

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Hereditær Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma
előfordulásával szerzett tapasztalataink.
Igazolt mutáció hordozó családok családfa analízise.**

Dr. Tanyi Miklós

**Témavezető:
Dr. Damjanovich László**

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- és EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
SEBÉSZETI INTÉZET**

**DEBRECEN
2008**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	6
2.1. Irodalmi áttekintés	6
2.2. A kolorektális daganatképződés genetikai alapjai	7
2.2.1. Kromoszóma szintű instabilitás	7
2.2.2. Mikroszatellita vagy gén szintű instabilitás	9
2.2.3. Tumorgenezisért felelős gének	10
2.3. A hereditár kolorektális daganatok típusai és genetikai sajátosságai	13
2.3.1. Familiáris Adenomatózus Polipózis (FAP)	13
2.3.2. Peutz-Jeghers szindróma (PJS)	16
2.3.3. Familiáris Juvenilis Polipózis (FJP)	16
2.3.4. Hereditár Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma	18
2.3.4.1. A HNPCC klinikai sajátosságai	18
2.3.4.2. Diagnosztikai kritériumok	20
2.3.4.3. A HNPCC kialakulásáért felelős genetikai eltérések	22
2.3.4.4. A HNPCC-asszociált daganatok incidenciája	25
2.3.4.5. A HNPCC kivizsgálásának lehetőségei, ajánlott menete	26
3. Célkitűzések	29
4. Betegek és módszerek	30
4.1. Vizsgált betegcsoport	30
4.2. Laboratóriumi vizsgálatok	33
4.2.1. Immunhisztokémiai vizsgálat	33
4.2.2. Mikroszatellita instabilitás vizsgálata	34

4.2.3. hMLH1 és hMSH2 gének szekvenálása	34
4.2.3.1. Genomiális DNS preparálás	34
4.2.3.2. PCR	35
4.2.3.3. Mutáció keresés	37
4.2.3.4. Szekvenálás	38
4.2.4. hMLH1 promóter metiláció vizsgálata	38
4.2.5. Nagy deléciók kimutatása (Multiple Ligation dependent Probe Amplification (MLPA))	38
5. Eredmények és Megbeszélés	39
5.1. Populációs szűrés eredményei	39
5.2. Családfa analízisek eredményei és azok megbeszélése	43
5.2.1. 1. család	43
5.2.2. 2. család	46
5.2.3. 3. család	50
5.2.4. 4. család	52
5.2.5. 5. család	53
5.2.6. 6. család	59
5.2.7. 7. család	61
5.2.8. 8. család	64
5.2.9. 9. család	66
5.2.10. 10. család	68
5.3. Populációs szűrés eredményeinek megbeszélése	71
5.4. HNPCC sebészeti ellátása	76
5.5. Betegek gondozása	77
5.6. Etikai megközelítés, a betegségfeltárás lélektani hatása	79

6. Összefoglalás	80
6.1. Új megállapítások	81
7. Irodalomjegyzék	84
7.1. Hivatkozott közlemények	84
7.2. Saját közlemények	97
8. Köszönetnyilvánítás	100

1. Rövidítések jegyzéke

AC: Amszterdam Kritériumok

APC: Adenomatous Poliposis Coli

CRC: kolorektális karcinóma

DCC: Deleted in Colorectal Cancer

FAP: Familiáris Adenomatózus Polipózis

FJP: Familiáris Juvenilis Polipózis

HNPCC: Herediter Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma

ICG-HNPCC: International Collaborative Group on HNPCC

IGF-II R: insulin-like growth factor receptor-II

LOH: Loss of heterozigosity

MLPA: Multiple Ligation dependent Probe Amplification

MMR: Mismatch Repair

MSI: mikroszatellita instabilitás

MSI-H: nagyfokú mikroszatellita instabilitás

MSI-L: alacsonyfokú mikroszatellita instabilitás

MSS: mikroszatellita stabil állapot

MTS: Muir-Torre szindróma

PJS: Peutz-Jeghers szindróma

TGF- β RII: transforming growth factor- β receptor II

TS: Turcot szindróma

5-FU: 5-Fluorouracil

2. Bevezetés

2.1. Irodalmi áttekintés

A vastagbél rosszindulatú daganata napjainkban az egyik vezető halálok a malignus megbetegedések között. A férfiak esetében csak a tüdő, nőknél pedig az emlő és a tüdő daganat mortalitása előzi meg (1). A vastagbél daganat elleni küzdelem egyik leghatékonyabb formája a populációs szintű szűrővizsgálatok elvégzése, a sporadikus esetek korai, még hatékonyan gyógyítható stádiumban történő felismerése. A másik, nem kevésbé fontos formája a megelőzésnek, a vastagbél tumoros betegek közül az öröklődő hajlamot mutató esetek kiszűrése, és az érintett családok gondozásba vétele. Így nagyon sok kolorektális, és más szervi manifesztációt mutató rosszindulatú elváltozás megelőzhető ezekben a családokban. Sajnos a mai magyarországi egészségügyi gyakorlatban egyik megelőzési forma sem működik általános gyakorlatként.

A molekuláris biológia gyors fejlődésével mind több malignus megbetegedés genetikai háttere, ill. esetenként öröklődő jellege tisztázódott az elmúlt két évtizedben. A kolorektális karcinómák 10-15%-ában figyeltek meg valamilyen fokú családi halmozódást (2). A FAP és variánsai (Attenuált-FAP, Turcot-, Gardner-szindróma), melyek autoszómális domináns módon öröklődő obligát tumor megelőző állapotok, körülbelül a vastagbél daganatok 1%-ért felelősek (2,3,4). Különböző szerzők a HNPCC előfordulását a vastagbélrákban szenvedő betegek 3-6 %-ára becsülik (2,5,6). A különböző szerzők által közölt eredmények között tapasztalható jelentős eltérések hátterében etnikai különbségek, valamint a vizsgálati módszerekben jelentkező eltérések egyaránt állhatnak.

2.2. A kolorektális daganatképződés genetikai alapjai

A tumorok alapvetően genetikai megbetegedésnek tekinthetők. A tumoros folyamat kialakulása egy adott genetikai szempontból megváltozott sejt klónjának fékezhetetlen expansziójából származik. A tumoros progresszió során a tumorszövet sejtjei a felgyorsult replikáció és sejtciklus közben újabb és újabb mutációkat szenvednek el. A folyamat kialakulásáért felelős úgynevezett „Driver” mutációk mellett, az úgynevezett „Passenger” mutációk tovább fokozzák a tumoros folyamat invazivitását és metasztázisképző hajlamát (7). Az onkogenetikai kutatások robbanásszerű fejlődését az egyébként ritkább hereditár tumoros megbetegedések kutatása indította el. Itt a folyamat háttérében általában egy adott gén különböző mutációit igazolták. Napjainkra azonban kiderült, hogy egy adott tumoros progresszió általában számos, gyakran több száz gén mutációjával jellemezhető folyamat (7). Ezekből a mutációkból mintegy húsz gén mutációja tehető egyértelműen felelőssé egy adott tumoros folyamat előrehaladásáért (8).

A kolorektális karcinogenezisnek két különböző útvonalát különböztették meg (9):

1. A kromoszóma szintű instabilitás kialakulásával járó, valamint a
2. Mikroszatellita instabilitás, avagy gén szintű instabilitás kialakulásával járó útvonalat.

2.2.1. Kromoszóma szintű instabilitás

A kromoszóma instabilitás a kromoszómák számát és struktúráját érintő eltérés. Azt jelenti, hogy a kromoszómák bizonyos részeinek elvesztésével vagy átrendeződésével (deléción, transzlokáción) egy vagy több gén funkciója is károsodik, és kialakul az adott gén szempontjából egy úgynevezett aneuploid állapot, melyet a heterozigóta jelleg elvesztésének nevezünk (LOH: Loss of heterozigosity). Ilyen például az 5. kromoszóma rövid karján

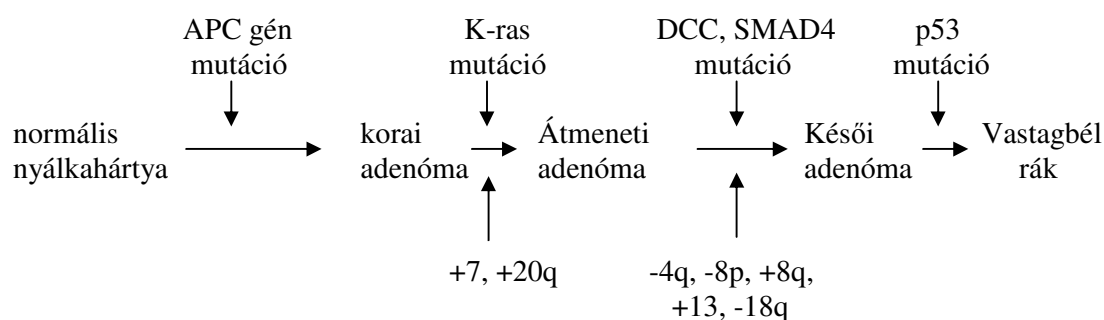
elhelyezkedő APC (Adenomatous Poliposis Coli) gén karboxi terminális végének deléciója (10). A kromoszóma instabilitás felelős a sporadikus karcinómák kialakulásának 85 %-ért, valamint a FAP fenotípussal kialakult vastagbél daganatok túlnyomó többségéért. (11).

A polipok kialakulásának kezdeti lépése tehát az APC gén tumor szupresszor funkciójának megszűnése. Így ez képezi a tumoros transzformáció első lépését (polipképződés megindulása), joggal kiérdemelve a „Gatekeeper” elnevezést (3,12).

A karcinogenesis során ezt követő kromoszóma szintű genetikai eltérések érintik az 1., 7., 8q, 13., 20., kromoszómákat, ezek egyes szakaszainak számbeli felszaporodásával, valamint a 4., 8p, 18q kromoszómákat, ezek egyes szakaszainak elvesztésével (13,14) .

Ezek az átrendeződő avagy elvesző szakaszok számos tumorszupresszor gént vagy onkogént tartalmaznak. Így a folyamat következő lépése a K-ras onkogén aktiválódása, további tumor szupresszor gén, a DCC, valamint a SMAD4 és SMAD2 inaktiválódása útján lesz a korai polip fázisból késői polip fázis. Végül a p53 tumor szupresszor gén funkciójának kiesése vezet a karcinóma kialakulásához (9,15,16,17) (1.ábra). A tumor progresszióhoz számos a sejtsztódásban, differenciálódásban, sejtadhézióban és a programozott sejthalálban (apoptosis) fontos gén egymást követő mutációjára van szükség, így tehát valószínű, hogy a lépések pontos sorrendje, és nem számszerű felhalmozódásuk bír nagyobb jelentőséggel (15).

1. ábra: A karcinogenezis lépései, adenóma-karcinóma szekvencia



2.2.2. Mikroszatellita avagy gén szintű instabilitás

A kolorektális daganatképződés egy másik útját, a DNS replikáció során keletkező hibák kijavítását végző enzim kaszkád, az úgynevezett "Mismatch Repair" (MMR) rendszer génjeiben bekövetkező mutációk okozzák (18,19). Ezek felelősek a sporadikus tumorok kb. 15%-ért, és a HNPCC-hez tartozó esetek 100%-ért (20).

A mikroszatellita instabilitás (MSI), mint fenotípus kialakulásáért az MMR gének mutációja és hibás működése a felelős (20). A mikroszatelliták a genom kis sztereotip ismétlődő szakaszai, melyek általában nem kódolnak fehérjét, azaz az intronban helyezkednek el. Az MMR gének valamelyikének mutációja esetén a DNS replikációja során kialakuló spontán mutációk száma nagyságrendekkel megemelkedik, és a mikroszatelliták sztereotip mérete is megváltozik, így PCR-t követő gélelektroforetikus vizsgálatokkal könnyedén kimutathatóak. Tehát a mikroszatellita instabilitás valamely MMR gén funkció kiesésének egyértelmű fenotípusos jegye. Az MSI kimutatható a HNPCC-s esetek 100%-ban, valamint a sporadikus esetek 15%-ban is (20).

A tumoros folyamat kialakulását elindító mutációk lehetnek öröklöttek (germline mutáció), vagy szerzettek (szomatikus mutációk). Ahhoz, hogy egy a daganatképződésben szerepet játszó gén által kódolt funkció kiessen, mind az anyai, mind az apai allélnek károsodnia kell. Ez az ún. Knudson-féle "two hit" hipotézis, melyet később további szerzők is megerősítettek (21). Ha tehát az egyén már egy hibás allélt örökölt (germline mutáció), akkor már csak a másik, a normális "vad" allél mutációja szükséges a funkció kieséséhez. Ez jellemző a HNPCC esetében az MMR gének öröklött mutációira. Sporadikus eseteknél mindkét allél szomatikus mutációjára van szükség, melynek bekövetkezési valószínűsége ezerszer kisebb az öröklött esetekhez képest, hiszen ez esetben mindkét allél mutációjának az érintett személy egy adott sejtjében kell bekövetkeznie. HNPCC esetében valamely MMR gén egyik szülői allélja már a csírasejt vonalban károsodottan kerül átadásra (germline mutáció).

A másik szülői allél azonban elvégzi normál funkcióját. Ezen vad allél pathogén mutációja esetén ennek a funkciója is kiesik, így a DNS replikációja során spontán képződő hibák nem kerülnek felismerésre és kijavításra. Ennek következtében az adott sejt klónjában a replikáció során a mutációk száma nagyságrendekkel megemelkedik, és ez vezet a malignus transzformáció kialakulásához.

Mivel nincs mutáció az úgynevezett „Gatekeeper” génekben, ezért az adenomatózus polipok kialakulása a HNPCC esetén hasonló ütemű, mint az átlag populációban, azonban az adenóma-karcinóma szekvencia lezajlása jóval gyorsabban játszódik le a már kialakult polipokban az úgynevezett „Caretaker”, azaz MMR gének funkció kiesése miatt, mint a normál populációban. Az MMR gének funkció kiesése tehát nem beindítja, (mint a „Gatekeeper” APC gén mutációja esetén), hanem sietteti a tumorgenezis lezajlását a halmozott mutációk előfordulása miatt. A tumorgenezisnek ebben a folyamatában tehát nem a mutációk pontos sorrendje, hanem inkább azok halmozott előfordulása szerepel patogenetikai tényezőként (12,15,22).

2.2.3. Tumorgenezisért felelős gének

Számos szerző vizsgálta a tumorgenezis fent említett két útvonalának különbségeit és elkülönülését. Azt tapasztalták, hogy különböző tumoros sejtvonalakban a két említett instabilitás keveredhet (23). Harminckilenc mikroszatellita instabil tumoros sejtvonal vizsgálatánál azt észlelték, hogy ezek 31%-nál valamilyen szintű kromoszóma instabilitás vagy számbeli eltérés is tapasztalható volt (23).

A tumorgenezis ezen két útvonalát leíró szerzők már újabb közleményükben más szempontból közelítik meg a tumorképződés folyamatát. Úgy vélik, hogy a tumorok kialakulásának hátterében alapvetően három géncsalád génjeiben bekövetkező mutációk

állhatnak. Ezek az onkogének, tumorszupresszor gének és az úgynevezett stabilizáló gének. A tumoros transzformáció megindulását kiválthatja egy adott gén mutációja, de ahhoz, hogy ebből valóban invazív malignus folyamat alakuljon ki számos gén funkciójának kiesése szükséges (24).

Az onkogének aktiválódása általában kromoszóma transzlokáció, gén amplifikáció, intragénikus pontmutáció vagy kis szakasz deléció során alakul ki. Az adott onkogén egyik vad allélját aktiváló szomatikus mutáció elegendő ahhoz, hogy a mutált sejtből kialakuló klón már valamely szaporodási előnyt élvezzen a normál sejtekhez képest.

A tumorszupresszor gének esetében a genetikai eltérés hatása épp ellenkezőképpen alakul ki. A bekövetkező mutáció a gént nem aktiválja, hanem az funkció kiesést szenved el. Ezt kiválthatja misszensz pontmutáció ha a gén esszenciális szakaszát érinti, nagy szakasz deléció avagy epigenetikus elnémítás (promóter hypermetiláció). A tumorszupresszor gén egyik alléljának funkció kiesése még nem elegendő a tumoros folyamat megindulásához, ehhez mindkét allél funkció vesztésére szükség van.

Az onkogének és a tumorszupresszor gének mutációi tehát hasonló módon befolyásolják a tumorgenezis folyamatát, stimulálják a sejtosztódás és a sejtnövekedés folyamatát és gátolják a sejthalált, valamint a sejtciklust fékező mechanizmusokat. Ezeknek a géneknek a funkcióvesztése általában kromoszóma szintű átrendeződés révén jön létre így megfelel a tumorgenezis kromoszóma szintű instabilitással járó folyamatának.

A tumorgenezisben szerepet játszó gének harmadik csoportja az úgynevezett stabilizáló gének („Caretaker”), amelyek mutációja esetén a tumor kialakulás egészen más típusú útvonala valósul meg. Ez a család tartalmazza a „mismatch repair” (MMR), „nucleotid-excision repair” (NER) és a „base-excision repair” (BER) géneket. Ezek a gének a normális DNS replikáció során bekövetkező pont, vagy kis szakaszt érintő mutációk felismerését és javítását végzik. A stabilizáló gének tehát próbálják a spontán bekövetkező mutációk számát a

legminimálisabb szinten tartani, így biztosítva örökítő anyagunk konzervativizmusát. Funkcióvesztésük esetén más gének mutációinak nagyságrendekkel történő felszaporodása következik be. Bár minden gén érintett a mutációk számának felszaporodásában, mégis az onkogénekben és a tumorszupresszor génekben megjelenő mutációk fogják a tumoros progressziót véghez vinni. Hasonlóan a tumorszupresszor génekhez, a stabilizáló gének mindkét alléljének a károsodása szükséges a folyamat kialakulásához.

Mindhárom géncsaládban előforduló mutációk kialakulhatnak a szomatikus sejtekben, okozva az úgynevezett sporadikus tumorokat („szomatikus mutációk”), vagy átadásra kerülhetnek a csírasejtekben, öröklődő hajlamot okozva a tumorok kialakulására („germline mutációk”). Meg kell azonban említenünk, hogy az öröklődő vastagbél és emlő daganatos megbetegedések túlnyomó többségének hátterében leginkább a stabilizáló gének germline mutációja áll, nem pedig a tumorszupresszor vagy az onkogének germline mutációi (24). A teljesség igénye nélkül a gasztrointestinalis daganatok kialakulásában szerepet játszó géneket a 1.A/B táblázatban mutatjuk be (24).

Gén	Szomatikus mutáció típusa	Tumor típus
CTNNB1 (β-catenin)	Aktiváló kodon változás (pontmutáció)	vastagbél, máj, medulloblastoma
BAX	Inaktiváló kodon változás (pontmutáció)	vastagbél, gyomor
PI3KCA	Aktiváló kodon változás (pontmutáció)	vastagbél, gyomor, központi idegrendszer, emlő
FES	Aktiváló kodon változás (pontmutáció)	vastagbél
FGFR1-3	Transzlokáció	lymphomák, gyomor, húgyhólyag
KRAS2, N-RAS	Aktiváló kodon változás (pontmutáció)	vastagbél, hasnyálmirigy, nem kissejtes tüdőrák,
SMAD2	Inaktiváló kodon változás	vastagbél, emlő
TGFBR1, TGFBR2	Inaktiváló kodon változás	vastagbél, gyomor, petefészek
MAP2K4 (MKK4)	Inaktiváló kodon változás	hasnyálmirigy, emlő, vastagbél
PTNP1, 11	Aktiváló kodon változás	leukémiák, vastagbél

1/A táblázat: Gasztrointesztinális tumorok kialakulásában szerepet játszó gének, melyek szomatikus mutációja előfordul, azonban nem öröklődnek mutáns formában.

Gén	Szindróma	Öröklődés menet	Öröklődő tumor típusa
Tumorsuppresszor gének			
APC	FAP	Domináns	vastagbél, gyomor, vékonybél
AXIN2	Attenuált polipózis	Domináns	Vastagbél
CDH1 (E-cadherin)	Familiar Gastric Carcinoma	Domináns	Gyomor
STK-11 (LKB1)	Peutz-Jegherz szindróma	Domináns	vékonybél, vastagbél, petefészek, hasnyálmirigy
PTEN	Cowden szindróma	Domináns	Vékony-vastagbél hamartómák, glioma, méh
BMPRI1A	Juvenilis polipózis	Domináns	Gasztrointesztinális
SMAD4	Juvenilis polipózis	Domináns	Gasztrointesztinális
Stabilizáló gének			
MUTYH (MYH)	Attenuált polipózis	Recesszív	vastagbél
MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, PMS1	HNPCC	Domináns	Vastagbél, méh, hepatobiliáris traktus
Onkogének			
KIT	Familiáris Gasztrointesztinális Strómális Tumor	Domináns	gasztrointesztinális strómális tumorok
FDGFRA	Familiáris Gasztrointesztinális Strómális Tumor	Domináns	Gasztrointesztinális strómális tumorok

1/B táblázat: Gasztrointesztinális daganatok kialakulására hajlamosító gének

2.3. A hereditár kolorektális daganatok típusai és genetikai sajátosságai

2.3.1. Familiáris adenomatózus Polipózis (FAP)

A Familiáris Adenomatózus Polipózis egy dominánsan öröklődő obligát tumor megelőző állapot. Az igazolt mutáció hordozóknál a vastagbél rosszindulatú folyamata 100 %-s valószínűséggel következik be 40 éves életkorig. Az 5. kromoszóma rövid karján elhelyezkedő (5q) APC gén, mely egy tumorsuppresszor gén, germline mutációja tehető felelőssé a polipózisos fenotípus kialakulásáért az esetek 70-90%-ban (25). A FAP fenotípus

kialakulását, úgynevezett „Gatekeeper” mechanizmussal magyarázzák (3,12). A „Gatekeeper” gének a sejtnövekedés celluláris szintű inhibitorai, minden szövetnek van specifikus „Gatekeeper” génje. A vastagbél nyálkahártya ilyen típusú génje az APC gén. Ha az egyed már hordoz minden sejtjében egy mutáns allélt, akkor már csak a normál allél szomatikus mutációjára van szükség a tumorgenezis beindulásához. Tehát ha az APC gén mindkét allélje mutáns, vagy deléción során elvesz a működő, úgynevezett „vad allél”, akkor beindul a gyomor-bél traktusban az adenomatózus polipok kialakulása. Főleg a vastagbélben, de néha a gyomorban, duodenumban, valamint a vékonybélben is több száz, esetenként több ezer adenomatózus polip keletkezik. Ez a fenotípus a mutációt hordozó egyedek 50 %-ban 15 éves életkorra kialakul (26,27,28). Az adenóma-karcinóma szekvencia lezajlása ezt követően ugyanolyan időtartamot igényel, mint a sporadikus esetek körében, azaz a polipok megjelenését követően 10-15 évre van szükség a vastagbél daganat kialakulásához. Ebben az esetben tehát a hordozott mutáció igazából az adenomatózus polipok tömeges kialakulását segíti elő, amely a tumorgenezis egy korai fázisának tekinthető. Azonban a polipok óriási száma miatt a tumor képződés elkerülhetetlenül kialakul. A gasztrointesztinális polipokon kívül a kórkép fenotípusos jegyei lehetnek még a lipómák, oszteómák, szám feletti fogak megjelenése, hepatoblasztómák, pajzsmirigy papilláris karcinómája, hasnyálmirigy adenokarcinómája, dezmoid tumorok és az úgynevezett retinapigment epithel hypertrophia (congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium, CHRPE)(25).

A kórkép alcsoportjai közé sorolják az Attenuált FAP-t, a Gardner és Turcot szindrómát. Az Attenuált FAP esetében a polipusok alacsonyabb száma (30-50) és ezek proximálisabb elhelyezkedése jellemző. A malignus átalakulás általában 10 évvel később következik be a FAP klasszikus eseteihez viszonyítva. A Gardner szindrómában a polipózist oszteómák, odontómák, dezmoid tumorok és epidermális cysták megjelenése kíséri. A Turcot

szindróma esetén központi idegrendszeri daganat (általában glioblasztóma) megjelenése színezi a FAP-ra jellemző fenotípust.

