

Wartość poznawcza i diagnostyczna oceny niestabilności chromosomowej w płaskonabłonkowym raku krtani

Research and diagnostic potential of estimation of chromosome instability in laryngeal squamous cell carcinoma

Krzysztof Szyfter^{1,2}, Piotr Dąbrowski², Marzena Gajęcka¹, Wojciech Gawęcki², Maciej Giefing¹, Małgorzata Jarmuż¹, Magdalena Kostrzewska-Poczekaj¹, Katarzyna Szukała¹, Małgorzata Wierzbicka^{1,2}

¹Zakład Mutagenetyki Środowiskowej, Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

²Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Niestabilność chromosomowa jest ukrytą cechą komórki i organizmu, ujawniającą się dopiero w wyniku kontaktu z mutagenem. Opracowano tzw. test bleomycynowy, pozwalający na ocenę ilościową niestabilności chromosomowej rozumianej jako wrażliwość na mutageny, a następnie pozwalający oszacować ryzyko genetyczne wystąpienia nowotworu. Artykuł prezentuje jego zastosowania w obrębie chorób nowotworowych głowy i szyi ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów krtani oraz węższych grup chorych, jak młodzi dorośli lub chorzy z mnogimi nowotworami pierwotnymi.

Słowa kluczowe: niestabilność chromosomowa, test bleomycynowy, rak krtani.

Abstract

Chromosome instability is a hidden attribute of a cell and/or organism emerging after an exposure to mutagen. There was established the bleomycin test for a qualitative estimation of chromosome instability being also a measure of mutagen sensitivity and further of genetic risk to develop cancer. A review presents application of bleomycin test to estimate a risk a head and cancer focused on laryngeal cancer. Next, an application to detect a tendency to develop secondary tumour and to estimate a cancer risk in young adults is discussed.

Key words: chromosome instability, bleomycin test, laryngeal cancer.

(*Postępy w chirurgii głowy i szyi* 2006; 1: 53–59)

Wprowadzenie

Przyjmuje się, że niestabilność genetyczna występująca w komórkach nowotworowych stanowi cechę charakterystyczną i jednocześnie siłą napędową procesu kancerogenezy. Pojęcie niestabilności genetycznej jest szerokie i obejmuje całość zmian informacji genetycznej obserwowanych w procesie nowotworzenia na poziomie DNA i chromosomów. Zjawisko niestabilności genetycznej wiąże się z mutagenезą, czyli powstawaniem kolejnych mutacji pod wpływem

czynników zewnętrznych (głównie) i wewnętrznych [1, 2]. Zgodnie z teorią dwóch zdarzeń Knudsona już wystąpienie mutacji w obu allelach jednego genu zmienia na tyle jego strukturę, a dalej funkcję, że może przestawić metabolizm komórki w kierunku transformacji nowotworowej. Wyjściowa hipoteza Knudsona uległa znacznym modyfikacjom i uwzględnia kolejne mutacje, ich akumulację, wejście na szlak mutatorowy i transformację nowotworową dopiero na tym etapie [3].



Przyczynowo wystąpienie niestabilności genetycznej wiąże się z szeregiem czynników. Oprócz wymienionej wyżej indukcji mutacji [4] rozpatruje się defekty cyklu komórkowego, wśród których wyróżnia się dysfunkcję punktów kontrolnych [5] oraz wadliwe działanie centrosomów w trakcie podziału chromosomów [6]. Kolejnym powodem niestabilności genetycznej są niedobory syntezy naprawczej DNA odpowiedzialnej za usuwanie uszkodzeń z cząsteczki DNA [7, 8].

Niestabilność genetyczna oznacza zarazem, że w nowotworach ma miejsce współwystępowanie komórek różniących się genotypowo. Zjawisko to traktuje się jako kompetencyjne formowanie różnych klonów komórkowych w obrębie nowotworu, które dalej mogą ulegać eliminacji wskutek presji selekcyjnej. W przypadku nowotworów głowy i szyi zjawisko klonalnej ewolucji komórek nowotworowych monitorowane jako szlak zmiennych aberracji chromosomowych jest dobrze opisane [9–11].

