

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az alkohol dehidrogenáz gén polimorfizmusainak
hatása az alkoholfogyasztásra és a krónikus májbetegségek
kialakulására Magyarországon**

Tóth Réka

Témavezető: Ádány Róza, MD, Ph.D., D.Sc.



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

A doktori értekezés betétlapja

Az alkohol dehidrogenáz gén polimorfizmusainak hatása az alkoholfogyasztásra és a krónikus májbetegségek kialakulására Magyarországon

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az „Egészségtudományok” tudományágban

Írta: **Tóth Réka** okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori Iskolája
(Megelőző orvostan és népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, kandidátus

Dr. Kakuk Péter, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. 10. 10. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Endreffy Emőke, kandidátus

Dr. Seres Ildikó, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

tagok: Dr. Endreffy Emőke, kandidátus

Dr. Seres Ildikó, Ph.D.

Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, kandidátus

Dr. Kakuk Péter, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. 10. 10. 13 óra

Bevezetés

A májbetegségek epidemiológiája

Bár a standardizált halálozási arány az elmúlt években csökkenést mutatott, a krónikus májbetegségek és a cirrózis okozta korai halálozás még mindig jelentősen magasabb a közép-kelet-európai országokban -köztük Magyarországon-, mint a nyugat-európai szomszédjaiknál. A krónikus májbetegség és cirrózis okozta halálozás különösen magas a magyar férfiak körében. A legmagasabb értéket 1994-ben figyelték meg, amikor a halálozási arány több, mint ötször magasabb volt, mint a nyugat-európai országok esetében.

A nyugati világban a májcirrózis leggyakoribb oka az alkoholfogyasztás. A European Detailed Mortality Database adatai szerint a magyar férfiak körében a májbetegségek okozta halálozás több, mint 80%-ának az alkoholos májbetegség állt a háttérben. A nagyivók mintegy 80%-ában zsírmáj, 10-35%-ukban alkoholos hepatitisz, míg 10%-ukban cirrózis alakul ki az alkoholfogyasztás következtében.

Annak ellenére, hogy a magyar férfiak 87,2%-a fogyaszt alkoholt és több, mint 20%-uknak vannak rohamszerű ivási periódusai, a krónikus májbetegségek magas halálozási aránya mégsem magyarázható egyszerűen az elfogyasztott alkohol mennyiségével, mivel a férfiak körében az egy főre jutó alkoholfogyasztás nem jelentősen magasabb, mint a nyugat-európai országokban. Ezen adatok miatt már régóta gyanítják, hogy az alkoholfogyasztás mellett más tényezők is szerepet játszhatnak Magyarországon illetve más közép-kelet-európai országok magas krónikus májbetegség okozta halálozásában. Bizonyos kutatások azt mutatták, hogy a helyben gyártott és széles körben fogyasztott alkoholos termékekben magas a hepatotoxikus alifás alkoholok koncentrációja. Idáig azonban nem történt vizsgálat a jelenség kialakításában esetlegesen résztvevő genetikai tényezők tekintetében.

Az alkoholfogyasztás hatása az alkoholos májbetegségek kialakulására

A krónikus alkoholfogyasztás májbetegségek kialakulását okozhatja, amelynek stádiumai az egyszerű szteatózis, szteatohepatitisz, fibrózis és cirrózis majd a májbetegség. Hogy megértsük a patogenezis háttérben álló molekuláris mechanizmusokat, az etanol lebontási útját kell közelebbről megvizsgálni.

A máj az alkohol metabolizmusában legfontosabb szerepet játszó szerv. Az alkohol lebontás fő útjának első lépése az etanol oxidációja acetaldehiddé. Ebben a lépésben a legfontosabb szerepet az alkohol dehidrogenáz (ADH) enzimsalád tagjai játsszák, amelyek nagy affinitással kötődnek az etanolhoz és a citoplazmában helyezkednek el. A következő lépésben a keletkezett acetaldehid acetáttá oxidálódik az aldehid dehidrogenáz (ALDH) enzimsalád segítségével, amely a mitokondriumban található. A keletkező acetát spontán bomlik tovább vízre és CO₂-ra. Mind az ADH, mind az ALDH az elektronokat NAD⁺-ra továbbítja.

Az alkohol a májbetegségek kialakulására és progressziójára gyakorolt hatását legalább három módon fejtheti ki: az etanol lebontása során keletkező acetaldehid és más toxikus melléktermékek által, az okozott biokémiai változásokon keresztül, valamint oxidatív stressz okozásával.

Az etanol lebontásakor keletkező toxikus melléktermékek

Az acetaldehid oxidációja acetáttá egy viszonylag lassú folyamat, így nagy mennyiségű alkohol fogyasztása esetén az acetaldehid felhalmozódhat a szervezetben. Mivel ez toxikus, az etanol számos szisztémás hatása, legalább részben, a megemelkedett acetaldehid szint direkt vagy indirekt hatásának köszönhető. Mivel az acetaldehid kémiaiailag reaktív, proteinekkal, lipidekkel, illetve akár a DNS-el is reagálhat.

Az acetaldehid által leginkább módosítható proteinek a hemoglobin, albumin, tubulin, lipoproteinek, kollagén, CYP450 2E1 és a ketoszteroid reduktáz. Bár az a tény, hogy alkoholfogyasztás hatására az aldehidek adduktokat képeznek, széles körben elfogadott, ezen adduktok pontos szerepe a májbetegségek patogenezisében még tisztázásra szorul. A kalmodulin és a tubulin adduktok elégtelen mikrotubuláris működést és ezen keresztül a hepatociták dezorganizációját és a máj strukturális változását okozzák. Az acetaldehid ezen kívül növeli a májsejtek kollagéntermelését, valószínűleg az adduktumaik segítségével. Ezek az eltérések az extracelluláris mátrix termelésében a májban hegszövet kialakulását indukálhatják (fibrózis). Ezek az adduktomok ráadásul kiválthatnak immunválaszt is, amely a káros immunfolyamatok és a gyulladási folyamatok elősegítésével májkárosodást okozhat.

