

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

IMMUNOLÓGIAI , CITO-ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI
ÉS AZOK JELENTŐSÉGE AZ EPITELIÁLIS PAJZSMIRIGYDAGANATOK
PATOGENÉZISÉBEN ÉS KÓRLEFOLYÁSÁBAN

ÍRTA:

DR JUHÁSZ FERENC

TÉMAVEZETŐ:

PROF. DR. LUKÁCS GÉZA

EGYETEMI TANÁR

DEBRECENI EGYETEM ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

I SZ. SEBÉSZETI KLINIKA

2006

1. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. PAJZSMIRIGY NEOPLÁZIÁK EPIDEMIOLÓGIAI ADATAI, ETIOLÓGIÁJA.....	7
2.1.1. <i>Differenciált pajzsmirigydagاناتok</i>	7
2.1.2. <i>Medulláris pajzsmirigy karcinóma (MTC)</i>	10
2.2. AZ MHC GENETIKAI SZERVEZETTSÉGE.....	14
2.3. A FŐ HISZTOKOMPATIBILITÁSI KOMPLEX (MHC) ÉS A BETEGSÉGEK ÖSSZEFÜGGÉSE.....	14
2.4. A HLA ÉS A BETEGSÉGEK ÖSSZEFÜGGÉSEINEK KUTATÁSÁBAN ALKALMAZOTT SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK...	17
2.5. A DAGANATOK GENETIKAI HÁTTERÉRŐL.....	18
2.6. PAJZSMIRIGY NEOPLÁZIÁK CITOGENETIKAI VIZSGÁLATAI.....	19
2.7. PAJZSMIRIGY NEOPLÁZIÁK MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATAI.....	21
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	25
3.1. HLA TÍPIZÁLT BETEGEK.....	25
3.2. HLA ANTIGÉNEK TÍPIZÁLÁSÁHOZ HASZNÁLT MÓDSZEREK.....	26
3.2.1. <i>Szerológiai módszer:</i>	26
3.2.2. <i>HLA DR antigén tipizálás DNS szinten.</i>	28
3.3. ALKALMAZOTT SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK.....	30
3.3.1. <i>Szignifikancia teszt</i>	30
3.3.2. <i>Relatív rizikó (RR)</i>	31
3.4. HLA TÍPIZÁLÁS, KALCITONIN MEGHATÁROZÁS, CSALÁDVIZSGÁLATOK MEDULLÁRIS PAJZSMIRIGY KARCINÓMÁBAN SZENVEDŐ BETEGEKBN.....	32
3.5. CITOGENETIKAI VIZSGÁLATOK PAPILLÁRIS KARCINÓMÁBAN ÉS FOLLIKULÁRIS ADENÓMÁBAN.....	33
3.6. MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK BENIGNUS ÉS MALIGNUS PAJZSMIRIGY NEOPLÁZIÁBAN.....	34
3.6.1. <i>Szintetikus oligonukleotid és PCR</i>	34
3.6.2. <i>Southern Blot és Oligonukleotid Probe Hibridizáció</i>	35
4. EREDMÉNYEK.....	36
4.1. HLA DR ANTIGÉN MEGOSZLÁSA PAJZSMIRIGY KARCINÓMÁBAN SZENVEDŐ BETEGEKBN.....	36
4.2. HLA-DR ANTIGÉNEK ÉS AZ IGG NEHÉZ-LÁNC (GM) FENOTÍPUS MEGOSZLÁSA EPITELIÁLIS PAJZSMIRIGY TUMOROKBAN.....	38
4.3. HLA DR ALLÉLEK DNS ALAPÚ TÍPIZÁLÁSA.....	40
4.4. A DIFFERENCIÁLT PAJZSMIRIGY KARCINÓMA PROGNOZTIKAI FAKTORAI ÉS A HLA-DR 11 KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS VIZSGÁLATA.....	41
4.5. KALCITONIN MEGHATÁROZÁSOK ÉS A CSALÁDVIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI MEDULLÁRIS PAJZSMIRIGYRÁKBAN.....	43
4.6. CITOGENETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	46
4.7. RAS ONKOGÉN MUTÁCIÓ BENIGNUS ÉS MALIGNUS PAJZSMIRIGY NEOPLÁZIÁBAN.....	49
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	52
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	60
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	62

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACT	anaplasztikus pajzsmirigy karcinóma
APUD	amin precursor uptake and decarboxylation
b-CT	bazális szérum kalcitonin
CEA	karcinoembrionális antigén
FCT	follikuláris pajzsmirigy karcinóma
FMTC	familiáris medulláris pajzsmirigy karcinóma
FPCT	follikulo-papilláris pajzsmirigy karcinóma
Ha- <i>ras</i>	Harvey-ras
HGF	hepatocyte growth factor
HLA	Human Leukocyta Antigén
IgG	immunglobulin G
K- <i>ras</i>	Kirsten-ras
MTC	medulláris pajzsmirigy karcinóma
MET	tirozin kináz receptor
MHC	Major Histocompatibility Complex
N- <i>ras</i>	N-ras
PCR	polymerase chain reaction
PCT	papilláris pajzsmirigy karcinóma
PET	pozitron emissziós tomográfia
RET	tirozin kináz receptor
RIA	radio immuno assay
RR	relatív kockázat
s-CT	stimulált szérum kalcitonin
SSCP	single strand conformational polymorphism
Tg	tireoglobulin
TgAb	tireoglobulin elleni antitest
TNF	tumor nekrosis faktor
TSH	tiroidea stimuláló hormon
TSH-R	tiroidea stimuláló hormon receptor

1. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A pajzsmirigy daganatok etiopatogenetikai kutatása, annak különleges biológiai tulajdonságai miatt rendkívül szerteágazó. A sokszínű, az egész világon folyó újabb tudományos vizsgálatokkal párhuzamosan, több mint húsz éve indítottuk el azokat a kutatásokat, amelyek eredményeit a mellékelt publikációkban összefoglaltuk.

A pajzsmirigy karcinóma molekuláris alapjaival foglalkozó ismeretek gyorsan és folyamatosan növekednek. Az immunszisztéma válaszkészségének megértése azonban még várat magára. Az immunválasz és a pajzsmirigy karcinóma összefüggésének szempontjából értékes, de egyben egymásnak ellentmondó eredmények születtek számos szerző tollából.

Az eredmények és vélemények igen különbözőek az irodalomban. E sok kérdőjelet tartalmazó probléma határozta meg célkitűzéseinket.

Vizsgálni kívántuk :

- 1.) a pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegek HLA antigénjeit azzal a céllal, hogy találunk-e olyan allélt, amely a betegekben szignifikánsan gyakrabban fordul elő, jelezve valamilyen összefüggést a betegség manifesztációjával, a rosszindulatúság

fokával, a metasztázis kiterjedésével, lokalizációjával, vagy az immunszisztéma válaszkészségével.

- 2.) Ugyanilyen szempontokból tanulmányoztuk az IgG nehéz lánc allotípusait (Gm).
- 3.) Megfelelő matematikai analízisek segítségével kívántuk eredményeinket elemezni.
- 4.) HLA tipizálást, bazális/stimulált kalcitonin meghatározásokat, valamint családvizsgálatot végeztünk medulláris karcinómás betegekben és családtagjaikban azzal a céllal, hogy összefüggést keressünk az immungenetikai determináció és a betegség kialakulása és lefolyása között.
- 5.) Kimutatható-e citogenetikai módszerekkel olyan kromoszóma-eltérés, ami általában jellemző a benignus és malignus pajzsmirigy daganatokra?
- 6.) Különböznek-e szövettanilag eltérő pajzsmirigydaganat típusok citogenetikailag?
- 7.) Van-e összefüggés a kromoszóma-eltérések és a betegség progressziója között?
- 8.) Jó-és rosszindulatú humán daganatokban egyaránt megtalálható Ha, N, K *ras* oncogen mutáció a jól differenciált malignus (PTC, FTC, FPTC) és a benignus follikuláris pajzsmirigy tumorokban milyen gyakorisággal fordul elő?
- 9.) Milyen szerepe lehet a *ras* onkogéneknek a pajzsmirigy neopláziák kialakulásában, fenntartásában és progressziójában?

10.) Van-e különbség a földrajzilag távoleső /*Kelet-Magyarország, Newfoundland/Kanada*/ területeken élők benignus és malignus pajzsmirigy daganataiban észlelt *ras* onkogén mutáció gyakoriságában, illetve, hogy milyen környezeti hatások befolyásolhatják a pajzsmirigy neopláziák létrejöttét.

A DE OEC I sz. Sebészeti Klinika endokrin sebészeti munkacsoportja évtizedek óta nagy számban végez pajzsmirigyműtéteket és ezen tevékenysége generációk óta elismert mind a sebészek mind a belgyógyászok körében. Ezt az ismertséget nagytekintélyű vezető sebészek Szeleczky, Balázs, Lukács professzorok és munkatársaik hosszú évek fáradságos munkájával érték el.

A pajzsmirigy műtétek száma Magyarországon 1990 és 2001 között 4000-6000 volt, amelyeknek 4, 2 %-a mutatott malignitást. Ugyanezen időszakban az I sz. Sebészeti Klinikán 238-510/év műtéti számban a malignus tumorok előfordulása átlagosan 8, 2 % volt. A rosszindulatú pajzsmirigy-tumorok csaknem kétszer gyakoribb előfordulása vélhetően a más intézetekből további kezelésre ide irányított betegek nagy számával magyarázható. Ez a helyzet a tradicionális háttérrel együtt, kivételesen nagyszámú, rosszindulatú pajzsmirigy betegségben végzett kutatás alapjául szolgált, valamint lehetőséget kínált a betegség patogenetikájának és kórlefolyásának tanulmányozására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Pajzsmirigy neopláziák epidemiológiai adatai, etiológiája

2.1.1. Differenciált pajzsmirigydaganatok

Az emberi szervezet malignus daganatainak 0,5-1%-át képező rosszindulatú pajzsmirigydaganatok viszonylag ritkán fordulnak elő, noha golyvaendémias országokban az előfordulás incidenciája nagyobb (Sherman és mtsai 1998, Sokal és mtsai 1960, Mustacchi és mtsai 1956, Young és mtsai 1981, Verby és mtsai 1969). Az életkort is figyelembe vevő incidencia arány (Age Adjusted Incidence Rates - AAIR) világszerte kis ingadozással 3 /100000 lakos, vagy 30 /1 millió lakos alatt van. A pajzsmirigy daganatok prognózisa elsősorban azok szövettani típusától, differenciáltsági fokától, a tumor hisztogenezisétől függ. A szöveti felépítés alapvetően meghatározza a követendő sebészi, radiológiai, citosztatikus kezelés módjait is.

A statisztikai mutatók értelmezését nehezítő körülmény az, hogy jelentős különbség mutatkozik a pajzsmirigydaganatok incidenciája és az autopsziás eredmények között. Az utóbbiban, pl. a férfi-nő arány 1:1, szemben a nem autopsziás anyagból nyert adatokkal, ahol ugyanezen érték 0,4-1-ig terjed. A pajzsmirigydaganatos betegek életkorát tekintve két életkori csúcs figyelhető meg: 7 és 20 év között, valamint 40 és 65 év között, de természetesen minden életkorban előfordul. A pajzsmirigydaganatos betegek 25%-ának volt megelőzően golyvája.

Az utóbbi négy évtizedben növekvő pajzsmirigy karcinóma incidencia néhány országban szorosan összefüggött a nyaki régió, nagyrészt gyermekkorban végzett sugárkezelésével (Mempelmann és Furth 1978), ami ráirányította a figyelmet azokra a környezeti tényezőkre, melyek jelentősen növelik a pajzsmirigy karcinóma kialakulásának kockázatát. Duffy és Fitzgerald 1950-ben közöltek először bizonyítékokat arra, hogy csecsemő- és kisgyermekkorban benignus megbetegedés miatt a fej és nyaktájra történt röntgen besugárzást követően pajzsmirigy karcinóma keletkezett. Szerzők keloid, ekcéma, tímus megnagyobbodás, haemangioma, seborrhoea, krónikus tonsillitis irradiációs kezelése után a pajzsmirigyben keletkezett göbökről számolnak be (Balázs és mtsai 1973, De Groot 1973a, Favus és mtsai. 1976, Witt és mtsai 1979, Csáky és mtsai 1981). A vizsgálatok kimutatták hogy két Gy, (200 rad) vagy ennél nagyobb sugárdózissal történt kezelés után a betegek 1/4-ének pajzsmirigyében pajzsmirigy karcinóma fejlődött ki 10 vagy 15 évvel a kezelés után. Ezekben az esetekben az ilyen irradiációt követően szinte kizárólag papilláris típusú karcinóma keletkezett (Refetoff 1975). A hirosimai és nagasakii atomrobbanást követően kimutatták, hogy az ionizáló sugárzás és a kifejlődött pajzsmirigyrák között szoros kapcsolat van, mely a kapott dózissal egyenes arányban növekedik. Parker és mtsai (1974) a Marshall-szigeteki radioaktív szennyeződés hatását vizsgálták és az előbbivel egyező megállapításra jutottak. A terápiás célú és dózissal jód¹³¹ kezelés rákkeltő hatása már közel sem ennyire egyértelmű. Sok ezer radio-jódizotóppal kezelt beteg utánvizsgálata során kiderült, hogy a terápiás dózissal jód¹³¹ nincs oki kapcsolatban a pajzsmirigy karcinóma kialakulásával (McDougall és mtsai.1971, Wiener 1975, Balázs és mtsai.1979, Hoff és Rheinvein 1980).

Az 1920-as éveket megelőzően Európa szárazföldi, kontinentális éghajlatú részein a golyva előfordulása gyakori volt. Az Alpok vidékén (Svájc, Bajorország, Tirol, Salzburg tartományok) az úgynevezett golyva endémiás területein helyenként a lakosság 30%-a szenvedett pajzsmirigy megnagyobbodásban. A kiváltó okként felfedezett és feltételezett jódhány úgy tűnt - a jódozott asztali só adagolásával - megszüntethető, így a golyva endémia és a malignus pajzsmirigy betegségek visszaszoríthatók lesznek. Az utóbbi vonatkozásában azonban a remények szertefoszlottak. Az előbb említett golyvaendémiás területeken a pajzsmirigyben előforduló rosszindulatú daganatok gyakorisága nem csökkent, de nem elhanyagolható tényként bizonyossá vált, hogy a magasan differenciált, s így jó prognózisú karcinómák javára bekövetkezett konverzió javította a betegek túlélését (Harach és Williams 1985).

Az úgynevezett golyvaendémiás, jódhányos vidékeken a follikuláris pajzsmirigy karcinóma gyakoribb, mint a papilláris tumor, ugyanakkor ennek ellenkezője figyelhető meg a jóddal megfelelően ellátott területeken (Mempelmann és Furth 1978). A jódhány megszüntetése Harach és Williams (1995, 1995a) legutóbbi megfigyelése alapján, öt éven belül megfordítja a follikuláris karcinóma túlsúlyát a papilláris tumorok javára. A jódhány a golyvaendémiás területek kialakulásában fő szerepet játszott, de nem tűnt jelentéktelennek a jódhány karcinogén hatása sem. Már 1928-ban megfigyelték, hogy golyvaendémiás területeken tartott patkányokon gyakrabban fordul elő pajzsmirigydaganat (Wegelin 1928, Pendergast és mtsai 1961). Az Amerikai Egyesült Államokban végzett vizsgálatok a pajzsmirigy karcinóma incidenciájában nem találtak különbséget a golyvaendémiás és nem golyvaendémiás vidék között. Úgy találták, hogy a

pajzsmirigyrák miatti halálozás az Egyesült Államokban az utóbbi 50 évben emelkedett, míg az endémiás golyvák száma csökkent. Svájcban az étrendi só jódozása csökkentette a golyvák számát, de a rosszindulatú daganatokét nem. A jódhiány és a pajzsmirigy daganat közötti oki kapcsolatot egyesek támogatták (Silink 1966, Beregi és mtsai 1967, Ramalingsawami 1969), míg mások, (Fuchsig és Keminger 1967, Winship 1967, Riccabona 1972) nem. Utóbbiak ezen összefüggést tanulmányaikban nem tartották valószínűnek. Williams (1977) a különböző szövettani típusú pajzsmirigy karcinómát hasonlította össze egy jódban gazdag (Izland) és egy átlagos jódellátottságú (Észak-Skócia) populáció között. Megállapította, hogy ha a táplálkozásban magas a jódfelvétel papilláris, ha alacsony folliculáris típusú rákok alakulnak ki. Izlandon a differenciált karcinómák száma egyébként háromszorosa volt annak, mint Észak-Skóciában, míg Japánban, pl. kizárólag papilláris típusú rákok fordulnak elő. Mindezek okán természetesen a pajzsmirigy göbök rosszindulatúságát tárgyalva a földrajzi és etnikai különbségeket nem lehet figyelmen kívül hagyni.

2.1.2. Medulláris pajzsmirigy karcinóma (MTC)

A szolid pajzsmirigy daganatok egy részéről Hazard (1959) óta tudjuk, hogy szokatlanul kedvező klinikai lefolyásukat egészen egyedi tulajdonságuknak egy speciális proteint termelő képességüknek, a kalcitoninnak köszönhetik. Ezek a tumorok, melyek az összes pajzsmirigy karcinóma mintegy 8-10%-át foglalják magukba és parafolliculáris C sejtekből épülnek fel, a vérbe jelentős mennyiségű kalcitonint választanak ki és ultimobranchiális eredetűek (Williams 1966,1966a). A neurális lécből fejlődő C sejtek az APUD szisztéma tulajdonságait mutatják (Le

Douarin 1970, Pearse 1971, Polak és mtsai 1974). A parafollikuláris sejtek száma és elhelyezkedése igen változatos. Nagyrészt a pajzsmirigyben fordulnak elő, esetenként azonban a mellékpajzsmirigyben, ritkábban a tímusban találjuk őket. A sejtek közös tulajdonsága a kalcitonin szekretáló képesség, amely lehetővé teszi a tirokalcitonin kimutatását a vérből. Ez a marker rendkívül megkönnyíti a medulláris karcinómasejtek kimutatását, helyezkedjenek el bárhol is a szervezetben.

A C sejtek által szekretált kalcitonin 32 aminosavból felépülő polypeptid (Foster 1964), amelynek immunreaktív formái (4-7-ig) különböznek egymástól molekulásúly, immunológiai jellegzetességek, biológiai aktivitás tekintetében (Dermody és mtsai 1981, Tobler és mtsai 1982). A nem endokrin tumorok mintegy 1/5-ében lehet kimutatni emelkedett szérumban kalcitonin szintet. A daganatsejtek típusát tekintve 8%-ban tüdő, 24%-ban colon karcinoma, 38%-ban emlő, és 42 %-ban pancreas karcinómában észlelhető emelkedett szérumban kalcitonin szint.

