

Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani

A significance of genetic factor in initiation and progression of squamous cell carcinoma of larynx

KRZYSZTOF SZYFTER

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Klinika Otolaryngologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Prof. dr hab. Krzysztof Szyfter jest kierownikiem Zespołu Mutagenyzy w Zakładzie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu oraz pracownikiem Katedry Otolaryngologii AM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Jego badawcze zainteresowania od ponad 20 lat dotyczą mutagenyzy środowiskowej i ekogenetyki. W tym zakresie mieści się funkcjonowanie organizmu ludzkiego w genotoksycznym środowisku, łącznie z osobniczo zmienną reakcją na bodźce środowiskowe. Podstawowym obiektem badań jest aspekt molekularny etiologii i wieloetapowego przebiegu tytoniozależnego raka krtani.

Prof. K. Szyfter działa w Komisji Biologii Nowotworów PAN, przewodniczy Sekcji Mutagenyzy Polskiego Towarzystwa Genetycznego, a w roku 2001 został wybrany wiceprzewodniczącym Europejskiego Towarzystwa Mutagenyzy Środowiskowej (EEMS).

Streszczenie

Znaczenie czynników genetycznych w etiologii nowotworów krtani widać wyraźnie już w osobniczej zmienności podatności na działanie czynników kancerogennych. Treścią artykułu jest przedstawienie genów kodujących enzymy uczestniczące w kancerogenezie z podziałem na onkogeny, geny supresorowe oraz odpowiedzialne za metabolizm kancerogenów. Wobec ostatniej grupy omówiono ich genetycznie uwarunkowany, polimorficzny charakter, warunkujący indywidualnie zmienną podatność na działanie kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym. Wskazania udziału omawianych genów w procesie kancerogenezy przedyskutowano na tle uszkodzeń materiału genetycznego na poziomie DNA i chromosomów.

Słowa kluczowe: rak krtani, ryzyko genetyczne, niestabilność genetyczna.

Abstract

A significance of genetic factor in etiology of laryngeal cancer emerges when analysing a variable individual susceptibility to carcinogens. Genes coding enzymes taking part in carcinogenesis, divided on oncogenes, tumour suppressor genes and genes responsible for carcinogen metabolism are reviewed. The latter group is discussed in relation to their genetically determined polymorphic character responsible for an individually variable response to carcinogens present in tobacco smoke. A role of particular reviewed genes is discussed further in connection with a pattern of DNA lesions and chromosome aberrations.

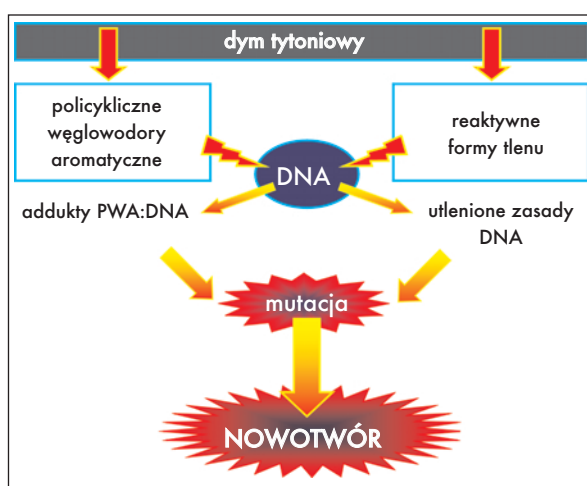
Key words: laryngeal cancer, genetic risk, genetic instability.

(*Postępy w chirurgii głowy i szyi* 2002; 1: 5–19)



Nowotwory krtani (ogólniej: nowotwory głowy i szyi) nie są zaliczane do chorób nowotworowych o uwarunkowaniu genetycznym czy chociażby rodzinnym. Niemniej komponenta genetyczna w kształtowaniu ryzyka wystąpienia nowotworu krtani istnieje [1, 2], a celem artykułu jest zwrócenie uwagi na ten aspekt. Dotyczy to nie tylko indywidualnego ryzyka wystąpienia tej choroby, ale także zmienności jej przebiegu. Wiedza dotycząca tego zagadnienia nie jest jeszcze ostateczna, ale ustalenia dokonane technikami biologii molekularnej, epidemiologii molekularnej oraz genetyki przyniosły znaczący postęp w rozumieniu wieloetapowego procesu, jaki ma miejsce w przypadku raka krtani [2–7]. Jednym z efektów badań molekularnych i genetycznych jest uzyskanie poglądu (niekiedy wstępnego), tłumaczącego w dosyć jednolity sposób rolę niektórych genów i ich ekspresji w polimorficznym charakterze odpowiedzi na ekspozycję na kancerogeny [3, 7, 8].

W powszechnym rozumieniu, uszkodzenia materiału genetycznego decydują o przenoszeniu danej wady z pokolenia na pokolenie. Stwierdzenie to jest prawdą, jeżeli dotyczy uszkodzeń w obrębie komórek rozrodczych. Natomiast uszkodzenie DNA lub chromosomów w komórkach somatycznych – stanowiących znakomitą większość organizmu – skutkuje zakłóceniem przekazu informacji genetycznej tylko na niekorzyść osoby, u której wystąpiło i nie jest przekazywane. Efektem takiego wadliwego przekazu informacji jest niewłaściwe funkcjonowanie komórki, prowadzące dalej do przedwczesnego starzenia, mutacji *cichych*, pozbawionych bezpośrednich skutków funkcjonalnych i mutacji uruchamiających proces kancerogenezy. Przy rozważaniu roli czynnika genetycznego w zapadalności na nowotwory należy posługiwać się poszerzonym pojęciem wpływu genów na funkcję komórki.



Ryc. 1. Mechanizm indukcji nowotworów pod wpływem kancerogenów dymu tytoniowego

Epidemiologiczne wskazania znaczenia czynnika genetycznego w kształtowaniu ryzyka zapadalności na nowotwory głowy i szyi

Bardzo jednoznaczne rozpoznanie **palenia papierosów** jako głównego czynnika etiologicznego odpowiedzialnego za wystąpienie raka krtani (ryc. 1.) nie zamyka problemu etiologii tego nowotworu lecz zawiera w sobie kolejne pytanie o **udział indywidualnej podatności** na szkodliwe działanie dymu tytoniowego. Chociaż palenie papierosów czyni się odpowiedzialnym za wystąpienie co najmniej 35% wszystkich nowotworów, to nawet w grupie intensywnych palaczy papierosów tylko u części z nich rozwijają się nowotwory [9, 10]. Równocześnie porównanie wywiadów na temat palenia papierosów przez chorych pokazuje, jak zróżnicowana była intensywność nałogu przed wystąpieniem choroby.

Przekonywujące badania epidemiologiczne nad rodzinnym uwarunkowaniem występowania płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi przedstawili Copper i wsp. [11]. Określono częstość występowania nowotworów u 618 krewnych 108 chorych z rakiem górnych dróg oddechowych; grupę odniesienia stanowiła grupa 619 osób niespokrewnionych z chorymi. Stwierdzono 3,5-krotnie większe wystąpienia nowotworów górnych dróg oddechowych u krewnych, podczas gdy u rodzeństwa ryzyko wzrastało aż 14,6-krotnie. Wnioskiem autorów jest stwierdzenie, że czynnik genetyczny jest ważnym elementem ryzyka wystąpienia nowotworów górnych dróg oddechowych. Tego samego zagadnienia dotyczy wcześniejsza publikacja Bondy i wsp. [12]. Obserwacje epidemiologiczne uzupełniono określeniem współczynnika wrażliwości na mutageny (por. rozdział *Niestabilność chromosomowa...*). Stwierdzono, że dziedziczna, a więc występująca rodzinnie, podwyższona wrażliwość na mutageny znacznie podnosi ryzyko wystąpienia nowotworów górnych dróg oddechowych. Autorzy interpretują własne wyniki jako pełną zgodność z teorią dwóch zdarzeń Knudsona (por. rozdział *Rola protoonkogenów...*). Wyniki te znalazły potwierdzenie w późniejszej publikacji tego samego ośrodka, która porównuje występowanie nowotworów u krewnych chorych na nowotwory głowy i szyi (170 osób) oraz u krewnych osób zdrowych (175 osób). Po uwzględnieniu innych czynników ryzyka (palenie tytoniu, picie alkoholu, wiek, płeć) obliczono, że ryzyko wystąpienia nowotworów u krewnych osób chorych na raka jest 3,8-krotnie większe niż u krewnych osób zdrowych. Ryzyko ulegało multiplikacji u osób o zwiększonej wrażliwości na mutageny [12].

Wnioski wyprowadzone z badań nad etiologią nowotworów głowy i szyi, a zwłaszcza wskazania na rolę indywidualnej podatności na działanie kancerogenów do-



przewodzą do podjęcia badań nad identyfikacją czynników genetycznych na różnych poziomach organizacji materiału genetycznego – od DNA do chromosomów.

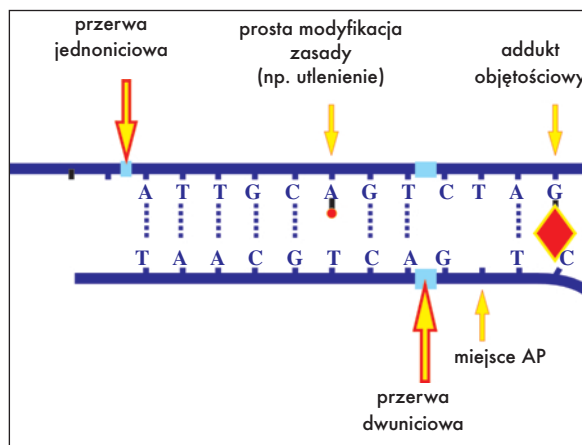
Niestabilność chromosomowa jako przykład genetycznego zróżnicowania populacji ludzkiej

Zróżnicowanie genetyczne populacji ludzkiej, znane także pod nazwą **polimorfizmu genetycznego**, zostało systematycznie przebadane pod kątem niestabilności chromosomowej, stanowiącej odbicie szerszego pojęcia, a mianowicie niestabilności genetycznej. Uważa się, że niestabilność chromosomowa jest ukrytą, dziedziczną cechą konstytutywną, która ujawnia się dopiero w warunkach kontaktu z mutagenem (kancerogenem). Do ilościowego pomiaru niestabilności chromosomowej w laboratorium T. C. Hsu (Houston, Texas, USA) opracowano tzw. test bleomycynowy, oparty na 2 założeniach:

- ▶ komórkami reprezentatywnymi dla całego organizmu są łatwe do pozyskania leukocyty krwi obwodowej,
- ▶ podatność na działanie bleomycyny indukującej w limfocytach różnorodność uszkodzeń DNA (przerwy jedno- i dwuniciowe, miejsca apurynowe) i aberracji chromosomowych można traktować jako wrażliwość na większość mutagenów.

