

1/48/2001

3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.

**RP2. Nem-invazív szűrési és prognosztikai modellek
kifejlesztése és gyakorlati alkalmazása a vastag- és
végbélrák halálozási gyakoriságának
csökkentésére**

Dr. Ottó Szabolcs
Országos Onkológiai Intézet

RP2. Nem-invazív szűrési és prognosztikai modellek kifejlesztése és gyakorlati alkalmazása a vastag- és végbélrákok halálozási gyakoriságának csökkentésére

Témavezető: dr. Ottó Szabolcs, Országos Onkológiai intézet

- 1. Anti-lactoferrin, anti-casein alkalmazása vastagbél tumorok szűrésére**
- 2. Vastagbél tumorok szűrése tejfehérjék alkalmazásával**
- 3. Exfoliált sejtek genetikai azonosítása**
- 4. Vastagbél daganatos genetikai szűrés**
- 5. Keringő daganatsejtek azonosítása és jellemzése.**
- 6. Vastagbél prognosztikai markerek vizsgálata és értékelése.**

1. Új immunkémiai eljárások alkalmazása vastagbél daganatok szűrésére

Bevezetés, célkitűzés

Az „Egészség Évtizedének Nemzeti Programja” egyik célkitűzése, hogy a 45-65 éves férfiak és nők között a vastag- és végbélrák halálozási gyakoriságát a rejtett bélvérzés szűrésének segítségével kb. 20%-al csökkentse.

Ennek érdekében született országgyűlési határozat és miniszteri rendelet foglalja keretbe a szűrés végrehajtásának a módját, amely az idevágó európai uniós elvárásoknak is megfelel. A program 2004. július 15-vel indult és az eső „modellértékű” szakasz (Ajka, Budapest IX., XIV. kerület) 2005. év végén zárul (**1., 2. táblázat**).

| MODELL ÉRTÉKŰ VASTAGBÉL SZŪRÉSEK ÖSSZESÍTETT EREDMÉNYEI | | | | | | |
|---|---------------------------------|----|------------------------------|----|-------------|------|
| A szűrésben részt vett személyek száma | Világbanki csoport 1997-1998 | | Ajka-Lovászpata 2003-2004 | | Összesített | |
| | 6805 | % | 3996 | % | 10801 | % |
| Részvételi arány | 31% | | 46% | | 35,3% | |
| Férfi | 2858 | 42 | 1638 | 41 | 4496 | 41,6 |
| Nő | 3947 | 58 | 2358 | 59 | 6305 | 58,4 |
| Átlagéletkor | 64 év | | 58,6 év | | 62,4 év | |
| Fecatest színreakció pozitív | 1892 | 28 | 1123 | 28 | 3015 | 28 |
| Immunkémiai pozitív | 377 | 6 | 321 | 8 | 698 | 6,5 |
| Immunkém. poz. közül színreakció neg. | 128 | 40 | 178 | 55 | 306 | 43,8 |
| Haemoglobin és albumin együtt poz. | 224 | 59 | 167 | 52 | 391 | 56,1 |
| Csak albumin pozitív | 146 | 39 | 135 | 42 | 281 | 40,2 |
| Csak haemoglobin pozitív | 7 | 2 | 19 | 6 | 26 | 3,7 |

