

## **A D vitamin, ösztrogén és calcium sensing receptor genotípusainak valamint a szérumban kalciumnak a prosztatatarák kialakulásában betöltött szerepe**

### **Bevezetés:**

A prosztatatarák (PCA) az egyik leggyakoribb rosszindulatú daganat, az észak-amerikai és európai férfiak daganatos halálozásának második leggyakoribb oka. A legelismertebb PCA-ra hajlamosító tényező az életkor, a családi halmozódás és az etnikum. Az etnikai különbségekért genetikai és környezeti tényezőket egyaránt felelőssé teszik.

Az ösztrogén a prosztata növekedésében és daganatos elfajulásában kulcsszerepet tölt be. A hatos kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő ösztrogén receptor (ER) genetikai eltérései a PCA-val szoros összefüggést mutatnak. Az ER a szteroid/thyroid receptor családba tartozik, és alfa valamint béta altípusként expresszálódhat. Korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy az alfa növeli, míg a béta altípus csökkenti a PCA előfordulásának esélyét. Az XbaI és PvuII egy nukleotid cserés polimorfizmusok összefüggést mutatnak bizonyos kórképek, például az emlő daganatok, az osteoarthritis és a csökkent csontsűrűség előfordulásával.

Az ösztrogén befolyásolja a D vitamin receptor (VDR) expresszióját, és ezen keresztül a D3 vitamin (1,25-dihidroxy-colecalciferol) hatását is. Egyes szerzők szerint a D3 vitamin védelmet nyújthat egyes daganatok ellen. A VDR szintén a szteroid/thyroid hormon receptor család tagja, és mind a normál, mind a daganatos prosztata sejtekben kimutatható. A D3 vitamin aktív formájának VDR-hez történő kapcsolódása a kalcium homeosztázis szabályozása mellett több szervben, így a prosztatában is, szereppel bír a sejtek növekedésében és differenciálódásában. A prosztata daganatok kialakulásában vizsgálták a VDR gén több polimorfizmusának (köztük a BsmI-nek is) a szerepét, de egymásnak ellentmondó eredmények születtek. A BsmI polimorfizmus meta-analízise sem adott egyértelmű választ.

A kalcium fontos szerepet tölt be mind a sejtosztódásban, mind a sejtek közötti kapcsolatban, mind a sejten belüli jelátviteli rendszerekben. Ezek mellett több epitheliális sejteken, így a prosztata sejteken is hatással van a differenciálódására. Ikervizsgálatok igazolták, hogy a szérumban kalcium szintje több mint felelősségen genetikailag meghatározott. A calcium-sensing receptor (CaSR) a kalcium homeosztázis fenntartásának egyik kulcsa. A sejten kívüli kalcium szintet érzékelve olyan sejt válaszokat indít be, amelyek korrigálják a sejten kívüli kalcium koncentrációt. A CaSR felfedezése világított rá, hogy a kalcium nem csak egy sejten belüli másodlagos jelátviteli molekula, hanem a szervezet homeosztázisának szabályozásában elsődleges szerepet tölt be. A CaSR működését érintő mutációk esetén kimutatható volt, hogy a kalcium szint sejten kívüli változásai eltérő sejten belüli válaszokat generáltak. A CaSR mutációkkal több betegség mutatott szoros kapcsolatot, míg a 986 Ala/Ser polimorfizmus (A986S) egészséges felnőttekben szignifikánsan összefüggött a szérumban kalcium szinttel.

Célunk az ösztrogén, D vitamin és calcium sensing receptor gének fenti polimorfizmusainak, valamint a szérumban kalcium szintnek a prosztatatarák kialakulásában betöltött szerepének vizsgálata volt.

### **Betegek és módszer:**

#### *Betegek*

Vizsgálatunkba 204 kaukázusi prosztatatarákos beteget (életkor: 52-88 év között) vontunk be, akik intézményünkben 2003-2005 között kezelés alatt álltak. A prosztatatarák diagnózisát mindannyiszor transrectalis tübiopszia vagy transurethralis prosztata resectatum szövettani vizsgálata erősítette meg. Azon betegeket, akiknek a prosztatatarakon kívül egyéb rosszindulatú betegeségük volt, illetve akiknek pT1a, nem releváns prosztata rájuk volt, illetve a Gleason score nem érte el az 5-öt, kizártuk a vizsgálatból. A szérumban kalcium szintet