Test polega na hodowli leukocytów *in vitro*, podaniu bleomycyny w końcowej fazie hodowli i ilościowej ocenie skutków ekspozycji na bleomycynę. Oceniane są 2 parametry: liczba pęknięć chromatyd na komórkę (ang. *b/c* = *breaks per cell*) oraz udział procentowy komórek z uszkodzonymi chromosomami w całej puli badanych komórek [14]. We wczesnej fazie badań stwierdzono, że test bleomycynowy wykazuje szczególną przydatność w badaniu podatności na nowotwory, będące wynikiem ekspozycji na mutageny środowiskowe, w czym całkowicie mieszczą się nowotwory głowy i szyi.

Pierwszym ustaleniem było spostrzeżenie znacznego rozrzutu wartości współczynnika *b/c*, przy czym wartość średnia obliczana dla chorych na raka przewyższała obliczaną dla grupy kontrolnej. Rozkład wartości *b/c* w grupie chorych na nowotwory nie miał charakteru gaussowskiego, a przynajmniej wg niektórych badań nabierał charakteru rozkładu bimodalnego. Uwagę zwracała grupa pacjentów o najwyższych wartościach współczynnika *b/c*, której przypisywano cechę hiperniestabilności chromosomowej. Zauważono, że z tej grupy pochodzą chorzy, u których występują drugie pierwotne nowotwory i często występują wznowy [15, 16]. Ponadto stwierdzono, że wysokie współczynniki niestabilności cechują młodych dorosłych chorych na nowotwory głowy i szyi [17]. Więk-



Ryc. 2. Uszkodzenie cząsteczki DNA pod wpływem kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym (przerwy jedno- i dwuniciowe, addukty objętościowe, produkty utleniania, zjonizowane zasady azotowe, miejsca apurynowe)

szość autorów donosi o przydatności oznaczania współczynniki *b/c* do oceny ryzyka wystąpienia raka krtani [18], ale jednocześnie kwestionuje jego użyteczność do celów prognostycznych [19]. Sprawa ta wymaga jeszcze wyjaśnienia.

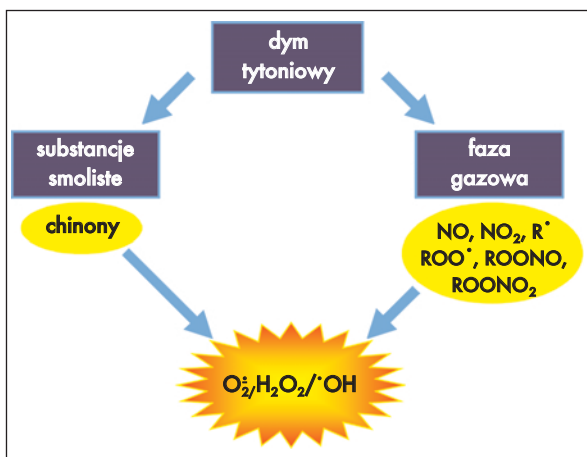
W ten sposób pojęcie niestabilności chromosomowej pozwoliło na powiązanie oceny ryzyka ze strukturą i funkcjonowaniem materiału genetycznego [18, 20].

Warto dodać, że metodykę pracy za pomocą testu bleomycynowego ostatnio znacznie rozbudowano, wskazując na celowość wykorzystania innych komórek (np. keratynocytów) i kancerogenów (np. benzo(a)piren), lepiej oddających inicjację kancerogenezy w komórkach nabłonkowych regionu głowy i szyi [14, 18]. Te propozycje znacznie poszerzyły możliwości badawcze. Ponadto oceny niestabilności genetycznej nie opiera się już wyłącznie na teście bleomycynowym, lecz wprowadzono też inne techniki badawcze (m.in. elektroforezę żelową pojedynczych komórek – ang. *comet assay*), z powodzeniem stosowane w badaniach nad biologią nowotworów górnych dróg oddechowych [21].

Kancerogeny w etiologii nowotworów krtani

Proces powolnego i niepełnego spalania tytoniu prowadzi do utworzenia dymu, w którym zidentyfikowano prawie 4 tys. związków chemicznych [9]. Właściwości mutagenne i kancerogenne dymu tytoniowego wynikają przede wszystkim z obecności następujących grup związków: policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PWA), amin aromatycznych (AA), N-nitrozoamin oraz reaktywnych form tlenu (ROS). Wymienione kancerogeny znajdują się zarówno w dymie unoszącym się z żarzącego się końca papierosa





Ryc. 3. Obecność i rodzaj reaktywnych form tlenu w dymie tytoniowym

(strumień boczny), jak i w dymie wdychanym przez palacza (strumień główny). Co prawda, coraz powszechniej stosowane filtry zmniejszają stężenie wdychanych kancerogenów – głównie przez przechwytywanie substancji smolistych – ale nie likwidują ekspozycji na kancerogeny. Zawartość niektórych kancerogenów w strumieniu bocznym może przewyższać ich stężenia w strumieniu głównym, co dobitnie zwraca uwagę na rolę tzw. biernego palenia [22].

Kancerogeny penetrują komórki i dostają się do jądra komórkowego, gdzie mogą oddziaływać destrukcyjnie z materiałem genetycznym (ryc. 2.). Oddziaływanie polega na reakcji chemicznej cząsteczki kancerogenu z elementami struktury DNA i trwałym ich uszkodzeniu. Efektem reakcji PWA i AA jest dobudowanie kancerogenu do reszty guaninowej, a produkt nazywany jest adduktem kancerogen:DNA. N-nitrozoaminy alkilują resztę guanozyny, wprowadzając na jeden z atomów azotu dodatkowy ładunek dodatni.

Z czterech podstawowych zasad azotowych DNA najbardziej wrażliwa na uszkodzenia jest guanina. ROS uszkadzają poprzez utlenianie wszystkie cztery zasady. Ponadto ROS (ryc. 3.) znajdują się zarówno w fazie gazowej, jak i w substancjach smolistych i to w ilościach znacznie przewyższających poziom innych kancerogenów. Dlatego ekspozycja na ROS wydaje się być najgroźniejsza dla komórki.

Konsekwencją uszkodzeń DNA przez kancerogeny jest zakłócenie funkcjonowania DNA poprzez:

- ▶ niewłaściwe parowanie zasad DNA, a więc nieprawidłowe przekazywanie informacji genetycznej,
- ▶ blokowanie dostępności do cząsteczki DNA enzymom uczestniczącym w procesach replikacji DNA i biosyntezy białka,
- ▶ zwiększanie niestabilności cząsteczki DNA, co prowadzi do zwiększenia podatności na kolejne uszkodzenia [23-25].

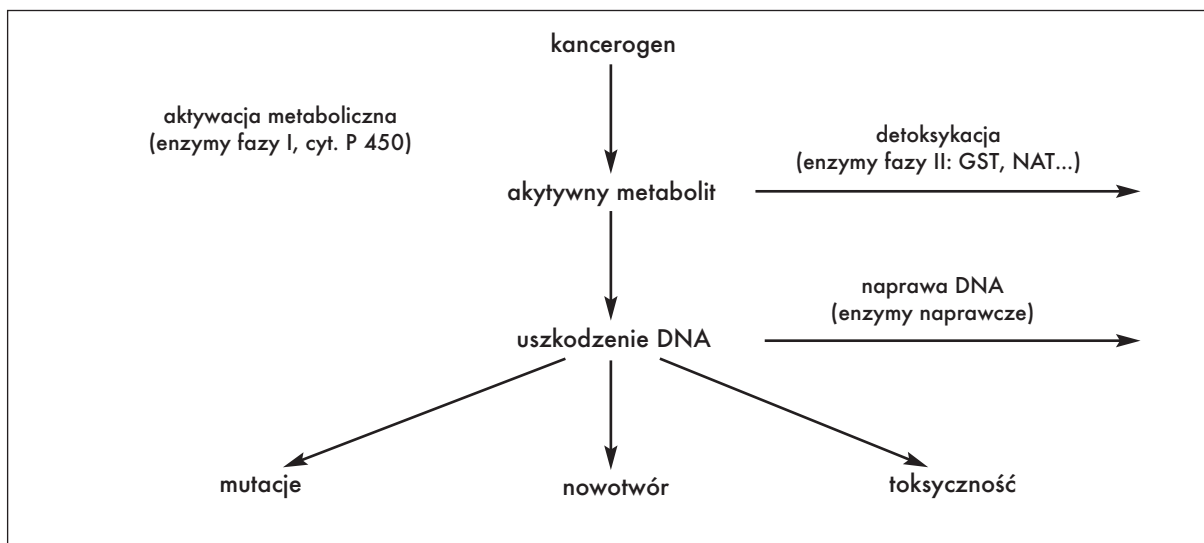
Uszkodzenia DNA znajdowane są we wszystkich tkankach organizmu ekspozowanego na kancerogen. Przykładowo u chorych na raka krtani stwierdzano obecność adduktów PWA:DNA w materiale pochodzącym z nowotworu, w otaczającej nowotwór tkance prawidłowej histologicznie oraz w leukocytach krwi obwodowej [26, 27]. Również guanozyna alkilowana w wyniku ekspozycji na N-nitrozoaminy występowała w tych trzech wymienionych tkankach [28]. Ogólnie, wyższe poziomy adduktów DNA stwierdzano w tkance ekspozowanej bezpośrednio (jama ustna, krtani) niż pośrednio (pęcherz moczowy, leukocyty krwi obwodowej) [29]. Natomiast w obrębie głowy i szyi w badaniach własnych stwierdzono malejący kolejno poziom adduktów PWA: DNA, przechodząc od części ustnej gardła do jamy ustnej i dalej do krtani, co wydaje się odpowiadać intensywności ekspozycji na dym tytoniowy [30]. Warto tu dodać, że poziom adduktów amin aromatycznych oznaczonych w materiale uzyskanym z nowotworów krtani koreluje lepiej z intensywnością palenia papierosów niż poziom adduktów PWA:DNA [31]. Można to tłumaczyć wszechobecnością policyklicznych węglodorów aromatycznych, które – poza papierosami – znajdują się także w spalinach samochodowych, wyziewach przemysłowych, a nawet kuchennych.

