

# Wartość prognostyczna marginesu operacyjnego w nowotworach głowy i szyi

## *A prognostic significance of surgical margin in head and neck cancer*

Krzysztof Szyfter<sup>1,2</sup>, Daniela Mielcarek-Kuchta<sup>2</sup>, Katarzyna Kiwerska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mutagenyzy Środowiskowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

### **Streszczenie**

Niepowodzenia leczenia nowotworów głowy i szyi wiążą się z występowaniem lokalnych i odległych przerzutów, wznowy lokalnej i rozwojem drugich pierwotnych nowotworów. Ponieważ rutyna kliniczna wykazuje umiarkowaną przydatność w predykcji dalszego rozwoju choroby nowotworowej, sięga się po analizę molekularną i subkomórkową. Nie ma jasności, czy wyższą wartość informacyjną ma analiza samego guza, czy też marginesu chirurgicznego, uznanego histologicznie za prawidłowy. W artykule przedyskutowano potencjał zawarty w analizie mutacji genu TP53 i innych genów, hipermetylacji regionów promotorowych wybranych genów i niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych do celów predykcyjnych. Wskazano na analizę mutacji i ekspresji TP53 jako najbardziej wiarygodnego czynnika predykcyjnego, jednocześnie wskazując na ograniczenia technik molekularnych.

**Słowa kluczowe:** raki głowy i szyi, prognoza choroby, margines operacyjny, techniki molekularne, gen TP53.

### **Abstract**

Failure of the treatment in head and neck cancer is connected with local and distal tumor metastases, local recurrence and formation of second primary tumors. Clinical procedures have a limited applicability to a prediction a further progression of the tumor. Hence an attention has turned towards molecular and subcellular analyses. It is not clear yet, which of the analyses would provide a better prognostic information, that in primary tumor itself or in the histologically normal surgical margin. An informative potential of the analysis of TP53 gene mutations, hypermethylation of promoters of the chosen genes and instability of microsatellite sequences for disease prognosis is reviewed. While TP53 mutation profile and gene expression appear to be the most reliable prognostic factors, the limitations of using the molecular techniques are discussed.

**Key words:** head and neck cancer, disease prognosis, molecular analysis, surgical margin, molecular analyses, gene TP53.

(*Postępy w chirurgii głowy i szyi* 2009; 3: 56–62)

## **Wprowadzenie**

W przypadku nowotworów złośliwych w obrębie głowy i szyi głównymi czynnikami mającymi wpływ na prognozę są możliwość radykalnego chirurgicznego usunięcia zmiany oraz brak lub obecność przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. W pierwszym przypadku o radykalności mówi się, jeśli zachowano

margines niezmienionej histologicznie błony śluzowej. Wielkość tego marginesu podlega różnym wpływom (np. topografia zmiany i jej rozległość, zajęcie tkanek bardzo istotnych dla funkcji życiowych chorego, współistnienie zmian przednowotworowych o innym umiejscowieniu) i jest – obok zmian w układzie chłonnym – ważnym parametrem determinującym podejście



do radioterapii następowej. Należy wspomnieć również, że istnieją różnice prognostyczne związane z pierwotnym umiejscowieniem zmiany. Wiadomo, że guzy T1 krtani roją lepiej niż raki dna jamy ustnej i gardła. Obok rutynowego badania barwienia hematoksyliną i eozyną (HE), na podstawie którego można ocenić obrzeże zmiany, tzw. czysty margines, bardzo przydatne są badania ultrastrukturalne pod mikroskopem elektronowym, pozwalające na ocenę frontu naciekania nowotworowego, rodzaju komórek, ich dojrzałości i indeksu mitotycznego. Na podstawie piśmiennictwa wydaje się, że ocena ta może być niewystarczająca jako główne kryterium diagnostyczne i prognostyczne. Jest to o tyle istotne, że dla niektórych lokalizacji nowotworu przeżywalność 5-letnia nie przekracza 27% [1, 2]. Z tego powodu ciągle poszukuje się nowych metod diagnostycznych.