Biokémiai változások

A zsírmáj, amely egyike a legkorábbi elváltozásoknak a májban, kritikus szerepet játszhat az alkoholos májbetegségek iniciációjában és progressziójában. Ahogy már korábban

említésre került, az etanol acetaldehiddé majd acetáttá történő oxidációja során a NAD^+ szolgál elektron akceptorként, eltolva ezzel a $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ arányt. Ez a redukált állapot lipidakkumulációhoz vezethet az alkohol emésztése során, mivel emeli a zsírsavsintézis és észterifikáció arányát és csökkenti a szabad zsírsavak β oxidációját.

Oxidatív stressz

Számos különböző faktor és folyamat okozhatja az alkohol indukált oxidatív stresszt. Néhány példa:

- a $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ arány eltolódása
- a keletkező acetaldehid hatása
- alkohol indukált hipoxia
- az alkohol hatása az immunrendszerre (és a citokin termelésre)
- az alkohol hatására megemelkedett CYP450 2E1 aktivitás
- az oxidatív stressz a gyulladási folyamatok aktiválásában, valamint a hepatociták apoptózisában is fontos szerepet játszik, leginkább a $\text{TNF}\alpha$ szintjének növelése miatt.

Az acetaldehid farmakológiai és viselkedési hatásai

Az úgynevezett „alkohol érzékenység” tüneteit a felhalmozódott acetaldehid okozza. Ezek a tünetek gyakran megfigyelhetők deficiens ALDH enzimmel rendelkező emberek esetében. Ezek a tünetek: a vazodilatáció, emelkedett bőr hőmérséklet, arcpír, gyors szívverés, vérnyomáscsökkenés, száraz száj és torok, amely hörgőszűkülettel társul, hányinger, fejfájás és eufória. Az alkoholfogyasztás ezen kedvezőtlen hatásai visszatarthatnak az alkoholfogyasztástól, így csökkenthetik az alkoholfüggőség kialakulásának esélyét.

Bár az acetaldehid kedvezőtlen hatásai jól ismertek, szerepe az agyban a mai napig vita tárgyát képezi. Néhány kutató úgy gondolja, hogy az acetaldehid szintje az agyban alacsony marad, ugyanis nem jut át a vér-agy gáton. Mások viszont azt állítják, hogy magas acetaldehid koncentráció esetén átjut a vér-agy gáton, és szerepe lehet az alkoholfogyasztás megerősítő mechanizmusának kialakításában.

Az alkohol dehidrogenáz (ADH) géncsalád

Az emberben hét ADH gén van, amelyek a 4q22 kromoszómarégióban helyezkednek el. Ezeket az enzimeket 5 alosztályba sorolták, az enzimatiskus tulajdonságaik és a szekvenciájuk hasonlósága alapján. A máj alkohollebontásában leginkább az I. osztályba tartozó enzimek vesznek részt. Ezek az enzimek α , β és γ alegységekből állnak, amelyeket az ADH1A, ADH1B és ADH1C enzimek kódolják. Mivel ezek az enzimek alacsony K_m értékkel rendelkeznek, normális esetben az acetaldehid keletkezése után rövid időn belül elbomlik.

Az ADH1B és ADH1C genetikai polimorfizmusai

Annak ellenére, hogy az alkoholfüggőség és krónikus májbetegség legfontosabb meghatározója az alkoholfogyasztás szintje, kialakulásuk esélyét azonban genetikai tényezők is befolyásolják. Az ikerkutatások eredményei szerint az alkoholfüggőség heritabilitása 40-60%, míg az alkohol lebontási rátáját 49%-ban határozzák meg genetikai tényezők. Az alkoholbontásban résztvevő enzimeket kódoló génekben található mutációk befolyásolhatják az enzimek kinetikus tulajdonságait, így az acetaldehid felhalmozódásához vezethetnek. Olyan egyszerű báziscserés mutációkat (single nucleotide polymorphism, SNP), amelyek az enzimek NAD^+ koenzimkötő részében okoznak aminosavcserét, mind az ADH1B és ADH1C esetében leírtak.

Az ADH1B*2 allél (rs1229984) a 48. pozícióban arginin-hisztidin cserét okoz, létrehozva ezzel a β_2 alegységet, amely 40-szer nagyobb V_{max} -al rendelkezik, mint a β_1 alegység, melyet a vad allél (ADH1B*1) kódol. Az ADH1B*3 (rs2066702) változat a β_3 alegységet kódolja, amely a 370. aminosav pozícióban arginin helyett ciszteint tartalmaz. Homodimer formában ez az alegység 30-szor nagyobb V_{max} -al rendelkezik, mint a β_1 . A vad típusú ADH1C allél, az ADH1C*1 (γ_1 alegység) a 272. pozícióban arginint, a 350. pozícióban pedig izoleucint tartalmaz, míg az ADH1C*2 változat, amely a γ_2 alegységet kódolja, ugyanezekben a pozíciókban glutamint és valint tartalmaz. A γ_1 maximális reakciósebessége 2-2,5-szer nagyobb, mint a γ_2 -é. Az ADH1C*2 allélt meghatározó két SNP erős kapcsoltságot mutat.

A magasabb aktivitással rendelkező változatok (γ_1 , β_2 és β_3) a feltételezések szerint az acetaldehid felhalmozódásához vezetnek, hiszen a változatlan aktivitással rendelkező ALDH nem képes megbirkózni az alkoholbontás megnövekedett sebességével. Az acetaldehid akkumulációja a már korábban említett kellemetlen hatásokhoz vezethet. Ezek a hatások

visszatarthatják az egyént a további alkoholfogyasztástól, de, a hipotézisek szerint, ha az egyén tovább folytatja az alkoholfogyasztást, hepatotoxicitás és egyéb szövetkárosodás léphet fel az acetaldehid hatásai miatt.

Meta-analízisek eredményei szerint az ADH1B*1 szignifikánsan növeli az alkoholizmus kockázatát (ez azt is jelenti, hogy az ADH1B*2 allél csökkenti az alkoholizmus kialakulásának esélyét) mind a kaukázusi, mind az ázsiai populációkban. Az összefüggés azonban erősebb az ázsiai populációk esetében, valószínűleg az eltérő haplotípusoknak köszönhetően. A májbetegségek tekintetében a meta-analízisek nem találtak szignifikáns összefüggést sem az ázsiai, sem a kaukázusi populációk esetében. Fontos megjegyezni, hogy mivel ezek az elemzések esetként alkoholos májbeteg, kontrollként pedig alkoholista személyek bevonásával készültek, azt várták, hogy az ADH1B*1 allél protektív lesz a májbetegségekkel szemben. Ez azt is jelenti, hogy ilyen vizsgálati elrendezésben az alkoholisták között az ADH1B*2 allél májbetegségekre hajlamosító hatását várták.

