

A kalcium metabolizmus jelentősége a csontritkulás és a colorectalis daganat pathogenezisében

Doktori tézisek

Dr. Bácsi Krisztián

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Vezető: Dr. Szőke Éva egyetemi tanár, a biológiai tudomány doktora



Témavezetők: Dr. Lakatos Péter egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Speer Gábor egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Cseh Károly egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Tóth Miklós egyetemi adjunktus, Ph.D.

Bíráló bizottság elnöke: Dr. Sréter Lídia egyetemi tanár, az MTA doktora
Bíráló bizottság tagjai: Dr. Poór Gyula egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Kovács Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Budapest, 2008

BEVEZETÉS

Az átlagos kalcium bevitel a magyar felnőtt lakosságban 400-600 mg, mely jelentősen alacsonyabb a javasolt 1200-1500 mg mennyiségnél. A megfelelő kalcium bevitt epidemiológiai vizsgálatok kedvezőnek találták - egyebek mellett - a csontritkulás (OP) és a colorectalis daganatok (CRC) megelőzésében.

A kalciumnak az OP prevenciójában döntően a menopauza utáni hatodik évtől kezdődően van jelentősége, amikor az ösztrogénhiány hatásai kevésbé érvényesülnek. Idősebb populációban a kalcium szupplementáció (400-650 mg/nap, két év alatt) csökkenti a korral járó csontvesztés mértékét. D-vitaminnal kombinálva az éves csontvesztést (0.54 % a csípőn és 1.19 % a gerincen) és a csonttörési rizikót (12 %) is mérsékli 1-7 év alatt. Kedvezőbb hatású az 1200 mg kalcium és a 800 nemzetközi egység D-vitamin szupplementáció a korábban alkalmazott kisebb dózisokhoz képest. A csont ásványanyag sűrűség (BMD) éves csökkenése a késői menopauzában a gerincen 1.1 %, a teljes csípőn 0.5 %. Az alacsonyabb kalcium bevitel nemcsak kevesebb kalciumot jelent a csont mineralizációs folyamataihoz, de a következményes szekunder hyperparathyroidismuson keresztül fokozza a csontbontó osteoclastok érését, proliferációját és aktivitását. Magyarországon becslések szerint 900 000 ember (600 000 nő, 300 000 férfi) szenved OP-ban. Az osteoporotikus törések száma évente 30-40 000 a lumbális gerincen, 25-28 000 a csuklón, 15 000 a csípőn és 8-10 000 a proximális humeruson.

A colorectalis daganatok kialakulásában a környezeti faktoroknak kiemelten fontos szerepet tulajdonítanak. A kalcium bevitel (1200 mg, négy év alatt) 25 %-kal csökkenti a polipok kiújulásának gyakoriságát heterogén populációban (átlag életkor 61 év), melyet a CRC kiinduló fázisának tekintenek, és 30-36 %-kal mérsékli (1000 mg, hét év alatt) a colorectalis daganatok előfordulását. A tejtermékek fogyasztása, mint legfőbb kalciumforrás a kaukázusi rasszban, férfiakban (átlag életkor = 60 év) 54 %-os rizikócsökkenést eredményez hat év alatt! Az intraluminális kalcium csökkenti a colorectalis carcinogenezist oldhatatlan komplexet képezve a szekunder epesavakkal és zsírsavakkal. A szekunder epesavak és zsírsavak citotoxikus hatásuk révén karcinogének a bélhámsejtekre. Továbbá az epesavak serkentik a proliferációt a 12-hidroxiiekozatetraénsav termelődés és a protein kináz C stimuláció útján, és apoptózis rezisztenciát indukálnak. A kalcium-szappanok képződésével a fenti mechanizmusokon keresztül csökken az epesavak és zsírsavak karcinogén hatása. Magyarországon a CRC a második a daganatok halálozási listájában. Incidenciája 87 eset (100 000 főre), mely jelentősen meghaladja az USA-ban (a kaukázusi rasszra vonatkoztatva) mért 45-63 eset (100 000 főre) értéket. Hangsúlyozza jelentőségét az alacsony, 40 %-os ötéves túlélés!

A dehydroepiandrosteron szulfát (DHEAS) és a dehydroepiandrosteron (DHEA) androgén és ösztrogén hormonok előanyagaként szintén kapcsolódik a csontvesztéshez és a colorectalis daganatképződéshez. A DHEA, DHEAS átalakulást a szulfotranszferáz enzim katalizálja, a DHEA 99 %-ban DHEAS-ként található meg a keringésben. A DHEA(S) szérum szintje a kor előrehaladtával fokozatosan csökken. DHEA pótlás 2 %-os teljes csípő BMD növekedést eredményez 12 hónap alatt posztmenopauzás nőkben, hatását az interleukin-6 (az egyik legfontosabb osteoclast stimuláló faktor), és az inzulinszerű növekedési faktor-1 (anabolikus csonthatású hormon) közvetíti. Ugyanakkor, mint előanyag, az ösztrogéneken keresztül is befolyásolja a csontvesztést: a DHEAS és az ösztrogén koncentráció szignifikánsan korrelál a BMD-vel. Ösztrogén pótlás három év alatt 4.6 % gerinc és 3 % teljes csípő denzitás növekedést eredményez posztmenopauzás nőkben. Az androgének szerepe a csontvesztésben kisebb, androgén inszenzivitásban szenvedő betegeknek nincs csontritkulása.