Az APC egy igen nagy méretű gén, melynek eddig több mint 1000 különböző típusú és lokalizációjú mutációját fedezték fel (9). Az APC gén felelős a sejtproliferáció, differenciálódás szabályozásáért, valamint az apoptózisért egyaránt. Az APC gén leggyakrabban előforduló mutációja a karboxi terminalis vég deléciójával jár, ezért úgy vélik, hogy ez a rész a felelős a tumor szupresszor hatás kifejtéséért (15). A genotípus és fenotípus összefüggése, azaz a különböző típusú és lokalizációjú mutációk esetén a különböző fenotípusos jegyek kialakulása a FAP különböző formái esetén jól megfigyelhető. A FAP, Attenuált FAP, Gardner Szindróma mind az APC gén különböző mutációinak különböző fenotípusos jegyeit hordozó variánsai (9,15). Nem létezik típusos mutáció. A leggyakrabban kimutatott 5 bázispárt érintő deléció (AAAAG) mely az 1061 és 1309-s kódonnál jelentkezik, is csak az esetek mintegy 5-10 %-ban fordul elő (29).

Azokban a családokban melyeknél a jellemző FAP fenotípus ellenére sem sikerült az APC gén valamely mutációját igazolni, 2002-ban először egy DNS repair gén, az úgynevezett MYH gén mutációját sikerült igazolni (30). Ez azonban az APC gén mutációjával ellentétben recesszív módon öröklődő eltérést okoz. Egy másik munkacsoport vizsgálatai alapján az Attenuált FAP-os családok mintegy 36%-nál sikerült a MYH gén homozigóta mutációját igazolni, így gyakrabban fordult elő, mint az APC gén mutációja (31).

Az érintett családokban az elsőfokú rokonok genetikai tesztelése és gondozásba vétele javasolt. Amennyiben ez nem megoldható, akkor a családtagok évente végzett kolonoszkópos szűrése indokolt 10-12 éves kortól, majd 3-5 évente 30 éves kor felett. A felső endoszkópia végzése is 30 év felett javasolt 1-3 évente, valamint hasi UH és AFP vizsgálata évente a májtumorok megelőzése céljából (25).

2.3.2. Peutz-Jeghers szindróma (PJS)

A Peutz-Jeghers szindrómára gasztrointesztinális hamartomatózus polipusok nagy száma jellemző. Ezt általában már igen korai életkorban (2 éves életkortól) bukkális hyperpigmentáció kíséri. A polipok leggyakrabban a vékonybélben (65-90%), a vastagbélben (60%) és a gyomorban (50%) fordulnak elő. A tünetek általában fiatal felnőttkorban jelentkeznek a polipokból származó per rektum vérzések vagy a polipok intussuszepciója miatt kialakuló görcsös hasi fájdalmak és bélelzáródás képében.

A kórkép jellemzően autoszómális domináns öröklődés menetet mutat, kialakulásáért a 19p13,3 lokalizációban elhelyezkedő tumorszupresszor gén (LKB1) germline mutációja felelős. Az esetek csak mintegy 50-70%-ban sikerül igazolni az úgynevezett LKB1 (szereontin kináz, STK11) gén mutációját (32). Itt sem sikerült típusos mutációt igazolni, számos, a gén különböző exonjain megjelenő eltérő mutációt igazoltak napjainkig (33). A kolorektális rák kialakulásának rizikója 50 éves korban 31%, 70 évesen 81%-nak bizonyult PJS esetében, amely jelentősen meghaladja az átlagos populáció adatait (4-5%) (34). Érdekes klinikai megfigyelés volt, hogy PJS talaján kialakult polipokban a COX2 expresszió fokozott, így a preventív célzattal alkalmazott tartós COX2 gátló kezelés a polipok számát 86%-al csökkentette (33).

2.3.3. Familiáris Juvenilis Polipózis (FJP)

A Familiáris Juvenilis Polipózis egy autoszómális domináns módon öröklődő kórkép, melyre a hamartomatózus polipok korai életkorban történő megjelenése jellemző, főleg a vastagbélben, de kisebb számban a gasztrointesztínium más területein is. Sokáig nem sorolták a neoplasztikus polipózis szindrómák közé, azonban a malignus eseteket dokumentáló

közlések szaporodásával ma már egyértelműen praemalignus eltérésnek tekintik. A vastagbél tumorok kialakulásának életkori megoszlása körülbelül 10 évvel megelőzi a Peutz-Jeghers szindrómánál tapasztaltat. Mindezek ellenére a két kórképet gyakran összemoszák és nem kezelik külön entitásként. Genetikai hátterét a SMAD4, BMPR1A és PTEN génekben bekövetkező mutációk képezik, bár ezt csak az esetek kb 50%-ban sikerül igazolni (24,25). A hereditár kolorektális daganatok különböző típusait és a jellemző genetikai eltéréseket a 2. táblázatban mutatjuk be.

Szindróma	Gyakoriság Incidencia	Koloncc. esélye az élet során	Átlagos életkor koloncc. felfedezésekor	Diagnosztikus kritérium	Jellemző mutációk
FAP	0,5-1% 1:10 000	100%	40 év	>100 polypus, Legalább 2 érintett családtag	APC> 90% MYH~ 5%
AFAP	1:8 000- 10 000	80%	50 év	Proximális polypok (30-50 db)	APC> 90% MYH ~ 25%
HNPCC	0,8-2,7% 1:2 000	~ 80%	45 év	Amsterdam I-II. Bethesda- kritérium.	MLH1: 55-60% MSH2: 35-40% MSH6, PMS2, PMS1: ~1-1%
JPS	1:100 000	~ 50%	35 év	>3-100 juvenilis polyp, pozitív családi anamnézis	SMAD4(DPC4) BMPR1A 50%, PTEN
PJS	1:200 000	~ 40%	45 év	>2 polyp, perioralis pigmentáció	LKB1 (STK11) 50-60%

2. táblázat: Hereditár Kolorektális Daganatok

2.3.4. Herediter Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma

2.3.4.1. A HNPCC klinikai sajátosságai

A HNPCC jelentőségét hangsúlyozza, hogy a jelenleg ismert öröklődő kolorektális daganatok legnagyobb hányadát képezi. Klinikai jellemzői között fontos a jobb kolonfél dominancia, a szinkrón és metakrón tumorok gyakori előfordulása, valamint az ún. HNPCC asszociált tumorok kialakulásának lehetősége (gyomor, endometrium, ovárium, uréter, epeúti karcinómák) az érintett családokban. Az igazolt mutációt hordozó HNPCC-s betegeknek 80-85 %-os esélyük van arra, hogy életük során vastagbélrákban szenvedjenek, mely már viszonylag korai életkorban kialakulhat. Az eddig közölt legfiatalabb HNPCC talaján manifestálódott vastagbél daganat 16 éves életkorban fordult elő (saját anyagunkban 25 évesen!) (35). A korábban rosszindulatú megbetegedés miatt operált, igazolt mutációt hordozó HNPCC-s betegek esetén újabb, azaz metakrón tumorok kialakulása 40%-s gyakorisággal fordul elő 10 éves időintervallumban (35,36). A típusos adenóma-karcinóma szekvencia itt is megfigyelhető, de a polipok száma nem haladja meg a populációs átlagot. A polipok szövettani felépítésére jellemző a villózus formáció, a daganatokéra pedig az alacsony differenciáltság, a pecsétgyűrűsejtes, mucinózus sejttípus, az intenzív lymphocytás infiltráció, mely egyes leírások szerint a Crohn-betegség szöveti képéhez hasonlatos (37,38). A HNPCC-re nem jellemző az adenomatózus polipok tömeges megjelenése, mint FAP esetén, valamint igazolt, hogy az esetek egy kis részében a "flat adenómákból", a klasszikus polipképződés nélkül is keletkezhet karcinóma (37).

A vastagbél proximális részén elhelyezkedő (flexura lienalis-tól orálisan), 40 éves kor alatt jelentkező karcinóma mindenképpen felkelti a gyanút a HNPCC-re. (39,40). A családi

halmozódás jellemző mind elsőfokú rokonok, mind az egymást követő generációk között. Öröklődés menete autoszómális domináns, mintegy 80%-os penetranciával (35). A vastagbél daganatok halmozott előfordulása a legjellemzőbb, az irodalomban ismert azonban néhány család, ahol más típusú daganatok domináltak, pl. endometrium vagy gyomor. A HNPCC asszociált tumorok jelentőségére hívja fel a figyelmet, hogy ezen családok nőtagjaiban életük során 30-50%-os valószínűséggel alakulhat ki endometrium-, ill. kb. 10%-ban más típusú karcinóma (40).

A Herediter Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma az irodalmi közlések alapján úgy tűnik ötször gyakrabban fordul elő, mint például a Familiáris Adenomatózis Polipózis (3). Mindezek ellenére a FAP sokkal gyakrabban kerül felismerésre, mint a nála sűrűbben előforduló HNPCC. Ennek oka az lehet, hogy a FAP fenotípusa sztereotíp, könnyen felismerhető és nem igényel több generációra kiterjedő családfaszűrést. Ezzel szemben a HNPCC fenotípusa jelentős eltéréseket mutat és nagyon alapos, legalább három generációra kiterjedő családfaszűrést igényel. Azt sem szabad elfelejtenünk, hogy a HNPCC, mint klinikai entitás sajnos nem közismert a gyakorló orvosok számára és ez gyakran vezet a családok fel nem ismeréséhez. Az évtizedek során, ahogy a HNPCC-vel kapcsolatos ismeretek bővültek, egyre több különböző család került közlésre, a betegség elnevezése is változott. Először Lynch szindrómának, majd az előforduló tumorok spektrumának bővülésével Lynch I. és II. szindrómának hívták. Lynch I. szindróma esetén csak kolorektális, Lynch II. szindróma esetén emellett egyéb, úgynevezett extrakólikus tumorok megjelenését is leírták a családokban. 1985-ben Lynch vezette be a Herediter Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma megnevezést (41). Ezt követően a HNPCC-n belül újabb entitásként került megkülönböztetésre a megszokott tumor spektrum mellett a családban előforduló faggyúmirigyekből kiinduló bőrrákok megjelenésével járó, úgynevezett Muir-Torre szindróma (42). Későbbiekben az MMR gének germline mutációinak igazolásával jelentős lépést tettek a betegség hátterének

tisztázásáért. A változatos arculatot mutató kórkép minél könnyebb felismerhetőségéhez újabb és újabb kritérium rendszerek kidolgozása történt meg (Amszterdam I-II, Bethesda). Azonban így is számos olyan családot találtak, mely vagy nem teljesíti tökéletesen a kritérium rendszereket, és mégis sikerül valamely MMR gén mutációját igazolni, vagy egyértelműen teljesíti a kritérium rendszert, és mégsem sikerül mutációt igazolni. Az egyértelműen Amszterdam pozitív családoknak is csak körülbelül 60%-ában sikerül patogén mutációt igazolni (43)! Azokra az esetekre, ahol a családi halmozódás teljesíti az eddig felállított kritérium rendszereket, de nem tudnak mutációt igazolni, a “Familial Colorectal Cancer Type-X” megnevezést ajánlják. Ezzel szemben a HNPCC megnevezést csak az igazolt mutációt hordozó családokra javasolják (44)!

Az érintett családok tagjaiban kialakuló malignómák gondozásba vétel és követés során idejekorán diagnosztizálhatóak és így többségük gyógyítható lenne. Ugyanakkor a metakrón tumorok kialakulásának lehetősége miatt élethosszig tartó, rendszeres onkológiai ellenőrzés szükséges (38,45,46). Az utóbbi évek megfigyelése az is, hogy a HNPCC talaján kialakult vastagbél daganatok jobb prognózisúak, mint a hasonló stádiumú sporadikus esetek, valamint jobban reagálnak az 5-Fluorouracil (5-FU) alapú szisztémás kemoterápiára is (35).

2.3.4.2. Diagnosztikai kritériumok

A HNPCC diagnózisának felállításában a jellemző mutációk igazolása a jelenleg elérhető legpontosabb módszer, de ez sem biztosítja 100%-ban a diagnózist, mert még nem ismerjük a kórkép kialakításában résztvevő összes tényezőt. A HNPCC klinikai diagnózisát megkönnyítve, egységesítő céllal 1989-ben 7 ország részvételével alakították meg az „International Collaborative Group on HNPCC”-t (ICG-HNPCC), azaz a HNPCC-vel foglalkozó orvosok nemzetközi szervezetét (47). Ennek legfőbb célja az egységes, elsősorban

anamnesztikus kritérium rendszer kifejlesztése és a nemzeti HNPCC regiszterek felállítása volt. Így született meg 1990-ben az első kritérium rendszer, melyet Amszterdam Kritériumoknak (AC) neveztek (47) (2. ábra).

2. ábra: Amszterdam és Módosított Amszterdam Kritériumok

Amszterdam Kritériumok

1. Három vagy több szövettanilag igazolt vastagbél daganat a családban melyek közül legalább egy a másik kettő elsőfokú rokona.
2. Legalább két vagy több generációban előforduló tumorok, az érintett személyek közül egy elsőfokú rokona a másik kettőnek.
3. Legalább egy daganatos megbetegedés 50 éves életkor előtt legyen diagnosztizálva.
4. Familiáris adenomatózis polipózis kizárható legyen.

Módosított Amszterdam Kritériumok

1. Ugyanaz mint az Amszterdam Kritériumok, azonban a vastagbél daganatokon kívül az úgynevezett HNPCC asszociált tumorok (endometrium, húgyúti, epeúti, gyomor stb.) előfordulása a családban is figyelembe veendő!

Habár az így diagnosztizált esetek nagy valószínűséggel HNPCC-nek igazolódtak, ez a feltételrendszer túl szigorúnak bizonyult, mert kizárta a kis létszámú családokat és nem vette figyelembe a vastagbélen kívüli egyéb típusú, úgynevezett extrakólikus daganatokat sem. Alkalmazása során a mutáció pozitív családok akár 30-40%-a sem került felismerésre (48).

A további klinikai megfigyelések alapján és az index személyekre koncentrálva alkották meg a Bethesda kritériumokat 1997-ben (20) (3. ábra), majd az extrakólikus tumorok gyakori előfordulását is figyelembe véve, rövidesen létrehozták a módosított Amszterdam Kritériumokat (20,49) (2. ábra).

3. ábra: Bethesda Kritériumok

Bethesda Kritériumok

A Kritériumok bármely pontjának teljesülése esetén alapos indokkal felmerül a HNPCC diagnosztizálásának lehetősége és a további kivizsgálás indokolt.

1. Az Amszterdam Kritériumokat teljesítő családok.
2. Két HNPCC asszociált daganat előfordulása egy személyben, akár szinkron vagy metakron vastagbél, akár vastagbél és egyéb HNPCC asszociált daganat együttes előfordulása.
3. Ha az index személy elsőfokú rokona vastagbél daganatban vagy valamely HNPCC asszociált daganatban szenved, vagy vastagbél adenomatózus polipja van, amennyiben a daganatok 45 éves életkor, a polipok pedig 40 éves életkor előtt kerülnek felismerésre.
4. Vastagbél vagy endometrium daganat esetén, ha az 45 éves életkor előtt kerül felismerésre.
5. 45 éves életkor előtt felismert alacsonyan differenciált jobb oldali vastagbél daganat esetén.
6. Bármely lokalizációjú 45 éves életkor előtt diagnosztizált pecsétgyűrűsejtes vastagbél daganat esetén. (A pecsétgyűrűsejtek aránya több mint 50 %.)
7. 40 éves életkor előtt diagnosztizált vastagbél adenomatózus polipok esetén.

2.3.4.3. A HNPCC kialakulásáért felelős genetikai eltérések

A hetvenes években ismerték fel először E. coli-ban az úgynevezett Mismatch Repair géneket, melyek a DNS replikáció során spontán keletkező hibák kijavításért felelős enzimeket kódolnak és ezért "Caretaker" géneknek is nevezik őket (12). A kilencvenes évek elején derült fény arra, hogy a bakteriális génekhez hasonló gének léteznek a humán genomban is, melyek nagyfokú konzervativizmust mutatnak a törzsfajlás során (18,19). Az MMR gének patogén mutációja mutatható ki a HNPCC-s betegek mintegy 60%-ában és a

sporadikusnak vélt daganatok néhány százalékában is (3,20). A humán Mismatch Repair rendszernek (MMR) jelenleg 7 tagja ismert, elnevezésük a bakteriális homológoktól származik, MutL homológok (MLH) hMLH1, hMLH3, MutS homológok, (MSH) hMSH2, hMSH3, hMSH6, valamint postmeiotikus szegregáció gének (PMS) hPMS1 és hPMS2 (50). Az MMR fehérjék egymással funkcionális komplexet alkotva javítják ki az újonnan másolt DNS szálban keletkezett hibákat. A különböző MMR fehérjéknek különböző funkciója van. Bár funkciójuk átfedéseket is mutathat (hiba felismerése, bázis kivágás, újraegyesítés), ezért nem minden genetikai eltérés hoz létre beteg fenotípust, ill. számos normál funkcióval járó allél variáció (polimorfizmus) is ismert (51,52). A legtöbbször érintett gének a hMLH1 és a hMSH2, melyek az igazolt patogén mutációk kb. 95%-áért felelősek. A hMSH6-ban bekövetkező mutációt az esetek 3-5 %-ban, a hPMS1 mutációját körülbelül 1%-ban sikerült igazolni (50,51,52,53,54,55). Feltételezhető azonban, hogy további, eddig még nem azonosított genetikai eltérések is felelősek lehetnek a kóros állapot kialakulásáért. Napjainkig körülbelül 450 különböző patogén mutációt sikerült igazolni világszerte (56). A mutációk 95 %-a szétszórva helyezkedik el a hMLH1 és hMSH2 35 exonján, nincsenek olyan területek, amelyek kiemelt mutációs gyakoriságot mutatnának (57,58).

Egyes szerzők a HNPCC fenotípus kialakulásának hátterében a hMLH1 gén promóter régiójának hypermethylocióját mutatták ki, mely mintegy elnémítja a gént. Itt a gén átírása nem történik meg, így nem exszpresszálódik az általa kódolt fehérje sem. Ebben az esetben nem mutatható ki az adott génben semmilyen bázissorrendbeli eltérés. Ezt a HNPCC fenotípusának, úgynevezett epigenetikus kialakulását eddig kizárólag a hMLH1 esetén írták, le (53).

Az MMR fehérjék hibás működése folytán számos mutáció jelenik meg szerte a genomban, többek között az ún. mikroszatellitákban. A mikroszatelliták rövid, általában egy (A), vagy két (AC) bázist tartalmazó repetitív szekvenciák a genomban, melyek funkciója

egyértelműen nem ismert, többnyire a kódoló régiókon kívül helyezkednek el. Ha a mikroszatelliták hossza a környező normál szövetben észlelthez képest megváltozik, mikroszatellita instabilitásról (MSI) beszélünk. Ez a jelenség a HNPCC-s esetek mintegy 95-100%-ában, a sporadikus tumorok 10-15%-ában figyelhető meg (20). Bizonyos gyakran előforduló mononukleotid (BAT25, BAT26) és dinukleotid (D2S123, D5S346, D17S250) mikroszatellitákat markerként lehet felhasználni a betegség szűrésére (20). Ha az öt vizsgált marker esetén több marker egyidejű instabilitása észlelhető, akkor nagyfokú instabilitásról (MSI-High), ha csak egy, akkor kisfokú instabilitásról (MSI-Low) beszélünk. Ha nem észlelhető mikroszatellita instabilitás, akkor a genom mikroszatellita stabil állapotáról beszélünk (MSS). Az osztályozásnak a klinikailag gyanítható betegek genetikai szűrésénél, ill. a betegség igazolásánál van nagy jelentősége.

Ismeretesek olyan, a sejtnövekedés során aktiválódó gének is, amelyek tartalmaznak ismétlődő szekvenciákat és ezáltal a mikroszatellitákhoz hasonlóan fogékonyak a mutációkra és elveszíthetik funkciójukat. Ilyen a TGF- β RII (transforming growth factor- β receptor II), mely specifikus ligandjával kapcsolódva gátolja a sejtproliferációt, viszont ha mutációt szenved a receptor, elveszíti a TGF- β iránti érzékenységet. Hasonlóan fontos szerep juthat az IGF-II R-nak (insulin-like growth factor receptor-II), Bax, PTEN géneknek is (53,59,60).

Több, egymástól független szerzői csoport által megfigyelt klinikai jellegzetessége a HNPCC-nek a sporadikus tumorokkal összevetett, életkortól és stádiumtól független jelentősen jobb prognózisa. Több teóriával próbálják magyarázni ezt a megfigyelést. Egyik lehetséges elképzelés az, hogy ahogy a mutációk akkumulálódnak, számos aberráns fehérje expresszálódik, amely a gazdaszervezet immunrendszerének intenzív válaszát váltja ki. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a HNPCC-s betegek tumorszövetében intenzív lymphocytás infiltráció, valamint a Crohn-betegségre jellemző B és T sejtis depozítumok létrejötte figyelhető meg (61). Másik lehetséges magyarázatnak tartják, hogy a nagyszámú

mutáció következtében a daganatos sejt túléléséért felelős alapvető gének működése is károsodik és az adott sejtpopuláció életképtelenné válik. Ez az úgynevezett „elerőtlenedő” malignitás („effete malignancy”) teóriája (62). A HNPCC sporadikus tumoroknál kedvezőbb kimenetelét stádiumonként összevetve is kimutatták. Az MSI-High tumorok esetén 68%-nak, míg a MSI-Low tumorok esetén 32%-nak találták a betegek stádiumtól független összesített 5 éves túlélését (63).

Hosszú távú betegkövetés során derült ki, hogy HNPCC-ben a távoli metasztázisok is kisebb számban fordulnak elő. Szignifikánsan jobb kemoterápiás választ is észleltek mikroszatellita instabil tumoroknál. Egyes szerzők Dukes C stádiumú tumoroknál azt észlelték, hogy az 5-Fluorouracil (5-FU) alapú kezelésre a nagyfokú mikroszatellita instabilitást (MSI-High) mutató betegek sokkal jobban reagálnak, így a 3 éves túlélésük 90%-os, összehasonlítva az MSI-Low tumoros betegek 43%-os túlélésével (64). Figyelembe véve azt, hogy a sporadikus esetek körülbelül 15 %-a, valamint azt, hogy a HNPCC-s esetek szinte 100%-a mikroszatellita instabil, a mikroszatellita instabilitás meghatározása a kolorektális daganatban szenvedő betegek majdnem 20%-ánál prognosztikus markerként is felhasználható.

2.3.4.4. A HNPCC asszociált daganatok incidenciája

A vastagbél daganatok 5-10%-ának hátterében feltételeznek hereditér jelleget, ebből a HNPCC 3-6%-ot képez (3). A gyakori szinkron tumorok megléte mellett (7-18%), az első daganat diagnosztizálását követően a betegek 20-40%-ában metakron tumor kialakulását is észlelték 10 éven belül. Ezt hosszabb időtartamú utánkövetés során jóval gyakoribbnak találták és mintegy 72%-ra becsülték 40 éves időtartamra vetítve (48,65,66). A különböző tumorok élettartam alatti előfordulásának valószínűsége is jelentős különbségeket mutathat, attól függően, hogy mely MMR gén funkciója károsodott. A vastagbél daganatok

előfordulását körülbelül 80%-ra becsülik az igazolt mutáció hordozókban, amely hMLH1 esetén 84%-nak, hMSH2 mutációja esetén 71%-nak bizonyult (67). Az úgynevezett HNPCC asszociált extrakólikus daganatoknál azonban ettől jelentősen eltérő helyzetet találtak. A hMLH1 mutációt hordozókban 11-42%, ezzel szemben a hMSH2 mutációit hordozókban 48-61% a vastagbélben kívüli daganatok összesített előfordulási lehetősége a teljes élettartamra vetítve (67). Endometrium karcinoma esetében az eltérés még szembetűnőbb. A hMLH1 esetén 31%, hMSH2 esetén 29%, a hMSH6 mutációt hordozók esetében azonban kiemelkedően magas, mintegy 73%-s valószínűséggel fordulhat elő életük során endometrium karcinóma (68,69). Ezek az eltérések befolyásolhatják a terápiás és betegkövetési protokollok kialakítását.