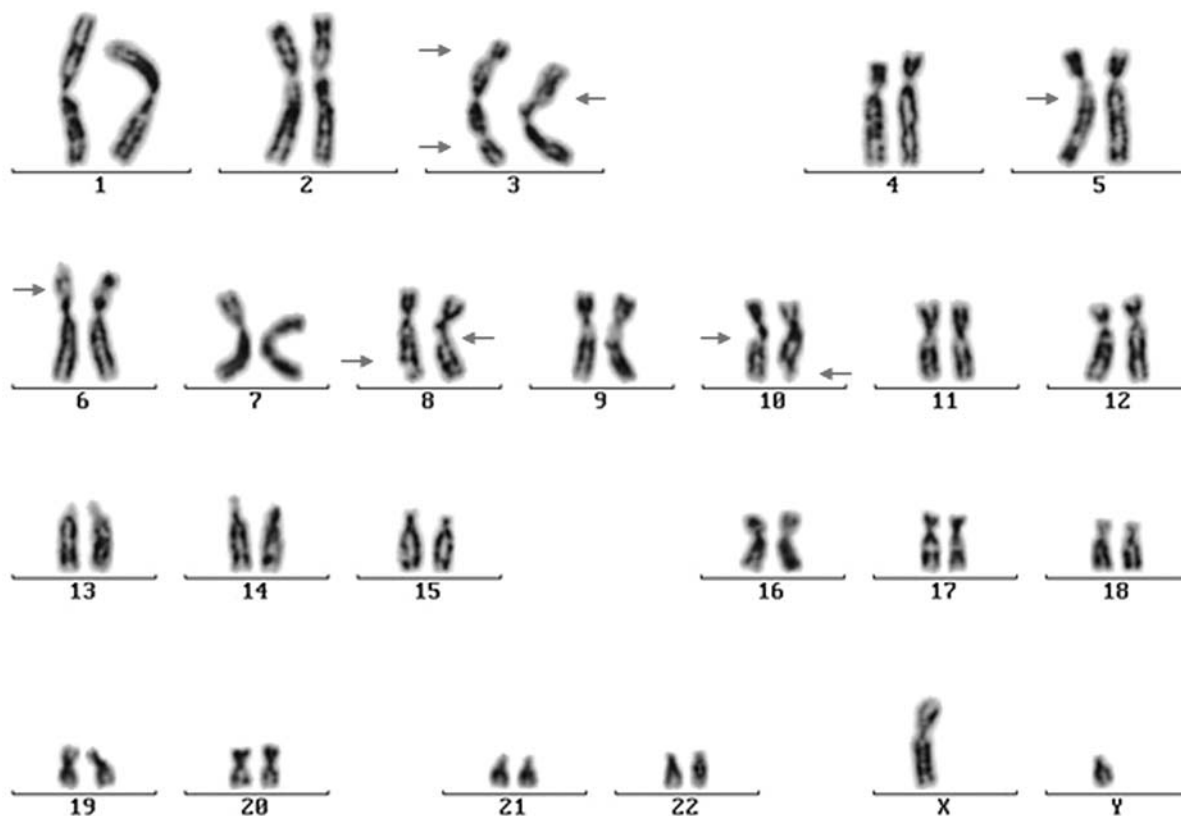
Obecne opracowanie dotyczy wyłącznie niestabilności chromosomowej badanej zarówno pod kątem poznawczym, jak też aplikacyjnym. Praktyczne wykorzystanie ustaleń na temat niestabilności chromosomowej jest nakierowane na ocenę ryzyka wystąpienia nowotworów oraz opracowanie markerów prognostycznych przebiegu choroby nowotworowej. Powiązanie badań

podstawowych z oczekiwaniami klinicystów idzie także w kierunku poszukiwania markerów etapów choroby (np. markery wczesnej fazy mikroprzerzutów, markery tendencji powstawania wznowy). Celem artykułu jest przedstawienie badań i ustaleń własnych w dziedzinie niestabilności chromosomowej w nowotworach głowy i szyi na tle literatury przedmiotu.

Uwagi metodologiczne

W badaniach nad niestabilnością chromosomową korzysta się z technik cytogenetycznych [12]. Obecnie wyraźnie oddziela się cytogenetykę klasyczną (konwencjonalną) od cytogenetyki molekularnej.

Klasyczna cytogenetyka preferuje leukocyty krwi obwodowej hodowane *in vitro*. Pobudzone mitogenem komórki doprowadza się do fazy podziałowej, kiedy najłatwiej można obserwować chromosomy i oceniać prawidłowość ich liczby i struktury. Podobnie pracuje się z komórkami linii wyprowadzonych z nowotworów. Natomiast hodowla bezpośrednia komórek guzów litych po przeprowadzeniu ich w stan zawiesiny jest trudna, długotrwała, a ponadto cechuje ją niska skuteczność. Przedmiotem oceny jest liczba chromosomów oraz wszelkie defekty strukturalne (pęknięcia,



Ryc. 1. Przykładowy układ złamań chromosomów widoczny w kariogramie człowieka



złamania, delecje lub obecność dodatkowego materiału, translokacje, obecność dodatkowych centromerów, występowanie tzw. izochromosomów itp.). Pewne wnikięcie w strukturę poszczególnych chromosomów jest możliwe w wyniku tzw. prążkowego wybarwienia chromosomów (ang. *banding*). Obserwacji dokonuje się za pomocą mikroskopu świetlnego, chociaż obecnie coraz powszechniej korzysta się z programów komputerowych ułatwiających i obiektywizujących ocenę.