A daganatot alkotó C sejtek a kalcium homeostasisban normálisan is szerepet játszó kalcitonint (CT) termelik patológiás - emiatt jól detektálható - mennyiségben. A kalcitonin mellett számos peptid és amin (ACTH, szomatostatin, substantia-P, neurotensin, béta-endorfin, szerotonin, gasztrin, vasoaktiv intesztinális polipeptid, karcinoembrionális antigén) termelését mutatták ki a MTC sejtjeiben (Holm és mtsai 1985). A parafollikuláris sejtek biológiai sajátosságai és elektronmikroszkópos képe, valamint a termelt hormonok természetét alapján valójában sokkal inkább az APUD (Amin and Precursor Uptake and Decarboxylation) rendszer rosszindulatú burjánzásáról beszélhetünk MTC esetén, mint a pajzsmirigy meglehetősen ritka daganatáról (Pearse 1966, 1966a). Ma inkább összefoglaló néven neuroendokrin

daganatoknak nevezzük őket s különös természetük miatt továbbra is igen intenzíven kutatott téma.

Az MTC diagnosztikájában és a betegség klinikai követése során az 1970-es években bevezetett és klasszikus tumormarkerként alkalmazott calcitonin (CT) meghatározás ma is az egyik leghasznosabb, leggyakrabban használt, specifikus, szenzitív módszer (Bussolati és Pearse 1967, Deftos 1973, Deftos és mtsai 1980, Telenius-Berg 1976, Heizmann és mtsai 2005).

A CT meghatározás érzékenysége provokációs tesztekkel (pentagastrin és kalcium stimulációval) tovább növelhető, amelynek értékét az adja, hogy egyéb vizsgálatokkal nem megközelíthető, igen kicsiny mennyiségű tumorszövet kimutatására is alkalmas, valamint az okkult tumorként, vagy prekancerózisként felfogható, C sejt hiperpláziás esetek felfedezését is biztosíthatja.

A bazális és a stimulált szérum calcitonin szint mérése így a családi halmozódású familiáris típusú medulláris karcinóma diagnózisának, posztoperatív utánkövetésének, a recidivák korai felfedezésének egyik legfontosabb eszközévé vált.

A pajzsmirigy rosszindulatú daganatainak 8-10%-a medulláris rák, amely sporadikusan vagy familiárisan (autoszomális domináns öröklődéssel) fordul elő. A két típus hisztológiailag vagy biokémiaailag nem különíthető el egymástól, viszont molekuláris genetikai vizsgálattal az öröklött változat a 634 codon (exon 11) illetve 609, 611, 618, 620 codon (exon 10) mutációja révén nagy valószínűséggel igazolható (Hofstra és mtsai 1994, Mulligan és mtsai 1994, Santoro és mtsai 1995).

A familiáris típusú medulláris karcinóma (FMTC) a 2. típusú multiplex endokrin neoplázia (MEN 2a) részjelensége lehet, vagy attól függetlenül jelenik meg. MEN 2a-ban feokromocitóma és /vagy paratiroidea adenóma, MEN 2b-ben, pedig

feokromocitóma, mukózális neurinóma, autonóm ganglion neuromatosis, Marfanoid-alkat fordul elő medulláris pajzsmirigyrákkal (Duncan 1980, 1980a, Wells és mtsai 1985).

Az autoszómális domináns öröklődés miatt a familiáris típusban egyenlő nemi megoszlás van, míg a sporadikus formára női túlsúly a jellemző. Irodalmi adatok szerint az átlagos életkor a sporadikus formában 40 és 60 év között van, a familiáris típusban ez a szám a fiatalabb kor felé tolódik el (Duncan 1980). Az MTC etiológiája sokáig általánosságban ismeretlen volt, kialakulásában fontos szerepet tulajdonítottak a pajzsmirigyet ért előzetes röntgen besugárzásnak, illetve genetikai faktoroknak, vagy meghatározott környezeti tényezőknek (Perkel és mtsai 1988). Az utóbbi megállapítás elméleti alapjait azonban csak 1993-ban teremtették meg azok a kutatások, melyek a 10. és 11. kromoszóma megfelelő régiójában bekövetkezett gén mutációkat tették felelőssé a betegség kialakulásáért (Hofstra és mtsai 1984, Mulligan és mtsai 1994, Santoro és mtsai 1995). A klinikailag is nyilvánvalóan genetikai hátterű medulláris pajzsmirigy karcinómák (MEN2a, MEN2b, ill. nem MEN típusú FMTC) patomechanizmusában, kialakulásában mára bizonyíthatóvá vált a 10. kromoszómán lokalizálódó ret-protonkogén mutációja.

A medulláris pajzsmirigy karcinómák egy részében 5-34%-ig (familiáris forma) autoszómális domináns öröklődést mutattak ki. Bergholm és mtsai (1990) a Svéd Nemzeti Regiszterben bejelentett 6513 pajzsmirigy karcinóma között 22%, míg Böttger Németországban (1991) hasonló felmérés kapcsán 34% familiáris formát talált. Mindezen adatok a genetikai predispozíció és a betegség keletkezése közötti szoros kapcsolat mellett szólnak, de jelentős szerepet tulajdonítanak emellett a környezeti hatásoknak is. Valószínű, hogy a ret fehérje egy membránhoz kötött,

hormonaktivált tirozinkináz. Egyelőre azonban nem ismert, hogy a mutáció ebben az esetben miért onkogén hatású.

2.2. Az MHC genetikai szervezettsége

A HLA antigének sejt felszíni strukturák, melyek kódoló génszakaszai emberben a 6. kromoszóma rövid karján helyezkednek el. Genetikailag az MHC-t régiókba lehet sorolni. Az MHC régió a komplexnek egy olyan része, amely genetikailag „crossing over”-el elhatárolható és legalább egy marker lókuszból áll.

Az I. osztályba tartoznak a HLA-A, HLA-B, HLA-C lókuszek. Ezen osztály antigénjei minden membránon megtalálhatók a korai embrionális sejteken és néhány malignus sejt membránján is. Az MHC II. osztályt a HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP génrégiók kódolják. A II. osztálybeli antigének megtalálhatók a B sejteken, aktivált T limfocitákon, monocitákon, makrofágokon, dendrikus sejteken, korai hemopoetikus endotél sejteken és néhány daganatsejten. A III. osztályba tartoznak a C2, Bf, C4A, C4B komplement fehérjék termelődésért felelős gének, a hősokk protein, valamint egy steroid enzimet (21-hidroxiláz) és egy citokint (tumor nekrozis faktor) kódoló gén.

2.3. A fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) és a betegségek összefüggése

Közel 30 éve annak, hogy Amiel (1967) elsőként közölte azt, hogy azok az egyének, akik HLA (Humán Leukocita Antigén)-B5, B35 vagy B18 antigénnel rendelkeznek gyakrabban betegszenek meg Hodgkin-kórban, mint azok, akik ezen antigénnel nem rendelkeznek. Ez és más kutatások eredményei vezettek a HLA és a

betegségek kapcsolatának kutatásához. A vizsgált betegségek száma ma már meghaladja az 500-at (Thorsby 1997). Ezen eredmények többségét széles körben nem erősítették meg. Egyes betegségekben azonban a HLA asszociáció olyan erős, hogy a minden kétséget kizáró a kapcsolat egy vagy több génkomplex szintjén résztvesz a betegség patogenezisében.

A fő kérdés az, hogy melyik HLA komplex gén érintett elsődlegesen. Ezek közül melyek a peptid prezentáló HLA molekulák a HLA komplex több, mint 200 génjéből. Mintegy 130 körül van azon funkcionális gének száma melyeknek immunfunkciójuk van.

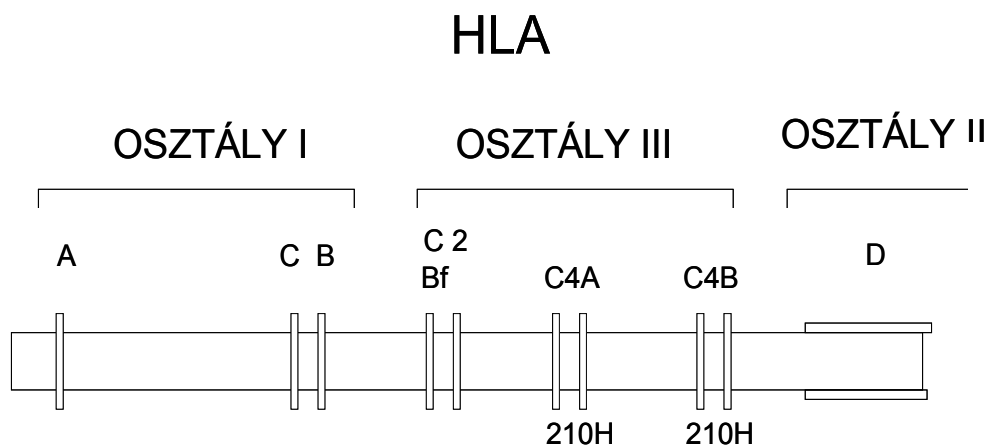
A fő problémát az erős linkage disequilibrium (nem várt kapcsoltsági gyakoriság), vagy non-random asszociáció okozza, illetve a HLA komplexben található gén(ek), amelyekről nem tudjuk, hogy részt vesznek-e elsődlegesen a folyamatokban (Thorsby 1970). A nemzetközi kollaboráció elengedhetetlen annak a kérdésnek a megközelítéséhez, hogy a HLA gének linkage disequilibriumai milyen folyamat során jöttek létre és miért változnak bizonyos népcsoportok és etnikai csoportok között. E kérdések vizsgálata különböző populációkban megkönnyíti a HLA gén(ek) megismerését, azok érintettségét a különböző betegségekben, pl. narcolepsia, Bechterew-kór.

Köztudott, hogy az MHC (Main Histocompatibility Complex)-hez tartozó gének összessége a biológia legpolimorfabb rendszere, melyhez tartozó génállomány képes a saját és a szervezet számára idegen fehérjékből származó peptideket megragadni és prezentálni. Így alapvető szerepet játszanak az antigén felismerésében és az immunrendszer specifikus sejtközvetített és humorális reakcióinak megindításában.

A HLA rendszer bonyolultsága egyrészt olyan különböző gének jelenlétéből adódik, amelyek hasonló molekulaféleségeket kódolnak, szoros kapcsolatban vannak és feltehetően génduplikáció eredményei. A bonyolultság másrészt abból a nagy polimorfizmusból adódik, hogy minden lókusznak több allélja van, melyek kodominánsak. A komplexitás harmadik szintje az első kettő kombinációja, a várttól eltérő kapcsoltsági gyakoriság, amely nagymértékben köti az egyik lókuszt bizonyos alléljaihoz a másik lókuszt bizonyos alléljaihoz.

1. ábra

A 6. kromoszóma rövid karja



A HLA antigének és egyes betegségek közötti összefüggést elsősorban statisztikai úton sikerült megtalálni. Vannak olyan betegségek, melyek családi halmozódást mutatnak és jóllehet az öröklődés nem követi a Mendel szabályt, mégis kapcsolódnak genetikai markerekhez, beleértve a HLA antigéneket is. Ez azt jelenti, hogy a betegek bizonyos allélokat egy adott genetikai rendszeren belül gyakrabban hordoznak, mint a nem betegek.

A legtöbb HLA kapcsolatot mutató betegség nem halálos kimenetelű a reprodukív életkor elérése előtt. Bizonyos asszociációkat ki lehet mutatni fertőző betegségekkel is (typhus, malária, lepra).

2.4. A HLA és a betegségek összefüggéseinek kutatásában alkalmazott számítási módszerek

A HLA és betegségek összefüggésének kutatásában számos, elengedhetetlen genetikai és matematikai módszert, statisztikai számítást kell alkalmazni. Fontos a nagyszámú, azonos etnikai csoporthoz tartozó, azonos diagnózisú beteg tipizálása, az egészséges kontroll, mint összehasonlítási alap és a megfelelő statisztikai analízis(ek). Kevés olyan betegséget tudunk felsorakoztatni, ahol a HLA asszociáció olyan erős, hogy az illető antigén jelenlétéből diagnosztikus következtetést lehetne levonni. Példának hozzuk fel az "asszociációk királynőjét", a Bechterew-kórt (spondylitis ankylopoetica). Közismert, hogy e betegek körében kb. 90 %-ban fordul elő a HLA-B27 antigén, míg az egészséges kontrollban csupán 8 %-ban. Ez a különbség kétségtelenül erősen szignifikáns. Mégis ismert, hogy a Bechterew-kórban szenvedők 10 %-ából hiányzik a B27 allél és a B27 pozitív egyének közül is csupán 2 % az, aki Bechterew kórban szenved (Van der Linden 1984).

A molekuláris genetikai módszerek bevezetése az MHC polimorfizmusának vizsgálatában nagy lépéssel vitte előre az ilyen irányú kutatásokat és rávilágított a rendszer biológiai és klinikai jelentőségére is.

A HLA tipizálás korszerű módszere a polimeráz láncreakcióval (PCR) végzett genotípus meghatározás, amely akár egyetlen aminosavcsere kimutatására is

alkalmas. Ezen módszer segítségével, a szerológiai eljárással azonosítható allotípusoknál lényegesen több allél, szubtípus mutatható ki az emberi populációban. A nagy felbontó képességű DNS vizsgálatokkal meghatározhatók a lókuszok olyan allotípus sajátosságai is, amelyek egyes betegségek, vagy betegség csoportok megjelenési formáival állnak kapcsolatban (Thorsby 1997).

2.5. A daganatok genetikai hátteréről

A malignus transzformáció lényege a kiindulásul szolgáló sejt genetikai megváltozása. Ez a változás bekövetkezhet kromoszómaszinten (kromoszóma átrendeződések, többletek, hiányok), vagy molekuláris szinten (génmutáció, deléción, tumor promóter beépülése stb). Mind a kromoszóma eltérések, mind a génszintű elváltozások a sejtproliferációt és differenciációt, a sejciklust és a az apoptózist szabályozó, vagy a DNS replikációban szerepet játszó gének károsítása révén vezetnek a sejt malignus transzformációjához, kontrollálatlan proliferációhoz.

A felelős gének két legfontosabb csoportját a protoonkogének- onkogének és a tumorszupresszor gének (antionkogének) képviselik

Az onkogének dominánsan ható gének, melyek az embrionális életben aktívak, posztnatálisan nyugalomban vannak. Aktiválódásuk kromoszómaaberrációk, pontmutációk, rivális tumorpromóterek beépülése révén következnek be.

2.6. Pajzsmirigy neopláziák citogenetikai vizsgálatai

A tumor citogenetika részben a sávtechnika alkalmazásának köszönhetően számos adatot szolgáltatott azokról a kromoszóma-változásokról, amelyek a hemopoetikus és a szolid tumorokban megjelennek.

A daganatspecifikus ún. primer kromoszóma-eltérések már a betegség kezdetén kimutathatók, jellemzőek az érintett sejttípusra, vagy a kiváltó tényezőre. E primer aberrációkhoz a betegség progressziója során újabb úgynevezett másodlagos kromoszóma-aberrációk társulnak.

A specifikus kromoszóma-eltérések tanulmányozása ahhoz a megfigyeléshez vezetett, hogy a kromoszóma-eltérések szelektív, proliferatív előnyt biztosítanak azoknak a sejteknek, amelyekben megjelennek, és ezáltal fontos szerepet játszanak a malignus folyamat kialakulásában.

Az aberrációt hordozó sejteknek szelektív proliferatív előnyt biztosító molekuláris mechanizmus a korszerű molekuláris genetikai módszerekkel vált megismerhetővé. Nyilvánvalóvá vált, hogy a celluláris onkogének aktiválódása fokozott vagy kórosan megváltozott expressziója a malignus transzformáció kulcs lépése. A kromoszóma abnormalitás, feltehetően ezzel a lépéssel van összefüggésben, akár a géndózis megváltozása, akár azáltal, hogy gén-átrendeződés révén az addig nyugalomban lévő protoonkogének aktív gének transzkripcióját kontrollja alá kerülnek (Oláh és mtsai 1989). A Yunis (1981) által bevezetett nagy feloldású sávtechnika a megkülönböztethető kromoszóma sávok számát négyszeresére növelte és ez lehetővé tette a hagyományos technikával fel nem ismerhető kromoszóma elváltozások kimutatását, ill. a változásban érintett

kromoszómális töréspontok pontos meghatározását. A szolid tumorok megbízható vizsgálatát a tápláló fibroblaszt layerek alkalmazása és a növekedési faktorok elérhetősége tette lehetővé.

A legtöbbet tanulmányozott szolid tumor a retinoblasztóma, ahol a 13-as kromoszóma q14-es régiójának középső része (Benedict és mtsai 1983) szenved deléció. A Wilms-tumor és a retinoblastoma konstitucionális, hereditér formáiban a deléció minden szomatikus sejtben megfigyelhető, míg a gyakori sporadikus formában csak magában a tumorsejtekben mutatható ki (Cory 1986, Slater és mtsai 1982, Yunis és mtsai 1983). Itt egy kis szegmens következetes hiánya, a retinoblastoma és Wilms-tumor konstitucionális, hereditér és sporadikus formáiban egyaránt az elvesztett DNS szekvenciák és a tumor kialakulása közötti szoros összefüggésre utal.

A fentiekhez hasonlóan citogenetikai technikával és úgynevezett restrictio fragment-hossz polymorfizmus (RFLP) segítségével különböző epiteliális tumorokban, kissejtes tüdőrákban (Whang-Peng 1982), hólyag (Fearon és mtsai 1985) és vastagbél rákban (Feinberg 1988) szenvedő betegek fehérvérsejtjeiben a felelős gén egyik alléljának delécióját találták (heterozigóta állapot), míg magukban a tumorsejtekben mindkét allél hiányzott, vagy károsodott. /heterozigótaság elvesztése: Loss of heterozygosity. (LOH)/. Ma már bizonyított, hogy ez a génesztés a legáltalánosabb genetikai esemény a szolid tumorok létrejöttében.

A pajzsmirigy magasan differenciált epiteliális daganataiban, follikuláris és papilláris karcinómákban, illetve benignus pajzsmirigy betegségekben, így pl. follikuláris adenómákban kevés citogenetikai vizsgálatról tudunk. Ennek okát a technikai nehézségeken kívül, vélhetően a differenciált pajzsmirigyrákok és a

benignus adenómák lassú növekedési potenciáljával, valamint a hosszú távú, humán pajzsmirigydaganat sejtvonalak életben tartásának nehézségeiben látják. Follikuláris adenóma citogenetikai vizsgálatáról csupán két munkacsoport (Bondeson és mtsai 1989 és Bartnitzke és mtsai 1989) közleményében olvashatunk, amikor is az előző munkacsoport 9 follikuláris adenóma közül kettőben, utóbbi 8 adenómából egyben igazolt kariotípus eltérést. Egy újabb t/7; 10/ transzlokációs esetről Antonini és mtsai (1989) számoltak be.