A DHEAS koncentráció nem különbözik a CRC-s beteg és kontroll csoportban, ugyanakkor a DHEA kezelés humán adenocarcinoma sejtvonalon növekedés-, és proliferáció gátlást eredményez. Továbbá egérben csökkenti az 1,2-dimetilhydrazine indukálta colon- és analis tumorok kialakulását. Posztmenopauzás nőkben a DHEA(S) a legjelentősebb ösztrogén forrás. Jól ismert az ösztrogének kedvező hatása a colorectalis daganatok prevenciójában, posztmenopauzális nőkben 19-46 %-al csökkenti a daganat előfordulását 1-11 év alatt. Humán adenocarcinoma sejtvonalon az 5-dihidrotesztoszteron kezelés mérsékli a proliferációt.

Kutatásunkban feltételeztük a kalcium anyagcserét befolyásoló LCT 13910 C/T, CaSR A986S és CYP3A7*1C polimorfizmusok hatását az OP és a CRC pathogenezisében. Az LCT gén 13910 CC genotípusa csökkenti a laktóz bontásáért felelős intraluminális laktáz phlorizin hidroláz termelődését, laktóz intoleranciához illetve alacsonyabb tejfogyasztáshoz vezetve. A tej az egyik legfontosabb kalcium forrás a kaukázusi rasszban. Az emésztetlen laktóz csökkenti a kalcium felszívódását. A kalcium szenzor receptor (CaSR) membránreceptorként közvetíti az extracelluláris kalcium hatását. 986 SS genetikai változata esetén a parathormon a normál tartományon belüli magasabb szinten mérhető. Osteoblastokon a magasabb extracelluláris kalcium CaSR fehérjén keresztül növeli az alkalikus foszfatáz aktivitást (ALP) és a mineralizációt. Továbbá a CaSR szabályozza a vastagbélhám proliferációját, differenciációját és apoptózisát. Feltételeztük a polimorfizmus jelentőségét ezekben a hatásokban. A CYP3A7 enzim felelős a DHEAS, az androgén és ösztrogén hormonok metabolizációjáért a fetalis korban, a CYP3A7*1C allél esetén az enzim a későbbi életkorban is magasabb szinten expresszálódik fokozva a DHEAS eliminációját, csökkentve a szérum DHEAS szintet.

A kalcium pótlás csonthatásait MC3T3-E1 osteoblastokon vizsgáltuk. Ismert, hogy a kalcium a CaSR és a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) szupercsaládba tartozó mothers against DPP homolog-3 (SMAD-3) jelátvitelen keresztül fokozza az osteoblastok ALP aktivitását, mely a csontformáció markere. Feltételeztük, hogy a kalcium befolyásolja az ALP aktivitás mellett a proliferációt, extracelluláris strukturális proteinek (I típusú prokollagén alfa 1 (COL1A1), II típusú prokollagén alfa 1 (COL2A1), decorin (DCN), bone sialoprotein (BSP), fibronectin-1 (FN-1)) és más, a kalcium anyagcserében jelentős proteinek (CaSR, bone gamma carboxyglutamate protein (osteocalcin) (BGLAP)) expresszióját. Vizsgáltuk továbbá a kalcium a TGF- β útvonal további tagjaival (bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), SMAD-3, mothers against DPP homolog-6 (SMAD-6)) való kapcsolatát is.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az LCT 13910 C/T, a CaSR A986S és a CYP3A7*1C polimorfizmusok hatásának vizsgálata a csontdenzitásra, csonttörésre
2. Az LCT 13910 C/T, a CaSR A986S és a CYP3A7*1C polimorfizmusok hatásának vizsgálata a colorectalis daganatok incidenciájára, progressziójára
3. A szérum kalcium és DHEAS szintek jelentőségének vizsgálata csonttritkulásban és colorectalis carcinogenesisben
4. A kalcium hatásának vizsgálata MC3T3-E1 osteoblast sejtek proliferációjára, ALP aktivitásra és protein expressziójára (COL1A1, COL2A1, DCN, BSP, FN-1, BMP-4, SMAD-3, SMAD-6, CaSR, BGLAP)

MÓDSZEREK

Résztvevők 1 - OP study

Az LCT és a CaSR gének hatását 595 posztmenopauzális nőben vizsgáltuk: 267 csonttrikulázós és 200 osteopenias (mindkét csoportban az átlag életkor = 62 ± 10 év), és 128 egészséges résztvevőben (átlag életkor = 56 ± 10 év). A tejfogyasztás, testtömegindex (BMI), magasság, testtömeg, menopauzális kor, dohányzás, alkohol- és kávéfogyasztás, szteroidhasználat, korábbi csonttörés, laboratóriumi paraméterek (szérum kalcium, foszfor, 25-OH-vitamin D₃, béta-crosslaps és alkalikus foszfatáz aktivitás), mint lehetséges befolyásoló faktorok kerültek rögzítésre. A CYP gén jelentőségét 319 posztmenopauzális nőben vizsgáltuk: 217 csonttrikulázós (átlag életkor = 68 ± 6 év) és 102 kontroll résztvevőben (átlag életkor = 55 ± 8 év). A testtömegindex, magasság, testtömeg, menopauzális kor, dohányzás, alkoholfogyasztás, szteroidhasználat, korábbi csonttörés, laboratóriumi paraméterek (szérum DHEAS, kalcium, foszfor, 25-OH-vitamin D₃ és alkalikus foszfatáz aktivitás), mint lehetséges befolyásoló faktorok kerültek rögzítésre.