W obrębie cytogenetyki klasycznej całkowicie pozostaje test bleomycynowy, stworzony na użytek badania podatności komórek (organizmu) na działanie mutagenów. Różnicę stanowi podanie do hodowli bleomycyny jako wzorcowego, uogólnionego mutagenu oraz zliczanie wyłącznie złamań chromosomów (ryc. 1.) [13].

Postęp w badaniach cytogenetycznych nastąpił przy udziale techniki FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*). Jej istotą jest stosowanie znakowanych fluorescencyjnie sond, które hybrydowane do komplementarnych fragmentów chromosomów pozwalają na potwierdzenie obecności (lub braku) poszukiwanych fragmentów genomu. Efektem wprowadzenia techniki FISH jest nie tylko znaczna poprawa granic detekcji, ale także wysoka spektakularność, zwłaszcza przy zastosowaniu zestawu sond malujących kolorami innymi dla każdego chromosomu [14].

W ostatnich 15 latach oferta badań cytogenetycznych uległa istotnemu poszerzeniu dzięki wprowadzeniu elementów biologii molekularnej do analizy chromosomów. Na użytek tego artykułu nowe propozycje można zredukować do wymienienia techniki porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *comparative genomic hybridization* – CGH). W tej technice do wzorcowych chromosomów hybryduje się równolegle fragmentowany DNA, np. z komórek prawidłowych i nowotworowych. Zastosowanie różnicowego znakowania obu DNA pozwala na ocenę delecji lub amplifikacji DNA we wszystkich chromosomach nowotworowego DNA [15].

Ocena niestabilności chromosomowej w aspekcie ryzyka wystąpienia nowotworów

Pod koniec lat 80. w laboratorium T.C. Hsu (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Teksas, USA) opracowano test wrażliwości na mutageny znany jako test bleomycynowy, oparty na dwóch założeniach. Po pierwsze, bleomycyna stosowana jako cytostatyk działa radiomimetycznie, indukując dwuniciowe przerwy nici DNA. Jednocześnie generuje także przerwy jednoniciowe oraz miejsca apurynowe. Współwystępowanie takich efektów biologicznych pozwala na traktowanie bleomycyny jako uogólnionego, wzorcowego mutagenu, a wrażliwość na bleomycynę odzwierciedla podatność na działanie mutagenów w ogóle. Po drugie, test prowadzi się w od-

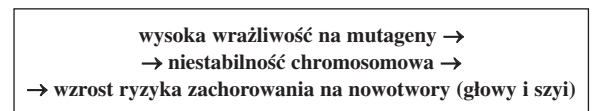
niesieniu do hodowanych *in vitro* limfocytów krwi obwodowej. Limfocyty są łatwe do pozyskania, a ponadto mogą być traktowane jako komórki modelowe dla całego organizmu. Tym samym uzyskano metodę oceny indywidualnej wrażliwości na mutageny (ryc. 2.).

Do celów analizy ilościowej zaproponowano skalę liczbową. Liczy się tylko dwa parametry: liczbę złamań chromatyd (ang. *breaks per cell, b/c*) oraz procent komórek zawierających złamania. Przyjęto, że wartości współczynnika *b/c* poniżej 0,8 oznaczają stabilność chromosomową, zakres 0,8–1,0 oznacza niestabilność chromosomową, której odpowiada podwyższone ryzyko wystąpienia nowotworów, a powyżej wartości *b/c*=1,0 mówi się o hiperniestabilności i znacznie podwyższonym ryzyku.

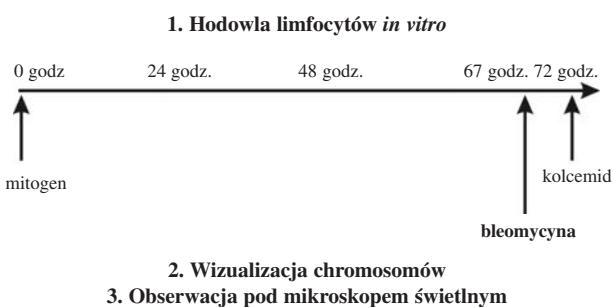
W tym miejscu należy dodać, że wrażliwość na działanie mutagenów jest wartością ukrytą i dopiero w warunkach ekspozycji na mutagen objawia się indywidualna podatność. Test bleomycynowy został omówiony w języku polskim we własnej pracy poglądowej autorów [16].