1. táblázat

MODELL ÉRTÉKŰ VASTAGBÉL SZŰRÉSEK ÖSSZESÍTETT EREDMÉNYEI

| | Világbanki csoport 1997-1998 | | Ajka-Lovászpataona 2003-2004 | | Összesített | |
|---------------------------------------|---|-----|---|-----|--|-------|
| | ENDOSCOPOS VIZSGÁLATOT VÁLLALÓK | 243 | 65% | 298 | 93% | 541 |
| ENDOSCOPOS VIZSGÁLATOT VISSZAUTASÍTÓK | 134** | 35% | 23 | 7% | 157 | 22,5% |
| RÁK | 12 | | 13 | | 25 | |
| POLYP | 59* | | 67* | | 126* | |
| NODUS | 82 | | 39 | | 121 | |
| DIVERTICULOSIS | 32 | | 36 | | 68 | |
| DIVERTICULOSIS + NODUS | 11 | | 3 | | 14 | |
| GYULLADÁS | 10 (colitis ulcerosa:6) | | 40 (colitis ulcerosa:4) | | 50 (colitis ulcerosa:10) | |
| EGYÉB | 2 | | 10 | | 12 | |
| NEGATÍV | 35 | | 90 | | 125 | |
| | * számos betegnél egynél több polyp került felfedezésre | | | | | |
| rákok | 9 sigma, 2 coli trans., 1 nincs adat | | 10 sigma, 3 rectum | | 19 sigma, 3 rectum, 2 coli trans., 1 nincs adat | |
| stádium | in situ:1, Dukes A:5, Dukes C:6 | | in situ:4, Dukes A:5, Dukes B:2, Dukes C:2 | | in situ:5, Dukes A:10, Dukes B:2, Dukes C:8 | |

**Az endoscopos vizsgálatot visszautasítók körében 2 éven belül megjelenő rákok száma: 7

2. táblázat

Az értékelésben felhasználjuk az 1997-1998 során nyert tapasztalatokat is, amelyek a Világbank által támogatott „felzárkózási program” (Budapest, XI. kerület) befejezése után kerültek napvilágra (**3., 4. táblázat**).

**VILÁGBANK ÁLTAL TÁMOGATOTT KÍSÉRLETI VASTAGBÉLSZŰRÉS
(1997-1998.) ÉS AJKA-LOVÁSZPATONA
VASTAGBÉLSZŰRÉS (2003-2004.) ÖSSZESÍTETT EREDMÉNYEI**

POLYP / KORAI RÁK / ÖSSZES RÁK

| Daganatok | Összesített | | Fecatest színreakció + | | Fecatest színreakció - | |
|-------------------|--------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | <i>Polyp</i> | 126 | <i>Polyp</i> | 67 | <i>Polyp</i> | 59 |
| | <i>Korai rák</i> | 17 | <i>Korai rák</i> | 10 | <i>Korai rák</i> | 7 |
| | <i>Összes rák</i> | 25 | <i>Összes rák</i> | 16 | <i>Összes rák</i> | 9 |
| | Haemoglobin + - | Albumin + - | Haemoglobin + - | Albumin + - | Haemoglobin + - | Albumin + - |
| Polyp | 72 54 | 122 4 | 37 30 | 66 1 | 35 24 | 56 3 |
| Korai rák | 5 12 | 17 0 | 5 5 | 10 0 | 0 7 | 7 0 |
| Összes rák | 9 16 | 25 0 | 8 8 | 16 0 | 1 8 | 9 0 |

3. táblázat

VILÁGBANK ÁLTAL TÁMOGATOTT KÍSÉRLETI VASTAGBÉLSZŰRÉS
(1997-1998.) ÉS AJKA-LOVÁSZPATONA
VASTAGBÉLSZŰRÉS (2003-2004.) ÖSSZESÍTETT EREDMÉNYEI

VÁRHATÓ VESZTESÉGEK A MODELLTŐL ELTÉRŐ SZŰRÉSI ELVEK ESETÉN

| Daganatok | Fecatest színreakció pozitívítás esetén elvégezve az imm. kém. vizsg.ot | | Mindenkinél elvégezve az imm.kém.vizsgálatot | |
|-------------------|--|--|---|------------|
| | Polyp | 47% | | |
| | Korai rák | 41% | | |
| | Összes rák | 36% | | |
| | csak haemoglobinnal végezve a vizsgálatot | csak albuminnal végezve a vizsgálatot | haemoglobinnal | albuminnal |
| Polyp | 45% | 1,5% | 43% | 3,2% |
| Korai rák | 50% | 0% | 71% | 0% |
| Összes rák | 50% | 0% | 64% | 0% |

4. táblázat

Mivel a rejtett bélvérzés kimutatási módszer (Fecatest; kétfázisú, hagyományos színreakción és kettős ellenanyaggal – anti- haemoglobin és albumin – dolgozó immunkémiai reakció) és a követő totál colonosopia azonos elvek alapján történt, az előzetes felmérésnél a két csoportot külön külön (mint két önálló közigazgatási egységet) és együttesen is értékeltük.