Résztvevők 2 - CRC study

Az LCT, CaSR és a CYP3A7 gének hatását 278 CRC-s beteg (130 nő, 148 férfi) és 260 kontroll, összesen 538 résztvevőn vizsgáltuk. Az átlag életkor a diagnózis megállapításakor 61 ± 11 év volt. A tumor lokalizáció, nem, tumor-nyirokcsomó-metasztázis rendszer (TNM) és AJCC (American Joint Committee on Cancer) stádiumok, a daganat lokális és/vagy távoli kiújulása, a halál időpontja, laboratóriumi paraméterek (alpha-fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigén (CEA), carbohydrate antigén 19-9 (CA19-9) és szérum kalcium koncentráció) kerültek rögzítésre. Az átlagos követési idő 17 hónap (range 1-20 hónap) volt. A kontroll csoport véradókból állt, klinikai adatok nem álltak rendelkezésünkre.

LCT 13910 C/T, CaSR A986S és CYP3A7*1C polimorfizmusok genotípezálása

DNS-t izoláltunk EDTA-s vérből rutin módszerrel (Magesil KF Genomic System, Promega, Madison, WI). Az LCT 13910 C/T (rs4988235) és CaSR A986S G/T (rs1801725) gének polimorfizmusait Taqman RT-PCR módszerrel (Applied Biosystems, Foster City, CA) vizsgáltuk. A CYP3A7*1C T167G (rs11568825) polimorfizmus genotípezálását restriktív fragmentumhossz polimorfizmus (RFLP) technikával határoztuk meg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Sigma-Genosys, Woodlands, Texas; Promega, Madison, WI, USA). Az eredményeket Tris-Acétát-EDTA agaróz gélelektroforézis és Fluorchem 8900 imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) útján kvantifikáltuk.

Csont denzitometria

A csont ásványanyag (BMD) tartalmat kettős energiájú röntgensugár elnyelődése alapján (Lunar Prodigy, GE Medical Systems, Diegem, Belgium) határoztuk meg a lumbális gerincen (L1-4), teljes csípőn, femorális nyakon, Ward's háromszögben és radiuson. A CYP3A7 polimorfizmus vizsgálatában a lumbális gerincen (L2-4) és a femorális nyakon mért BMD-t használtuk. Osteoporosist a -2.5 standard deviáció (SD) > T-score, osteopeniat a -2.5 SD < T-score < -1 SD esetén állapítottuk meg.

Laboratóriumi paraméterek

Colorimetriás módszerrel határoztuk meg a szérum kalcium (2.25-2.61 mmol/L), foszfor (0.8-1.45 mmol/L), albumin (35-50 g/L) szinteket és az alkalikus foszfatáz aktivitást (35-123 U/L) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Immuno-chemilumineszcens technikát használtunk a szérum béta-crosslaps (0-320 pg/mL), DHEAS (45-74 év között: 0.3-7.0 μ mol/L), CEA (< 4.3 ng/mL), AFP (< 13.6 ng/mL) és CA19-9 (< 39 U/mL) koncentrációk mérésére (Roche Diagnostics). HPLC (high performance liquid chromatography) útján állapítottuk meg a szérum 25-OH-vitamin D₃ (75-160 nmol/L) koncentrációt (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). (referencia érték)

Sejtkultúra

MC3T3-E1 egér osteoblast sejteket használtunk a kalcium pótlás proliferációra, ALP aktivitására és génexpresszióra kifejtett hatásának vizsgálatában. A médium (α -MEM oldat) 1.8 mmol/L kalciumot, 25 μ g/ml aszkorbinsavat, 10 % fetal calf szérumot és antibiotikumokat (Sigma-Aldrich) tartalmazott.

Vitális sejt szám meghatározás

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) útján határoztuk meg a sejtszám 24 óra alatti változását 25.5 mmol/L CaCl₂-t és kalcium kiegészítést nem tartalmazó α -MEM oldat esetén. A mérés az ATP lumineszcens meghatározásán alapszik, mely korrelál a metabolikusan aktív sejtek mennyiségével. A lumineszcenciát Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA) útján mértük.

Alkalikus foszfatáz aktivitás meghatározása

Az ALP aktivitást a 15 napos sejtkultúrákban (25.5 mmol/L CaCl₂-t és kalcium kiegészítést nem tartalmazó α -MEM oldat mellett) a p-nitrophenil-phosphate p-nitrophenol reakció alapján határoztuk meg Olympus AU2700 analyzerrel (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), majd normalizáltuk a celluláris protein koncentrációra, melyet a CellLytic TM pufferrel történt sejtemésztés után (Sigma-Aldrich) 280 nm-en Bradford assay-el mértünk NanoDrop ND-1000 spektrofotométeren (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Génexpresszió vizsgálata

Az MC3T3-E1 osteoblastok génexpresszióját 25.5 mmol/L CaCl₂-t és kalcium kiegészítést nem tartalmazó α -MEM oldat mellett hasonlítottuk össze. Teljes RNS-t izoláltunk a 15 napos sejtkultúrákból High Pure RNA Isolation Kit-tel (Roche Diagnostics). Az RNS mennyiségi és tisztasági vizsgálatát 260 nm-en NanoDrop ND-1000 spektrofotométeren (NanoDrop Technologies) végeztük. Reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk (Promega), majd amplifikáltuk TaqMan RT-PCR módszerrel (Applied Biosystems). GAPDH-t, mint 'housekeeping' gént használtuk a expresszió normalizálására.

