilyen módosítás/ daganat vakcinálás nem hatásos, míg megfelelő alacsony dózisban adagolva orthotopikus környezetben (agyban) pozitív terápiás válasz nyerhető. A program másik részében elkészült a részletes humán fázis I GMCSF génterápiás protokoll végleges változata.

#### *Molekuláris patológiai kutatások*

NHL betegek minimális reziduális betegségének kimutatása egyre gyakoribb feladat a sikeres kezelések eredményeként. Több mint 50 ilyen eset analízise azt mutatta, hogy ezt a feladatot immunhisztokémiai módszerekkel általában el lehet látni, az esetel mintegy 10%-ban van szükség a bcl2 vagy a IgH génátrendeződés meghatározásának felhasználására. A HPV daganatkeltő hatásának tisztázására jelenleg több mint 800 minta vizsgálatát végeztük el. Ebből kiderül, hogy a méhnyakrákok 65, a szájüregi, gége, nyelőcső, cardia(gyomor)-daganatok egyharmada, míg a tüdőrákok 16%-ában

mutatható ki HPV fertőzöttség, amit elősorban molekuláris másodsorban immunhisztokémiai módszerrel lehet igazolni. A HPV+ daganatok elősorban nemdohányzó/nem-alkoholizáló nőkben gyakori kóroki tényező és jellegzetes szövettani típussal kombinálódik. Végül egy örökletes vastagbélrákban szenvedő beteg felfedezése alapján a család több mint 100 tagjának vizsgálata történt meg a betegségre hajlamosító MMR gének analízisével. Kiderült, hogy a családban a hMLH1 gén inaktivációja történik egy új intron-mutáció következtében. Klinikopatológiai vizsgálataink szerint a TTF1 transzkripciós faktor expressziója alkalmas a primer és áttéti tüdőrák elkülönítésére (100-as minta). Hazai fiatal tüdőrákos populáción folytatott vizsgálat (90 beteg) arra hívta fel a figyelmet, hogy ebben a populációban, eddig még nem tisztázott okból, fokozottabb a veszélye a haematogén szóródásnak. Tüdő adenocarcinomák esetében pedig felhívtuk a figyelmet az agyi áttétképző képesség akcelerált voltára.

A B sejtes Non-Hodgkin lymphomák diagnosztikája számára kidolgoztunk egy olcsó és gyors módszert a bcl-2 génátrendeződés mennyiségi és minőségi analízisére, valamint a molekuláris relapsus előrejelzésére és a minimális reziduális betegség kimutatására csontvelőben és nyirokcsomóban.

A hazai tüdő adenocarcinomák (melyek terápiájában az EGFR tirozinkináz gátlók kapnak szerepet) vizsgálatának tanulsága az, hogy az esetek felében abnormalis EGFR mintázat észlelhető azonban az esetek csak mintegy 10%-ban van erős (fokozott) receptor expresszió és ezeknek is csak egy részében változik meg a mintázat (daganatos forma). Ez utóbbi jelenség arra utalhat, hogy amennyiben a receptor protein expressziós szintje és mintázata összefügg a receptor fokozott és/vagy aberráns funkciójával, az esetek csak egy kis százalékában van ennek morfológiai jele.

A *daganatos progresszióra* vonatkozó kutatások során több, a malignus melanóma progressziójában szerepet játszó gént azonosítottunk, mint amilyen az  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin, a CD44v3 és decorin proteoglikánok, a 12-lipoxigenáz enzim és egy új kemokín receptor a gp78/AMFR. Ezek közül a CD44v3 expresszióinak egyértelmű negatív prognosztikus értéke van. Terápiás szempontból kísérleti rendszerekben az  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin és a sejtfelszíni proteoglikánok használhatók ki sikeresen a melanóma progressziójának fékezésére, amit az anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 antitest- (RheoPro) és a heparin adagolása igazolt. Kísérleti rendszerekben igazoltuk, hogy az extracelluláris matrix-környezet alapvetően befolyásolja különböző emberi daganatsejtféleségek biológiai viselkedését (proliferációs képességét és invazivitását) valamint kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységét.