Obecność adduktów DNA jest niewątpliwie dowodem uprzedniego kontaktu z kancerogenami. Powstaje zatem pytanie, czy stwierdzenie ich obecności dowodzi podjęcia procesu kancerogenezy. Odpowiedź na to pytanie jest negatywna z dwóch względów. Po pierwsze, komórki posiadają bardzo sprawny mechanizm wykrywania i usuwania uszkodzeń, znany jako proces naprawy DNA, przywracający normę fizjologiczną. Po drugie, uszkodzenia DNA oznacza się w całym genomowym DNA [29]. Jednak względnie niska tolerowana liczba uszkodzeń DNA nie przewyższa poziomu $1/10^7$ adduktów PWA, AA lub N-nitrozoamin, a liczba uszkodzeń oksydacyjnych jest o 1–2 rzędy wyższa. Ponieważ znakomita większość cząsteczki DNA nie zawiera regionów kodujących (genów), to uszkodzenia w tych rejonach mogą nie prowadzić do znaczących konsekwencji. Ponadto tylko część genów jest bezpośrednio zaangażowana w proces kancerogenezy i tylko uszkodzenia w ich obrębie uruchamiają proces kancerogenezy (por. rozdział *Rola protoonkogenów...*) [1, 2, 7, 23, 24]. Choć uszkodzenia utrwalone w postaci mutacji można identyfikować w poszczególnych genach, to do tej pory nie opracowano metodyki wykrywania w nich daleko liczniejszych uszkodzeń DNA.

Enzymy uczestniczące w metabolizmie kancerogenów

Kancerogeny chemiczne jako substancje obce są usuwane z komórki (organizmu) w trakcie procesu de-





Ryc. 4. Metabolizm kancerogenów w komórce – udział enzymów aktywacyjnych, detoksykacyjnych i naprawczych

toksykacji. Organem wyspecjalizowanym w usuwaniu obcych substancji jest wątroba. Proces detoksykacji kancerogenu jest dwuetapowy (ryc. 4.). Pierwszy etap nazywany **aktywacją metaboliczną** polega na zmianie właściwości fizykochemicznych cząsteczki w kierunku (i) zwiększenia jej rozpuszczalności i (ii) nadania jej cechy reaktywności chemicznej. Aktywacja metaboliczna przebiega przy udziale enzymów aktywacyjnych, które należą do licznej rodziny białek zależnych od cytochromu P450. Mnogość enzymów tej grupy wiąże się z daleko posuniętą specjalizacją. Przykładowo, gen *CYP1A1* koduje białka aktywujące policykliczne węglowodory aromatyczne, *CYP1A2* aminy aromatyczne, *CYP2D6* N-nitrozoaminy, a *CYP3A7* aflatoksyny [7, 32, 33].

Dopiero aktywowany kancerogen staje się substratem dla enzymów aktywacyjnych. Do tej grupy należą transferazy S-glutationu, N-acetylotransferazy, sulfo-transferazy, glukorynidazy, hydrolazy epoksydów i inne. Zadaniem tych enzymów jest sprzężanie aktywowanych kancerogenów, wydalanie z komórki i ostatecznie usuwanie wraz z moczem z organizmu. Enzymy detoksykacyjne nie posiadają tak zaawansowanej specyficzności i brak niektórych z nich może być kompensowany aktywnością innych [33–35].

Ubocznym skutkiem aktywacji metabolicznej kancerogenu jest jego reaktywność wobec DNA. Aktywowany, a nie usunięty na czas kancerogen reaguje z DNA, co omówiono w rozdz. *Kancerogeny w etiologii nowotworów krtani*. Jednakże powstanie uszkodzeń cząsteczki DNA powoduje natychmiastowe uruchomienie procesu naprawy, którego zadaniem jest przywrócenie stanu wyjściowego. Poznanie **procesu naprawy DNA** jest zaawansowane. Ustalono, że istnieje kilka mechanizmów naprawy DNA dostosowanych do typu uszkodzenia, a nawet jego poziomu oraz stanu funkcjonalnego komórki. Tym samym grupa en-

zymów uczestniczących w procesie naprawy DNA jest dosyć rozległa i liczy co najmniej kilkadziesiąt białek (ostatnie szacunki mówią o ok. 150 białkach). Najogólniej można je podzielić na białka rozpoznające uszkodzenie, odpowiedzialne za właściwe usunięcie uszkodzenia i białka współdziałające [33, 36].

Zarówno dwuetapowa detoksykacja, jak i naprawa uszkodzeń DNA w normie przebiegają sprawnie. Dlatego wystąpienie i kumulacja mutacji DNA inicjuje proces kancerogenezy, mimo że jest to najmniej prawdopodobny scenariusz. Innymi konsekwencjami nagromadzenia mutacji są: śmierć komórki, przyspieszenie starzenia i indukcja nienowotworowych chorób somatycznych (ryc. 4.). Jednakże zróżnicowanie wydajności wymienionych trzech procesów enzymatycznych, występujące w populacji ludzkiej, decyduje o różnej sumarycznej sprawności usuwania kancerogenów lub wywołanych przez nie uszkodzeń materiału genetycznego i tym samej różnej podatności na rozwój nowotworów. Temat ten zostanie omówiony w następnym rozdziale.

Genetyczna determinacja aktywności enzymatycznej

Wszystkie 3 grupy enzymów odpowiedzialnych za metabolizm kancerogenów cechuje polimorficzne zróżnicowanie aktywności [7, 33]. O ile jednak farmakogenetyka od dawna stykała się ze zróżnicowaniem aktywności enzymatycznej leków metabolizujących leki, to rozkład aktywności w populacji obrazowała krzywa Gaussa. Tymczasem przynajmniej dla części enzymów odpowiedzialnych za metabolizm kancerogenów populacyjny rozkład aktywności jest bi- lub trimodalny. Oznacza to, że istnieją odrębne populacje oparte na obecności izoenzymów, kodowanych przez warianty



strukturalne genu. Sprowadza się to do faktu, że populacje o niskiej, średniej i wysokiej aktywności danego enzymu różnią się statusem genetycznym. Przy znanej w biologii zaawansowanej zależności między strukturą a funkcją można oczekiwać, że nawet nieznaczne różnice strukturalne prowadzą do istotnej zmiany funkcji aż po całkowity brak aktywności enzymatycznej. W omawianej sytuacji zmiana struktury genu (czasami nawet brak lub substytucja jednego (!) nukleotydu) może doprowadzić do tego, że syntezowane na jego matrycy białko jest skrócone w stosunku do prawidłowego, ulega szybkiemu rozpadowi lub, po prostu, jego aktywność enzymatyczna jest obniżona. Logicznym zatem wydaje się, że zwiększenie podatności na działanie kancerogenu będzie cechowało osoby o wyższej aktywności enzymów aktywacyjnych oraz obniżonej sprawności enzymów detoksykacyjnych i naprawczych.

Różnice aktywności enzymatycznej omawianych enzymów mogą być znaczne. Donosi się o zróżnicowaniu aktywności enzymów aktywacyjnych sięgającej dziesiątków tysięcy, setek, do tysiąca w przypadku enzymów detoksykacyjnych i względnie najniższym zróżnicowaniu aktywności enzymów naprawczych. Ta ostatnia grupa jest jeszcze najmniej rozpracowana.

W licznych badaniach opisano związek między aktywnością enzymów metabolizujących kancerogeny a ryzykiem wystąpienia nowotworu. Zdanie to wymaga komentarza. Po pierwsze, aby dokładniej odnieść się do statusu genetycznego analizowano rozkład genotypów tych enzymów, porównując udział tych, które determinują wysoką aktywność enzymów aktywacyjnych i niską sprawność procesów detoksykacji i naprawy DNA. Oczywistym założeniem było, że taki układ enzymów pociąga za sobą wzrost ryzyka wystąpienia nowotworu, o czym wspomniano już wyżej. W nowotworach głowy i szyi po raz pierwszy zwrócono uwagę na taką zależność w ograniczonym zakresie w badaniach nad poziomami adduktów PWA: DNA w tkankach chorych na raka krtani, prowadzonych w zespole F.F. Kadlubara (Jefferson, USA) [26, 37]. Ustalono dodatnią korelację między poziomem adduktów DNA, a ogólnym poziomem enzymów aktywacyjnych zależnych od cytochromu P450, a także poziomami dwóch konkretnych enzymów (CYP1A1 i CYP2C), katalizującymi alternatywne szlaki aktywacji benzo(a)pirenu.

Później okazało się, że o ile można uchwycić genetyczną determinację poziomu uszkodzeń DNA, to przełożenie tego ustalenia na ocenę ryzyka genetycznego wystąpienia nowotworów jest trudne [38], bowiem uszkodzenia DNA są usuwane w procesie naprawy. Ponadto podniesiono też fakt, że genetyczna determinacja poziomu uszkodzeń DNA jest wypadkową działania dwóch grup enzymów: aktywacyjnych i detoksykacyjnych. Rozumowanie to dało impuls do dalszych badań nad udziałem wszystkich trzech grup enzymów oraz ich sumarycznego efektu. W tym miejscu trzeba przypo-

mnąć wysoką sprawność procesów detoksykacji i naprawy DNA; ogromna większość aktywowanego enzymu podlega detoksykacji, a tylko nieliczne uszkodzenia DNA trwale zmieniają jego strukturę ulegając przekształceniu w mutacje DNA. Mimo wyłożonych tutaj zastrzeżeń udało się wykazać słabą zależność dodatnią między aktywnością CYP2D6 (aktywacja N-nitrozoamin) a ryzykiem wystąpienia nowotworu krtani; asocjacja taka była najsilniejsza u intensywnych palaczy [39]. Wyniki te znalazły potwierdzenie w późniejszej pracy na materiale pochodzącym od pacjentów z nowotworami głowy i szyi, z dużym udziałem nowotworów jamy ustnej [34]. Ciekawe jest także wykazanie istnienia biologicznie aktywnych duplikacji genu *CYP2D6* u chorych na raka krtani i płuc, co świadczy o wzmożonej aktywacji kancerogennych N-nitrozoamin [40].

Wobec sprawności procesu detoksykacji uwaga badaczy przesunęła się w stronę indywidualnego zróżnicowania tego etapu metabolizmu kancerogenów. Początkowo badania skupiały się na pojedynczych izoenzymach detoksykacyjnych, ale możliwość kompensacji braku aktywności jednego z nich przez inne narzucała konieczność pracy równoległe z kilkoma. W badaniach własnych wykazano, że o poziomie adduktów DNA nie decyduje defekt pojedynczego genu, ale poziom adduktów DNA rośnie wraz z krotnością defektów genowych [41]. Ustalenia innych autorów można zresumować następująco:

- ▶ obniżenie aktywności transferaz glutationowych (GSTM1, GSTP1, GSTM3) oraz N-acetylotransferaz (NAT1 i NAT2) w niewielkim, ale zauważalnym stopniu wpływa na podniesienie ryzyka nowotworów głowy i szyi [34, 38, 42],
- ▶ rola defektów genów enzymów detoksykacyjnych jest niższa w organach eksponowanych na dym tytoniowy miejscowo (górne drogi oddechowe) niż w organach eksponowanych pośrednio (np. pęcherz moczowy) [43],
- ▶ znaczenie czynnika genetycznego jest maskowane przez palenie tytoniu i uwidacznia się głównie u osób o niskiej lub umiarkowanej ekspozycji [42, 44].