2.7. Pajzsmirigy neopláziák molekuláris genetikai vizsgálatai.

Az orvostudomány minden területén éreztetik hatásukat a molekuláris biológia újabb és újabb felfedezései az egyes szub-diszciplínákban természetesen más és más súllyal. Elsősorban haematológusok, onkológusok, immunológusok azok, akik klinikai gyakorlatukban ma már egyre gyakrabban alkalmazzák a citogenetika és a molekuláris genetika kutatási eredményeit. Klinikai szempontból a molekuláris biológiai módszerek különböző célokat szolgálhatnak. Így 1. segíthetik, megerősíthetik, kiegészíthetik a morfológiai diagnózist, 2. bizonyos esetekben jellemzik a prognózist és 3. lehetővé teszik a minimális reziduális betegség kimutatását. A 80-as évek végén indított monstre program, a Human Genome Project – amely a teljes emberi genom föltérképezését tűzte ki célul és 13 évig tartott – 2003-ban befejeződött

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml.

Bovery 1929-ben közölt megfigyelései óta egyre gyarapodnak a bizonyítékok, melyek szerint az emberben előforduló malignus daganatok keletkezését a sejtek genetikai

károsodása idézi elő. Különböző öröklődő és nem öröklődő betegségekben mintegy 80-90 %-ban mutatható ki kromoszóma aberráció. E téma a ma onkológiai kutatásának egyik legintenzívebben vizsgált legizgalmasabb területe.

A genetikai hibák érinthetnek proto-onkogéneket, tumorszupresszor géneket, illetve kapcsolatosak lehetnek vírus infekciókkal. A transzlokációk és strukturális hibák a proto-onkogének aktivációját eredményezhetik, azaz olyan működő onkogéneket produkálnak melyek a sejtnövekedés és -proliferáció valamely lépését serkentik. A tumorszupresszor génműködés hiánya viszont ezzel szemben a sejtnövekedés és a sejtszaporodás fiziológiás gátlásának elmaradását eredményezi. A tumorszupresszor gének mindkét alléljának inaktivációjára szükség van ahhoz, hogy működésük kiesése malignus transzformációhoz vezessen. A patogenetikai háttér leggyakrabban az egyik allél deléciója egyidőben a másik mutációjával. A vírusok szerepe még nem teljesen tisztázott, de ma már általánosan elismert, hogy bizonyos betegségek (limfómák) patogenezisében a vírusok alapvető szerepet játszanak (EBV, HTLV-1, HHV-8).

Az onkogének a géntermékek funkciói szerint lehetnek: (1) a proliferációt elősegítő és/vagy a sejtpusztulást gátló gének hibái, (2) a proliferációt gátló és/vagy a sejtpusztulást elősegítő gének hibái. Látszólag ellentmondásos, hogy ugyanaz a tényező sejtípusonként ellentétes hatást válthat ki, és az aktuálisan jelenlévő egyéb tényezőktől függően ugyanabban a sejtípusban is előfordulhat. Az átfedésektől eltekintve általánosságban elmondhatjuk, hogy az első csoportba az onkogének, a másodikba pedig a szupresszor gének sorolhatók.

Az onkogének száma 100 körül van. Megismerésük a vírusokban kezdődött, majd a humán daganatokban folytatódott, illetve később kiderült: hibátlan változataik

normál sejtekben is előfordulnak, őket protoonkogéneknek nevezzük. A protoonkogének hibái között leggyakrabban mutációk, transzlokációk, amplifikációk, vagy inzerciók fordulnak elő. A hibás gén domináns, míg a legtöbb szupresszor gén recesszív génként viselkedik. A protoonkogén funkciója szerint növekedési faktor, növekedési faktor receptor, szerin-treonin és tirozin kináz, G-fehérje, transzkripció faktor lehet.

A G-fehérjék (guanin nukleotid kötő) membránhoz kapcsolódó molekulák, amelyek legfontosabb képviselője a több mint 20 tagból álló ras család, amely az igen fontos jelátviteli mechanizmusban játszik kiemelkedő szerepet. Legismertebb a Ha-ras(Harvey), Ki-ras(Kirsten) és az N-ras, melyek mutációi, illetve amplifikációi igen sok tumorban megtalálhatók. A ras fehérje amplifikáció miatti túltermelődése, vagy a ras ismert kodonokban (12, 13, 59, 61) bekövetkező mutációja köztes biokémiai folyamat végén a sejt genomja felé folyamatosan proliferációra serkentő jeleket küld. A ras gének hibáit igen sok benignus és malignus tumorban, de normál szövetekben, egészséges egyéneknél is kimutatták, ami arra utal, hogy a daganat kialakulásában további, genetikai, környezeti faktorok közreműködése szükséges. A G-fehérjék egyéb típusai jelenlegi ismereteink szerint nem játszanak lényeges szerepet a daganatok képződésében.

A génhibák lehetnek veleszületettek vagy szerzettek. A génhibák okozói azok a fizikai, kémiai, biológiai daganatkeltők lehetnek, amelyeket összefoglalóan karcinogéneknek, mutagéneknek nevezünk. Szükséges különbséget tenni a főleg gyermekkorban megjelenő betegségeket okozó, a csirasejtek károsodása nyomán létrejött öröklött génhibák és az endogén, exogén környezeti tényezők hatására bekövetkező úgynevezett szomatikus génhibák között. Az előbbi esetben, a

csirasejtben kimutatható génhiba következményesen megjelenik a szomatikus sejtekben is, míg az utóbbiban csupán a tumorsejtek hordozzák a károsodott genetikai állományt. A hibás gének jellegét tekintve arra kell felhívni a figyelmet, hogy az öröklődő daganatok csirasejtjeiben meglévő hibák esetén csak kivételesen találunk onkogéneket. A kivétel éppen az MEN 2a, amely autoszomális dominanciát, inkomplett penetranciát, változó expresszivitást mutat. A génhiba úgy tűnik bizonyíthatóan a 10-es kromoszómán van és a ret onkogént teszik felelőssé a MEN 2a kialakulásáért. Valószínű, hogy a ret fehérjéje membránhoz kötött, hormonaktivált tirozinkináz. Egyelőre azonban nem ismert, hogy a mutáció ebben az esetben miért onkogén hatású.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. HLA tipizált betegek

Pajzsmirigydagánatos betegekben végzett első saját vizsgálatainkban (Juhász és mtsai 1986) a HLA tipizáláshoz szerológiai módszert használva 52 hámeredetű pajzsmirigy rákban szenvedő beteget vizsgáltunk, akik az I sz. Sebészeti Klinikán kerültek műtétre. Ebben a csoportban 43 nő és 9 férfi volt, a követési idő 6 hónap és 13 év között változott (közéérték 4, 73 \pm SD 4, 46 év). 12 betegben a klinikai tünetek, a képalkotó vizsgálatok (CT, MR, pajzsmirigy MIBI, I¹³¹ teljes test izotóp vizsgálat), az aspirációs finomtű biopszia bizonyították a regionális vagy távoli áttéteket. A hisztológiai vizsgálatok egységes megítéléséhez az eredeti szövettani blokkok revízióját a DEOEC Patológiai Intézetének a pajzsmirigy hisztológiában nagy gyakorlattal rendelkező és a közleményben szereplő betegek adatait nem ismerő munkatársa végezte el.

16 beteg papilláris, 16 follikuláris, 18 follikulo-papilláris, kettő anaplasztikus karcinómában szenvedett. Mind az 52 beteget 58 HLA A,B,C és DR antigénre tipizáltuk. A betegek fenotípus megoszlását 380 egészséges kontrollal hasonlítottuk össze, akik HLA A,B,C antigénekre, illetve közülük 160-an DR allélekre is tipizálva voltak. A HLA antigének kimutatására a nemzetközi standard limfocita citotoxicitási mikromódszert alkalmaztuk (Terasaki, McLelland 1964).

Ebből a betegcsoportból 50 egyént IgG nehéz-lánc Gm allotípusokra is tipizáltunk. A szérumok Gm azonosítására a hemagglutinációs inhibíciós tesztet

használtuk (van Loghem 1973). Alkalmazott reagenseinkkel 13 fenotípust tudtunk kimutatni. Eredményeinket 228 egészséges egyén adataival hasonlítottuk össze.

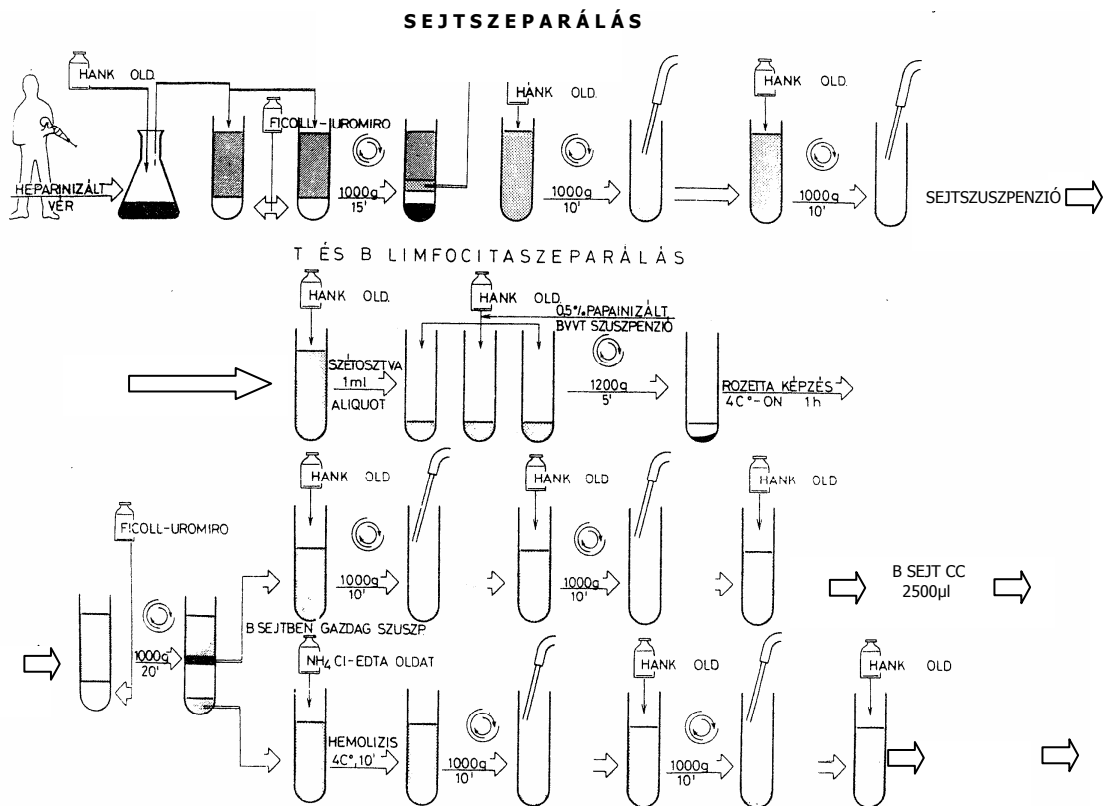
3.2. HLA antigének tipizálásához használt módszerek

3.2.1. Szerológiai módszer:

a) Limfocita szuszpenzió készítésére Böyum (1986) módszerét használtuk. A DR antigének tipizálásához B sejtekből álló, legalább 75-95%-os tisztaságú szuszpenzió szükséges. Az általunk használt eljárást a 2. ábrában foglaltuk össze, ílymódon egyszerűsítve a bonyolult szeparálás leírását.

2. ábra

A sejtseparálás folyamatábrája



b) Limfocita citotoxicitási teszt elve: a savóban lévő citotoxikus ellenanyag komplement jelenlétében károsítja a sejtszuszpenzióban lévő limfocitákat. Az antigén-antitest reakció következtében a sejthártya károsodik, permeabilitása fokozódik az eozin-Y (vagy tripánkék) festék számára – amely az ép sejtbe nem tud behatolni – átjárhatóvá válik, a sejt megfestődik. Elektronmikroszkóppal a sejt nagymérvű megduzzadása, a riboszómák eltűnése, a mitokondriumok fragmentációja is megfigyelhető a sejtek pusztulásának jeleként.

c) A teszt kivitelezése: a vizsgálatokat Terasaki tálcában végeztük paraffin olaj alatt, amely a kis mennyiségek kiszáradásának meggátlására szolgál. Egy mikroliter antitest tartalmú savóhoz 1 mikroliter megfelelő sejtszámú ($2500/\text{mm}^3$) limfocita szuszpenziót fecskendezünk mikropipettával. Az elegyet szobahőmérsékleten 30 percig (DR antigén kimutatásához 60 percig) inkubáljuk, majd 5 mikroliter nyúl komplementet adunk hozzá és 60 percig (DR antigén esetében 120 percig) inkubáljuk. A leülepedett sejtszuszpenzió felett lévő folyadékot leszívjuk és helyébe eozin-Y festékoldatot teszünk. 15 percig festjük a sejteket szobahőmérsékleten. A felülúszót újra leszívjuk és helyébe Hank oldatot pipettázunk. A Terasaki tálcát fáziskontraszt inverz mikroszkóp alá tesszük és a károsodott, azaz megfestett sejtek arányától függően jelöljük a pozitivitás mértékét. A kontrollok használata nagyon fontos a reakció értékelésében. Ezért minden alkalommal a tálcákba negatív és pozitív kontrollokat is elhelyezünk. A

tipizálást minden esetben két tálcában párhuzamosan végeztük, így két adatból értékeltük a végeredményt.

Ezt a módszert ma is az egész világon minden HLA tipizáló laboratórium kötelezően alkalmazza a HLA antigének szerológiai tipizálására. Ezek a vizsgálatok alapul szolgálnak a szerv és szövet cserék, valamint a nemzetközi őssejt bankok működtetéséhez.

3.2.2. HLA DR antigén tipizálás DNS szinten.

2002-től vizsgálatainkat a HLA DR allélek DNS alapú tipizálásával egészítettük ki (OLERUP-SSP). Ez egyben a korábbi szerológiai specifikítások részletesebb felbontását is megengedte.

Ebbe a vizsgálati sorozatba 75 eddig HLA-ra nem tipizált 1990 után operált pajzsmirigy karcinómás beteg tartozott, 65 férfi és 10 nő. Az átlagéletkor a diagnózis felállításának időpontjában 40-53 év volt. A követési idő 1-30 az átlag 8,6 év volt. Húsz beteg tumor mérete nem haladta meg az egy cm-t. A limfocitás infiltráció mértékét figyelembe véve enyhe, átlagos, súlyos csoportba soroltuk a betegeket. A DR antigének előfordulási gyakoriságát 170 egészséges véradó adataival hasonlítottuk össze.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A HLA antigének jórészt egyetlen aminosavban térnek el egymástól a polipeptid láncon. Ezeket a szekvenciákat szerológiailag azonosítani szinte lehetetlen, azonban DNS szinten, szintetikus oligonukleotidok segítségével identifikálhatók a

nagyszámú HLA allélok. A PCR egy különösen érzékeny módszer, mellyel a legkisebb mennyiségű DNS is megsokszorozható. A PCR-SSP módszer specifikus primereket használ az amplifikáció során. A primer szekvenciák csak a teljesen azonos DNS mintában lévő target szekvenciához képesek kötődni és a reakció során amplifikálódni. A nem komplementer primerek nem kötődnek a DNS-hez és nem történik amplifikáció.

A tipizálások a BIOTEST HLA SSP Kit használatával történtek. DNS szeparáláshoz és tisztításhoz „Generation Capture Column kit”-et használtunk (Genra System Inc). A kit tartalmazza a DNS tisztító oldatot, a DNS eluciós puffert, illetve a DNS szeparáló oszlopot.

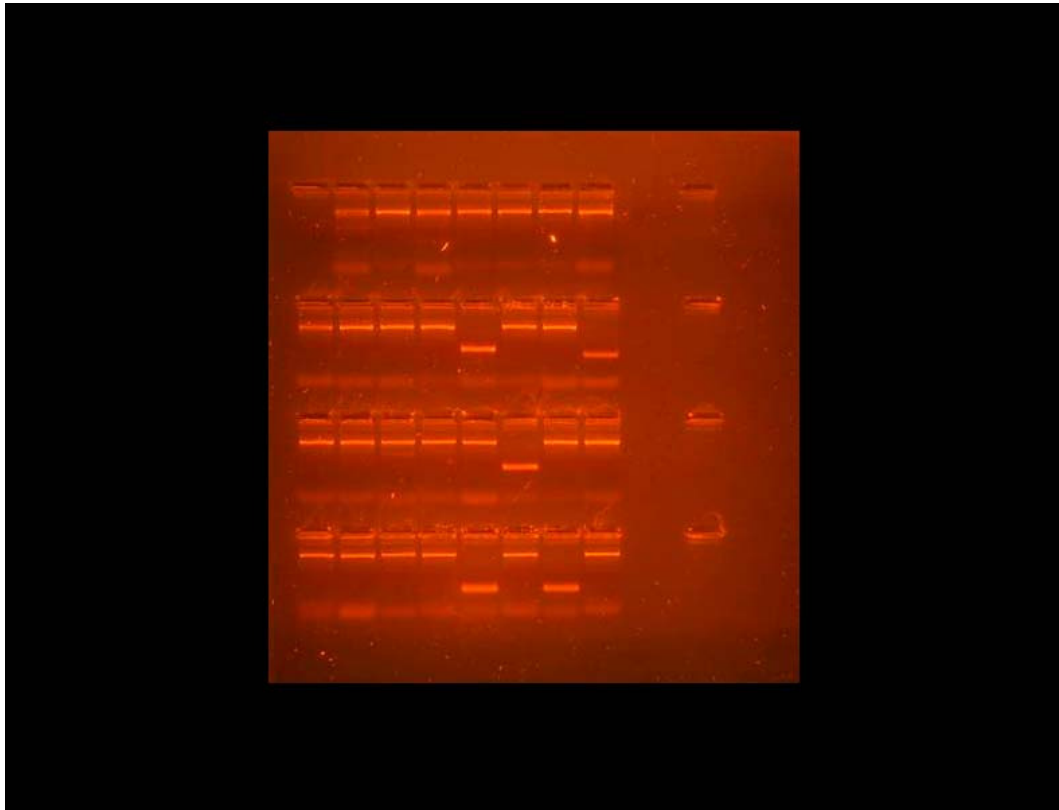
A DNS magas sókoncentráció mellett szelektíven kötődik az oszlopra. A mosás lépései után alacsony sókoncentrációjú pufferrel, melegen eluálható. A DNS szeparálás limfocita szuszpenzióból történt.