2.3.4.5. A HNPCC kivizsgálásának lehetőségei, ajánlott menete

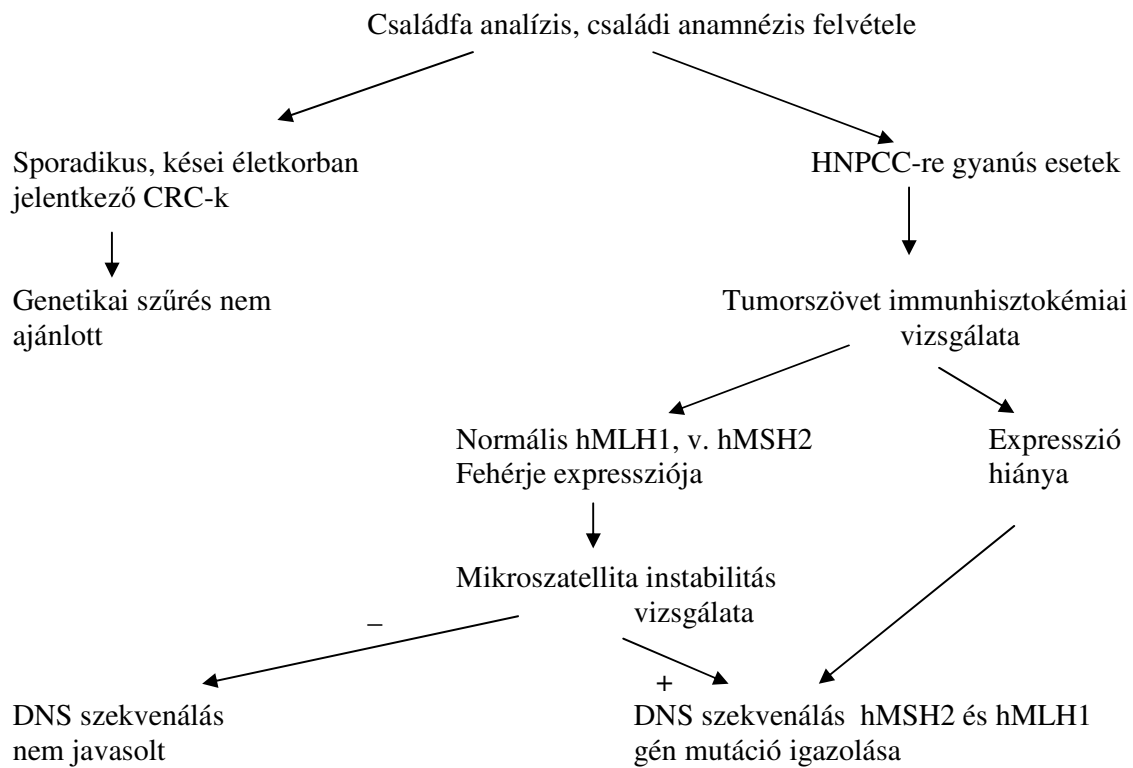
Az 1990-ben megalkotott Amszterdam kritériumrendszer, mely a későbbiekben számos módosításon ment keresztül, a mai napig a legkönnyebben alkalmazható feltételrendszer a mindennapi klinikai gyakorlatban. Mindemellet számos kritika is érte hiányosságai miatt: kihagyta a nem vastagbélben manifesztálódó malignómákat (az úgynevezett HNPCC asszociált tumorokat), nem vette figyelembe a kórkép 80%-os penetranciáját, valamint azt, hogy kis létszámú családok esetén néha nincs is elég hozzátartozó a kritériumok teljesítéséhez. Tagadhatatlan azonban, hogy a legelső lépés a HNPCC-s családok kiszűrésében az alapos, legalább 3 generációt felölelő családi anamnézis felvétele (70). Az anamnézis felvételénél azonban az ICG legutóbbi ajánlásait is figyelembe kell venni a betegek lehető legteljesebb körének kiszűréséhez. Különös figyelemmel kell lenni a családi halmozódásra, a HNPCC asszociált tumorokra, a szinkrón és metakrón tumorok előfordulására, a jobb kólonfél lokalizációra, a vastagbél adenómákra és ezek életkori

előfordulására, valamint a jellemző, már ismertett szövettanukra. A vastagbél vagy egyéb HNPCC asszociált daganatban szenvedő beteg esetén a legalább három generációra kiterjedő alapos anamnézis felvétel során tehát nem csak az Amszterdam, hanem a Bethesda kritériumok alkalmazása is szükséges. Amennyiben felmerül a HNPCC lehetősége, ezt a tumoros beteget nevezzük index személynek és az ebből a betegből eltávolított daganat szövettani feldolgozásával folytatódik a kivizsgálás. Az eltávolított tumorszövet sejtmagjaiban immunhisztokémiai vizsgálat segítségével próbáljuk igazolni a különböző MMR gének fehérje termékeinek meglétét vagy hiányát. Amennyiben ezen fehérjék valamelyike nem mutatható ki a sejtmagban, a HNPCC gyanúja további megerősítést nyer és genetikai vizsgálatot kell végeznünk. Ennek első lépése a mikroszatellita instabilitás vizsgálata. Ha ez negatív, a HNPCC diagnózisát gyakorlatilag el lehet vetni. Amennyiben a vizsgálat nagy fokú instabilitást igazol (MSI-High), akkor végső lépésként a kialakult fenotípus hátterében valamely MMR gén mutációját próbáljuk igazolni DNS szekvenálás segítségével (4. ábra) (43,70,71,72).

A kivizsgálás során végig szem előtt kell tartani, hogy a felsorolt módszerek egyike sem képes önmagában teljes értékű eredményt adni a betegség megerősítését, vagy kizárását illetően. HNPCC-s betegnek csak az a személy tekinthető, akiben sikerül kimutatni valamely MMR gén mutációját DNS szekvenálás segítségével. Ilyen esetben a család szűrése is könnyebb, hiszen az index személyben talált mutációt kell keresni a többi családtagban is. Az a családtag, akiben ez a mutáció nem mutatható ki és mentes a HNPCC bármely szervi manifestációjától, átlagos rizikóval bíró, „egészséges” személynek tekinthető (43,72.). Ezzel szemben, ha az anamnézis és a jellegzetes betegségek előfordulása alapján valaki HNPCC-re gyanús, akkor is betegként kell gondozni, ha konkrét MMR gén mutációt nem sikerül kimutatni szekvenálás segítségével sem (eddig még ismeretlen gének mutációi, „Familial

Colorectal Cancer Type-X”) (44). Az ilyen beteg családtagjai szintén fokozott figyelmet érdemelnek és „high risk” betegként kell őket követni a továbbiakban.

4. ábra: Az MMR gén mutációt hordozó személyek vastagbél tumoros populációból történő szűrésének ajánlott menete



3. Célkitűzések

Munkánk alapvető célja az, hogy az általunk gondozott beteganyagon felismerjük, kivizsgáljuk és gondozásba vegyük a nemzetközi kritériumok alkalmazásával kiszűrt Herediter Nonpolipózis Kolorektális Karcinómában szenvedő betegeket. Eddig kevés hazai közlés ismert, annak is jelentős része munkacsoportunk tollából. A magyarországi adatok hiányossága inspirált bennünket arra, hogy az ezzel a betegséggel kapcsolatos valós adatokhoz jussunk populációs szintű szűrésünk segítségével. Munkánk során külön figyelmet fordítottunk arra, hogy tevékenységünkkel elért új eredményeink egyértelműen alkalmazhatóak legyenek a mindennapi gasztroenterológiai gyakorlatban. Erre tekintettel a következő célkitűzéseket állítottuk fel.

1. Célul tűztük ki Amszterdam pozitív családok százalékos előfordulásának meghatározását priméren felfedezett vastagbél tumoros betegeink között. Ezzel is hazai adatokhoz juthatunk a CRC öröklődő hajlamát illetően, mellyel kapcsolatos magyarországi adat még nem ismert.
2. Célként fogalmaztuk meg annak vizsgálatát, hogy vajon a nemzetközi kritérium rendszerek alkalmazhatóságában vannak-e különbségek a magyarországi betegeken alkalmazva. Vizsgáltuk azt, hogy vajon az Amszterdam kritériumok egyedüli alkalmazásával, vagy az Amszterdam és Bethesda kritériumok kombinálásával mennyiben változik a mutáció hordozó betegek felismerésének hatékonysága.
3. Munkánk legfontosabb célkitűzése volt a kelet-magyarországi vastagbél tumoros populációban előforduló mutációk felismerése és összevetése a nemzetközi adatbázisokkal. Célunk volt annak felismerése, hogy vajon vannak-e az MMR gének ismétlődő, egy adott populációban jellemző mutációi és hogy vannak-e ezen géneken belül olyan területek, melyek mutációja gyakrabban fordul elő („hot spot”).

4. Tekintettel arra, hogy a betegség genetikai hátterének felderítése igen költséges és időigényes vizsgálatok révén valósítható meg, ezért nagyon fontosnak éreztük a HNPCC fenotípus kialakulásáért felelős MMR gén mutációk felismerésének a mindennapi gyakorlatban is elvégezhető költséghatékony útjának kidolgozását és megvalósítását a Debreceni Egyetemen.
5. Jelen munkánk klinikai alkalmazhatóságát az fémjelzi, ha a kimutatott mutációkat az adott családban élő hozzátartozókban is igazoljuk vagy kizárjuk. A mutáció hordozó családok családfa szűrésének elvégzése, igazolt mutáció hordozó egyének gondozásba vétele segítségével nem csak az újonnan kialakuló malignus megbetegedések megelőzésére van lehetőség, hanem számos új tapasztalat segítségével tovább javíthatjuk szűrési és gondozási tevékenységünk hatékonyságát.

4. Betegek és módszer

4.1. Vizsgált betegcsoport

Tanulmányunkba a DEOEC I. sz. Sebészeti Klinikáján (későbbiekben Sebészeti Intézet) 1997 és 2006 között 1127 priméren felfedezett és műtéti ellátáson átesett vastagbél tumoros beteget vettünk be. A fent említett betegcsoportból munkánk során azonban csak 809 beteg eredményeit használtuk fel. Ennek oka az volt, hogy a betegek egy része nem értékelhetően vagy egyáltalán nem válaszolt megkeresésünkre. Nem használtuk fel azokat a kérdőíveinket sem, melyeket az időközben elhunyt betegek hozzátartozói töltöttek ki, nem megfelelően pontos adatokat szolgáltatva. A vizsgálati időszakban 1997-2003 között retrospektív úton (1. vizsgálati szak), 2004-2006 között pedig prospektív úton végeztük vizsgálatainkat (2. vizsgálati szak). A két vizsgálati időszak alatt elért eredményeket,

tekintettel a különböző adatszerzési módszerre, elkülönítve is értékeljük. Minden betegünk esetén a Módosított Amszterdam és Bethesda kritériumok felhasználásával elkészített kérdőívünket alkalmaztuk (5. ábra).

5. ábra: A betegek szűréséhez használt kérdőív

Beteg neve (TAJ): Op. Éve: Tu. Lokalizációja:

I. Hány éves volt a vastagbél daganat felfedezésekor?

II. Volt-e már vastagbél tükrözéssel igazolt vastagbél polipja?

Nem

Igen

Ha igen, akkor hány éves korában, mekkora számban?

III. Szenvedett-e már korábban vastagbél daganatban vagy egyéb rosszindulatú daganatban?

Nem

Igen

Ha igen akkor hány évesen és milyen típusú daganat volt az?

IV. Van, vagy volt-e szülei, gyermekei vagy édestestvérei között vastagbél daganatban szenvedő beteg?

Nem volt,

1,

2,

Több is,

V. Van, vagy volt-e távolabbi rokonságában rosszindulatú vastagbél daganatban szenvedő beteg?

Nem volt,

1,

2,

Több is,

VI. Amennyiben volt vastagbél daganatban szenvedő rokona, annak betegsége 50 éves kor előtt vagy után került felismerésre?

Előtt

Után,

VII. Fordult-e elő családjában nőgyógyászati, gyomor, húgyúti vagy egyéb daganat?

Nem

Igen

Ha igen akkor milyen típusú, milyen fokú rokonában, hány éves korban?

Eltávolított daganat szövettani vizsgálatának eredménye:

Tanulmányunkból kizártuk azokat a betegeket, ahol a beteg családi anamnézise alapján vagy az adott beteg műtéti preparátuma alapján a Familiáris Adenomatózus Polipózis vagy annak bármely altípusa nem volt egyértelműen kizárható. Kizártuk azokat a betegeket is, akiknél a vastagbél daganat valamilyen gyulladásos bélbetegség (Crohn-betegség, Colitis ulcerosa) talaján alakult ki. Nem tekintettük értékelhető anamnesztikus információnak azt, amikor a családban felmerülő malignus betegség ténye nem volt egyértelműen igazolható. A kérdőívek kitöltését követően betegeinket alapvetően három csoportba osztottuk. Első csoportba soroltuk azokat a betegeket, akik esetében egyáltalán nem merült fel a családban a vastagbél daganatok hereditér jellege (**Sporadikus tumoros csoport**). A következő két csoportot a HNPCC-re gyanús betegeink képezték. Egyik csoportba tartoztak azok a betegek, ahol a családi anamnézis alapján egyértelműen teljesülnek az Amszterdam kritériumok (**Amszterdam pozitív csoport**). A másik csoportba tartoztak azok a betegek, ahol vagy a családi anamnézis vagy a családtagok alacsony száma miatt nem teljesülnek az Amszterdam kritériumok, azonban mégis bizonyos adatok alapján (például szinkrón vagy metakrón tumor előfordulása, korai életkor stb.) az adott beteg és családja esetén a Hereditér Nonpolipózisos Kolorektális Karcinóma fennállása feltételezhető és ezért további vizsgálatokat igényelnek. Ezt a beteg csoportot **Amszterdam negatív csoport**-nak neveztük el. Ezt követően a HNPCC fennállására gyanús betegek esetén az eltávolított műtéti preparátum immunhisztokémiai vizsgálatát és mikroszatellita instabilitási vizsgálatát végeztük el. Ez utóbbi vizsgálat esetén az adott beteg tumorszövetéből és perifériás véréből izolált DNS mikroszatellita instabilitási eredményeit hasonlítottuk össze. Így ezzel a fent említett két vizsgálattal tovább szűkíthető volt azon betegek köre, akiknél a legköltségesebb és leginkább időigényes vizsgálat, a DNS szekvenálás segítségével próbáltuk igazolni a családban előforduló megbetegedések patogenetikai hátterét képező MMR gén mutációkat (5. ábra). Az eddigi irodalmi közlések eredményeit felhasználva, csak azoknál az eseteinknél végeztünk DNS szekvenálást vagy a

genomiális átrendeződést igazoló vizsgálatokat, ahol a mikroszatellita instabilitási vizsgálat magas fokú instabilitást igazolt és az adott beteg tumor szövetének immunhisztokémiai vizsgálata is valamelyik MMR gén fehérje produktumának hiányát bizonyította. Amennyiben sikerült patogén eltérést találnunk, akkor a családtagokat a továbbiakban az igazolt mutációra célzottan vizsgáltuk. A vizsgálatokat a családtagok egyetértésével, írásos beleegyezésével végeztük el.

4.2. Laboratóriumi vizsgálatok

4.2.1. Immunhisztokémiai vizsgálat

A tanulmányban rutin metodikával feldolgozott, formalinban fixált, paraffinba ágyazott vastagbél karcinómás szöveteket használtunk. Öt mikron vastagságú, sorozat metszeteket készítettünk a haematoxylin-eosin festéshez és a hMSH2, hMLH1 immunhisztokémiai reakciókhoz. Az immunhisztokémiai reakció elvégzéséhez a metszeteket deparaffináltuk xylol, 96 %-os etil-alkohol segítségével. Endogén peroxidáz blokkolást végeztünk 0,5%-os metanolos hidrogén-peroxid oldattal, 30 percen keresztül, majd desztillált vizes öblítés után antigén feltárást végeztünk. A metszeteket 5 percre mikrohullámú sütőbe helyeztük (600 W), citrát pufferben (10 mmol/l citromsav, 2N NaOH-dal a pH-t 6,0-ra beállítva). A metszeteket ezután pH 7,4-es PBS oldatban mostuk. A primer antitest (monoklonális anti humán hMLH1 illetve hMSH2 Labvision, clone M074581, és 2MSH01) 1:100 hígításával inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át a metszeteket. Kétszeri 7,4-es pH-jú PBS oldatban történő mosás után hozzáadtuk a szekunder antitestet (LSAB biotinnal konjugált 2. antitest, DAKO). Ezt követően 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Előhívás VIP chromogénnel (Vector) történt, majd metilzöld magfestés, víztelenítés, lefedés.

4.2.2. Mikroszatellita instabilitás vizsgálata

A tumorszövet és a beteg véréből izolált DNS mikroszatellita instabilitási vizsgálatát végeztük. Két mononukleotid markert (BAT 25, BAT 26) és három dinukleotid markert (D2S123, D5S346, D17S250) vizsgáltunk a Nemzetközi Referencia Panel utasításait követve, a HNPCC Microsatellite Instability Test alkalmazásával (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Az MSI státuszt a „National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Colorectal Cancer Detection” konszenzusa alapján határoztuk meg. Nagyfokú instabilitást (MSI-High) állapítottunk meg, amennyiben a tumorszövetben a markerek legalább 30 százaléka mutatott új alléleket a vérben izolált kontrollhoz képest. Ennél kevesebb eltérés esetén kisfokú instabilitásról (MSI-Low) beszélhetünk. Ha nem találunk eltérést a tumorszövetből és a vérből izolált markerek között, akkor stabil MSI státusról (MSS) beszélhetünk (20).

4.2.3. hMLH1 és hMSH2 gének szekvenálása

4.2.3.1. Genomiális DNS preparálás

A DNS izolálás 3 ml alvadásában gátolt (EDTA-ás) vérből történt Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega A1120) segítségével a gyártó instrukcióinak megfelelően. A kapott DNS oldatot - GeneQuant RNA/DNA calculator - spektrofotométeren (Pharmacia) kvantifikáltuk.

4.2.3.2. PCR

hMLH1 és hMSH2 gének kódoló részeit összesen 35 primer párral fedtük le. A PCR reakciókat Primus96 PCR készülékben (MERCK) végeztük.

1 U REDTaq DNS polimeráz (SIGMA D 4309)
10x REDTaq PCR puffer (polimerázzal forgalmazzák)
0.1 μ M sense primer
0.1 μ M antisense primer
dNTP mix: 100 μ M egyenként (Promega U1240)
0.5 mM MgCl₂ (SIGMA M-8787)
200 ng genomiális DNS

PCR program:

96 °C 5 perc
93.5 °C 1 perc
Tanell. 1 perc
72 °C 1 perc

} 35x

A primerek kötődési hőmérséklete (Tanell.) a primerek mellett található.

Primer szekvenciák:

hMLH1 1 exon Tanell.: 56°C
s 5'-gacgtttccttggtcttctg-3'
as 5'-ccgttaagtcgttagcccttaagt-3'
hMLH1 2 exon Tanell.: 55°C
s 5'-tattttctgttgattgccag-3'
as 5'-tgactctccatgaagcgc-3'
hMLH1 3 exon Tanell.: 49°C
s 5'-gagatttggaatagtaaca-3'
as 5'-cacaggaggatatttacaca-3'
hMLH1 4 exon Tanell.: 52°C
s 5'-cccagcagtgagttttctt-3'
as 5'-gattactctgagacctagc-3'
hMLH1 5 exon Tanell.: 52°C
s 5'-gattttcttttcccttggg-3'
as 5'-caaacaagctcaacaattac-3'
hMLH1 6 exon Tanell.: 55°C
s 5'-ttgccaggaccatcttggg-3'
as 5'-actcccagatttggactgt-3'
hMLH1 7 exon Tanell.: 47°C
s 5'-ctagtgtgtgttttggc-3'

as 5'-cataaccttatctccacc-3'
 hMLH1 8 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-aaatccttgtgtcttctgtg-3'
 as 5'-gtgatggaatgataaaccaag-3'
 hMLH1 9 exon Tanell.:52 °C
 s 5'-gcttcagaatctcttttcta-3'
 as 5'-gtggatttcccatgtggttc-3'
 hMLH1 10 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-ggacagtttgaactggttgc-3'
 as 5'-gaggagagcctgatagaacatctg-3'
 hMLH1 11 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-tctaaggtaattgttctctctta-3'
 as 5'-aagtagctggatgagaagcg-3'
 hMLH1 12 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-ttaatacagactttgctaccag-3'
 as 5'-cagataaagagtagctgtactt-3'
 hMLH1 13 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-ggttcattcacagctctgtag-3'
 as 5'-cacagcgttttagtaccctca-3'
 hMLH1 14 exon Tanell.:60 °C
 s 5'-aagtgggggttgtaggattc-3'
 as 5'-ctctgcttgttcacacactc-3'
 hMLH1 15 exon Tanell.:49 °C
 s 5'-tttgtcccaactggtgtatctc-3'
 as 5'-tcagttgaaatttcagaagtg-3'
 hMLH1 16 exon Tanell.:50 °C
 s 5'-ttcatgttcttgccttctcc-3'
 as 5'-gaagtataagaatggctgtc-3'
 hMLH1 17 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-tgtccttttctctgcaagc-3'
 as 5'-tttcctccagcacacatg-3'
 hMLH1 18 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-gaggtattgaatttcttggac-3'
 as 5'-gtgtgcatcaccactgtacc-3'
 hMLH1 19 exon Tanell.:60 °C
 s 5'-ttcatgttcttgccttctcc-3'
 as 5'-gaagtataagaatggctgtc-3'

hMSH2 1 exon Tanell.:59 °C
 s 5'-cttcaaccaggaggtgaggaggt-3'
 as 5'-gaaaggagccgcgccacaag-3'
 hMSH2 2 exon Tanell.:47 °C
 s 5'-atgtaatatctcaaatctgtaatgt-3'
 as 5'-ataagtaaattaaaaaggaagataa-3'
 hMSH2 3 exon Tanell.:52 °C
 s 5'-tgttcaagagttgttaaatttt-3'
 as 5'-tggaatctcctctatcactagact-3'
 hMSH2 4 exon Tanell.:47 °C
 s 5'-tettattcctttctcatagtag-3'

as 5'-tattgtaattcacatttataatcc-3'
 hMSH2 5 exon Tanell.:47 °C
 s 5'-agtggatagaaatcttc-3'
 as 5'-accaatcaacattttaaccc-3'
 hMSH2 6 exon Tanell.:48 °C
 s 5'-tttactaatgagcttgcc-3'
 as caggttacataaaaactaacg-3'
 hMSH2 7 exon Tanell.:49 °C
 s 5'-agattgaatttagtggagc-3'
 as 5'-caaatcactgtgtaccttc-3'
 hMSH2 8 exon Tanell.:47 °C
 s 5'-aatgagatctttttattgtttgtt-3'
 as 5'-actgcttaataaaaaagtattg-3'
 hMSH2 9 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-gtcactttgtctgttgccag-3'
 as 5'-attccaacctccaatgaccc-3'
 hMSH2 10 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-gtagtaggtatttatggaatac-3'
 as 5'-taataatgacttacaacctg-3'
 hMSH2 11 exon Tanell.:50 °C
 s 5'-ttaataaaactgtatttccgatttg-3'
 as 5'-agccaggtgacattcagaacattat-3'
 hMSH2 12 exon Tanell.:52 °C
 s 5'-aggctatgtagaaccaatgc-3'
 as 5'-taccagtaatgatgttggaac-3'
 hMSH2 13 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-aatcttgcttctgatataattg-3'
 as 5'-catttctatctcaagggactagga-3'
 hMSH2 14 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-tcatgtaattatgtgcttcag-3'
 as 5'-gtactccaatagtagatacc-3'
 hMSH2 15 exon Tanell.:55 °C
 s 5'-tgtctcttctcatgctgtcc-3'
 as 5'-taagttaactatgaaaacaaactg-3'
 hMSH2 16 exon Tanell.:58 °C
 s 5'-gacattcacatgtgttcagc-3'
 as 5'-taccttcattccattactggg-3'

4.2.3.3. Mutáció keresés

A PCR termékek futtatása vertikális gél apparátussal történt (BioRad) MDE gélen (CAMBREX 506209) heteroduplex és SSCP formájában a gyártó instrukcióinak megfelelően.

