

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**

Bevezetés

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. 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. Különböző szerzők a HNPCC előfordulását a vastagbélrákban szenvedő betegek 3-6 %-ára becsülik

A tumorok alapvetően genetikai megbetegedésnek tekinthetők. A tumoros folyamat kialakulása, egy adott genetikai szempontból megváltozott sejt klónjának fékezhetetlen expansiójából származik.

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 viszonylag korai életkorban már kialakulhat.

A családi halmozódás jellemző mind elsőfokú rokonok, mind az egymást követő generációk között. Az öröklődés menete autoszómális domináns, mintegy 80%-os penetranciával.

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 szegregációs gének (PMS) hPMS1 és hPMS2. Az MMR fehérjék egymással funkcionális komplexet alkotva javítják ki az újonnan másolt DNS szálban keletkezett hibákat. 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%-ában a hPMS1 mutációját körülbelül 1%-ában sikerült igazolni.

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 exspresszálódik az általa kódolt fehérje sem. Ezt a HNPCC fenotípusának úgynevezett epigenetikus kialakulását, eddig kizárólag a hMLH1 esetén írták le.

Célkitűzések

Munkánk alapvető célja az, hogy az általunk gondozott beteganyagon felismerjük, vizsgáljuk, és gondozásba vegyük a nemzetközi kritériumok alkalmazásával kiszűrt HNPCC-ben szenvedő betegeket. 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 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 populációra jellemző mutációi és hogy vannak-e ezeken a géneken belül olyan területek, melyek mutációja gyakrabban fordul elő („hot spot”).
4. Tekintettel arra, hogy a betegség genetikai hátterének felderítése igen költséges ezért nagyon fontosnak éreztük az MMR gén mutációk felismerésének a mindennapi gyakorlatban is elvégezhető költség hatékony útjának kidolgozását és megvalósítását a Debreceni Egyetemen.
5. Jelen munkánk klinikai alkalmazhatóságát fémjelzi a mutáció hordozó családok családfa szűrésének elvégzése, igazolt mutáció hordozó egyének gondozásba vétele és így, az újonnan kialakuló malignus megbetegedések megelőzése. Számos új tapasztalat segítségével tovább javíthatjuk szűrési és gondozási tevékenységünk hatékonyságát.

Betegek és módszer

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 azonban csak 809 beteg eredményeit használtuk fel. Ennek oka az volt, hogy a betegek egy része nem értékelhetően vagy egyáltalán nem válaszolt megkeresésünkre. A vizsgálati időszakban 1997-2003 között retrospektív úton (1. vizsgálati szak), 2004-2006 között pedig prospektív úton végeztük vizsgálatainkat (2. vizsgálati szak). Minden betegünk esetén a Módosított Amszterdam és Bethesda kritériumok felhasználásával elkészített kérdőívünket alkalmaztuk. 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. 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 HNPCC fennállása feltételezhető és ezért további vizsgálatokat igényelnek (**Amszterdam negatív**

csoport). 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 tumor szövetéből és perifériás véréből izolált DNS mikroszatellita instabilitási eredményeit hasonlítottuk össze. Így ezzel a fent említett két vizsgálattal tovább volt szűkíthető 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. Amennyiben sikerült patogén eltérést találnunk, akkor a családtagokat a továbbiakban az igazolt mutációra célzottan vizsgáltuk.

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.

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.

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.

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 forgalmazták)
- 0.1µM sense primer
- 0.1µM antisense primer
- dNTP mix: 100µM 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	}	35x
Tanell. 1 perc		
72 °C 1 perc		

Mutáció keresés

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

Szekvenálás

Az heteroduplexen vagy SSCP-n eltérő mintázatot adó mutációk PCR termékeit láncterminálós 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.

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. 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.

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.

Eredmények és Megbeszélés

Populációs szűrés eredményei

A teljes vizsgálati időszak alatt 809 betegből 725 esetet (89,6%) egyértelműen a késői életkorban előforduló sporadikus vastagbél daganatnak tekintettünk. A teljes vizsgálati időszakban 84 HNPCC gyanús családot regisztráltunk (10,3%). Ebből Amsterdam negatív csoportba 49 (6%), Amsterdam pozitív csoportba 35 család tartozott (4,3%). Vizsgálatainkat 1997-2003 között retrospektív úton végeztük. A kiküldött kérdőíveket lekérdező orvos segítségével 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%) Amsterdam negatív, 14 (3%) Amsterdam 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. 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 családja (10,4%), míg Amszterdam pozitívnak bizonyult 21 beteg családja (6%).