Egyértelművé vált, hogy a kettős immunkémiai fehérje kimutatást a színreakció eredményétől függetlenül el kell végezni, s a haemoglobin mellett az albumin párhuzamos vizsgálata sem nélkülözhető, ellenkező esetben a daganatok kb. felét elveszítenénk.

Mivel a szűrési programban feltűnően nagy a polypok és a korai rákok (köztük az in situ) aránya, a szűrés országos méretű kiterjesztése esetén a két modell-csoport szűrési stratégiája a mérvadó. Fentieket alátámasztja az a sajnálatos tény is, hogy a világbanki csoportból – a 134 vérzésre pozitív, de utánvizsgálatot (colonosopia) visszautasító egyén közül - a szűrés lezárását követő 1-2 éven belül 7 vastag- és végbélrákot találtak, míg a negatívak közül ilyen jelzés nem érkezett.

Amíg tehát az automatizált, egyszerűbb és olcsóbb genetikai módszer nem áll rendelkezésre a tömegszűrésben, addig a korszerűbb vérzés-kimutató (egyéb markereket is felmutató) módszerek a szűrésben nélkülözhetetlenek.

2. Vastagbél daganatok genetikai szűrése

Örökletes, nonpolyposis vastagbél daganatos betegek genetikai vizsgálata:

24, a Bethesda kritériumok szerint HNPCC típusú vastagbél daganatos beteget vizsgáltunk. A genomiális DNS-t alvadásgátolt vérből izoláltuk (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega A1120).

A hMLH1 és hMSH2 összes exonját (35) lefedő primer párokkal végzett PCR reakció termékeit először SSCP, illetve heteroduplex analízissel vizsgáltuk (BioRad vertikális gélapparátus, MDE gél CAMBEX 506209) majd a normáltól eltérő mintázatot adó termékeket sense és antisense irányban szekvenáltuk (PE Applied Biosystems: BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v.3.1; ABI-PRISM 310 Genetic Analyser).

A PCR reakciókhoz az irodalomban korábban leírt primereket használtunk.

(N. E. Beck, I. P. M. Tomlinson, Tessa Homfray, *et al.*: [Use of SSCP analysis to identify germline mutations in HNPCC families fulfilling the Amsterdam criteria](#), Hum Genet 1997(99) 219-224.

Yuka Yanagisawa, Yoshimitsu Akiyama, Satoru Iida, Emi Ito, Tadashi Nomizu, Kenichi Sugihara, Yasuhito Yuasa, Kazuo Maruyama: Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability, Int J Cancer 2000 (85) 50-53)

A mutációk azonosításához a következő internetes adatbázisokat használtuk:

ICG-HNPCC Database (<http://www.nfdht.nl/database.htm>), The Human Gene Mutation Database, Cardiff (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>), InSiGHT Database (<http://www.insight-group.org>)

Jelentős eredménynek számít, hogy 2 HNPCC-s betegen dupla mutációt találtunk:

A hMSH2 3-as exonban: cd127 Asn→Ser és a hMSH2 7-es exonban: cd422 Glu→STOP az egyik beteg esetén (7.), valamint a hMLH1 19-es exonban: cd716 Val→Met és a hMSH2 13-as exon-intron határon: 2210+1G→C a másik beteg (25.) esetén. Ez utóbbi beteg két különálló vastagbél daganattal rendelkezett. A két beteg hozzátartozóinak bevonásával családfa vizsgálatot végeztünk a mutációk patogenetikai szerepének meghatározásához.