Az ADH1C*2 allél hatását szintén meta-analízisekben foglalták össze. Ez a változat csak az alkoholfüggőséggel mutatott összefüggést, de csak az ázsiai populációk körében.

Az ADH1B*3 allél esetében jóval kevesebb adat áll rendelkezésre. Afrikai-amerikaiak körében ez a változat nem mutatott összefüggést az alkoholfüggőséggel. Más kutatások szerint a kaliforniai indiánok és afrikai-amerikaiak esetében az allél protektív az alkoholfüggőséggel szemben.

Ezen polimorf allélok gyakorisága változó a különböző földrajzi régiókban, kelet-nyugati gradienst mutatva. Az ADH1B*2 allél az afrikai-amerikaiakban és a kaukázusiakban viszonylag ritka, 0-10% között változik a gyakorisága. Ezzel szemben az ázsiai populációkban jóval gyakoribb, 50-90 %-ban fordul elő, etnikumtól függően.

Az ADH1B*3 allél leginkább afrikai-amerikaiakban fordul elő, 10-35%-os gyakorisággal, míg ázsiai és kaukázusi populációkban ritka vagy hiányzik.

Az ADH1C*2 előfordulása a kaukázusi populációkban 35-50% körül alakul. Ázsiai populációkban azonban erősen változó, magasabb a prevalenciája Kelet-Ázsiában és alacsonyabb Délnyugat-Ázsiában. Afrikában az allélgyakoriság magasabb, mint a kaukázusiakban, de alacsonyabb, mint Kelet-Ázsiában. Az alléleloszlás érdekes mintázata valószínűleg a különböző ADH gének közötti kapcsoltság, valamint az ADH1C*2 és ADH1B*2 allélokra ható szelekciós tényezők miatt alakult ki.

Az aldehid dehidrogenáz (ALDH) géncsalád

Az aldehid dehidrogenáz enzimek három osztályba sorolhatóak. Az acetaldehid oxidációjában szerepet játszó két legfontosabb enzim a citoszolikus ALDH1 és a mitokondriumban található ALDH2. Mindkét enzim tetramer formában van jelen és az acetaldehiddel szemben alacsony K_m értékkel rendelkezik. Az ALDH2 gén polimorf.

Az ALDH2 Glu504Lys polimorfizmus

Ez a polimorfizmus egy G – A csere, amely az 504. aminosav pozícióban a glutaminsav-lizin kicserélődést okoz (a polimorfizmus neve nemrégiben változott meg Glu487Lys-ről). A vad allél jelölése ALDH2*1, míg a mutáns allél az ALDH2*2. Az ALDH2*2 allélra homozigóták gyakorlatilag nem rendelkeznek ALDH2 aktivitással, míg a heterozigótákban jelentősen csökkent aktivitás mutatható ki. Az ALDH2*2 allél jelenléte nagyon erősen protektív az alkoholfüggőséggel szemben, a felhalmozódó acetaldehid kellemetlen hatásai miatt. Azonban, ahogy az ADH1B*2 allél esetében láhattuk, ha a mutációt hordozó személy a kellemetlen tünetek ellenére továbbra is fogyaszt alkoholt, elszenvedheti az emelkedett acetaldehid szint májkárosító hatásait. Az inaktív allélváltozat viszonylag gyakori ázsiai eredetű populációkban, míg az európai vagy afrikai eredetű népesség körében ritka vagy hiányzik.

Vizsgálataink során annak ellenére elvégeztük a vizsgálati populáció szűrését erre a mutációra, hogy az allél előfordulása Európában ritka. Magyarországon a krónikus májbetegség okozta halálozás olyan magas, hogy nem hagyhattuk ki ezt a polimorfizmust, mint lehetséges magyarázatot.

Célkitűzések

Vizsgálataink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a genetikai háttér szignifikáns szerepet játszik-e a krónikus májbetegségek Magyarországon tapasztalható magas prevalenciájában. Az allélgyakoriságok, illetve az allélok hatásainak meghatározásához eset-kontroll vizsgálatot végeztünk. Ennek során célunk volt, hogy a vizsgálati populáció alkoholfogyasztási szokásainak feltérképezése segítségével meghatározzuk a vizsgált mutációk hatását az alkoholfogyasztásra. A vizsgált allélok kombinált hatását is meg kívántuk határozni, mind a krónikus májbetegségek, az alkoholfüggőség és az alkoholfogyasztás tekintetében. Az eredményeink nem csak abban segíthetnek, hogy megértsük a krónikus májbetegség magas prevalenciájának okát Magyarországon, hanem a polimorfizmusok egymásra gyakorolt hatását is segíthetnek tisztázni.

Annak a jobb megértése, hogy a genetikai polimorfizmusok milyen szerepet játszanak az egyének alkoholfogyasztási szokásainak kialakításában, valamint a krónikus májbetegségek kialakításában, elősegítheti a személyre szabott terápiák kialakítását. Ez azért is nagyon fontos, mert Magyarországon az alkoholizmus is nagyon veszélyes probléma. Populációs szinten ugyanakkor a génvariánsok gyakoriságának feltérképezése segíthet olyan népegészségügyi programok kialakításában, melyek jobban illeszkednek a helyi jellemzőkhöz, ezáltal csökkentve a krónikus májbetegség és cirrózis magas arányát.

Anyagok és módszerek

Mintagyűjtés

1998-ban a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Iskolája és az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat egy figyelőrendszert állított fel Magyarországon négy megyében (Szabolcs-Szatmár-Bereg, Hajdú-Bihar, Zala és Győr-Moson-Sopron). A Házi-orvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP) abból a célból keletkezett, hogy olyan nem fertőző betegségek morbiditását monitorozni lehessen, amelyek népegészségügyi szempontból kiemelt jelentőségűek. A vizsgálatba bevont négy megye jól reprezentálja a keleti és nyugati országrész között fennálló, jól ismert gazdasági-társadalmi és egészségi állapotbeli különbségeket. A résztvevő praxisokban regisztrált populáció nem és kor tekintetében reprezentatív a résztvevő megyékre, illetve a teljes országra is. Ez a program ezen kívül jó keretrendszert szolgáltat epidemiológiai kutatások kivitelezéséhez is.