W badaniach własnych przeprowadzonych na grupie 61 chorych na płaskonabłonkowego raka krtani w porównaniu z 30-osobową grupą kontrolną stwierdzono znamienne podwyższenie indukowanego bleomycyną wskaźnika *b/c* (0,68 vs 0,37). Obie grupy cechował rozrzut wyników indywidualnych zbliżony do normalnego z wyraźnym przesunięciem krzywej dotyczącej grupy osób chorych w stronę wyższych wartości [17]. Wyniki nie odbiegały od przedstawionych przez innych autorów. Warto też przytoczyć pracę ośrodka wrocławskiego wykonaną na materiale pozyskanym od 37 chorych na nowotwory głowy i szyi i od 23 zdrowych osobników z grupy kontrolnej [18].

Zarówno dane literaturowe, jak i wyniki własne jednoznacznie dowodzą, że istnieje następujący związek przyczynowy:

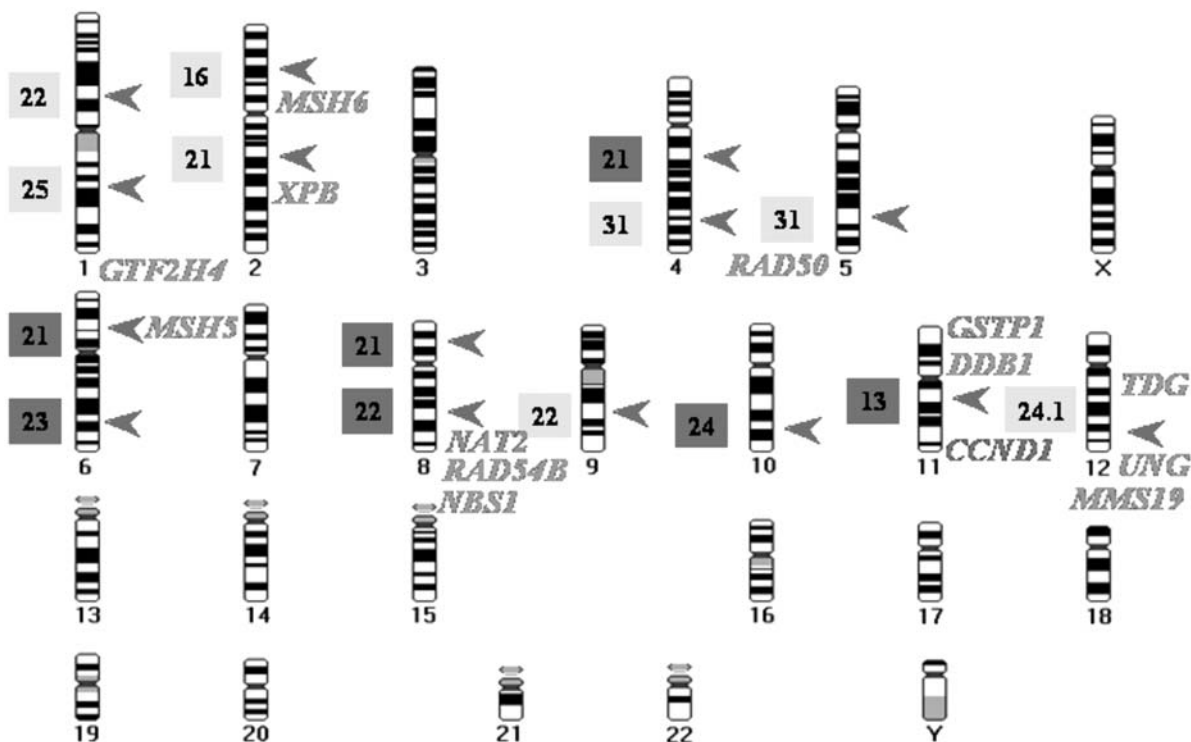


Wobec tego postawiono kolejne pytanie, wychodzące poza oczekiwany zakres stosowalności testu bleomycynowego i podjęto próbę powiązania niestabilno-



Ryc. 2. Schemat prowadzenia testu bleomycynowego





Ryc. 3. Występowanie genów zaangażowanych w proces kancerogenezy na tle najczęstszych złamań chromosomów

ści chromosomowej z przebiegiem raka krtani. Współczynnik b/c obliczono dla grup utworzonych na podstawie stopnia agresywności histologicznej (*G – grading*). Stwierdzono, że rozkład wyników indywidualnych nie jest normalny, lecz zbliżony do bimodalnego, z wyraźnym wystąpieniem grupy o wysokim współczynniku b/c. Obserwacja ta nakłada się na wyższą (zbliżoną do znamienności statystycznej) wartość współczynnika b/c w grupie G3 w porównaniu z grupami G1+G2 [19]. Wynik ten nie został potwierdzony w nowszych badaniach ośrodka wrocławskiego [20]. Choć można było zatem spodziewać się gorszych rokowań w grupie z wysokim współczynnikiem b/c, to 2-letnia obserwacja dalszych losów pacjentów leczonych na raka krtani nie potwierdziła tego założenia [19]. Wydaje się więc, że niestabilność chromosomowa informuje o ryzyku wystąpienia raka krtani, ale nie ma wpływu na przebieg choroby. Markerów prognostycznych należy poszukiwać nie na poziomie całego kariotypu, lecz konkretnie umiejscowionych aberracji, co zostanie omówione w dalszej części artykułu. Niemniej warto dodać, że stwierdzenie pozytywnego związku między ogólnym poziomem aberracji chromosomowych a ryzykiem rozwoju nowotworów wyprowadzono także w wieloletnich badaniach prowadzonych przez Europejską Grupę Badania Markerów Cytogenetycznych, prowadzoną przez Hannu Norppę z Helsinek [21].

