

Molekuláris epidemiológiai biomarkerek a preventív és a prediktív medicinában, különös tekintettel a daganatkemoprevencióra

Fehér Katalin¹, Prantner Ida², Kiss István², Varjas Tímea², Gyöngyi Zoltán², Perjési Pál³, Németh Katalin², Nowrasteh Ghodratollah², Dombi Zsuzsanna², Ember István²

¹ÁNTSZ Nyugat-dunántúli Regionális Intézete, Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, ²Orvosi Népegészségtani Intézet, ³Gyógyszerészi Kémiai Intézet

Molecular epidemiologic biomarkers; a new concept in preventive and predictive medicine, chemoprevention of cancers

A change of paradigm occurred in the field of cancer research due to the rapid development of molecular biology and genetics. The application of molecular methodologies can be efficient in primary prevention of cancers. Before the morphological appearance of cancer certain biological-genetic alteration can be detected, which can be recognized as early biomarkers and can be used for the identification of high-risk of cancer. We demonstrate a model which measures early biomarkers on the level of genes. The „short-term” test system indicates the early and potential biological effects of dangerous cancer inducing factors, on the other hand it provides the opportunity for quantitative risk value. It is able to measure the efficiency of applied chemoprophylaxis on the level of genes, so it is fit for testing the efficiency of the intervention and for the qualification of gene-level chemopreventive substances.

Keywords: molecular and predictive epidemiology, early biomarkers, primary prevention, chemoprevention of human cancer, „short-term” test system

Biomarkeri epidemiologice moleculare: un concept nou în medicina preventivă și predictivă, chemoprevenția cancerului

În ultimele decenii în cercetarea cancerului a avut loc o schimbare de paradigmă, ca urmare a dezvoltării rapide a biologiei moleculare și a geneticii. Aplicarea metodelor moleculare poate fi eficientă în prevenția primară a cancerului. Înaintea apariției morfologice a cancerului pot fi detectate unele alterări biologice și genetice, care pot fi identificate ca biomarkeri precoce și pot fi folosite pentru determinarea riscului crescut de cancer. În această lucrare prezentăm un model de măsurare a biomarkerilor precoce la nivelul genelor. Sistemul de testare „pe termen scurt” indică efectele precoce și cu potențial biologic a factorilor periculoase de inducere a cancerului, și oferă posibilitate pentru evaluarea cantitativă a riscului. Este posibilă măsurarea eficienței la nivelul genelor a chemoprophylaxiei aplicate, deci este potrivit pentru testarea eficienței intervenției și clasificarea calitativă a substanțelor chemopreflactice care acționează la nivelul genelor.

Cuvinte cheie: epidemiologie moleculară și preventivă, biomarkeri precoce, prevenție primară, chemoprevenția cancerului la om, sistem de testare „pe termen scurt”

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (3): 163-168

www.orvtudert.ro

A daganatkutatásban az elmúlt évtizedekben a forradalmian új felfedezések nyomán paradigmaváltás következett be. Ezek alapja az onko- és szupresszorgén kaszkád felfedezése, a sejtek közötti kommunikáció és információáramlás, az apoptózis megismerése volt, hogy csak néhányat emeljünk ki a legfontosabbakból. Ezek a molekuláris genetika és biológia robbanásszerű fejlődésének hozadékai voltak [18]. Mindezek ellenére mind a mai napig nem sikerült olyan daganatspecifikus molekuláris elváltozásokat, jelet, illetve jeleket felfedezni, amelyek kizárólag a daganatos betegségekre lennének jellemzőek. Nagyon sok olyan molekuláris genetikai-biológiai elváltozás került azonban felfedezésre és leírásra, amelyek arra utalnak, hogy a daganatos betegségek alapvetően olyan „genetikai betegségek”, melyeket nagyrészt környezeti tényezők indukálnak [8, 16]. Ez elsősorban az összes daganat több mint 90%-át kitevő sporadikus daganatokra igaz. Ezekben a daganatokban közel 90 %-os a környezet induktív szerepe és 80%-ban kémiai karcinogének oki szerepe mutatható ki [1].