Vizsgálatunk forráspopulációja az adatgyűjtés idején 45-64 éves férfiakat foglalt magában. A kontrollcsoport szisztematikus véletlenszerű mintavétellel került kiválasztásra. A lehetséges esetek a korábban májbetegséggel diagnosztizált betegek közül kerültek ki. Mind az esetek, mind a kontrollok fizikai és laboratóriumi vizsgálatokon estek át, hogy a betegség megléte vagy hiánya megerősítésre kerüljön. A diagnosztikus kritériumok teljesüléséhez a betegnek az alábbiak közül legalább két tünetet kellett mutatnia: póknaevus, ascites, palmaris vagy plantaris erythema, sárgaság, megnagyobbodott, tömör máj, lekerekített vagy egyenetlen felszínnel, valamint legalább egy pozitív laboratóriumi eredményt az alábbiak közül: emelkedett aszpartát-aminotranszferáz (AST), alanin-aminotranszferáz (ALT), γ -glutamil-transzpeptidáz (γ GT) alkalikus foszfatáz illetve bilirubin szint vagy emelkedett szérumban albumin szint. Minden olyan esetben, ahol a háziorvos diagnózisa nem egyezett meg a vizsgálatok eredményeivel, az érintett személyek az utóbbi alapján lettek az eset vagy a kontroll csoportba sorolva. A résztvevőktől a laboratóriumi tesztekhez és a genetikai vizsgálatokhoz vért vett a háziorvos, majd sor került egy kérdőív kitöltésére, amely az érintettek gazdasági és családi állapotáról, végzettségéről, egészségmagatartásáról és alkoholfogyasztási szokásairól gyűjtött információkat. A hepatitis B és C fertőzött személyek a vizsgálatból kizárásra kerültek.

Összességében 666 kontroll és 241 eset került bevonásra a vizsgálatainkba, a részvételi arány 60%-os volt. Kor tekintetében a kontrollcsoport reprezentatív volt a teljes magyar lakosságra ($p=0,424$). Az esetek szignifikánsan idősebbek voltak, mint a kontrollok (55,17 év és 53,89 év, $p=0,0023$). Minden résztvevő írásos beleegyező nyilatkozatot töltött ki.

A kutatást a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Tudományos Bizottságának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta.

Kérdőíves adatfelvétel

Az önkitöltős kérdőív adatai alapján a szociális státuszra vonatkozóan az alábbi változókat állítottuk össze:

Végzettség: iskolai végzettség alapján 4 kategóriába osztottuk a vizsgálati alanyokat. Az elsőbe tartoztak a 8 vagy kevesebb általános iskolai osztályt végzők, a másodikba azok, akik jártak középiskolába, de nem tettek érettségi vizsgát, a harmadikba az érettségi vizsgával, míg a negyedikbe a felsőfokú végzettséggel rendelkezők kerültek.

Anyagi helyzet: a résztvevők saját bevallásuk alapján tartoztak a rossz/nagyon rossz, kielégítő, jó/nagyon jó anyagi helyzetű csoportok valamelyikébe.

Az alkoholfogyasztási szokások tekintetében a következő változókkal jellemeztük a vizsgálati csoportot:

Alkoholfogyasztás gyakorisága, 7 lehetséges kategóriával: (1) soha nem ivott alkoholt, (2) nem ivott alkoholt az elmúlt 12 hónapban, (3) havonta egy alkalomnál ritkábban fogyaszt alkoholt, (4) havonta 1-3 alkalommal iszik alkoholt, (5) heti 1-2 alkalommal, (6) heti 3-4 alkalommal, (7) legalább heti 5 alkalommal fogyaszt alkoholt.

Összesített alkoholfogyasztás, az alkoholfogyasztás gyakorisága és az elfogyasztott mennyiség alapján, 4 kategóriát képezve: (1) nem ivó, (2) ritka ivó, aki havonta 3 alkalomnál kevesebbszer fogyaszt alkoholt, (3) mértékletes ivó, ha heti rendszerességgel iszik hetente 14 egységnyi vagy kevesebb alkoholt és a napi elfogyasztott mennyiség soha nem több, mint 5 egység, (4) nagyivó, aki hetente több, mint 14 egységnyi alkoholt fogyaszt, vagy a napi fogyasztása meghaladja az 5 egységet (1 egység=15 g alkohol).

Az alkoholproblémákkal küzdők számát az úgynevezett CAGE kérdőív segítségével mértük fel. Ez a kérdőív négy, indirekt kérdésből épül fel, neve a kérdések angol

elnevezéseinek kezdőbetűiből áll össze (**C**ut, **A**nnoyed, **G**uilty, **E**ye-opener). A kérdések a következők:

1. Érezte-e valaha, hogy abba kellene hagynia az ivást?
2. Zavarták-e valaha az emberek azzal, hogy kritizálták az ivását?
3. Rossznak vagy vétkesnek érezte-e magát az ivásával kapcsolatban?
4. Előfordult-e, hogy ivással kezdte a napot reggel, hogy megerősítse az idegeit, vagy megszabaduljon a másnaposságtól?

A kérdésekre adott igen válaszok száma alapján két változót alakítottunk ki.

CAGE pontszám, a kérdőívre adott pozitív válaszok száma, értéke 0-tól 4-ig terjed.

CAGE státusz, 2 vagy több igen válasz esetén a státusz pozitív, egyébként negatív.

DNS izolálás

A DNS-t EDTA-val alvadásgátolt vér fehérvérsejtjeikből, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit Large Volume (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) segítségével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően.

Genotipizálás

A genotipizálást LightCycler 1.5 készüléken (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) végeztük, valósídejű polimeráz-lánreakciót (real-time PCR) követő olvadáspont analízissel.