Kísérleti körülmények között humán fibrosarcoma sejtek alvó (dormant) állapotát indukáltuk ECM jelenlétében. Ezek a sejtek laminin hatására csökkenő mitogenicitást is motilitást mutatnak, míg ezzel ellentétes hatású a IV kollagén és a HSPG. Az ECM jelenlétében kialakuló multicelluláris komplexek csökkent apoptózis-érzékenységűek. További vizsgálatok során a proliferációs készség és a kollagenáz expresszió/aktivitás összefüggéseit vizsgáltuk és megállapítottuk hogy a ciklusból való kilépés során fokozódik a MMP9 génexpresszió (és az inváziós hajlam). Ezen kapcsolatot 37 petefészekrák esetében is megvizsgáltuk. Kimutattuk a fibronektin fokozott expresszióját agresszív tumorokban és a malignus daganatok MMP2/9 aktiválódását (de nem expresszióját, ami a benignus tumorokban is jelen van).

Kísérletes vizsgálataink az emberi daganatsejtek mozgásának, mint az áttétképzés kulcsfolyamatának új mechanikáját írta le. Chip-vizsgálataink a daganatmozgás jelátviteli pályájában részt vevő gének sorának fokozott expresszióját igazolta.

Érdaganatok esetében a WT1 gén diagnosztikus jelentőségét fedeztük fel, míg melanómában több un. valódi melanóma-specifikus gént azonosítottunk chip-technikával (Cyclin E, ryanodinR2, sorcin, p107/RB-like). A progressziós markerek terén melanóma esetében a VAP1 adhéziós molekula elvesztésének jelentőségét tártuk fel és igazoltuk, hogy a melanómát infiltráló T sejtek aktiváltsági állapotának van túlélést is jelentősen befolyásoló szerepe. Chip-vizsgálataink egyelőre arra utalnak, hogy a melanóma progressziója (kísérleti rendszerekben) meglehetősen individuális módon, (individuális génkészletekkel) valósul meg, amelyek között csak a  $\beta$ -endonexin és a glukokortikoid receptor- $\alpha$  szerepe tűnik univerzálisnak. Három szer esetében sikerült igazolni preklinikai modellekben specifikus anti-progressziós hatást: az alacsony molsúlyú heparin esetében, amely a daganat mozgását és az extravazációt gátolja, a májban termelődő ösztrogén-metabolit, a 2ME esetében apoptózis-indukáló hatást (mindkét esetben humán melanómában), valamint az erythropoetin- $\alpha$  esetében radio-sensitizer és vaszkuláris perfúziót fokozó hatást (laphámrákban).

Korábbi vizsgálataink a human melanómákban un. illegitim thrombocytá-integrin expressziót jeleztek. A gén szekvenciájának analízise az extracelluláris doménban mutációt jelzett, aminek következménye konstitutív aktiválódás lehet és hasonló hatással járt a human melanoma thrombocytá-integrin transzfekciója is. A fokozott integrin funkció következményeként a daganatsejtek un. Angiogén fenotípusa felerősödött amiért számos endotél-gén aktivizálódása volt felelőssé tehető. Ennek a sajátos jelátviteli pályának kulcseleme az un. B3 endonexin lehet. A melanoma angiogén fenotípusának változásával összefüggésben in vivo jobban nőtt a tumor és fokozódott a májártétképzés hatékonysága is. Korábbi genomikai vizsgálataink alapján sebészeti melanoma-mintákban sikerrel teszteltük három protein melanoma-specifikus expresszióját: CyclinE1, ryanodin receptor2 és cannaboid receptor1, melyek hasznosíthatók lennének a nevus/melanoma kérdések tisztázásakor.

Genomikai vizsgálataink során spontán metasztázis modelljeinkben többszáz human melanoma metasztázis-gént azonosítottunk, és ettől függetlenül sikerült azonosítani a megfelelő un. Metasztatikus stroma-ujjlenyomatot is. Glottikus rákok esetében is sikerült meghatározni egy metasztázisgén-ujjlenyomatot, aminek érdekessége az volt, hogy a különböző anatómai lokalizációkban eltérőnek bizonyult. Fontos megfigyelésünk, hogy a laryngeális tumorok ebből a szempontból sokoldalúbbak (17 gén) mint a hypopharyngeálisok (4 gén).