A módszer kivitelezése: a megfelelő primereket elegyítjük a szeparált DNS-el, majd thermocyclerbe helyezzük és elindítjuk a PCR reakciót. A PCR termékeket agaróz gélen futtatva UV lámpa alatt azonosítjuk.

A gélelektroforézis elve: a töltéssel rendelkező részecskék elektromos térben töltésüknek megfelelő irányba mozognak. A DNS neutrális pH mellett negatív töltésű és az anód felé mozog. A kettős szálú DNS az elektromos térben orientálódik és a méretének logaritmusával fordított arányban lévő sebességgel vándorol, azaz a nagyobb DNS fragmentumok lassabban, a kisebbek gyorsabban mozognak a gélben. Pozitívnak fogadjuk el az eredményeket, ha van specifikus csík a gélen (3. ábra).

3. ábra

HLA DR tipizálás gélelektroforetikus képe



3.3. Alkalmazott számítási módszerek

3.3.1. Szignifikancia teszt

Egy bizonyos HLA antigén gyakoribb előfordulása a vizsgált betegek között nem feltétlenül jelent általános és lényeges összefüggést a betegséggel. Ezt a kérdést csak a chi-négyzet próba Woolf (1955) módszerének segítségével lehet eldönteni, melynek első lépése a 2X2 kontingencia táblázat használata.

Szignifikancia számítás

Vizsgált csoport	az antigénnel		összesen
	rendelkező	nem rendelkező	
	egyének száma		
betegek	a	b	a + b
kontroll	c	d	c + d
összesen	a + c	b + d	n = a + b + c + d

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 n}{(a + c)(b + d)(a + b)(c + d)}$$

3.3.2. Relatív rizikó (RR)

Relatív rizikó (RR) az a szám, amely megmutatja, hogy hányszor gyakrabban fordul elő a betegség az illető antigént hordozók körében, mint ezen antigénnel nem rendelkezőkben. Az előbbi tábla jelölését véve alapul

$$RR = \frac{ad}{bd}$$

A diszkriminációs funkciók analízist (Mclachlan 2004, 2005) az SPSS PC szoftver segítségével végeztük. A számítógépes analízishez a HLA DR típuson kívül az alábbi kritériumokat adtuk meg : életkor, nem, tumor szövettani klasszifikációja,

HLA-DR típus, limfocitás infiltráció mértéke, regionális és távoli áttétek, valamint a tumor méret.

3.4. HLA tipizálás, kalcitonin meghatározás, családvizsgálatok medulláris pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegekben

Az I sz. Sebészeti Klinikán 1950-1990 között operált 30 medulláris (MTC) pajzsmirigy rák közül 12 betegben tudtuk egyidőben elvégezni a HLA és a bazális valamint a stimulált szérum kalcitonin vizsgálatokat. Közülük 5 beteg családjában familiáris halmozódást találtunk. A bazális és stimulált szérum kalcitonin vizsgálatokat és a HLA tipizálást nemcsak a betegekben, hanem a familiáris típusú medulláris karcinómás betegek egészséges (klinikai tüneteket nem mutató) családtagjaiban is elvégeztük.

Kalcitonin (CT) meghatározást a BYK Mallinckrodt tesztjével, illetve a stimulált kalcitonin (s-CT) meghatározást Wells szerint végeztük.

A basalis és stimulált calcitonin meghatározásokat RIA módszerekkel a INC /Immuno Nuclear Corporation, Stillwater, Minesota/ Calcitonin II 125J Human Calcitonin és a Byk-Sangtec Diagnostica RIA-ma + Calcitonin II tesztjeivel végezte a DOTE I. Belgyógyászati Klinika, ill. a Központi Klinikai Kémiai Intézet Központi Izotópdiagnosztikai Laboratóriuma. A levett vérmintákat azonnal jég közé helyeztük és hideg centrifugálás után felhasználásig a savókat -20oC-on tároltuk.

Az értekezésben részletezett stimulált kalcitonin meghatározások pentagastrin (Peptavlon ICI Pharmaceuticals, Macclesfield Cheshire) felhasználásával történtek 0,5 µg/kg/5mp (Wells és mtsai 1975). A pentagastrin beadását 60-90 mp alatt végeztük i.v., esetenként infúziós pumpa segítségével.

Calcium infúziós tesztet csupán néhány alkalommal végeztünk 1,5-10 perc alatt beadott 15mg/kg Ca-gluconat alkalmazásával. Ezekben az esetekben pentagastrinnal összehasonlítva elnyúltabb választ, alacsonyabb csúcsértékeket kaptunk, ezért a monitorozás szükségessége miatt ezt a provokációs tesztet elhagytuk.

3.5. Citogenetikai vizsgálatok papilláris karcinómában és follikuláris adenómában

Hat beteg műtéttel eltávolított pajzsmirigy daganatának citogenetikai vizsgálata során négy esetben, három papilláris karcinómában, és egy follikuláris adenómában kaptunk értékelhető metafázisokat.

Minden esetben a primer tumort vizsgáltuk a következő módszerrel: a sejtszuszpenziót a tumorszövet mechanikus felaprózása után +4⁰C-on 16-20 órán át tartó tripszines emésztéssel /0,25 %/ nyertük. A tenyésztés 10 % fetalis borjusavót tartalmazó DMEM /GIBCO/ tápfolyadékban, Greiner T25 tenyésztőedényben, 5 % széndioxidot tartalmazó ASSAB /Sandbyberg/ típusú termosztátban történt 7-60 napig. Megfelelő számú sejt esetén a tenyészethez 24-36 órára colchicint /0,1 ug/ml végkoncentráció/ adtunk, majd a feldolgozást a hagyományos módszerrel végeztük. Két sávozási eljárást alkalmaztunk: G-sávozást (Seabright és mtsai 1971), és Q-sávozást (Caspersson és mtsai 1970). A kariotipizálás a papírképek kivágásával történt. A kariotípus jelölésében az International System for Human Cytogenetic Nomenclature /ISCN/ /1978/ előírásait követtük.

3.6. Molekuláris genetikai vizsgálatok benignus és malignus pajzsmirigy neopláziában.

Véletlenszerűen választottunk ki 16 follikuláris és 22 papilláris pajzsmirigy karcinómában és 25 follikuláris adenómában szenvedő beteg paraffinba ágyazott szövettani blokkjait a kanadai St-John's (New Foundland) Egészségtudományi Központjának és a DEOEC, akkor Debreceni Orvostudományi Egyetem Patológiai Intézetének archívumából. Kanadának ezen a vidékén a napi jód felvétel több mint elégséges 190-550 µg/nap, míg Magyarország Dunától keletre fekvő területein a jód felvétel 46-70 µg/nap.

A Debrecenből származó metszeteket a St-John's-ban dolgozó patológusok revideálták, hogy ki lehessen zárni az eltérő diagnosztikai kritériumokból adódó tévedést. A paraffinba ágyazott blokkokból 5 mµ vastagságú metszetek készültek, amelyeket PCR céljaira Shibata és mtsai. (1991) leírása szerint preparáltunk.

3.6.1. Szintetikus oligonukleotid és PCR

A szintetikus oligomerek a Clontech (Kalifornia) cégtől származtak. Az oligonukleotid szekvenciák teljes listáját itt nem részletezzük. A metszeteket 400 µl xylennel deparaffinizáltuk majd két alkalommal abszolút alkoholban mostuk. A szöveteket szárítás után 50 µl pufferben (100mM Tris, 5mM EDTA, pH 8,0) emésztettük, amelyhez 40 µg Proteináz K -t adtunk. A keveréket egy éjszakán keresztül 37°C-on inkubáltuk, ezután a Proteináz K inaktiválásához 10 percig 95°C-ra hevítettük. A PCR-hoz 5 µl felülúszót tettünk 50 µl Gene Amp Kíthez (Perkin Elmer,

Cetus, Kalifornia), az előállító használati előírása szerint. A primerek 20 bázis hosszúságúak voltak és minden párhoz egy 100 bázispárból álló amplifikált régió tartozott. A mintákat 3 percig 94°C-on denaturáltuk, majd hirtelen 4°C-ra lehűtöttük. 40 ciklusban végeztünk amplifikációt a következők szerint: denaturáció 30 másodpercig 94°C-on, oligonukleotid primer kötődés 30 másodpercig 56°C-on, és végül 30 másodperc, amíg a DNS polimeráz enzim másolatot készít a primerek közötti DNS szakaszcson 74°C-on. 5 µl amplifikátumot futtatunk 2 % agaróz gélen, hogy megbizonyosodjunk a specifikus kötődésről.

3.6.2. Southern Blot és Oligonukleotid Probe Hibridizáció

Kezdeti mennyiségi mérés után 2-10 µl amplifikátumot futtattunk 1, 5% agaróz gélen, amit nylon membránra (Hybond-N; Amersham Canada) vittünk át. Filter másolatokat készítettünk és a DNS-t UV fényvel fixáltuk. A filtereket prehibridizáltuk egy órán át 56°C-on, a szondaszekvenciától függően 5x SSC(1xSSC 0,15 mol NaCl, 0,015 mol nátriumcitrát, 5x Denhardt's oldatban (1x Denhardt's oldat 0,02% Ficoll, 0,02% polivinilpirrolidon, 0,02% marhasavó), 0,5% NaDodSO₄ és 10 mmol nátriumpirofoszfát. A hibridizációt ugyanilyen körülmények között végeztük 2 órán át [γ - ³²P]-vel jelölt ATP és 20 nukleotidból álló végjelölt oligonukleotid szondával. A filtereket 2 x mostuk, 2 x SSC, 0,1% NaDodSO₄-ban 25°C-on 20 percig „high stringency” mosást követően 2 x SSC, 0,1% NaDodSO₄-ban 10-20 percig 60-70°C-on. Végül a filtereken 12 óra elteltével autoradiográfiát készítettünk -70°C-on.

4. EREDMÉNYEK

4.1. HLA DR antigén megoszlása pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegekben

A karcinogenezis egy komplex patogenetikai folyamat, amely magába foglalja nemcsak a malignus sejtek genetikai és következményes funkcionális változásait, hanem az extracelluláris környezeti hatásokat is. A szervezet válasza viszont befolyásolja a túlélést, a malignus sejtek növekedését és szétterjedését. Az immunválasz résztvesz ebben a folyamatban, melyet folyamatosan érzékel.

A különböző szöveti típusú pajzsmirigy-tumороkban számos szerző vizsgálta a HLA antigének megoszlását. Az eredmények megegyeznek abban, hogy az I.osztály (HLA A,B,C lokusz) antigénjeinek előfordulása nem különbözik a normál kontrolltól. Különböző paramétereket figyelembe véve eltérést tapasztaltak ugyanakkor az egyes DR antigének szerepét illetően. Az 1. táblázatban foglaltuk össze a különböző kutatócsoportok eredményét összevetve saját adatainkkal.

1. táblázat

HLA antigének és a pajzsmirigy karcinóma asszociációja különböző szerzők közleményeiben

Szerzők	év	antigén	betegszám/ tumortípus	összefüggés	ország
Panza és mtsai	1982	B35/DR1	20 PTC	Sz.	Olasz
Sridama és mtsai	1986	DR7	74 FPTC	Sz.	USA
Juhász és mtsai	1986	DR1	52 PTC/ FTC	Sz.	Magyar
Larsen és mtsai	1986	Nincs kapcsolat	45	0	Kanada
Dralle és mtsai	1986	DR5*	24/ PTC	N.Sz.	Német
		DR6	13/ FTC	N.Sz.	Német
		DR3	11/ MTC	N.Sz.	Német
Juhász és mtsai	1989	DR1	84 FTC/PTC	Sz.	Magyar
Rigopoulou és mtsai	1994	DR11*	137/ PTC	Sz.	Spanyol
Juhász és mtsai	2005	DR11*	75 PTC/ FTC	Sz.	Magyar

* A HLA DR11 a DR5 része

PTC- papilláris pajzsmirigy karcinóma
 FTC- follikuláris pajzsmirigy karcinóma
 FPTC- follikulo-papilláris pajzsmirigy karcinóma
 MTC- medulláris pajzsmirigy karcinóma
 Sz- szignifikáns
 N.Sz.- nem szignifikáns

Első saját vizsgálatunkban (Juhász és mtsai 1986) szerológiai módszert használva 52 hámeredetű pajzsmirigyrákban szenvedő beteget tipizálva megállapítottuk, hogy a HLA DR1 antigén szignifikánsan gyakran (53,8 % vs. 19,4

%) fordult elő (2. táblázat). Kimutattuk, hogy tizenkét metasztázissal rendelkező FTC,PTC-s betegből tíz DR1 pozitív volt. HLA asszociációs vizsgálatokat három eltérő periódusban végeztük 1986, 1989, 2005.

2. táblázat

HLA DR antigén megoszlása 52 pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegben és 170 egészséges kontrollban

HLA-DR allél	beteg	kontroll	RR	χ^2
1	26 (53,8)	31 (19,4)	4,85	21,26
2	11 (21,1)	32 (20,0)	1,07	0,03
3	14 (26,9)	28 (17,5)	1,74	2,16
4	7 (13,5)	40 (25,0)	0,47	2,93
5	10 (19,2)	36 (22,5)	0,82	0,25
7	11 (21,2)	42 (26,3)	0,75	0,54

4.2. HLA-DR antigének és az IgG nehéz-lánc (Gm) fenotípus megoszlása epiteliális pajzsmirigy tumorokban

Az immunválasz szerepének fontosságát szempontjából vizsgáltuk a szöveti (HLA) antigének és az IgG nehéz-lánc allotípusok (Gm) előfordulását a pajzsmirigy karcinómában szenvedő betegekben és esetenként családjukban, annak megközelítésére, hogy ezek a genetikai faktorok milyen szerepet játszanak a betegség etiopatogenezisében.

A Gm allotípusok előfordulása nem mutatott eltérést a kontrolltól. HLA antigének mellett a betegek Gm allotípusainak vizsgálatától azt reméltük, hogy a pajzsmirigy karcinómára való hajlam megbecsüléséhez közelebb jutunk. A vizsgálatokba 50 differenciált pajzsmirigy-tumoros beteget és 168 egészséges véradóból álló kontrollt vontunk be. Az 50 beteg és a kontrollok mindegyike tipizált

volt az MHC I. és II. osztályának antigénjeire. A 3. táblázatban látható, hogy egyedül az fb fenotípus mutatott emelkedett értéket ($\chi^2 = 4,50$, $p < 0,05$) a kontrollhoz képest. A follikuláris (11/16), papilláris (8/16), follikulo-papilláris (10/18) tumorban szenvedők a megjelölt arányban fb homozigóták voltak.

Nem találtunk összefüggést a különböző Gm genotípusok és a pajzsmirigy karcinóma szövettani típusa között.

A továbbiakban a Gm és HLA fenotípusok lehetséges interakcióját vizsgáltuk. Csoportosítottuk a betegeket és a kontrollokat DR1 pozitivitás és Gm fb homozigótáság szerint. Ebben a csoportosításban jól megfigyelhető, hogy HLA DR1+ fb+ betegek relatív kockázata a kontrollhoz és az összes többi csoporthoz képest extrém mértékben megemelkedett. A HLA DR1+ fb+ relatív kockázata például a DR1- fb- -al szemben 37, 48-szor nagyobb volt.

3. táblázat

HLA-DR antigének és a Gm fenotípus megoszlása epiteliális pajzsmirigy-tumorokban és 168 egészséges kontrollban

Vizsgálatban résztvevők	HLA antigén és Gm fenotípus DR1 ⁺ fb ⁺	HLA antigén és Gm fenotípus DR1 ⁺ fb ⁻	HLA antigén és Gm fenotípus DR1 ⁻ fb ⁺	HLA antigén és Gm fenotípus DR1 ⁻ fb ⁻
betegek /n=50/	15 /30.0/	12 /24.0/	15 /30.0/	8 /16.0/
kontroll /n=81*/	2 /2.47/	10 /12.34/	29 /35.80/	40 /49.38/
RR	37.48	6.00	2.58	1
szignifikancia	< 0,005	< 0,0005	< 0,0005	–

* A 168 kontroll egyénből 81 volt Gm allotípusra tipizálva.

Mindez azt igazolja, hogy az fb homozigótaság a HLA-DR1 pozitív betegekben kifejezetten fokozott hajlamot jelent a pajzsmirigy karcinóma kialakulására.

4.3. HLA DR allélek DNS alapú tipizálása

Vizsgálatsorozatunk második periódusában (Juhász és mtsai 2005) a HLA DR allélek DNS alapú tipizálását végeztük el (OLERUP-SSP). Ez egyben a korábbi szerológiai specifikások részletesebb felbontását is megengedte.

75 eddig nem vizsgált, de a korábbival megegyező hisztológiai típusú daganatos beteget tipizálva a HLA DR11 antigén szignifikánsan gyakori előfordulását mutattuk ki a 170 egészséges kontrollhoz képest (4. táblázat).

Ez jellemző volt mind a follikuláris, mind a papilláris karcinomára. Ugyanakkor a betegség prognosztikai faktoraival - mint a tumor mérete, limfocitás infiltráció mértéke, a regionális nyirokcsomó és a távoli metasztázis előfordulása - nem találtunk DR11 asszociációt.

4.táblázat
 HLA DR allélek megoszlása 75 differenciált
 pajzsmirigy karcinómában és 170 egészséges kontrollban

HLA-DR	pozitív betegek száma	pozitív kontrollok száma	RR	chi-négyzet	p<
1	17	29	1.329	0.737	0.391
15 (2)	16	41	0.885	0.097	0.756
16 (2)	1	4	0.567	0.001	0.976
4	13	38	0.775	0.52	0.471
11 (5)	34	36	2.141	13.72	0.000
12 (5)	0	4	0	0.628	0.428
13 (6)	9	28	0.729	0.500	0.479
14 (6)	1	6	0.378	0.266	0.593
7	22	39	1.279	0.821	0.365
8	2	10	0.453	0.568	0.451
9	3	5	1.36	0.002	0.968

4.4. A differenciált pajzsmirigy karcinóma prognosztikai faktorai és a HLA-DR 11 közötti összefüggés vizsgálata

A betegség manifesztációja és a DR1 előfordulása között korábban talált asszociáció miatt azonos módon hasonlítottuk össze az ezen csoportban bemutatott betegek adatait és úgy találtuk, hogy ebben a betegcsoportban nincs összefüggés a kórlefolyás és a DR11 antigén előfordulása között.

5. táblázat.