Az ADH1C Arg272Gln (rs1693482) és Ile350Val (rs698) mutációkat közösen, duplex reakció segítségével vizsgáltuk, míg az ADH1B Arg370Cys (rs2066702) és ADH1B Arg48His (rs1229984) szimplex reakcióban kerültek feldolgozására. A szekvenálást, ahol szükséges volt, a Biomi kft. végezte, az egyik megfelelő PCR primer segítségével.

Statisztikai elemzés

Egyszerű SNP analízis

A genotípusok és a kimeneteli változók (krónikus májbetegség jelenléte, az alkoholfogyasztás gyakorisága, összesített alkoholfogyasztás, a pozitív CAGE válaszok

száma, CAGE státusz) közötti kapcsolatot logisztikus regresszióval vizsgáltuk. Amennyiben a kimeneteli változók nem binárisak voltak, ordinális logisztikus regressziót használtunk.

A logisztikus regresszió vagy bifaktoriális volt (a fent említett magyarázó változók közül csak egyet tartalmazott), vagy multifaktoriális (a genotípus mellett egy alkoholfogyasztási változót is figyelembe vettünk, mint a krónikus májbetegségek független kockázati tényezőjét), illetve, ahol szükséges volt, az interakciót is vizsgáltuk.

Kapcsoltsági analízis

Az SNP-k között fennálló kapcsolat feltérképezése érdekében LOD (Logarithm of Odds), D' és r^2 értékeket számoltunk, a Haploview szoftver segítségével.

Multivariáns SNP analízis

A három legfontosabb polimorfizmus (ADH1B*2 és az ADH1C két polimorfizmusa) együttes hatásának és a közöttük esetlegesen fennálló episztázisnak a feltérképezéséhez ezeket a mutációkat egy multivariáns logisztikus regressziós modellbe illesztettük. Ehhez öt csoportot képeztük a minták genotípusától függően: az első csoportba (vad/vad) tartozó minták mindhárom mutációra homozigóta vad típusúak voltak. Ez a csoport szolgált referenciacsoportként. A második csoportba (vad/heterozigóta) azok a minták kerültek, amelyek homozigóták voltak az ADH1B*1 allélra és heterozigóták az ADH1C*2 allélra. A harmadik csoport (vad/mutáns) tagjai szintén homozigóták voltak az ADH1B*1-re, de az ADH1C*2 allélra homozigóta mutáns genotípusúak. A negyedik csoport (heterozigóta/vad) mintái hordozták az ADH1B*2 allélt, és homozigóták az ADH1C*1 allélra. Az ötödik csoport (heterozigóta/heterozigóta) tagjai szintén hordozták az ADH1B*2 allélt, valamint heterozigóták voltak az ADH1C*2 allélra. Logisztikus regresszióval vizsgáltuk ezen genotípuskombinációk hatását a krónikus májbetegségekre és alkoholfogyasztási szokásokra.

A kockázati tényezők és a kimeneteli változók közötti kapcsolat becslésére esélyhányadost (EH) számoltunk. Az esélyhányados korrigált formában kerül feltüntetésre, ahol a korrekciót korra, végzettségre és anyagi helyzetre vonatkozóan végeztük el.

Az adatokat a STATA 9.0 statisztikai szoftver segítségével elemeztük (StataCorp LP, Texas, USA).

Eredmények

Egyszerű SNP analízis

Egy új SNP variáns azonosítása

Az ADH1B Arg370Cys (rs2066702) mutáció vizsgálata során egy nem várt mutációt azonosítottunk. A szekvenálás során kiderült, hogy az új változat ugyanazt az aminosavat érinti, amelyet az eredeti változat, de nem ciszteinre, hanem hisztidinre cserélődik az arginin. Ez a változat az Arg370His (rs75967634). Annak ellenére, hogy ezt a mutációt nemrégiben feltöltötték a PubMed SNP adatbázisba, sem a gyakoriságát, sem a hatását nem írták le, így ezt a mutációt bevontuk a további elemzésbe. Az allél gyakorisága 1% volt mind az eset, mind a kontrollcsoportban.

A vizsgált SNP-k analízise

Mivel az ADH1C Arg272Gln és az Ile350Val két minta kivételével minden esetben ugyanazt a genotípust mutatták, a továbbiakban ezeket a mutációkat a kapcsoltsági analízis kivételével együtt elemeztük.

Az ADH1B*2 gyakorisága 4,4% volt az esetek és 8,6% a kontrollok között. Az ADH1B 370Cys polimorfizmus gyakorisága 1% alatt maradt, így ez az allél a további elemzésből kizárásra került. Az ADH1C*2 allélgyakorisága 38,7% volt mind az eset, mind a kontrollcsoportban.

Az ADH1B*2 allél jelenléte esetén a májbetegség kialakulásának esélye szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult (EH=0,47; $p=0,003$). Ugyanígy szignifikáns összefüggést találtunk az allél hordozása és az alkoholfogyasztás gyakorisága (EH=0,63; $p=0,004$) valamint az alkoholfüggőség -CAGE kérdőív szerinti- kialakulása között (EH=0,53; $p=0,009$), tehát a nagyivók kevésbé hajlamosak az ADH1B*2 allél hordozására. Úgy is fogalmazhatunk, hogy az allél protektív a problémás ivás kialakulásával szemben. Hasonlóan erős összefüggést találtunk a pozitív CAGE válaszok számával (EH=0,52; $p=0,002$).

Annak megállapítására, hogy a genotípus közvetlenül a májbetegségekre hat, vagy csak az alkoholfogyasztási szokásokon keresztül, modelleket illesztetünk a ivási szokásokra korrigálva, illetve korrigálás nélkül. Az egyértelmű kapcsolat az allél és a betegség

kialakulása között eltűnt, ha a pozitív CAGE válaszok számára, a CAGE státuszra, valamint az alkoholfogyasztás gyakoriságára korrigáltunk (rendre: $EH=0,63$; $p=0,123$; $EH=0,62$; $p=0,101$; $EH=0,60$; $p=0,061$).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az ADH1B*2 allél eltérően hat-e a májbetegség kialakulására az alkohol mennyiségétől függően, olyan modelleket illesztettünk, amelyek figyelembe vették a lehetséges interakciót a genotípus és az alkoholexpozíció között. CAGE negatívokban az ADH1B*2 allél a krónikus májbetegségek kialakulásának esélyét szignifikánsan csökkentette ($EH=0,27$; $p=0,014$), míg CAGE pozitívokban ellenkező irányú, de nem szignifikáns hatást figyelhetünk meg ($EH=1,21$; $p=0,500$). A hatásmódosítás szignifikánsnak bizonyult ($p=0,026$).