Badania nad niestabilnością chromosomową kontynuowano w zakresie poznawczym. Za pomocą wybarwienia chromosomów barwnikiem DAPI, co stanowi rozwinięcie testu bleomycynowego, stwierdzono nielosowy rozkład pęknięć, które najczęściej występowały w chromosomach 1, 2, 3, 7 i 13 [22]. Nielosowy rozkład miejsc pęknięć chromosomów został potwierdzony także w innych badaniach [23]. W tej sytuacji wydawało się celowe rozwinięcie tego kierunku badań. Potwierdzono wcześniejszą tezę o nierównomiernym rozkładzie miejsc pęknięć, a jako najczęściej występujące wskazano: 1p22, 5q31, 6q23 i 10q24. Wskazano na fakt, że miejsca częstych pęknięć pokrywają się z lokalizacją polimorficznych genów, tzw. niskiej penetracji odpowiedzialnych za procesy detoksykacji kancerogenów i naprawy uszkodzeń DNA (ryc. 3.). Pęknięcia chromosomów w tych regionach zakłócają ekspresję genów i wpływają na upośledzenie wzmiankowanych procesów [24]. Związek sprawczy między niedoborem syntezy naprawczej DNA a występowaniem aberracji chromosomowych był już podnoszony w literaturze [25, 26].

Najnowsze doniesienia literaturowe z omawianej dziedziny, pochodzące z Katedry Otolaryngologii Wolnego Uniwersytetu w Amsterdamie, próbują połączyć test bleomycynowy z badaniem ekspresji genów za pomocą techniki mikromacierzy DNA. Porównanie ko-



mórek o wysokiej i niskiej niestabilności może doprowadzić do wskazania genów kluczowych dla rozwoju procesu kancerogenezy/onkogenezy [27].

Niestabilność chromosomowa a występowanie nowotworów krtani u młodych dorosłych

Rozważania opisane w powyższej sekcji dotyczyły nowotworów głowy i szyi, a zwłaszcza nowotworów krtani w całej populacji chorych. Tymczasem wnioski wyprowadzane z badań nad niestabilnością chromosomową można odnosić do bardziej specyficznych sytuacji.

Wcześniejsze doniesienia literaturowe sugerowały pewną odrębność genetyczną młodych dorosłych chorych na raka krtani. O wysokiej podatności na indukcję uszkodzeń chromosomów u młodych dorosłych z nowotworami głowy i szyi donosiła publikacja Schantza i wsp. [28]. Jednak dokładniejsza analiza tej publikacji pozwoliła na odnalezienie błędu metodologicznego polegającego na niewłaściwym dobraniu grupy kontrolnej. Badania przeprowadzone w naszym zespole nie wykazały różnic podatności na działanie mutagenów między grupą młodych dorosłych a grupą typowych pacjentów z rakiem krtani (śr. wieku ok. 60 lat) [29]. Do podobnych wniosków doszli Szekely i wsp. [30], którzy przebadali testem bleomycynowym chorych narodowości węgierskiej. Wyniki uzyskane w naszym zespole ani podane przez Szekelyego bynajmniej nie kwestionują założenia o genetycznych przyczynach zapadalności na raka krtani w młodym wieku. Analiza polimorfizmu genetycznego niektórych genów kodujących enzymy detoksykacyjne wskazuje na względne nagromadzenie wariantów odpowiedzialnych za wolną detoksykację u młodych dorosłych [31]. Spostrzeżenie to należy traktować jako wstępne i oprzeć je na poszerzonej grupie chorych na raka krtani.

Niestabilność chromosomowa a występowanie drugich (mnogich) pierwotnych nowotworów głowy i szyi

Przed przystąpieniem do omówienia występowania mnogich pierwotnych nowotworów (ang. *multiple primary tumors* – MPT) regionu głowy i szyi należy podkreślić ich odrębność od wznowy i przerzutowania [32]. Odrębność nie sprowadza się do różnic teoretycznych, lecz pociąga za sobą implikacje kliniczne na poziomie terapii. O ile w leczeniu nowotworów pierwotnych (pojedynczych lub mnogich) pierwszym wskazaniem jest podjęcie zabiegu chirurgicznego, to w leczeniu przerzu-

tów i wznowy pierwszoplanowo przewidziana jest radioterapia. Zagadnieniu odróżniania MPT od wznowy była poświęcona jedna z prac zespołu, która opisuje zastosowanie markerów mikrosatelitarnych do wykazania klonalności dwóch ognisk nowotworów (wskazanie na wznowę) lub niezależności klonalnej (MPT) [33]. Technika ta pozostaje poza obrębem tego opracowania i dlatego ta praca nie będzie dalej omawiana.