érintő számításokból kizártuk azt a 103 beteget, akik biszfoszfonát kezelés alatt álltak. Korban illeszkedő 102 kontroll beteget is bevontunk a vizsgálatba, akik nem kaptak semmilyen a kalcium anyagcserét befolyásoló gyógyszert, illetve nem volt a kalcium anyagcserét befolyásoló ismert betegségük. A kontroll csoportba tartozó betegeknél a prosztatata daganatot kizáró rectalis digitális vizsgálatot és prosztatata specifikus antigén (PSA) meghatározást végeztünk. Amennyiben a PSA szintje meghaladta a 4 ng/ml-t, vagy a tapintási lelet nem tudta egyértelműen kizárni a prosztatata daganatot, a beteget a kontroll csoportból kizártuk. A vizsgálatban résztvevőktől éhomi vérmintát gyűjtöttünk, miután részletes felvilágosítást követően a vizsgálatba írásos beleegyezésüket adták. Felmérésünket jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Tudományos Kutatásaitikai Bizottsága (TUKEB) is.

### *Genotipizálás*

A DNS-t a vérmintákból a Magnesil KF Genomic System (Promega, Madison, WI, USA) használatával izoláltuk. Az ER-alfa gén esetén az alábbi primereket alkalmaztuk: S primer: 5' CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC 3' 34-mer, A primer: 5' TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA 3' 33-mer (10  $\mu$ M végső koncentráció). A PCR reakciót (végső térfogat: 50 $\mu$ L) az alábbiak felhasználásával végeztük: 5  $\mu$ L 10x Mg mentes reaction buffer (Promega, Madison, USA), 1  $\mu$ L 10mM dNTP (Promega, Madison, USA), 5  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, USA), 10  $\mu$ L DNS, 1-1  $\mu$ L 10  $\mu$ M primer A és S, 0,4  $\mu$ L (2 U/ $\mu$ L) Taq (Promega, Madison, USA) és 26,6  $\mu$ L 2D PCR víz. A PCR program a következők szerint zajlott: 95 C° 2 percig, 85 C° 3 percig, 5x (70 C° 210 másodpercig, 95 C° 30 másodpercig), 30x (70 C° 105 másodpercig, 90 C° 30 másodpercig), 10x (70 C° 210 másodpercig, 95 C° 30 másodpercig) és 70 C° 15 percig. A PCR produktumát PvuII és XbaI restrictios endonucleázok (Promega, Madison, USA) segítségével emésztettük 37 C°-on egy éjszakán keresztül. A PvuII/XbaI restrictios site-ok hiánya a P/X allélek, jelenléte a p/x allélek jelenlétét igazolta.

A VDR gén esetén az alábbi primereket használtuk: A primer: 5' AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG 3' 23-mer, B primer: 5' CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA 3' 30-mer (2,5  $\mu$ M végső koncentráció). A PCR reakciót 20  $\mu$ L végső térfogattal az alábbiak felhasználásával végeztük: 2  $\mu$ L 10 x PCR reaction buffer (Dynazyme, Espoo, Finland), 0,5  $\mu$ L dNTP (10 mM, 200  $\mu$ M végső koncentráció), 0,5  $\mu$ L (2 U/ $\mu$ L) Taq polimeráz (Dynazyme, Espoo, Finland), 1-1  $\mu$ L A, B primer és 15  $\mu$ L (1  $\mu$ g) tisztított DNS. A reakció a következők szerint zajlott: 95 C° 3 percig, 35 x (94 C° 45 másodpercig, 72 C° 90 másodpercig), 72 C° 10 percig. A PCR produktumát BsmI restrictios enzimmel (BioLabs, Beverly, USA, 5 U/ $\mu$ L) emésztettük 90 percig 65 C°-on. A BsmI restrictios site hiánya a B allélt, míg jelenléte a b allélt jelölte.

A CaSR gén polimorfikus régióját allél specifikus PCR technikával amplifikáltuk. Az alábbi primereket használtuk: M primer: 5' ACG GTC ACC TTC TCA CTG ACG TTT GAT GAG CCT CAG AAG TAC T 3' 43-mer, W primer: 5' GCT TTG ATG AGC CTC AGA AGA TCG ' 24-mer és R primer: 5' CTC TTC AGG GTC CTC CAC CTC T 3' 22-mer (10  $\mu$ M végső koncentráció). A PCR reakció során (20  $\mu$ L végső térfogat) az alábbi anyagokat alkalmaztuk: 2  $\mu$ L 10x Mg free reaction buffer, 4  $\mu$ L dNTP (1mM), 1,2  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L DNS (25 ng/ml), 3-2-1  $\mu$ L (R, W, M primer), 0,1  $\mu$ L (0,5 U/ $\mu$ L) Taq (Promega, Madison, USA) és 5,7  $\mu$ L 2D PCR víz. A PCR program a következők szerint zajlott: 94 C° 12 percig, 35x (94 C° 20 másodpercig, 55 C° 20 másodpercig, 72 C° 30 másodpercig) és 72 C° 5 percig. A CaSR allélnek két típusa ismeretes: az A és az S allélek, az alábbi genotípusokkal: AA, AS, SS. A PCR reakciókra a Hybaid Express thermocycler-t alkalmaztuk (Teddington, Middlesex,

UK). Az elektroforetikus szeparálás 7%-os Spreadex/acrilamide (29:1) gélen történt (Elchrom, Cham, Switzerland).