4.2.3.4. Szekvenálás

A heteroduplexen vagy SSCP-n eltérő mintázatot adó mutációk PCR termékeit láncterminalizációs módszerrel szekvenáltuk BigDye Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 kittel (PE Applied Biosystems 4336917) a gyártó utasításainak megfelelően.

A szekvenálás termékét ABI-PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems) készüléken futtattuk a készülék kézikönyve szerint, a futtatást Sequencing Analysis v.3.7 szoftverrel analizáltuk (73,74).

4.2.4. hMLH1 promóter metiláció vizsgálata

A transzkripció start helytől proximális irányban a –435 és –316 nukleotid közötti régió vizsgálata Kámory és mtsai szerint metilációra érzékeny és nem érzékeny enzimek, valamint belső kontrollok segítségével történt (75). A disztális rész vizsgálata –662 és –575 között Eads és mtsai alapján történt kvantitatív valós idejű PCR segítségével, amelyben a metilációs státusz egy nem metilált humán sperma kontroll és egy teljesen metilált mesterséges kontroll segítségével határozható meg (76).

4.2.5. Nagy deléciók kimutatása (Multiple Ligation dependent Probe Amplification (MLPA))

A genomi deléciókat multiplex ligáció-függő próba amplifikációs módszerrel, SALSA MLPA Kit P003 MLH1/MSH2 (MRC-Holland, Amsterdam Netherlands) kit segítségével mutattuk ki, a gyártó útmutatásai alapján. A felsokszorosított DNS-fragmenteket kapilláris gélelektroforézissel választottuk szét (ABI-3130). A különböző exonok

amplifikációs termékeinek mennyiségét a görbe alatti területe alapján határoztuk meg, az összes fragment görbe alatti területének összegéhez viszonyítva. Deléciót állapítottunk meg a vizsgált mintában, ha valamely exon próbáinak amplifikációs terméke 35-55%-kal csökkent a negatív kontroll mintáéhoz képest.

5. Eredmények és Megbeszélés

5.1. Populációs szűrés eredményei

1997 és 2006 közötti vizsgálati időszakunkban összesen 1127 beteget kérdeztünk ki az általunk elkészített kérdőív segítségével, melyet a Bethesda és az Amszterdam kritériumok felhasználásával szerkesztettünk meg (6. ábra). Az adatok pontatlansága vagy a kérdések félreértelmezése miatt 318 kérdőívet nem vettünk be a vizsgálatainkba. Kizártunk minden olyan esetet, ahol a gyulladásos bélbetegség vagy FAP talaján kialakult malignus folyamat lehetősége felmerült. Nem értékeltük azokat az eseteket sem, ahol örökbefogadás vagy egyéb tényezők miatt az egyenesági rokonság nem volt felderíthető. Sporadikusnak tekintettük azokat az eseteket, ahol a családi tumoros anamnézis nem volt egyértelműen igazolható. A teljes vizsgálati időszak alatt 809 betegből 725 esetet (89,6%) egyértelműen a késői életkorban előforduló sporadikus vastagbél daganatnak tekintettünk. Az összes ebbe a csoportba tartozó vastagbél tumoros beteg 50 év feletti életkorban szenvedett a fent említett megbetegedésben. A teljes vizsgálati időszakban 84 HNPCC gyanús családot regisztráltunk (10,3%). Ebből Amszterdam negatív csoportba 49 (6%), Amszterdam pozitív csoportba 35 család tartozott (4,3%). A vizsgálatainkat 1997-2003 között retrospektív úton végeztük. A kiküldött kérdőíveket lekérdező orvos segítsége nélkül a betegek egyedül töltötték ki. Ebben az időszakban voltunk kénytelenek kizárni a vizsgálatokból a kérdőívek jelentős részét (297

db). 1997-2003 között 464 beteget tudtunk bevenni a vizsgálatokba, ebből 437 beteg (94%) sporadikus vastagbél tumoros betegnek minősült. Ebben az időszakban összesen 27 (5,8%) HNPCC gyanús családot szűrtünk ki, melyek közül 13 (2,8%) Amszterdam negatív, 14 (3%) Amszterdam pozitív volt. A 2004-2005-2006 évben már a betegek osztályra történő felvételekor lekérdező orvos segítségével történt a betegek szűrése, ugyanazon kérdőív alkalmazásával. Ebben az időszakban csak 21 beteg kérdőívét zártuk ki vizsgálatainkból. Ennek oka az, hogy a későbbi szövettan igazolta azt, hogy a daganat gyulladásos bélbetegség (IBD) talaján alakult ki, mely addig még nem volt ismert, vagy a beteg már évekkel ezelőtt lekérdezésre került. Ebben az időszakban 345 beteg kérdőívét vettük be tanulmányunkba, melyek közül 288 (83,4%) egyértelműen késői életkorban jelentkező sporadikus vastagbél daganatnak tekinthető. 57 beteg (16,5%) tartozott a HNPCC gyanús betegcsoporthoz, melyek közül Amszterdam negatívnak bizonyult 36 beteg családjá (10,4%), míg Amszterdam pozitívnak bizonyult 21 beteg családjá (6%) (3. táblázat).

3. táblázat: A vizsgált betegcsoportok megoszlása

	1. időszak (1997-2003)	2. időszak (2004-2006)	Teljes időszak (1997-2006)
Vizsgált betegek száma	464	345	809
Sporadikus esetek	437 (94%)	288 (83,4%)	725 (89,6%)
Amszterdam negatív	13 (2,8%)	36 (10,4%)	49 (6%)
Amszterdam pozitív	14 (3%)	21 (6%)	35 (4,3%)
Igazolt mutáció hordozó	4 (0,86%)	6 (1,74%)	10 (1,2%)

A teljes vizsgálati időszakban 64 beteg esetében tudtuk elvégezni a mikroszatellita instabilitási és az immunhisztokémiai vizsgálatokat. A fennmaradó 20 beteg esetében a beteg halála a vizsgálati technika beállítása alatt, vagy a beteg bele nem egyezése miatt nem történt

meg. Szekvenálásra csak azokban az esetekben került sor, ahol magas fokú mikroszatellita instabilitást tapasztaltunk (MSI-H), az immunhisztokémiai vizsgálat pedig valamely MMR gén fehérjetermékének hiányát igazolta a tumorsejtek magjaiban. A mikroszatellita stabil (MSS), vagy alacsony fokú instabilitású (MSI-L) eseteket, valamint a pozitív immunhisztokémiájú eseteket (hMLH1 és hMSH2 festődik a tumorsejtek magjaiban) nem szekvenáltuk meg. Így összesen 25 beteg szekvenálását terveztük. A betegek együttműködésének, hiánya valamint a beteg időközbeni halála vagy lakcím változása miatt összesen csak 19 beteg esetében tudtunk szekvenálást végezni a beteg perifériás véréből izolált DNS-ből. Tíz patogénnek vélt mutációt és számos már ismert polimorfizmust igazoltunk (4. táblázat). A 10 patogén mutációból 8 mutációt munkacsoportunk írt le elsőként. Ezek közül 4 igazolt mutáció hordozó családot az első (1997-2003), hatot pedig a második időszakban (2004-2006) fedeztünk fel. A teljes időszakban felismert 10 igazolt mutáció hordozó család közül 7 az Amszterdam pozitív, 3 az Amszterdam negatív csoportból került ki. A teljes vizsgálati időszakra számítva 19 beteg esetében végeztük el a teljes vizsgálati sort. Ebben a betegcsoportban Amszterdam pozitív család volt 9 (47%) és Amszterdam negatív volt 10 család (53%). Ezek alapján a teljesen kivizsgált Amszterdam pozitív családok 77%-ában tudtunk valamely patogén mutációt igazolni. Az Amszterdam negatív családok esetében ez 30%-nak bizonyult.

Az igazolt mutációk esetén a betegek családjának elérhető tagjait az adott mutációra célzottan vizsgáltuk. A családfák analízisét a következőekben ismertetjük.

Család	Gén	Exon	Mutáció	Domain	Következmény
1.	hMSH2	7	c.1264G>T	hMSH3/hMSH6 interaction	p.E422X nonsense
	hMSH2	3	c.380A>G	DNA binding	p.N127S missense
2.	hMSH2	13	c.2210+1G>C	MutL homologs interaction	Splicing error frameshift
	hMLH1	19	c.2146G>A	hPMS2/hMLH3/hPMS1 interaction	p.V716M missense
3.	hMSH2	13	c.2131C>T	Walker A	p.R711X nonsense
4.	hMLH1	11	g.26844-28630del1787	MutS homologs interaction	Out of frame del frameshift
5.	hMLH1	10	c.794G>C	MutS homologs interaction	p.R265P missense
6.	hMLH1	11	c.685-?_1038+?del	MutS homologs interaction	deletion (frameshift?)
7.	hMLH1		c.1663C>G	hPMS2/hMLH3/hPMS1 interaction domain	p. L555V missense
			c.2240C>A	C-terminális	p. P747H missense
8.	hMLH1	2	c.143A>C	ATP-ase	p.Q48P missense
9.	hMSH2	6	c.969-970delTC	DNA binding	Out of frame del frameshift
10.	hMSH2	9	c.1392A>T	hMSH3/hMSH6 interaction domain	p.E464D missense

4. táblázat: Igazolt patogén mutációk. Az 1. 2. és 7. családnál egy-egy felismert nem patogén polimorfizmus is szerepel.

A mutációk elnevezése a Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/rec.html>) nomenklatúrája szerint történt

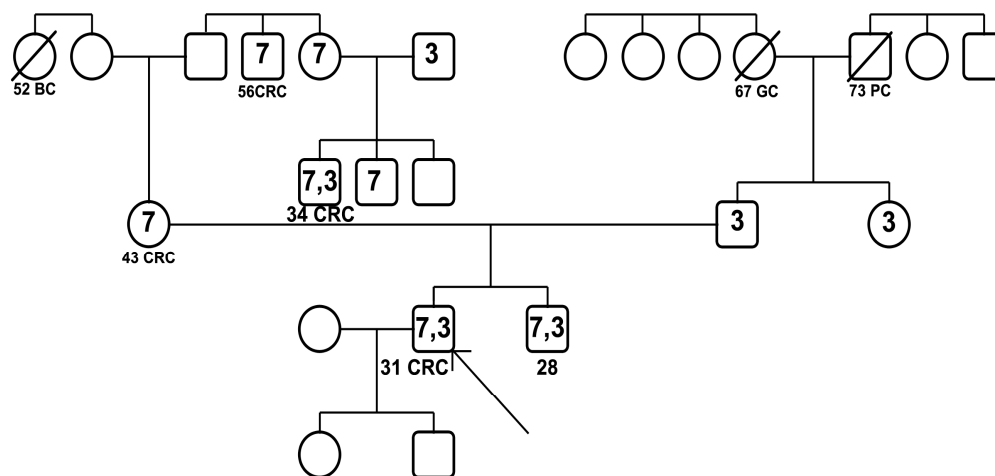
5.2. Családfa analízisek eredményei és azok megbeszélése

5.2.1. 1. család:

Fiatal férfi beteg 31 éves korában a flexura lienalis rosszindulatú daganata miatt került műtéti ellátásra. Édesanyja 43 évesen, anyai nagyapja testvére 56 évesen, és az index személy unokatestvére 34 évesen szenvedett vastagbél daganatban.

A beteg családfájának három generációra kiterjedő analízise során egyértelművé vált, hogy számos ponton teljesíti az Amszterdam és Bethesda kritériumokat egyaránt. Az anyai ágon, az index személyt is beleértve négy vastagbél és egy emlő daganat fordult elő elsőfokú rokonok között. Az apai ágon egy gyomor, és egy tüdő daganatot regisztráltunk (6. ábra). A tumorszövet immunhisztokémiai vizsgálata során a hMSH2 festődés hiányát tapasztaltuk. A hMLH1 festődés megfigyelhető volt a tumorsejtek magjaiban. Mikroszatellita instabilitás vizsgálata magas fokú (MSI-H) instabilitást igazolt. Mindezen leletek birtokában DNS szekvenálást végeztünk a hMSH2 és a hMLH1 gének összes exonján. A hMLH1 gén exonjain nem tudtunk eltérést igazolni, azonban két genetikai elváltozást is találtunk a hMSH2 esetében. Az első mutáció a 7. exon 422. kodon Glu→STOP cserét kialakító nonszensz mutációja. A második eltérés a 3. exon 127. kodon Asp→Ser cserét kiváltó misszensz mutációja (4. táblázat). A családtagok tájékoztatását követően, velük egyetértésben 14 családtag perifériás véréből (lymphocyta) izolált DNS célzott vizsgálatát végeztük. Az anyai ágon 7 személy hordozza a 7. exonon található nonszensz mutációt, ebből 4 személy vastagbél daganatban szenvedett. A 3. exon mutációja megtalálható az apai ágon két családtagban, valamint az anyai ágon is egy másik család kapcsolódása révén. A családban három személyben figyelhető meg a 3. és 7. exon mutációjának együttes előfordulása (6.

ábra). Az emlő, tüdő és a gyomor daganatban szenvedő családtagokat nem tudtuk vizsgálni, mivel a tanulmány kezdetének idejére már elhunytak.



6. ábra: Az 1. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonokban a hordozott mutáció lokalizációját (exon), az ikonok alatt pedig, az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma. BC: Emlő daganat. GC: Gyomor daganat. PC: Tüdő daganat.

A két, a hMSH2 génben található genetikai eltérést összevetettük a jelenleg elérhető legaktuálisabb nemzetközi mutációs adatbázissal (The Human Gene Mutation Database, Cardiff. International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors) (77,78). A 7. exonon található nonszensz mutáció még eddig nem került közlésre, így újonnan detektált mutációnak tekinthető. Elképzelhető, hogy egy a közép-kelet európai populációra jellegzetes mutációval állunk szemben, azonban erre csak további vizsgálatok deríthetnek majd fényt. A STOP kodon kialakulásával járó mutációt egyértelműen patogén eltérésnek tartjuk. Úgynevezett trunkált fehérje expressziója jön létre, mely funkcióképtelen, hamar lebomlik, így immunhisztokémiai vizsgálatokkal sem volt kimutatható. Ezt a feltételezésünket erősíti az a

megfigyelésünk is, hogy mind a négy vastagbél daganatban szenvedő egyénben igazoltuk ezt az eltérést.

A 3. exon misszensz mutációját már több szerző is közölte, mint egy aminosav cseréjével járó nem patogén polimorfizmust. Samowitz 1066 beteg vizsgálata során 3 esetben találta meg ezt a genetikai eltérést. Egyik esetben egy másik misszensz mutációval (hMSH2 6. exon, 328. kodon, Ala→Pro csere), egy másik esetben, pedig a hMLH1 gén patogén frameshift mutációjával társult (16. exon, 626. kodon) (80). Egy másik érdekes társulást De la Chapelle és munkatársai közölték, mikor a fent említett polimorfizmus a hMSH2 6. exon 333. kodonon elhelyezkedő pontmutációval együtt fordult elő (78). Ezen polimorfizmus allél frekvenciáját a „The National Institute of Environmental Health Sciences Genome Project” adatbázisa 0,02-nek adja meg, mely 4 százalékos heterozigóta előfordulást jelent az amerikai populációban (81).

A 7. exon mutáció egyedüli jelenléte két betegnél vezetett vastagbél daganat kialakulásához, 43 és 56 éves életkorban. Amikor mind a két genetikai eltérés (7. és 3. exon mutáció) kimutatható volt az adott egyénben, a vastagbél daganat kialakulása jóval korábbi életkorra tolódott (31 és 34 év). A csak 3. exon mutációt hordozó egyének esetén nem találtunk kolorektális karcinómában szenvedő beteget. Mindezek, valamint az irodalmi adatok alapján felmerül, hogy a 3. exon polimorfizmus egyedül nem képes malignus betegség kialakulását kiváltani, azonban patogén mutáció jelenlétében annak kialakulását akár egy évtizeddel is korábbi életkorra tolhatja. Természetesen a kis esetszám miatt ez csak feltételezés. Jól ismert tény, hogy a HNPCC penetranciája nem 100 százalékos. Ez magyarázhatja azt, hogy két a 7. exon nonszensz mutációját hordozó személy nem szenvedett még kolorektális vagy valamely HNPCC asszociált daganatos megbetegedésben. Az index személy testvére, aki 28 éves, mind a két igazolt genetikai eltérést hordozza, mint ahogy az index személy is. Az index személy testvérénél kolonoszkópos vizsgálata során eltérést nem

találtunk. Fiatal életkorával magyarázható, hogy jelenleg még nem manifestálódott nála megbetegedés. A négy már kolorektális karcinómában szenvedett beteg, valamint a további három, a 7. exon mutációját hordozó személy magas rizikójú egyénnek minősül és rendszeres kontrollt igényel.

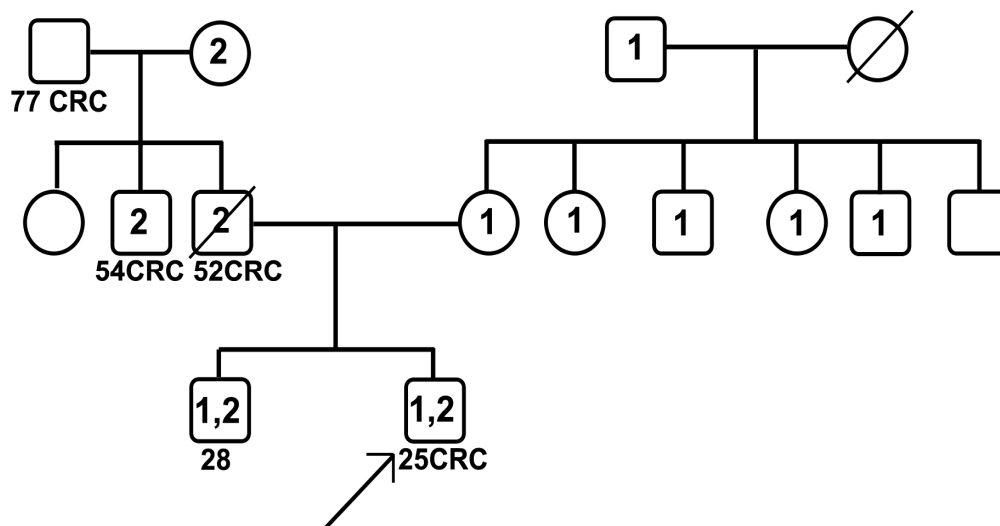
A vizsgált család összes tagja egy észak-magyarországi kis lélekszámú helységből származik. Ez lehet az oka annak, hogy a hMSH2 3. exonján talált polimorfizmus megjelenik mind az apai és anyai ágon is. Az anyai ágon egy másik család kapcsolódása révén kerül be. A 7. exon mutáció gyakoriságának megítélése, mint újonnan felfedezett mutáció, még további populációs szintű vizsgálatokat igényel.

Első családuk egy típusos, úgynevezett „standard” HNPCC-s család (82). Mind az Amszterdam, mind a Bethesda kritériumok számos pontját teljesíti. Az itt talált két eltérés közül az egyik ismert volt, a másikat munkacsoportunk közölte először (83). A család kiváló együttműködése kapcsán nem csak a családfaszűrés, hanem a folyamatos gondozás és követés is megvalósítható, melynek következtében a családban további daganat előfordulásáról nem tudunk. Az index személy rendszeres kolonoszkópiás kontrollja során a műtét óta eltelt 4 év alatt két tubulovillózus adenóma eltávolítása történt meg.

5.2.2. 2. család:

Az index személy 25 évesen a rektum adenokarcinómája és a vakbél mucinózus adenokarcinómájának szinkrón előfordulása miatt szubtotális kolektomián esett át intézetünkben. A beteg családja nem teljesíti az Amszterdam kritériumokat. Viszonylag szegényes családi anamnézissel rendelkezik, az index személyen kívül csak egy további vastagbél daganatos beteg volt a családban, a felismerés pillanatában (77 éves apai nagyapa) (7. ábra). Egyéb, más típusú rosszindulatú megbetegedés előfordulásáról nem volt

tudomásunk. Az index személy 28 éves bátyjánál a szigmabél tubulovillózus adenómáját igazoltuk, melyet endoszkópos úton eltávolítottunk. Az index személy három Bethesda kritériumot is teljesít, melyek a következők: szinkrón vastagbél daganat, ez 45 éves életkor előtt került felismerésre, elsőfokú rokon vastagbél adenomatózus polippal, 40 éves életkor előtt. A két tumorszövet immunhisztokémiai vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy sem a hMLH1, sem a hMSH2 nem festődik a tumoros sejtek magjaiban. Mindkét tumorszövet magas fokú (MSI-H) mikroszatellita instabilitást mutatott. A hMLH1 gén promóterének sem disztális, sem proximális régiójának hypermetilációját nem tudtuk igazolni egyik tumorszövetből sem. A hMLH1 és hMSH2 gének 35 exonjának szekvenálását végeztük, melynek során a hMLH1 gén 19. exon 716. kodonján Val→Met cserét okozó mutációját, valamint a hMSH2 gén 13. intron 2210+1 nukleotidjának G→C cserét okozó mutációját találtuk (4. táblázat). A család tájékoztatását követően, velük egyetértésben további 15 családtag célzott genetikai vizsgálatát végeztük el. A hMLH1 gén 19. exon mutációját, az index személyt is beleértve, anyai ágon 9 személyben igazoltuk, míg a hMSH2 mutációját, az index személyt is beleértve, apai ágon 7 személyben találtuk meg. Az index személy és testvére mindkét mutációt hordozza (7. ábra).



7. ábra: A 2. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonokban a hordozott mutáció típusát (hMLH1 vagy hMSH2 génben), az ikonok alatt pedig, az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma.

Hutter és munkatársai egy HNPCC-s családban leírták a hMLH1 19. exonján talált mutációt, mely egy másik germline eltéréssel társult (84). A szerzők úgy vélték, hogy a 19. exon mutációja a betegséget okozó patogén eltérés. Cederquist és munkatársai már csak egy ritkán előforduló variánsnak (polimorfizmus) tartja ezt az eltérést. Egy dupla HNPCC asszociált daganat miatt kiszűrt beteg (endometrium 50 évesen, kolorektális 56 évesen) vizsgálata során a hMLH1 19. exonján elhelyezkedő mutációján kívül egy másik germline mutációt is igazoltak. Véleményük szerint nem a 19. exonon található mutáció a patogén (85). Az általunk vizsgált családban az anyai ágon, az index személyt is beleértve 9 személyben találtuk meg a fent említett eltérést. Egyedül az index személy szenvedett daganatos megbetegedésben a vizsgálat megkezdésének időpontjában. Az expresszált hMLH1 fehérje ebben a pozícióban elhelyezkedő aminosava fejlődéstani szempontból nem konzervatív és a normál kontroll csoport legalább egy százalékában mutat eltérést. Ezen polimorfizmus allél

frekvenciáját Cederquist is vizsgálta, és úgy észlelte, hogy a teljesen egészséges populáció 1 százalékában fellelhető (85). Mindezek alapján úgy véljük, hogy ez az eltérés inkább egy nem patogén, ritka polimorfizmusnak tekinthető.