Występowanie drugich (mnogich) pierwotnych nowotworów w regionie głowy i szyi przede wszystkim wiąże się przyczynowo z długotrwałą ekspozycją na dym tytoniowy i napoje alkoholowe. Wynikiem takiej łącznej ekspozycji jest rozległe uszkodzenie błony śluzowej jamy ustnej, gardła i krtani, w których mogą rozwijać się niezależne ogniska procesu nowotworzenia. Epidemiologia i etiologia MPT zostały obszernie omówione w pracy poglądowej [34]. Badania nad wyjaśnieniem molekularnego mechanizmu powstawania mnogich nowotworów pierwotnych przyniosły sformułowanie teorii kanceryzacji płaszczyznowej (ang. *field cancerization*), podanej po raz pierwszy już w 1953 r. przez Slaughtera i wsp. [35, 36].

Podobnie jak w przypadku nowotworów głowy i szyi u młodych dorosłych punktem wyjścia do badań nad związkiem między niestabilnością chromosomową a podatnością na występowanie MPT była wcześniejsza publikacja zespołu Schantza (Houston, Teksas, USA) [37]. Za pomocą testu bleomycynowego określono podatność na uszkodzenia chromosomów w grupie 84 chorych z nowotworami głowy i szyi. W toku dalszej obserwacji wykazano, że MPT rozwijały głównie chorzy o hiperniestabilności chromosomowej ($b/c > 1,0$). Jednak późniejsze badania zespołu holenderskiego przeprowadzone na grupie chorych z nowotworami głowy i szyi liczącej 218 osób obserwowanych dalej przez 6 lat nie potwierdziły tych wyników. Chorzy, u których rozwinęły się drugie pierwotne nowotwory, nie różnili się od pozostałych pod względem podatności na działanie mutagenów. Stwierdzono, że jedynym istotnym czynnikiem predysponującym do rozwoju MPT była intensywność palenia papierosów [38].

Tymczasem wyniki badań własnych wydają się potwierdzać wcześniejszą pracę Schantza i wsp. [37]. Wskaźnik b/c wyznaczony dla chorych z MPT regionu głowy i szyi ($n=36$) znamienne przewyższał średnią wartość uzyskaną dla grupy chorych z jednym nowotworem ($n=57$) oraz dla grupy osób zdrowych palących papierosy ($n=47$). Ponadto w analizie jakościowej stwierdzono, że większość złamań chromosomów znajduje się w *loci* genów związanych z naprawą DNA, przeciwnowotworowych genów supresorowych i onkogenów [39]. Dalsze badania własne nad genetycznym uwarunkowaniem występowania MPT nie poszły w kierunku ogólnej predyspozycji genetycznej, lecz wskazania konkretnych genów działających



sprawczo. Przebadano 11 polimorfizmów genów kodujących enzymy aktywacyjne, detoksykacyjne i naprawcze. Wskazano na określone warianty genów CY-P1A1, GSTM1 i NAT2 jako podnoszące ryzyko wystąpienia MPT. Ponadto ryzyko genetyczne dalej wzrasta przy współwystępowaniu pewnych kombinacji genowych [40].

Dla uzupełnienia dyskusji warto zacytować pracę Keller i wsp. [41], której przedmiotem jest niestabilność chromosomowa u młodych dorosłych z mnogimi pierwotnymi guzami. Autorzy mniej uwagi przykładali do wartości średnich parametrów cytogenetycznych, koncentrując się na określeniu liczby osób o wysokiej niestabilności chromosomowej w każdej grupie. Stwierdzono, że znacznie wyższy udział w grupie pacjentów z MPT mają osoby o wysokich parametrach niestabilności chromosomowej oraz obciążeni rodzinie nowotworami.

Inne kierunki wykorzystania niestabilności chromosomowej

Własne zainteresowania badawcze nie wyczerpują wszystkich możliwości badawczych i aplikacyjnych zjawiska niestabilności chromosomowej. W tej sekcji artykułu uwaga zostanie zwrócona na te właśnie aspekty.

