

Levélcím: I. sz. Belgyógyászati Klinika, 6701 Szeged, Korányi fasor 8-10.

147/2012

A kutatási terv közérdekű adatainak kivonata beavatkozással járó vizsgálatok¹ számára²

A kitöltött nyomtatvány adatait az etikai véleményt adó Regionális Kutatásetikai Bizottságnak korlátozás nélkül hozzáférhetővé kell tennie bárki számára.

A kutatás-fejlesztési tevékenység során létrejövő szellemi javakat Magyarországon több törvény is védi.³ Ugyanakkor a Helsinki Nyilatkozat 16. pontja, az Ovideoi Egyezményt hatályba léptető 2002. évi VI. törvény, és az orvosi kutatások végzéséről szóló miniszeri rendelet az emberen végzett orvosi kutatások etikus folytatása érdekében megkövetelik az etikai bizottságoktól, hogy a közvéleményt tájékoztassák az általuk véleményezett kutatások fontosabb adatairól. A közvélemény tájékoztatásának célja: az etikai bizottság munkájának nyilvánossága, a kutatások alanyai alapvető emberi jogainak biztosítása.

A 2007. III. 10-től hatályos 1/2007. (I. 24.) EüM rendelettel módosított 23/2002. (V. 9.) EüM rendelet szerint az alább felsorolt, a kutatási tervben megtalálható adatok közérdekű adatok, amelyeket bárki korlátozás nélkül megismerhet. Kérjük, hogy a szellemi alkotások oltalmának védelmét is szem előtt tartva, a nem nyilvános kutatási terv alapján töltsék ki ezt a táblázatot. A közvélemény és az alanyok tisztességes, lényegre törő tájékoztatását tartsa elsődleges szempontnak. A kutatási terv szakmai-etikai jóváhagyása után, az etikai bizottság a saját honlapján minden érdeklődő számára közzé teheti az itt megadott közérdekű adatokat. **Szakmai vagy szolgálati titoknak minősülő, illetve a kutatás érdekeit veszélyeztető adatot ne közöljön!**

A téma megnevezése (nem kell, hogy megegyezzen a kutatási protokoll címével)

A fej-nyak régió vírus indukálta daganatai és a méhnyakrák, valamint genitális fekélyek együttes előfordulásának vizsgálata életközösségekben.

A kérelem iktatási száma:

147/2012

A kérelmező neve, munkaköre és beosztása: Prof. Dr. Nagy Katalin- egyetemi tanár, Dr. Buzás Krisztina-tudományos főmunkatárs

1. A kutatás célja, indokoltsága és várható eredményének összefoglalása

1. Munkahipotézis:

Mind az Epstein-Barr (EBV), mind pedig a human papillomavírus (HPV) kóroki szerepe jól ismert az epitheloid tumorok kialakulásában Ugyanakkor ezen vírusok pontos szerepe a szájüregi

¹ A 23/2002. (V. 9.) számú EüM rendelet 20/B. § g) és h) pontjai szerint:

g.) *beavatkozással járó vizsgálat (interventional trial)*: fizikai beavatkozással járó orvostudományi kutatás és minden olyan beavatkozással járó kutatás, amely a vizsgálati alany lelki egészségére nézve kockázattal jár

² Ez a nyomtatvány a 23/2002. (V. 9.) számú EüM rendelet 8. § (3) és (4) bekezdéseinek 2008. szeptember 1-jén hatályos szövege alapján készült.

³ A találmányok szabadalmi oltalmáról szóló 1995. évi XXXIII. törvény, a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. törvény.

squamosus carcinomákban kialakulásában tisztázatlan.

Feltételezzük, hogy azokban a párkapcsolatokban, ahol az **egyik félnek igazoltan vírus (HPV, EBV) okozta tumoros elváltozása van a fej-nyak régióban, a másik fél nagyobb valószínűséggel betegszik meg, ezen vírus(ok) okozta rákban** (pl.: HPV okozta méhnyakrákban) illetve gyakoribb lehet a genitális területeken EBV indukálta fekély, **mint amennyi a normál populációban prediktálható lenne**. Ugyanakkor vizsgálható lenne az EBV kóroki szerepe HPV negatív méhnyakrák esetén is.