Statisztikai analízis

A folytonos változók normalitását Kolmogorov-Smirnov-Liliefors teszttel vizsgáltuk. A kategórikus változók hatását variancia analízissel (ANOVA) és/vagy kovariancia analízissel (ANCOVA) számoltuk, míg a normalitás hiánya esetén Mann-Whitney

párosítatlan t-tesztet vagy Kruskal-Wallis tesztet használtunk. Nominális változók között Chi-négyzet tesztet végeztünk, bináris logisztikus regressziót, esélyhányadost (OR) és 95 %-os konfidencia intervallumokat (95 % CI) számoltunk. Folytonos változók között lineáris regressziót alkalmaztunk. A teljes (OS) és betegségmentes túlélés (DFS) vizsgálatánál Cox regressziót, relatív hazárdot (HR) és 95 %-os konfidencia intervallumokat (95 % CI) számoltunk. Az egyes túlélés görbék közötti eltérések vizsgálatához log-rank tesztet használtunk. A polimorfizmusokat recesszív modellben vizsgáltuk, más modell alkalmazását külön jeleztük. Az adatokat normális eloszlás esetén átlag \pm standard deviáció (SD) vagy átlag hibája (SEM), egyébként medián (range, minimum - maximum) formában adtuk meg. Szignifikanciát $p < 0.05$ esetén állapítottunk meg. A statisztikai számításokhoz az SPSS programcsomagot használtuk (SPSS Inc., Chicago, IL; version 15.0 for Windows).

EREDMÉNYEK

Az LCT 13910 C/T, CaSR A986S és CYP3A7*1C polimorfizmusok jelentősége a posztmenopauzás osteoporosisban

A három polimorfizmus allélfrekvenciája nem különbözött a beteg- és kontroll csoportokban.

Az LCT 13910 CC ($p = 0.03$), a CaSR 986 SS ($p = 0.026$) genotípus és a CCSS genotípus kombináció ($p = 0.0002$) esetén csökkent tejfogyasztást tapasztaltunk. A laktóz intoleranciáért felelős LCT 13910 CC genotípus alacsonyabb szérumszinttel ($p = 0.031$), kisebb testmagassággal ($p = 0.002$) és csökkent csontdenzitással (Z-score) járt a radiuson ($p = 0.038$), a Ward's háromszög területén ($p = 0.044$) és a teljes csípőn (CC vs TT, $p = 0.041$). A lumbális gerincen az osteoporotikus és kontroll egyesített csoportban ($n = 395$) tapasztaltunk szignifikáns BMD (Z-score) csökkenést ($p = 0.029$). A BMI, mint befolyásoló tényező figyelembevétele esetén az LCT 13910 C/T polimorfizmus határozta meg a BMD variancia 1.1 %-t a radiuson ($p = 0.048$) és 1.7 %-t a teljes csípőn ($p = 0.018$). A szérumszint és a lumbális gerinc BMD között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

A CaSR 986 SS genotípus alacsonyabb teljes csípő csontdenzitással (Z-score) ($p = 0.036$) járt az osteopenias és kontroll egyesített csoportban ($n = 328$). A BMI, mint befolyásoló tényező figyelembevétele esetén a CaSR A986S polimorfizmus határozta meg a lumbális BMD variancia 1.3 %-t ($p = 0.04$).

A CYP3A7*1C polimorfizmus hatása a szérumszintre az életkor beszámítása után elmaradt, más laboratóriumi paraméterekkel nem találtunk kapcsolatot. Az életkor korrelált a szérumszinttel ($r = -0.52$, $p < 0.005$). A homozigóta mutáns GG genotípus csökkent csontdenzitással (Z-score) járt a lumbális gerincen a TT genotípushoz képest ($p = 0.048$), mely szignifikáns maradt a menopauzális korban, a szérumszint, az alkoholfogyasztás, a szteroidhasználat, a dohányzás és a korábbi nem-vertebrális csonttörés beszámítása után is ($p = 0.047$). A szérumszint korrelált a lumbális gerincen ($r = 0.23$, $p < 0.005$) és femorális nyakon ($r = 0.17$, $p = 0.003$) mért BMD-vel (Z-score). A csonttörést egyik polimorfizmus sem befolyásolta.

Az LCT 13910 C/T, a CaSR A986S és a CYP3A7*1C polimorfizmusok jelentősége a colorectalis carcinogenesisben

A CaSR 986 S allél frekvenciája a beteg csoportban szignifikánsan magasabb volt ($p = 0.026$). A CCSS genotípus kombinációt ($n = 5$) csak a betegek között láttunk ($p = 0.033$). Az LCT 13910 C és a CYP3A7*1C G allél frekvenciája nem különbözött a csoportokban.