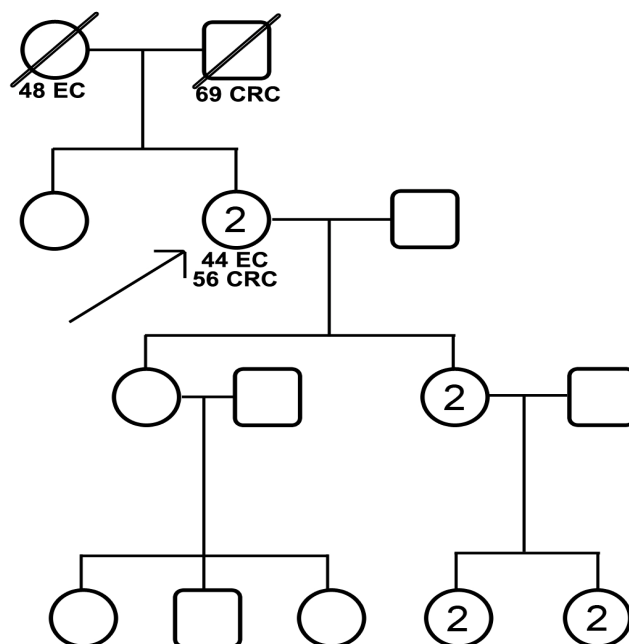
A másik eltérést (hMSH2, c.2210+1 G→C) egy lengyel HNPCC-s család vizsgálata során már Kurzawski és munkatársai leírták, mint egyértelműen patogén mutációt (57). Ez az eltérés egy kereteltolódásos mutáció az exon-intron határon. Ezt a mutációt az index személyt és annak testvérét is beleértve, 5 személyben tudtuk igazolni az apai ágon. Az apai nagyapa, aki 77 évesen szenvedett vastagbél daganatban nem hordozza ezt a mutációt, így megbetegedése sporadikus vastagbél daganatnak tekinthető. Az index személy 28 éves bátyja mindkét genetikai eltérést hordozza. Az ő esetében elvégzett kolonoszkópia a szigmabél adenomatózis polipját igazolta, amelyet endoszkópos úton eltávolítottunk. A vastagbélben több polip nem volt fellelhető. Ő és az index személy egyaránt további szoros követést igényel. Úgy véljük, hogy ez a genetikai eltérés a patogén, és ebben az esetben is felmerülhet az, hogy a két eltérés egy személyben történő megjelenése a vastagbél daganat korai megjelenéséhez vezethet. A család további gondozását javasoltuk mindazon családtagok követése céljából, ahol ez utóbbi mutációt sikerült igazolnunk. Annak ellenére, hogy a családtagok a HNPCC jellemzőivel kapcsolatosan alapos felvilágosítást kaptak, nem sikerült őket gondozási programba venni. Ennek oka volt a család egészségügyi szemléletének hiánya, valamint az, hogy a családban ezidáig kis számú tumoros eset fordult elő. 3 évvel az index személy műtete és a HNPCC igazolását követően a gondozásra egyébként nem járó családtag, nevezetesen az index személy édesapja jelentkezett intézetünkben a felszálló vastagbél mucinózus adenokarcinómájával. A helyzet érdekességét tovább emeli az, hogy ennél a betegnél egyidőben a prosztatata rosszindulatú folyamatát is észleltük. A beteg malignus folyamatának felismerése pillanatában 52 éves volt. A műtét során a vastagbél folyamat eltávolítható volt, azonban kiterjedt paraaortikus nyirokcsomó metasztázisok következtében a beteget adekvált

onkológiai kezelés ellenére 9 hónappal később elvesztettük. Eközben az index személy édesapjának testvére 54 évesen más intézetben szintén előrehaladott végbél daganat miatt került ellátásra, végleges sztóma kihelyezésével. Ő jelenleg is onkológiai kezelés alatt áll. Mindkét utóbb említett beteg esetében a rendszeres gondozásba vétel a daganat idejekorán történő felismeréséhez vezetett volna. Mindketten hordozták a hMSH2 ebben a családban igazolt mutációját. A második család érdekessége, hogy bár nagyszámú családtag van, azonban a szegényes családi anamnézis következtében a család nem teljesítette az Amszterdam kritériumokat. Családunk jól példázza „a HNPCC gyanús család szegényes családi anamnézissel” típusát.

5.2.3. 3. család:

Index személyünk 44 éves korában endometrium, majd 56 éves korában a leszálló vastagbél adenokarcinómájában szenvedett. Édesanyja 48 évesen endometrium, édesapja 69 évesen gyomor daganat következtében hunyt el. Az index személy nagyszüleiéről érdemi információ nem volt beszerezhető. A család kis létszáma miatt nem teljesítheti az Amszterdam kritériumokat. Figyelmünket azonban egy adott személyben előforduló vastagbél, és egy HNPCC asszociált daganat viszonylag korai életkorban történő metakrón előfordulása keltette fel. Vizsgálataink során a tumorszövet nagyfokú mikroszatellita instabilitását (MSI-H), valamint a hMSH2 protein festődésének hiányát tapasztaltuk a tumorsejtek magjaiban. Szekvenálás során a hMSH2 a nemzetközi adatbázisok szerint már ismert patogén mutációját (hMSH2 gén 13 exon 711. kodon Arg→STOP) sikerült igazolnunk. (4. táblázat) (77,78).

További 7 családtag célzott vizsgálata során a fent említett mutációt 3 személyben találtuk meg (8. ábra). Az index személy szüleit a vizsgálat előtti haláluk miatt már nem tudtuk vizsgálni.



8. ábra: A 3. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonokban a hordozott mutációt (hMSH2), az ikonok alatt pedig, az életkort jelzik a tumor megállapításának időpontjában. CRC: Kolorektális karcinóma. EC: Endometrium karcinóma.

Az ebben a családban igazolt, a hMSH2 gén 13. exon 711. kodon Arg→STOP cserével járó nonszensz mutációját Kurzawski egy az Amszterdam kritériumokat teljesítő lengyel HNPCC-s családban írja le (86). Kim és munkatársai koreai familiárisan halmozódó gyomor daganatos családok esetén keresték a hMLH1 és hMSH2 mutációk patogenetikai szerepét. Ez a munkacsoport is leközlö ezt a genetikai eltérést egy dominálónan gyomor daganatokat tartalmazó családban. Érdekes megállapításra jut, hogy szemben azokkal az eddigi megfigyelésekkel, melyek szerint HNPCC-ben a kolorektális karcinómák után az endometrium karcinóma a leggyakrabban előforduló HNPCC asszociált daganat, a koreai

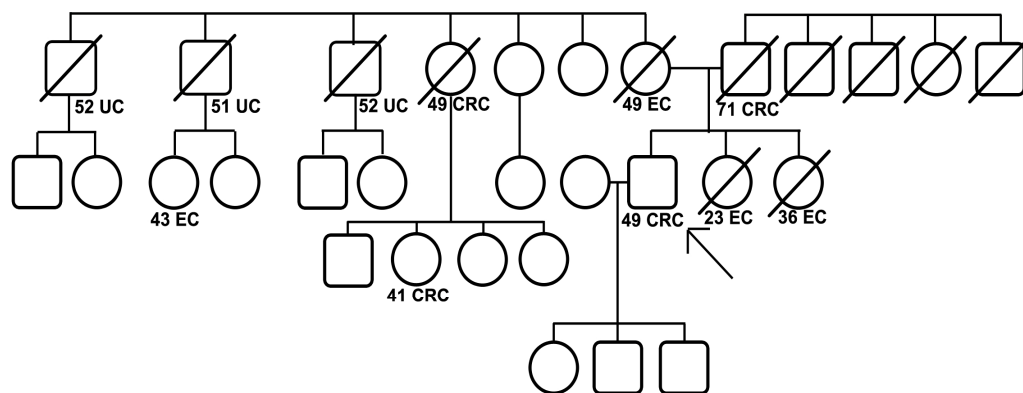
HNPCC-s családok esetén a gyomor daganatot tapasztalták a második leggyakoribb megbetegedésnek (87).

További 7 családtag célzott vizsgálata során a fent említett mutációt 3 személyben találtuk meg (8. ábra). Ezek a családtagok jelenleg egészségesek, rendszeres utánkövetésük megoldott. A rendszeres nőgyógyászati és kolonoszkópos ellenőrzések miatt további rosszindulatú megbetegedés nem fordult elő a családban. Követésük során egy konizáció és több adenomatózus vastagbél polip endoszkópos eltávolítása történt. Ez a család típusos példája a kis létszámú, így az Amszterdam kritériumokat teljesíteni nem tudó HNPCC-s családoknak.

5.2.4. 4. család:

Index személyünk 49 évesen flexura hepatica adenokarcinómájában szenvedett. Több generációra kiterjedő családi anamnézis felvétel során beszámolt arról, hogy két húgát korai életkorban (23 és 36 évesen) endometrium karcinóma következtében veszítette el. Édesanyja 49 évesen endometrium, édesapja 71 évesen végbélrákban szenvedett. Az apai ágon további daganat nem szerepel, azonban az anyai ágon további 3 húgyúti daganat és korai életkorban előforduló endometrium és vastagbél daganat volt igazolható (9. ábra). A tumorszövet immunhisztokémiai vizsgálata a hMLH1 festődés hiányát, a mikroszatellita instabilitás vizsgálata pedig nagyfokú (MSI-H) instabilitást igazolt. A hMLH1 gén nagy szakasz delécióját igazoltuk MLPA segítségével, mely eltérés még nem volt megtalálható a nemzetközi adatbázisokban (4. táblázat) (78). A deléció kezdőpontja a 11 exon 301 kodonban helyezkedik el, végpontja a 11-s intronban van, összesen 1786 bázispár veszteséget okozva (g.28756-g.305429). Ez a nagy kiterjedésű deléció kereteltolós mutáció létrehozásával a

MutS homológokkal (hPMS2, hPMS1) történő heterodimer képzésért felelős domain funkcióját szünteti meg.



9. ábra: A 4. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma. EC: Endometrium karcinóma. UC: Huguýti karcinóma.

A negyedik család egy igazi „cancer family” ahol azonban nem a kolorektális daganatok előfordulása dominál. Számos HNPCC asszociált daganat előfordulását tapasztalhatjuk a családban, amely így egyértelműen teljesíti a Módosított Amszterdam kritériumokat. Sajnos a családban számos hozzátartozó halála, valamint a genetikai vizsgálatba történő beleegyezés hiánya miatt kiterjedt családfaszűrést nem tudtunk végezni. Az index személy három leszármazottját tudtuk vizsgálni, közülük kettőben megtaláltuk a mutációt. A helyzetet tovább nehezíti, hogy a család különböző részei nagy földrajzi területen helyezkedik el, így a szűrés és utógondozás technikailag sem valósítható meg.

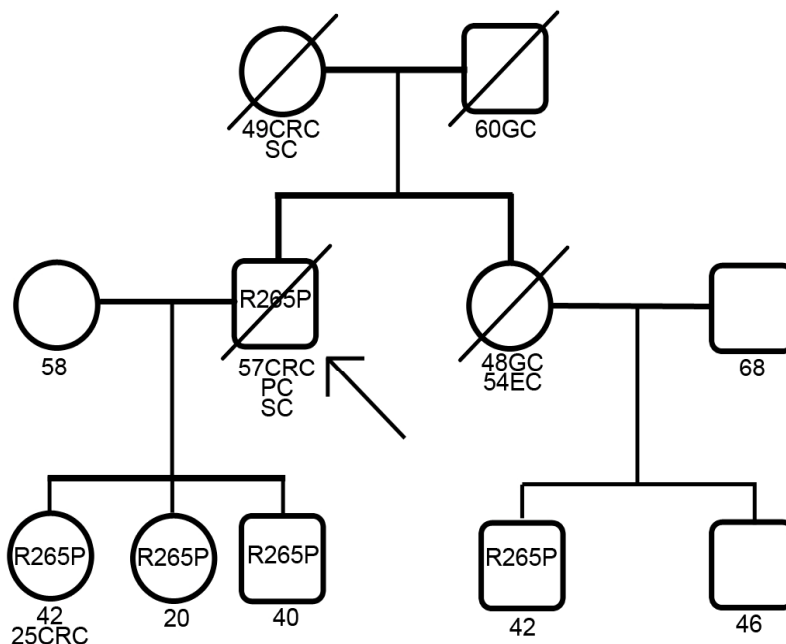
5.2.5. 5. család:

57 éves férfi beteg került kivizsgálásra súlyos fokú anémia (Hgb:84 g/l, mikrociter, hypokróm) tünetcsoportjával. Kolonoszkópia a vakbél mucinózus adenokarcinómáját

igazolta. Előzetes CT vizsgálat a pancreas fej ismeretlen természetű térfoglaló folyamatát jelezte. Műtét során a pancreas fej rosszindulatúnak imponáló térfoglaló folyamatát találtuk, mely infiltrálta a duodenum falát és a mezenteriális nagyereket, így a folyamat inoperábilisnak bizonyult. A beteg beszámolt arról, hogy előzőleg már rosszindulatú bőrelváltozás eltávolítása történt a mellkas területéről. Fizikális vizsgálat során jelenleg a beteg nyakán elhelyezkedő papulózus bőrelváltozást tapasztaltunk. Jobb oldali hemikolektómiát végeztünk, valamint gasztro-entero anasztomózis készítése is történt Roux-Y szerint az inoperábilis pancreas fej térfoglalás miatt. Ebből vastagtű biopsziás mintavétel igazolta a diagnózist. Egyidejűleg a bőrelváltozás eltávolítása is megtörtént, melynek szövettana „sebaceus carcinoma-t” igazolt. A vastagbél és a bőr daganatból immunhisztokémiai és mikroszatellita instabilitási vizsgálatot végeztettünk. Mindkét szövet esetén nagyfokú mikroszatellita instabilitást (MSI-H) és a hMLH1 gén fehérjetermékének festődési hiányát tapasztaltuk a tumorsejtek magvaiban. Ezt követően a beteg perifériás véréből izolált DNS szekvenálásával kerestük a hMLH1 vélt mutációját. Ennek során a hMLH1 gén 10 exon Arg→Pro cserével járó (c.794 G→C) misszensz mutációját találtuk (4. táblázat).

A beteg családfájának felderítése során további két vastagbél (index személy anyja 49 évesen, index személy lánya 25 évesen), két gyomor (index személy apja 60 évesen, index személy nővére 48 évesen) és egy metakrón endometrium daganat (index személy nővére 54 évesen) előfordulására derült fény. Az index személy édesanyjáról rosszindulatú bőrdaganat eltávolítása történt még a vastagbél daganat kialakulása előtt, ennek életkori megjelenését pontosan nem ismerjük (10. ábra). Az elérhető családtagok beleegyezésével célzott genetikai vizsgálatot végeztünk a már igazolt mutáció irányába. Összesen az index személy kivételével 6 családtagot vizsgáltunk meg, melyek közül 4 esetben igazoltuk a genetikai eltérést. Sajnos

3 tumoros családtag vizsgálata már nem volt megvalósítható a betegek vizsgálat előtti halála miatt.



10. ábra: Az 5. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. Az R265P jelzés az ikonokban a mutáció hordozó személyeket jelöli. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. A nem tumoros családtagok esetén az életkort a vizsgálat időpontjában jelöltük. CRC: Kolorektális karcinóma. EC: Endometrium karcinóma. GC: Gyomor daganat. PC: Pancreas daganat. SC: Bőr daganat.

A Muir-Torre szindróma (MTS) egy autoszómális domináns öröklődés menetet mutató megbetegedés melyet először 1967-ben majd 1968-ban írtak le (88,89). A megbetegedésre jellemző a rosszindulatú „sebaceous” bőrelváltozások és a gasztrointesztinális malignómák egyidejű előfordulása. Az első közlések során még nem került sor a családi háttér felderítésére. Erre első alkalommal 1981-ben Lynch tett említést,

amikor is a ritkán előforduló „sebaceus” bőr tumorok előfordulását közölte egy HNPCC érintett családban (90). Ekkor merült fel annak a lehetősége, hogy a kórkép a HNPCC egyik alcsoportjának tekinthető. Későbbiekben a Muir-Torre szindróma előfordulását a HNPCC-s esetek között több szerző is jelentős eltérésekkel közli, körülbelül 1-10% között (91,92). Érdekes megfigyelés az, hogy a jó, vagy rosszindulatú „sebaceous” bőrelváltozások az esetek 60%-ban megelőzik a beteg sorsát sokkal jelentősebben befolyásoló gasztrointesztinális malignóma kialakulását (92,93). Csak az esetek mintegy megmaradó 40% az, amikor egyidőben, vagy a későbbiekben jelentkezik a bőrelváltozás. A „sebaceous” bőrelváltozások és keratoakantómák az esetek jelentős részében multiplexek és leggyakrabban a beteg nyakán és arcán fordulnak elő (93). Ezekre a tapasztalatokra tekintettel kiváló előrejelzői lehetnének a kialakuló HNPCC asszociált daganatoknak. A legnagyobb problémát az jelenti, hogy a bőrelváltozások észlelését követően nem történik több generációra kiterjedő családfaszűrés, így a hereditér jelleg felismerése elmarad. Amíg a HNPCC esetében a hMLH1 és a hMSH2 mutációi körülbelül megegyező mértékben fordulnak elő, addig az MTS esetében a mutációk döntő többsége a hMSH2 génben fordul elő (94).

A HNPCC asszociált extrakólikus tumorok között a gyomor és az endometrium karcinóma előfordulása tapasztalható leggyakrabban. Ezt követően a húgyutak, ovárium, vékonybél daganatok következnek gyakoriság szempontjából. Az emlő, központi idegrendszer, biliáris traktus és a hasnyálmirigy daganata egészen ritkán fordul elő HNPCC esetén (95,96). A pancreas daganatok előfordulása a HNPCC-s családok „high risk” családtagjai között minimálisan magasabb a populációs átlagnál, de attól nem mutat szignifikáns eltérést (96). Ez is azt bizonyítja, hogy a pancreas daganat előfordulása igen ritka jelenség HNPCC-ben. Pancreas daganat előfordulására MTS esetén még nem találtunk irodalmi hivatkozást.

Az általunk közölt család esetében a hMLH1 10. exon c. 794 G→C cserével járó misszensz mutációját találtuk szekvenálás segítségével (4. táblázat). Ez az egyébként konzervatív pozícióban elhelyezkedő arginin helyett prolin kialakulásával jár. Ezt a genetikai eltérést még nem közölték, a nemzetközi adatbázisokban nem találtunk erre vonatkozó utalást (78). Hasonló pozícióban kialakult misszensz mutációt közölnek (hMLH1 c. 793 C→A, Arg→Ser,) egy szlovák HNPCC-s család esetében (97). Itt az index személy 29 évesen jobb kólonfél daganatban szenvedett, családjában korai életkorban kialakuló endometrium daganatokat, vastagbél polipokat és egy malignus melanóma előfordulását tapasztalták. A szerzők ezt a misszensz mutációt egyértelműen patogén mutációnak gondolják (97). További hasonló pozícióban kialakult genetikai eltérést írnak le egy cseh HNPCC-s család esetében (c. 793 C→T, Arg→Cys,) amelyet patogén eltérésnek tartanak (98). Ezt az eltérést már 1999-ben Wahlberg és munkatársai is leírják és patogén mutációnak tartják (99). Ugyanezt a kodont érintő másik pontmutáció is közlésre került, melyet egy HNPCC-ben szenvedő olasz család esetében írtak le. Itt egy Arg→His cserét okozó misszensz mutációra derült fény (c. 794 G→A) (100). Ebben az esetben azonban ugyanabban a személyben a hMLH1 egy kereteltolást okozó deléciójával is társult ez a misszensz pontmutáció, így inkább a deléció a beteg fenotípust kiváltó eltérés. Mivel az általuk vizsgált további 196 kontroll kromoszómában egy esetben sem találták meg ezt a pontmutációt, így ezt az eltérést egy ritka polimorfizmusnak tartják (100). Az utóbb említett két misszensz mutáció (Arg265Cys, Arg265His) funkcionális vizsgálatát is elvégezték. Ezt a két eltérést külön-külön tartalmazó hMLH1 gént transzfektálták 293T humán sejtvonalba és vizsgálták a kialakuló MMR aktivitást. Erre a humán sejtvonalra jellemző, hogy a hMLH1 gén promóter hypermetilációja miatt nem expresszál hMLH1 proteint. Azt tapasztalták, hogy a transzfektált sejtvonalban mindkét genetikai eltérést tartalmazó hMLH1 gén esetén helyreáll az MMR aktivitás, az

Arg265His esetén kissé alacsonyabb effektivitással (101). Ez a funkcionális megközelítés azt mutatja, hogy ez a két utóbbi eltérés inkább egy ritka polimorfizmusnak tekinthető (101).

A hMLH1 és hPMS2 kapcsolódása révén kialakuló heterodimer (MutL α) központi szerepet játszik a humán DNS replikáció során spontán kialakuló hibák javításában. ATP-től függően kapcsolódik a hibákat felismerő MutS α heterodimerrel, és az így kialakuló komplex képes a hibák javítását elvégezni (102). A 265. Arg a hMLH1 MutS homológokkal kölcsönható doménjében helyezkedik el, mely egy evolúciósan konzervált régió. Az arginin bázikus aminosav, poláris oldallánccal, mely erősen hidrofíllé teszi. A prolin ezzel szemben ciklikus, alifás, apoláris oldallánccal rendelkezik, mely alapvetően megváltoztatja a fehérje másodlagos szerkezetét. Három különböző szoftvert alkalmaztunk az aminosav csere hatásának megítélésére. Ezen szoftverek a szekvencia homológia és az aminosavak fizikai tulajdonságai alapján: „ártalmas”(103), „patológiás”(104), illetve „valószínűleg káros”(105) hatásúként értékelték az Arg265Pro aminosav cserét. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy ez a genetikai eltérés patogén mutációnak tekinthető.

Az általunk közölt családban ezen a hMLH1 misszensz mutáción kívül egyéb eltérést a hMLH1-ben és a hMSH2-ban nem találtunk. Mindkét tumorszövet (vastagbél adenokarcinóma, „sebaceous” bőrtumor) immunhisztokémiai vizsgálata a hMLH1 protein festődésének hiányát igazolta a tumorsejtek magvaiban. A családban 5 családtagban tudtuk igazolni az eltérést. Megtaláltuk a mutációt az index személy fiatalon vastagbél tumorban szenvedő lányában. Megtaláltuk az eltérést az index személy nővérenek fiában is, ami arra utal, hogy az index személy nővére, aki gyomor és endometrium karcinómában is szenvedett, hordozta a genetikai eltérést. Sajnos az index személy nővérét és a többi tumoros családtagot a betegek halála miatt már nem tudtunk vizsgálni.

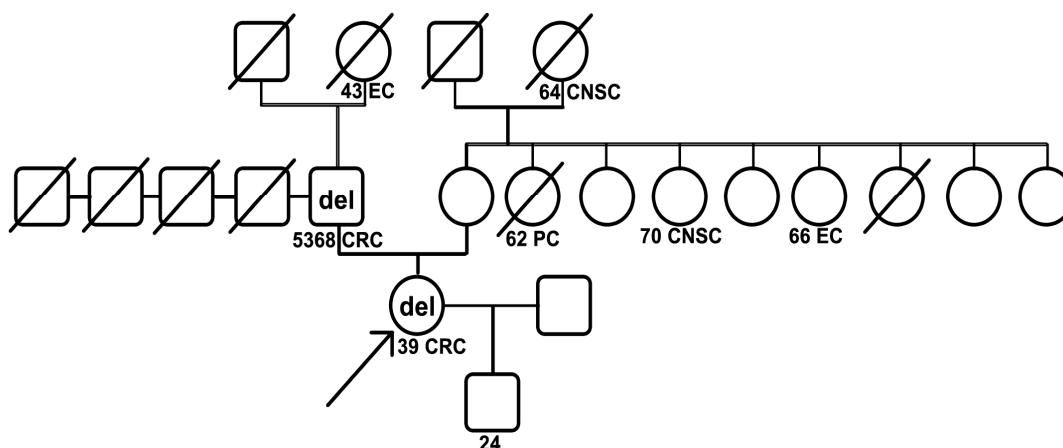
Esetünk érdekességét adja a pancreas daganat és a vastagbél daganat egyidejű előfordulása Muir-Torre szindrómás betegben. A ritka és egyben a beteg halálát okozó

daganat társulás talán idejében operálható lett volna a hereditár jelleg korábbi felderítése esetén. Erre a korábbi bőrelváltozás eltávolításánál elvégzett családi anamnézis felvétel és idejében elvégzett genetikai vizsgálatok utáni rendszeres szűrő vizsgálatok során nyílt volna lehetőség. Ilyen szinkrón daganat előfordulást még nem közöltek az irodalomban Muir-Torre szindrómás beteg esetén. Az eset érdekességét tovább növeli az általunk elsőként közölt hMLH1 mutáció melyet a korábbiakban részletezett okok miatt patogén mutációnak tekintünk.