#### Laborértékek:

A szérum PSA, kalcium, albumin, 17 béta estradiol és tesztoszteron szintek meghatározása rutin laboratóriumi módszerekkel történt egyetemünk központi laborjában. A szérum kalcium szint albumin szinthez történő korrigálása az alábbi képlet felhasználásával történt: korrigált kalcium (mmol/l) = kalcium (mmol/L) – 0,02 x (albumin (g/L)).

#### Statisztikai módszerek:

A leíró statisztika során a kategórikus változókat százalék formájában, a folyamatos, normál elosztást mutató változókat átlag± standard deviáció (SD), a folyamatos, nem normál elosztást mutató változókat interquartile range (IQR) segítségével jellemeztük. A prosztatata daganatos betegcsoport és a kontroll betegcsoport összehasonlítására folyamatos változók esetén a két változós t próbát vagy a Mann-Whitney U-módszert, kategórikus változók esetén (genotípusok) a  $\chi^2$  tesztet alkalmaztuk. A folyamatos változókat, amennyiben szükséges volt, log-transzformáltuk. A PCA-val kapcsolatos független változók vizsgálata során többszörös regressziós módszert alkalmaztunk azon változók felhasználásával, amelyek a p értékei az egyváltozós vizsgálatokban 0,1-nél kisebbnek bizonyultak a biszfoszfonát kezelés alatt álló betegek kizárása után. Minden gén megfelelt a Hardy-Weinberg equilibriumnak. A p értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak. Az adatok értékelése során az SPSS 13.0 for Windows programcsomagot alkalmaztuk.

### Eredmények

A leíró statisztika eredményét az 1-es táblázatban ismertetjük.

**1. táblázat.** A prosztatata daganatos (PCA) és a kontroll betegcsoport jellemzői.

	<b>PCA n=204</b>	<b>Kontroll n=102</b>	<b>Referencia értékek</b>	<b>P értékek</b>
<b>Kor (év)</b>	70,0±8,2	64,1±10,9	-	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Szérum PSA (ng/ml)</b>	22,5 [54,1]	1,5 [2,2]	< 4,0	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Szérum kalcium (mmol/l)</b>	2,34±0,17	2,41±0,14	2,25-2,61	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Szérum foszfát (mmol/l)</b>	1,10±0,21	1,06±0,17	0,74-1,52	0,15
<b>Szérum albumin (g/l)</b>	44 [7]	44 [5]	35-50	0,58
<b>Korrigált kalcium (mmol/l)*</b>	2,27±0,11	2,34±0,12	2,25-2,61	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Szérum ösztrogén (pg/ml)</b>	20,0 [20,3]	28,5 [9,4]	13,0-60,0	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Szérum tesztoszteron (ng/ml)</b>	1,56 [4,13]	4,02 [1,85]	2,80-8,00	<b>&lt;0,0001</b>

PSA: prosztatata specifikus antigén

\* Korrigált kalcium (mmol/l) = szérum kalcium (mmol/L) – 0.02 x (albumin (g/L) – 40)).

A szérum kalcium szint szignifikánsan alacsonyabb volt a prosztatata daganatos betegekben a kontrollokhoz képest (2,33 mmol/l a prosztatadaganatosokban és 2,44 mmol/l a kontrollokban; p<0,0001). A szérum PSA, ösztrogén és tesztoszteron szint szintén szignifikánsan különbözött a két csoportban. A biszfoszfonát kezelésben nem részesülő 103 beteget vizsgálva hasonló összefüggéseket kaptunk (prosztatata daganatos betegek szérum kalcium szintje: 2,36 mmol/l, kontrollok szérum kalcium szintje: 2,41 mmol/l, p<0,26; prosztatata daganatos betegek korrigált szérum kalcium szintje: 2,28 mmol/l, kontrollok korrigált szérum kalcium szintje: 2,34 mmol/l, p<0,002).

A genotípusok megoszlását a 2. táblázatban ismertetjük.