Ostatnio badaniami objęto polimorficzne zróżnicowanie enzymów naprawczych. Chociaż od dawna wysuwano przypuszczenie znaczenia defektów naprawy DNA w zwiększaniu ryzyka zapadalności na nowotwory, dopiero niedawno uzyskano eksperymentalne potwierdzenie tej hipotezy.

Wstępne, ale sugestywne dane zamieszczone w pracy Matullo i wsp. [45] dowodzą związku między polimorfizmem trzech genów, których enzymy katalizują 3 różne mechanizmy procesu naprawy DNA a uszkodzeniami DNA w leukocytach krwi obwodowej zdrowych palaczy tytoniu. Najwyższy współczynnik korelacji między poziomem adduktów DNA a obniżeniem potencjału naprawy DNA zaobserwowano dla genu *XPD*, który uczestni-



czy w naprawie DNA wg mechanizmu z wycinaniem nukleotydów, a ten właśnie mechanizm funkcjonuje w usuwaniu większości uszkodzeń indukowanych genotoksycznym działaniem dymu tytoniowego. Potwierdzenie roli defektów naprawy DNA w zapadalności na raka płuc, a więc w nowotworze o zbliżonej etiologii uzyskała Butkiewicz i wsp. [46]. Bezpośredni dowód na związek między defektami genów odpowiedzialnych za proces naprawy DNA, a zapadalnością na nowotwory głowy i szyi podany został przez Shena i wsp. [47]. Praca dotyczyła genu *XPC*, który również koduje białko uczestniczące w procesie naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów.

Powyższy opis nie wyczerpuje całości zagadnienia. Poza rodziną cytochromu P450 znaleziono inne enzymy uczestniczące w aktywacji metabolicznej kancerogenów. Należy do nich lizosomalna mieloperoksydaza. Stwierdzono, że jeden z wariantów polimorficznych tego enzymu, który wykazuje obniżoną aktywność, stanowi czynnik zabezpieczający przed wystąpieniem nowotworów płuc i krtani, ale prawdopodobnie nie odgrywa roli w etiologii nowotworów gardła [48].

Przy badaniu ryzyka genetycznego sięgnięto także po geny kodujące białka metabolizujące etanol, bowiem mocne napoje alkoholowe są rozpoznany czynnikiem, który multiplikuje ryzyko wystąpienia nowotworów związane z paleniem tytoniu [49]. Zaskakująco, 2 niezależnie wykonane badania, przeprowadzone na różnych grupach etnicznych nie stwierdziły podwyższonego ryzyka wystąpienia nowotworów górnych dróg oddechowych (głowy i szyi) powiązanego z polimorfizmem dehydrogenazy alkoholowej 3 [50, 51].

Rola protoonkogenów i genów supresorowych (antyonkogenów)

Mianem protoonkogenów określa się sekwencje DNA, które w warunkach fizjologicznych pozostają *uśpione* i dopiero pod wpływem mutacji ulegają ekspresji. Produktem onkogenu jest onkoproteina zdolna do transformacji nowotworowej komórki. Onkogeny zostały pierwotnie zidentyfikowane jako geny transformujących retrowirusów, ale później homologiczne geny odkryto u kręgowców, w tym też w komórkach ludzkich. Tym samym protoonkogeny podają sygnał *start* do procesu kancerogenezy. Prawdopodobnie długotrwała produkcja onkoprotein powoduje, że dodatkowo komórki tracą kontrolę nad proliferacją i podlegają niekontrolowanemu namnażaniu się.

W genomie ludzkim znajdują się równocześnie geny o całkowicie przeciwnym zadaniu, a mianowicie geny supresorowe (przeciwnowotworowe). Geny te również nie ulegają ekspresji w normie, ale pod wpływem czynników uszkodzających DNA zaczynają produkować białka, których funkcja sprowadza się do przekazania sy-

gnału *stop* transformacji nowotworowej [52–54]. Występowanie w genomie wszystkich genów w dwóch kopiach daje dalszą implikację. Dla dysregulacji funkcji komórki konieczne jest zmutowanie jednej kopii protoonkogenu (pojawia się onkoproteina sygnalizująca podjęcie proliferacji) i obydwóch kopii genu supresorowego (całkowity brak sygnału *stop*). Dotyczy to wyłącznie mutacji nowych, ale możliwe jest, że zmutowany gen został odziedziczony, co zwiększa prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej. Dodać trzeba, że w przypadku nowotworów dziedzicznych (np. zespół Li-Fraumeni) inaktywacja genów supresorowych przenoszona jest z pokolenia na pokolenie w sposób dominujący [55].

Pierwszym symptomem transformacji jest wyjście komórki z fazy spoczynkowej i podjęcie proliferacji. Tym samym produkty białkowe protoonkogenów działają na rzecz proliferacji, a genów supresorowych antyproliferacyjnie. Finalnie taką samą rolę jak protoonkogeny spełniają czynniki wzrostu, ale sygnał do ich działania następuje w prawidłowo funkcjonującej komórce. Ze względu na podobieństwo funkcji oraz fakt, że wszelka dysregulacja ich struktury i funkcji leży u podstaw procesu kancerogenezy, onkogeny i czynniki wzrostu są na ogół omawiane razem [1, 52, 53].

Ponieważ działanie protoonkogenów i genów supresorowych stanowi fragment mechanizmu kancerogenezy należy podać więcej informacji na ten temat. Punktem wyjściowym jest założenie oddziaływania czynników zewnętrznych (kancerogenów) na materiał genetyczny, który w swoisty, indywidualny sposób modyfikuje efekt działania kancerogenów. Według powszechnie przyjętej teorii Knudsona, znanej jako **hipoteza dwóch zdarzeń**, konieczne jest równoległe lub nieodległe w czasie zmutowanie protoonkogenu i genu supresorowego [52, 56]. Dalsze badania doprowadziły do rozwinięcia tej hipotezy oraz jej dostosowania do różnych typów nowotworów. Obecnie wiadomo, że 2 mutacje są warunkiem niewystarczającym – dla nowotworów głowy i szyi wyliczono, że do podjęcia onkogenezy konieczne jest wystąpienie 6–10 mutacji w genach odpowiedzialnych za ten proces [57, 58]. Liczba mutacji w komórkach zainicjowanych szybko rośnie i prowadzi do przybrania tzw. **fenotypu mutatorowego**. Pojawia się tendencja do częstego występowania amplifikacji genów, niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych, aberracji chromosomowych i aneuploidii, co prowadzi do pogłębiającego się chaosu przekazu informacji genetycznej [59].

W kontekście powyższych rozważań wiedza na temat aktywacji protoonkogenów i czynników wzrostu w nowotworach głowy i szyi jest względnie uboga. Wiadomo, że we wstępnej fazie rozrostu błony śluzowej stwierdza się wysoką aktywność epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) i jego receptora [3]. W fazie promocji



i progresji nowotworu obserwuje się wysoką aktywność cykliny D1. Gen dla tego białka (*CCND1*, poprzednio oznaczany jako *PRAD1*) zlokalizowano w długim ramieniu chromosomu 11 (dokładna lokalizacja: 11q13) i wiadomo, że ten region chromosomowy ulega często amplifikacji w nowotworach głowy i szyi. W tym samym regionie zidentyfikowano 2 inne geny (*INT2* i *HST1*), ale większość danych doświadczalnych wskazuje, że rolę onkogeny pełni cyklina D1. Amplifikacja 11q13 dobrze koreluje z postępem choroby i jest bardzo złym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów [1]. Wymieniany jest także protoonkogen *eIF4E*, którego rola polega na stymulacji szeregu czynników wzrostu. Podwyższony poziom ekspresji tego białka obserwuje się we wszystkich przypadkach nowotworów głowy i szyi, i w większości przypadków tkanki otaczającej, a więc jest złym czynnikiem rokowniczym [60].

Wśród białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego zwrócono uwagę na grupę fosfataz CDC25. Zidentyfikowano geny *CDC25A*, *CDC25B* i *CDC25C*, które kodują fosfatazy czynne w różnych fazach cyklu komórkowego. Wykazano, że *CDC25A* i *CDC25B* uczestniczą w stymulacji komórek pod wpływem onkogenów *H-ras* i *c-myc* oraz dezaktywacji genu supresorowego *Rb1*. Nadekspresja tych 2 genów w nowotworach głowy i szyi pozwala przypisać im rolę onkogenów w tym schorzeniu [61].

W inwazyjnej fazie rozrostu nowotworu istotną rolę odgrywają geny kodujące kompleks białek o aktywności proteolitycznej degradującej matrycę pozakomórkową, a klasyfikowanych jako matrycowe metaloproteinazy (MPP) [1]. W tej klasie właściwości protoonkogeny przypisano m.in. *MPP11*, zlokalizowanemu w długim ramieniu chromosomu 7, chociaż początkowo traktowano go jako gen supresorowy [62].

Rola genów supresorowych w nowotworach głowy i szyi poznana jest znacznie lepiej [54]. W znacznym stopniu wiąże się to z genem *p53*, który ulega ekspresji w wielu nowotworach, ale w nowotworach głowy i szyi jego dysfunkcja jest szczególnie częsta [63, 64]. Ogólnie zadanie genu *p53* i jego produktu białkowego sprowadza się do nadzoru nad prawidłowością przebiegu cyklu komórkowego. W normie gen *p53* praktycznie nie ulega ekspresji. Biosynteza białka zaczyna się w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, a jego poziom wzrasta od anaplazji przez hipoplazję do dysplazji, gdzie osiąga stan odpowiadający produkcji białka w komórkach transformowanych nowotworowo.

W przypadku wystąpienia uszkodzeń DNA białko *p53* wydłuża fazę G1, zapewniając więcej czasu na naprawę DNA. Jeżeli nastąpi replikacja uszkodzonego DNA, to białko *p53* ponownie blokuje cykl komórkowy w fazie G2/M, zabezpieczając komórki przed mitozą. W miejsce zakończenia cyklu komórki z uszkodzonym DNA są kierowane w stronę śmierci programowa-

nej (apoptozy). Tak działa produkt prawidłowego genu, jednak mutacje w obrębie tego genu dają produkt nietrwały albo o wadliwej funkcji i komórki tracą kontrolę nad cyklem życiowym [65]. Mutacje genu *p53* grupują się w charakterystycznych *gorących miejscach* struktury, najczęściej w eksonach 5–8. Badając profil mutacji genu *p53* można było powiązać je z uprzednią ekspozycją na dym tytoniowy [65], a także wskazać na różnice między pierwotną lokalizacją w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych [66], czy powiązać profil mutacji genu *p53* ze wznową choroby i występowaniem drugich pierwotnych nowotworów [67, 68].