Ostatnio w piśmiennictwie pojawia się coraz więcej prac dotyczących wpływu zmian w obrębie marginesu tkanki nowotworowej na powstawanie wznów nowotworowych zarówno o charakterze miejscowym, jak i regionalnym, rozwoju drugich pierwotnych nowotworów oraz ognisk satelitarnych [3–5]. Mówiąc o czystym marginesie, najczęściej ma się na myśli ocenę histologiczną preparatów barwionych HE, a w niektórych przypadkach poszerzoną o barwienia immunohistochemiczne oceniające ekspresję białka TP53 czy innych białek regulujących cykl komórkowy, np. cykliny D1. Kolejnym niezwykle cennym badaniem jest ocena ultrastrukturalna guza w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Dotyczy to frontu naciekania nowotworowego, liczby podziałów (indeks mitotyczny), rodzaju komórek i ich dojrzałości. Ocena ta wnosi kolejne istotne informacje oraz umożliwia precyzyjną diagnostykę marginesu resekcyjnego. Materiał poddany ocenie ultrastrukturalnej jest następnie oceniany technikami biologii molekularnej. Ważna jest informacja od patologa, że wybrano właściwy fragment resekcyjny, zawierający liczbę komórek nowotworowych w przedziale 70–80%. Materiał ten i tzw. margines resekcyjny może być dalej poddany ocenie cytogenetycznej i molekularnej.

Mimo postępu metod diagnostycznych, wyleczalność nowotworów krtani pozostaje na względnie niewysokim poziomie, nie zmieniając się w większym stopniu w ostatnich dekadach. Wśród przyczyn takiego stanu rzeczy wymienia się: częstą tendencję do wznowy procesu nowotworowego, formowanie drugich pierwotnych nowotworów oraz powstawanie przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. Jednocześnie obserwuje się równoległy postęp badań podstawowych, a zwłaszcza biologii molekularnej, która wyjaśniła wiele aspektów podatności na nowotwory głowy i szyi, mechanizmy choroby nowotworowej i przyczyniła się znacząco do powstania terapii celowanej [6–9]. W tej sytuacji zwrócono uwagę na wykorzystanie ustaleń ko-

mórkowych i molekularnych do opracowania markerów przebiegu choroby nowotworowej, w tym prognozowania tendencji do wznowy i powstawania drugich nowotworów pierwotnych. Zasadniczo badania idą w dwóch kierunkach. W pierwszym usiłuje się rozpoznać, czy charakterystyka samego guza zawiera w sobie informację o dalszym przebiegu choroby. Drugie podejście skupia się na analizie molekularnej otoczenia guza, uznanego histologicznie za tkankę prawidłową.

Celem artykułu jest przedstawienie i ocena obecnego stanu badań nad przydatnością analizy marginesu guza, usuwanego w trakcie zabiegu chirurgicznego i tym samym dostępnego do dalszych badań. Wartość diagnostyczna samego guza zostanie omówiona tylko porównawczo, ponieważ obecnie najpewniejszym sposobem prognozowania choroby jest uwzględnienie charakterystyki guza w skali TNM wraz ze skalą zróżnicowania histologicznego (*grading* – parametr G) [10].

Zabiegi chirurgiczne nowotworu pierwotnego mają na celu całkowite usunięcie guza z jego umiejscowienia pierwotnego. Warunek ten jest szczególnie istotny, gdy zastosowana w pierwszym etapie radioterapia lub chemioterapia nie przyniosły oczekiwanego efektu terapeutycznego. Dla bezpieczeństwa zaleca się usuwanie guza wraz z marginesem bezpieczeństwa. Praktyka kliniczna wskazuje, że wielkość marginesu w przypadkach raka jamy ustnej powinna wynosić 1 cm, a dla raków krtani, zwłaszcza w okolicy głośni, ok. 0,5 cm [11]. Zalecenie usuwania wraz z nowotworem marginesu tkanki zdrowej budzi jednak podejrzenie, że ani praktyka kliniczna, ani analiza histologiczna nie mogą wykluczyć istnienia poza rozpoznany guzem zmian, które mogą zdecydować o nawrocie choroby, lub powstania nowego ogniska nowotworowego.