A teljes vizsgálati időszakban 64 beteg esetében tudtuk elvégezni a mikroszatellita instabilitási és az immunhisztokémiai vizsgálatokat. Ezek alapján összesen 25 beteg szekvenálását terveztük, amelyből csak 19 esetben tudtuk a szekvenálást elvégezni a beteg perifériás véréből izolált DNS-ből. Tíz patogénnek vélt mutációt és számos már ismert polimorfizmust találtunk. 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 9 Amszterdam pozitív család volt (47%) és 10 Amszterdam negatív 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.

Családfa analízisek eredményei és azok megbeszélése

1. család:

31 éves férfi 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. Szekvenálás segítségével 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. 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 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). A 7. exonon található nonszensz mutáció még eddig nem került közlésre, így újonnan detektált mutációnak tekinthető. 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. Ezen polimorfizmus allél frekvenciáját a „The National Institute of Environmental Health Sciences Genome Project” adatbázisa 0,02-nek adja meg, mely 4%-os heterozigóta előfordulást jelent az amerikai populációban.

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.

Első családunk egy típusos, úgynevezett „standard” HNPCC-s család. 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.

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). Az index személy 28 éves bátyjánál a szigmbél tubulovillozus adenómáját igazoltuk, melyet endoszkópos úton eltávolítottunk. Az index személy három Bethesda kritériumot is teljesít: szinkrón vastagbél daganat, mely 45 éves életkor előtt került felismerésre, elsőfokú rokon vastagbél adenomatózis polippal, 40 éves életkor előtt. Szekvenálás 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.

Hutter és munkatársai egy HNPCC-s családban leírták a hMLH1 19. exonján talált mutációt, melyet patogén eltérésnek vélték. Cederquist és munkatársai már csak egy ritkán előforduló variánsnak (polimorfizmus) tartja ezt az eltérést. Az általunk vizsgált családban az anyai ágon, az index személyt is beleértve 9 személyben találtuk meg a fent említett eltérést. Az expresszált hMLH1 fehérje ebben a pozícióban elhelyezkedő aminosava fejlődéstani szempontból nem konzervatív és a normál kontroll csoport legalább egy százalékában mutat eltérést. 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. Ez az eltérés egy kereteltolós mutáció az exon-intron határon. Ezt a mutációt, az index személyt és annak testvérét is beleértve 5 személyben tudtuk igazolni az apai ágon. Az index személy és testvére mindkét mutációt hordozza. 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.

Annak ellenére, hogy a családtagok a HNPCC jellemzőivel kapcsolatosan alapos felvilágosítást kaptak, nem sikerült őket gondozási programba venni. Három évvel az index személy műtete és a HNPCC igazolását követően a gondozásra egyébként nem járó családtag,

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. Eközben az index személy édesapjának testvére 54 évesen más intézetben, szintén előrehaladott végbél daganat miatt került ellátásra. 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.

E család jól példázza „a HNPCC gyanús család szegényes családi anamnézissel” típusát.

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. 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. Szekvenálás során a hMSH2 a nemzetközi adatbázisok szerint már ismert patogén mutációját (hMSH2 gén 13 exon 711. kodon Arg→STOP) sikerült igazolnunk.

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. Kim és munkatársai koreai familiárisan halmozódó gyomor daganatos családok esetén is leközi ezt a genetikai eltérést. Érdekes megállapításra jut, hogy szemben azokkal az eddigi megfigyelésekkel melyek szerint a 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.

További 7 családtag célzott vizsgálata során a fent említett mutációt 3 személyben találtuk meg. Ezek a családtagok jelenleg egészségesek, rendszeres utánkövetésük megoldott. Ez a család típusos példája a kis létszámú, így az Amszterdam kritériumokat teljesíteni nem tudó HNPCC-s családoknak.

4. család:

Index személyünk 49 évesen flexura hepatica adenokarcinómában szenvedett. 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. A hMLH1 gén nagy szakasz delécióját igazoltuk MLPA segítségével, mely eltérés még nem volt megtalálható a nemzetközi adatbázisokban. A deléció kezdőpontja a 11. exon 301. kodonban helyezkedik el, végpontja a 11. 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.

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. A család különböző részei nagy földrajzi területen helyezkedik el, így a szűrés és utógondozás technikailag sem valósítható meg.

5. család:

57 éves férfi beteg a vakbél mucinózus adenokarcinómája és szinkrón rosszindulatú pancreas fej térfoglalás miatt került műtéti ellátásra. A beteg mellkasáról a korábbiakban már rosszindulatú bőrelváltozás eltávolítása történt. A műtét során a beteg nyakán elhelyezkedő papulózus bőrelváltozást is eltávolítottuk, melynek szövettana „sebaceous” karcinómát igazolt. A beteg családfájának felderítése során további két vastagbél (49, 25 évesen), két gyomor (60, 48 évesen) és egy metakrón endometrium daganat (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.