**2. táblázat:** A VDR BsmI, ER $\alpha$  PvuII és XbaI valamint CaSR A986S genotípusok megoszlása a prosztatata daganatos (PCA, n=204) és a kontroll (n=102) betegcsoportban.

VDR BsmI	PCA (n=204)	Kontroll (n=102)	Odds ratio (95% CI)
bb	25,4%	52,1%	1 (ref.)
Bb	49,7%	34,4%	2,96 (1,67-5,25)
BB	24,9%	13,5%	3,76 (1,79-7,90)

**P<0,0001**

ER $\alpha$ PvuII			
pp	21,3%	30,0%	1 (ref.)
Pp	59,8%	45,6%	1,84 (0,99-3,43)
PP	18,9%	24,4 %	1,01 (0,52-2,28)

**P=0,092**

ER $\alpha$ XbaI			
xx	17,1%	28,9%	1 (ref.)
Xx	54,3%	53,3%	1,72 (0,91-3,26)
XX	28,7%	17,8%	2,73 (1,25-5,94)

**P=0,037**

CaSR A986S			
AA	77,8%	71,1%	1 (ref.)
AS	20,6%	27,8%	0,68 (0,38-1,20)
SS	1,7%	1,0 %	1,48 (0,15-14,48)

**P=0,37**

CI: konfidencia intervallum

VDR: D vitamin receptor; ER $\alpha$ : ösztrogén receptor  $\alpha$ ; CaSR: calcium sensing receptor

A VDR BsmI bb genotípus szignifikánsan ritkábban fordult elő a prosztatata daganatos csoportban ( $p<0,0001$ ), csakúgy, mint az ER-alfa XX genotípusa ( $p=0,011$ ). Az ER-alfa PvuII genotípusa és a CaSR genotípusai nem tértek el a prosztatata daganatos és a kontroll populációban.

A logisztikus regressziós analízis eredménye alapján a magasabb korrigált szérum kalcium szint ( $p<0,003$ ) és a VDR bb genotípusa ( $p<0,0001$ ) egymástól és az életkortól függetlenül is ritkábban fordultak elő a prosztatata daganatos csoportban ( $R^2=18,8\%$ ) (3. táblázat).

**3. táblázat:** A szérum korrigált kalcium és a VDR BsmI polimorfizmus független kapcsolata a prosztatata daganattal logisztikus regressziós analízis alapján.

	Odds ratio	95% CI	P
Kor (év)	1,06	1,03-1,10	<b>&lt;0,0001</b>
Korrigált kalcium (mmol/l)*	0,027	0,001-0,54	<b>0,018</b>
VDR BsmI			
bb	1 (ref.)		
Bb	1,95	0,96-3,98	0,066
BB	2,29	0,87-5,99	0,092

\* Korrigált kalcium (mmol/l) = szérumban kalcium (mmol/L) – 0,02 x (albumin (g/L) - 40)).

A VDR gén BsmI polimorfizmusa a prosztata daganattal mennyiségi összefüggést mutat: a daganat kockázata a bb homozigótától kezdve a bB heterozigótán keresztül a BB homozigótáig fokozatosan növekszik. (3. táblázat). Az ER-alfa XbaI polimorfizmusát illetően a fenti megfigyelés nem érvényesült. A klinikai paraméterek (Gleason score, áttétek jelenléte, betegség-specifikus túlélés, egyéb laboratóriumi paraméterek) nem mutattak összefüggést sem a genotípusokkal sem a szérumban kalcium szinttel.

### Megbeszélés

Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a VDR BsmI bb genotípusa szignifikánsan ritkábban fordult elő a prosztata daganatos betegcsoportban. In vitro kísérletben is igazolták, hogy 1,25-dihydroxicolecalciferol hatására a VDR-t expresszáló prosztata daganatos sejtek differenciálódásnak indulnak, és növekedésük gátlódik. Amint azt a bevezetésben kifejtettük, jelentős földrajzi eltérések tapasztalhatóak a genotípusok megoszlásában. A fenti tény és az eltérő napsugárzás miatt tehát az egyes földrajzi területeken, egyes népcsoporton tett megfigyeléseket nem lehet általánosítani. A VDR BB genotípusa alacsonyabb szérumban kalcium szintet eredményez a csökkent bélből történő felszívódás által. A VDR tehát, legalábbis részben, a szérumban kalcium szinten keresztül fejtheti ki hatását, mivel az alacsonyabb korrigált szérumban kalcium szint növelte a prosztatarák előfordulásának kockázatát.