Występowanie zmian w obrębie marginesu, określonego histologicznie jako tkanka prawidłowa, odkryto w badaniach nad uszkodzeniami DNA pod wpływem kancerogenów dymu tytoniowego. Wykazano obecność tzw. adduktów kancerogenów: DNA w tkance zdrowej otaczającej guz krtani, a poziomy tych uszkodzeń nie odbiegały lub wręcz przekraczały oznaczone w materiale usuwanego chirurgicznie guza [12, 13]. Obecnie wiadomo, że addukty DNA z jednej strony dowodzą aktywnego oddziaływania kancerogenów z DNA i podnoszą ryzyko wystąpienia transformacji nowotworowej, z drugiej natomiast są usuwane przez mechanizm naprawy DNA i niekoniecznie oznaczają wstąpienie na nieodwracalną ścieżkę nowotworową [14]. Te same uwagi dotyczą oznaczeń poziomu jednoniciowych przerw w DNA indukowanych pod wpływem kancerogenów [15]. Oznaczanie uszkodzeń DNA w formie adduktów DNA, oksydacyjnych czy przerw jednoniciowych ma więc ograniczoną przydatność prognostyczną [14].

Dalsze poszukiwania prowadzone są głównie w obrębie teorii *kancerogenezy płaszczyznowej* sformułowanej przez Slaughtera i wsp. już w 1953 r. Według tej



ciągle obowiązującej teorii przewlekła ekspozycja na dym tytoniowy i pary wysokoprocentowych napojów alkoholowych powoduje powstanie rozległych uszkodzeń w błonie śluzowej jamy ustnej i krtani, które w wyniku pewnego zbiegu okoliczności mogą przekształcić się w zmiany przednowotworowe, a te następnie rozwijają się, tworząc ognisko nowotworowe [16, 17]. Teoria ta doskonale tłumaczy powstanie drugich (mnogich) nowotworów na bazie rozległych uszkodzeń błony śluzowej, dla której utworzono termin *skazana błona śluzowa (condemned mucosa)* [18]. Należy zaznaczyć, że powstała znacznie później teoria zakładająca udział komórek macierzystych w kancerogenezie nie jest sprzeczna z założeniem istnienia zmian molekularnych poza nowotworem pierwotnym [19].

### Mutacje genu *TP53*

W poszukiwaniach molekularnego markera progresji choroby największej uwagi poświęcono genowi *TP53* i jego produktowi genowemu o tej samej nazwie. Produkt genu *TP53* umiejscowionego na krótkim ramieniu chromosomu 17 (17p13.1) jest wielofunkcyjny i uczestniczy w procesach regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA. Z punktu widzenia onkogenezy *TP53* pełni funkcję przeciwnowotworowego genu supresorowego [20]. Zainteresowanie tym genem wynika z faktu, że w wielu chorobach nowotworowych ulega on inaktywacji i nie wypełnia funkcji supresorowej. Zmutowany gen *TP53* wykrywa się w 50–60% przypadków nowotworów głowy i szyi [21], a ponadto mutacje *TP53* świadczą o klonalnym rozwoju tych nowotworów [22]. Istotne było jednak wykrywanie mutacji *TP53* nie tylko w miejscu pierwotnego umiejscowienia nowotworu, lecz w znacznie szerszym obszarze górnych dróg oddechowych. Franklin i wsp. [23] wykryli mutację G > T w kodonie 245 genu *TP53* w 7 na 10 wycinkach z miejsc, gdzie stwierdzono zmiany przednowotworowe.