A differenciált pajzsmirigy karcinoma lefolyása és a HLA-DR 11 pozitivitás közötti összefüggés vizsgálata

A betegség manifesztációja	HLDR11		χ^2	p<
	+	-		
metasztázis				
+	5	9	0.84	0.35
-	30	31		
limfocitás infiltráció				
1	28	28	1.15	0.58
2	1	1		
3	6	11		
tumor nagyság				
1	11	10	0.92	0.63
2	21	28		
3	3	2		
nyirokcsomó metasztázis				
1	30	31	1.72	0.42
2	1	4		
3	4	5		

A limfocitás infiltráció mértékének megállapításakor azt (1) enyhe (2) közepes és (3) súlyos fokúnak határoztuk meg. A tumor méret megadásánál < 1 cm (1), 1.1-2 (2) ill. > 2 cm (3) mérethatárokat állapítottunk meg. A nyirokcsomó érintettség alapján a betegek csoportjai: nincs (1) , regionalis nyaki nyirokcsomó metastázis (2) és távoli metastázis (3) (5.Táblázat).

Diszkrimináns analízist alkalmazva matematikai módszerrel igazoltuk, hogy a tumor méretével a metasztázis gyakoribb előfordulása és a limfocitás infiltráció csökkent mértéke mutatott szignifikáns kapcsolatot.

Irodalmi adatok szerint ismert, hogy összefüggés mutatható ki a pajzsmirigy karcinoma előfordulása és bizonyos onkogén mutációk (RET, MET) között, mely utóbbiak fokozzák a HLA II. osztály antigénjeinek expresszióját és így áttételesen a tumor limfocitás infiltrációját is.

A két vizsgálati periódus közötti DR antigén eltérés, valamint az irodalomban is tapasztalt ilyen irányú ellentmondások valószínűleg a betegség kialakulására hajlamosító változó környezeti, kockázati tényezők különbözőségében rejlik. Gondolhatunk itt arra a tényre is, hogy a csernobili katasztrófa az első tanulmányunk megjelenése után történt, s amelynek hatását a pajzsmirigyrák kialakulására nem lehet vitatni.

4.5. Kalcitonin meghatározások és a családvizsgálatok eredményei medulláris pajzsmirigyrákban

Az irodalmi áttekintés fejezetben részletesen foglalkoztunk a medulláris pajzsmirigy karcinóma különleges helyzetével a pajzsmirigyrákok között. Itt a családvizsgálatok számára elérhető betegek és hozzátartozóinak HLA típusát és a bazális, valamint a provokált szérum kalcitonin értékek összefüggéseit értékeltük. 1950 és 1990 között operált 30 medulláris pajzsmirigyrák közül 12 betegben genetikai vizsgálatokat (HLA) és szérum kalcitonin meghatározást végeztünk. (6. táblázat).

6. táblázat

HLA-antigének előfordulása és a HLA-tipizálás idején mért b-CT-szintek

medulláris pajzsmirigy karcinómában

Betegek	HLA lokusz A		HLA lokusz B		HLA lokusz C		HLA lokusz DR		b-CT pg/ml	Vizsgálatok időpontja
1.K.L.	3	9	12	-	4	-	2	7	1000	Mu
2.Cs.J,	2	3	7	13	1	3	4	7	100	Mu
3.O.I.+	1	1	22	35	4	-	-	7	675 (x)	Me
4.K.I.+++	2	3	15	-	2	-	4	7	30	Mu
S.N.G.++	1	11	35	13	4	-	1	7	100	Mu
6.O.J.	1	2	7	40	-	-	4	7	70	Mu
7.F.S.+++	1	10	8	12	3	-	6	7	480 (x)	Me
B.F.J.	1	11	8	18	5	-	1	3	100	Mu
9.K.G.++++	3	-	7	14	-	-	2	7	1300 (x)	Me
10.F.J.	3	9	12	-	1	3	-	3	1300 (x)	Me
11.B.S.	2	3	22	35	5	-	2	4	1000 (x)	Me
12.S.T.	1	-	7	14	2	-	6	7	790 (x)	Me

- + = anyja MCT-ben halt meg
- ++ = novére MCT-ben halt meg
- +++ = apja MCT-ben halt meg
- ++++ = anyai nagynénje MCT-ben halt meg
- b-CT = bazális kalcitonin
- Me = műtét előtti b-CT
- Mu = műtét utáni b-CT
- x = műtét után közvetlenül normalizálódott b-CT érték volt mérhető

Tizekét beteg esetében statisztikai analízis nem végezhető, mert a kis számok miatt fennáll a tévedés lehetősége. Ennek ellenére nem tartjuk véletlennek azt, hogy 12 betegből 9 DR7 pozitív volt. A DR7 antigén előfordulása Magyarországon 23 %. A kilenc DR7 pozitív betegből öt esetben bizonyított, vagy feltételezhető volt továbbá a családi előfordulás is.

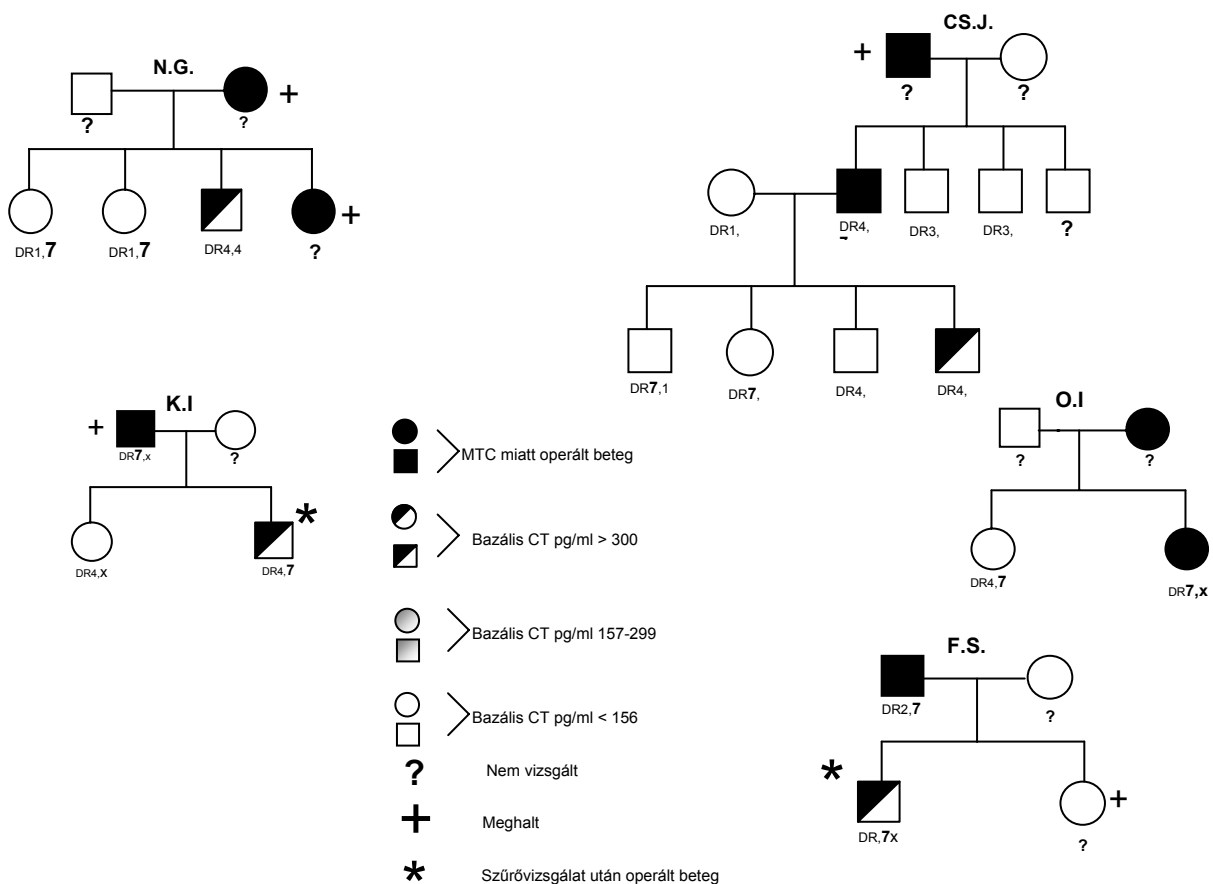
Nem volt módunk több MTC-s beteget tipizálni a korai halálozások miatt, de a DR7 antigen jelenlétének meghatározó fontosságát és a betegségre utaló markerként való alkalmazását családvizsgálatokkal igyekeztünk megerősíteni.

A betegek családtagjaiban észlelt bazális és/vagy stimulált kalcitoninszint - emelkedés a családi előfordulás lehetőségét jelzi, hiszen a szérumban CT-értéke nemcsak a kifejtett MTC-ben lehet magasabb, hanem a daganatban szenvedő betegek egyébként egészséges, de már rosszindulatú sejteket hordozó családtagjaiban is.

Az 4. ábra azt az öt családfát mutatja, amelyekben a DR antigéneken túl a manifeszt betegséget (FMTC) és a kalcitonin értékeket is feltüntettük, rámutatva ezzel a DR7 és ezen laboratóriumi érték összefüggésére.

4. ábra

Családvizsgálatok medulláris pajzsmirigyrákban



14 családtag pentagasztrin terheléses calcitonin (s-CT) meghatározását végeztük el. Ezek közül 7 olyan családtag pentagasztrin terheléses szérumszint (s-CT) meghatározását végeztük el, akiknek bazális CT értéke (két családtagban) 100-299 pg/ml, illetve (négy családtagban) 300 pg/ml. fölé volt. A stimulált CT (s-CT) szint a bazális értékhez képest mind a 7 családtagban megemelkedett, noha igen magas 1300 pg/ml CT értéket csak azon két családtag esetében mutattunk ki, akiknél a medulláris pajzsmirigy karcinóma diagnózisát is felállítottuk. Totál thyreoidektómia után mindkét beteg CT szérumszintje normalizálódott. A részletes szövettani vizsgálat azonban C sejtes hiperplázia morfológiai jelei ellenére MTC-t nem tudott bizonyítani. A hiperplázia vonatkozásában viszont minden szerző egyetért abban, hogy a C sejtes hiperplázia olyan preblasztomatózisnak tekintendő, amelyet klinikailag karcinómaként szükséges megítélni és kezelni.

4.6. Citogenetikai vizsgálatok eredményei

A citogenetikai vizsgálat eredményeit a 7. táblázatban foglaltuk össze, míg a 8. táblázatban a vizsgált betegek klinikai jellemzőit tüntettük fel.

7. táblázat

Pajzsmirigydagánatos betegek citogenetikai adatai

Betegek	kórszövettani diagnózis	vizsgálat száma	in vitro tenyésztés tartama	számolt (analizált) sejtek száma	kromoszóma szám	visszatérő aberrációk		markerrel bíró sejtek száma	konstitucionális kariotípus
						számbeli	szerkezeti		
1.	papilláris karcinóma	1.	7	52(31)	46(40—48)	-10 (22) —X —Y (10)	del (11) (q21) dup (1) (q23-qter) egy6b	25 27	46,XY
2.	papilláris karcinóma	1. 2. 3.	16 30 55	10(2), 15(9) 5(3)	44(41—47) 45(41—47) 47(43—47)	-22 (3)	del (11) (q23)	2 5 2	46,XX
3.	papilláris karcinóma	1. 2.	30 60	4(1) 7_(3)	46(45—47)	—	—	—	nem történt
4.	follikuláris adenóma	1. 2. 3.	direkt 10 17	7(3) 8(3)	46	—	—	—	46,XX

8. táblázat

A betegek klinikai jellemzői

Betegek	kor (év) nem	klinikai előzmény, műtét	szöv. dg.	postop. kezelés	Műtét óta eltelt idő (hó)
1.	13/f	lobectomia után, 1 hó múlva recidíva és nyirokcsomó metasztázis miatt re-operáció: near totális tireoidektómia	papilláris cc.	I ¹³¹ ablatív izotóp szupressz. dózisu hormon	20
2.	71/n	tartós Thyroxin szupresszió ellenére nem csökkenő göbméret miatt tireoidektómia	papilláris cc.	—	16.
3.	32/n	öt évig tartó Methyryn kezelés hipertireózis miatt, majd 6 héttel a műtét előtt észlelt tumor miatt lobektómia	papilláris cc.	—	17
4.	37/n	9 évvel korábban nyaki röntgen besugárzás carotis angiografia során pajzsmirigygöb műtét: azonos oldali lobektómia	atípusos follikuláris adenóma	—	18

Folikuláris adenomában kariotípus eltérést nem észleltünk. A három sikeresen vizsgált papilláris karcinóma közül kettőben klonális számbeli és szerkezeti eltéréseket igazoltunk.

A modális kromoszómaszám mindhárom papilláris karcinómában a diploid tartományba esett, de hipodiploiditást eredményező kromoszómavesztéseket és - néhány sejtben - számfeletti kromoszómákat is megfigyeltünk. Míg a tri-, és tetraszomiák nem bizonyultak következetesnek, az 1. és 2. sz. betegben nonrandom kromoszómavesztéseket igazoltunk:

9. táblázat:

Visszatérő marker típusok az 1. sz. betegben

Marker sor-száma	szerkezeti eltérés	markerrel rendelkező sejtek száma / n =31
1.	dup(1) (q23;gter)	27/31
2.	del (11) (q21)	25/31
3.	del (13) (q12;g22)	9/31
4.	del (14) (q21;g24)	3/31
5.	del (16) (q22)	12/31
6.	i (17q)	5/31
7.	t (?;20) (?;q23)	5/31
8.	del (X) (q23)	4/31
19.	del (5) (q13)	14/31
10.	del (5) (p13)	6/31
11.	ace	2/31
12.	nem azonosított kis metacentrikus kromoszóma	12/31
13.	DM-ok	5/31

Az 1. számú beteg 31 analizált sejtje közül 22-ben 10-es monoszomiát, vagy mindkét homológ elvesztését, 15-ben az X, 10-ben az Y hiányát észleltük. A hipodiploid sejtek mellett néhány hiperdiploid és hipotetraploid sejt is megjelent. A 2. számú betegben a 22-es monoszomiát találtuk klonális jellegűnek. Ugyanezen két betegben hasonló szerkezeti eltérés, a 11q deléciója volt kimutatható, q21, ill. q23 töréspontokkal (7. táblázat). Az 1. számú betegben a 11q delécióhoz további - deléciókból és pontosan nem identifikálható transzlokációkból származó - marker kromoszómák társultak /9. táblázat/. Közöttük az 1-es kromoszóma q23-qter régiójának duplikálódását azonosítottuk. A marker kromoszómák mellett a sejtek egy részében génamplifikációra utaló „double minute-ok” is megjelentek.

A betegek konstitucionális kariotípusa - PHA-val stimulált perifériás limfocita kultúrában vizsgálva - normálisnak bizonyult.

4.7. ras onkogénmutáció benignus és malignus pajzsmirigy neopláziában

PCR és oligonukleotid hibridizáció felhasználásával vizsgáltuk az N-ras, Ha-ras, K-ras onkogének mutációját jó és rosszindulatú pajzsmirigydaganatokban kelet-magyarországi jódiányos területeken élő (46-70mikrogramm/nap jódbevitel) és Kanada északkeleti részén (New-Foundland) lakó és megfelelő jódelátottságú földrajzi területen élő betegekben (190-550mikrogramm/nap jódbevitel).

25 folliculáris pajzsmirigy adenóma 16 folliculáris karcinóma és 20 papilláris karcinóma onkogén mutációs frekvenciáját elemeztük. A betegek megközelítően fele

Kelet-magyarországi, a Tiszántúl, Debrecen térségéből, míg a másik fele Kanada keleti vidékéről, New Foundlandról (St. John's) származott. A vizelettel ürített jód mennyisége alapján az előbbi kifejezetten jódhiányos, míg utóbbi jóddal megfelelően, a kívánatosnál is jobban ellátott területnek tekinthető.

Mutációt szenvedett ras onkogéneket azonosítottunk 13 pajzsmirigy adenómás debreceni beteg közül 11 esetben (85%), illetve hat pajzsmirigy karcinóma közül három esetben (50%). Az adenómák 80%-a makrofollikuláris szerkezetű volt, míg a maradék kevert, mikro és makrofollikuláris struktúrát mutatott. Ras onkogén mutációt 12 papilláris karcinóma közül egy esetben sem találtunk. A leggyakoribb mutáció a 61-es codonban Gln→Arg csre volt. A mutációk 93%-a ehhez a helyhez kötődött, míg a 12,13-as codonban nem tudtunk mutációt kimutatni. Egy tumormintában két ras mutációt is találtunk, amely szövettanilag tipikusan mikrofollikuláris szerkezetű volt /codon 61 (Gln→Lys N-ras, ill.Gln Arg→Ha-ras)/. Szerzők többsége a mikrofollikuláris adenómát preblasztomatózisnak tartja, így a kettős mutációt is szenvedett adenóma magasabb malignitási potenciálját, igazolhatja a beteg fokozott megfigyelése során esetleg bekövetkező malignus transzformáció.

A St. John's-ban operált betegekből származó hisztológiai mintákban sokkal kisebb számban találtunk ras mutációt, mint a kelet-magyarországi régióban operáltakban. Itt a follikuláris adenómák 16%-ában (2/12) mutattunk ki ras mutációt, amely szignifikánsan alacsonyabb incidenciát jelez ($\chi^2 = 5,695$, $P < 0,02$). Tíz pajzsmirigy karcinómából csupán egy betegben lehetett ras mutációt kimutatni New Foundlandon. Follikuláris karcinóma tekintetében azonban nem volt szignifikáns különbség a ras mutációk incidenciájában New Foundland és a Tiszántúl között

($\chi^2=1,423$, $P<0,02$). A mutációk célpontja viszont itt is a 61-es codonon (Gln→Arg szubsztitúcióval) helyezkedett el. A magyarországi betegekhez hasonlóan az itt operált 10 papilláris pajzsmirigyák egyikében sem lehetett ras mutációt észlelni.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Áttekintettük vizsgálataink eredményeit az MHC I és II osztály antigénjeinek előfordulását a magasan differenciált pajzsmirigy rákokban Kelet-Magyarországon szerológiai és DNS technikát alkalmazva.

A pajzsmirigy karcinóma szövettani típusától független, szignifikánsan gyakori DR1 antigén előfordulást közöltünk (Juhász és mtsai 1986). Ebben a vizsgálati sorban 52 hámeredetű pajzsmirigyrákban szenvedő beteget tipizáltunk szerológiai módszerrel. A DR1 antigén 53,8 %-ban fordult elő a kontroll 19,4 %-ával szemben . A 12 regionalis nyirokcsomó metasztázisban szenvedő betegből 10 DR1 pozitív volt. A Gm allotípusok előfordulása ugyanebben a betegcsoportban nem mutatott eltérést a normál kontrolltól.