Az ADH1B 370His allél nem mutatott szignifikáns összefüggést egyik vizsgált változóval sem.

Az ADH1C*2 allél homozigóta formában növeli az esélyét a gyakoribb alkoholfogyasztás ($EH=1,513$, $p=0,028$), a magasabb alkoholfogyasztási státusz ($EH=1,582$, $p=0,035$) és a pozitív CAGE státusz kialakulásának ($EH=1,780$, $p=0,016$). Ez az allél nem mutatott összefüggést a krónikus májbetegség jelenlétével.

Kapcsoltsági analízis

Az irodalmi adatok alapján vártunk megfelelően az ADH1C polimorfizmusai között erős kapcsoltság figyelhető meg. Az ADH1C Arg272Gln és Ile350Val mutációk és az ADH1B Arg48His mutáció között szintén megfigyelhető a kapcsoltság, amely alapján a vad-vad-mutáns és a mutáns-mutáns-vad kombinációk gyakrabban fordulnak elő, mint az az allélgyakoriság alapján várható lenne.

Multivariáns SNP analízis

Ahogy az anyagok és módszerek fejezetben már említésre került, a mintákat ADH1B Arg48His és ADH1C Arg272Gln/Ile350Val mutációs státuszuknak megfelelően öt csoportba soroltuk. A heterozigóta/vad szignifikáns összefüggést mutatott a CAGE státusszal, az esélyhányados 0,550 volt ($p=0,011$). Mind a vad/heterozigóta mind a vad/mutáns csoport esetén magasabb az esélye a CAGE pozitív státusz kialakulásának ($EH=1,540$, $p=0,024$; $EH=1,859$, $p=0,014$). Érdekes módon sem a heterozigóta/vad, sem a heterozigóta/heterozigóta csoport nem mutatott összefüggést a CAGE státusszal.

A krónikus májbetegséggel csak azok a csoportok mutattak összefüggést, amelyek hordozták az ADH1B 48His allélt. Mindkét ilyen csoport protektívnek bizonyult, ahogy az az egyszerű SNP vizsgálatok eredményei alapján várható volt (heterozigóta/vad: $EH=0,398$, $p=0,010$; heterozigóta/heterozigóta: $EH=0,461$, $p=0,043$).

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, ezek a kombinációk közvetlenül a krónikus májbetegségre hatnak, vagy az alkoholfogyasztási szokások módosításán keresztül fejtik ki hatásukat, további regressziós modelleket illesztettünk. Ezekben a modellekben vagy a krónikus májbetegség, vagy a CAGE státusz szolgált kimeneti változóként, miközben a másik (kimeneti változóként nem használt) változóra korrigáltuk a modellt. Ha a CAGE státuszt használtuk kimeneti változóként, és a krónikus májbetegség jelenlétére korrigáltunk, a vad/heterozigóta és a vad/mutáns csoportok maradtak szignifikánsak ($EH=1,756$, $p=0,006$; $EH=2,204$, $p=0,004$). Amennyiben a májbetegségek meglétét tekintettük kimeneti változónak és a CAGE státuszra végeztük el a korrekciót, csak a heterozigóta/vad csoport által korábban mutatott összefüggés maradt szignifikáns ($EH=0,368$, $p=0,019$).

Annak eldöntésére, hogy ezek a kombinációk másképpen hatnak-e az alkoholfüggőkben, mint a nem függőkben, újabb modelleket használtunk. Amennyiben a logisztikus regressziót csak a CAGE negatív esetekben és kontrollokban végeztük el, csak a heterozigóta/vad csoport mutatott szignifikáns összefüggést a májbetegség kialakulásával ($EH=0,116$, $p=0,039$). Amennyiben csak a CAGE pozitív személyeket vizsgáltuk, egyik csoport sem mutatott szignifikáns összefüggést a májbetegség jelenlétével.

Megbeszélés

Magyarországon és a kelet-közép-európai országokban megfigyelhető, krónikus májbetegségek okozta magasabb halálozás hátterének felderítése érdekében végzett vizsgálatok eddig elsősorban az alkoholfogyasztási mintázatokat vizsgálták, a genetikai tényezők jóval kisebb figyelmet kaptak. Ezért, jelen vizsgálatban azt szeretnénk volna tisztázni, vajon a Kelet- és Nyugat-Európa között fennálló genetikai különbségek játszanak-e szerepet a cirrózis okozta mortalitás esetében megfigyelhető kelet-nyugati különbség kialakításában.

Emellett célunk volt a fontos ADH polimorfizmusok a krónikus májbetegségekre gyakorolt együttes hatásának leírása nem csak alkoholfüggő esetekben és kontrollokban, hanem a mérsékelt, illetve ritkán ivók körében is. Ezek az eredmények komplex betekintést nyújtanak az alkoholfogyasztás és az ezzel összefüggő betegségek genetikai hátterébe, nem csak a magyar lakosságra, hanem más kaukázusi populációkra vonatkozóan is.

Kutatásunk egyik érdekes, nem várt eredménye egy új mutáció, az ADH1B Arg370His (rs75967634) leírása volt. Megállapítottuk a mutáns allél gyakoriságát is a magyar lakosság körében. Annak ellenére, hogy ez a mutáció már korábban bekerült a PubMed SNP adatbázisába, sem a gyakorisága, sem a hatása nem került leírásra. Mivel ez a mutáció az eredeti, ADH1B Arg370Cys mutációhoz nagyon közel helyezkedik el, a korábban használt módszerekkel nem lehetett detektálni. Eredményeink szerint azonban érdemes lenne a korábbi, ADH1B Arg370Cys mutáció jelenlétére vizsgált mutációkat újra genotipizálni, vagy szekvenálni, a pontos genotípus validálása érdekében. Mivel a mutáció gyakorisága alacsony, hatása további vizsgálatokat igényel, akár más populációkon is.