Na podstawie tych ustaleń Gasparatto i wsp. [24] założyli, że zmienny profil mutacji (rodzaj, liczba i lokalizacja mutacji) genu *TP53* w rakach głowy i szyi można wykorzystać do odróżnienia nawrotu choroby, przerzutowania i drugich pierwotnych nowotworów. Założono, że nawroty i przerzuty zachowują ten sam profil mutacji, a drugie pierwotne nowotwory mogą podjąć proces onkogenezy w wyniku wystąpienia innych mutacji genu *TP53*. W analizowanych pod tym kątem 12 przypadkach, dla 4 z nich potwierdzono identyczność mutacji dla nawrotów nowotworu, a w 5 przypadkach stwierdzono różnice profilu mutacji. Analiza danych klinicznych (porównywano materiał z guza pierwotnego i zmian nowotworowych stwierdzonych po 2 latach od zabiegu) pozwoliła na zdiagnozowanie nawrotów dla pierwszej grupy, przy rozpozna-

niu charakteru drugich pierwotnych nowotworów dla drugiej grupy.

Wśród starszych prac warto odnotować publikację dotyczącą niepowodzeń leczenia nowotworów głowy i szyi za pomocą radioterapii lub chirurgii skojarzonej z radioterapią [25]. W materiale archiwalnym 110 guzów oznaczono mutacje genu *TP53*. Krzywe Kaplana-Meyera wykazały znamienne wyższą skłonność do rozwoju przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych w przypadkach, gdzie wykrywano mutacje genu *TP53*, chociaż czas całkowitego przeżycia w obu grupach się nie różnił. Zdaniem autorów, występowanie mutacji genu *TP53* w samym guzie – bez potrzeby sięgania do marginesu – jest znamienym wykładnikiem zwiększonego ryzyka wystąpienia przerzutów nieodległych i okazuje się to zgodne z obecnym rozumieniem funkcji genu *TP53*. W innej pracy tego samego zespołu zajęto się mutacjami *TP53* w marginesie pooperacyjnym ocenionym histologicznie jako pozbawiony cech nowotworowych. W materiale pochodzącym od 25 osób operowanych z powodu raków głowy i szyi, w 13 przypadkach wykryto mutacje genu *TP53*. Po 7 mies. stwierdzono nawrót choroby u 5 z 13 mających mutacje *TP53* w marginesie, podczas gdy u 12 chorych bez mutacji nie wystąpił nawrót podczas 17-miesięcznej obserwacji [26].

Podobne wnioski sformułowano po analizie 54 przypadków raka krtani, której dokonali Nathan i wsp. [27]. Mutacje genu *TP53* wykryto w 53% przypadków w materiale pochodzącym z guza pierwotnego i w 11% z marginesu opisanego jako histologicznie prawidłowy. Mutacje *TP53* występowały wyłącznie w marginesach tych guzów, które były obarczone mutacjami w pierwotnej lokalizacji. Mimo wykazania pozytywnego związku między zwiększonym ryzykiem wystąpienia nawrotu a występowaniem mutacji *TP53* w marginesie, uwaga autorów skupiła się na sytuacji, w której nie odnotowano mutacji *TP53* w guzie pierwotnym. Stwierdzono, że mutacje protoonkogenu *eIF4E* w badanym materiale występowały we wszystkich przypadkach guza pierwotnego i 59% materiału pochodzącego z marginesu. Również i tutaj mutacje w marginesie odpowiadały mutacjom w guzie pierwotnym. Ostatecznie autorzy wnioskują, że mutacje protoonkogenu *eIF4E* są znacznie pewniejszym wskaźnikiem wystąpienia nawrotu. Ten typ badań kontynuowano, porównując ekspresję białek eIF4E, TP53 i MMP-9 (metaloproteinaza) w 54 sparowanych (guz pierwotny + margines) próbkach. Nadekspresję stwierdzono, odpowiednio, dla 98, 65 i 92% guzów i stosownie mniejsze wartości dla marginesu. Tym samym wskazano na *MMP-9* jako kolejny marker prognostyczny bardziej wiarygodny niż *TP53* [28].