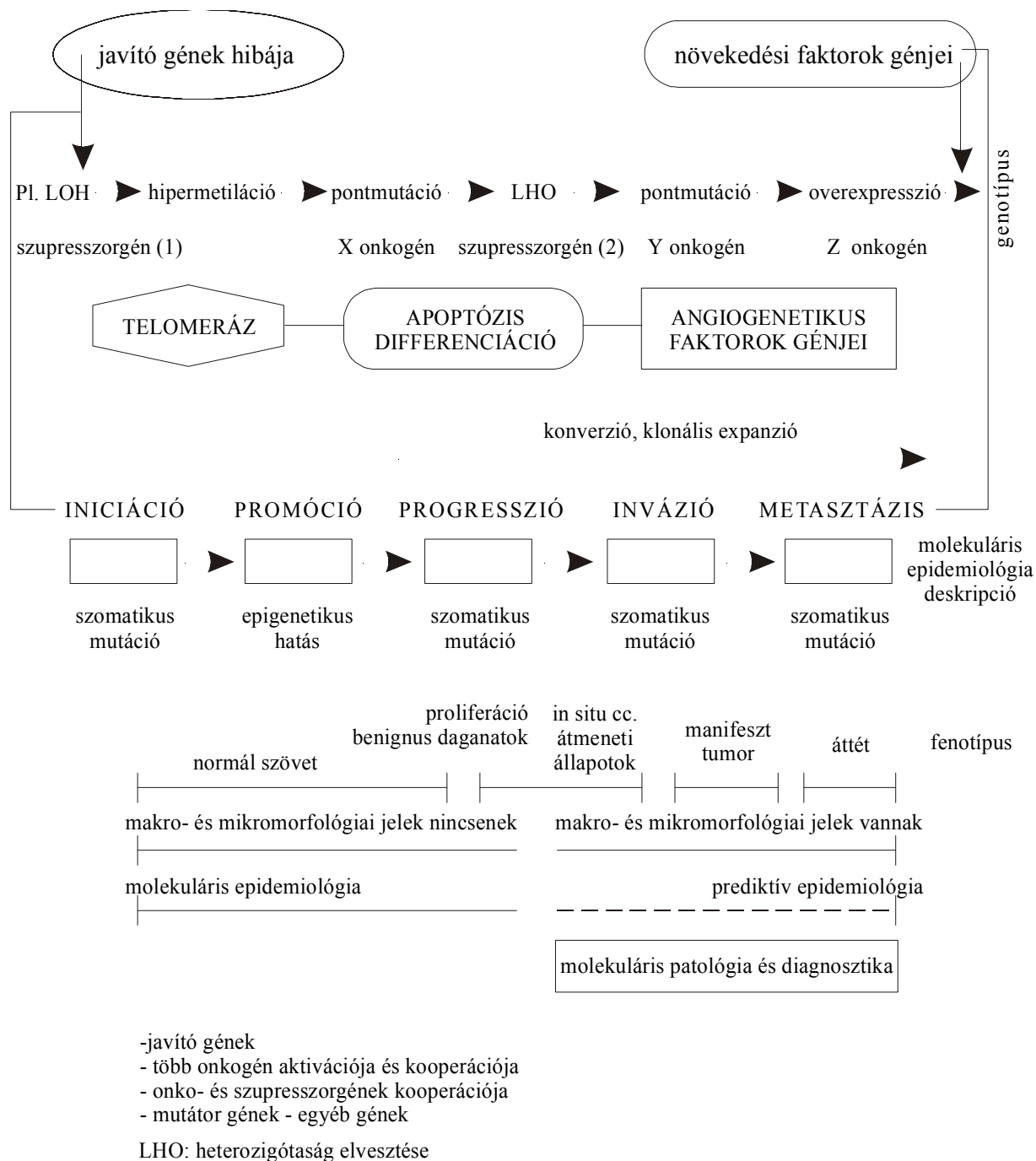
Ma már tudjuk, hogy az onko- illetve szupresszor gének – elsősorban környezeti-kémiai tényezők hatására történő – megváltozása daganatok kialakulásához vezethet, azonban ehhez bonyolult többkomponensű rendszerek, molekulák kaszkádszerű aktiválódása szükséges, gyakran individuálisan variálódva [13]. A daganatok keletkezéséhez vezető történéseket így csak általánosságban ismerjük [17].