5.2.6. 6. család:

39 éves fiatal nőbeteg széklethabitus változás, valamint véres székürítés miatt került kivizsgálásra, melynek során a szigmabél szűkítő daganatát igazolták. Máj metasztázis nem igazolódott. Rektosigma reszekció történt intézetünkben. A beteg családi anamnézisének felvétele során derült fény a családban halmozottan előforduló daganatos megbetegedésekre. A beteg édesapja 53 évesen a felszálló vastagbél, majd 68 évesen rektum tumor műtéti eltávolításán esett át. Az apai nagymama 43 éves korában endometrium karcinómában szenvedett, mely halálát okozta. Anyai ágon két központi idegrendszeri (anyai nagymama 64 évesen, édesanyja leánytestvére 70 évesen), egy tüdő (édesanya leánytestvére 62 évesen) és egy endometrium karcinóma (édesanya másik leánytestvére 66 évesen) előfordulása szerepel (11. ábra). Az index személyből eltávolított daganatszövet mikroszatellita instabilitási vizsgálata nagyfokú (MSI-H) instabilitást igazolt. A tumorszövet sejtmagjaiban hMLH1 és hMSH6 festődés hiányát és normál hMSH2 festődést tapasztaltunk. Ezt követően a beteg beleegyezésével további vizsgálatokat végeztünk, melynek során a hMLH1 nagy kiterjedésű delécióját észleltük. A családtagok közül 4 személyt tudtunk megvizsgálni, az index személy és édesapja is hordozza a genetikai elváltozást. Az index személy édesanyja és fia csak a

normális allélt hordozza. Tekintettel arra, hogy a deléciót az index személy édesapja hordozza, édesanyja azonban nem, az anyai ág további vizsgálatát nem tartottuk szükségesnek. Az index személy édesapjának testvéreit a vizsgálat elvégzése előtti haláluk miatt már nem tudtuk vizsgálni, azonban daganatos megbetegedés nem fordult elő közöttük.



11. ábra: A 6. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A del jelzés az ikonokban a mutáció hordozó személyeket jelöli. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma. PC: tüdő daganat. EC: Endometrium karcinóma. CNSC: Központi idegrendszeri daganat.

Az általunk talált eltérés 3,8 kb-s nagy deléció, mely a hMLH1 11 exon teljes egészét érinti. Erre az eltérésre még nem találtunk hivatkozást a nemzetközi irodalomban (4. táblázat) (78). Az exszpresszállódó trunkált fehérje biztosan funkcióképtelen, hamar lebomlik, így az elváltozást patogén mutációnak tartjuk. Erre utal a hMLH1 fehérje termékének hiánya a tumorsejtek magjaiban az immunhisztokémiai vizsgálat során.

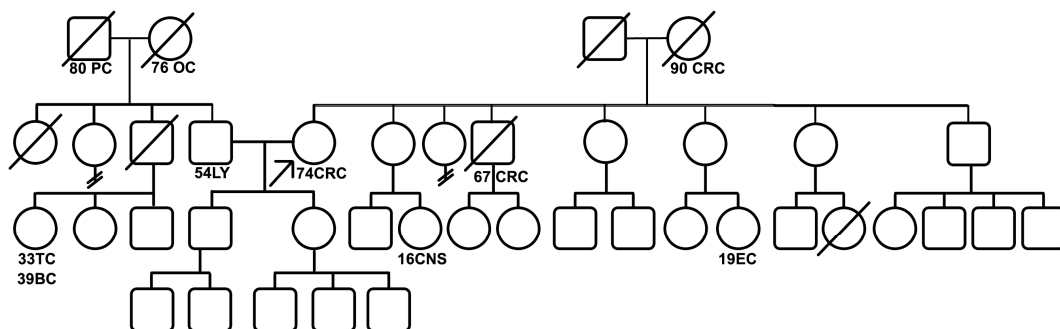
Esetünk érdekességét adja az, hogy bár a családban nagy számú különböző daganat előfordulása került leírásra, a központi idegrendszerben előforduló, valamint a tüdő

rosszindulatú folyamatai nem tartoznak a HNPCC asszociált daganatok közé. Ezt igazolja az a tény is, hogy az anyai ágon MMR gén mutáció előfordulását nem tudtuk kimutatni. Az apai ágon azonban típusos HNPCC asszociált daganatok fordulnak elő, ahol a mutáció jelenlétét igazolni tudtuk. Az index személyünk gyermeke és édesanyja nem hordozza az elváltozást, így átlagos rizikójú személynek tekinthető. Az index személy maga, mint mutáció hordozó azonban nőgyógyászati és gasztroenterológiai követést igényel a metakrón daganatok kialakulásának megelőzése céljából, ahogy erre édesapja esetében is szükség lett volna, aki szintén mutáció hordozó. Családunk kiválóan példázza a „HNPCC gyanús család félrevezető tumor spektrummal” típusát, ahol a számos nem HNPCC asszociált tumor jelenléte elterelheti a vizsgáló figyelmét a kisebb számú HNPCC-vel összefüggést mutató elváltozásról.

5.2.7. 7. család:

Index személyünk 72 évesen széklethabitus megváltozása, hasi görcsös fájdalmak miatt került kivizsgálásra. Az anusgyűrűtől 18-20 cm-re szűkítő mucinózus adenokarcinómára derült fény, ami miatt rektoszigma reszekción esett át intézetünkben. A három generációra kiterjedő családfa analízis során elsőfokú rokonok között további két vastagbél daganatot (index személy édesanyja 90 évesen rektum daganat, index személy öccse 67 évesen haránt vastagbél daganat), egy egészen fiatal életkorban kialakult központi idegrendszeri daganatot (index személy testvérének lánya 16 évesen), valamint egy endometrium daganatot (index személy másik testvérének lánya 19 évesen) igazoltunk (12. ábra). A kolorektális daganatok életkori megjelenése viszonylag késői és nem típusos HNPCC-re. A vastagbél daganatban szenvedő személyek közül az index személyen kívül senkit nem tudtunk vizsgálni a betegek vizsgálat előtti halála miatt. Ezek alapján további vizsgálatokat nem kezdeményeztünk volna. Figyelmünket a korai életkorban megjelenő endometrium karcinóma keltette fel. Érdekes

megfigyelés, hogy az endometrium karcinómában szenvedő fiatal nőbeteg édesanyja teljesen egészséges, így a fenotípusos manifesztáció egy generációt átugrott. Az elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat a hMLH1 fehérjetermékének festődési hiányát igazolta az index személy vastagbél tumorának sejtmagjaiban. hMSH2 és hMSH6 festődés azonban észlelhető volt. Mikroszatellita instabilitási vizsgálata nagyfokú instabilitást igazolt (MSI-H) ezért a hMLH1 összes exonjának szekvenálását végeztük. Ennek során két misszensz mutációt észleltünk (14. exon: L555V, 19. exon: P747H) (4. táblázat), melyeket még nem találtunk meg a nemzetközi adatbázisokban (78).



12. ábra: A 7. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma. EC: Endometrium karcinóma. BC: Emlő daganat. TC: pajzsmirigy daganat. PC: Tüdő daganat. OC: Ovárium karcinóma. LY: Lymphoma. CNSC: Központi idegrendszeri daganat.

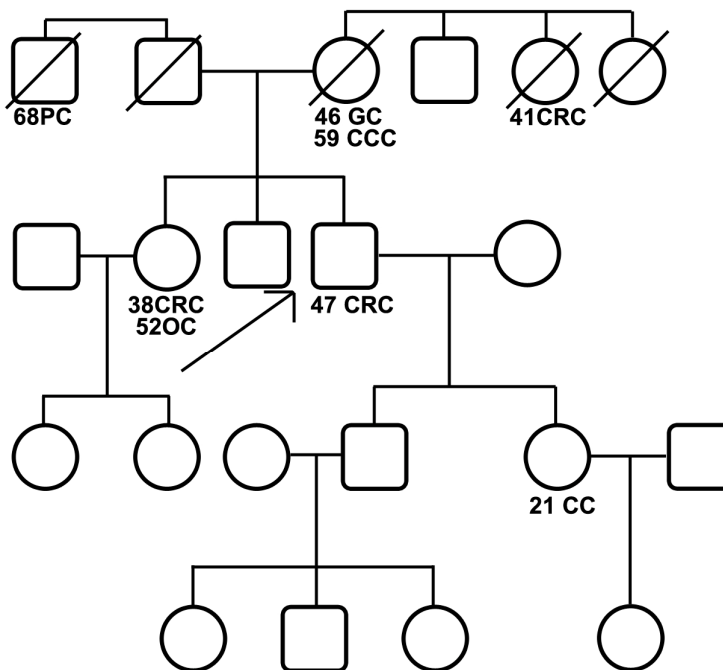
A családtagok tájékoztatását követően, velük egyetértésben további 13 családtag perifériás véréből izolált DNS célzott vizsgálatát végeztük. Ezek közül a 14. exon mutációját 6 személyben, a 19. exon mutációját 7 személyben sikerült igazolnunk.

A 14. exon mutációját tudtuk igazolni az index személy egészséges lányában (54 éves), a fiatalon központi idegrendszeri daganatban elhunyt személy édesanyjában (73 éves), az index személy másik egészséges húgában (70 éves), és annak fiatalon cervix karcinómában szenvedő lányában. Ezen felül igazoltuk még a 14. exon mutációt a 67 évesen haránt vastagbél daganat következtében elhunyt személy mindkét gyermekében, akik most 36 és 39 évesek. A 19. exon mutációját 7 személyben igazoltuk. Az index személy 49 éves egészséges fiában, a fiatalon központi idegrendszeri daganatban elhunyt személy édesanyjában (73 éves), és annak jelenleg is egészséges fiában (48 éves), az index személy másik 3 jelenleg is egészséges húgában (72, 71, 68 éves) és öccsében (65 éves). Három különböző szoftvert alkalmaztunk ennek a két aminosav csere hatásának megítélésére. Ezen szoftverek a szekvencia homológia és az aminosavak fizikai tulajdonságai alapján a 19. exon mutációját „tolerálható aminosav cserének” nyilvánították (103,104,105). A 14. exon mutációját egyik szoftver „tolerálható aminosav cserének” (103) a másik két program „valószínűleg káros”(104,105) hatásúnak értékelte. A 19 exon mutációja egészen a hMLH1 gén C-terminalis végén helyezkedik el. Az index személy kivételével egyetlen tumoros személyben sem találtuk meg. Mindezek alapján úgy véljük, hogy ez a genetikai eltérés feltehetőleg csak egy nem patogén polimorizmus. A 14. exon mutációja hPMS2/hMLH3/hPMS1 „interaction domain”-ban helyezkedik el. Ezt az eltérést igazoltuk az index személy kivételével az egészen fiatal életkorban cervix karcinómában szenvedő családtagban és a 67 évesen colon transversum tumorban szenvedő személy mindkét fiában, tehát ő is hordozta az eltérést. Mindezek alapján úgy véljük, hogy a 14. exon mutációja feltehetőleg patogén mutáció, azonban penetranciájának mértéke kérdéses, tekintettel arra, hogy 5 teljesen egészséges

családtagban is igazoltuk az eltérést. A 14. exonon található eltérést hordozó családtagokat gondozásba vettük, közöttük eddig további malignus megbetegedés kialakulását nem tapasztaltuk.

5.2.8. 8. család:

47 éves férfi puffadás, székelési habitus megváltozása miatt került kivizsgálásra, melynek során a haránt vastagbél mucinózus adenokarcinómájára derült fény. Kiterjesztett jobb hemikolektómia történt intézetünkben. A családi anamnézis felvétele során számos vastagbél daganat és egyéb HNPCC asszociált daganat előfordulásáról számolt be családjában. Édesanyja 46 évesen gyomordaganatban szenvedett, majd 59 évesen halálát Klatskin tumor (epeúti karcinóma) okozta. Édesanyja nővére 41 éves korában már májajáttéket adó előrehaladott vastagbél daganat miatt hunyt el. Édesapja testvére 68 évesen hörgőrákban szenvedett. Index személyünk nővére 38 évesen a leszálló vastagbél és a szigmabél szinkrón polipoid daganata miatt került műtéti ellátásra, majd 52 évesen ovarium karcinóma miatt Wertheim műtéten esett át. Az index személy egyik gyermeke 21 éves korában korai stádiumú cervix karcinóma miatt konizáción esett át (13. ábra). A tumorok életkori megoszlása alapján a család tökéletesen teljesíti az Amszterdam és Bethesda kritériumokat egyaránt. Igazi „Standard HNPCC-s család”-nak tekinthető (82).



13. ábra: A 8. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma. CC: Cervix karcinóma. PC: Tüdő daganat. OC: Ovárium karcinóma. GC: Gyomor daganat. CCC: Klotkin tumor.

Az index személy eltávolított tumorszövetéből vett minta immunhisztokémiai vizsgálata a hMLH1 fehérjetermékének festődési hiányát igazolta a tumorsejtek magjaiban. A hMSH2 és hMSH6 fehérje terméke festődött. Nagyfokú (MSI-H) mikroszatellita instabilitást tapasztaltunk, ezért szekvenálást végeztünk. Ennek során a hMLH1 2. exon 143 kodon A→C cserével járó misszensz mutációját találtuk (p.Q48P) (4. táblázat). A fent említett genetikai eltérést egyetlen nemzetközi adatbázisban sem találtuk meg (78). Ez a pontmutáció a hMLH1 ATP-ase domain-jában helyezkedik el. Patogenitásának megítélése igen nehéz, tekintettel arra, hogy a családfaszűrést a család, vallási okokra hivatkozva megtagadta. Három különböző szoftvert alkalmaztunk ennek az aminosav csere hatásának a megítélésére. Az

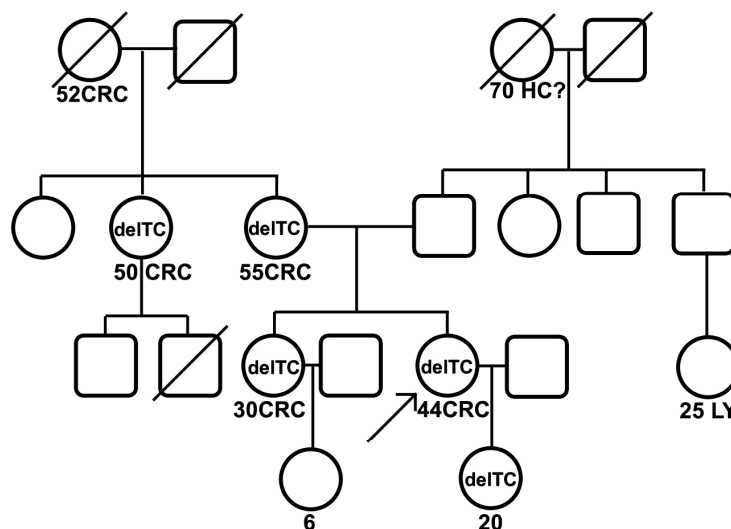
egyik szoftver „egyértelműen patogén”-nek (104), a másik kettő „feltehetőleg káros”-nak (103,105) nyilvánította ezt a genetikai eltérést.

A család a betegséggel kapcsolatos tájékoztatás ellenére a családfaszűrésbe nem egyezett bele, rendszeres kontrollra az index személy kivételével egyetlen családtag sem jár. Az index személy mai napig is egészséges, több adenomatózus polip endoszkópos eltávolítása történt meg nála az elmúlt években.

5.2.9. 9. család:

44 éves nőbeteg egy évvel korábban flexura lienalis területén elhelyezkedő mucinózus adenokarcinóma miatt bal oldali hemikolektómián esett át más intézetben. Recidív, a hasfalra törő előrehaladott tumoros folyamat miatt került intézetünkbe. Műtét során az előzetesen elvégzett PET CT vizsgálat negatív eredménye ellenére kismedencében karcinotikus göböket találtunk, így a székürítési zavart okozó hasfalra törő folyamat kiirtását és a hasfal kimetszését követően Hartmann szerinti megoldást alkalmaztunk. Ezt követően onkológiai kezelés során a beteg tumormarkerei jelentősen javultak. Egy évvel később elvégzett „second look” laparotomia során tumormentes hasüri viszonyokat találtunk (mely egyezett az előzetes vizsgálatok eredményével), így a bél folytonosságát helyreállítottuk. Családi anamnézis felvétele során a családban további 4, viszonylag korai életkorban jelentkező vastagbél tumoros esetre, egy bőr, egy malignus lymphoproliferatív és egy bizonytalan eredetű, de rosszindulatú máj elváltozásra derült fény. A vastagbél daganatok mind a család anyai ágán fordultak elő 30, 43, 50, 52 és 55 éves életkorban (14. ábra). A család teljesíti az Amszterdam kritériumokat, így a család tájékoztatását követően a családtagokkal egyetértésben további vizsgálatokat végeztünk. Az eltávolított tumorszövet immunhisztokémiai vizsgálata során a hMSH2 protein festődésének hiányát tapasztaltuk a tumorsejtek magjaiban. hMLH1 és

hMSH6 festődés jelen volt. A tumorszövet nagyfokú mikroszatellita instabilitást mutatott, ezért a hMSH2 összes exonjának szekvenálását végeztük el. Ennek során a hMSH2 6 exon eddig a nemzetközi adatbázisokban nem szereplő két nukleotidot érintő kis delécióját találtuk (delTC c. 969-970) (4. táblázat) (78). További 6 családtag célzott vizsgálatát végeztük el, melyek közül 4 személyben megtaláltuk az eltérést. A mutációt hordozó 5 személyből 4 vastagbél daganatban szenvedett. Az index személy egyébként 52 éves korában vastagbél daganatban szenvedő anyai nagyanyját már nem tudtuk vizsgálni a vizsgálatok előtti halála miatt.



14. ábra: A 9. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A delTC jelzés az ikonokban a mutáció hordozó személyeket jelzi. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. CRC: Kolorektális karcinóma. LY: Lymphoma?. HC: ismeretlen primer vagy szekunder rosszindulatú folyamat a májban.

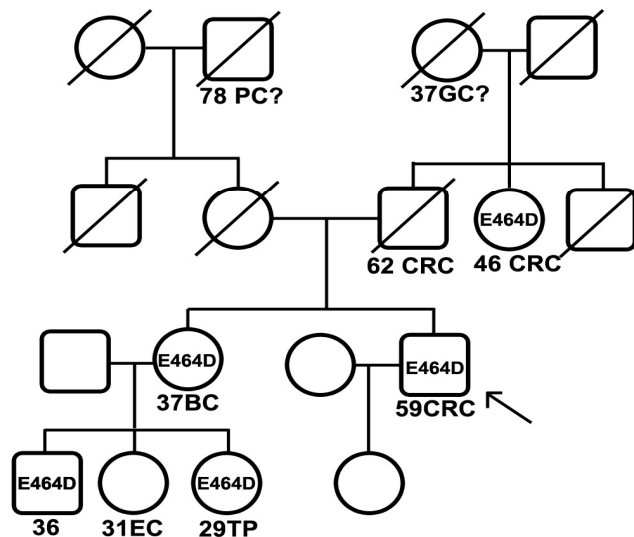
A család egyértelműen teljesíti az Amszterdam kritériumokat, „standard” HNPCC-s családnak tekinthető (82). Az eset érdekességét az is fokozza, hogy a család egyébként ma is élő 3 vastagbél daganatban szenvedő tagját egy adott sebész operálta és ezek ellenére sem merült fel a családfaszűrés szükségessége. Ez a tény arra hívja fel figyelmünket, hogy a HNPCC-val kapcsolatos ismeretterjesztést szélesebb körben a már régóta praktizáló orvosok körében is szükséges volna kiterjeszteni. Ez a család jól példázza azt, hogy a HNPCC talaján kialakult vastagbél daganatok jól reagálnak 5-Fluorouracil alapú kemoterápiára és jelentősen jobb prognózist mutatnak a sporadikus esetekkel összehasonlítva. A mutációt hordozó 5 személy közül 4 vastagbél daganatban szenvedett, jelenleg egészséges (14. ábra). Az index személy lánya, aki jelenleg 20 éves és hordozza a mutációt a többi már daganatos megbetegedésen átesett személlyel együtt szoros gondozást és követést igényel. A család jó együttműködésének következtében további daganat előfordulását mind a mai napig nem tapasztaltunk.

Az általunk elsőként igazolt két nukleotidot érintő kis deléción a hMSH2 6. exonján, a „DNA binding domain”-ban helyezkedik el, kereteltolást okozva, így ezt az eltérést egyértelműen patogénnek tekintjük.

5.2.10. 10. család:

59 éves férfibeteg 2 hónapja tartó véres székelés, jelentős testsúlycsökkenés és enyhefokú székürítési zavar miatt került kivizsgálásra. A szigmabél szűkítő daganatára derült fény, emiatt intézetünkben bal oldali hemikolektómián esett át. Családi anamnézisében számos kolorektális és egyéb HNPCC asszociált daganat szerepelt. Index személy édesapja 62 évesen előrehaladott haránt vastagbél daganatban szenvedett. Az index személy édesapjának testvére 46 évesen rektum rák sikeres gyógykezelését követően ma is egészséges. Az index

személy húga 35 évesen emlő daganatban szenvedett. Három gyermeke közül egyik 31 évesen frakcionált kürettázson esett át korai stádiumú endometrium karcinóma miatt, a másik lánya pedig endoszkópos polipektomián a leszálló vastagbél tubulovillózus adenómája miatt 29 évesen. Index személy apai nagyanyja korai halálát (37 évesen) feltehetőleg előrehaladott gyomordaganat okozta, de erről nem áll egyértelműen megbízható adat rendelkezésünkre. Index személy anyai nagyapja késői életkorban kialakult tüdőrákban hunyt el (15. ábra). Annak ellenére, hogy sem a tüdő, sem az emlőrák nem tartozik a HNPCC asszociált daganatok közé, a családban viszonylag korai életkorban előforduló vastagbél daganatok, endometrium karcinóma és 40 év alatt felfedezett vastagbél polip miatt a család kivizsgálását kezdeményeztük. Az eltávolított tumor szövet nagyfokú (MSI-H) mikroszatellita instabilitást és a hMSH2 festődés hiányát mutatta a tumorsejtek magjaiban. hMLH1 és hMSH6 fehérjeterméke festődött. Szekvenálás során a hMSH2 9. exon Glu→Asp cserével járó misszensz mutációját találtuk (c.1392 A>T) (4. táblázat). A családtagok tájékoztatását követően, azok beleegyezésével további 6 családtagot vizsgáltunk célzottan, akik közül 4-ben megtaláltuk az eltérést.



15. ábra: A 10. család családfája. A nyíl az index személyt jelzi. A számok az ikonok alatt az életkort jelzik a tumor megállapításának pillanatában. Az E464D jelzés az ikonokban a mutáció hordozó személyeket jelöli. CRC: Kolorektális karcinóma. EC: Endometrium karcinóma. BC: Emlő daganat. TP: Tubulovillózus adenoma. GC: Gyomor daganat. PC: Tüdő daganat.

A család egyértelműen teljesíti az Amszterdam és teljesít egy Bethesda kritériumot is (vastagbél daganatok elsőfokú rokonok között, 50 éves életkor előtt, adenomatózus vastagbél polip 40 éves életkor előtt). Az index személyt is beleértve 5 személyben találtuk meg a genetikai eltérést, melyek közül ketten vastagbél daganatban (46 és 59 évesen), egy személy emlőrákban (37 évesen), egy pedig 29 évesen a leszálló vastagbél tubulovillózus adenomájában szenvedett. Az index személy húgának fia is örökölte a genetikai eltérést, akinél még daganatos megbetegedés nem fordult elő. Jelenleg 36 éves, gondozást és követést igényel. Az index személy húgának fiatal életkorban cervix karcinómában szenvedett

lányában nem találtuk meg a mutációt, ezért daganatát nem tekintjük HNPCC asszociált daganatnak, kialakulása hátterében feltehetőleg más etiológiai tényező állhatott (Pl. Human papilloma vírus infekció, stb.). Az index személy édesapját és az anyai ágot nem tudtuk vizsgálni, a hozzátartozók tanulmányunk előtti halála miatt. Az index személy édesapjának nővérében, aki fiatalon végbél daganatban szenvedett, megtaláltuk az elváltozást, ezért arra következtetünk, hogy az eltérés az apai ág felől öröklődhetett.