Partridge i wsp. [29] poddali analizie grupę liczącą 18 chorych leczonych z powodu raków jamy ustnej przez 36 mies. We wszystkich przypadkach margines



operacyjny oceniono jako histologicznie prawidłowy. U 6 chorych wykazano nawroty choroby, a u 3 przerzuty do węzłów chłonnych. We wszystkich, oprócz jednego, przypadkach dalszego rozwoju choroby wykryto mutacje *TP53*. Zastosowanie radioterapii w miejscu guza pierwotnego w przypadkach mutacji *TP53* nie zapobiegło nawrotowi choroby. Według autorów, wykrycie mutacji *TP53* wraz ze stwierdzeniem kancerogenezy płaszczynowej tłumaczy niepowodzenia leczenia nowotworów jamy ustnej.

Częściowo inne podejście badawcze zastosowali van Houten i wsp. [30]. Oznaczano ekspresję zmutowanego białka *TP53* wyłącznie w marginesach usuwanych podczas leczenia 76 chorych na nowotwory głowy i szyi. Osoby te obserwowano następnie przez 55 mies. Wśród 50 z 76 chorych, u których stwierdzono mutacje *TP53*, u 13 odnotowano dalszą progresję choroby, natomiast tylko u 1 z 26 z dzikim *TP53* stwierdzono nowe ognisko nowotworowe. Wyniki ekspresji zmutowanego białka zinterpretowano w kierunku naciekania komórek z pierwotnego ogniska nowotworowego (80%) lub powstania nowego ogniska (20%). Wyniki uzyskane przez Homana i wsp. [31] w grupie 105 chorych na nowotwory głowy i szyi wydają się również wskazywać to, że nadekspresja białka *TP53* nie wiąże się z ekspresją białka w nowotworze pierwotnym. Wskazuje to wyłącznie na rozwój drugiego nowotworu pierwotnego, a nie na nawroty i przerzutowanie. Obserwacja chorych trwała 55 mies. Innego rozróżnienia dokonali Partridge i wsp. [3]. Mając na uwadze względnie arbitralną ocenę marginesu usuwanego wraz z nowotworem, poziom mutacji *TP53* oceniano w zakresie do 5 mm (margines *chirurgiczny*) i poniżej 5 mm (margines *głęboki*). Nawroty choroby nastąpiły w ciągu 60 mies. u 11 z 16 chorych, u których w całym marginesie wykryto mutacje. Proporcja ta była znacznie większa, gdy uwzględniono wyłącznie mutacje w marginesie głębokim.

Za pomocą analizy profilu mutacji genu *TP53* próbowano odróżnić agresywny i nieagresywny typ nowotworu komórek płaskonabłonkowych i podstawnych. Mimo przebadania łącznie 342 próbek materiału pochodzącego z guzów, nie udało się ustalić wyraźnej linii podziału między nowotworami agresywnymi i nieagresywnymi. Nie wyklucza to bynajmniej roli mutacji *TP53* w powstawaniu obu typów nowotworów [32].

Zaufanie wzbudzają wyniki przedstawione w pracy Poeta i wsp. [33], a uzyskane na materiale pochodzącym od 560 chorych na nowotwory głowy i szyi poddanych obserwacji przez 7 lat. Na podstawie nowoczesnych technik badawczych (Affymetrix p53 chip, denaturująca wysokosprawna chromatografia cieczowa) oznaczono mutacje *TP53* wyłącznie w guzie pierwotnym, znajdując je u 224 z 420 chorych. Uwzględniono typ mutacji, dzieląc je w zależności od wpływu na strukturę białka kodowanego przez gen *TP53*. Obec-

ność jakiegokolwiek mutacji *TP53* zmniejszała przeżywalność chorych, przy czym efekt ten był statystycznie znamienny tylko dla mutacji znacząco modulujących strukturę białka. Duża skala opisanego doświadczenia pozwala przypuszczać, że mutacje *TP53* w guzie pierwotnym są wiarygodnym markerem przeżycia, ale dla oceny ryzyka wystąpienia nawrotu, przerzutowania i drugich pierwotnych nowotworów należy analizą objąć margines operacyjny.