Az onko- és szupresszorgének önmagukban igazi áttörést a korai diagnosztikában nem hoztak, már csak azért sem, mert ezeknek a géneknek amplifikációja, expressziója vagy más elváltozása leggyakrabban csak a fenotípusos megjelenést követően, rutin patológia vizsgálat kapcsán kerül

észlelésre, amikor már gyakran szétterjedt, irreverzibilis daganattal találkozunk [2]. Hatékonyak lehetnek viszont a tercier prevencióban, a daganatok relapszusának felismerésében, esetleges remissziójának követésében, az egyénre szabott terápia finomításában, valamint a molekuláris és prediktív klinikai epidemiológia területén való alkalmazásban [19]. Számos biztató jel ellenére kevésbé hatékony a tercier prevenció másik területén, a metasztázisok korai felismerésében. Öröklődő daganatok esetén természetesen más a helyzet, hiszen ott ezen gének expressziója matematikailag is értelmezhető a laboratóriumi leletek alapján (például a BRCA1 gén és az emlőrák kapcsolata, hogy csak az egyik legismertebbet említsük). A nem kielégítő terápiás, illetve prevenciók válaszok miatt azonban ma ezen módszerek alkalmazásának bioetikai korlátai is vannak (1. ábra).

A megelőzés szempontjából ideális az volna, ha a molekuláris szintű elváltozásokat a daganat keletkezésének korai, premorbid fázisaiban lehetne diagnosztikára alkalmazni. A molekuláris módszertan alkalmazása tehát – főleg az onko- és szupresszorgénekre vonatkozóan – a daganatok szekunder prevenciója mellett, illetve helyett igazán a primer prevencióban lenne hatékony. A 2. ábrán a prevenció különböző szintjeinek értelmezése szerepel a daganatkeletkezés korai stádiumainak megfelelően, valamint az ezen stádiumokban található molekuláris biológiai elváltozások tükrében [15].

A morfológiai-klinikai megjelenés előtt vannak olyan génelváltozások, melyek kritikus értékelése informatív lehet. Ezek a páciens vagy a különböző csoportok aktuális veszélyeztetettségi állapotáról, daganatrizikójáról adhatnak felvilágosítást, jóval a daganat megjelenése előtt. Tovább



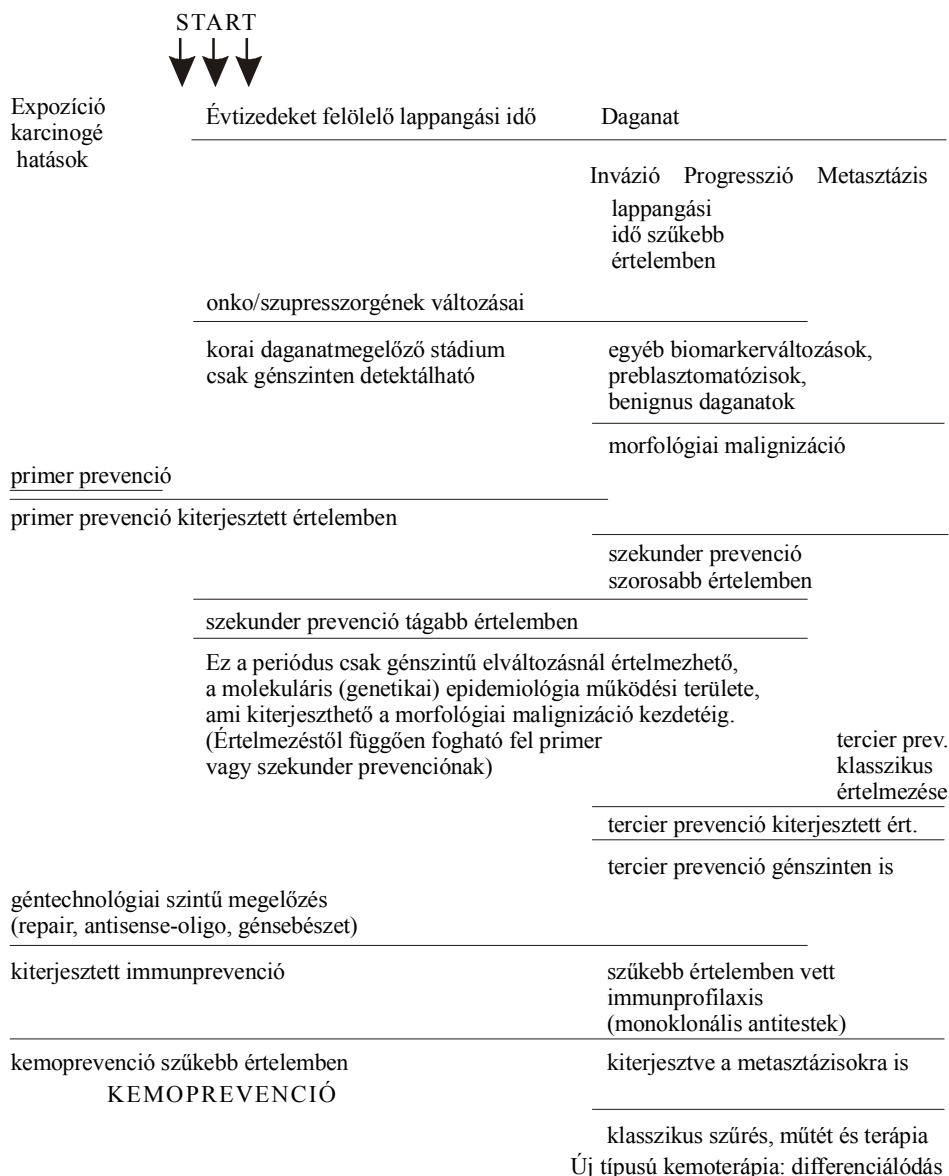
1. ábra. A daganatok kialakulásának szekvenciális-prediktív modellje