A Muir-Torre szindróma (MTS) egy autoszómális domináns öröklődés menetet mutató megbetegedés, melyre jellemző a rosszindulatú „sebaceous” bőrelváltozások és a gasztrointesztinális malignómák egyidejű előfordulása. A kórkép a HNPCC egyik alcsoportjának tekinthető. Érdekes megfigyelés az, hogy a jó vagy rosszindulatú sebaceous bőrelváltozások az esetek 60%-ban megelőzik a beteg sorsát sokkal jelentősebben befolyásoló gasztrointesztinális malignóma kialakulását. Ezekre a tapasztalatokra tekintettel kiváló előrejelzői lehetnének a kialakuló HNPCC asszociált daganatoknak.

Az általunk közölt család esetében a hMLH1 10 exon c. 794 G→C cserével járó misszensz mutációját találtuk szekvenálás segítségével. 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.

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. 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.

Ezt az eltérést 5 családtagban tudtuk igazolni. 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 hereditér 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.

6. család:

39 éves fiatal nőbeteg a szigmbél szűkítő daganata miatt rektoszigma reszekción esett át intézetünkben. 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 (64, 70 évesen), egy tüdő (62 évesen) és egy endometrium karcinóma (66 évesen) előfordulása szerepel.

A hMLH1 nagy kiterjedésű delécióját igazoltuk. 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.

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.

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 személy, 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.

7. család:

Index személyünk 72 évesen az anusgyűrűtől 18-20 cm-re szűkítő mucinózus adenokarcinóma miatt rektosigma reszekción esett át intézetünkben. Családfa analízis során elsőfokú rokonok között további két vastagbél daganatot (90, 67 évesen), egy egészen fiatal életkorban kialakult központi idegrendszeri daganatot (16 évesen), valamint egy endometrium daganatot (19 évesen) igazoltunk. A kolorektális daganatok életkori megjelenése viszonylag késői és nem típusos HNPCC-re. Figyelmünket a korai életkorban megjelenő endometrium karcinóma keltette fel. Érdekes megfigyelés, hogy az endometrium karcinómában szenvedő fiatal nőbeteg édesanyja teljesen egészséges, így a fenotípusos manifestáció egy generációt átugrott.

Szekvenálás során a hMLH1 két misszensz mutációját észleltük (14. exon: L555V, 19. exon: P747H), melyeket még nem találtunk meg a nemzetközi adatbázisokban. A 14. exon mutációját 6 személyben, a 19. exon mutációját 7 személyben sikerült igazolnunk.

Három különböző szoftvert alkalmaztunk ezen két aminosav csere hatásának megítélésére. E szoftverek a szekvencia homológia és az aminosavak fizikai tulajdonságai alapján a 19. exon mutációját „tolerálható aminosav cserének” nyilvánították. A 14. exon mutációját egyik szoftver „tolerálható aminosav cserének” a másik két program „valószínűleg káros” 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 polimorfizmus. 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 haránt vastagbél daganatban 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.

8. család:

47 éves férfi betegnél a haránt vastagbél mucinózus adenokarcinómájára derült fény. A családban elsőfokú rokonok között egy gyomor (46 évesen), két vastagbél (41, 38 évesen), egy hörgő (68 évesen), egy cervix (21 évesen), egy metakrón ovárium (52 évesen) és egy metakrón Klatskin tumorra (59 évesen) derült fény. A tumorok életkori megoszlása alapján a család tökéletesen teljesíti az Amszterdam és Bethesda kritériumokat egyaránt. Igazi „Standard HNPCC-s család”-nak tekinthető.

Szekvenálás során a hMLH1 2. exon 143 kodon A→C cserével járó misszensz mutációját találtuk (p.Q48P). A fent említett genetikai eltérést egyetlen nemzetközi adatbázisban sem találtuk meg. 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, a másik kettő „feltehetőleg káros”-nak nyilvánította ezt a genetikai eltérést.

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 a hasfalra törő malignus folyamat kiírtását és a hasfal kimetszését követően Hartmann szerinti megoldást alkalmaztunk. Ezt követően onkológiai kezelés során a beteg tumor markerei jelentősen javultak. Egy évvel később a bél folytonosságát helyreállítottuk, recidívát nem találtunk. 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.

Szekvenálás során a hMSH2 6. exon eddig a nemzetközi adatbázisokban nem szereplő két nukleotidot érintő kis delécióját találtuk (delTC c. 969-970). További 6 családtag célzott vizsgálatát végeztük el, melyek közül 4 személyben megtaláltuk az eltérést. A mutációt hordozó 5 személyből 4 vastagbél daganatban szenvedett.

A család egyértelműen teljesíti az Amszterdam kritériumokat, „standard” HNPCC-s családnak tekinthető. 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 család jó együttműködésének következtében további daganat előfordulását mind a mai napig nem tapasztaltunk.