Kwestii przydatności analizy mutacji i ekspresji genu *TP53* nie można uważać za zamkniętą, ponieważ w dalszym ciągu publikowane są prace, głównie dotyczące porównania tego markera z innymi, również reprezentującymi wczesne zmiany nowotworowe [34, 35]. Można także odnotować próbę uproszczenia analizy przez przeniesienie jej na poziom chromosomu [36]. Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* porównano aberracje chromosomów 1, 10, 17 i 18 w marginesie operacyjnym. Wnioskiem z tych badań było wskazanie na delecję chromosomu 17 jako najlepiej korelującej z występowaniem drugich nowotworów pierwotnych. Należy dodać, że gen *TP53* jest kodowany właśnie przez krótkie ramię chromosomu 17.

## Inne geny jako markery prognostyczne

Podstawowym kryterium warunkującym wykorzystanie danego genu do celów diagnostycznych jest silne powiązanie z procesem onkogenezy w obrębie głowy i szyi. Gen *TP53* nie jest więc jedynym kandydatem, o czym wcześniej wspomniano.

W piśmiennictwie pojawiły się prace starające się powiązać ekspresję genów kodujących rodzinę transferaz glutationowych (GST) w marginesie wolnym od zmian nowotworowych z ryzykiem wystąpienia drugich nowotworów pierwotnych u pacjentów z rakaми głowy i szyi [37]. Na względnie niewielkim materiale autorzy powiązali wysoką ekspresję GST ze zwiększonym ryzykiem rozwoju SPT, ale późniejsze badania nie potwierdziły tej zależności.

Wspomniana wcześniej proteinaza MMP-9 [28] była badana wraz z MMP-2 pod kątem zastosowania jako marker prognostyczny w rakach jamy ustnej. Wykazano, że wysoka ekspresja obu genów cechuje fenotyp przerzutowy i tym samym stanowi marker złego rokowania [38]. Z podobnym celem analizowano ekspresję cytokeratyn 5, 14 i 20, stwierdzając przydatność oznaczeń dwóch pierwszych genów za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy do wykrywania mikroprzerzutów [39]. Cytowana praca miała jednak tylko modelowy charakter, ponieważ część doświadczeń wykonano na materiale pochodzącym z linii komórkowych.

Ciekawa propozycja pochodzi z bardzo doświadczonego zespołu pracującego nad biologią nowotworów głowy i szyi w Amsterdamie. Zastosowano reakcję



PCR z odwrotną transkryptazą do wykrywania ludzkiego antygeny hLy-6D, ulegającego ekspresji w 80–90% komórek nabłonka transformowanych nowotworowo. Dowiedziano znamiennej różnicy między obecnością tego antygeny w komórkach guza, marginesie wolnym od nowotworu i komórkach prawidłowych [40].

Morshed i wsp. [41], badając udział wirusa brodawczaka (HPV) w raku krtani, wykryli jego obecność w 35,5% guzów ( $n = 93$ ), 8,2% marginesów wolnych od nowotworu i potwierdzili brak HPV w 22 kontrolnych próbkach nienowotworowych. Wykrycie HPV w marginesie wolnym od nowotworu nie może służyć jako samodzielny marker predykcyjny w rakach krtani.