szélesítheti a biomarkerek körét az egyéni érzékenység markereinek vizsgálata, mint pl. a különböző karcinogéneket metabolizáló enzimek polimorfizmusai [15].

Mindezek együttes értelmezése – figyelembe véve az individuális ingadozásokat is – nagyszámú vizsgálat alapján alkalmas arra, hogy a gyakorlatban is alkalmazzuk az egyén vagy a veszélyeztetett csoportok azonosítására. Ezt követően a megfelelő prevenció alkalmazásával a daganatos morbiditás és így a mortalitás csökkenthető. A biomarkerek alkalmazása egyben a prevenció hatékonyságának kontrollját is jelentik.

Kemoprofilaxis

Azokat a szintetikus vagy természetes – többnyire növényi vagy ritkábban állati eredetű – anyagokat, melyek hatásukat a daganatok morfológiai detektálhatósága előtt fejtik ki kémiai, fizikai, esetleg biológiai tulajdonságaiknál fogva, összefoglaló néven kemopreventívumoknak nevezzük; alkalmazásukat pedig kemoprofilaxisnak (a himlő és más fertőző betegségek sikeres megelőzésének analógiájára). Hatásmechanizmusuk sokféle: a kémiai kötés gátlásától a



2. ábra. A prevenció szintek változása a molekuláris biológia alkalmazásával

biotranszformáció modulálásán át, a szomatikus mutáció, a repair rendszerek megváltoztatásáig több lépésre gátlólag hathatnak (anti-iniciátorok, antioxidánsok, antipromoterek stb.). Hatásuk megítélésére és mérésére általában hosszú idejű és drága „long term állatkísérleteket” vagy humán epidemiológiai vizsgálatokat alkalmaznak [12].