2. Célkitűzéseink:

1. Kérdőíveztetéssel a lehető legnagyobb alaposággal feltárni a Fogorvostudományi Karon fej-nyak régió daganatos elváltozásával diagnosztizált betegek és hozzátartozók kórtörténetét, különös tekintettel a szexuális partner genitális tájékán fellelhető kóros elváltozásokra.
2. A beteg hozzátartozójának adminisztratív lekövetése daganatos megbetegedések szempontjából.
3. Szájüregi és cervix mikrobiológiai minták gyűjtése, beleértve bakteriális és virológiai mintákat is.
4. A mikrobiológiai minták archiválása.
5. A betegek mikrobiológiai mintáinak feldolgozása nagy áteresztő képességű technikák segítségével.

3. Vizsgálat várható időtartama: 36 hónap

4. Vizsgálat helye: Szegedi Tudományegyetem, Fogorvostudományi Kar, Szájsebészeti tanszék, Szeged, 6720, Tisza Lajos krt. 64.

5. Vizsgálatba bevonni kívánt személyek:

A vizsgálatokban 3 csoportot képezünk.

A vizsgálandó csoportunk minimálisan 15 fő/csoport.

1. Fej-nyak régió daganatos csoport:

45-70 éves férfiak, hölgy társukkal élnek párkapcsolatban minimum 5 éve vagy életük során minimum 20 nővel volt szexuális kapcsolatuk, a fej-nyak régió daganatával illetve szájüregi laphámrákkal diagnosztizáltak ami lehet in situ, vagy bármilyen magasabb stádiumban levő megbetegedés.

Kontroll csoport 1.

45-70 éves férfiak, hölgy társukkal élnek párkapcsolatban minimum 5 éve vagy életük során minimum 20 nővel volt szexuális kapcsolatuk, nem daganatos jellegű szájnyálkahártya elváltozással vagy fogászati problémával (fibroma, mucokela, oropyrosis stb.) diagnosztizáltak.

Kontroll csoport 2.

45-70 éves férfiak, hölgy társukkal élnek párkapcsolatban minimum 5 éve vagy életük során minimum 20 nővel volt szexuális kapcsolatuk, fogászati problémával diagnosztizáltak szájnyálkahártya elváltozásai nélkül.

Beleegyező nyilatkozatot kérünk minden páciensről.

A kérdőívet mellékletként csatoltuk. Humán genetikai anyagon DNS manipulációt érintő vizsgálatokat, kísérleteket nem végzünk.

2. A kutatás tudományos megalapozottságát, indokoltságát megalapozó irodalmi hivatkozások megjelölése (elegendő a kutatás irányát jelző néhány irodalmi hivatkozás)

Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. *N Engl J Med*. 2007 May 10;356(19):1944-56.

Curado MP, Hashibe M. (2009) Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 21:194-200.

Greenman J, Duffield J, Spencer P *et al* (2004). Study on the organoleptic intensity scale for measuring oral malodor. *J Dent Res* 83: 81–85.

Haraszthy VI, Gerber D, Clark B, Moses P, Parker C, Sreenivasan PK, Zambon JJ. (2008) Characterization and prevalence of *Solobacterium moorei* associated with oral halitosis. *J Breath Res*. 2:017002. Epub 2008 Feb 7.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. (2007) *CA Cancer J Clin* 2007;57:43–66.

Rosenberg M, Kulkarni GV, Bosa A *et al* (1991). Reproducibility and sensitivity of oral malodour measurements with a portable sulphide monitor. *J Dent Res* 70: 1436–1440.

3. A résztvevők toborzásának, beválasztásának, kizárásának rendszere

Beválogatási szempontok: lásd 4. pont

Kizáró kritériumok:

Professzionális profilaxis egy hónapon belül.

Szisztematikus antibiotikus terápia egy hónapon belül.

Szignifikáns orvosi állapot.

Terhesség.

Hosszú gyógyszeres terápia vagy antibiotikumos profilaxis.