W omawianych wyżej pracach mocno akcentowano znaczenie czynnika genetycznego w wystąpieniu i przebiegu choroby nowotworowej głowy i szyi. Chociaż istnieje powszechna zgoda na współdziałanie czynnika genetycznego i predyspozycji genetycznej, to zaczyna dominować przekonanie o przewadze znaczenia czynnika środowiskowego nad genetycznym [42]. Przewaga nie oznacza eliminacji i stąd trwałość zainteresowań zjawiskami determinowanymi genetycznie. Omówienie stanu wiedzy na ten temat można znaleźć w literaturze anglojęzycznej [43] i polskiej [44]. Zastosowanie testu bleomycynowego do oceny ryzyka wystąpienia raka głowy i szyi wskazało, że niestabilność chromosomowa obok obciążeń rodzinnych jest najważniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko [45].

Zaproponowano także zastosowanie testu bleomycynowego do oceny wrażliwości na promieniowanie jonizujące, a dalej także skuteczności radioterapii ze wskazaniem na wykrywanie osób nadwrażliwych na radioterapię. Ponieważ bleomycyna jest znana jako radiomimetyk, mogło by się wydawać, że szczególnie dobrze oddaje radiowrażliwość badanego organizmu. Na modelu istotnie potwierdzono to założenie [46], ale sprzeciw radioterapeutów wywołuje stosowanie limfocytów jako komórek modelowych, a te niekoniecznie pozwalają na przeniesienie wyników na tkanki lite. Obawy, niestety, zostały potwierdzone w pracy porównawczej Kleinsassera i wsp. [47].

Uwagi końcowe

Ocena niestabilności chromosomowej oparta jest na rzetelnym rozpoznaniu mechanizmu działania mutagenów na materiał genetyczny. Test bleomycynowy opracowany na tej podstawie jest użytecznym narzędziem do badania predyspozycji genetycznej nowotworów krtani oraz bardziej specyficznych form postaci raka u młodych dorosłych lub tendencji do rozwoju mnogich nowotworów pierwotnych. Wykonanie testu wymaga posiadania podstawowego laboratorium cytogenetycznego, bowiem nie jest wymagające sprzętowo i nie wykracza poza podstawowe umiejętności personelu przeszkolonego w zakresie technik cytogenetycznych.

Piśmiennictwo

1. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 2005; 230: 6-19.
2. Szyfter K, Jałoszyński P, Kujawski M, et al. Niestabilność genetyczna w przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. *Nowotwory* 2002; 52 (suppl. 3): 26-31.
3. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 776-81.
4. Bardelli A, Cahill DP, Lederer D, et al. Carcinogen-specific induction of genetic instability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5770-5.
5. Carr AM. DNA structure dependent checkpoints as regulators of DNA structure. *DNA Repair* 2002, 1: 983-94.
6. Pihan GM, Wallace J, Zhou Y, et al. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 2003, 63: 1398-404.
7. Bohr VA. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis* 1995, 16: 2885-92.
8. Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 1998; 400: 15-24.
9. Carey TE, van Dyke D, Worsham MJ. Nonrandom chromosome aberrations and clonal populations in HNC. *Anticancer Res* 1993; 13: 2561-68.
10. Jin Ch, Jin Y, Wennerberg J, et al. Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 66-76.
11. Shiomi H, Sugihara H, Kamitani S, et al. Cytogenetic heterogeneity and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 147: 50-61.
12. Bal J (red.) *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Springer PWN, Warszawa 1998.
13. Jarmuż M, Gajęcka M, Szyfter K. Test bleomycynowy – ocena niestabilności chromosomowej, W: Słomski R (red.). *Przykłady analiz DNA*; wyd. 2. Wydawnictwo AR im. A. Cieszkowskiego, Poznań 2004: 350-4.
14. Jarmuż M, Lipiński D, Michalak E, et al. Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ w inżynierii genetycznej. W: Słomski R (red.). *Przykłady analiz DNA*; wyd. 2. Wydawnictwo AR im. A. Cieszkowskiego, Poznań 2004: 355-8.
15. Kujawski M. Analiza aberracji chromosomowych w chorobach nowotworowych metodą porównawczej hybrydyzacji genomów (CGH). W: Słomski R (red.). *Przykłady analiz DNA*; wyd. 2. Wydawnictwo AR im. A. Cieszkowskiego, Poznań 2004: 365-8.
16. Jarmuż M, Szyfter K. Zastosowanie testu bleomycynowego do określania predyspozycji genetycznej do zachorowania na nowotwory. *Współcz Onkol* 1999; 3: 188-90.
17. Dąbrowski P, Kita S, Szyfter W, et al. Ukryta niestabilność chromosomowa a ryzyko wystąpienia raka krtani. *Otolaryngol Pol* 1999; 53: 245-51.
18. Kręcicki T, Schlade K, Blin N, et al. Chromosome instability in HNC patients. *Oncol Rep* 1997; 4: 1383-5.