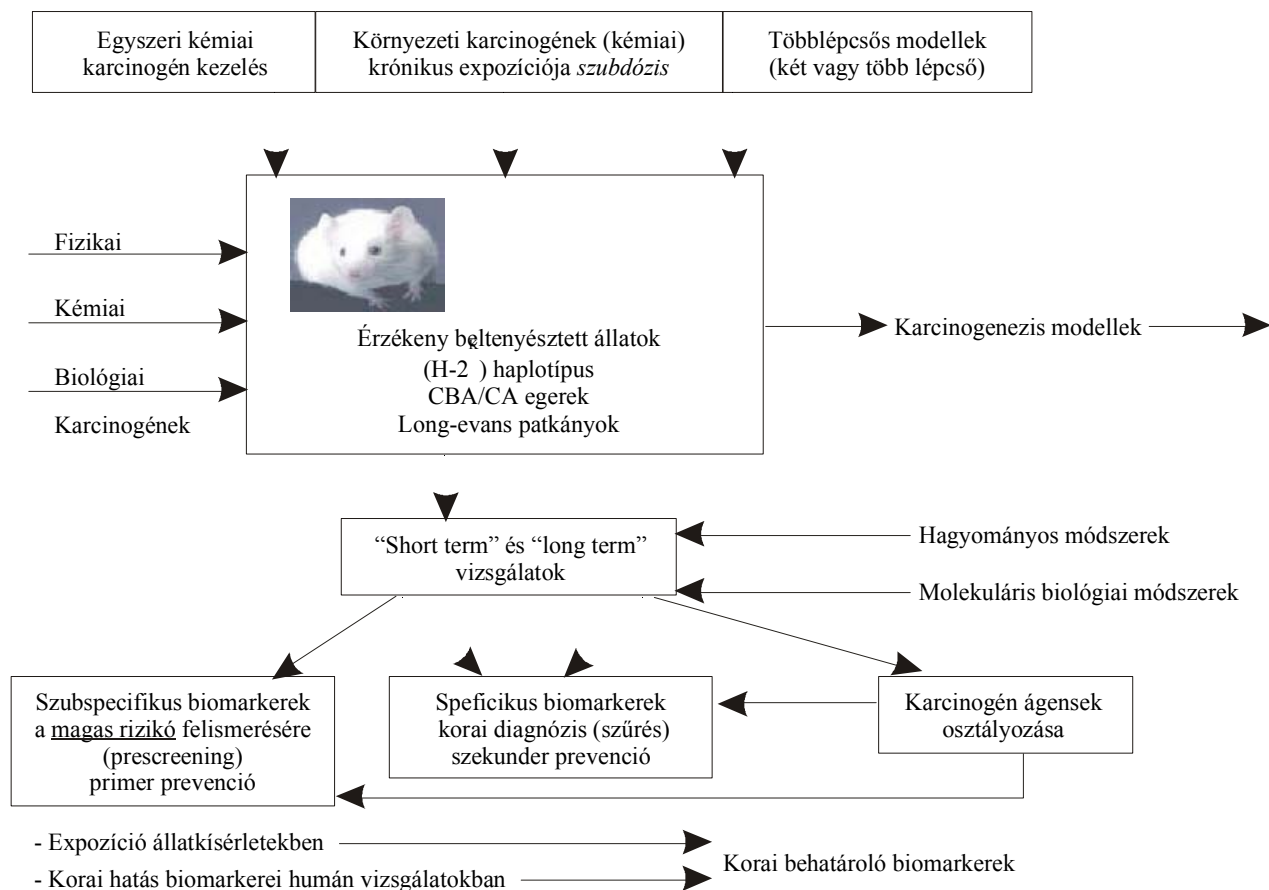
Tesztrendszer

Az alábbiakban egy olyan állatmodellt mutatunk be, amely eleget tesz a biomarkerek kritériumainak, a kémiai karcinogén expozíció és a korai biológiai hatás kimutatása mellett kielégíti az 1. táblázatban részletezett feltételeket is [2].

Állatmodellünk korai biomarkereket mér, de egyben kemopreventívumok tesztelésére is alkalmas. Tesztrendszerünk

„short term” tesztrendszer, amelyben RNS szintű génexpressziókat mérünk. Állatmodelljeinkben sikerült bizonyítani a korai, karcinogén hatásra létrejövő genetikai változások (génamplifikáció, génexpresszió és mutáció) és a később kialakuló tumorok közötti összefüggéseket [2]. Lényege egy olyan érzékeny egértörzs alkalmazása (3. ábra), amelyik különösen szenzitív kémiai karcinogén anyagokra (CbA/Ca/H-2K), s azokra egyes kulcs onko- (Ha-ras és c-myc), illetve szupresszorgének (p53) overexpressziójával válaszol. A válasz már igen korán, az expozíciót követően 24-72 órán belül jelentkezik.

Így előrejelzi azt a karcinogén hatást, amely csak „long term” kísérletben jelentkezne [5, 6, 7, 9, 11, 21, 22]. Ugyanakkor az alkalmazott kemoprofilaxis hatékonyságát is képes génszinten mérni. Alkalmas a kemopreventívumok potenciális, génszintű minősítésére is, különös tekintettel a kemopreventív anyagok hatására és a daganat-kialakulás



3. ábra. A „short term” tesztrendszer bemutatása

rizikójának csökkentésére [14, 20].