A Gm és HLA fenotípusok lehetséges interakcióját vizsgálva csoportosítottuk a betegeket és a kontrollokat DR1 pozitivitás és Gm fb homozigótaság szerint. Ebben a kontextusban az látható, hogy HLA DR1+ fb+ betegek relatív kockázata a kontrollhoz és az összes többi csoporthoz képest extrém mértékben megemelkedett. A HLA DR1+ fb+ relatív kockázata például a DR1- fb- -al szemben 37, 48-szor nagyobb. Az MHC II osztály és az IgG nehéz-lánc (Gm) allotípusainak összefüggését pajzsmirigy karcinómában más kutatók korábban nem vizsgálták, az összefüggés patomechanizmusban játszott szerepe ma is tisztázatlan.

A második vizsgálati sorban 75 beteget molekuláris genetikai módszerrel tipizálva, szignifikáns kapcsolatot találtunk a HLA DR11 és a differenciált

pajzsmirigydagánatok (PTC,FTC) között (Juhász és mtsai 2005). A kontroll populációtól ez az egyetlen antigén mutatott szignifikáns eltérést. A többi antigén előfordulását nem torzította a DR11 magas frekvenciája, amit a DR11 pozitívok kizárása utáni relatív rizikó (RR) számítás is igazolt. A DR11 mind a papilláris, mind a follikuláris formában gyakrabban fordult elő, ami különösen az utóbbiban volt megfigyelhető. Ez a különbség azonban nem volt szignifikáns. A DR 11 fenotípus nem volt befolyással a tumor méretére, a limfocitás infiltráció mértékére valamint a nyirokcsomó, illetve a távoli metasztázisok előfordulására. Hét papilláris karcinómás betegnek jelentős cervikális limfadenopatiája volt, így az intraoperatív észlelt 1,5-2,5 cm nagyságú metasztatikus nyirokcsomók miatt módosított nyaki disszekciót végeztünk. Ezek a nyirokcsomók szövettanilag nem bizonyultak malignusnak, viszont mind a hét beteg DR1 pozitív volt. A nagyméretű nyirokcsomók jelenléte nem bizonyítja tehát önmagában a malignitást és felveti az intraoperatív fagyasztott szövettani vizsgálat szükségességét vagy a csupán makroszkópos/klinikai megítélés alapján végzett nyaki disszekció indikációjának felülvizsgálatát.

Hagyományosan az egy cm-es tumor átmérő az elkülönítés határa a mikrotumorok és a klinikailag releváns karcinómák között. A mikrotumorok ugyanis biológiailag különböznek a nagyobb daganatoktól, amit több szerző is bizonyított (Asa és mtsai 2004). Így megvizsgáltuk a különböző paraméterek hatását a mikrotumor, klinikailag releváns karcinóma átmenetre. A diszkriminációs faktor analízis során csak két tényező mutatott szignifikáns összfüggést a tumor méretével: a távoli metasztázis jelenléte pozitív módon és a limfocitás infiltráció mértéke fordított arányban. Az utóbbi eredmény azt sugallja, hogy a klinikailag észlelhető tumor kialakulása kapcsolatban van az immunrendszer károsodásával, ami a

limfocitás infiltráción keresztül jut érvényre. A többi változó, mint például a DR fenotípus, a nem, az életkor, a szövettani típus nem bizonyult meghatározónak.

Két alapvető kérdést lehet feltenni: 1/ mi a pajzsmirigy-rák és a HLA allélek kapcsolatának jelentősége 2/ mi a magyarázata annak, hogy olyan sok allél szerepét közték a különböző szerzők beleértve a mi eredményeinket is is ?

Az MHC II osztály molekulái központi szerepet játszanak az immunválaszban, mint az antigén prezentáló sejtek restrikciós elemei a T sejtekkel folytatott kooperációban. Ezeknek a molekuláknak a polimorfizmusa, valamint a kapcsolt lókuszok alléljaival fennálló linkage disequilibrium (haplotípusok) meghatározhatják a mennyiségi választ a későbbi termékek, különösen a citokinek produkciójában (Farid 1989, van der Bruggen és mtsai 2002, Lio és mtsai 2001, Wong és mtsai 2003, Lee és mtsai 2002).

Az utóbbi időben közölték, hogy a RET/PTC onkogének az MHC II osztály antigénjeinek expresszióját fokozzák (Hwang és mtsai 2004). Valószínűnek tűnik, hogy a pajzsmirigy tumorsejtek olyan citokineket termelnek, amelyek előmozdítják a limfocitás infiltrációt. Ezt korábban a MET fokozott expressziójával kapcsolatban is kimutatták, mind papilláris és mind follikuláris karcinómában. Ezi összhangban van azzal, hogy az MHC II osztály expressziója és a limfocitás infiltráció miért nemcsak a papilláris típusra korlátozódik. A vad típusú p53 onko-szuppresszor gén stabilizáló hatással van az MHC II osztály antigénjeinek expressziójára csak a hatást a mutáns p53 nem tudja kifejteni (Zeki és mtsai 1998).

Az MHC II osztály indukciója, melyet különböző onkogének válthatnak ki, megmagyarázza, hogy a korábbi vizsgálatokban talált MHC II expresszió szabályozása miért térel a pajzsmirigy-rákban a normál pajzsmirigysejtekhez képest.

Az infiltráló mononukleáris sejtek biztosítják a ko-stimulációban szereplő molekulákat, amelyek egyébként nem expresszálódnak a pajzsmirigyrák sejtekben, ami lehetővé teszi a hatékony immunválaszt. Ezek az infiltráló mononukleáris sejtek azonban a kétélű kard szerepét is játszhatják, amennyiben a gyulladást okozó mediátorok paracrine módon elősegíthetik a tumor növekedését.

Bizonyíték van arra, hogy a pajzsmirigyrák specifikus tumor antigének (RET/PTC) ellen humorális és celluláris immunválaszt indulhat, amely esetleg képes az immunmoduláció révén sikeresen eliminálni a mutáns onkogéneket hordozó sejteket. Az immunmoduláció átformálhatja a túlélő tumort az immunrendszer szelektív nyomása által. Ez egy a korábbtól gyökeresen különböző tumortípus megjelenéséhez vezethet. A tumor "darwini evolúciója" lényeges lehet a mikrokarcinóma – klinikailag releváns tumorátmenet szempontjából. A tumor evolúció nagy kihívás a hatékony vaccinák kifejlesztésében, ami tumorspecifikus neoantigénekre alapoz.

A pajzsmirigy karcinóma DR kapcsolatáról megjelent közlemények említik a DR1, DR7, DR11-et, vagy nem találtak kapcsolatot egyáltalán. Magunk a DR11 szignifikáns emelkedését igazoltuk ugyanabban a populációban (de nem ugyanazon betegekben), amelyben korábban a DR1 asszociációt közöltük. Ez nem lehet technikai probléma, amit a csontvelő donorok HLA vizsgálata is igazolt, amikor a szerológiai módszerről a DNS alapú tipizálásra váltottunk a laboratóriumban. Az MHC II osztály antigénkülönbség összefüggésben lehet a változó környezeti kockázati tényezők hatásával a különböző érzékenységű populációkban. A heterogenitás példáját adja Sridama és mtsai (1986), akik az irradiációhoz kapcsolódó pajzsmirigyrákban kimutatták, hogy a DR7 pozitív betegekben a latencia idő sokkal rövidebb, mint a

DR7 negatívokban. Fontos, hogy hét PTC-s beteg nyilvánvalóan sikeres immunválasszal társuló DR1 pozitív volt. A DR1 antigén gyakoriságát korábban mi is észleltük. Megjegyezzük, hogy az utóbbi vizsgálatunkban négy betegben a kórkép 1986 előtti és 17-ben 1996 utáni manifesztálódott. A csernobili radioaktív felhő a katasztrófa után Magyarországot néhány nappal később érte el. A kombináció esetleg spekulatív, de mégis ez volt a legdrámaibb környezeti, kockázati tényező a két közlésünk közötti intervallumban.

Megjegyezni kívánjuk, hogy a családi halmozódást mutató kisszámú medulláris karcinómás csoportban 12 betegből kilencben találtunk DR7 pozitivitást, amely vizsgálat folytatása a betegszám növelésével hozzájárulhat a genetikai prediszpozíció pontosabb megítéléséhez.

A betegeinkben DR11-el talált asszociációt megerősítették Dralle és mtsai (1986), amikor follikuláris karcinómában a DR5 (a DR11 a DR5 egy része) szignifikánsan gyakori előfordulását észlelték, míg Rigopoulou és mtsai (1994) papilláris karcinómában találták ugyanezt. A korábbi közlésünk a DR1 fokozott gyakoriságáról megerősíti Panza és mtsai (1982) megállapítását, akik egy kisebb olasz betegcsoportban hasonló eredményre jutottak.

Citogenetikai vizsgálatainkról összefoglalóan megállapítottuk hogy a pajzsmirigy differenciált daganataira jellemző a diploid modális kromoszómaszám és a hipodiploiditásra való hajlam. Hiperdiploid, poliploid sejtek megjelenése anaplasztikus elfajulásra figyelmeztet. A papilláris karcinóma patogenézisében a 10-es kromoszóma illetve a 11q játszhat szerepet. A változatos markerek, főleg az 1q triszómia és a „double minute”-ok megjelenése kedvezőtlen prognózist jelez. Ugyanazon betegek különböző ideig tenyésztett in vitro kultúrájában a marker

kromoszómák ugyanazok maradtak, azaz az átrendeződött kromoszómák nagy valószínűséggel a primer tumorban megjelenő, neoplasztikus transzformációval összefüggő aberrációkat képviselik.

Vizsgálataink igazolják, hogy a pajzsmirigydaganatok citogenetikai vizsgálatai diagnosztikus és prognosztikai értékű kromoszóma-eltérések kimutatását teszik lehetővé. Az észlelt számbeli és szerkezeti eltérések specifikus szerepét molekuláris vizsgálatokkal kell bizonyítani. Várható, hogy az egyes tumorokra jellemző átrendeződések és az érintett gének további megismerése a jövőben új terápiás és megelőzési stratégiát tesz lehetővé.

A citogenetikai és a MHC II. osztály antigén vizsgálatok valamint a Gm polimorfizmusbeli eltérések felhívták a figyelmet arra, hogy molekuláris biológiai vizsgálatok részletesebb magyarázatot adhatnak a pajzsmirigy karcinóma kialakulását vagy a fokozott tumor képződési hajlamot illetően.

A ras protoonkogén család három legismertebb tagja a Ha-ras, K-ras és az N-ras. Ezek a gének a sejtnövekedésben és a sejtdifferenciálódásban játszanak szerepet (Barbacid 1987) és a 12, 13, 61-es codonon bekövetkező mutációk aktív onkogének létrejöttéhez vezetnek. Mutáns ras gének mutathatók ki a humán tumorok mintegy 30%-ában, ahol a daganatok kifejlődésében tettenérhető szerepük miatt fokozott jelentőséget kapnak (Bos 1990). A mutációk egy része bizonyos emberi daganatokban található meg: K-ras onkogen mutációja a 12-es codonon pankreász karcinómában (Almoquera 1988, Smit 1988) és tüdő adenokarcinómában (Rodenhuis 1992, Rodenhuis 1997), illetve Ha-ras 61-s codon Gly→Arg szubsztitúcióval follikuláris pajzsmirigy karcinómában (Lemoine1989).

A 61-es codon Gln→Arg szubsztitúciója a legmarkánsabb változás a ras proteinek szerkezetében, amelyek normál körülmények között nélkülözhetetlenek a GTP hidrolíziséhez (GTP-áz gátló mutáció Krengel és mtsai 1990) A mutáns fehérje kötődhet a GTP-áz aktiváló fehérjéhez, amely a jelátvitelben közvetít a ras fehérje és a sejt között (Trahey és mtsai 1987, McCormick 1989).

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a ras gének jóval gyakrabban aktiválódtak Kelet Magyarországon, mint New Foundlandon. Hasonló ras gén aktiválódás figyelhető meg follikuláris adenómákban mint a tumorgenezis késői fázisának megfelelő follikuláris karcinómában, mely utóbbiban erősen szignifikáns különbséget találtunk. A kisszámú minta miatt a magyarországi adatokat Lemoine (1988) cardiffi (Wales) betegeinek ras eredményeivel kibővítettük és így hasonlítottuk össze a new foundlandi mintákkal. A ras onkogén mutáció így is szignifikánsan gyakoribb volt, mint New Foundlandon ($\chi^2 = 14,03$; $p < 0,0001$). Az összehasonlítást az engedte meg, hogy a wales-i populációban a vizelettel ürített jódb mennyisége átlagosan 90 $\mu\text{g}/\text{nap}$, ami megfelel annak a ténynek, hogy a jódbevitel Wales-ben sem éri el szükséges 150-300 μg -ot (Koutras 1980, Gutekunst és Scriba 1989).

Állatkísérleti adatokból ismert hogy a jódhiány pajzsmirigy hiperpláziához, göbképződéshez és végül rosszindulatú daganatok kifejlődéséhez vezethet (Schaller és mtsai 1966). Néhány tanulmány golyvaendémiás vidékeken a follikuláris tumorok gyakoribb előfordulását igazolta, amelynek növekedett ras mutációs frekvenciáját ebben a tanulmányban mi is megállapítottuk.

Említésre érdemes, hogy 22 papilláris karcinómában, egy esetben sem tudtunk ras mutációt kimutatni. Lemoine és mtsai (1988), Wright és mtsai (1989) 20 %-ban

találtak ras mutációt, míg Fusco és mtsai (1987) egy ugyancsak jódhányos területen 20 papilláris karcinómában nem találtak egyet sem. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a papilláris pajzsmirigyrák keletkezésében valószínűleg nincs szerepe a ras mutációs aktivitásnak. Bongarzone és mtsai (1989) szerint ezekben a tumorokban két tirozinkináz onkogén mutáció szerepe látszik fontosnak, de ők is felhívják a figyelmet a környezeti hatások nagy jelentőségére.

Vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a jódhányos vidéken kimutatható ras onkogén aktiváció nagyon fontos szerepet játszik a daganat keletkezésében/fenntartásában. Természetesen nem állíthatjuk, hogy egyetlen tényező (ras onkogén mutáció) elegendő a tumoros folyamat elindulásához, hiszen a multifaktoriális etiológia általánosan elfogadott a témát kutatók körében.

6. Köszönetnyilvánítás

Ez az értekezés bizonyára nem készülhetett volna el munkatársaim odaadó támogatása és segítségével nélkül.

Amikor mindnyájuknak köszönetet mondok, kifejezem hálámat Balázs György Professzor Úrnak, aki egyetemi pályámon elindított és megismertette velem a sebészet szépségeit és nehézségeit.

Köszönetet mondok Lukács Géza Professzor Úrnak a DEOEC I. sz Sebészeti Klinika vezetőjének szakmai és témavezetői segítségével és külön azért a baráti hangnemért, amely jelentősen megkönnyítette azokat az erőfeszítéseket, amelyek nélkülözhetetlenek voltak a munka elkészülése során.

Köszönöm Győry Ferencnek, Bodrogi Péternek közvetlen munkatársaimnak szakmai és baráti segítségét, amellyel lehetővé tették azokat a háttérmunkákat, amelyek nélkül biztosan nem készült volna el ez az értekezés.

Köszönet illeti Medgyessy Ildikót, Stenszky Valériát és Kozma Lászlót a Megyei Vértranszfúziós Intézet tudományos munkatársait, akik a HLA kutatás és gyakorlat eredményeinek értékelésében messzemenő segítséget és útmutatást nyújtottak.

Megköszönöm Oláh Éva Professzor Úrnőnek, a DEOEC Gyermekklinika vezetőjének nemzetközi mércével is kivételes citogenetikai vizsgálatait, melynek eredményei nagyban segítettek munkánk elismerését.

Külön köszönöm Nadir R. Farid Professzor Úrnak értékes támogatását, aki a Memorial University of Newfoundland kutatója és az Amerikai Pajzsmirigy Társaság

(ATA) vezetőségi tagja és több pajzsmirigy témájú könyv szerzője. Közreműködésével számos nemzetközi fórumon mutattuk be eredményeinket és elismert folyóiratokban jelentek meg közleményeink.

Hálával tartozom Nemes Zoltán Professzor Úrnak, a DEOEC Patológiai Intézetének igazgatójának és munkatársainak értékes tanácsaiért, útmutatásaiért, a patológiai diagnózisok pontosságáért.

Köszönöm Petri Idikónak az Országos Vérellátó Szolgálat Szegedi Regionális Vértranszfúziós Központ munkatársának (Szegedi Tudomány Egyetem) a high resolution HLA tipizálás elvégzését és nélkülözhetetlen tanácsait.

Végül köszönöm családomnak a türelmet, a megértést és a támogatást amely lehetővé tette, hogy tőlük oly sok időt távol töltve elkészíthettem ezt a disszertációt.