Rendszeres szájöblítő használata egy hónapja.

4. A kutatásba bevinni kívánt résztvevők száma (összesen és kutatóhelyenként), neme, életkora

A vizsgálatokban 3 csoportot képezünk.

A vizsgálandó csoportunk minimálisan 15 fő/csoport.

1. Fej-nyak régió daganatos csoport:

45-70 éves férfiak, hölgy társukkal élnek párkapcsolatban minimum 5 éve vagy életük során minimum 20 nővel volt szexuális kapcsolatuk, a fej-nyak régió daganatával illetve szájüregi laphámrákkal diagnosztizáltak ami lehet in situ, vagy bármilyen magasabb stádiumban levő megbetegedés.

Kontroll csoport 1.

45-70 éves férfiak, hölgy társukkal élnek párkapcsolatban minimum 5 éve vagy életük során

minimum 20 nővel volt szexuális kapcsolatuk, nem daganatos jellegű szájnyálkahártya elváltozással vagy fogászati problémával (fibroma, mucocela, oropyrosis stb.) diagnosztizáltak.

Kontroll csoport 2.

45-70 éves férfiak, hölgy társukkal élnek párkapcsolatban minimum 5 éve vagy életük során minimum 20 nővel volt szexuális kapcsolatuk, fogászati problémával diagnosztizáltak szájnyálkahártya elváltozásai nélkül.

Beleegyező nyilatkozatot kérünk minden páciensstől.

A kérdőívet melléleként csatoltuk. Humán genetikai anyagon DNS manipulációt érintő vizsgálatokat, kísérleteket nem végzünk.

5. A kutatás módszerei

Mikrobiológiai protokoll:

Mintavétel és protokoll a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok elvégzéséhez:

Bakteriológiai vizsgálathoz minták gyűjtése a szájnyálkahártyáról:

A mintákat 2 cm² nyálkahártya-terület steril tamponnal való áttörésével nyerjük. Mind a tumoros mind az ép felszínről mintát veszünk. A tamponokat steril transzport táptalajba helyezve juttatjuk 4 órán belül a mikrobiológiai laboratóriumba.

Bakteriális minták vizsgálata:

A transzport közegből 1 ml-t húsos bouillion-ba viszünk, azt lezárjuk vazelinnel 24 órás 35°C-on történő tenyésztéssel a kultúra optikai denzitását 590 nm-en meghatározzuk. Az előinkubálás után kioltásokat végzünk a következő szilárd táptalajokra: birkavér tartalmú agar (aerob), főtt véres agar (aerob), eozin-metilénkék agar (aerob) a gram-negatív pálcákhoz, és phenylethyl alkohol (PEA) vagy colistin-naladixsav (CNA) véres agar a gram pozitív coccusok jelenléte miatt, valamint Sabouraud agar a gombák jelenlétének kimutatására. Anaerob tenyésztésre kioltást végzünk anaerob véres agar, vanomycin-kanamycin lizált véres agar, CNA agar felületére. Az aerob lemezeket normál légköri körülményekés 5–10% széndioxid koncentráció mellett inkubáljuk legalább 2-5 napig (a vizsgálat irányától függően), az anaerob lemezeket min. 5 napig inkubáljuk anaerob chamberben. A tenyésztéses vizsgálatok eredményről fotodokumentáció készül és a húsos bouillionban felszaporított 24 órás tenyészetből 1 ml-t -70°C-on archiválunk betegazonosító számok alapján későbbi molekuláris vizsgálatokhoz. A mikrobiológus a primokultúrák esetén meghatározza a flóraösszetételt telepmorfológia és alap biokémiai reakciók segítségével.

Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok:

Identifikáláshoz, esetlegesen rezisztens mikroorganizmusok kiszűrése céljából a flórából kiválasztott izolátumok antibiotikum érzékenységét aerob és anaerob mikroorganizmusok esetén agar diffúziós vagy gradiens diffúzió (E teszt) módszerrel végezzük Mueller-Hinton vagy vértartalmú agaron adott mikroorganizmus csoportra specifikusan összeállított antibiotikum korongokkal a EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testin Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 2.0) ajánlásai alapján.