A kemopreventívumot a karcinogén dimetil-benzantracén (DMBA) expozíciót 24 órával megelőzően vagy az expozícióval együtt vagy az expozíciót követően 24 óra múlva adagoljuk. A második karcinogén expozíció után 24, 48 és 72 órával az állatokból eltávolítjuk a tümest, a lépet, a nyirokcsomókat, a csontvelőt, a májat, a vesét, a tüdőt, majd ezekből, valamint a perifériás fehérvérsejtekből RNS-t nyerünk. Három kulcsgén: a H-ras, a c-myc és a p53 gén expresszióját vizsgáljuk [8]. A H-ras a kémiai karcinogenezisben kulcsszerepet játszik a szignáltranszferben, a p53 az apoptózisban és a sejt DNS-ét érintő károsodások utáni helyreállításban, továbbá szuppresszorgén szerepe is van, valamint a sejtciklusban is fontos, a c-myc pedig a proliferációhoz és immortalizációhoz elengedhetetlen. Ezekkel a génekkel három különböző ponton tudjuk monitorozni a karcinogenezis korai történéseit. Mind a három gén szintjén sikerült vizsgálni azokat a korai változásokat, amelyek az expozíciót és a biológiai hatást jelzik [3].

Kísérleteinkben potenciális kemopreventív anyagokkal való egyidejű, elő- illetve utókezelés hatását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az egyidejű, illetve a karcinogén anyaggal történt kezelés előtti adagolás, azaz a definitív kemoprevenzió esetében szignifikáns csökkenés mérhető a DMBA-val indukált, pozitív kontrollként alkalmazott

onkogén overexpressziók mértékében.

Alkalmazási lehetőség

A tesztrendszerben vizsgálhatjuk egyrészt, hogy a kemopreventívumoknak génszinten van-e hatásuk, másrészt megtudhatjuk, hogy melyik fázisban avatkoznak be, s egyben a karcinogenezis is monitorozható.

A tesztrendszer (markerrendszer) alkalmas a különböző gyanúsított kémiai karcinogén anyagok vizsgálatára akár minősítő tesztrendszerként is (primer prevenció), de az expozíció és annak következményeként létrejött korai biológiai hatások monitorozására is [4].

Harmadrészt alkalmas predikcióra, hiszen az érintett gének sorsát is előre jelezheti, részben az expresszió, részben az amplifikáció vizsgálatával, Kaplan–Meier-féle túlélési görbék analizálásával. Lehetőséget adhat a kemoterápia egyéni tervezésére, a protokollok és a génszintű kemoprevenzió hatékonyságának lemérésére, a betegség stádiumainak, esetleg a metasztázisok követésére. Hangsúlyozandó, hogy egyik legnagyobb jelentősége az állatkísérletes modellrendszernek nem a kemoterapeutikumok, hanem a kemopreventívumok tesztelése. Kemoterapeutikumok tesztelésére nem is vál-

1. táblázat. RNS-onko/szupresszor génexpresszió (H-ras, p53, c-myc) vizsgálat mint a kémiai karcinogenezis korai biomarkerei

Jellemzők	Állatkísérletek	Humán vizsgálatok	Megjegyzések
Prediktív érték	+	+	Statisztikai epidemiológiai analízis szükséges
Prognosztikus érték	± ?	±	
Expozíciós marker	+	+ ?	(Az expozíció kezdete nem pontos?)
Korai hatás markere	+	+	Elsődleges prevenció (expozíció elkerülése)
A primer prevenció eszközei	-	+	
Korai behatároló biomarker populációs szinten			Elsődleges prevenció
egyéni szinten	?	?	<ul style="list-style-type: none"> • kiemelés az expozícióból • higiénikus határérték • egyéni- és populációs szintű védekezés, rizikóbecslés
Karcinogenezis minősítése rövidtávú vizsgálatokban	+	-	
Veszélyeztetett, magas rizikójú populáció felismerése	-	+	
enzim/gén polimorfizmusok	-	±	
			KEMOPREVENCIÓN
Rizikóbecslés			Epidemiológiai módszerek
Génszintű expozíció monitorizálása	+	+	Intervenció monitorizálás
Az intervenció monitorizálása „rövid távú” kísérletekben	+	+	
A kemoprevenció monitorizálása „rövid távú” kísérletekben	+	+	Olcsó, gyors
A veszélyeztetett, magas rizikójú populáció monitorizálása „rövid távú” kísérletekben	+	+	
A specificitás és validitás fejlesztése	+	+	
A szűrés alapja szekunder prevenció	-	+ ?	
Megelőző szűrés számítógéppel	-	+	
A génexpressziós státusz monitorizálása	+	+	
Önállóan	-	-	
Együttesen	+	+	

lalkozhat a rendszer, hiszen messze a daganat fenotípusos megjelenése előtti stádiumokat vizsgálja. A tesztrendszer előre jelezheti a „long-term”, illetve a más rendszerben definitíve bizonyított kemopreventív hatást.