Dużo uwagi poświęcono genom supresorowym: *p15*, *p16*, *p21* i *p27* (nazwy pochodzą od wielkości kodowanego białka wyrażonego w kilodaltonach). Cechą wspólną ich produktów białkowych jest hamujące działanie na kinazy zależne od cyklin, a więc białka odpowiedzialne za proliferację komórek. W strukturze tych genów w nowotworach głowy i szyi wykrywano liczne mutacje, prowadzące do niedoboru lub braku funkcji antyproliferacyjnej [65, 69–71]. Najwięcej dowodów doświadczalnych uzyskano dla upośledzenia funkcji supresorowej białka *p16*.

Zwrócono także uwagę na gen supresorowy *FHIT*, zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu 3 w pobliżu łamliwego miejsca tego chromosomu. Wydaje się, że łamliwość tego regionu wyłącza funkcjonowanie genu *FHIT*, a ma to miejsce szczególnie często w nowotworach głowy i szyi [72, 73].

Nie ma zgodności poglądów na temat roli genu supresorowego *Rb1*. Chociaż funkcja supresorowa tego białka została opisana w siatkówczaku już dawno [52, 53], to badania utraty heterozygotyczności oraz delecji w regionie chromosomu 13, kodującym ten gen przynoszą sprzeczne wyniki. Porównanie delecji w grupie chorych na raka krtani i określenie najmniejszego wspólnego deletowanego regionu techniką porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *comparative genomic hybridization* – CGH) zdawało się wskazywać, że locus *Rb1* pozostaje poza tym regionem. Jednak zastosowanie bardziej precyzyjnej techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) nie tylko potwierdziło rolę genu *Rb1* w progresji nowotworów krtani, ale wskazało na udział tego właśnie genu w przechodzeniu do fazy przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, chociaż w pobliżu są zlokalizowane inne prawdopodobne geny supresorowe [74].

Również w kategoriach działania pro- i antyonkogennego rozpatruje się geny kodujące białka uczestniczące w procesie programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy. Jak już wspomniano przy omawianiu genu *p53*, rolą tego procesu jest eliminacja komórek zawierających uszkodzony materiał genetyczny. Gen *bcl-2* działa hamująco na apoptozę, a gen *bax* przyspiesza ten proces. Określenie ekspresji obu tych genów u pacjentów z rakiem krtani wykazało dobrą korelację



z parametrami klinicznymi i ekspresją p53, co pozwala sugerować ich wykorzystanie jako niezależnych markerów prognostycznych [75].

Szczególnie cenne w tej dziedzinie są równoległe badania ekspresji protoonkogenów i genów supresorowych, bowiem dopiero wypadkowa przeciwnych aktywności obu grup genów decyduje o progresji choroby [52, 53, 65].

Aberracje chromosomów w przebiegu choroby nowotworowej

Informacji o znaczeniu protoonkogenów i genów supresorowych nie można omawiać w oderwaniu od przeglądu aberracji chromosomowych. W głównej mierze wiąże się to z faktem, że znaczącą część ustaleń na temat zmian struktury i funkcji genomu dokonano albo ze wskazań albo metodami cytogenetyki. W tym miejscu należy zaznaczyć, że cytogenetyka konwencjonalna w ostatnich latach zyskała nowy zasięg poznawczy dzięki wprowadzeniu metod molekularnych (ryc. 5.). Największy postęp uzyskano dzięki technice fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), malowaniu chromosomów oraz porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *comparative genomic hybridization* – CGH). Podstawową nową jakością jest osiągnięcie znacznie lepszej zdolności rozdzielczej, co pozwala na coraz bardziej precyzyjną ocenę wszelkich uszkodzeń chromosomów.

Podstawowe pojęcia cytogenetyczne:

- **chromosom** – stopień organizacji materiału genetycznego stanowiący kompleks DNA i białek, widoczny w mikroskopie świetlnym podczas podziału komórkowego; chromosomy są zbudowane z ramion długich i krótkich, łączących się w przewężeniu pierwotnym zwanym centromerem,
- **kariotyp** – zestaw wszystkich chromosomów cechujących dany organizm, do celów porównawczych przyjęto stosowanie zapisu graficznego uporządkowanego wg ustalonych zasad,
- **aberracja chromosomowa** – jakakolwiek nieprawidłowość liczby lub struktury chromosomu (-ów).

Prawidłowy kariotyp człowieka stanowi 46 chromosomów złożonych z 22 par autosomów oraz dwóch chromosomów płciowych, co daje zapis 46, XX dla kobiety i 46, XY dla mężczyzny.

W odróżnieniu od hematologicznych chorób nowotworowych, gdzie dopracowano się dosyć przejrzystego obrazu uszkodzeń chromosomów, cytogenetyka guzów litych nie ma tak jednoznacznych ustaleń z racji

mnożności, stopnia skomplikowania oraz zmienności profilu uszkodzeń w przebiegu choroby nowotworowej. Dlatego tylko w nielicznych guzach litych udaje się wskazać aberrację chromosomową, typową dla danej jednostki chorobowej. Przykładem jest translokacja regionu q24, q12 między chromosomami 11 a 22 w guzie Ewinga czy translokacja regionu p11, q11 między chromosomem płciowym X a autosomem 18 w maziówczaku złośliwym. W tej sytuacji w nowotworach głowy i szyi pozostaje poszukiwanie najczęstszych aberracji chromosomowych i odnoszenie ich do opisu klinicznego [76].

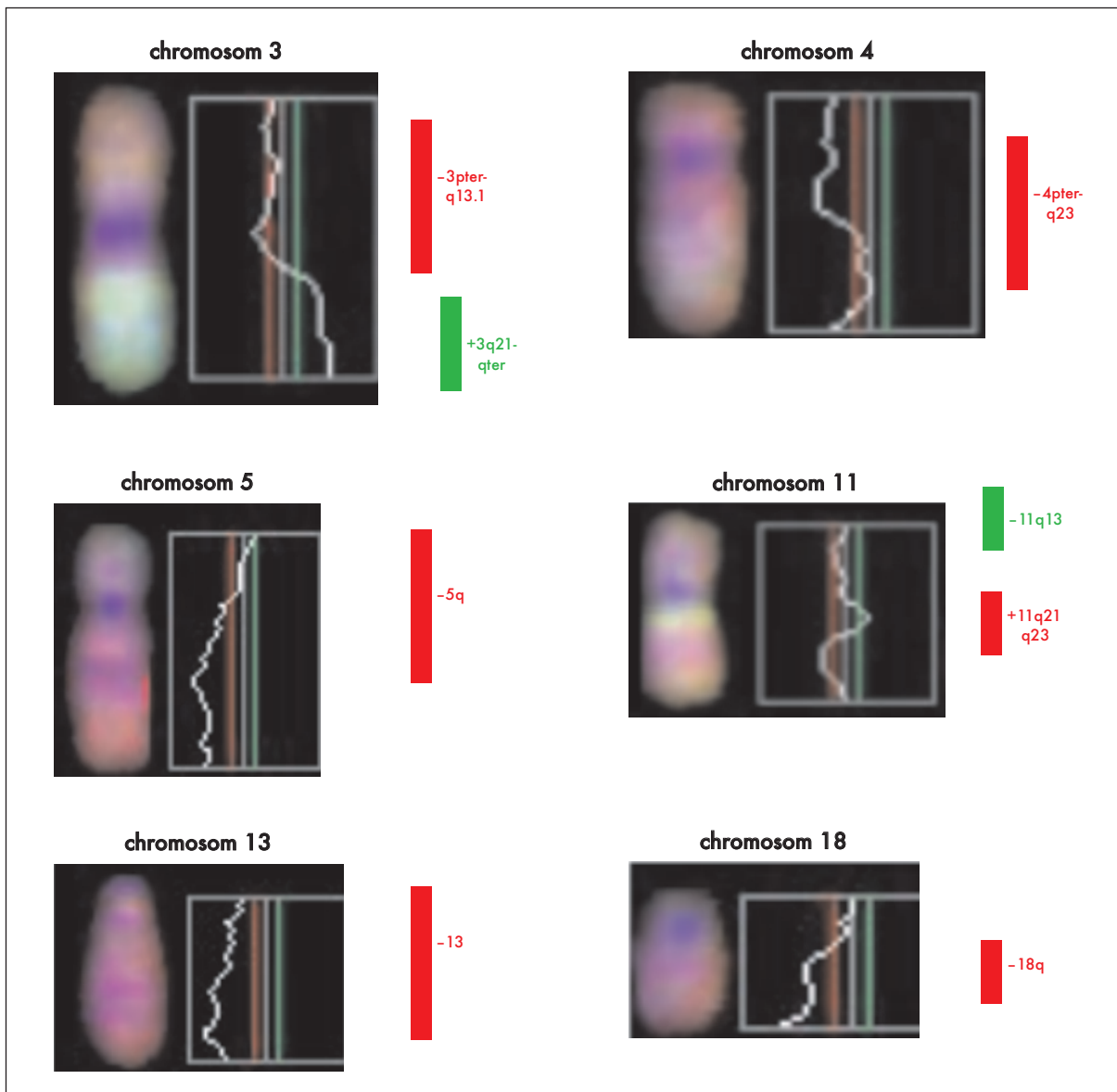
W nowotworach głowy i szyi najczęściej występują następujące aberracje: amplifikacje 3q, 8q, 9q, 20q, 7p, 11q13, i 5p, delecje 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q i 8p oraz miejsca łamliwe 1p36, 3p21, 8p11 [1, 77]. Próbowano korelować występowanie aberracji chromosomowych z ekspozycją na dym tytoniowy. Uzyskano przekonujący dowód związku między tą ekspozycją a indukcją aberracji dla utraty krótkiego ramienia chromosomu 3 lub jego fragmentu [78, 79] i 8q [80]. W przypadku chromosomu 3p stwierdzono podwyższoną wrażliwość tego regionu na działanie szeregu mutagenów [78] i asocjację z występowaniem raka płuc [79]. Natomiast badania dotyczące chromosomu 8, przeprowadzone na liniach komórkowych, wykazały obecność izochromosomu 8q, co prowadzi do zwiększenia ekspresji onkogeny *c-myc* [80].

Ponieważ cytogenetyka nowotworów, w tym również nowotworów głowy i szyi jest przedmiotem licznych opracowań (również w języku polskim) [76, 77, 81], dlatego omówienie zostanie zawężone do aberracji chromosomowych towarzyszących przebiegowi choroby nowotworowej i (potencjalnie) pełniących rolę markerów prognostycznych.

► Utratę regionu 9p21 jest najczęstszą obserwowaną aberracją chromosomową w nowotworach głowy i szyi. W tym regionie zlokalizowano kilka genów supresorowych (*p15*, *p16*, *p18*, *p19*) kodujących białka będące inhibitorami kinaz zależnych od cykliny. Delecja tego regionu prowadzi do utraty kontroli nad cyklem komórkowym i jest wczesnym wydarzeniem w cyklu transformacji nowotworowej. Ta aberracja jest wykrywana głównie w pierwotnych nowotworach [82–84].