#### *Kísérleti terápiák*

Kísérleti eredményeink szerint az 5-FU citotoxikus hatását az EUdR-nal potenciózni lehet. A gyógyszerkombináció, a korábbiakban már megállapított TS és DPD expresszió gátlása mellett fokozta a daganatsejtek G2/M átmenetben való felhalmozódását, a timidin beépülését a DNS-be és az apoptózis kialakulását valamint a p53 expressziót.

A sejtszaporodást meghatározó onkogének és tumorszuppresszorgének kölcsönhatásait, a daganatgátlás kulcsfontosságú molekuláris célpontjait 41 ezer gént, illetve génterméket tartalmazó cDNS-array (Agilent) felhasználásával tanulmányoztuk daganatsejt-tenyészetekben. A sejteket antimetabolittal (Ribavirin) és természetes előfordulású daganatellenes szerrel (IP6) kezeltük. Több, a daganatképződés szempontjából meghatározó szignálút eltéréseit, és a daganatgátlás kulcsfontosságú molekuláris célpontjait azonosítottuk.

Preklinikai vizsgálatainkban több új megközelítést teszteltünk a progresszió megakadályozására. Az ektópiás thrombocytá integrin elleni antitest (PAC1) tirozin-

kaszkád-blokkon keresztül gátolja a melanoma proliferációt és az áttétképzést. Az emberi melanómákban talált Ca<sup>++</sup>-csatornák terápiás célpontként használhatók, mert mind a ryanodin receptor blokkolók, mind pedig a klasszikus Ca-csatorna blokkolók igen hatékonyak in vitro a sejtproliferáció-gátlás szempontjából. Fény derült arra is, hogy a human melanoma EGF receptora is szolgálhat targetként, mert több kinázgátló is képes proliferációt és migrációt blokkolni és apoptosist előidézni in vitro. Az ECM gélbe történő tumor migráció modellezésére bevezetett in vitro vizsgálati módszer a daganat elleni gyógyszerkutatók újabb lehetőségét tárta fel. Ezzel a módszerrel egyidőben állapítható meg a teszt-vegyületek sejtproliferációra és migrációra irányuló hatása. Megállapítottuk, hogy viszonylag szelektíven a tumorsejt migrációt gátló borrelidin az ECM irányította jelátvitelt és a fehérje szintézis szabályozó rendszerét módosítja. Az erythropoetin kemoterápia-potenciózó hatását human colorectalis carcinoma modellben is igazolni tudtuk.

#### *A Konzorcium közleményei 2001-2004 között*

1. Antoniou AC, P.D.P. Pharoah, S. Narod, H.A. Risch, J.E. Eyfjord, J.L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D.M. Eccles, N. Tang, E. Olah, et al.: Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies – J MED GENET, (közlés alatt)
2. Ádám Zs, Ádány R, Ladányi A, Tímár J, Balázs M. Liver metastatic ability of human melanoma cell lines is associated with losses of chromosome 4 and 9p and the extreme aggressive behaviour of human melanoma cell lines. Clin Exp Metast 18:295-302, 2001
3. Adleff V., Hitre E., Köves I., Orosz Zs., Kralovánszky J.: Heterozygote advantage for thymidylate synthase polymorphism in colorectal cancer: a Hungarian case-control study. Int. J. Cancer 108: 852-856, 2004
4. Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., et al. : Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history, a combined analysis of 22 studies. AM J HUM GENET 72: 1117-1130, 2003
5. Aszalos A, Ladányi A, Bocsi J, Szende B. Induction of apoptosis in MDR1 expressing cells by daunorubicin with combinations of suboptimal concentrations of P-glycoprotein modulators. Cancer Letters 167:157-162, 2001 IF
6. Bánfalvi T, Udvarhelyi N, Orosz Zs, Gergye M, Gilde K, Tímár J. Heterogenous S-100B protein expression patterns in malignant melanoma and association with serum protein levels. Oncology 64:374-379, 2003
7. Beczássy E., Ottó Sz., Vámosi Nagy I.: A tumormarkerek szerepe a vastag- és végbélrákos betegek követésében és ellenőrzésében. Magyar Onkológia 48, 57-62, 2004
8. Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó Á, Tímár J, Tóvári J. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. Clin Exp Metast 2005 (elfogadva)