A laktóz intoleranciáért felelős LCT 13910 CC genotípus esetén gyakoribb távoli daganat recidívát tapasztaltunk ($p = 0.012$), mely férfiakban alacsonyabb betegségmentes túléléssel járt ($p = 0.024$). A betegek életkora nem mutatott változást a különböző genotípusokban. Nőkben a TCSS genotípus kombináció ($n = 3$) esetén láttunk csökkent betegségmentes túlélést ($p < 0.005$). A túlélési adatok számításánál figyelembe vettük a terápia típusát. Az alacsonyabb szérumszintű kalcium szint férfiakban előrehaladottabb T-stádiummal járt ($p = 0.009$). A CC genotípus nőkben csökkent szérumszintű kalcium szinttel járt ($p = 0.038$), férfiakban nem láttunk szignifikáns összefüggést. Nem találtunk kapcsolatot a teljes túlélés, az AJCC stádiumok, a differenciáltsági fok, lokalizáció és az LCT genotípusok között.

A CaSR 986 SS genotípus szignifikánsan magasabb szérumszintű kalcium szinttel járt ($p = 0.033$), de nem találtunk kapcsolatot a recidíva, a betegségmentes vagy teljes túlélés, a TNM vagy az AJCC stádiumok, a differenciáltsági fok, lokalizáció és a genotípusok között.

A lokális vagy távoli daganat recidíva, a betegségmentes vagy teljes túlélés, a TNM, AJCC stádiumok, a differenciáltsági fok és a lokalizáció nem különbözött a CYP3A7*1C genotípusokban.

A kalcium hatása az MC3T3-E1 sejtek proliferációjára, ALP aktivitására és protein expressziójára

A magasabb extracelluláris kalcium (25.5 mmol/L) csökkentette a sejtproliferációt ($p < 0.001$), növelte az alkalikus foszfatáz aktivitást ($p < 0.001$) és a COL2A1 ($p < 0.01$), a SMAD-3 ($p < 0.01$), a SMAD-6 ($p < 0.01$) expresszióját. A kalcium hatására csökkent az COL1A1 ($p < 0.001$), a DCN ($p < 0.01$), a BSP ($p < 0.001$) és a BMP-4 ($p < 0.01$) expresszió. A CaSR és a BGLAP (osteocalcin) gének nem expresszálódtak mérhető mennyiségben a kalcium pótlás után. A fibronectin változása nem volt szignifikáns.

MEGBESZÉLÉS

Az LCT 13910 C/T, a CaSR A986S és a CYP3A7*1C polimorfizmusok jelentősége a posztmenopauzás osteoporosisban

Munkánkban az LCT, a CaSR és a CYP gének jelentőségét vizsgáltuk posztmenopauzás osteoporosisban. Mindhárom polimorfizmus befolyásolta a csontdenzitást, az LCT 13910 C/T és a CaSR A986S polimorfizmus kapcsolódott a tejfogyasztáshoz, az LCT gén a szérumszintű kalcium szinthez.

Az LCT 13910 CC genotípus esetén látott alacsonyabb szérumszintű kalcium szint részben a csökkent tejfogyasztás eredménye. Ismert, hogy a CC genotípus a csökkent laktáz phlorizin hidroláz expresszió keresztül laktóz intoleranciához, csökkent tejfogyasztáshoz és kalcium felszívódáshoz vezet. A tejtermékek fontos kalcium forrást jelentenek a kaukázusi rasszban. Ezért nem meglepő, hogy a CC genotípusú személyekben alacsonyabb csontdenzitást találtunk az alacsonyabb tejfogyasztás és a csökkent szérumszintű kalcium szint eredményeként. A polimorfizmus 1.1-1.7 %-ban járult hozzá a BMD változásához mérési helyektől függően.

A CYP3A7*1C homozigóta genotípusa csökkent csontdenzitással járt, de a szérumszintű DHEAS szintet nem befolyásolta a kor figyelembevétel után, így feltételezzük, hogy a polimorfizmus a szérumszintű DHEAS szinttől függetlenül, feltehetőleg más CYP3A7 enzim szubsztrát (ösztrogén) fokozott eliminációján keresztül fejtette ki hatását. A CYP3A7 enzim expressziója nőkben alacsonyabb, mint férfiakban, így a polimorfizmus hatása a DHEAS szintre is csak kevésbé érvényesülhet. Más munkacsoport szintén csak heterogén vagy férfiakat tartalmazó populációban tudta igazolni a CYP3A7*1C polimorfizmus és a szérumszintű DHEAS koncentráció közötti összefüggést, nőkben ilyen kapcsolatot nem találtak. Az

ösztrogének prevenció hatása a csontritkulásra ismert, posztmenopauzás nőkben alkalmazott ösztrogénpótlás csökkenti a csontvesztést.

Összességében elmondható, hogy az LCT, CaSR és a CYP3A7 gének befolyásolják a kalcium anyagcserét és ezen keresztül a csontdenzitást. A csontritkulás prevenciójában a megfelelő kalcium bevitel hangsúlyozandó, mely laktóz intolerancia esetén laktóz mentes kalcium pótlást jelent. Ennek jelentősége hazánkban különösen nagy a laktóz intolerancia gyakori, 37 %-s előfordulása miatt.