► Utratę długiego ramienia chromosomu 18 stwierdzano co najmniej w 60% badanych przypadków. Występowanie tej aberracji nie jest ograniczone do nowotworów głowy i szyi. Można przypuszczać, że zlokalizowane w tym regionie geny są odpowiedzialne za powstawanie i progresję różnych typów nowotworów. Przy zastosowaniu technik CGH oraz analizy heterozygotyczności zidentyfikowano 3 regiony najczęściej deletowane w nowotworach głowy i szyi wskazując na obecność trzech różnych genów supre-





Ryc. 5. Zestawienie przykładowych aberracji chromosomowych najczęściej występujących w analizowanych metodą CGH grupach raka krtani. Obok każdego z chromosomów zamieszczono wykresy stosunków fluorescencji czerwonej do zielonej, obrazujące występowanie zmiany liczby kopii DNA wzdłuż chromosomu. Kolor czerwony reprezentuje delecje materiału genetycznego, natomiast zielony amplifikacje

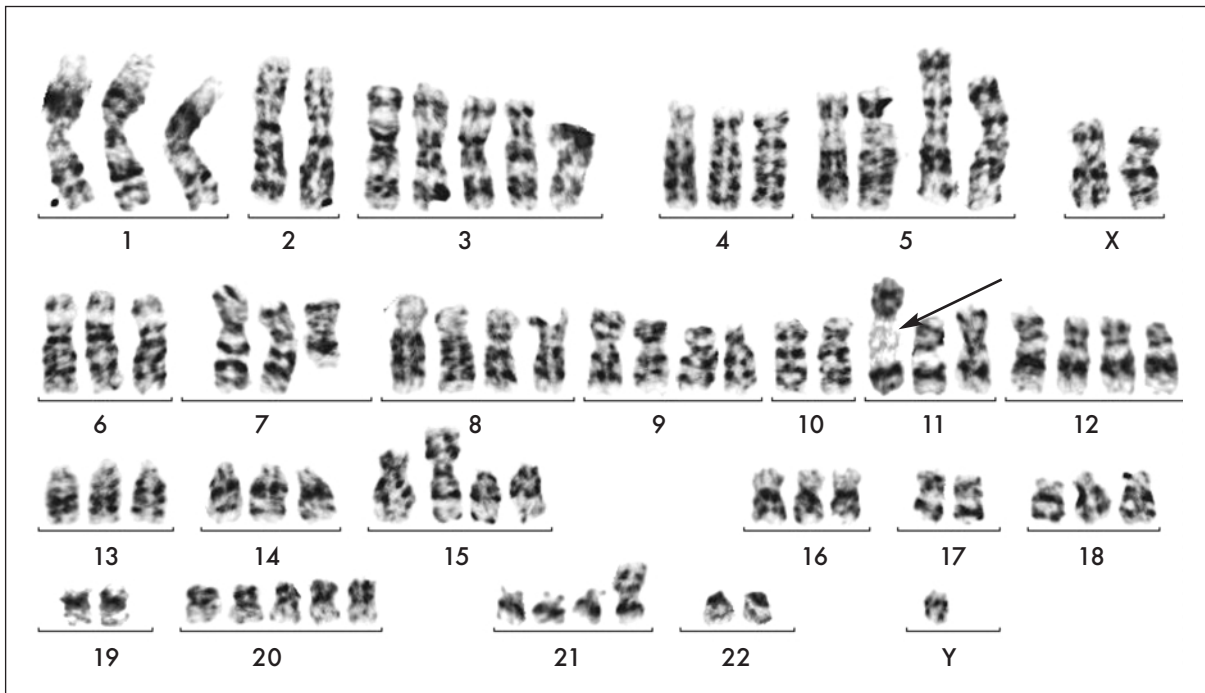
sorowych. Wysoki poziom utraty 18q jest złym wskaźnikiem prognostycznym, bowiem wykrywany jest głównie w wysoko odróżnicowanych nowotworach i wskazuje na szybką wznowę [85–87].

- ▶ Amplifikacja regionu 11q13 (ryc. 6.) cechuje przede wszystkim zaawansowane etapy choroby oraz stopień histologiczny G3. Gen *CCND1* koduje cyklinę D1 odpowiedzialną za przejście komórki z fazy G1 do S i pośrednio wpływa negatywnie na wydajność procesu naprawy DNA. Mechanizm, za którego udziałem amplifikacja 11q13 zwiększa progresję i wpływa na inwazyjność nowotworu nie jest jasny. W każdym razie

wartość diagnostyczna ilościowej oceny amplifikacji 11q13 jest bardzo duża, a wysoki poziom amplifikacji jest bardzo złym czynnikiem rokowniczym [87, 88].

- ▶ Chromosom 3 ulega najsilniejszym rearanżacjom spośród wszystkich chromosomów somatycznych poprzez częstą utratę ramienia krótkiego i amplifikację ramienia długiego. Najmniejszy amplifikowany region 3q26–q27 zawiera protoonkogen *AIS*, któremu przypisuje się rolę w transformacji nowotworowej. Natomiast w ramieniu krótkim uwagę zwracają 3 subregiony w regionie 3p12–p21. Występuje tu m.in. gen supresorowy *FHIT* (3p14.2). Ponadto utratę 3p notowano w komór-





Ryc. 6. Karyotyp komórek linii wyprowadzonej z raka krtani, zawierającej liczne aberracje liczbowe oraz aberrację strukturalną chromosomu 11 z zaznaczoną amplifikacją regionu q13

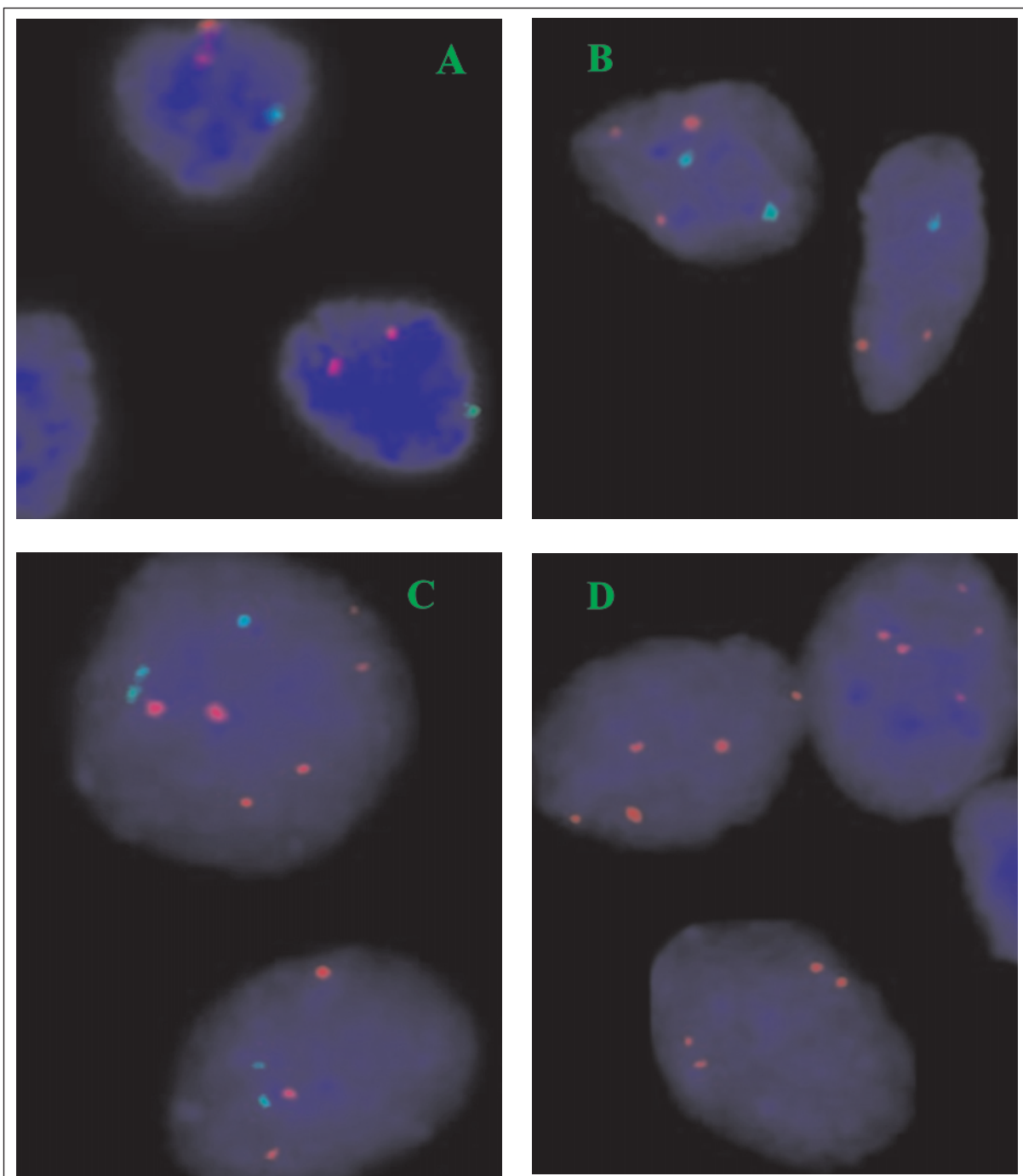
kach dysplastycznych, co sugeruje udział tego regionu we wczesnych etapach kancerogenezy [87, 89, 90].

- ▶ Utrata 13q przyciąga uwagę, ponieważ w regionie 13q14 znajduje się gen supresorowy *Rb1*. W badaniach własnych prowadzonych w oparciu o technikę CGH stwierdzono częstą utratę tego regionu, zarówno w guzach pierwotnych nieprzerzutowych, jak i nasilenie tej aberracji w guzach dających przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych [91]. Potwierdzenie udziału genu supresorowego *Rb1* w progresji nowotworu krtani neguje rolę znajdującego się w pobliżu (13q34) genu supresorowego *ING1*. Jest to zgodne z wykazaniem braku mutacji w genie *ING1* u chorych na nowotwory głowy i szyi, co świadczy o niez zaangażowaniu tego genu w progresję tego typu nowotworów [92]. Wobec przeciwstawnych wyników innego zespołu dowodzącego występowania nonsensownych mutacji (prowadzących do syntezy niefunkcjonalnego białka) w genie *ING1* sprawa wymaga dalszych badań [93].
- ▶ Utrata chromosomu płciowego Y ma miejsce w wielu guzach litych, a w tym w nowotworach głowy i szyi [94, 95]. Chociaż u starszych mężczyzn obserwuje się pewien ubytek tego chromosomu, m.in. w leukocytach krwi obwodowej, to ubytek nie przekracza kilkunastu promili [96]. Natomiast w komórkach guza krtani u większości pacjentów obserwowano w badaniach własnych całkowitą utratę tego chromosomu (ryc. 7.). Podobnie obserwacje zanoto-

wano przy karyotypowaniu linii komórkowych wyprowadzonych z raka krtani (M. Kujawski, M. Jarmuż – manuskrypt w przygotowaniu). Utrata tego chromosomu pozostaje niezrozumiała, bowiem chromosom Y jest ubogi informacyjnie. Nie można jednak wykluczyć obecności genów supresorowych. Ponadto w chromosomie Y wykryto gen kodujący białko związane z adhezją, a więc można spekulować na temat wpływu utraty Y na odrywanie się komórek od podścieliska. Próbowano też odnosić utratę Y do dysproporcji zachorowalności mężczyzn i kobiet na nowotwory krtani [82, 94].