9. Budai B., Hitre E., Adleff V., Czeglédi F., Gyergyay F., Láng I., Kralovánszky J.: A metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmus klinikai jelentősége a metasztatikus colorectalis daganatok 5-fluoropirimidin alapú kezelésében. *Magyar Onkológia* 48: 253-257, 2004
10. Csuka O., Olasz J., Juhász A., Hargitai Á., Remenár É., Kásler M.: Genetikai marker-vizsgálatok fej-nyaki daganatokban. *Magyar Onkológia* 45, 161-167, 2001
11. Demeter A. Szirmai Katalin, Oláh Julia, Papp Zoltán Jeney András A matrix metalloproteázok aktivált formáinak megjelenése és a fibronectin koncentrációjának emelkedése recidiváló petefészekrákban. *Orvosi Hetilap* 145 : 1617-1624. 2004.
12. Désaknai, Sz., Lumniczky, K., Esik, O., Hamada, H. and Sáfrány G. Local tumour irradiation enhances the anti-tumour effect of a double-suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med.* 5: 377-385, 2003
13. Désaknai, Sz., Lumniczky, K., Hidvégi, E.J., Hamada, H. and Sáfrány G. Brain tumor treatment with IL-2 and IL-12 producing autologous cancer cell vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495. 369-372, 2001
14. Dobos J, Tímár J, Bocsi J, Burian Zs, Nagy K, Barna G, Peták L, Ladányi A. In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. *Int J Cancer* 112:771-776, 2004
15. Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 197:355-362, 2002
16. Döme B, Rásó E, Dobos J, Mészáros L, Varga N, Puskás LG, Fehér LZ, Lőrincz T, Ladányi A, Trikha M, Honn KV, Tímár J. Parallel expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer* 2005 (elfogadva)
17. Döme B, Somlai B, Ladányi A, Fazekas K, Zöller M, Tímár J. Expression of CD44v3 splice variant is associated with the visceral metastatic phenotype of human melanoma. *Virchow Arch* 439:628-635, 2001
18. Döme B, Tímár J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropath Exp Neurol* 62:655-661, 2003
19. Dubez S Jr, Csuka O, Torok K, Vasas N, Peley G, Doleschal Z, Sulyok Z, Lang I, Koves I.: [Clinical significance of bone marrow micrometastases of breast tumors] [Article in Hungarian]. *Magy Seb* 56:108-12, 2003
20. E. Kámory, O. Kolacsek, Sz. Ottó and O. Csuka: hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res*, 9, 236-241, 2003
21. E.A. Rapley, S. Hockley, W. Warren, L. Johnson, R. Huddart, G. Crockford, D. Forman, M.G. Leahy, D.T. Oliver, K. Tucker, M. Friedlander Hogg, M.A.S. Jewett, R. Lohynska, G. Daugaard, S. Richard, A. Heidenreich, I. Geczi, I. Bodrogi, E. Olah, et al.: Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours – BR J CANC (90), 2397-2401, 2004
22. Fazekas K, Csuka O, Köves I, Rásó E, Tímár J. Experimental and clinicopathologic studies on the function of the HGF receptor in human colon cancer metastasis. *Clin Exp Metast* 18:639-649, 2001
23. Fazekas K, Janovics Á, Döme B, Koska P, Albini A, Tímár J. Effect of HGF-like basic hexapeptides on angiogenesis. *Microvasc Res* 62:440-444, 2001