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

10. család:

59 éves férfi a szigmabél szűkítő daganata miatt bal oldali hemikolektómián esett át intézetünkben. A családban elsőfokú rokonok között 2 vastagbél (62, 46 évesen), egy emlő (35 évesen), egy cervix (31 évesen), egy vastagbél tubulovillózus adenóma (29 évesen), egy gyomor (37 évesen) és egy tüdő daganat (késői életkorban) szerepel.

Szekvenálás során a hMSH2 9. exon Glu→Asp cserével járó misszensz mutációját találtuk (c.1392 A>T).

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 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. A Glu→Asp. cserével járó misszensz mutáció a hMSH2 gén hMSH3/hMSH6-al képzett „interaction domain”-ját érinti, mely a gén egy konzervatív régiója. A család egy

„Standard” HNPPC-s családnak tekinthető. Sajnos szociális problémák és a földrajzi távolság miatt az összes mutáció hordozó nem vonható gondozás alá.

Populációs szűrés eredményeinek megbeszélése

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 HNPPC 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 HNPPC gyanús családok százalékos aránya is jelentősen megnőtt. A HNPPC 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 eredményei a HNPPC régiókban történő előfordulásának valós értékeitől jelentősen alacsonyabb eredményt mutatott. A második időszak eredményei már reprezentálhatják a HNPPC előfordulásának valós arányát, azonban a vizsgált betegeink száma (345) alapján úgy érezzük, hogy tényleges adatok felállításához még további populációs szintű szűrésre van szükség.

Vizsgálataink során 10 patogén mutáció-t hordozó személyt sikerült igazolnunk, 809 vastagbél tumorban szenvedő beteg között, mely 1,2%-os előfordulási rátát jelent. Összehasonlítva a nemzetközi irodalmi adatokkal, ahol 3-5%-os előfordulási arányt közölnek,

úgy véljük, hogy a mi 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 tudtunk 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.

A teljes vizsgálati időszak adatait tekintve 19 beteg esetében végeztünk szekvenálást, ahol az Amszterdam pozitív 9 beteg közül 7 esetében, azaz 77%-ban tudtunk mutációt igazolni! 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.

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.

Összefoglalás, új megállapítások

1. Vizsgálataink során reprezentatív mintának csak a 2. vizsgálati időszakot tekinthetjük. Intézetünkben Kelet Magyarország jelentős részéről fordulnak meg betegek, ezért az itt vizsgált populáció a kelet-magyarországi régió jellegzetes betegpopulációjának tekinthető. Ebben az időszakban betegeink 6%-a teljesítette a módosított Amszterdam Kritériumokat és további 10,4%-a HNPCC gyanúnak minősült. Ezekből az adatokból jól érezhető, hogy a magyarországi vastagbél tumoros populációban igen nagy számban fordulnak elő hereditér jelleget mutató esetek, melyek szűrése és gondozása egyáltalán nincs megoldva. Eddig ilyen jellegű magyarországi adat nem volt ismert, így eredményünk birtokában megállapíthatjuk, hogy ezeknek a betegeknek a szűrése és gondozásba vétele preventív onkológiai tevékenységnek tekinthető, melyre nagy szükség van régiókban is.

2. 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%-a nem kerül felismerésre. Ezért a két kritérium rendszer elemeinek együttes alkalmazása szükséges ahhoz, hogy lehetőleg minden HNPCC-re gyanús család felismerése megtörténjen.

3. A kritérium rendszerek együttes alkalmazásával a HNPCC gyanús betegek száma bővül. 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, majd friss tumorszövet minta 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. A beteg halála esetén az első észlelésnél lefagyasztott mintákból a vizsgálati sor befejezhető. Így van lehetőség a családtagok szűrésére és gondozásba vételére is.

4. Munkánk során 10 patogén mutációt és számos eddig ismert és nem ismert polimorfizmust találtunk. Egyeztetve a nemzetközi adatbázisokkal, 8 mutációt munkacsoportunk közölt elsőként. Nem tapasztaltunk betegeink között ismételt előforduló mutációkat, tehát olyan mutációt, amely a vizsgált populációra jellemző volna. Ezek a genetikai eltérések az érintett MMR gének különböző exonjain elszórva helyezkednek el. Úgy véljük, hogy nincs az MMR géneknek olyan prédilekciós helye, ahol a mutációk gyakrabban fordulnának elő. Munkánk folytatásával, a vizsgált betegpopuláció növelésével 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 adenomatózis 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, a családtagok szűrését követően azok gondozásba vételére az újonnan kialakuló daganatok megelőzése céljából.

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

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 Medicinae* 2007. 17 (2): 144-148.

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