## Metylacja regionów promotorowych

W ostatniej dekadzie dowiedziano, że – oprócz zmian genetycznych – nowotwory charakteryzują wiele zmian epigenetycznych. Epigenetyka opisuje zjawiska prowadzące do zmian w poziomie ekspresji genów poprzez mechanizmy nieingerujące w zapis informacji genetycznej. Do zjawisk takich zalicza się metylację reszt cytozyny dinukleotydów 5'-CpG-3' DNA, a także kowalencyjne modyfikacje histonów (acetylacja, metylacja, fosforylacja i inne). Zarówno metylacja DNA, jak i modyfikacje histonów – zmieniając strukturę chromatyny – wpływają na ekspresję genów. Zmiany epigenetyczne zachodzą na wczesnych etapach rozwoju guza (wykrywa się je już w formach przedrakowych niektórych nowotworów) i pogłębiają się, kiedy komórki nowotworowe zmieniają fenotyp na wysoce agresywny, zdolny do przerzutów.

Podsumowując najnowsze piśmiennictwo przedmiotowe, należy podkreślić, że w nowotworach w obrębie głowy i szyi obserwowano hipermetylację takich genów, jak: *p14*, *p15*, *p16*, *DAPK*, *DCC*, *MLH1*, *CDH1*, *RASSF1A*, *MGMT*, *RARβ2*, *SEPT9*, *SLC5A8*, *EBF3* i *IRX1* [42–44]. W płaskonabłonkowych nowotworach jamy ustnej odnotowano częstą hipermetylację następujących genów: *p16*, *CDH1*, *MGMT*, *DAPK*, *DBC1*, *p14ARF*, *RARβ*, *RASSF1*, *MLH1*, *p73*, *FHIT* oraz *SERPINB5* [45]. Hipermetylacja regionów promotorowych prowadzi do wyciszania genów, a taka epigenetyczna regulacja ekspresji genów jest często obserwowana w nowotworach. Zjawisko to odpowiada m.in. za wyciszanie wielu przeciwnowotworowych genów supresorowych (TSG). Zakłada się, że wykrycie hipermetylacji określonych TSG w wolnym od nowotworu marginesie rokuje źle. W przeciwieństwie do *TP53*, którego negatywna regulacja wynika z wystąpienia mutacji, aktywność genu przeciwnowotworowego *p16* (inna nazwa *CDKN2A*) jest regulowana właśnie za pomocą metylacji.

W grupie 79 chorych leczonych z powodu raka jamy ustnej oceniono poziom metylacji sekwencji promotorowych *p16*, *RARβ* (chemoprewencja), E-kadhe-

ryny (inwazyjność), cykliny A1 i cytoglobiny, którą wykrywano w 45–85% próbek pochodzących z guza i 11–71% próbek z marginesu. Największą różnicę metylacji odnotowano dla cykliny A1, a w dalszej kolejności dla *p16*. Można więc stwierdzić, że metylacja obu tych genów jest specyficzna dla komórek nowotworowych [4]. Do podobnych ustaleń doszli Martone i wsp. [46], którzy badali metylację *MGMT* (naprawa DNA), *p16* (proliferaacja) i *DAP-K* (apoptoza) w guzach i marginesach chorych na nowotwory głowy i szyi ( $n = 20$ ). Z obu przytoczonych prac wynika, że wykrycie hipermetylacji badanych genów w tkankach otaczających nowotwór jest dowodem obecności uszkodzeń płaszczyznowych źle rokujących dla pacjenta. Podobne wyniki ilościowe uzyskali Tan i wsp. [47], oceniając metylację genów supresorowych *p16* i *DCC* oraz genu *CCNA1* regulującego proliferację w grupie 42 chorych na nowotwory głowy i szyi. Podczas dodatkowej obserwacji prowadzonej przez 22 mies. wykazano, że spośród 24 chorych, u których w marginesie występowała metylacja badanych genów, u 3 wystąpiły nawroty choroby, a u 2 przerzuty. Można więc postulować, że metylacja określonych genów w marginesie jest niezależnym czynnikiem wystąpienia dalszych objawów choroby. Wniosek ten potwierdzono w prospektywnej analizie hipermetylacji genu *p16* w marginesie 38 operowanych nowotworów języka. Pacjenci, u których wykryto metylację genu *p16*, byli obarczeni ponad 6-krotnie większym ryzykiem wystąpienia nawrotu choroby niż pozostali chorzy [48].