Porządkowanie informacji o aberracjach chromosomowych doprowadziło także do rozpatrywania dynamiki uszkodzeń chromosomów, a więc zmienności profilu aberracji wraz z przebiegiem choroby. Jak już wykazano wyżej, pewne uszkodzenia dają się dosyć ściśle przypisać etapom choroby. Na podstawie analizy dotychczasowych ustaleń zaproponowano kilka modeli, korelujących pojawianie się uszkodzeń chromosomów z przebiegiem choroby. Na użytek nowotworów głowy i szyi najlepiej został przyjęty model Califano skonstruowany w zespole D. Sidransky'ego [98, 99]. Ta propozycja stała się punktem wyjścia wielu badań. Wysiłki skupiono m.in. na próbach identyfikacji chromosomu markerowego etapu przechodzenia guza w fazę przerzutów. Kwestia ta nie została do dzisiaj rozwiązana.





Ryc. 7. Obrazy mikroskopowe jąder interfazowych komórek nowotworowych uzyskane metodą interfazowego FISH, zarejestrowane przy pomocy kamery sprzężonej z mikroskopem fluorescencyjnym. Sygnały zielone reprezentują sondę centromerową dla chromosomu Y, sygnały czerwone reprezentują kontrolną sondę centromerową dla chromosomu 6. Kolejno przedstawiono: A jądra z prawidłową liczbą sygnałów (odpowiednio 1 „Y” i 2 „6”), B jądro prawidłowe i jądro o zwiększonej liczbie sygnałów (odpowiednio 2 i 3), C jądra o wielokrotnej liczbie sygnałów (odpowiednio 3 i 5 oraz 2 i 3), D jądra z brakiem sygnału dla chromosomu Y i wielokrotną liczbą sygnałów dla chromosomu 6 (odpowiednio 0 i 5, 0 i 5 oraz 0 i 4)

Uwagi końcowe

Prowadzone od lat badania nad genetyką i biologią molekularną nowotworów głowy i szyi przyniosły

ogromną wartość poznawczą [1, 4]. Jednym z ważniejszych ustaleń pozostaje stwierdzenie akumulacji uszkodzeń materiału genetycznego w progresji choroby nowotworowej, która od pewnego etapu rozwija się

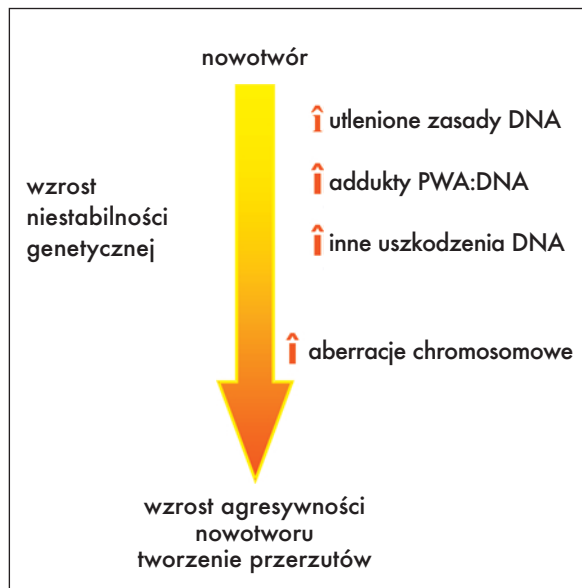


samoczynnie, nawet w warunkach ustania ekspozycji na kancerogeny (ryc. 8.).

Użyteczność badań genetycznych i biologicznych pozostaje jeszcze ciągle ograniczona. Przykładem może być ocena ryzyka genetycznego wystąpienia raka głowy i szyi. Niewielki wzrost ryzyka towarzyszący defektom genów niskiej penetracji przy dużej liczbie tych genów praktycznie uniemożliwia prowadzenie szerokiego *screeningu* ze względów organizacyjnych i kosztów badań. Natomiast rozpoznanie szeregu markerów na poziomie genów, ich produktów genowych, a zwłaszcza aberracji chromosomowych pozwala na stosowanie ich w charakterze markerów przebiegu choroby i prognozy. Na etapie badań modelowych oraz I fazy są protokoły terapii genowej [7].

Piśmiennictwo

- Sidransky D. Molecular genetics of head and cancer. *Current Opinion Oncol* 1995; 7: 229-233.
- Szyfter K, Jaskuła-Sztul R, Kujawski M, Kita S, Jarmuż M, Dąbrowski P. Czynniki genetyczne w raku krtani. *Post Biol Kom* 1998; 25, supl. 10: 123-136.
- Papadimitrakopoulou VA, Shin DM, Hong WK. Molecular and cellular biomarkers and multistep process in head and neck tumorigenesis. *Cancer Metast Rev* 1996; 15: 53-76.
- Szyfter K, Szmeja Z, Szyfter W, Hemminki K, Banaszewski J, Jaskuła-Sztul R, Louhelainen J. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. *Mutat Res* 1999; 445: 259-274.
- Petruzzelli GJ. The biology of tumor invasion, angiogenesis and lymph node metastasis. *ORL* 2000; 62: 178-185.
- Petruzzelli GJ. The biology of distant metastases in head and neck cancer. *ORL* 2001; 63: 192-201.
- Partridge K. Current status of genetics for prediction, prognosis and gene therapy. *Cur Opinion Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 8: 69-79.
- Au WW, Oh HY, Grady J, Salama SA, Heo MY. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environ Molec Mutagenesis* 2001; 37: 215-223.
- International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. IARC, Lyon 1995.
- Zatoński W, Becher H, Lissowska J, Wahrendorf J. Tobacco, alcohol and diet in the etiology of laryngeal cancer: a population based case-control study. *Cancer Cause & Control* 1991; 2: 3-10.
- Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJP, Braakhuis BJM, de Vries M, van der Waal I, Snow GB. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 157-160.
- Bondy ML, Spitz MR, Halabi S, Feuger JJ, Schantz SP, Sample D, Hsu TC. Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 1993; 2: 103-106.
- Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett* 1999; 146: 93-101.
- Jarmuż M, Szyfter K. Zastosowanie testu bleomycynowego do określania predyspozycji genetycznej do zachorowania na nowotwory. *Wsp Onkol* 1999; 3: 188-190.
- Spitz MR, Hoque A, Trizna Z, Schantz SP, Amos CH, King TM, Bondy ML, Hong WK, Hsu TC. Mutagen sensitivity as a risk factor for second malignant tumors following malignancies of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1681-1684.



Ryc. 8. Ideogram przedstawiający akumulację uszkodzeń DNA i chromosomów, prowadzącą do zwiększenia niestabilności chromosomów, co z kolei przyczynia się do wzrostu agresywności i przybrania fenotypu przerzutowego

- Spitz MR, Lippman SM, Jiang H, Lee JJ, Khuri F, Hsu TC, Trizna Z, Benner S, Hong WK. Mutagen sensitivity as a predictor of tumor recurrence in patients with cancer of the upper aerodigestive tracts. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 243-245.
- Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA* 1989; 262: 3313-3315.
- Cloos JM, Nieuwenhuis EJC, Boomsma DI, Kuik DJ, van der Sterre MLT, Arwer F, Snow GB, Braakhuis BJM. Inherited susceptibility to bleomycin-induced chromatid breaks in cultured peripheral blood lymphocytes. Review. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1125-1130.
- Kręcicki T, Schlade K, Blin N, Sqsadek M. Chromosome instability in head and neck cancer patients. *Oncol Rep* 1997; 4: 1383-1385.
- Pandita TK, Hittelman WN. Evidence of a chromatin basis for increased mutagen sensitivity associated with multiple primary malignancies of the head and neck. *Int J Cancer* 1995; 61: 738-743.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzerieder RK, Harreus UA. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the comet assay. *Mutat Res* 2000; 467: 21-30.
- Bermudez E, Stone K, Carter KM, Pryor WA. Environmental tobacco smoke is just as damaging to DNA as mainstream smoke. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 870-874.
- Gray JW, Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21: 443-452.
- Shields PG, Harris CC. Principles of carcinogenesis: Chemical. In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, V. T. DeVita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (red.), wyd. 4, J. B. Lippincott Co, Philadelphia 1993.
- Marnett L. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370.
- Stern SJ, Degawa M, Martin MV, Guengerich FP, Ilett KF, Kaderlik RK, Breau R, McGheeM, Montague D, Lyn-Cook B, Kadlubar FF. Metabolic activation, DNA adducts, and H-ras mutations in human neoplastic and non-neoplastic laryngeal tissue. *J Cell Biochem* 1993; suppl. 17F: 129-137.
- Szyfter K, Hemminki K, Szyfter W, Szmeja Z, Banaszewski J, Yang K.