Az LCT 13910 C/T, a CaSR A986S és a CYP3A7*1C polimorfizmusok jelentősége a colorectalis carcinogenesisben

Az LCT 13910 CC genotípus és a colorectalis daganatok incidenciája közötti kapcsolat ismert, de a polimorfizmus hatását a daganat progressziójára nem vizsgálták. Utánkövetéses vizsgálatunkban magasabb távoli daganat recidívát találtunk a CC genotípusú betegekben. Férfiakban a CC genotípus esetén csökkent betegségmentes túlélést láttunk. Ismert, hogy a CC genotípus laktóz intoleranciához illetve csökkent tejfogyasztáshoz vezet. A tej kalcium és laktóztartalma miatt csökkenti a colorectalis carcinoma rizikóját. A kalcium oldhatatlan komplexet képez a bélben a carcinogén szekunder epesavakkal és zsírsavakkal, mérsékelve a bélhám irritációját. A laktóz galaktózzá alakulva megköti a lektineket, meggátolva a Thomsen-Friedenreich vércsoport antigénhez való kapcsolódásukat, mely carcinogén hatású. Továbbá a kalcium közvetlenül is hat a bélhámsejtekre a CaSR fehérjén keresztül, proliferációs kontrollt biztosítva. A CaSR expressziója és a colorectalis daganatok differenciáltsági foka között kapcsolat van, a receptor funkció kiesése fokozza a proliferációt. Munkánkban magasabb allélfrekvenciát találtunk a daganatos csoportban a kontroll résztvevőkhöz képest, hangsúlyozva a CaSR A986S polimorfizmus jelentőségét a colorectalis daganatok kialakulásában. Elképzelhető, hogy a 986 SS genotípus esetén az apoptózist elindító filamin-A adaptermolekula kötődésének hiánya vezet colorectalis carcinogenesishez. A CaSR 986 polimorfizmus a progressziót nem befolyásolta.

Heterogén populációban a CYP3A7*1C polimorfizmus alacsonyabb DHEAS szintet eredményez. A DHEAS szerepe a colorectalis daganatok megelőzésében vitatott: a DHEAS szint nem különbözik daganatos és kontrollcsoportban, ugyanakkor humán coloncarcinoma sejtvonalon csökkenti a proliferációt. Vizsgálatunkban nem találtunk kapcsolatot a CYP3A7*1C polimorfizmus és a colorectalis carcinogenesis között.

Összességében elmondható, hogy az LCT 13910 C/T és a CaSR A986S polimorfizmusok befolyásolták a colorectalis daganatok pathogenezisét feltehetően a megváltozott kalcium metabolizmuson keresztül. Hazánkban a laktóz intolerancia és a colorectalis daganatok magas incidenciája miatt különösen fontos a kalcium profilaxis biztosítása. A CYP3A7*1C polimorfizmus nem kapcsolódott a colorectalis carcinogenesishez.

A kalcium hatása az MC3T3-E1 sejtek proliferációjára, ALP aktivitására és protein expressziójára

A kalcium nélkülözhetetlen a csont mineralizációjához, az osteoblastok kemotaxisához és differenciációjához. Remodelling folyamán jelentős mennyiségű (40 mmol/L) kalcium szabadul fel a csontból, stimulálva az osteoblastok csontképzését. Ismert, hogy a megnövekedett kalcium a CaSR fehérjén keresztül aktiválja a SMAD-3 expressziót, mely a TGF- β jelátviteli útvonal egyik legjelentősebb tagjaként fokozza az ALP aktivitást biztosítva a megfelelő csontmineralizációt. Ezekhez hasonlóan munkánkban a kalcium pótlás magasabb SMAD-3 expressziót és ALP aktivitást eredményezett. A SMAD-6, negatív

visszacsatolásként szintén fokozottan expresszáldott, gátolva az osteoblast differenciációt. Az enchondrális csontosodásra utaló COL2A1 expresszió nőtt a kalciumpótlás hatására. A BGLAP (osteocalcin), mely az osteoblast aktivitás inhibitora, és a CaSR expressziója a detektálási határ alá csökkent.

Konklúzióként elmondható, hogy a kalcium a TGF- β jelátviteli útvonalhoz kapcsolódva fokozta a modelinget, új csont képződését eredményezve.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az LCT 13910 C/T polimorfizmus befolyásolta a kalcium bevitelt, a szérum kalcium koncentrációt és a csontsűrűséget
2. A CaSR A986S polimorfizmus befolyásolta a kalcium bevitelt és a csontsűrűséget
3. A CYP3A7*1C polimorfizmus a DHEAS enzimszubsztrát koncentrációjától függetlenül befolyásolta a csontdenzitást
4. A csonttörést az LCT 13910 C/T, CaSR A986S és a CYP3A7*1C polimorfizmusok nem befolyásolták
5. Az LCT 13910 C/T polimorfizmus befolyásolta a colorectalis daganatok progresszióját, feltehetőleg az alacsonyabb kalcium bevitelen keresztül
6. A CaSR A986S polimorfizmus befolyásolta a colorectalis daganatok incidenciáját, valószínűleg az apoptózis szabályozásán keresztül
7. A CYP3A7*1C polimorfizmusnak nem volt szerepe a colorectalis daganatok kialakulásában, progressziójában
8. A kalcium kedvező csonthatásai kapcsolódtak TGF- β jelátviteli útvonalhoz MC3T3-E1 osteoblaston

ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánkban az átlagos kalcium bevitel (400-600 mg) a felnőtt populációban jelentősen alacsonyabb a javasolt mennyiségnél (1200-1500 mg). Ismert, hogy a megfelelő kalcium bevitel kedvezően befolyásolja a csontvesztést, és mérsékli a colorectalis daganatok (CRC) kialakulásának rizikóját. Munkánkban igazoltuk, hogy a laktóz intoleranciával járó LCT 13910 CC genotípus csökkent tejfogyasztást, alacsonyabb szérum kalcium szintet és csontdenzitást eredményez. A csökkent tejfogyasztás fontos pathogenetikai tényező lehet a gyakoribb távoli recidíva kialakulásában, melyet CC genotípusú CRC-s betegeknel találtunk. A CaSR fehérje az extracelluláris kalcium hatását mediálva befolyásolja az osteoblastok és a vastagbél mucosa sejtek anyagcseréjét. A CaSR 986 SS genotípus feltételezhetően megváltoztatva ezeket a folyamatokat alacsonyabb csontdenzitáshoz, és magasabb CRC incidenciához vezetett. A kalcium mellett a DHEAS szteroid prohormon is fontos szerepet játszhat a csont és a colon mucosa sejtek működésében. A CYP3A7 enzim a *1C G allél hordozása esetén magasabb szinten expresszáldik, fokozott DHEAS eliminációt eredményezve. A CYP3A7*1C GG genotípus csökkentette a csontdenzitást, de nem befolyásolta a colorectalis carcinogenesis. Mindezek alapján valószínű, hogy a kalcium bevitel szupplementációja, különösen laktóz intoleráns személyekben, kedvezően befolyásolná az osteoporosis és a colorectalis carcinoma kialakulásának kockázatát.

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- Bácsi, K.**, Kósa, JP., Borgulya, G., Balla, B., Lazáry, Á., Nagy, Z., Horváth, C., Speer, G., Lakatos, P. 2007. CYP3A7*1C polymorphism, serum dehydroepiandrosterone sulfate level, and bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* **80**(3): 154-9. **IF: 2.483**
- Bácsi, K.**, Kósa, J., Lazáry, Á., Horváth, H., Balla, B., Lakatos, P., Speer, G. 2007. Importance of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in different diseases. *Orv Hetil* **148**(14): 651-7.
- Bácsi, K.**, Kósa, J., Lazáry, Á., Balla, B., Horváth, H., Takács, I., Nagy, Z., Speer, G., Lakatos, P. 2007. Impact of CYP3A7*1C polymorphism on serum dehydroepiandrosteron sulphate level and bone mineral density in postmenopausal women. *Orv Hetil* **148**(27): 1273-80.
- Lazáry, Á., Balla, B., Kósa, JP., **Bácsi, K.**, Nagy, Z., Takács, I., Varga, PP., Speer, G., Lakatos, P. 2007. Effect of gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblast cells. *Biomaterials* **28**(3): 393-9. **IF: 5.196**
- Bácsi, K.**, Hitre, E., Kósa, JP., Horváth, H., Lazáry, Á., Lakatos, LP., Balla, B., Nagy, Z., Lakatos, P., Speer, G. Effects of the lactose-phlorizin hydrolase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer (submitted for *Int J Cancer*, Manuscript number: IJC-08-0175)
- Bácsi, K.**, Kósa, JP., Lazáry, Á., Balla, B., Nagy, Z., Lakatos, P., Speer, G. Effect of LCT 13910 C/T polymorphism on serum calcium level and bone mineral density in postmenopausal women (submitted for *Osteoporosis Int*, Manuscript number: OI-2008-01-0049)

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

- Lazáry, Á., Speer, G., Varga, PP., Balla, B., **Bácsi, K.**, Kósa, JP., Nagy, Z., Takács, I., Lakatos, P. Effect of vertebroplasty filler materials on viability and gene expression of human nucleus pulposus cells. *J Orthop Res*, 2008. Jan. 4. (article in press, DOI 10.1002/jor.20532) **IF: 2.784**
- Lazáry, Á., Balla, B., Kósa, JP., **Bácsi, K.**, Nagy, Z., Takács, I., Varga, PP., Speer, G., Lakatos, P. 2007. Synthetic bone grafts, the role of the gypsum in bone substitution; molecular biological approach. *Orv Hetil*, **148** (51): 2427-33.
- Balla, B., Kósa, JP., Kiss, J., Borsy, A., Podani, J., Takács, I., Lazáry, Á., Nagy, Z., **Bácsi, K.**, Speer, G., Orosz, L., Lakatos, P. 2008. Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif Tissue Int*, **82**(1): 12-26 **IF: 2.483**
- Kósa, JP., Kis, A., **Bácsi, K.**, Nagy, Z., Balla, B., Lazáry, Á., Takács, I., Speer, G., Lakatos, P. 2007. Identification of novel candidate genes associated with glucocorticoid-induced bone loss in a murine osteoblastic cell line and primary calvarial osteoblasts. *Magyar Belorvosi Archívum*, **60**(5): 443-450.

Balla, B., Kósa, JP., Takács, I., Kiss, J., Podani, J., Borsy, A., Lazáry, Á., **Bácsi, K.**, Nagy, Z., Speer, G., Orosz, L., Lakatos, P. Menopauza hatása a csontszöveti génkifejeződésre posztmenopauzás és premenopauzás korú nem oszteoprotikus nőkben *Magyar Belorvosi Archívum* (article in press)

Kiss, J., Balla, B., Kósa, JP., Borsy, A., Podani, J., Takács, I., Lazáry, Á., Nagy, Z., **Bácsi, K.**, Szlávy, E., Szendrői, M., Speer, G., Orosz, L., Lakatos, P. Gene expression patterns in the bone tissue of women with fibrous dysplasia (submitted for *J Bone Miner Res*, Manuscript number: J0802072)