1 esetben találtunk mutációt a hMLH1 2-es exonban: cd48 Gln→Pro (6.). Ezt a mutációt elsőként azonosítottuk

9 esetben találtunk polimorfizmust a hMSH2 1-es intronban: 211+9: C→G, 2 esetben polimorfizmust a hMSH2 6-os exonban: cd 322 Gly→Asp, 1 esetben polimorfizmust a hMSH2 9-es intronban: 65092 A→T, valamint 1 esetben hMLH1 polimorfizmust a hMLH1 14-es intronban: 50677 A→G

A kapott eredményeket az 5. táblázatban foglaltuk össze.

| Esetek | jelölés | Genetikai elváltozás |
|---------------|----------------|---|
| 1. | 2 | Nem azonosítható |
| 2. | 3 | Nem azonosítható |
| 3. | 4 | Nem azonosítható |
| 4. | 5 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 5. | 6 | HMLH1: ex 2, cod 48: CAA > CCA (Gln > Pro) (nem ism) |
| 6. | 7 | HMSH2: ex 3, cod 127: AAT > AGT (Asn > Ser) (ism) HMSH2: ex 7, cod 422: GAA > TAA (Glu > STOP) (nem ism) |
| 7. | 10 | Nem azonosítható |
| 8. | 11 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G |
| 9. | 19 | Nem azonosítható |
| 10. | 21 | Nem azonosítható |
| 11. | 22 | Nem azonosítható |
| 12. | 23 | Nem azonosítható |
| 13. | 24 | Nem azonosítható |
| 14. | 25 | HMLH1 ex 19, cod 716: GTG > ATG (Val > Met) (ism) HMSH2 ex 13, cod. 737: AGG > AGC (Arg > Ser) (nem ism) |
| 15. | 26 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 16. | 27 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 17. | 28 | Nem azonosítható |

| | | |
|-----|----|--|
| 18. | 29 | Nem azonosítható |
| 19. | 30 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 20. | 31 | HMSH2 polimorfizmus: ex.6, cod. 322: GGC>GAC (Gly>Asp) (ism) HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 21. | 32 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 22. | 33 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) HMSH2 polimorfizmus: ex.6, cod. 322: GGC>GAC (Gly>Asp) (ism) |
| 23. | 34 | HMSH2 polimorfizmus: int 1, +9 of 3' ex.1 (211+9): C > G (ism) |
| 24. | 35 | HMLH1 polimorfizmus: int 14, -19 of 5' ex 15 (50677): A>G (ism) HMSH2 polimorfizmus: int. 9; -9 of 5' ex 10 (65092): A >T (nem ism) |

5. táblázat: 24 HNPCC-s betegben azonosított genetikai elváltozások

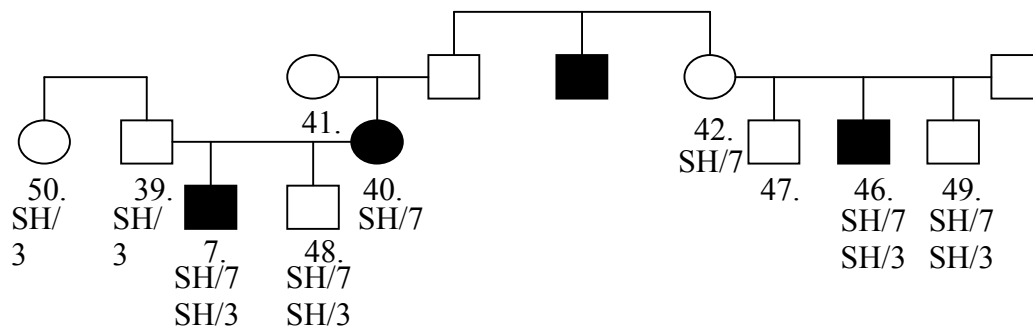
Családvizsgálat:

A 7. és 25. beteg családtagjait célzottan vizsgáltuk a bennük előforduló mutációkra. Az eredményeket a **6-7. táblázatban** foglaltuk össze.