24. Fazekas K, Rásó E, Zarándi M, Dudás J, Tímár J. Basic HGF-like peptides inhibit generation of liver metastases in murine and human tumor models. *Anticancer Res* 22:2575-2580, 2002
25. Forster-Horváth Cs, Bocsi J, Rásó E, Orbán TI, Olah E, Tímár J, Ladányi A. Constitutive intracellular expression and activation-induced cell surface up-regulation of CD44v3 in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 31:600-608, 2001
26. Forster-Horváth Cs, Döme b, Paku S, Ladányi A, Somlai B, Jalkanen S, Tímár J. Loss of vascular adhesion protein-1 expression in intratumoral microvessels of human skin melanoma. *Melanoma Res* 14:135-140, 2004
27. Forster-Horváth Cs, Mészáros L, Rásó E, Döme B, Ladányi A, Morini M, Albin A, Tímár J. Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvascular Res* 68:110-118, 2004
28. G.Székely, É.Remenár, M.Kásler, S.Gundy: Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis*, 18, 59-63, 2003
29. J. Tuimala, G. Székely, H. Wikman, H. Jarventaus, A. Hirvonen, S. Gundy, H. Norppa: Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations: *Mutation Res*, 554, 319-333, 2004
30. J. Tuimala, G. Székely, S. Gundy, A. Hirvonen, H. Norppa: Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic metabolizing enzymes: Role in mutagen sensitivity, *Carcinogenesis* 23 1003-1008,2002
31. Katona Cs.,Tímár F.,Oláh J.,Bocsi J.,Budai B.,Ötvös L.,Kralovánszky J.: Az 5-fluorouracil (5-FU) hatékonyságának fokozása. Az 5-FU és 5-etil-2'-dezoxiuridin kombináció hatásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok. *Magyar Onkológia* 48:243-251,2004
32. Kelecsényi Zs., Székely G., Gundy S.:A sporadikus kromoszómaaberrációk háromszoros emelkedése 1986-2001 között vizsgált egészséges személyekben. *Magyar Onkológia*, 47, 169-176, 2003
33. Korszerű daganatpatológiai diagnosztika. *Háziorv. Továbbképző Szle.*, 9:E15-24, 2004.
34. Kralovánszky J., Köves I.,Orosz Zs., Katona Cs.,Tóth K.,Rahóty P., Czeglédi F.,Kovács T.Budai B.,Hullán L.,Jeney A.: Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 62: 167-174,2002
35. Kralovánszky J.: A kolorektális rákok gyógyszeres terápiájának hatékonyságát meghatározó tényezők. *MOTESZ magazin* 2. 15-23,2004
36. Ladányi A, Gallai M, Paku S, O Nagy J, Dudás J, Tímár J, Kovalszky I. Expression of a decorin-like molecule in human melanoma. *Path Oncol Res* 7:260-266, 2001
37. Ladányi A, Somlai B, Gilde K, Fejős Zs, Gaudi I, Tímár J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 10:521-530, 2004
38. Lapis K, Tímár J. Role of elastin-matrix interactions in tumor progression. *Semin Cancer Biol* 12:209-217, 2002
39. Looijenga LHJ, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp R, Stoop H, Gillis AJ, de Gouveia de Brazoa CA, Weber RFA, van Dijk T, von Lindren M, Geczi L, Oláh E., Nesland JM, Fossa SD, Oostehuis JW: Stem cell factor receptor (c-KIT)

- codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ cell tumors. *CANCER RES* 63: 7674-7678, 2003.
40. Lőrincz T, Tímár J, Szendrői M. Alterations of microvascular density in bone metastases of adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res* 10:149-153, 2004
  41. Lőrincz T, Tóth J, Szendrői M, Tímár J. Her2/neu status in bone metastases of breast cancers. 2<sup>nd</sup> Congress of the World Society for Breast Health, Monduzzi Editore Bologna, 2004, pp. 35-38
  42. Lövey J, Fazekas K, Ladányi A, Németh Gy, Tímár J. Low-dose irradiation and short-exposure suboptimal dose of Paclitaxel adversely modulate metastatic potential of squamous cell carcinoma cells. *Strahlentherapie und Onkologie*, 179:812-818, 2003
  43. Lukits J, Tímár J, Juhász A, Döme B, Paku S, Répássy G. Progression difference between cancers of the larynx and hypopharynx is not due to tumor size and vascularization. *Laryngol Head Neck Surg* 125:18-22, 2001
  44. Lumniczky, K., Désaknai, Sz., Mangel, L., Szende, B., Hamada, H., Hídvégi, E.J., and Sáfrány G. Local tumor irradiation augments the anti-tumor effect of cytokine producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 9. 44-53, 2002
  45. Magyarosy E, Sebestyén A, Tímár J. Expression of metastasis associated proteins CD44v3 and NM23-H1 in pediatric acute lymphoid leukemia. *Anticancer Res* 21:819-824, 2001
  46. Magyarosy E, Varga N, Tímár J, Rásó E. Follow-up of minimal residual disease in acute childhood lymphoblastic leukemia by WT1 gene expression in the peripheral blood: The Hungarian experience. *Pediatric Haematol Oncol* 20:65-74, 2003
  47. Melegh Zs, Bálint I, Nagy K, Tóth E, Csernák E and Szentirmay Z: Detection of N-myc gene amplification in neuroblastoma by comparative, in situ and real-time polymerase chain reaction. *Pediatric Pathol. Molec. Med.*, 22:1-10, 2003
  48. Melegh Zs, Bálint I, Nagy K, Magyarosi E, Galántai I. és Szentirmay Z.: N-myc amplifikáció vizsgálata neuroblastomában PCR alapú módszerekkel. (Analysis of N-myc amplification by PCR-based methods in neuroblastoma) *Magyar. Onkol.*, 46:43-48, 2002
  49. Melegh Zs, Csernák E, Tóth E, Nagy K and Szentirmay Z: DNA content heterogeneity by image cytometry in neuroblastoma and its potential significance. *Virchows Arch. Közlésre elfogadva.*
  50. Orbán T. I., Oláh E.: Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *J CLIN PATHOL: MOL PATHOL – Review* 56: 191-197, 2003.
  51. Orbán, T.I., Oláh, E.: Purifying selection on silent sites – a constraint from splicing regulation? *TRENDS GENET* 17: 252-253, 2001
  52. Ottó Sz: A vastag- és végbéldaganatok szűrésének epidemiológiai háttere. In: *A vastagbélrák megelőzése és kezelése* (szerk: Tulassay Zsolt), 21-30, 2004.
  53. Ötvös L., Jeney A., Kralovánszky J., Veres Zs.: Drug development based on pharmacokinetic investigation of pyrimidine nucleosides. In: *Monoamine Oxidase inhibitors and their role in neurotransmission ( drug development)* Eds: Török TL and Klebovich I. pp 231-250 *Medicina*, 2004
  54. P. Rozen, M. Pignone, M. Crespi, D. Criblez, S.A. El-Badawy, R. Leicester, Sz. Otto, C. Pox, M. Richards, D. Smith, S. Spann, G. P. Young and R. Smith: Workgroup V: Professional education and advocacy. *Ann Oncol* 16: 42-45, 2005

55. Paku S, Döme B, Tóth R, Tímár J. Organ-specificity of the extravasation process: An ultrastructural study. *Clin Exp Met* 18:481-492, 2001
56. Paku S, Tóvári J, Lőrincz Zs, Timár F, Döme B, Kopper L, Raz A, Tímár J. Adhesion dynamics and cytoskeletal structure of gliding human fibrosarcoma cells: a hypothetical model of cell migration. *Exp Cell Res* 290:246-253, 2003
57. Peley G, Toth J, Csuka, Sinkovics I, Farkas E, Koves I.: Immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction on sentinel lymph nodes can improve the accuracy of nodal staging in breast cancer patients. *Int J Biol Markers* 16:227-3,2001
58. Pogány G., Timár F., Oláh J., Harisi R., Polony G., Paku S., Bocsi J., Jeney A., Laurie G.W. Role of basement membrane in tumor cell dormancy and cytotoxic resistance. *Oncology* 60, 274-281,2001
59. Rásó E, Döme B, Somlai B, Zacharek A, Hagmann W, Honn KV, Tímár J. Molecular identification, localization and function of platelet-type 12-lipoxygenase in human melanoma progression, under experimental and clinical conditions. *Melanoma Res* 14:245-250, 2004
60. Rásó E, Mészáros L, Albini A, Tímár J. A WT1 expressing metastatic human Kaposi sarcoma xenografts model. *Pathol Oncol Res* 10:22-25, 2004
61. Rásó E, Paku S, Kopper L, Tímár J. Trace elements improve survival of DTIC-treated mice with overt liver metastases of lewis lung carcinoma. *Pathol Oncol Res* 9:96-99, 2003
62. Rásó E, Tóvári J, Tóth K, Paku S, Trikha M, Honn KV, Tímár J. Ectopic  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin signaling involves 12-lipoxygenase- and PKC-mediated serine phosphorylation events in melanoma cells. *Thrombosis Haemostasis* 85:1037-42, 200
63. Schneider T, Molnár Zs., Deák B, Eid H, Várady E, Tóth E, Matolcsy A, Schneider K és Rosta A: Relabált folliculáris lymphomás betegek Rituximab-kezelése. *Magy. Belorv. Arch.*, 56:121-126, 2003
64. Schneider T, Tóth E, Molnár Zs, Várady E, Deák B, Horváth A, Horváth Gaudi I, Eid H, Schneider K, Lóvey Js és Rosta A: Primer mediasztinális nagy B-sejtes lymphomák kezelése *Orv. Hetil.*, 145:2531-2537, 2004
65. Sz. Németh M., Ottó Sz.: Két antigént felismerő immunszérum előállítása és vizsgálata a rejtett bélvérzés immunkémiai kimutatásához. *Magyar Onkológia* 48, 45-48, 2004
66. Sz. Ottó and L. Döbrössy: Screening for colorectal cancer with immunological FOBT. *Br J Cancer* 90, 1871-1872, 2004
67. Szántó I, Szentirmay Z, Banai J, Nagy P, Gonda G Vörös A, Kiss J és Bajtai A.: A nyelöcső laphámsejtes papillómája. Klinikai és patológiai tapasztalataink 155 beteg 172 papillómája kapcsán. *Orv. Hetil., Közlésre elfogadva.*
68. Székely G, Remenár É, Kásler M, Bodrog A. Gundy S.: A kromoszómaanalízis és a bleomycin-teszt hazai alkalmazhatóságának vizsgálata a fej-nyaki laphámrák prevenciójában. *Orvosi Hetilap* 142: 611-616, 2001
69. Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Expozíció vagy rákhajlam? Fej-nyaki laphámrákos betegek citogenetikai szűrése. *Magyar Onkológia* 45, 152-157, 2001