Az európai populáció körében az ADH1B*2 allél átlagos gyakorisága 5%, etnikumtól függően. Magyarországon a kontrollcsoportban 8,31% volt ennek az allélnak a gyakorisága, majdnem kétszerese a nyugat-európai populációkban mértnek. Ez a magasabb érték valószínűleg a magyar-szláv genetikai keveredésnek köszönhető, lényegesen magasabb allélgyakoriságot írtak ugyanis le Oroszországban, mint a nyugati országokban.

Az eredményeink alapján az ADH1B*2 allél hordozása csökkenti a májbetegség kialakulásának esélyét (EH=0,47), de ez az összefüggés eltűnik, ha az alkoholfogyasztási szokásokra korrigálva végezzük el az elemzést. Emiatt úgy tűnik, hogy az allél az alkoholfogyasztási szokásokra hat közvetlenül, a májbetegség kialakulására pedig csak

indirekt módon. Az alkoholfüggő személyek esetében az allél hordozása nem növelte szignifikánsan a májbetegségek kialakulásának esélyét, bár az alkoholizmus megléte és allél hatása között szignifikáns interakciót figyeltünk meg. Ez azt is jelentheti, hogy annak ellenére, hogy ez a protektív allél Magyarországon gyakori, hatását az alkoholfogyasztás továbbfolytatása kiküszöbölheti, illetve akár ellentétes irányba fordíthatja.

Az ADH1C két legfontosabb polimorfizmusa, az Arg272Gln és az Ile350Val majdnem teljes kapcsoltságot mutatott, ahogy azt korábbi vizsgálatok alapján vártuk. Annak ellenére, hogy korábbi meta-analízisek nem találtak összefüggést az allélok hordozása és a májbetegség illetve az alkoholfüggőség kialakulása között, több szerző is leírt kapcsolatot az allélok és az alkoholfogyasztási szokások, illetve az alkoholizmus kialakulása között. Bár eredményeink megerősítik az összefüggés hiányát a krónikus májbetegségek esetében, vizsgálataink emelkedett esélyhányadost mutattak az alkoholfüggőség (CAGE pozitív státusz) és a nagyívás tekintetében az ADH1C*2 homozigóta személyek esetében. Ez az ellentmondás a meta-analízisek eredményeivel valószínűleg annak köszönhető, hogy a különböző vizsgálatokban az alkoholfogyasztási változókat eltérően kategorizálják, valamint annak, hogy az allél viszonylag gyenge hatással bír. A kapcsoltsági vizsgálataink eredménye megerősíti a korábbi vizsgálatok eredményeit. Ez a kapcsoltság azt jelenti, hogy a gyorsabb etanol lebontási képességgel rendelkező allélok gyakrabban tűnnek fel együtt, mint az az allélgyakoriságok alapján várható lenne.

Annak érdekében, hogy az ADH1B és ADH1C polimorfizmusok egyéni hatását is vizsgálni tudjuk, multivariáns analízist hajtottunk végre. Amennyiben a krónikus májbetegségekre gyakorolt hatást vizsgáltuk, az eredmények megerősítik az egyszerű elemzés alapján vártakat, kivéve, hogy az ADH1B*2 allélt hordozó csoportok nem csökkentették a alkoholfüggőség kialakulásának esélyét. Ennek oka valószínűleg az lehet, hogy az allél az eset- illetve kontrollcsoportban eltérően hat a CAGE státuszra, az esetcsoportban nem bizonyult protektívnek a CAGE pozitivitás kialakulásával szemben.

Érdekes módon, ha a CAGE státuszt használjuk kimeneti változóként és a krónikus májbetegségek jelenlétére korrigálunk, csak a homozigóta ADH1B*1 genotípusú csoportok hatása maradt szignifikáns. Amennyiben a krónikus májbetegség szerepelt kimeneti változóként és a CAGE státuszra korrigáltunk, az ADH1B*2 allélt hordozó és az ADH1C*1-re vad csoport hatása szignifikáns maradt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az ADH1C polimorfizmusai közvetlenül az alkoholfogyasztásra hatnak. Az egyszerű SNP analízis

eredményei is ezt támasztják alá. Ezzel ellentétben, az ADH1B*2 allél önmagában vizsgálva úgy tűnt, hogy csak az alkoholfogyasztási szokásokra fejt ki hatást, a multivariáns analízis alapján feltételezhető, hogy az ADH1C*2 allél ellentétes hatása nélkül, tehát ha ezek vad formában vannak jelen, védelmet nyújt a krónikus májbetegségek kialakulása ellen. Ennek a hipotézisnek a megerősítése további enzimatis teszteket vagy eset-kontroll vizsgálatokat igényel.

Vizsgálataink megerősítik, hogy az alkoholfogyasztási problémák felmérésére a CAGE kérdőív pontosabb képet nyújt, mint az alkoholfogyasztásra vonatkozó kérdések. Jól ismert tény, hogy az alkoholfogyasztók nagy része hajlamos alábecsülni az általa elfogyasztott ital mennyiségét, akár feledékenységéből, akár a társadalmi előítéletek miatt.

Összefoglalva vizsgálataink az alkoholizmus és a krónikus májbetegségek genetikai hátterének tisztázásában fontos lépést jelentenek. Kutatásunk nem csak része az ADH polimorfizmusok gyakoriságának feltérképezésének a kaukázusi populációkban, hanem egyike a legösszetettebb vizsgálatoknak Európában, amely nagyszámú eset- illetve kontrollszemély bevonásával készült. További fontos eredménye a vizsgálatainknak, hogy rávilágítottunk arra, hogy nem csak alkoholista eseteket és kontrollokat érdemes vizsgálni, hanem olyanokat is, akik nem küzdenek alkoholproblémákkal. Ezzel a vizsgálati elrendezéssel fontos és új információkat nyertünk az ADH mutációk és az alkoholfüggőség vagy a krónikus májbetegség közötti interakciók fennállásáról is.