Az általunk kimutatott eltérést még nem találtuk meg a nemzetközi adatbázisokban (78). A Glu→Asp. cserével járó misszensz mutáció a hMSH2 gén hMSH3/hMSH6-al képzett „interaction domain”-ját érinti, mely a gén egy konzervatív régiója. Tekintettel arra, hogy a hMLH1-ben eltérést nem találtunk, ezt az elváltozást tartjuk a betegség kóroki tényezőjének.

A család egy „Standard” HNPCC-s családnak tekinthető (82). Sajnos szociális problémák és a földrajzi távolság miatt az összes mutáció hordozó nem vonható gondozás alá.

5.3. Populációs szűrés eredményeinek megbeszélése

A Herediter Nonpolipózis Kolorrektális Karcinóma, mint egy a vastagbél és egyéb tumorok kialakulására hajlamosító megbetegedés, sajnos nem él köztudottan a praktizáló orvosok mindennapi gyakorlatában. Felismerése ennek megfelelően igen ritkán történik meg. Ennek egyik oka a rendkívül sokrétű fenotípusos megjelenése, melynek során több diszciplínához tartozó daganatok kezelését különböző társszakmák orvosai egymástól függetlenül végzik. Így gyakran figyelmen kívül marad a több generációban előforduló különböző típusú daganatos megbetegedések felderítése. Másik ok az, hogy a több generációra kiterjedő alapos családi anamnézis felvétel csak kezdő lépése a HNPCC felderítésének. Ezt követően azonban viszonylag eszköz és költség igényes kivizsgálási módszerek szükségesek a HNPCC kizárásához vagy igazolásához. A betegség

nomenklaturája is változott az elmúlt években. HNPCC-s családnak tekintették mindazon családokat, ahol teljesültek a Módosított Amszterdam kritériumok, függetlenül attól, hogy sikerült-e patogénnek tekinthető mutációt igazolni vagy sem az adott családban. Több szerző egymástól függetlenül is leírja, hogy az egyértelműen Amszterdam pozitív családokban is csak mintegy 40-60%-ban sikerül mutációt igazolni (43). Annak okaként, hogy miért nem sikerül patogén mutációt igazolni egyértelmű anamnesztikus adatokkal rendelkező családokban, az eddig még fel nem derített genetikai hátteret véleményezték. Ezt követően felmerült azaz igény, hogy azokat az Amszterdam pozitív családokat, ahol nem sikerül egyértelmű patogén mutációt igazolni, meg kell különböztetni azoktól, ahol mutáció igazolható volt. Így született meg a Familiáris Kolorektális Karcinóma-X szindróma megnevezés, és azt követően HNPCC-nek már csak az egyértelműen igazolható patogén mutációt hordozó családokat hívták (44). Gondozásba vétel szempontjából a nemzetközi ajánlások mégsem tesznek különbséget a két betegcsoport között, ugyanazt a követési módszert javasolják, melyet a későbbiekben részletezünk.

10 éves vizsgálati periódusunkban összesen 809 priméren felfedezett vastagbél daganatban szenvedő betegünk adatait tudtuk vizsgálni. Az első időszakban (1997-2003) retrospektív úton végeztük a betegek lekérdezését. Második időszakban minden beteg az öt kikérdező orvossal történt személyes találkozás során került felmérésre (2004-2006). A két időszak összehasonlító eredményeit a 3. táblázatban mutatjuk be. Jól látható, hogy az első 7 éves időszakban nemcsak az időszak hosszához képest relatíve kevesebb beteget tudtunk lekérdezni a betegek halála vagy elérhetetlensége miatt, hanem a kérdőívek jelentős részét ki is kellett zárunk vizsgálatainkból azok félreértelmezése vagy megbízhatatlan adatszolgáltatás miatt. Az is látható, hogy az első időszakban jóval alacsonyabb volt betegeink között a HNPCC gyanús (Amszterdam pozitív és negatív) betegek százalékos aránya. A második időszakban, amikor már minden vizsgálatba bevett beteg személyes kontaktus révén a

lekérdezést végző orvos segítségével töltötte ki a kérdőívünket, a vizsgálati eredmények jelentősen megváltoztak. A vizsgálati időszak rövidebb időtartama alatt relatíve több beteg lekérdezése történt meg, és a HNPCC gyanús családok százalékos aránya is jelentősen megnőtt. A HNPCC sokszínű fenotípusos megjelenése, valamint a betegek félreértelmező válaszai miatt csak az orvos-beteg személyes kontaktusa útján történő családi anamnézis felvétel tekinthető megbízhatónak. Mindezek alapján úgy véljük, hogy a teljes időszak semmiképpen sem értékelhető egy populációs szűrés reprezentatív mintájának. Az első vizsgálati időszak eredménye a HNPCC régiókban történő előfordulásának valós értékeitől jelentősen alacsonyabb eredményt mutatott a korábbiakban részletezett okok miatt. A második időszak eredményei már reprezentálhatják a HNPCC előfordulásának valós arányát a régiókban újonnan felfedezett vastagbél daganatos populációban. Azonban a második időszakban vizsgált betegeink száma (345) alapján úgy érezzük, hogy tényleges adatok felállításához még további populációs szintű szűrésre van szükség.

Vizsgálataink során 10 patogén mutációt hordozó személyt sikerült igazolnunk 809 vastagbél tumorban szenvedő beteg között, mely 1,2%-s előfordulási rátát jelent. Összehasonlítva a nemzetközi irodalmi adatokkal, ahol 3-5%-s előfordulási arányt közölnek, úgy véljük, hogy az általunk igazolt eredmény feltehetőleg a valóságos előfordulási százalék alatt van. Ez nagy valószínűséggel abból adódik, hogy az Amszterdam negatív és pozitív betegeink egy bizonyos részét nem tudtuk vizsgálni, valamint abból, hogy a hMSH6 irányú szekvenálást sem tudtuk végezni. Az is okként szerepelhet, hogy minden olyan genetikai eltérést, amelynek egyértelmű patogén jellegét nem tudtuk bizonyítani, polimorfizmusnak tekintettünk. A korábban született irodalmi források még minden olyan családot, mely teljesíti az Amszterdam kritériumokat, HNPCC-snek tekint, függetlenül attól, hogy sikerült-e patogénnek tekinthető mutációt igazolni. Ez a mi eredményeinket is jelentősen más

megvilágításba helyezi. A reprezentatívnak tekinthető második vizsgálati időszakban (2004-2006) az egyértelműen Amszterdam pozitív családjaink a betegek 6%-át képezték.

Tekintettel arra, hogy a nemzetközi irodalom az Amszterdam kritériumok ellen számos kifogást emel, vizsgálatainkat egyből olyan kérdőív segítségével kezdtük, melyet a Bethesda és az Amszterdam kritériumok együttes alkalmazásával szerkesztettünk, és később a végleges szövettani leletet is ellenőriztük. Érdekes felvetésnek tűnt számunkra, hogy a HNPCC gyanús családok közül melyik csoportban (Amszterdam pozitív, Amszterdam negatív) milyen százalékban találunk mutáció hordozókat. Más irányból is megközelíthetjük a felvetést, hogy hány mutáció hordozó családot nem ismernénk fel, ha csak a szigorúan Amszterdam pozitív családokat vizsgálánánk. Itt a teljes vizsgálati időszak adatait tekintve 19 beteg esetében végeztünk szekvenálást, melyek közül 10 (53%) Amszterdam negatív, és 9 (47%) Amszterdam pozitív volt. Az Amszterdam pozitív 9 beteg közül 7 esetében, azaz 77%-ban tudunk patogén mutációt igazolni! Ez jóval magasabb mutáció találati eredmény Amszterdam pozitív családjaink esetén, mint az irodalomban közölt 50-60%-os találati arány! Az Amszterdam negatív 10 beteg közül 3, azaz 30%-ban sikerült mutációt igazolni. Látható tehát, hogy mutáció hordozó családjaink jelentős százalékát nem ismertük volna fel (2., 3., 7. család), ha csak a szigorú Amszterdam kritériumokat alkalmazzuk. Bár az Amszterdam kritériumokat tökéletesen teljesítő családok között valóban nagyobb százalékban tudunk patogén mutációt igazolni, mindezek ellenére úgy gondoljuk, hogy a betegek szűrése során jóval alaposabb és minden kritérium rendszert figyelembe vevő lekérdezést kell alkalmaznunk.

A HNPCC kivizsgálása sajnos igen idő és költség igényes folyamat. A kivizsgálás racionalizálása szintén munkánk egyik fontos célkitűzése volt. A kérdőívek segítségével történő beteg szelekció inkább idő, mint költség igényes folyamat. Azonban az így kiszűrt, úgynevezett HNPCC szuszpekt betegek aránya még igen magas. Munkánk 1. vizsgálati

szakaszában ez 5,8%-nak, a 2. szakaszában pedig 16,5%-nak bizonyult. Már ez a két időszak eredménye közti különbség is jól jelezte számunkra, hogy a betegszelekció is, amely vizsgálatunk első és nagyon fontos lépése, csak a betegséget jól ismerő orvos, és a beteg közvetlen találkozása révén valósulhat meg. Az így kiszűrt betegek aránya és száma azonban igen magas, így további szelekciós eljárást kell alkalmaznunk annak érdekében, hogy közelebb kerüljünk a valóban mutációt hordozó családokhoz. Az irodalmi adatok felhasználásával két további vizsgálatot végeztünk, történetesen az eltávolított tumorszövet immunhisztokémiai vizsgálatát és mikroszatellita instabilitási vizsgálatát. A HNPCC-ben szenvedő betegek 100%-a nagyfokú mikroszatellita instabilitást (MSI-H) mutat, mivel a genom ezen kis sztereotíp szekvenciáinak hossza azonnal megváltozik ahogy károsodik a replikáció során spontán létrejövő hibák javítása, azaz az MMR funkció. Így a mikroszatellita instabilitás kiváló markere a HNPCC fennállásának. Ennek megfelelően a mikroszatellita stabil (MSS) vagy alacsony fokú instabilitást (MSI-L) mutató betegek DNS-ét nem szekvenáltuk. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során módunkban állt a hMLH1, hMSH2 és hMSH6 fehérjetermékének jelenlétét igazolni vagy kizárni az eltávolított tumorszövet sejteinek magjaiban. Amennyiben valamelyik MMR gén fehérje termékének festődését nem tudtuk igazolni, akkor célzottan ennek a génnek az exonjait szekvenáltuk. Amennyiben mind festődött, de az eltávolított tumorszövet nagyfokú mikroszatellita instabilitást mutatott, akkor mind a hMLH1 és hMSH2 gén összes exonját szekvenáltuk. Sajnos a hMSH6 szekvenálására nem volt lehetőségünk.

Az általunk észlelt mutációk szétszórtan helyezkednek el a hMLH1 és hMSH2 gének exonjain. Nem tapasztaltunk sem ismételt előforduló mutációkat, sem olyan szekvenciákat ahol a mutációk halmozottan fordulnak elő. Eredményünket összevetettük az eddig elérhető egyetlen nagyobb magyarországi közleménnyel, amelynek adatai megerősítik feltételezésünket (79).

5.4. A HNPCC sebészi ellátása

A sebészi beavatkozások során meg kell különböztetnünk az igazolt mutációt hordozó, de még daganatos megbetegedésben nem szenvedő egyének **profilaktikus ellátását**, a mutációt hordozók diagnosztizált daganata esetén történő **terápiás ellátástól**. A megkülönböztetésnek az indikáció felállításban van jelentősége, hiszen a betegség különböző megnyilvánulási formái élethosszig veszélyeztetik az egészséget. Az igazolt mutáció hordozó egyénben rosszindulatú vastagbél tumor megjelenése után javasolt a kiterjesztett műtét, a szokványos szegmentális reszekció helyett, a metakrón daganatok kb. 40%-os esélye miatt. A kiterjesztés általában totál kolektómiát, ill. rektum lokalizáció esetén proktokolektómiát jelent ileoanális anasztomózissal, vagy végleges ileosztómával. Kolektómia esetén a megkímélt rektumban kialakuló karcinómának felmérések szerint 12% az incidenciája 10 éves távlatban (36,38,106).

Az igazolt mutáció hordozók 20-30%-a nem fog élete során vastagbél daganatban szenvedni és a műtét kockázata nem elhanyagolható, ezért a szerzők többsége nem javasolja a profilaktikus totál kolektómia elvégzését. A vastagbél nagy részének az eltávolítása nem véd meg az úgynevezett HNPCC asszociált daganatok kialakulásától sem, ugyanakkor az idejében elkezdett szűrőprogram jelentősen csökkenti mind az incidenciát, mind a mortalitást. Gondosan mérlegelni kell az életminőség hanyatlása miatti hátrányokat is, a kontinencia és a szexuális funkciók romlásának veszélyeit. Különösen érvényesek ezek a megfontolások a fiatalabb korban jelentkező terápiás és még inkább a profilaktikus céllal javasolt műtétek esetén. Ezen megfontolások alapján a profilaktikus totál kolektómia kizárólag azokban a ritkán előforduló esetekben javasolható, amikor az egyén nem képes részt venni a szigorú követési programban (technikai, földrajzi adottságok, rossz együttműködés), avagy fokozott a

betegségtudata és a tumoroktól való félelme miatt állandó pszichés teher alatt él. A laparoszkópos kolektómiát, mint kíméletes és jól alkalmazható eljárást javasolják ezen ritka esetekben (107). Egy 1999-es amerikai felmérés szerint a megkérdezett magas rizikójú betegek 95%-a inkább a rendszeres kolonoszkópiát vállalná a profilaktikus kolektómia helyett (108). Nők körében végzett felmérések szerint 94% vállalná a rendszeres nőgyógyászati szűrést, de csak mintegy 50% választaná a profilaktikus teljes abdominális hiszteroszalpingektómiát a családtervezés befejeztével (108). A nőgyógyászati beavatkozások a nagyobb rizikót jelentő hMSH6 mutáció hordozók körében inkább javasolhatók. Gyomor tumorok esetén is kiterjesztett műtétek végzése a cél, míg epe- és húgyúti érintettség esetén sem a profilaktikus, sem a kiterjesztett műtétek jelentősége nem tisztázott. Az egyértelműen palliatív beavatkozások során nem érdemes kiterjesztett reszekciót végezni.

5.5. A betegek gondozása

A HNPCC-s betegek szoros követésének, gondozásának fontosságát hangsúlyozza a mutliplex és metakrón tumorok gyakori előfordulása. Meg kell különböztetnünk három betegcsoportot: 1. a már rosszindulatú megbetegedés miatt műtéten átesett mutáció hordozókat, 2. a még rosszindulatú megbetegedésben nem szenvedett, de igazolt mutáció hordozókat, és 3. a nagy rizikójú családokból származó, de egészséges egyének követését (mutációt nem sikerült igazolni). Az igazolt mutáció hordozóknak életük során körülbelül 80-85%-os esélye van vastagbél daganat kifejlődésére, 10-19%-os valószínűséget tapasztaltak gyomor, húgyúti és epeúti daganatok kialakulására (38,109). Az ovárium daganatok kialakulására egy élettartam alatt 9%-os esély van, ami az átlag populáció rizikójának 3,5-szöröse (110). Vasen és mtsai 165 HNPCC-s család hosszútávú követésével szerzett tapasztalatai alapján úgy vélik, hogy a kolonoszkópia 20-25 éves korban történő elkezdése

indokolt, ez előtt az életkor előtt az esetek alacsony száma miatt elkezdése értelmetlen. Az általuk regisztrált tumorok 17-88 éves kor közötti megoszlást mutattak. 60 éves életkor felett csak az esetek 15%-a került detektálásra (ellentétben a sporadikus esetek idősebb életkorbeli halmozódásával) és ezek között is gyakoribb volt a szigmabél és végbél lokalizáció, mint a fiatalabb korosztályban. A vizsgálatban résztvevő néhány centrum a rendszeres kolonoszkópia 60-75 éves kor feletti befejezését javasolta, azonban a centrumok többsége ezzel nem értett egyet (40). Wouter és mtsai 114 HNPCC-s család gondozása során a kolonoszkópiás vizsgálatok legalább két évente, vagy ennél sűrűbben történő elvégzését szorgalmazza (72). Az igazolt mutáció hordozók között 10 év alatt 10,5%-ban alakult ki primer vastagbél daganat, a már operált betegek esetén ezen 10 év alatt metakrón tumor 15,7%-nak keletkezett (72). Ez jól egyezik Jarvinen eredményeivel, aki 13%-ban tapasztalt metakrón tumor kialakulást igazolt mutáció hordozókban 10 éves követés során (111). Ebben a tanulmányban a szoros betegkövetés és kontroll eredményét próbálták felmérni az újonnan keletkező daganatok megelőzésében és korai felismerésében. Úgy tapasztalták, hogy a metakrón tumorok kialakulása 62%-kal, a mortalitás 65%-kal csökkent a nem követett kontroll csoporthoz képest (111). Az előbb említett incidencia a bármely típusú (szegment reszekció, totális kolektómia stb.) műtéten átesett betegek összesített adataiból származnak. Rodriguez-Bigas vizsgálta azt is, hogy az igazolt mutáció hordozók, akik totális kolektómián esnek át ileorektális anasztomózis képzésével, milyen további metakrón tumor előfordulására számíthatnak. Azt észlelte, hogy az általa vizsgált betegcsoportban 12 év alatt a rektum karcinóma kialakulása 12%-ban tapasztalható, figyelmeztetve a rektum csonk évenkénti endoszkópos kontrolljára (106). Mindezek alapján az ICG-HNPCC által meghatározott betegkövetési protokollt táblázat formájában az 5. táblázatban mutatjuk be (38).

5. táblázat: Az International Collaborative Group on HNPCC javaslata a mutáció hordozók és magas rizikójú személyek követésére.

Érintett szerv	Vizsgálat	Életkortól javasolt	Gyakoriság
Vastagbél	Kolonoszkópia	20-25 év	2 év
Endometrium, ovárium	Nőgyógyászati fizikális vizsgálat Transzvaginális ultrahang, biopszia	30-35 év	1-2év
Gyomor	Gastrofiberoszkópia	30-35 év	1-2 év
Húgyutak	Vizelet üledék Vizelet citológia Cisztoszkópia stb.	30-35 év	1-2év

Azokban a családokban, ahol nem sikerül egyértelmű patogén eltérést igazolni, azonban egyértelműen teljesítik a módosított Amszterdam Kritériumokat, a nemzetközi irodalom azt az ajánlást teszi, hogy minden családtag gondozásba vétele és követése javasolt (38,106,111). Az, hogy egyértelmű patogén genetikai eltérés kimutatása nem sikerül az adott családban, az nem az öröklődő hajlam elvetését, annál inkább hiányos ismereteinket jelenti, azaz, hogy nem ismerjük a betegség kialakulásának hátterét képező összes genetikai eltérést.

5.6. Etikai megközelítés, a betegségfeltárás lélektani hatása

A HNPCC-s betegek jelentős része már az első észlelésnél is pszichésen labilis lehet a családban halmozottan előforduló daganatok miatt, ezért fokozott körütekintést igényel a

felvilágosítás során. Óriási lelki terhet jelent, ha valaki egy rosszindulatú betegségre hajlamosító gént hordoz és ez nem csak a saját egészsége iránti aggodásban, hanem az utódokra történő örökítés miatti büntudatban is megnyilvánulhat. A genetikai vizsgálat előtt a beteg beleegyezését kell kérnünk, miután részletes megbeszélésre kerültek a következő témák: 1. a genetikai teszt kivitelezésének menete, 2. a pozitív és negatív leletek értékelése, 3. a lehetőség, hogy a vizsgálatok nem vezetnek egyértelmű eredményre, 4. életbiztosítási, munkaügyi problémák vetődhetnek fel, 5. a vizsgáló titoktartási kötelezettsége ezekre az adatokra is vonatkozik, 6. a lelki teher viselésének kérdése, 7. a vizsgálatok költségessége és technikai határai. Gyermekekben nincs helye a genetikai tesztek elvégzésének. A jellegzetes daganatok ebben a korban nagyon ritkán fordulnak elő, az ajánlott szűrőprogramok ennek megfelelően átlagosan 20 éves kortól javasolják a rendszeres vizsgálatok megkezdését. Ugyanakkor a gyermek pszichés fejlődését végzetesen befolyásolhatná a betegségtudat, a félelem, a szülők védelmező túlreagálása.

6. Összefoglalás

A vastagbél daganatok elleni küzdelemben nem csak a bizonyos életkor feletti populációs szűrésnek, hanem az öröklődő jelleget mutató családok felkutatásának és gondozásba vételének is óriási jelentősége van. A hereditér vastagbél daganatok között a Hereditér Nonpolipózis Kolorrektális Karcinóma fordul elő leggyakrabban. 1997-2006 között klinikánkon 809 újonnan felfedezett vastagbél tumoros beteget szűrtünk HNPCC irányában. Betegeink 4,3%-a tökéletesen teljesítette a módosított Amszterdami Kritériumokat és további 6%-a valamilyen okból HNPCC gyanúsnak minősült. Ezekből az adatokból jól érezhető, hogy a magyarországi vastagbél tumoros betegpopulációban igen nagy számban fordulnak elő hereditér jelleget mutató tumoros esetek, amelyek szűrése és gondozása egyáltalán nincs

megoldva. Az Amszterdam Kritériumok alkalmazása messzemenően a legkönnyebben megvalósítható és a legtöbb mutáció hordozó család felderítéséhez vezet, önmagában alkalmazva azonban a mutáció hordozó családok körülbelül 30%-ának fel nem ismeréséhez vezet. Ezért az Amszterdam és Bethesda kritérium rendszer elemeinek együttes alkalmazása szükséges ahhoz, hogy lehetőleg majdnem minden HNPCC-re gyanús család felismerése megtörténjen. Amszterdam pozitív családjaink esetén mutáció találati arányunk 77%-nak bizonyult, mely megelőzte az irodalomban ismertetett eredményeket.

Munkánk során 10 patogén mutációt és számos eddig ismert és nem ismert polimorfizmust találtunk. A felismert patogén mutációk közül 8 mutációt munkacsoportunk közölt elsőként. Nem tapasztaltunk betegeink között ismételt előforduló mutációkat. Úgy tapasztaltuk, hogy ezek a genetikai eltérések az érintett MMR gének különböző exonjain elszórva helyezkednek el. Ezek alapján úgy véljük, hogy nincs az MMR géneknek olyan prédilekciós helye, ahol a mutációk gyakrabban fordulnának elő. A kiszűrt családok tagjainak rendszeres kontrollja jelentősen kisebb anyagi ráfordítást igényel, mint a már kialakult malignus betegségben szenvedő betegek komplex kezelése.

6.1. Új megállapítások

1. Vizsgálataink során reprezentatív mintának csak a 2. vizsgálati időszakot tekinthetjük. Tekintettel arra, hogy a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézetében Kelet Magyarország jelentős részéről megfordulnak betegek, az itt vizsgált populáció a kelet-magyarországi régió jellegzetes betegpopulációjának tekinthető. Ebben az időszakban betegeink 6%-a tökéletesen teljesítette a módosított Amszterdam Kritériumokat és további 10,4%-a valamilyen okból HNPCC gyanúsak minősült. Ezekből az adatokból jól érezhető, hogy a magyarországi vastagbél tumoros betegpopulációban igen nagy számban fordulnak elő hereditér jelleget

mutató tumoros esetek, amelyek szűrése és gondozása egyáltalán nincs megoldva. Eddig ilyen jellegű magyarországi adat nem volt ismert, így eredményünk birtokában nyugodtan megállapíthatjuk, hogy ezeknek a betegeknek a szűrése és gondozásba vétele jelentős preventív onkológiai tevékenységnek tekinthető, melyre nagy szükség van régiókban is.

2. A nemzetközi kritérium rendszerek alkalmazásával arra a következtetésre jutottunk, hogy bár az Amszterdam Kritériumok alkalmazása messzemenően a legkönnyebben megvalósítható és a legtöbb mutáció hordozó család felderítéséhez vezet, önmagában alkalmazva azonban a mutáció hordozó családok körülbelül 30%-ának fel nem ismeréséhez vezet. Ezért a két kritérium rendszer elemeinek együttes alkalmazása szükséges ahhoz, hogy lehetőleg majdnem minden HNPCC-re gyanús család felismerése megtörténjen. Amszterdam pozitív családjaink esetén mutáció találati arányunk megelőzte az irodalomban ismertetett eredményeket.