70. Szentirmay Z és Csuka O: A vastagbélrák molekuláris patológiája. In: A vastagbélrák megelőzése és szűrése. Ed.: Tulassay T. Springer Hungária. pp 19-54, 2004.
71. Szentirmay Z, Pólus K, Tamás L, Szentkúti G, Kurcsics J, Csernák E, Tóth E, and Kásler M: Human papillomavirus in head and neck cancer: clinicopathological correlates. *Cancer Metast Rev.* 24:17-32, 2005
72. Szentirmay Z, Szántó I, Bálint Ildikó, Pólus K, Remenár É, Tamás L, Szentkúti, Melegh Zs, Nagy P és Kásler M: Oki összefüggés a humán papillomavirus fertőzés és a fej-nyak régió valamint a nyelvcső laphámrákok egyes típusai között. (Causal association between human papillomavirus infection and head and neck and esophageal squamous cell carcinoma) *Magyar. Onkol.*, 46:35-41, 2002
73. Szentirmay Z. Csuka O: A vastagbélrák molekuláris patológiája. In: A vastagbélrák megelőzése és kezelése (szerk: Tulassay Zsolt), 31-62, 2004.
74. Szentirmay Z., Ottó Sz és Kásler M.: A Humán papillomavírus (HPV) molekuláris biológiai meghatározásának indikációi. (Indication of the molecular biological determination of human papillomavirus) *Magyar Onkol*, 46:235-237, 2002
75. Szentirmay Z: A humán genom megismerésének hatása a patológia fejlődésére. *Orv. Hetil.*, 144:3-12, 2003 (az Orvosi Hetilap Markusovszky Lajos Díjával kitüntetett közlemény).
76. Tevyashova, Anna, Sztaricskay F., Batta, Gy., Herczegh P., Jeney, A., Formation of aquaric acid amides of anthracycline antibiotics. Synthesis and cytotoxic properties. *Bioorganic and Med Chem Let* 14 : 4783-4789 2004.
77. Thompson D., Easton D. F., The Breast Cancer Linkage Consortium (McGuffog, L.M., Weber, B, Gad, S., Stoppa-Lyonnet, D., Korn, V., Kroiss, R., Langbauer, G., Muhr, D., Wagner, T, Goldgar, D., Lenoir, G., Lynch, H.T., Narod, S., Sinilnikova, O., Gayther, S., Ponder, B., Taylor, A., Klijn, J.G.M., Meijers-Heijhoher, H., Olah E., et al.: Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J NATL CANCER INST* 94: 1358-1365
78. Thompson, D., Szabo, C.I., Mangion, J., Oldenburg, R.A., Odefrey, F., Seal, S., Barfoot, R., Kroeze-Jansema, K., Teare, D., Rahman, N., Renard, H., KconFab Consortium, Mann, G., Hopper, J.L., Buys, S., Andrulis, I.A., Senie, R., Daly, M.B., West, D., Ostrander, E.A., Offit, K., Peretz, T., Osorio, A., Benitez, J., Nathanson, K.L., Sinilnikova, O.M., Oláh, E., et al.: Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *P NATL ACAD SCI USA.* 99: 827-831, 2001
79. Tímár J, Csuka O, Orosz Zs, Jeney A, Kopper L. Molecular pathology of tumor metastasis. I. predictive pathology. *Pathol Oncol Res* 7:217-230, 2001
80. Tímár J, Csuka O, Orosz Zs, Jeney A, Kopper L. Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular Staging and differential diagnosis. *Pathol Oncol Res* 8:204-219, 2002
81. Tímár J, Csuka O, Remenár É, Répássy G, Kásler M. Progression of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Metast Rev* 24:105-125, 2005
82. Tímár J, Döme B, Fazekas K, Janovics Á, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 7:85-95, 2001
83. Tímár J, Forster-Horváth Cs, Lukits J, Döme B, Ladányi A, Remenár É, Kásler M, Bencsik M, Répássy G, Szabó G, Velich N, Suba Zs, Élő J, Balatoni Z, Bajtai A, Chretien P, Taylor E. The effects of leukocyte