Főbb megállapítások és eredmények

1. Magyarországon az első olyan eset-kontroll vizsgálatot végeztük el, amelynek során a krónikus májbetegségek és az alkoholfüggőség háttérében álló genetikai tényezőket térképeztük fel.
2. Kutatásunk egyik érdekes, nem várt eredménye egy új mutáció, az ADH1B Arg370His (rs75967634) leírása volt. Megállapítottuk a mutáns allél gyakoriságát is a magyar lakosság körében, de az nem mutatott összefüggést sem az alkoholfogyasztást leíró változókkal, sem a krónikus májbetegséggel. Alacsony prevalenciája miatt ezen SNP hatásának tisztázása további vizsgálatokat igényel.
3. Egy komplex analízist hajtottunk végre annak érdekében, hogy a fontos ADH polimorfizmusok együttes hatását megvizsgáljuk a krónikus májbetegségek, az alkoholfüggőség és az alkoholfogyasztási szokások tekintetében, nem csak alkoholista esetek és kontrollok, hanem mérsékelt és ritkán ivók körében is.
4. A vizsgált polimorfizmusok között az ADH1B 48His rendelkezett a legnagyobb hatással. Eredményeink szerint ez a mutáció leginkább az alkoholfogyasztási szokásokra hat, csökkentve a gyakori és a problémás ivás esélyét. Amennyiben ez a mutáció a vad típusú ADH1C mutációkkal társul, protektívnek tűnik a májbetegségek kialakulásával szemben.
5. A nyugat-európai országokhoz képest az ADH1B 48His allél magas prevalenciáját találtuk Magyarországon. Mivel azonban ennek a mutációnak az alkoholfüggőségben szenvedőknél eltérő hatása van, a protektív allél hordozásának előnyei a további alkoholfogyasztással megszüntethetőek, vagy akár ellenkező irányba fordíthatók.
6. Megállapítottuk, hogy a két legfontosabb ADH1C polimorfizmus (Arg272Gln and Ile350Val) majdnem teljes kapcsoltságot mutat, és közvetlen módon az alkoholfogyasztási szokásokra hatnak, emelve az alkoholfüggőség (CAGE pozitív státusz) és a nagyivás esélyét.
7. A kapcsoltsági analízis eredményei szerint a gyors etanol lebontó képességgel rendelkező ADH1B és ADH1C allélok hajlamosabbak együtt előfordulni.



Iktatószám: DEENKÉTK /177/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Tóth Réka

Neptun kód: VMUUIIC

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, R.**, Fialat, S., Petrovsky, B.É., McKee, M., Ádány, R.: Combined effect of ADH1B rs1229984, rs2066702 and ADH1C rs1693482/ rs698 alleles on alcoholism and chronic liver diseases.
Dis. Markers. "accepted by publisher", 2011.
IF:1.723 (2010)
2. **Tóth, R.**, Pocsai, Z., Fialat, S., Széles, G., Kardos, L., Petrovsky, B.É., McKee, M., Ádány, R.: ADH1B*2 allele is protective against alcoholism but not chronic liver disease in the Hungarian population.
Addiction. 105 (5), 891-896, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02876.x>
IF:4.145

További Közlemények

3. Fialat, S., Szigethy, E., Széles, G., **Tóth, R.**, Ádány, R.: Insertion/deletion polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme is associated with metabolic syndrome in Hungarian adults.
J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320310394231>
IF:1.6 (2010)
4. Lázár, V., Ecsedi, S., Szöllősi, A., **Tóth, R.**, Vízkeleti, L., Rákossy, Z., Bégány, Á., Ádány, R., Balázs, M.: Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma.



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Mod. Pathol. 22 (10), 1367-1378, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2009.109>

IF:4.406

Összesített impakt faktor: 11,874

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5,868

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.08.26



Előadások és poszterek

Tóth R., Pocsai Zs., Ádány R.: A lipoprotein lipáz gén kardiovaszkuláris betegségekre hajlamosító génpolimorfizmusainak vizsgálata a magyar általános populációban. 2007. évi Helyi Ph.D és TDK Konferencia, Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum, 2007. február, Debrecen

Pocsai Zs., **Tóth R.**, Széles Gy., Kardos L., Petrovski B., Ádány R.: Alkoholos májbetegségek háttérében álló alkohol-dehidrogenáz génpolimorfizmusok vizsgálata. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Első Országos Találkozója. Hajdúszoboszló, 2007. november 15-17.

Tóth R., Pocsai Zs., Széles Gy., Kardos L., Petrovski B., Ádány R.: Analysis of the ADH1B Arg47His and ALDH2 Glu487Lys mutations revealed association between ADH1B*2 allele and alcoholism but not with chronic liver disease in Hungarian males. A Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum és az MTA DAB Orvostudományi és Biológiai Szakbizottságának tudományos ülése, 2008. február 25., Debrecen, poszter

Lázár V., Ecsedi Sz., Rákosy Zs., **Tóth R.**, Szöllősi A., Emri G., Ádány R., Balázs M.: Characterization of cyclin D1 and other candidate gene amplifications in the 11q13 region in human primary cutaneous melanoma. XXIV ISAC International Congress, 2008. május 17-21, Budapest

Tóth R., Pocsai Zs., Fialat Sz., Széles Gy., Kardos L., Petrovski B., McKee M., Ádány R.: Az alkohol dehidrogenáz polimorfizmusainak hatása az alkoholfogyasztási szokásokra és az alkoholos májbetegségek kialakulására a magyar populációban. Debreceni Egyetem, OEC, Egészségtudományok Doktori Iskola, Ph.D. hallgatóinak 2009. szimpóziuma, 2009. április 27, Debrecen

Tóth R., Pocsai Zs., Fialat Sz., Széles Gy., Kardos L., Petrovski B., McKee M., Ádány R.: A krónikus májbetegségek és az alkoholfogyasztás genetikai háttérének vizsgálata magyar férfiak körében; NKE IV. Konferenciája, 2010. szeptember 2-4. Szombathely

Fialat Sz., **Tóth R.**, Szigethy E., Nagy A., Balázs M., Ádány R.: A 2-es típusú diabetes mellitusra való fogékonyság vizsgálata a magyar lakosság körében (PPAR γ , KCNJ és TCF7 α); NKE IV. Konferenciája, 2010. szeptember 2-4. Szombathely

Tóth R., Szigethy E., Fiatal Sz., Ádány R.: A lipoprotein lipáz S447X génpolimorfizmusának hatása a metabolikus szindróma és komponenseinek kialakulására; NKE V. Konferenciája, 2011. augusztus 31.-szeptember 2. Szeged