Kutatási elképzeléseink eredendően szekunder prevenció célzattal, a korai diagnosztikából indultak ki, és a szűrés irányában gondolkodtunk. Az állatkísérletek kidolgozásánál azonban rá kellett jönnünk arra, hogy a mai molekuláris-biológiai adottságok mellett, miután nem ismerünk daganatspecifikus génelváltozásokat, a veszélyeztetett és

exponált egyének „behatárolására” kell törekedni, korai biológiai markerek alkalmazásával; kvantifikálni a rizikóbecslést és megadni annak molekuláris-prediktív jellegét, ami a primer prevenció területén is alkalmazható. Ezzel a szekunder prevenció irányából a primer prevenció irányába tértünk át, felismerve az etikai és technikai korlátokat, egyben az elsők között alkalmazva az új molekuláris epidemiológiai megközelítést (génszinten) a primer prevencióban. Tény az is, hogy a kuratív medicina nem adott megfelelő választ a molekuláris módszertan fejlődésére a gyógyszerek

fejlesztése, illetve a terápiás beavatkozások hatékonysága terén, azaz nem érte el azt a fejlettséget, amelyet a molekuláris diagnosztika és epidemiológia megtett (korai kiemelés); ez utóbbi éppen a daganatok esetében és éppen a fentiek miatt meg is torpant.

Emiatt a korai stádiumból kiemelt daganatos vagy daganatmegelőző stádiumra gyakran nincs adekvát terápiás válasz „csak” prevenció és az is gyakran „csak” populációs szinten (egyéni szinten jelenleg ez nem eléggé hatékony), emiatt a genetikai alapú (szomatikus) diagnosztikának (és szűrésnek) etikai korlátai vannak.

Nagyszámú statisztikai vizsgálat szükséges pontosan az onko- és szupresszorgének individuális variabilitása miatt ahhoz, hogy ez populációs szinten alkalmazható legyen. Ugyanakkor nem felejtjük el, hogy az egyéni szintű gén-(allél) polimorfizmusok (enzimpolimorfizmusok) alkalmazásával a rizikóbecslés egyre jobban egyénre szabható.

A prevenció, a kemoprevenció filozófiájával egybecsengő tesztrendszer elsősorban abban a „néma”, korai periódusban szolgáltat jelet a kémiai karcinogenezis történéseire nézve, amikor még morfológiai, biokémiai (fenotípusos) jelek nincsenek, tehát ilyen szinten a kemopreventívumokat sem tudnánk tesztelni.

A korai karcinogenezis stádiumainak genotípus szintű vizsgálata lehetőséget adhat a kemoprevenció fejlesztéséhez, így az intervenció és prevenció stratégiák kialakításához, a nagy, közel 30-35%-os hatékonyságú primer prevenció alkalmazásához, amely – ismerve a jelenlegi prevenció és gyógyszerfejlesztési, operációs és radiológiai technikákat – beláthatatlan távlatokkal kecsegtet, hisz nemcsak a mortalitás, hanem a morbiditás csökkentésében is jelentős szerepe van; a primer prevenciónak pontosan ez a lényege.

Összefoglalva: a fenti állatmodell kidolgozásával egy olyan rendszer került kezünkbe, amely egyrészt jelezheti a veszélyeztetettséget, ugyanakkor tesztrendszerként is szolgálhat, elsősorban preventív jellegű szerek kipróbálásához, mint molekuláris epidemiológiai és prediktív biomarkerrendszer. A továbblépést a humán kiterjesztés jelenti.