- interleukin injection treatment on the peritumoral and intratumoral subpopulation of mononuclear cells and tumor epithelia. *Laryngoscope* 113:2206-2217, 2003
84. Tímár J, Ladányi A, Forster-Horváth Cs, Lukits J, Döme B, Remenár É, Gódeny M, Kásler M, Bencsik B, Répássy G, Szabó Gy, Velich N, Suba Zs, Élő J, Balatoni Zs, Pócza K, Zemplén B, Chretien P, Talor E. Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral CD4+/CD8+ ratio and tumor microenvironment. A multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol* 2005 (elfogadva)
  85. Tímár J, Ladányi A, Peták I, Jeney A, Kopper L. Molecular pathology of tumor metastasis III. Target array and combinatorial therapies. *Pathol Oncol Res* 9:49-72, 2003
  86. Tímár J, Lapis K, Dudás J, Sebestyén A, Kopper L, Kovalszky I. Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer Biol* 12:173-186, 2002
  87. Tímár J, Mészáros L, Orosz Zs, Albini A, Rásó E. WT1 expression in angiogenic tumors of the skin. *Histopathology* 2005 (elfogadva)
  88. Tímár J, Rásó E, Döme B, Ladányi A, Bánfalvi T, Gilde K, Raz A. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems. *Clin Exp Metastasis* 19:225-232, 2002
  89. Tímár J, Tóvári J, Rásó E, Mészáros L, Bereczky B, Lapis K. Thrombocyte-mimicry of cancer cells: rationale for the prevention and treatment of hematogenous dissemination. *Oncology* 2005 (elfogadva)
  90. Tímár J, Udevarhelyi N, Bánfalvi T, Gilde K, Orosz Zs. Accuracy of the determination of S100B protein expression in malignant melanoma using polyclonal or monoclonal antibodies. *Histopathology* 44:180-184, 2004
  91. Tóvári J, Gilly R, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó Á, Tímár J. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels improving chemotherapy in human xenografts models. *Cancer Res* 2005 (elfogadva)
  92. Trikha M, Tímár J, Zacharek A, Nemeth JA, Cai Y, Döme B, Somlai B, Rásó E, Ladányi A, Honn KV. Role for  $\beta 3$  integrins in human melanoma growth and survival. *Int J Cancer* 101:156-167, 2002
  93. Trikha M, Zhou Z, Tímár J, Rásó E, Kennel M, Emmell E, Nakada MT. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and  $\alpha v\beta 3$  integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res* 62:2824-2833, 2002
  94. Weber G., Shen F., Orban T. I., Kökény Sz., Oláh E.: Targeting signal transduction. *ADV ENZYME REGULAT* 43: 47-56, 2003.