Az 1. családban a hMSH2 127-es kodon missense mutációja konzervatív aminosavcsere (Asn→Ser) eredményez, melyet korábban már leírtak, és önmagában nem patogén polimorfizmusként valószínűsítettek (Samowitz et al, Gastroenterology 121:830- (2001). Önmagában ezt az elváltozást hordozó családtagok nem betegek. A 422-es kodon nonsense mutációját elsőként azonosítottuk. A beteg családtagok mind hordozzák ezt a mutációt. Ez a tény a korai lánctermináció miatti funkciókiesést, illetve a mutáció patogén szerepét igazolja.

6. táblázat:

| 1. család | Életkor a diagnóziskor / vizsgálatkor | Egészségi állapot | MSH2,ex.7: 422.kodon: nonsense gaa→taa: GLU→STOP | MSH2,ex.3: 127.kodon: aat→agt: Asn→Ser |
|-------------------------------------|---|----------------------|--|---|
| 7. H. A. | 31 | beteg | + | + |
| 39. H. L. (apa) | | egészséges | - | + |
| 40. H. Lné (anya) | 43 | beteg | + | - |
| 41. Sz. Mné (nagyamama) | | egészséges | - | - |
| 42. Sz. Lné (nagyapapa testvére) | | egészséges | + | - |
| 46. Sz. T. (másodunokatestvér) | 36 | beteg | + | + |
| 47. Sz. L. (másodunokatestvér) | 42 | egészséges | - | - |
| 48. H. N. (testvér) | 28 | egészséges | + | + |
| 49. Sz. M. (másodunokatestvér) | 31 | egészséges | + | + |
| 50. H. E. (nagynéni) | | egészséges | - | + |



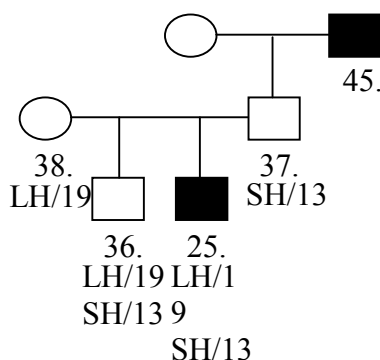
1. ábra: az 1. család családfája

SH/3: mutáció a hMSH2, 3. exonban

SH/7: mutáció a hMSH2, 7. exonban

A 2. családban előforduló genetikai elváltozások közül a a hMLH1 716-os kodonjának missense mutációjának szerepe eddig nem tisztázott (P.Hutter et al, Int J Cancer 78:680-4(1998). A hMSH2 13-as exon-intron határán lévő nukleotidcsere alternatív splice site-ot eredményez, amely out of frame delécióhoz vezethet (Kurzawski et al. J Med Genet 39: e65 (2002). Minthogy az egyik, illetve másik mutációt önmagában hordozó családtagok egészségesek, feltételezzük, hogy a kettős mutáció együttes jelenléte vezet patogén elváltozáshoz. Az idős nagyszülő betegsége feltehetően ezen örökletes elváltozásoktól független. **7. táblázat**

| 2. család | Életkor a diagnóziskor / vizsgálatkor | Egészségi állapot | MLH1,ex.19: 716.kodon: gtg→atg: Val→Met | MSH2,ex.13: 2210+1g→c |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------|---|-----------------------|
| 25. Cs. T. | 25 | beteg | + | + |
| 36. Cs. Z. (testvér) | 28 | | + | + |
| 37. Cs. Z. I. (apa) | 51 | egészséges | - | + |
| 38. Cs. Zné (anya) | | egészséges | + | - |
| | | | (homo/hemizigóta) | |
| 45. Cs. K. (nagypapa) | 84 | beteg | - | - |



2. ábra: 2. család családfája

LH/19: mutáció a hMLH1 19-es exonjában

SH/13: mutáció a hMSH2 13-as exonjában