7. Irodalomjegyzék

- Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N., Perucho M. (1988) Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 53 (4): 549-54.
- Amiel J. C. (1967) Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: *Histocompatibility Testing* Curtoni, E.S., Mattiuz P.L., Tosi R.M. eds. Copenhagen: Munksgaard
- Antonini P., Venuat A.M., Linares G., Caillou B., Berger R., Parmentier C. (1989) A translocation (7;10)(q35;q21) in a differentiated papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer Genet Cytogenet*. 41 (1): 139-44.
- Balázs Gy., Krasznai G., Mantse L., Csáky G. (1973) Pajzsmirigy-rák fiatal kori nyaktáji röntgen besugárzás után. *Magyar Onkológia*. 17: 133-138.
- Balázs Gy., Lukács G., Csáky G., Arday G. (1979) Adatok a pajzsmirigy-rákok epidemiológiájához. *Magyar Onkológia*. 23, 63-67.
- Barbacid M. (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem*. 56: 779-827. Review.
- Bartnitzke S., Hermann., M.E., Lobeck H., Zuschneid W., Neuhaus P., Bullerdiek J. (1989) Cytogenetic findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t (10;19). *Cancer Genet Cytogenet*. 39 (1): 65-68.
- Benedict W.F., Murphree A.L., Banerjee A., Spina C.A., Sparkes M.C., Sparkes R.S. (1983) Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science*. 219 (4587): 973-975.
- Beregi E., Jankovics R., Brasch Z. *Malignant tumors of the thyroid gland*. Akadémiai Kiadó Budapest (1967)
- Bergholm U., Adami H.O., Telenius-Berg M., Johansson H., Wilander E. (1990) Incidence of sporadic and familial medullary thyroid carcinoma in Sweden 1959 through 1981. A nationwide study in 126 patients. Swedish MCT Study Group. *Acta Oncol*. 29 (1): 9-15.
- Bondeson L., Ljunberg O. (1984) Occult papillary thyroid carcinoma in the young and the aged. *Cancer*. 53: 1790-1792.
- Bongarzone I., Pierotti M.A., Monzini N., Mondellini P., Manenti G., Donghi R., Pilotti S., Grieco M., Santoro M., Fusco A. (1989) High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*. 4 (12): 1457-62.
- Bos J.L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 49 (17): 4682-9. Review. Erratum in: *Cancer Res*. 1990 Feb 15; 50 (4): 1352.
- Böttger T., Klupp J., Sorger K., Junginger T. (1991) Therapy and prognosis of medullary thyroid cancer *Med Klin. (Munich)* 86 (1): 8-14.
- Böyum A. (1968): Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand J Lab Invest*. 21; Suppl. 97, 77
- Bussolati G., Pearse A. G., (1967) Immunofluorescent localization of calcitonin in the C cells of pig and dog thyroid. *J Endocrinol*. 37(2): 205-209.
- Caspersson T., Zech. L, Johansson C. (1970) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*. 60, 315-319. 6.
- Cory S. (1986) Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Advances in Cancer Research*. 47:189-234.
- Csáky G., Balázs Gy., Fábrián E., Iványi J.L., Lukács G., Makár V. (1981) Nyaktáji haemangioma röntgen besugárzásának következtében kialakult pajzsmirigy elváltozások. *Orvosi Hetilap* 122: 2599-2602

- Deftos L.J. (1973): Radio immunoassay for calcitonin in medullary thyroid carcinoma. *J Amer med Ass.* 227: 403.
- Dermody W.C., Rosen M.A., Ananthaswamy R., McCormick W.M., Levy A.G. (1981) Characterization of the major forms of human calcitonin in tissue and serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 52 (6): 1090-8.
- Dralle H., Robin-Winn M., Reilmann L., Laue A., Torok M. (1986) HLA and thyroid cancer. *Klin Wochenschr.* 64: 522-525.
- Duffy B.J. Jr., Fitzgerald P.J. (1950) Cancer of the thyroid in children: a report of 28 cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 10(10):1296-1308.
- Duncan W (1980): Thyroid cancer. *Recent Results Cancer Res.* 73.
- Duncan, W. (1980a): Thyroid cancer. W. Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York.
- Farid, N.R., Newton, R.M., Noel E.P., Marshall W. H. (1977) Gm phenotypes in autoimmune thyroid disease. *Journal of Immunogenetics*, 4: 429-432.
- Farid N.R. (1989) Are the immune responses to endocrine autoantigens genetically restricted? *Autoimmunity.* 3(1): 47-55.
- Farid N.R. (Ed.) (2004) *Molecular Basis of Thyroid Cancer Series: Cancer Treatment and Research.* Vol. 122 VII: 444 p. Hardcover ISBN: 1-4020-8106-5
- Farndon J.R., Leight G.S., Dilley-W.G., Baylin S.B., Smallridge R.C., Harrison T.S., Wells .SA. Jr. (1986) Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg.* 73 (4): 278-81
- Favus M.J., Schneider A.B., Stachura M.E., Arnold J.E., Ryo U.Y., Pinsky S.M., Colman M., Arnold M.J., Frohmann L.A. (1976) Thyroid cancer occurring as a late consequence of head and neck irradiation: evaluation of 1056 patients. *N Engl J Med.* 294: 1019-1025
- Fearon E.R., Feinberg A.P., Hamilton S.H., Vogelstein B. (1985) Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature.* 318 (6044): 377-80.
- Feinberg A.P. (1988) Alterations in DNA methylation in colorectal polyps and cancer. *Prog Clin Biol Res.* 279: 309-17.
- Feinberg A. P. (1986) Changes in allelic zygosity are a common feature of human epithelial malignancies. 7th International Congress of human genetics. Berlin Sept. 22-26 Abstracts p. 557: Part II.
- Foster G.V., Baghdiantz A., Kumar M.A., Slack E., Soliman H.A., MacIntyre I. (1964) Thyroid Origin of Calcitonin. *Nature.* 202: 1303-5.
- Fuchsig P., Keminger K. (1967) Das Schilddrüsenadenom im Endemiegebiet. *Brunns' Beitr Klin Chir.* 214: 32-40
- Fusco A., Grieco M., Santoro M., Berlingieri M.T., Pilotti S, Pierotti M.A., Della Porta G., Vecchio G. (1987) A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature.* 328(6126): 170-2.
- Gutekunst R, Scriba PC. (1989) Goiter and iodine deficiency in Europe. The European Thyroid Association report as updated in 1988. *J Endocrinol Invest.* 12(3):209-20. Review.
- Harach H.R., Williams E.D. (1995) Childhood thyroid cancer in England and Wales. *Br-J-Cancer.* 72 (3): 777-83
- Harach-H.R; Williams-E.D. (1995a) Thyroid cancer and thyroiditis in the goitrous region of Salta, Argentina, before and after iodine prophylaxis. *Clin Endocrinol Oxf.* 43(6): 701-6
- Hazard, J.B., Hawk W.A., Crille G. (1959) Medullary (solid) carcinoma of the thyroid. A clinico-pathologic entity. *J Clin Endocrinol.* 19: 152-161.
- Heizmann O., Haecker F.M., Zumsteg U., Muller B., Oberholzer M., Oertli D. (2005) Presymptomatic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia 2a. *Eur J Surg Oncol.* Nov 30; [Epub ahead of print]
- Hoff H.G., Reinwein D. (1980) Radiojodbehandlung der diffuses Hyperthyreose vom Typ Morbus Basedow. *Intern Welt.* 7: 264-270
- Hofstra Robert M.W., Rudy M. Landsvater, Isabella Ceccherini, Rein P. Stulp, Tineke Stelwagen, Yin Luo, Barbara Pasini, Jo W.M. Hoppener, Hans Kristian Ploos van Amstel,

- Giovanni Romeo, Cornells J.M., Lips Charles H.C.M. Buys. (1994) A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 367: 375-376
- Holm L.E., Blomgren H., Löwhagen T. (1985) Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med*. 312: 601-604.
- Holm R, Sobrinho-Simoes M, Nesland JM, Gould VE, Johannessen JV. (1985) Medullary carcinoma of the thyroid gland: an immunocytochemical study. *Ultrastruct Pathol*. 8 (1): 25-41.
- ISCN (1978) International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Birth Defects. Original Article Series. Vol. XIV, no. 8. (The National Foundation, New York, 1978) also in *Cytogenet Cell Genet*. 21: 309—404.
- Juhász F., Stenszky V., Bartha I., Balázs Gy. (1983): A complex clinical and genetic analysis of patients with medullary thyroid carcinoma. *Acta Endocrinol. Suppl*. 252.
- Juhász F., Stenszky V., Kozma L., Farid, N.R. (1986): The relation of susceptibility to and biologic behavior of thyroid epithelial cell cancer to HLA-DR1, *Cancer*, 58:52-54.
- Juhász F., Balázs Gy., Kozma L., Kraszits E., Stenszky V., Farid N. R. (1986a): Interaction of IgG heavy-chain allotypes (Gm) and HLA in conferring susceptibility to thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol*. 25:17-21.
- Juhász F., Boros P., Szegedi Gy., Balázs Gy., Surányi P., Kraszits E., Stenszky V., Farid R. (1989): Immunogenetic and Immunologic Studies of Differentiated Thyroid Cancer. *Cancer*, 63, 1318-1326.
- Juhász F., Stenszky V., Lukács G., Gyóry F., Lenkey Á. Családvizsgálatok medulláris pajzsmirigyrákokban. *Magyar Sebészet*. 1993, 46: 361-368.
- Juhász F., Kozma L., Stenszky V., Gyóry F., Lukács G., Farid NR. (2005) Well differentiated thyroid carcinoma is associated with human leucocyte antigen D-related 11 in Eastern Hungarians a case of changing circumstances. *Cancer*. Oct 15; 104 (8): 1603-8.
- Krengel U, Schlichting L., Scherer A., Schumann R., Frech M., John J., Kabsch W., Pai E.F., Wittinghofer A. (1990) Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell*. 62 (3): 539-48.
- Knudson A.G Jr. (1983) Contribution and mechanisms of genetic predisposition to cancer: hereditary cancers and anti-oncogenes. *Prog Clin Biol Res*. 132C: 351-60.
- Koutras D.A. (1980) Survey-Europe and Middle East. In: J. B. Stanbury and B. S. Hetzel (eds.) *Endemic Goiter and Endemic Cretinism*, pp. 79-100. New York: John Wiley & Sons.
- Larry D. Greenfield (Ed) (1978) *Thyroid cancer: Chapter 6 pathology of thyroid cancer* 1110. Crc Press Inc.
- Larsen, B., Thompson C., Kwan A., Farid, N.R. (1986): Lack of association of HLA with thyroid cancer. *Tissue Antigens* 28: 298-300.
- Le Douarin N, Le Lievre C. (1970) Demonstration of neural origin of calcitonin cells of ultimobranchial body of chick embryo *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 270 (23): 2857-60.
- Lemoine N.R., Mayall E.S., Wyllie F.S., Farr C.J., Hughes D., Padua R.A., Thurston V., Williams E.D., Wynford-Thomas D. (1988) Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res*. 48 (16): 4459-63.
- Lemoine N.R., Mayall E.S., Wyllie F.S., Williams E.D., Goyns M., Stringer B., Wynford-Thomas D. (1989) High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*. 4 (2): 159-64.
- Lukács GL, Balázs G, Zs-Nagy I. Cytofluorimetric measurements on the DNA contents of tumor cells in human thyroid gland. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1979;95(3):265-71.
- Lukács G., Balázs Gy., Zs.-Nagy I., Juhász F. (1990) Die prognostische Bedeutung des nukleären DNS-Gehalts bei hochmalignen Schilddrüsentumoren. *W Klin Wschr*. 102: 253-256).

- Lukács G., Balázs Gy., Juhász F. (1991a) A radikalitás szempontjai a papilláris típusú pajzsmirigyrákok regionális nyirokcsomó-metasztázisainak kezelésében (klinikai tanulmány). *Magyar Sebészet.* 44: 113-117.
- Lukács G., Balázs Gy., Mikó T., Juhász F., Pálffy A. (1991b) Klinikum és morfológia a folliculáris szerkezetű pajzsmirigy-tumороk szelektív műtéti kezelésében. *Magyar Sebészet.* 44, 165-171.
- Lukács G., Balázs Gy., Molnár P., Juhász F., Gyóry F (1991c) Pajzsmirigykarcinóma és benignus pajzsmirigybetegség együttes előfordulása. *Magyar Sebészet.* 44, 281-287.
- Lukács G., Balázs Gy., Juhász F., Thomázi V., Gyóry F. (1992a) A medulláris pajzsmirigyrák kezelése és prognózisa. *Magyar Sebészet.* 45: 313-320.
- Lukács G., Miltényi L., Uray É., Gyóry F., Juhász F., Molnár P., Balázs Gy. (1993) Interdiszciplináris együttműködés a magasmalignitású pajzsmirigy-tumороk kezelésében. *Magyar Sebészet.* 46: 1-6.
- Mark J. Ekedahl C., Dahlenfors R., Westermarck B. (1987) Cytogenetical observations in five human anaplastic thyroid carcinomas. *Hereditas* 107: 163-174.
- McDougall I.R., Kennedy J.S., Thomson J.A. (1971) Thyroid carcinoma following iodine - 131 therapy. Report of a case and review of the literature. *J Clin Endocrinol. Metab.* 33: 287-292
- McLachlan G.J, Do K.A., Ambroise C. (2004) *Analyzing Microarray Gene Expression Data.* John Wiley & Sons, Inc. 320pp. ISBN:0-471-22616-5
- McLachlan G.J. (2005) *Discriminant analysis and statistical pattern recognition.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- McCormick F. (1989) ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell.* 56 (1): 5-8. Review.
- Mempelmann L.H., Furth J. (1978) Etiology of thyroid cancer. In: Greenfield. L. R. (ed.) *Thyroid Cancer.* West Palm Beach FL: CRC Press. Inc. 37-49.
- Mulligan L.M., Charis Eng., Catherine S. Healey, David Clayton, John B.J. Kwok, Emily Gardner, Margaret A. Ponder, Andrea Frilling, Charles E. Jackson, Hendrik Lehnert, Hartmut P.H. Neumann, Stephen N. Thibodeau , Bruce A.J. (1994) Ponder Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC *Nature Genetics* 6: 70 - 74
- Mustacchi, P., Cutler, S. J. (1956): Some observations on the incidence of thyroid cancer in the United States. *N Eng J Med.* 255: 889.
- No authors listed (1985) Radiation-induced thyroid cancer. *Lancet.* Jul 6; 2 (8445): 21-2.
- Oláh É., Balogh E., Kovács I., Kiss A. (1989) Abnormalities of chromosome 1 in relation to human malignant diseases. *Cancer Genet Cytogenet.* 43 (2): 179-94.
- Oláh-É., Balogh E., Boján F., Juhász F., Stenszky V., Farid N.R. (1990) Cytogenetic analyses of three papillary carcinomas and a follicular adenoma of the thyroid. *Cancer Genet Cytogenet.* 44(1): 119-29
- Oláh É., Balogh E., Boján F., Pásti G., Losonczi L., Juhász F., Stenszky V., Farid N.R. Kromoszómavizsgálat pajzsmirigy papilláris karcinómában és folliculáris adenomában. *Orvosi Hetilap.* 1991, 132 (6): 281-336.
- Panza N, Del Vecchio L, Maio M, De Felice M, Lombardi G, Minozzi M, Zappacosta S.(1982) Strong association between HLA-DR antigen thyroid carcinoma. *Tissue Antigens.* 2: 155-158.
- Parker L.N., Belsky J., Yamamoto T., Kawamoto S., Keehn R. (1974) Thyroid carcinoma after exposure to atomic radiation. A continuing survey of a fixed population, Hiroshima and Nagasaki 1958-1971. *Ann. Intern. Med.* 80, 600-604
- Pearse A.G. (1966) Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormones with particular reference to calcitonin and the thyroid C-cells. *Vet Rec.* 79: 587-590.

- Pearse A.G., Polak JM. (1971) Cytochemical evidence for the neural crest origin of mammalian ultimobranchial C cells. *Histochemie* 27 (2): 96-102.
- Pendergast, W. J., Milmore, B. K., Marcus, S. C (1961): Thyroid cancer and thyrotoxicosis in the United States: their relation to endemic goiter. *J Chron. Dis.* 13: 22-38.
- Perkel VS, Gail MH, Lubin J, Pee DY, Weinstein R, Shore-Freedman E, Schneider AB. (1988) Radiation-induced thyroid neoplasms: evidence for familial susceptibility factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 66 (6): 1316-22.
- Petrányi Győző (1986). *Az immunogenetika alapjai.* Medicina Könyvkiadó, Budapest.
- Polak J.M., Pearse A.G., Le Lievre C., Fontaine J., LeDouarin N.M. (1974) Immunocytochemical confirmation of the neural crest origin of avian calcitonin-producing cells. *Histochemistry.* 40 (3): 209-14.
- Ramalingaswami V. (1969) Iodine and thyroid cancer in man. In: Ch.E. Hedinger: *Thyroid Cancer UICC Monograph Series.* Springer Verlag Berlin 12. 111.
- Refetoff S., Harrison J., Karanfilski B.T., Kaplan E.L., De Groot L.J., Bekerman C. (1975) Continuing occurrence of thyroid carcinoma after irradiation to the neck in infancy and childhood. *N Engl J Med.* 292 (4): 171-5.
- Riccabona G. (1972) *Die endemische Struma.* Urban - Schwarzenberg, München,
- Rigopoulou D., Martinez Laso J., Martinez Tello F., Alcaide J.F., Benmamar D., Hawkins F., Arnaiz Villena A. (1994) Both class I and class II HLA antigens are thyroid cancer susceptibility factors. *Tissue Antigens.* 43 (5): 281-5.
- Rodenhuis S., Slebos R.J., Boot A.J., Evers S.G., Mooi W.J., Wagenaar S.S., van Bodegom P.C., Bos J.L. (1988) Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.* 48 (20): 5738-41.
- Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, van Zandwijk N. (1997) Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. *J Clin Oncol.* 15 (1): 285-91.
- Rodenhuis S. (1992) ras and human tumors. *Semin Cancer Biol.* 3 (4): 241-7.
- Salgó M., Farkas I. (1990) Ivóvizeink jódtartalma és a lakosság jódeállottságának mutatói. *Egészségtudomány* 34: 28-33.
- Salgó M., Farkas I., Biró György (1989): A lakossági jódeállítás problémái 1988-ban. *Egészségtudomány.* 33: 78-83.
- Santoro M., Carlomagno F., Romano A., Bottaro D.P., Dathan N.A., Grieco M., Fusco A., Vecchio G., Matoskova B., Kraus M.H. (1995) Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science.* 267 (5196): 381-3.
- Schaller R.T., and Stevenson, J.K. (1966) Development of carcinoma of the thyroid in iodine deficient mice. *Cancer (Phila).* 19: 1063-1080,
- Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 2: 971-972.
- Sherman S.I, Brierley J.D., Sperling M., Ain K.B., Bigos S.T., Cooper D.S., Haugen B.R., Ho M., Klein I., Ladenson P.W., Robbins J., Ross D.S., Specker B., Taylor T., Maxon H.R. (1998) Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer.* 83 (5): 1012-21.
- Shi Y.F., Zou M.J., Schmidt H., Juhász F., Stenszky V., Robb D., Farid N.R. (1991) High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res.* 51 (10): 2690-3.
- Shibata D., Kurosu M., Noguchi T.T. (1991) Fixed human tissues: a resource for the identification of individuals. *J Forensic Sci.* 36 (4): 1204-12.
- Silink K. (Ed) (1966) *Endemics of goiter and thyroid cancer.* In: *Tumors of the thyroid gland.* Appaix A. Karger, Basel-New York p.215.