3. Tekintettel arra, hogy a kritérium rendszerek együttes alkalmazásával azonban a HNPCC gyanús betegek száma bővül, a legköltségesebb és leginkább időigényes vizsgálat, a szekvenálás előtt olyan vizsgálatok elvégzésére van szükségünk, amivel növelni tudjuk a mutáció keresés határfokát. Erre az általunk kidolgozott vizsgálati sorban úgy van lehetőség, hogy a beteg lekérdezésével egyidőben levett EDTA-s vérminta fagyasztásával, majd friss tumor szövetminta fagyasztásával a mikroszatellita instabilitás és immunhisztokémiai vizsgálatok rutinszerűen elvégezhetőek. Így már csak a betegek azon szűk köre kerül szekvenálásra, ahol a HNPCC lehetősége egészen biztosan fennáll. Így a költségek jelentősen csökkenthetőek. A beteg halála esetén az első észlelésnél lefagyasztott mintákból a vizsgálati sor befejezhető. Így van lehetőség a családtagok szűrése és gondozásba vételére is.

4. Munkánk során 10 patogén mutációt és számos eddig ismert és nem ismert polimorfizmust találtunk. A felismert patogén mutációkat egyeztetve a nemzetközi adatbázisokkal arra az eredményre jutottunk, hogy 8 mutációt munkacsoportunk közölt

elsőként. Nem tapasztaltunk betegeink között ismételt előforduló mutációkat, tehát olyan mutációt, amely a vizsgált populációra jellemző volna. Úgy tapasztaltuk, hogy ezek a genetikai eltérések az érintett MMR gének különböző exonjain elszórva helyezkednek el. Ezek alapján úgy véljük, hogy nincs az MMR géneknek olyan prédilekciós helye, ahol a mutációk gyakrabban fordulnának elő. Úgy gondoljuk, hogy munkánk folytatásával, a vizsgált betegpopuláció növelésével még tisztább képet kaphatunk a HNPCC magyarországi előfordulásáról és az előforduló mutációk típusairól.

5. Munkánk klinikai alkalmazhatóságát fémjelzi 1., 3., 5., 6., 7. és 9. családuk példája, ahol a rendszeres onkológiai követés miatt újonnan kialakult daganatos megbetegedés már nem fordult elő. Azonban számos ezt megelőző állapot (vastagbél adenomatózus polipok, korai bőrdaganatok stb.), elhárítása megtörtént. Nagyon lényeges eredménynek tartjuk azt is, hogy a leszűrt családokban a mutációt hordozó és nem hordozó személyek felismerésével azokat a személyeket, akik nem tartoznak a magas rizikójú betegcsoporthoz, mintegy megszabadítjuk ennek a betegség tudatnak a lelki terhetől. Sajnos a 2. családuk jól példázza a nem gondozott HNPCC-s család sorsát, és általában ezek az esetek azért sem kerülnek soha napvilágra, mert a betegek különböző intézetekben kerülnek ellátásra. Mindezek alapján tehát megállapíthatjuk, hogy az általunk gondozott betegpopulációban nagy szükség van a HNPCC-s családok felismerésére és a családtagok leszűrését követően azok gondozásba vételére az újonnan kialakuló daganatok megelőzése céljából.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Hivatkozott közlemények

1. Ottó Sz, Kásler M: Rákmortalitás és-incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében. *Magy Onkol* 2002. 46: 111-117.
2. Thorson AG, Knezetic JA, Lynch HT: A Century of Progress in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome). *Dis Colon Rectum* 1999. 42: 1-9.
3. Suoza RF: Review article: a molecular rationale for the how, when and why of colorectal cancer screening. *Aliment Pharmacol Ther* 2001. 15: 451-462.
4. Simon L: Colorectalis Carcinoma. A molekuláris genetikai kutatások elméleti és gyakorlati eredményei. *Eur J Gastroent Hepatol* 1999. 201-208.
5. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JM, Launonen V, Aaltonen LA: Microsatellite Marker Analysis in Screening for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001. 61: 4545-4549.
6. Dieumegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, Le Bihan ML, Lefrère I, Bellefqih L, Pignon JP, Rougier P, Lasser P, Bénard J, Couturier D, Bressac-de Paillerets B: Extensive molecular screening for non-polyposis colorectal cancer. *British J of Cancer* 2000. 82: 871-880.
7. Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, W Kinzler K, Valculescu VE, Vogelstein B, Nowak MA: Genetic Progression and the Waiting Time to Cancer. *Plos Comput Biol* 2007. 3(11): e225.

8. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J et al.: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. 2006. *Science* 314: 268-274.
9. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990. 61: 759-767.
10. Polakis P: Mutations in the APC gene and their implications for protein structure and function. *Curr Opin Genet Dev* 1995. 5: 66-71.
11. Robbins DH, Itzkowitz SH: The molecular and genetic basis of colon cancer. *Med Clin N Am* 2002. 86: 1467-1495.
12. Kinzler KW, Vogelstein B: Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers (news, comment). *Nature* 1997. 386: 761-763.
13. Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM: Molecular cytogenetics: Genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol* 2006. 28: 71-84.
14. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G: Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1996. 15: 234-245.
15. Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996. 87: 159-170.
16. Malumbres M, Pellicer A: RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 1998. 3: 887-912.
17. Park DY, Sakamoto H, Kirley SD, Ogino S, Kawasaki T, Kwon E, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Chung DC, Rueda BR, Zukerberg LR: The Cables Gene on Chromosome 18q is silenced by Promoter Hypermethylation and Allelic Loss in Human Colorectal Cancer. *Am J Pathol* 2007. 171(5): 1509-1519.

18. Holmes J Jr, Clark F, Modrich P: Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila Melanogaster* cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990. 87: 5837-5841.
19. Thomas DC, Roberts JD, Kunkel TA: Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. *J Biol Chem* 1991. 266: 3744-3751.
20. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW: A National Cancer Institute Workshop on Mikrosatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of mikrosatellita instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998. 58: 5248-5257.
21. Knudson AG: Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996. 122: 135-140.
22. Kinzler KW, Vogelstein V: Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998. 280: 1036-1037 (comment).
23. Li LS, Kim NG, Kim SH, Park C, Kim H, Kang HJ, Koh KH, Kim SM, Kim WH, Kim NK, Kim H: Chromosomal imbalances in the colorectal carcinomas with mikrosatellite instability. *Am J Pathol* 2003. 163: 1429-1436.
24. Vogelstein B, Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004. 10(8): 789-798.
25. Lakatos PL, Lakatos L: A hereditaer és sporadikus colorectalis daganatok genetikája és a genetikai ismeretek jelentősége a mindennapi gyakorlatban: hereditaer colorectalis daganatok. *Orv Hetil* 2006. 147(8): 363-368.
26. Powell SM, Zilz N, Beazer Barclay Y: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992. 359: 235-237.
27. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990. 247: 49-56.

28. Kennedy EP, Hamilton SR: Genetics of colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 1998. 15: 126-130.
29. Friedl W, Caspari R, Sengteller M et al.: Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *GUT* 2001. 48: 515-521.
30. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al.: Inherited variants of MYH associated with somatic G:C → T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002. 30: 227-232.
31. Venesio T, Molatore S, Cattaneo F et al.: High Frequency of MYH Gene Mutations in a Subset of Patients With Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology* 2004. 126: 1681-1685.
32. Jenne DE, Reimann H, Nezu J et al.: Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serin threonin kinase. *Nat Genet* 1998. 18: 38-43.
33. Udd L, Katajisto P, Rossi DJ et al.: Supression of Peutz-Jeghers Polyposis by Inhibition of Cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* 2004. 127: 1030-1037.
34. Lim W, Olschwang S, Keller JJ et al.: Relative Frequency and Morphology of Cancers in STK11 Mutation Carriers. *Gastroenterology* 2004. 126: 1788-1794.
35. Lawes DA, SenGupta SB, Boulos PB: Pathogenesis and clinical management of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *British J Surg* 2002. 89: 1357-1369.
36. Lynch HT: Is there a role for prophylactic subtotal colectomy among hereditary nonpolyposis colorectal cancer germline mutation carriers? *Dis Colon Rectum* 1996. 39: 109-110.
37. Iino H, Simms L, Young J, Arnold J, Winship IM, Webb S, Furlong KL, Leggett B, Jass JR: DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 2000. 47: 37-42.

38. Scaife CL, Rodriguez-Bigas MA: Lynch Syndrome: Implications for the Surgeon. Clin. Colorectal Cancer 2003. Vol 3, No 2: 92-98.
39. Jeong SY, Shin KH, Shin JH, Ku JL, Shin YK, Park SY, Kim WH, Park JG: Microsatellite Instability and Mutations in DNA Mismatch Repair Genes in Sporadic Colorectal Cancers. Dis Col Rect 2003. 46: 1069-1077.
40. Vasen HF, Mecklin JP, Watson P, Utsunomiya J, Bertario L, Lynch P, Svendsen LB, Cristofaro G, Müller H, Khan PM, Lynch HT: Surveillance in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: An International Cooperative Study of 165 Families. Dis Col Rect 1993. 36: 1-5.
41. Lynch HT, Schuelke GS, Kimberling WJ, Albano WA, Lynch JF, Biscone KA, Lipkin ML, Deschner EE, Mikol YB, Sandberg AA: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome I and II). II. Biomarker studies. Cancer 1985. 56: 939-951.
42. Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I. & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control. Part I. Cancer Genet Cytogenet 1991. 5: 143-160.
43. Debniak T, Kurzawski G, Gorski B: Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer. Eur J Cancer 2000. 36: 49-54.
44. Jass JR: Hereditary non-polyposis colorectal cancer: The rise and fall of a confusing term. World J Gastroenterol 2006. 12 (31): 4943-4950.
45. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G: Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. Gastroenterology 1996. 110: 1020-1027.

46. Lin KM, Shashidharan M, Thorson AG, Ternent CA, Blatchford GJ, Christensen MA: Cumulative incidence of colorectal and extracolonic cancers in MLH1 and MSH2 mutation carriers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 1998. 2: 67-71.
47. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) *Dis Col Rect* 1991. 34: 424-425.
48. Watson P, Lynch HT: Extracolonic cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993. 71: 677-685.
49. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999. 116: 1453-1456.
50. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994. 371: 75-80.
51. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P: Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996. 2: 169-174.
52. Peltomaki P, Vasen HF: Mutations predisposing to hereditary non-polyposis colorectal cancer: database and results of collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997. 113: 1146-1158.
53. Chung, DC: The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000. 119: 854.

54. Lynch HT, de la Chapelle A: Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003. 348: 919-932.
55. de la Chapelle A: Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004. 4: 769-780.
56. Peltomaki P, Vasen H: Mutations associated with HNPCC predisposition-update of ICG-HNPCC/INSIGHT mutation database. *Dis Markers* 2004. 20: 269-276.
57. Kurzawski G, Suchy J, Kladny J, Safranow K, Jakubowska A, Elsakov P, Kucinkas V, Gardovski J, Irmejs A, Sibul H, Huzarski T, Byrski T, Debniak T, Cybulski C, Gronwald J, Oszurek O, Clark J, Gozdz S, Niepsuj S, Slomski R, Plawski A, Lacka-Wojciechowska A, Rozmiarek A, Fiszer-Maliszewszka L, Bebenek M, Sorokin D, Stawicka M, Godlewski D, Richter P, Brozek I, Wysocka B, Jawien A, Banaszekiewicz Z, Kowalczyk J, Czudowska D, Goretzki PE, Moeslein G, Lubinski J: Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum in HNPCC families from Poland and the Baltic States. *J Med Genet* (abstract) 2002. 39: E65.
58. Wagner A, Barrows A, Wijnen JT, van der Klift H, Franken PF, Verkuijlen P, Nakagawa H, Geugien M, Jaghmohan-Changur S, Breukel C, Meijers-Heijboer H, Morreau H, van Puijenbroek M, Burn J, Coronel S, Kinarski Y, Okimoto R, Watson P, Lynch JF, de la Chapelle A, Lynch HT, Fodde R: Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an american founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am J Hum Genet* 2003. 72: 1088-1100.
59. Heldin CH, Miyazono K, Dijke P: TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997. 390: 465.
60. Markowitz S, Wang J, Myeroff L: Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995. 268: 1336.

61. Branch P, Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF, Karran P: Immune surveillance in colorectal carcinoma. *Nat Genet* 1995. 9: 231-232.
62. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M: Genomic instability in repeated sequences is an early somatic in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994. 6: 273-281.
63. Lukish JR, Muro K, De Nobile J, Katz R, Williams J, Cruess DF: Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 1998. 227: 51-56.
64. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H: Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000. 119: 921-928.
65. Lynch HT, de la Chapelle A: Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999. 36: 801-818.
66. Fante R, Roncucci L, Di Gregorio C: Frequency and clinical features of multiple tumors of the large bowel in the general population and in patients with hereditary colorectal carcinoma. *Cancer* 1996. 77: 2013-2021.
67. Peltomaki P, Vasen HF: Mutations predisposing to hereditary non-polyposis colorectal cancer: database and results of collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997. 113: 1146-1158.
68. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Jarvinen H, Lynch HT: The risk of endometrial cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Am J Med* 1994. 96: 516-520.
69. Wijnen J, De Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Moller P, Stormorken A: Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 1999. 23: 142-144.

70. Percesepe A, Anti M, Marra G: Role of clinical criteria in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer: results of a multivariate analysis. *Int J Cancer* 1994. 58: 799.
71. Moslein G, Tester DJ, Lindor NM: Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum Mol Gen* 1996. 5: 1245-1252.
72. Wouter H, de Vos tot Nederveen Cappel, Fokko M Nagengast, Gerit Griffioen, Fred H Menko, Babs G Taal, Jan H kleibeuker, Hans F Vasen: Surveillance for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Dis Col Rect* 2002. 45: 1588-1595.
73. Beck NE, Tomlinson IPM, Homfray T: Use of SSCP analysis to identify germline mutations in HNPCC families fulfilling the Amsterdam criteria. *Hum Genet* 1997. 99: 219-224.
74. Yanagisawa Y, Akiyama Y, Iida S: Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000. 85: 50-53.
75. Kamory E, Kolacsek O, Otto S: hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *POR* 2003. 9: 236-241.
76. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K: Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001. 61: 3410-3418.
77. The Human Gene Mutation Database Cardiff.
<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/searc/203983.html>
78. International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors. <http://www.insight-group.org>
79. Papp J, Kovács ME, Oláh E: Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis

- colorectal cancer families: Implications for genetic testing. *World J Gastroenterol* 2007. 21, 13 (19): 2727-32.
80. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH: The Colon Cancer Burden of Genetically Defined Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *Gastroenterology* 2001. 121: 830-838.
 81. National Institute of Environmental Health Sciences Genome Project, NIEHS SNPs. <http://egp.gs.washington.edu/M.html>
 82. Lynch HT, Riley BD, Weismann S, Coronel SM, Kinarsky Y, Lynch JF, Shaw TG, Rubinstein WS: Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC) and HNPCC-like families: Problems in diagnosis, surveillance, and management. *Cancer*. 2003. 100 (1): 53-64.
 83. Tanyi M, Olasz J, Lukács G, Csuka O, Tóth L, Szentirmay Z, Rész Zs, Barta Zs, Tanyi JL, Damjanovich L: Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006. 12(8): 1192-1197.
 84. Hutter P, Couturier A, Membrez V: Excess of hMLH1 germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 1998. 78: 80-84.
 85. Cederquist K, Emanuelsson M, Goransson I: Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. *Int J Cancer* 2004. 109: 370-376.
 86. Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubinski J: Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2002. 51: 89-100.
 87. Kim JC, Kim HC, Roh SA, Koo KH, Lee DH, Yu CS, Lee JH, Kim TW, Lee HL, Beck NE, Bodmer WF: hMLH1 and hMSH2 mutations in families with familial

- clustering of gastric cancer and hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2001. 25 (6): 503-510.
88. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA: Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. *Br J Surg* 1967. 54: 191-195.
 89. Torre D: Multiple sebaceous tumors. *Arch Dermatol* 1968. 98: 549-551.
 90. Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM. The cancer family syndrome: rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch Intern Med* 1981. 141: 607-611.
 91. Ponti G, Losi L, Pedroni M, Lucci-Cordisco E, Di Gregorio C, Pellacani G, Seidenari S: Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. *J Invest Dermatol* 2006. 126 (10): 2302-2307.
 92. Lynch HT, Fusaro RM, Lynch PM: Sebaceous Skin Lesions as Clues to Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. *J Invest Dermatol* 2006. 126 (10): 2158-2159.
 93. Ponti G, Losi L, Di Gregorio C, Roncucci L, Pedroni M, Scarselli A, Benatti P, Seidenari S, Pellacani G, Lembo L, Rossi G, Marino M, Lucci-Cordisco E, Ponz de Leon M: Identification of Muir-Torre syndrome among patients with sebaceous tumors and keratoacanthomas. *Cancer* 2005. 103 (5): 1018-1025.
 94. Mangold E, Pagenstecher C, Leister M, et al.: A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004. 41: 567-572.
 95. Watson P, Riley B: The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005. 4: 245-248.

96. Watson P, Lynch HT: Extracolonic Cancer in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer* 1993. 71 (3): 677-685
97. Zavodna K, Bujalkova M, Krivulcik T, Alemayehu A, Skorvaga M, Marra G, Fridrichova I, Jiricny J, Bartosova Z: Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients in Slovakia. *Neoplasma* 2006. 53 (4): 269-276.
98. Plevova P, Krepelova A, Papezova M, Sedlakova E, Curik R et al.: Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma* 2004. 51 (4): 275-284.
99. Wahlberg S, Liu T, Lindblom P, Lindblom A: Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1. *Genet Test*. 1999. 3 (3): 259-264.
100. Viel A, Genuardi M, Capozzi E, Leonardi F, Bellacosa A, Paravatou-Petsotas M, Pomponi MG, Fornasarig M, Percesepe A, Roncucci L, Tamassia MG, Benatti P, Ponz de Leon M, Valenti A, Covino M, Anti M, Foletto M, Boiocchi M, Neri G: Characterization of MSH2 and MLH1 mutations in Italian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1997. 18 (1): 8-18.
101. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, Plotz G, Jiricny J, Marra G: Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 2002. 122 (1): 211-219.
102. Plotz G, Welsch C, Giron-Monzon L, Friedhoff P, Albrecht M, Piiper A, Biondi RM, Lengauer T, Zeuzem S, Raedle J: Mutations in the MutS α interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Research* 2006. 34 (0): 1-13.
103. Sorting Intolerant from Tolerant: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>

104. PMut: <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>
105. PolyPhen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
106. Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, et al.: Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. Ann Surg 1997. 225: 202-207.
107. Milson JW, Ludwig KA, Church JM, et al.: Laparoscopic total abdominal colectomy with ileorectal anastomosis for familial adenomatous polyposis. Dis Colon Rectum 1997. 40: 675-678.
108. Lynch HT, Watson P, Shaw TG, Lynch JF, Harty AE, Franklin BA, et al.: Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part II. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. Cancer 1999. 86: 2457-63.
109. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, és mtsai: Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. Int J Cancer 1995. 64: 430-433.
110. Watson P, Butzow R, Lynch HT, et al.: The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gynecol Oncol 2001. 82: 223-228.
111. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al.: Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology 2000. 118: 829-834.

7.2. Saját közlemények

7.2.a. Az értekezést megalapozó közlemények:

1. **Tanyi M**, Kanyári Z, Orosz L, Juhász B, Lukács G, Damjanovich L: A HNPCC klinikai jelentősége, korai felismerésének sebészi vonatkozásai. Magy. Seb. 2004. 57 (5): 267-78.
2. **Tanyi M**, Olasz J, Lukacs G, Csuka O, Toth L, Szentirmay Z, Ress Z, Barta Z, Tanyi JL, Damjanovich L: Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. World J Gastroenterol 2006. 12 (8): 1192-7. **IF:3.41**
3. **Tanyi M**, Kanyári Z, Juhász B, Lukács G, Olasz J, Kámory E, Csuka O, Tóth L, Damjanovich L: A Herediter Nonpolipózis Kolorektális Karcinóma fenotípusának sokszínűsége. Két, igazolt mutáció hordozó beteg családfa analízise. Magy. Seb. 2006. 59: 411-421
4. Kámory E, **Tanyi M**, Kolacsek O, Olasz L, Tóth L, Damjanovich L, Csuka O: Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. Pathol Oncol Res 2006. 12(4): 228-33. **IF: 1.2**
5. **Tanyi M**, Olasz J, Kámory E, Csuka O, Tanyi JL, Ress Z, Damjanovich L: Difficulties in recognizing families with Hereditary Non-polyposis Colorectal Carcinoma. Presentation of 4 families with proven mutation. Eur J Surg Oncol. 2008 Feb 18; (Közlésre elfogadva) **IF: 1.88**

Az értekezést megalapozó közlemények impakt faktora: 6.49

7.2.b. Egyéb témakörben megjelent közlemények:

1. **Tanyi M**, Fülöp B, Garami Z, Garai I, Tanyi J, Lukács G: The role of MIBI scintigraphy in the early detection of breast cancer. *Magy. Seb.* 2001. 54 (2): 118-22.
2. Kanyári Z, Orosz L, Juhász B, **Tanyi M**, Németh E, Trón L, Damjanovich L, Lukács G, Kálvin B: The role of positron emission tomography (PET) in the detection of local recurrence and metastasis of colorectal cancer. *Magy. Seb.* 2005. 58 (3): 179-83.
3. Kanyári Z, Kincses Z, Orosz L, Juhász B, **Tanyi M**, Lukács G, Damjanovich L: Increasing dominance of laparoscopic techniques in the surgery of the spleen in hematologic syndroms. *Magy. Seb.* 2006. 59 (1): 7-11.
4. **Tanyi M**, Kanyári Z, Juhász B, Damjanovich L, Lukács G: A kóros elhízás sebészeti kezelése *Magy. Seb.* 2006. 59 (5): 350-361.
5. Damjanovich L, **Tanyi M**: A kóros elhízás sebészeti kezelése. *Gastro Update* (2007)
6. Tanyi M, Kanyári Z, Juhász B, Damjanovich L: Surgical treatment of morbid obesity. *Chirurgia* 2007. 102: 131-141.
7. Ress Z, Illés Á, Matolcsy A, **Tanyi M**, Szövördi É, Gergely L: Szokatlan lokalizációjú diffúz nagy B-sejtes non-Hodgkin lymphoma fiatal férfibetegünkénél *Lege Artis Medicinæ* 2007. 17 (2): 144-148.

7.2.c. Idézhető nemzetközi folyóiratban megjelent absztrakt

1. **Tanyi M**, Damjanovich L: The prevalence of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma in eastern Hungary, the importance of screening. *Zeitschrift für Gastroenterologie* XLIII (2005) **IF:1.1**

2. Konya L, Kover A, Fulop I, **Tanyi M**, Tanyi J: Nickel is able to substitute calcium in EC coupling during K⁺ contractures in mouse EDL but not in soleus muscle. Abstract for the XIX European conference on muscle contraction and cell motility. Brussels, Belgium, 10-13 September 1990. J Muscle Research and Cell Motility 1: 91, 1991.
IF: 3.402

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Damjanovich László Professzor Úrnak, hogy felhívta figyelmemet erre a jelentős klinikai relevanciával rendelkező kutatási területre, és töretlen támogatásával segítette munkámat. Tanácsai és útmutatásai nélkülözhetetlenek voltak ennek a munkának a létrejöttéhez.

Köszönöm Olasz Judit vegyész nő lelkiismeretes és áldozatos munkáját, melyben óriási részt vállalt a genetikai eltérések felismerésében és azok patogenetikai jelentőségének megítélésében.

Köszönöm Dr. Tóth László Egyetemi Tanársegéd Úrnak, hogy az eltávolított tumorszövetminták immunhisztokémiai vizsgálatainak elvégzésével és értékelésével nélkülözhetetlen szerepet vállalt a betegeink kivizsgálása során.

Köszönöm Dr. Antal-Szalmás Péter Tanár Úrnak, hogy a mikroszatellita instabilitási vizsgálatok elvégzésével és értékelésével hozzájárult a HNPCC-s családok felismeréséhez.

Végezetül és nem utolsó sorban köszönöm családomnak a türelmet és támogatást munkám során.