19. Dąbrowski P, Szyfter W, Szejma Z, et al. Association between chromosome instability and histological aggressiveness in laryngeal cancer. *OtoRhinoLaryngol. Nova* 2001; 11: 193-7.
20. Zych M, Stembalska-Kozłowska A, Schlade-Bartusiak K, et al. Ocena wrażliwości pacjentów z rakiem krtani na czynniki mutagenne. *Otolaryng Pol* 2004; 58: 741-5.
21. Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res* 2000; 60: 1619-25.
22. Kita S, Jarmuż M, Dąbrowski P, et al. Ocena indukowanych bleomycyną aberracji struktury chromosomów u chorych z rakiem krtani. *Otolaryngol Pol* 1999; 53: 253-8.
23. Hou ChD, Chiang J, Tai JJ. Testing the nonrandomness of chromosomal breakpoints using highest observed breakages. *Human Genet* 1999; 104: 350-5.
24. Gajęcka M, Jarmuż M, Szyfter W, et al. Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal scc patients. *Oncol Rep* 2004; 12: 153-7.
25. Richardson Ch, Jasin M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 2000, 405: 697-700.
26. Pfeifer P, Goedecke W, Obe G. Mechanism of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000, 15: 289-302.
27. Cloos J, de Boer WP, Snell MH, et al. Microarray analysis of bleomycin-exposed lymphoblastoid cells for identifying cancer susceptibility genes. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 71-7.
28. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, et al. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA* 1989; 262: 3313-5.
29. Gawęcki W, Kostrzewska-Poczekaj M, Gajęcka M, et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults – a preliminary assessment of genetic factor. *Rep Pract Oncol Radiother* 2005; 10: 17-21.
30. Szekely G, Remenar E, Kasler M, et al. Mutagen sensitivity of patients with cancer at different sites of the head and neck. *Mutagenesis* 2005; 20: 381-5.
31. Gawęcki J. Praca doktorska, AM Poznań, 2006.
32. Giefing M, Wierzbicka M, Szyfter K. Drugie pierwotne nowotwory głowy i szyi – przegląd teorii wyjaśniających ich powstawanie oraz najnowszej terminologii. *Współcz Onkol* 2004; 8: 466-74.
33. Giefing M, Rydzanicz M, Szukala K, et al. Second primary tumors (SPT) of head and neck. Distinguishing of "true" SPT from micrometastasis by LOH analysis of selected chromosome regions. *Neoplasma* 2005; 52: 374-80.
34. Wierzbicka M, Szyfter K. Mnogie pierwotne nowotwory w obrębie głowy i szyi – podłoże genetyczne. *Post Chir Głowy Szyi* 2003; 1: 21-40.
35. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for HNC: Implication for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-92.
36. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer A, et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003; 63: 1727-30.
37. Schantz SP, Spitz MR, Hsu TC. Mutagen sensitivity in patients with HNC: a biological marker of risk of MPT. *J Nat Cancer Inst* 1990; 82: 1773-5.
38. Cloos J, Leemans CR, van der Sterre ML, et al. Mutagen sensitivity as a biomarker for second primary tumors after head and neck carcinoma. *Cancer Epidem Biomarkers Prevent* 2000; 9: 713-7.
39. Wierzbicka M, Jarmuż M, Gajęcka M, et al. Wrażliwość na mutageny chorych z mnogimi nowotworami pierwotnymi (MPT) głowy i szyi – ilościowa i jakościowa ocena złamań chromosomów w teście bleomycynowym. *Otolaryng Pol* 2004; 58: 441-9.
40. Rydzanicz M, Wierzbicka M, Gajęcka M, et al. The impact of genetic factor on the incidence of multiple primary tumors of the head and neck. *Cancer Lett* 2005; 224: 263-78.
41. Keller U, Grabenbauer G, Kuechler A, et al. Cytogenetic instability in young patients with multiple primary cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 157: 25-32.
42. Le Marchand L. The predominance of the environment over genes in cancer causation: implications for genetic epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1037-9.
43. Partridge M. Current status of genetics for prediction, prognosis, and gene therapy. *Current Opinion Oncol* 2000, 8: 69-79.
44. Szyfter K. Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu raka płaskonabłonkowego krtani. *Post Chir Głowy Szyi* 2002; 1: 5-19.
45. Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, et al. Family history of cancer and increased risk of HNC. *Cancer Lett* 1999, 146: 93-101.
46. Adema AD, Cloos J, Verheijen RH, et al. Comparison of bleomycin and radiation in the G2 assay of chromatid breaks. *Int J Radiat Biol* 2003, 79: 655-61.
47. Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, et al. Comparing of 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.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. **Krzysztof Szyfter**
 Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej
 Akademia Medyczna
 im. Karola Marcinkowskiego
 ul. Przybyszewskiego 49
 60-355 Poznań
 e-mail: szyfkris@man.poznan.pl