Alkalmas egyrészt jelezni az expozíciót és a korai biológiai hatást a vizsgált kémiai, fizikai, biológiai karcinogének hatására, másrészt kvantitatív kockázatbecslésre ad lehetőséget humán populációban is a daganatkeletkezésre nézve. Miután ezt számos kemopreventívummal, illetve potenciális kemopreventívummal is vizsgáltuk, megállapítottuk, hogy egybevetve más kemopreventívumokra vonatkozó adatokkal a rendszer alkalmas a potenciális kemopreventívumok hatásainak előzetes tesztelésére, eltérő hatásmechanizmus esetén is [14, 20].

Irodalom

1. Doll R., Petto R. – *The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today*, J Natl Cancer Inst, 1981, 66(6):1191-308.
2. Ember I. – *Onko-és szupresszorgének expresszió vizsgálata in vivo állatmodellekben és humán populációban, preventív stratégia (molekuláris epidemiológia) kialakítása céljából*, Akadémiai Disszertáció, Pécs, 1997.
3. Ember I., Kiss I., Gombkötő Gy. et al. – *Onco and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure*, Cancer Detection and Prevention, 1998, 22:241-245.
4. Ember I., Kiss I., Málóvics I. – *Oncogene and tumor suppressor gene expression changes in persons exposed to ethylene oxide*, European Journal of Cancer Prevention, 1998, 7:167-168.
5. Ember I., Kiss I., Pusztai Zs. – *Effect of 7,15-Dimethylbenzanthracene in onco/suppressor genes action in vivo: a „short term” experiment*, Anticancer Research, 1998, 18:445-448.
6. Ember I., Kiss I., Raposa T. – *In vivo effects of COPP protocol on onco- and suppressor gene expression in a „follow up study”*, In vivo, 1997, 11:399-402.
7. Ember I., Kiss I., Raposa T. – *The usefulness of in vivo gene expression investigation from peripheral white blood cells: A preliminary study*, European Journal Cancer Prev, 1999, 84: 331-334.
8. Ember I., Kiss I., Sándor J. – *A daganatok epidemiológiája és prevenciója*, Dialóg Campus Kiadó, 2000.
9. Ember I., Kiss I., Vermes E. – *Early Effects of Cyclophosphamide on Oncogene Expression*, In vivo, 1998, 12:201-208.
10. Ember I., Nowrasteh G., Kiss I. – *Different H-2 complexes given altered susceptibility for chemical carcinogen induced oncogene expression*, Anticancer Research, 1999, 19:1181-1186.
11. Ember I., Pusztai Zs., Gyöngyi Z. et al. – *Nitropryrene induces elevated expression of oncogenes and tumor suppressor genes 24 hours after treatment in CBA/Ca mice*, Anticancer Research, 2000, 20:1563-1566.
12. Ember I., Rády P. – *A daganatok kemoprevenciójáról*, Magyar Onkológia, 1993, XXXVII/1.: 64-80.
13. Fearon E. R., Vogelstein B. – *A genetic model of colorectal tumorigenesis*, Cell, 1991, 61: 759-767.
14. Gyöngyi Z. – *Az in vivo onko/szupresszorgén expresszió és karcinogén expozíció lehetséges összefüggései*, Orvosképzés, 1999, 5-6: 192-207.
15. Kiss I., Ember I. – *Molekuláris epidemiológia*, Egészségtudomány, 1996, 40:286-294.
16. Kiss I., Ember I. – *Molekuláris epidemiológia*, Medicom-Glaxo, Budapest, 1997.
17. Kopper L. – *Génexpressziós profil a szolid tumorok diagnosztikájában és prognosztikájában*, M Onkol, 2002, 46(1):3-9.
18. Kopper L., Marcsek Z., Kovalszky I. – *Molekuláris medicina*, Medicina, Budapest, 1997.
19. Mc Michael – *New pathway is New Travelling Companion?*, Am J Epidemiol, 1994, 140:1 11.
20. Perjési P., Gyöngyi Z., Bayer Zs. – *Effect of E-2-(methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo II: a 48-hour experiment*, Anticancer Res, 2000, (3):1839-48.
21. Perjési P., Pintér Z., Gyöngyi Z. et al. – *Effect of rancid corn oil on some onco/suppressor gene expression in vivo. A short term study*, Anticancer Res, 2002, 22:225-230.
22. Tőkés A., Füzesi M., Ember I. – *A retinoidok onkogenetikai hatásai*, Lege Artis Medicinae, 1996, 6(9-10):508-515.