Lazáry, Á., Kósa, JP., Tóbiás, B., Balla, B., **Bácsi, K.**, Takács, I., Nagy, Z., Speer, G., Mező, T., Lakatos, P. Single nucleotide polymorphisms in new candidate genes are associated with bone mineral density in Hungarian postmenopausal women (submitted for *Eur J Endocrinol*, Manuscript number: EJE-08-0021)

Absztraktok

Bácsi, K., Kósa, JP., Balla, B., Lazáry, Á., Nagy, Z., Takács, I., Speer, G., Lakatos, P. The decreased activity of lactase phlorizin hydrolase and bone mineral density in postmenopausal women. *American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting* Honolulu, HI, USA September 16-19, 2007. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(S1): S186

Bácsi, K., Kósa, JP., Balla, B., Lazáry, Á., Nagy, Z., Takács, I., Speer, G., Lakatos, P. A laktáz phlorizin hidroláz és a csontdenzitás kapcsolatának vizsgálata posztmenopauzáis nőkben. *Magyar Osteoporosis és Osteoarthrologiai Társaság XVI. Kongresszusa* Balatonfüred, 2007. május 23-26. *Ca és Csont* 2007, **10**(2): 50

Lazáry, Á., Varga, P., Speer, G., **Bácsi, K.**, Balla, B., Kósa, JP., Nagy, Z., Takács, I., Lakatos, P. Effect of Vertebroplasty Filler Materials on Viability and Gene Expression of Mouse and Human Nucleus Pulposus Cells. *American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting* Honolulu, HI, USA September 16-19, 2007. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(S1): S160

Balla, B., Kósa, JP., Kiss, J., Borsy, A., Podani, J., Takács, I., Lazáry, Á., Nagy, Z., **Bácsi, K.**, Speer, G., Orosz, L., Lakatos, P. Effect of Estrogen Deficiency on Gene Expression Pattern in the Bone Tissue of Postmenopausal Versus Premenopausal Healthy Women. *American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting* Honolulu, HI, USA September 16-19, 2007. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(S1): S261

Speer, G., Lazáry, Á., Kósa, JP., Tóbiás, B., Mező, T., **Bácsi, K.**, Balla, B., Takács, I., Nagy, Z., Lakatos, P. Multiplex SNP Genotyping and Data Analysis on 360 Hungarian Postmenopausal Women. *American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting* Honolulu, HI, USA September 16-19, 2007. *J Bone Miner Res* 2007, **22**(S1): S286

Balla, B., Kósa, JP., Takács, I., Kiss, J., Podani, J., Borsy, A., Lazáry, Á., **Bácsi, K.**, Speer, G., Orosz, L., Lakatos, P. Ösztrogén hiányában fellépő génexpressziós változás vizsgálata posztmenopauzás és premenopauzás nem osteoporosisos nők csontszövetében. *Magyar*

Osteoporosis és Osteoarthrologiai Társaság XVI. Kongresszusa Balatonfüred, 2007. május 23-26. *Ca és Csont* 2007, **10**(2): 51

Lazáry, Á., Speer, G., Kósa, JP., Tóbiás, B., Balla, B., **Bácsi, K.**, Nagy, Z., Takács, I., Mező, T., Lakatos, P. Multiplex SNP genotipizálás és adatfeldolgozás 360 posztmenopauzás nő vérmintájából. *Magyar Osteoporosis és Osteoarthrologiai Társaság XVI. Kongresszusa* Balatonfüred, 2007. május 23-26. *Ca és Csont* 2007, **10**(2): 59

Kis, A., Balla, B., Lazáry, Á., Takács, I., Nagy, Z., Speer, G., Mező, T., **Bácsi, K.**, Lakatos, P. A tartós glükokortikoid terápia okozta osteoporosis létrejöttében résztvevő gének kimutatása osteoblastsejteken. *Magyar Osteoporosis és Osteoarthrologiai Társaság XV. Kongresszusa* Balatonfüred, 2006. május 24-27. *Ca és Csont* 2006, **9**(1): 19

Balla, B., Borsy, A., Kósa, JP., Kiss, J., Lazáry, Á., Takács, I., Nagy, Z., Speer, G., **Bácsi, K.**, Orosz, L., Lakatos, P. Génexpressziós mintázat vizsgálata posztmenopauzában levő egészséges és osteoporotikus nők csontszövetében. *Magyar Osteoporosis és Osteoarthrologiai Társaság XV. Kongresszusa* Balatonfüred, 2006. május 24-27. *Ca és Csont* 2006, **9**(1): 11

Lazáry, Á., Balla, B., Kósa, JP., Takács, I., Nagy, Z., Speer, G., **Bácsi, K.**, Koppány, V., Lakatos, P. A gipsz in vitro hatása az osteoblastok osztódására és differenciálódására. *Magyar Osteoporosis és Osteoarthrologiai Társaság XV. Kongresszusa* Balatonfüred, 2006. május 24-27. *Ca és Csont* 2006, **9**(1): 22

Balla, B., Kósa, JP., Takács, I., Lazáry, Á., **Bácsi, K.**, Lakatos, P. Génexpressziós mintázat vizsgálata prae- és postmenopausás egészséges nők csontszövetében. *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XXI. Kongresszusa* Debrecen, 2006. május 18-20. *Magyar Belorvosi Archivum* 2006, **1**: 24

ÖSSZESÍTETT IMPAKT FAKTOR: 12.946