A szérumban kalcium szint és a prosztata daganat előfordulásának összefüggése mellett a VDR genotípusai a kalcium szinttől függetlenül is összefüggést mutattak a prosztatarákkal. A D vitamin-VDR rendszer a daganatok kialakulására közvetlen hatással lehet többek között az inzulin-like növekedési faktor kötő fehérjén, a p21-en, a cyclin D1-en és a prosztata-glandinokon keresztül is. Ezeket a közvetlen hatásokat prosztata daganatban is megfigyelték. Ezek alapján feltételezhető, hogy a VDR genotípusai is közvetlen hatással lehetnek a prosztatarák kialakulására. A VDR BsmI genotípusok továbbá mennyiségi összefüggést is mutattak a prosztatarákkal, a rák gyakorisága a bb genotípustól a Bb genotípuson keresztül a BB genotípusig szignifikáns növekedést mutatott. Ezen megfigyelésünk szintén a B allél „káros” szerepét támaszthatja alá.

Az ER-alfa XbaI polimorfizmusa és a prosztata daganat előfordulása között szintén összefüggést tapasztaltunk. A prosztata daganatos sejtek in vitro növekedését ösztrogénnel lehet befolyásolni. Normál prosztata szövetben az ER-alfa csak a stromában expresszálódik, az epithelben nem. Ezzel ellentétben prosztata daganatokban immunfestéssel epitheliális expressziót is ki lehet mutatni. Hormon-refrakter daganatok esetén csökkent ER-alfa expresszió tapasztalható. Az ER-alfa XX genotípusa a többi genotípussal szemben magasabb csonttömeggel és a törésveszély csökkenésével mutat összefüggést, ez feltehetően egy kifejezettebb ösztrogén hatást jelez. Vizsgálatunkban az ER-alfa XX genotípusának ritkább előfordulását tapasztaltuk a prosztata daganatos betegekben a kontroll-csoporthoz képest. Ez utalhat arra, hogy a többi ER genotípus az ösztrogén anti-proliferatív hatását csak kisebb hatásokkal tudja közvetíteni.

A szérumban kalcium szint variabilitása felerészben genetikai tényezők által meghatározott. A CaSR egy sejtfelszíni fehérje, amely főként a mellékpajzsmirigyben és a vese tubulusokban expresszálódik. A CaSR a szérumban kalcium szint változásának függvényében szabályozza a parathormon kiválasztást a mellékpajzsmirigyben és a kalcium visszaszívást a vese tubulusaiban. A CaSR gén A986S polimorfizmusa és a szérumban ionizált és teljes kalcium szintje között egészséges felnőttek esetén összefüggést találtak: az AA

homozigóta nőknek alacsonyabb volt a szérumban a kalcium szintjük, mint az AS heterozigótáknak vagy az SS homozigótáknak. A kalcium prosztata daganat ellen betöltött védő szerepéről több kísérletes és epidemiológiai vizsgálat beszámolt. A genetikai tényezőknek köszönhető csökkent (de még a normál tartományon belüli) szérumban a kalcium szint az élet során megnövekedett kockázatot jelent colorectalis, emlő és prosztata daganatok kialakulására. Várakozásainkkal ellentétben azonban vizsgálatunk során nem találtunk eltérést a CaSR A986S genotípusát illetően a prosztatarákos és a kontroll csoportok között. Ezen megfigyelésünktől függetlenül a prosztata daganatos betegekben azonban szignifikánsan alacsonyabb volt a szérumban a kalcium szint, amely szintén a szérumban a kalcium szint prosztata daganat kialakulásában betöltött fontos szerepére utalhat.

Vizsgálatunk korlátját képezi, hogy keresztmetszeti felépítése révén nem alkalmas a kalcium szintek időbeli változásának, valamint a daganat kialakulásának a vizsgálatára. Továbbá a kalcium anyagcserének a szérumban a kalcium szinten kívüli egyéb paramétereit nem vizsgáltuk. Az a tény viszont, hogy vizsgálati csoportjaink földrajzilag, etnikailag homogénnek tekinthetők, erősíti levont következtetéseink súlyát.

#### **Következtetések:**

Vizsgálatunkban egyidejűleg több, a kalcium anyagcserében szerepet játszó genetikai tényező hatását vizsgáltuk a prosztata daganat kialakulására. Az ER- $\alpha$  XbaI és a VDR BsmI gének polimorfizmusa és a szérumban a kalcium szint szoros összefüggést mutatott a prosztata daganat jelenlétével. Ezen felül a VDR genotípusai a szérumban a kalcium szinttől függetlenül is összefüggést mutattak a prosztatarákkal, amely a D vitamin közvetlen daganat ellenes hatását igazolhatja.