- Sipple J.H. (1961) The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med.* 31: 163-166.
- Slater R.M., de Kraker J. (1982) Chromosome number 11 and Wilms' tumor. *Cancer Genet Cytogenet.* 5 (3): 237-45.
- Smit V.T., Boot A.J., Smits A.M., Fleuren G.J., Cornelisse C.J., Bos J.L. (1988) K ras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.* 16 (16): 7773-82.
- Sokal J. E. (1960) The incidence of thyroid cancer and the problem of malignancy in nodular goiter, in Astwood EB (ed): *Clinical Endocrinology.* New York, Grune and Stratton Inc. 1. 168.
- Sridama V., Hara Y., Fauchet R., DeGroot L. J. (1986) Association of differentiated thyroid carcinoma with HLA-DR7. *Cancer.* 56: 1086-1088.
- Szántó J., Vincze B., Revitzky A. (1982) Medulláris pajzsmirigyrákban szenvedő betegek családtagjainak szűrése. *Orvosi Hetilap.* 123: 1737-1740.
- Szántó L., Szántó J. (1979) A pajzsmirigy medulláris rákja. *Orvostudomány Aktuális Problémái,* 33: 39-54.
- Telenius Berg M. (1976) Diagnostic studies in medullary carcinoma of the thyroid. New methods for early diagnosis in families with Sipple*s syndrome. *Acta-Med. Scand-Suppl.* 597. 1-59.
- Terasaki P.I., Mcllelland J.D. (1964) Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 204: 998-1000.
- Teyssier J.R. (1987) Nonrandom chromosomal changes in human solid tumors; application of an improved culture method. *J Natl Cancer Inst* 79: 189-198.
- Thorsby E. Human histocompatibility antigens (HL-A-antigens). (1970) Genetic studies and identification of "new" HL-A-antigens. *Nord Med.* 83 (7): 193-7
- Thorsby E. (1997) HLA associated diseases. A summary of the 12th International Histocompatibility Workshop component. In: *Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication,* Charron, D. ed. Medical and Scientific International Publisher, Paris, pp. 91-96,
- Thorsby E. (1997a) Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol.* 53 (1): 1-11.
- Tobler P.H., Johl A., Born W., Maier R., Fischer J.A. (1982) Identity of calcitonin extracted from normal human thyroid glands with synthetic human calcitonin (1-32). *Biochim Biophys Acta.* 707 (1): 59-65.
- Trahey M., McCormick F.. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science.* 238 (4826): 542-5.
- van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. (2002) Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cell. *Immunol Rev.* 188: 51-64.
- van der Linden S.M., Valkenburg H.A., de Jongh B.M., Cats A. (1984) The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* 27 (3): 241-9.
- van Herle A.J., Vassart G., Dumont J.E. (1979) Control of thyroglobulin synthesis and secretion. *N Engl J Med.* 301 (5): 239-49.
- van Loghem (1973) Genetics of human immunoglobulin. In: *Handbook of experimental Immunology, Vol.1* pp12,1-18 Blackwell Scientific Publication, Oxford
- Vanderlaan, W.P. (1947) The occurrence of carcinoma of the thyroid gland in autopsy material. *N Engl J Med.* 237: 221.
- Verby J.E., Woolner L.B., Nobrega, F.T., Kurland, L.T., McConahey, W.M., (1969): Thyroid cancer in Olmsted County, 1935-1965. *J. Natl Cancer Inst.* 43: 813.
- Wegelin C. (1928) Malignant disease of the thyroid gland and its relation to goitre in man and animals. *Cancer Rev.* 3, 297.

- Weissel M., Kainz H., Hoefler, R., Mayr. W. R. (1988) HLA-DR and differentiated thyroid cancer - lack of association with nonmedullary types and possible association with the medullary type. *Cancer*. 62 (12): 2486-2488.
- Wells S.A. Jr, Ontjes D.A, Cooper C.W., Hennessy J.F., Ellis G.J., McPherson H.T., Sabiston D.C. Jr. (1975) The early diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland in patients with multiple endocrine neoplasia type II. *Ann Surg*. 182 (4): 362-70.
- Wells S.A., Dilley W. G., Farndon J. A., Leight G., S., Baylin S. B. (1985) Early diagnosis and treatment of medullary thyroid carcinoma. *Arch Intern Med*. 145: 1248-1252.
- Whang Peng J., Kao-Shan C.S., Lee E.C., Bunn P.A., Carney D.N., Gazdar A.F., Minna J.D. (1982) Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p(14-23). *Science*. 215 (4529): 181-2.
- Wiener J.D., Thijs L.G., Meijer S. (1975) Thyroid carcinoma after 131 J treatment for hyperthyroidism. *Acta Med. Scand*. 198: 329-330
- Williams, E.D., Brown C.L., Doniach I. (1966) Pathological and clinical findings in a series of 67 cases of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Pathol*. 19 (2): 103-113.
- Williams, E.D. (1966a) Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J. Clin. Pathol*. 19, 114-118.
- Williams E.D. (1977) The epidemiology of thyroid cancer. *Ann Radiol (Paris)*. 20 (8): 722-4.
- Winship T. (1967) Management of patients with cancer of the thyroid. *Cancer*. 20: 1815-1818
- Witt Th.R., Meng L.R., Elconomou St.G., Southwick H.W. (1979) The approach to the irradiated thyroid. *Surg Clin N Amer*. 59: 45-63
- Woolf B. (1955) On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 19 (4): 251-3.
- Wright P.A., Lemoine N.R., Mayall E.S., Wyllie F.S., Hughes D., Williams E.D., Wynford Thomas D. (1989) Papillary and follicular thyroid carcinomas show a different pattern of ras oncogene mutation. *Br J Cancer*. 60 (4): 576-7.
- Young J.L. jr., Percy, C.L., Asire A.J. (eds) (1981) Surveillance, Epidemiology, and End Results: Incidence and Mortality Data, 1973-77, National Cancer institute Monograph. 57, NIH Publication no. 81-2330, 1082 pages.
- Yunis J.J., Lewandowski R.C. (1983) High-resolution cytogenetics. *Birth Defects Orig Artic Ser.*;19(5):11-37. Review.
- Yunis J.J. (1981) New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Pathol*. Jun; 12 (6): 540-9.
- Zeki K, Tanaka Y, Morimoto I, Nishimura Y, Kimura A, Yamashita U, Eto S. (1998) Induction of expression of MHC-class-II antigen on human thyroid carcinoma by wild-type p53. *Int J Cancer*. 75 (3): 391-5.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. F. Juhász, Gy. Balázs, Valéria Stenszky, L. Kozma and N.R. Farid. The relation of susceptibility to and biologic behavior of thyroid epithelial cell cancer to HLA. *Cancer*. 1986, 58: 52-54. **IF: 2, 33**
2. F. Juhász, Gy. Balázs, L. Kozma, E. Kraszits, Valéria Stenszky and N.R. Farid. Interaction of IgG Heavy-chain allotypes /Gm/ and HLA in conferring susceptibility to thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 1986, 25: 17-21. **IF: 2, 388**
3. F. Juhász, P. Boros, Gy. Szegedi, Gy. Balázs, P. Surányi, E. Kraszits, Valéria Stenszky and N.R. Farid. Immunogenetics and immunologic studies of differentiated thyroid cancer. *Cancer*. 1989, 63: 1318-1326. **IF: 2, 313**
4. Éva Oláh, F. Juhász, F. Boján, Valéria Stenszky, N.R. Farid. Cytogenetic analyses of three papillary carcinomas and a follicular adenoma of the thyroid. *Cancer Genet Cytogenet*. 1990, 44: 119-129. **IF: 2, 392**
5. Oláh É., Balogh E., Boján F., Pásti G., Losonczi L., Juhász F., Stenszky V., Farid N.R. Kromoszómvizsgálat pajzsmirigy papilláris karcinómában és folliculáris adenomában. *Orvosi Hetilap*. 1991, 132 (6): 281-336.
6. Shi Y.F., Zou M.J., Schmidt H., Juhász F., Stenszky V., Robb D., Farid N.R. High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res*. 1991 May 15, 51 (10): P 2690-3. **IF: 4, 383**
7. Juhász F., Stenszky V., Lukács G., Gyóry F., Lenkey Á. Családvizsgálatok medulláris pajzsmirigyrákokban. *Magyar Sebészet*. 1993, 46: 361-368.
8. F. Juhász, L. Kozma, V. Stenszky, F. Gyóry, G. Lukács, N.R. Farid. Well differentiated thyroid carcinoma is associated with human leucocyte antigen D-related 11 in Eastern Hungarians. *Cancer*. 2005 Oct 15, 104 (8): 1603-8. **IF: 4, 434**

Impact faktor: 18, 24

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ, DE ABBAN NEM FELHASZNÁLT
TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. E. Bodolay, Gy. Szegedi, P. Surányi, F. Juhász, V. Stenszky, Cs. Balázs, N. R. Farid. Expression of HLA-DR antigens by thyroid cells: the effect of Graves IgG. Immunology Letters. 1987. 15. 77-81 **IF: 1, 241**
2. Fábrián E., Balázs Gy., Lukács G., Csáky G., Juhász F. Pajzsmirigydagaganatok preoperatív igazolása finomtű-aspiratioval. Magyar Sebészet. 1987, 40: 121-126
3. V. Stenszky, C. Balázs, E. Kraszits, F. Juhász, L. Kozma, Gy. Balázs and N. R. Farid. Association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR 3 in Eastern Hungary. Journal of Immunogenetics. 1987, 14: 143-148 **IF: 1, 250**
4. Balázs Gy., Lukács G., Fábrián E., Csáky G., Juhász F. A pajzsmirigy hideg göbök differenciáldiagnosztikája. Orvosképzés. 1987, 62: 471-477
5. Edith Bodolay, Péter Surányi, Ferenc Juhász, Valeria Stenszky, Csaba Balázs, N. R. Farid. Methimazol blocks Graves IgG but not interferon- γ -HLA-DR expression by thyroid cells. Immunology Letters. 1988, 18: 167-172
IF: 1, 137
6. Surányi P., Szegedi Gy., Damjanovich S., Juhász F., Stenszky V., Farid N.R. B_Lymphocyte subsets in Hashimoto Thyroiditis. Immunology Letters. 1989, 22(2): 147-1450. **IF: 1, 241**
7. Lukács G., Balázs Gy., Juhász F. A radikalitás szempontjai a papilláris pajzsmirigyrákok regionális nyirokcsomó-metasztázisainak kezelésében. Magyar Sebészet. 1991, 44: 113-117
8. Lukács G., Balázs Gy., Mikó T., Juhász F., Pálffy A. Klinikum és morfológia a folliculáris szerkezetű pajzsmirigy-tumorer szeptektív mütéti kezelésében. Magyar Sebészet. 1991, 44: 165-171
9. Lukács G., Balázs Gy., Molnár F., Juhász F., Gyóry F. Pajzsmirigykarcinóma és benignus pajzsmirigybetegség együttes előfordulása. Magyar Sebészet. 1991, 44: 281-287.
10. Lukács G., Balázs Gy., Juhász F. A radikalitás szempontjai a papilláris típusú pajzsmirigyrákok regionalis nyirokcsomó-metasztázisainak kezelésében Magyar

- Sebészet. 1991, 44: 113-117
11. Lukács G., Balázs Gy., Uray É., Juhász F. Differenciált szerkezetű pajzsmirigyrákok tüdő-és csontátéteinek kezelése. Orvosi Hetilap. 1991, 132: 2687-2690
12. Gy. Balázs, E. Fábán, G. Lukács, F. Juhász. Rapid cytological diagnosis during thyroid surgery. European Journal of Surgical Oncology. 1992, 18: 1-6
IF: 0, 450
13. Lukács G., Balázs Gy., Juhász F., Thomázy V., Győry F. A medulláris pajzsmirigyrák kezelése és prognózisa. Magyar Sebészet. 1992, 45: 313-320
14. Lukács G., Miltényi L., Uray É., Győry F., Juhász F., Molnár P., Balázs Gy. Interdiszciplináris együttműködés a magas malignitású pajzsmirigy tumorok kezelésében. Magyar Sebészet. 1993, 46: 1-6
15. Lukács G., Győry F., Juhász F. Differenciált szerkezetű pajzsmirigyrákok recidíváinak prognosztikai jelentősége. Magyar Sebészet. 1993, 46: 351-360.
16. Juhász F., Balázs Gy., Lukács G., Lenkey Á., Győry F. Thyreoglobulin meghatározások értéke differenciált pajzsmirigycarcinómában szenvedő betegek utókezelésében. Orvosi Hetilap. 1994, 135: 849-853
17. A.F. Ahmad, V. Stenszky, F. Juhász, Gy. Balázs, N. R. Farid. No Mutations in the Translated Region of Exon 1 in the TSH Receptor in Graves Thyroid Glands. Thyroid 1994, 4: N. 2. **IF: 1, 695**
18. Gy. Balázs, G. Lukács, F. Juhász, F. Győry, Éva Oláh, Erzsébet Balogh. Special features of childhood and juvenile thyroid carcinomas Surgery Today Jpn J Surg. 1996, 26: 536-540 **IF: 0, 171**
19. Győry F., Lukács G., Nagy V. E, Juhász F., Mezősi E., Szakáll Sz., Máth J., Balázs Gy. Differenciált pajzsmirigy carcinoma: prognosztikai faktorok vizsgálata. Orvosi Hetilap. 2001, 54: 69-74
20. Győry F., Lukács G., Juhász F., Mezősi E., Szakáll Sz., T. Végh, Máth J., Balázs Gy. Surgically treated Hashimoto Thyroiditis. Acta Chir Hungarica. 1999, 38 3-4: pp. 243-247
21. Győry F, Balázs G, Nagy EV, Juhász F, Mezősi E, Szakáll S, Máth J, Lukács G. Differentiated thyroid cancer and outcome in iodine deficiency. Eur J Surg Oncol. 2004 Apr, 30 (3): 325-31 **IF: 1. 882**

22. Puskas LG, Juhasz F, Zarva A, Hackler L, Farid J, Farid N. Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors. *Cell Mol Biol* 2005 Sep 5, 51-2: 177-186 **IF: 0. 873**

Impact faktor: 9,930

KÖNYVRÉSZLETEK

1. T. Mikó, G. Lukács, Gy. Balázs, F. Juhász. Reliability of frozen section diagnosis of the thyroid. *Verh Dtsch Krebs Ges.* 1983, 4: 629. **Gustav Fischer Verlag Stuttgart NewYork**
2. Balázs György, Juhász Ferenc. Pajzsmirigygyulladások. 1989, 57-59,. **Medicina** Szerk. : Balázs György A pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy sebészete
3. G. Lukács, G. Balázs, P.Molnár, F. Juhász, F. Győry. Gleichzeitiges Auftreten von Schilddrüsenkarzinomen und benigner Schilddrüsenerkrankung. In: W. Pimpl, *Derzeitiger Stand in Diagnose und Therapie der Struma Maligna* **Springer Verlag Berlin** 1993, 27-37
4. F. Juhász, Zs. Kincses, F. Győry, Zs. Kanyári, B. Megyeri and Gy. Balázs. Surgical and medical treatment of abdominal carcinoid tumors 8 th World Congress of the International Gastro-Surgical Club Strasbourg (France), 1998, April 15-18, **International Proceedings Division** Eds: H. Bismuth, J. P.Galmiche, M. Huguier, D. Jaeck (Monduzzi Editore)
5. L.G. Puskas, F. Juhasz, A. Zarva, L. Hackler, Jr. and N. R. Farid. Distinction Between Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis by Gene Profiling **The Journal of Endocrine Genetics** 2005, Volume 4: No. 1,

ABSTRACT, SUPPLEMENTUM, COMMENT

1. Juhász F., Stenszky V., Bartha I., Balázs Gy.: A complex clinical and genetic analysis of patients with medullary thyroid cancer. Acta Endocrinologica. 1983,. 102:.. Suppl. 252 **IF: 2, 241**
2. F. Juhász, Valéria Stenszky, Gy. Balázs, L. Kozma and N. R. Farid. Epithelial thyroid cell carcinoma is associated with DR 1. International Meeting on Immunogenetics of endocrine Disorders. St.John,s , New Foundland. Canada. 1985. augusztus 24-27. Abstracts, 23.
3. V. Stenszky, F. Juhász, Gy. Balázs, B. Larsen, N. R. Farid. HLA and IgG heavy chain markers /GM/ in differentiated thyroid carcinoma. XIII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Abstracts. 1986.
4. F. Juhász, V. Stenszky, Gy. Balázs, B. Larsen, N. R. Farid. HLA and IgG heavy chain markers (Gm) in DTC. 14-th International Cancer Congress. Budapest, 1986. augusztus 21-27. Abstract of Lectures. Vol. 3. 4527.
5. V. Stenszky, C. Balázs, E. Kraszits, F. Juhász, L. Kozma, Gy. Balázs and N. R. Farid. Association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR 3 in Eastern Hungary. Journal of Immunogenetics. 1987, 14: 143-148
6. Balázs Gy., Lukács G., Fábíán E., Csáky G., Juhász F. A pajzsmirigy hideg göbök differenciáldiagnosztikája. Orvosképzés. 1987, 62. 471-477.
7. Sáy P., Péter M., Balogh E., Juhász F. Schwere chronische Entzündung im Pankreaskopf - negatives ERCP. Acta Chir Austriaca. 1988, 3: 153-154
8. Gy. Balázs, G. Lukács, G. Csáky, F. Juhász and E. Fábíán. Reeingriffe bei papillären Schilddrüsenkarzinom. Acta Chir Austriaca. 1988, Sonderheft/Jahrgang. 20.
9. F. Juhász und L. Varga. Anwendungsmöglichkeiten des Ebrimycin-gels in der septischen Abteilung der allgemeinen Chirurgie? Acta Chir Austriaca. 1988, Heft 3.
10. Gy. Balázs, G. Lukács, F. Juhász, Éva Uray. Komplexe Behandlung des papillären Schilddrüsenkarzinom ohne Radiojodtherapie. Acta Chir Austriaca. 1988, Heft 3.

11. G. Lukács, F. Juhász, Valeria Stenszky, Gy. Balázs, B. Larsen, Farid N.R. HLA and IgG heavy chain markers (Gm) in differentiated thyroid carcinoma. Medicine, Biologie, Environment. 1990, 18: 35-37.
12. F. Juhász, I. Erdei, Zs. Kanyári. Metal allergy as a possible cause for the early reoperation after laparoscopic cholecystectomy. 4-th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery Trondheim Norway 1996. júnus 23-26. Abstract.
13. Juhász F., Farid N. R. Immune response to papillary thyroid carcinoma. (Letter: Comment) J Clin Endocrinol Metab. 1996 Nov, 81(11): 4175-6. **IF: 5. 778**
14. G. L. Lukács, Gy. Balázs, F. Győry, F. Juhász, Sz. Szakáll. Chirurgische Strategie bei Strumen im Kindesalter. Acta Chir.Austriaca. Suppl. Nor. 141. 8. 1998.
15. Juhász F.,Kanyári Zs.,Győry F.,Lukács G. Laparoskopos adrenalectomia. Learning curve. Magyar Sebészet 2000 október, 46: III. évf. Supplementum.
16. G. L. Lukács, F. Győry, F. Juhász, Sz. Szakáll. Pediatric thyroid cancer European Journal of Cancer 2001 October, Vol 37: (Suppl.6) page 108. Abstracts **IF: 3. 302**

Impact factor: 11,321