Izolátumok hemolítikus, lipolítikus és proteolítikus aktivitásának meghatározása:

Az enzimatis aktivitás meghatározásához az izolátumokat tryptone-szója agaron (TSA) 37°C-on 24 órát inkubáljuk. Hemolítikus aktivitás meghatározásához: a törzseket 48 h keresztül inkubáljuk 37°C-on 5% (v/v) birka vérrel kiegészített TSA agaron. Lipolítikus aktivitás: Tween 20 (T20) agaron (pepton, 10 g/l; NaCl, 5 g/l; CaCl₂, 0,1 g/l; agar, 20 g/l; Tween 20, 1 mL/liter) inkubáljuk a törzseket 37°C, 72 h-n keresztül. Lipáz aktivitást az előző táptalajon határozzuk meg a precipitáció mértékéből (zóna átmérőket hasonlítjuk össze). Proteolítikus aktivitást módosított

TSA mediumban (TSAM : TSA, 40 g/l; zselatin, 7,5 g/l; agar, 20 g/l), 37°C-on 18-20 órás inkubálás után határozzuk meg. A képződő ammónium-szulfát által kicsapódott fehérje mennyiségéből határozható meg a proteolitikus aktivitás (zónaátmérők alapján).

Mintavétel és protokoll a molekuláris biológia vizsgálatokhoz:

Vírus minták:

Invazív beavatkozást kísérletes munkák kivitelezéséhez nem végzünk.

Mintavétel:

1. A diagnózis felállításához szükséges szövettani minták főlegessé vált részéből illetve a terápiás céllal eltávolított daganatszövetből virális elemek azonosítását végezzük el.

2. Szájöblítés:

10mL SCOPE® szájöblítő folyadékkal a vizsgálandó személlyel szájöblítést végeztetünk. A szájba vett folyadékkal 30 másodpercig kell öblögetni, a folyadékot steril edénybe kiköpní majd az így nyert mintát -80 °C-on szállításig tárolni. A feldolgozás körülményeit lsd. Bakteriális minták rész alatt.

Az onkogén vírusok jelenlétét PCR technikával igazoljuk. A daganatszövetből virális örökítőanyagot izolálunk majd specifikus primerek segítségével a vírusra jellemző génszakaszt felamplifikáljuk.

Baktérium minták:

A baktériumokat (nyelvről lekapart közvetlen klinikai minták) TE pufferben (10 mM TRIS, pH 8, 100 mM EDTA) reszuszpendáljuk és a bakteriális DNS-t izoláljuk. Módosított protokollt "Modified Protocol" használunk Ready-Lyse™ Lysozyme Solution (Epicentre, Cat. No. R1802M), melyben egy éjszakán át inkubáljuk és utána MasterPure DNA Purification Kit-et használunk (Epicentre, Cat. No. MCD85201).

Az izolált DNS-t elküldjük a "Human Microbe Identification Microarray laboratory"-ba (Forsyth Dental Center). Legalább 200 ng-ot, minimum 20 ng/μl koncentrációjú genomikus DNS mintát 0,5 ml-es vagy 1,5 ml-es Eppendorf csőben. A mintákat -80 °C fagyasszuk. A fagyasztott mintákat száraz jégen szállítjuk a feldolgozó helyre.

A "HOMIM" olyan kifejlesztett technológia, amely komplex orális mikrobiológiai eltéréseket képes vizsgálni hibridizációval (azaz szimultán képes detektálni 300 az orális flórában domináns baktériumot faj szinten, beleértve a nem tenyészhető phylotípusokat is).

A 16S rRNS-alapú, reverse-capture oligonukleotid próbákat (tipikusan 18-tól 20 bázisig) aldehidkezelt üveglapra nyomtatják. A 16S rRNS géneket PCR-ral sokszorosítják 16S rRNS univerzális forward és reverse primereket használva, amelyeket Cy3-dCTP-vel jelölik a második "nested" PCR során. A jelölt 16S amplikonokat egy éjszakán át hibridizálják az üveglapon lévő próbákhoz. Mosás után a "microarray" üveglapokat mossák, majd scannelik Axon 4000B scannerrel és a nyers adatokat kinyeréséhez GenePix Pro software használnak. Az adatokat normalizálják úgy, hogy az egyes individuális (jeleket) szignálokat az átlagos univerzális próbához hasonlítják.