- Aromatic DNA adducts in larynx biopsies and leukocytes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2195-2199.
28. Szyfter K, Hemminki K, Szyfter W, Szymeja Z, Banaszewski J, Pabiszczak M. Tobacco smoke-associated N7-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leukocytes. *Carcinogenesis* 1996; 77: 501-506.
 29. Phillips DH. Detection of DNA modifications by the ³²P-postlabelling assay. *Mutat Res* 1997; 378: 1-12.
 30. Pabiszczak M, Banaszewski J, Szymeja Z, Szyfter K, Szyfter W. Porównanie poziomu adduktów kancerogen: DNA w rakach jamy ustnej, gardła i krtani. *Otolaryng Pol* 2001; 45: 551-554.
 31. Flamini G, Romano G, Curigliano G, Chiominto A, Capelli G, Boninsegna A, Signorelli C, Ventura L, Santella RM, Sgambato A, Cittadini A. 4-aminobiphenyl-DNA adducts in laryngeal tissue and smoking habits: an immunohistochemical study. *Carcinogenesis* 1998; 19: 353-357.
 32. Paine AJ. Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Human ExpToxicol* 1995; 14: 1-7.
 33. Houlston RS, Tomlinson IPM. Detecting low penetrance genes in cancer: The way ahead. *J Med Genet* 2000; 37: 161-167.
 34. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1* and *NAT1* polymorphisms, tobacco use and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 2000; 9: 185-191.
 35. Strange RS, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21-26.
 36. Sancar A. DNA repair in human. *Annual Rev Genet* 1995; 29: 69-105.
 37. Degawa M, Stern SJ, Martin MV, Guengerich FP, Fu PP, Ilett KF, Kaderlik RK, Kadlubar FF. Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Res* 1994; 54: 4915-4919.
 38. Jahnke V, Strange R, Matthias C, Fryer A. Glutathione S-transferase and cytochrome P450 genotypes as risk factors for laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryng* 1997; 254, suppl. 1: S147-S149.
 39. Benhamou S, Bouchardy C, Paoletti C, Dayer P. Effects of CYP2D6 activity and tobacco on larynx cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 1996; 5: 683-686.
 40. Agundez JAG, Gallardo L, Ledesma MC, Locano L, Rodriguez-Lescure A, Pontes JC, Iglesias-Moreno MC, Poch J, Ladero Jm, Benitez J. Functionally active duplications of the *CYP2D6* are more prevalent among larynx and lung cancer patients. *Oncology* 2001; 61: 59-63.
 41. Szyfter K, Jaskuła-Sztul R, Banaszewski J, Möller L, Szyfter W, Szymeja Z. Wykazanie roli czynnika genetycznego w raku krtani na podstawie analizy genotypów enzymów detoksykacyjnych. *Wsp Onkol* 1998; 7: 159-161.
 42. Jaskuła-Sztul R, Husgafvel-Pursiainen K, Reinikainen M, Hirvonen A, Szymeja Z, Szyfter W, Szyfter K. Glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and susceptibility to smoking related larynx cancer. *Biomarkers* 1998; 3: 149-155.
 43. Johns LE, Houlston RS. *GSTM1* status and bladder cancer risk: a meta analysis. *Mutagenesis* 2000; 15: 399-404.
 44. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy Ch, Wikman H, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. Glutathione S-transferase *GSTM3* and *GSTP1* genotypes and larynx cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 1999; 8: 185-188.
 45. Shen H, Sturgis M, Khan SG, Qiao Y, Eicher SA, Xu Y, Wang X, Stom SS, Spitz MR, Kraemer KH, Weo Q. An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene *XPC* and risk of scc of the head & neck: A case-control study. *Cancer Res* 2001; 61: 3321-3325.
 46. Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Vineis P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a healthy subjects. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1437-1445.
 47. Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorąży M, Harris CC. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2001; 22: 593-597.
 48. Cascorbi I, Henning S, Brockmöller J, Gephart J, Meisel Ch, Müller JM, Lodenkemper R, Roots I. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res* 2000; 60: 644-649.
 49. Wojtukiewicz M, Sierko E. Alkohol a nowotwory. *Nowotwory* 2000; 50: 39-47.
 50. Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle Ch, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S. Role of dehydrogenase 3 and cytochrome P-450E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 2000; 87: 734-740.
 51. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis* 2001; 22: 57-61.
 52. Knudson AG. Overview: Genes that predispose to cancer. *Mutat Res* 1991; 247: 185-190.
 53. Bos JJ, van Kreijl CF. Genes and gene products that regulate proliferation and differentiation: critical targets in carcinogenesis. In: *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*, H. Vainio, P. N. Magee, D. B. McGregor, A. J. McMichael (red.), Lyon, International Agency for Research on Cancer 1992.
 54. A. Jones AS. Tumour suppressor genes and head and neck cancer. W: *Genetics in Otorhinolaryngology*, K. Kitamura & K.P. Steel (red.), Adv Otorhinolaryngol, Karger, Basel 2000; 249-260.
 55. Davenport MP, Ward RL, Hawkins NJ. The null oncogene hypothesis and protection from cancer. *J Med Genet* 2001; 39: 12-15.
 56. Tomlinson IPM, Roylance R, Houlston RS. Two hits revisited again. *J Med Genet* 2001; 38: 81-85.
 57. Boland CR, Ricciardello L. How many mutations does it take to make a tumor? *Proc Nat Acad Sci US* 1999; 96: 14675-14677.
 58. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 379-385.
 59. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3230-3239.
 60. Nathan ChA, Sanders K, Abreo FW, Nassar R, Glass J. Correlation of p53 and the proto-oncogene *elF4E* in larynx cancer: prognostic implications. *Cancer Res* 2000; 60: 3599-3604.
 61. Gasparotto D, Maestro R, Piccinin S, Vukosavljevic T, Barzan L, Doglioni C, Sulfaro S, Boiocchi M. Overexpression of *CDC25A* and *CDC25D* in head and neck cancers. *Cancer Res* 1997; 57: 2366-2368.
 62. Resto VA, Cabalero Ol, Buta MR, Westra WH, Westendorf JM, Jen J, Hieter Ph, Sidransky D. A putative oncogenic role for *MP11* in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 529-535.
 63. Sommers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5997-6000.
 64. Sauter ER, Ridge JA, Trock B, Cleveland D, Whitley KV, Mohr RM, Klein-Szanto A. Overexpression of the p53 gene in primary and metastatic head & neck carcinomas. *Laryngoscope* 1995; 105: 653-656.
 65. Sherr ChJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677.
 66. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation in the p53 gene in scc of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712-717.
 67. Law JC, Whiteside T, Gollin SM, Weissfeld J, EL-Ashmawy L, Srivastava S, Landreneau RJ, Johnson JT, Ferrell RE. Variation of p53 mutational spectra between carcinoma of the upper and lower respiratory tract. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 763-768.
 68. Gasparotto D, Maestro R, Barzan L, Vukosavljevic T, Doglioni C, Sulfaro S, Piccinin S, Boiocchi M. Recurrences and second primary tumors in the head and neck region: Differentiation by p53 mutation analysis. *Ann Oncol* 1995; 6: 933-939.
 69. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Shrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High



- frequency of p16 (*CDKN2/MTS-1/INK4A*) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma, 1996.
70. Liggett WH, Sewell DA, Rocco J, Ahrendt SA, Koch W, Sidransky D. *p16* and *p16* β are potent growth suppressors of head and neck squamous cells in vitro. *Cancer Res* 1996; 56: 4119-4123.
 71. Erber R, Klein W, Andl Th, Ender Ch, Born AL, Conradt Ch, Bartek J, Bosch FX. Aberrant p21 protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 1997; 74: 383-389.
 72. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Nat Acad Sci US* 1996; 93: 9770-9775.
 73. Mao L, Fan YH, Lotan R, Hong WK. Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1996; 56: 5128-5131.
 74. Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Szyfter K. Rearrangement involving 13q chromosome arm committed to the progression of laryngeal squamous cell carcinoma, *Cancer Genet Cytogen* 2002, w druku.
 75. Georgiou A, Gomas IP, Ferekidis E, Syrigos K, Bistola V, Giotakis J, Adamopoulos G, Androulakis G. Prognostic significance of p53, bax, and bcl-2 gene expression in patients with laryngeal carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 574-580.
 76. Wysocka B, Limon J. Znaczenie kliniczne badań cytogenetycznych w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi. *Otolaryng Pol* 2000; 54: 529-532.
 77. Gollin S. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head & Neck* 2001; 23: 238-253.
 78. Schantz SP, Huang Q, Shah K, Murty VVVS, Hsu TC, Yu G, Andersen P, Huvos AG, Chaganti RSK. Mutagen sensitivity and environmental exposures as contributing causes of chromosome 3p losses in head and neck cancers. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1239-1246.
 79. Wu X, Zhao Y, Honn SE, Tomlinson GE, Minna JD, Hong WK, Spitz MR. Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced 3p21.3 aberrations and genetic predisposition to lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1605-1608.
 80. Caruso JA, Reiners JJ, Emond J, Shultz T, Tainsky MA, Alaoui-Jamali M, Batist G. Genetic alteration of chromosome 8 is a common feature of human mammary epithelial cell lines transformed in vitro with benzo (a) pyrene. *Mutat Res* 2001; 473: 85-99.
 81. Akervall J, Wennerberg J, Mertens F. Chromosomal abnormalities in squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Genetics in Otorhinolaryngology*, K. Kitamura & K. P. Steel (red.), Adv Otorhinolaryngol, Karger, Basel 2000; 261-267.
 82. Worsham M, Benninger MJ, Zarbo RJ, Carey TE, Van Dyke DL. Deletion of 9p22-pter and loss of Y as primary abnormalities in a squamous cell carcinoma of the vocal cord. *Genes Chromosom Cancer* 1993; 6: 58-60.
 83. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch WM, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994; 54: 1156-1158.
 84. Veltman JA, van Weert I, Aubele M, Bot FJ, Ramaekers FCS, Manni JJ, Hopman AHN. Specific steps in aneuploidization correlate with loss of heterozygosity of 9p21, 17p13, and 18q21 in the progression of pre-malignant laryngeal lesions. *Int J Cancer* 2001; 91: 193-199.
 85. Frank ChJ, McClatchy KD, Devaney KD, Carey TE. Evidence that loss of chromosome 18q is associated with tumor progression. *Cancer Res* 1997; 5: 824-827.
 86. Takebayashi S, Ogawa T, Yung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, Grenman R, Carey TE. Identification of new minimally lost regions on 18 q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 3397-3403.
 87. Bockmühl U, Schlüns K, Küchler I, Petersen S, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. *Am J Pathol* 2000; 157: 369-375.
 88. Bockmühl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Diel M, Petersen I. Patterns of chromosomal alterations in metastizing and nonmetastizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 5213-5216.
 89. Buchhagen DL, Worsham MJ, van Dyke DL, Carey TE. Two regions of heterozygosity on chromosome 3p in scc of head and neck: comparison with cytogenetic analysis. *Head & Neck* 1996; 18: 529-537.
 90. Bockmühl U, Schwendel A, Diel M, Petersen I. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grading head and neck carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 5325-5329.
 91. Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K, Knuutila S. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes Chromosom Cancer* 1999; 26: 253-257.
 92. Sanchez-Cespedes M, Okami K, Sidransky D. Molecular analysis of the candidate tumor suppressor gene *ING1* in human head and neck tumors with 13q deletions. *Genes Chromosom Cancer* 2000; 27: 319-322.
 93. Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Hanafusa H, Etani T, Nishioaka S, Nishizaki K, Shimizu K. Genomic structure of human *ING1* gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 3143-3146.
 94. Khaled HM, Aly MS, Magrath IT. Loss of Y chromosome in bilharzial bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117: 32-36.
 95. Jordan JJ, Hanlon AL, Al-Saleem TI, Greenberg RE, Tricoli JV. Loss of the short arm of the Y chromosome in human prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 124: 122-126.
 96. Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, Capursa A, Guanti G. Sex chromosome loss, micronuclei, SCE and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res* 2001; 498: 159-167.
 97. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-2492.
 98. Califano J, Westra W, Meininger G, Corio R, Koch W, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 347-352.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. med. **Krzysztof Szyfter**
 Zakład Genetyki Człowieka PAN
 ul. Strzeszyńska 32
 60-479 Poznań
 tel. (061) 823 30 11, fax (061) 823 32 35
 e-mail: szyfkris@rose.man.poznan.pl