Az individuális HOMIM szignálokat "bar code" formátumba konvertálják és normalizálják az egyes individuális szignálokat az átlagos univerzális próbához. A vonalakat viszonyítjuk a jelenlétükhöz vagy a nem jelenlétükhöz és jelöljük 0, 1+, 2+, 3+, 4+ or 5+-val. Így az intenzívebb vonal nagyobb mennyiséget jelent a megadott species számára. A különbségek és a hasonlóságok jól láthatók. A mintákat ezután csoport (cluster) analízisnek vetjük alá. A csoport analízis program szétválasztja a profilokat, így össze lehet hasonlítani a mikroflórákat a kiválasztott csoportnál.

Ez egy kollaborációs szándék javaslat a School of Dental Medicine at Buffalo, NY, USA és a University of Szeged Faculty of Dentistry között. A pácienseket Szegeden vizsgálják és válasszák ki. Klinikai adatokat gyűjtenek. A nyelvről begyűjtött mintákat Buffalo-ba küldik a további analízis céljából.

6. A kedvezőtlen események és a súlyos nemkívánatos események lehetősége, a bekövetkezésük esetén a követendő eljárások

A betegcsoportoknál (lásd 2/5. pont) diagnosztikai illetve a szükséges terápiás eljáráshoz elengedhetetlen beavatkozáson kívül kizárólag kutatási céllal nem történik mintavételezés így többlet terheléssel sem jár.

Egészséges kontrollok mintáinak gyűjtése sculptio kapcsán rutinszerűen preparált lebenyből történik, amely a paciens komfortérzetét és gyógyulási folyamatát nem Irontja, lassítja vagy befolyásolja.

7. A résztvevők személyes és egészségügyi adatainak kezelésével kapcsolatos intézkedések (az 1992. évi LXIII. törvény alapján)

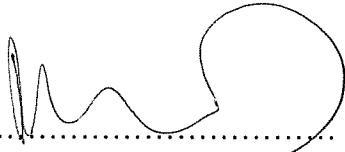
A páciensek személye kódolva lesz és nem kapcsolhatók össze a publikált eredményekkel. A kódszámok és a személy azonosság adatait a Programvezető tartja titkosítva/elzárva. A tanulmányt ellenőrizheti az Egészségtudományok Intézményes Biráló Bizottsága /*Health Sciences Institutional Review Board* /Nemzetközi Egészségügyi Tudományos Tanács vagy az NIH (National Institutes of Health) és OHRP (Office of Human Research Protection), akik feltárhatják a személyek identitását

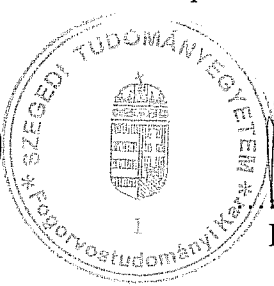
8. A kutatás során nyert adatok statisztikai feldolgozásának módszere

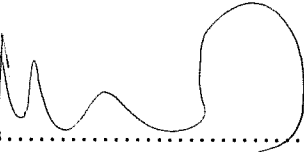
Excell és Graph Pad Prism adatfeldolgozó szoftverek segítségével

Nyilatkozom, hogy a fenti adatok nem sértik a kutatásnak a szellemi alkotások védelmére vonatkozó érdekeit és nem tartalmazznak szakmai- vagy szolgálati titkot, illetve a kutatás érdekeit veszélyeztető adatot. A fenti adatokat bárki, korlátozás nélkül megismerheti. Tudomásul veszem, hogy jóváhagyás után az RKEB a közérdekű adatokat a honlapján közzé teheti.

Szeged, 2013. ... január ... hó ... 21 ... nap


Prof. Dr. Nagy Katalin
kérelmező




Prof. Dr. Nagy Katalin
dékán