Na uwagę zasługuje praca Goldenberga i wsp. [49] dotycząca metylacji genów *p16* i *MGMT* w marginesie. Zastosowanie ilościowej i metylacyjno-specyficznej techniki PCR (QMSP) wykonywanej w czasie poniżej 5 godz. pozwoliło autorom na proponowanie śródoperacyjnego przeprowadzania analizy w celu precyzyjnego ustalenia pola operacyjnego.

## Niestabilność mikrosatelitarna i utrata heterozygotyczności

Rozproszone w genomie małe, repetetywne sekwencje mikrosatelitarne wykazują wysoki stopień polimorficzności. Najczęstszym uszkodzeniem sekwencji mikrosatelitarnych w nowotworach jest utrata heterozygotyczności (*loss of heterozygosity* – LOH), prowadząca do inaktywacji genów supresorowych. Innym uszkodzeniem okazuje się zmiana liczby powtórzeń (MSI). Analizę prowadzi się w miejscach znanych z występowania genów supresorowych.

Rosin i wsp. [50] zastosowali analizę LOH do predykcji rozwoju dysplazji epitelialnej jamy ustnej do czynnego nowotworu. Analizowano 19 *loci* mikrosatelitarnych w ramionach chromosomów: 3p, 4q, 8p, 9p, 11q, 13q i 17p. Wskazuje się na LOH w ramionach 3p i 9p jako wiarygodny czynnik prognostyczny.



Analogiczne badania zastosowane do 10 *loci* chromosomowych przeprowadzono w celu oceny ryzyka wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej u pacjentów z rakami głowy i szyi. Uznano, że LOH stanowi samodzielny czynnik rokowniczy nawrotów choroby [51]. Niemal identyczne podejście zastosowali Teman i wsp. [52] w analizie marginesów 76 pacjentów leczonych chirurgicznie z powodu raków głowy i szyi. Również i w tym przypadku zwrócono uwagę na wysoką użyteczność analizy sekwencji mikrosatelitarnych.

W badaniach własnych analizowano przydatność markerów mikrosatelitarnych na ramieniu 13q (osobno), a następnie na ramionach 3p, 7q, 8p, 9p i 18q dla oceny ryzyka nawrotu leczonych chirurgicznie raków krtani. Utratę heterozygotyczności określano w nowotworze pierwotnym, marginesie otaczającym guz, dystalnych regionach krtani (górną i dolną) oraz kontrolnie we krwi. Zaobserwowano zróżnicowaną przydatność poszczególnych markerów, wskazując na pierwszoplanową przydatność markerów umiejscowionych w regionie 3p i 17p, co w znacznym stopniu odpowiada lokalizacji genów *p16* i *TP53*. Zaskakujące wyniki przyniosło natomiast porównanie badanych lokalizacji anatomicznych. W zakresie pracy najwyższą przydatność miała analiza materiału pierwotnego guza, zmniejszoną otaczającego marginesu, podczas gdy przydatność lokalizacji dystalnych była znikoma [5, 53].

## Uwagi końcowe

Na postawione w tytule pytanie dotyczące przydatności analizy molekularnej marginesu otaczającego guz do dalszej predykcji choroby nowotworowej w obrębie głowy i szyi nie podano odpowiedzi w dwóch aspektach. Po pierwsze, nie ustalono, czy wyższą przydatność ma analiza molekularna samego guza, czy też marginesu prawidłowego histologicznie. Po drugie, nie ma zgodności odnośnie do proponowanego podejścia molekularnego. W przypadku drugiego zagadnienia warto zacytować publikację Slotwega i wsp. [54], którzy przebadali przyczyny niepowodzenia leczenia chirurgicznego 394 chorych na nowotwory głowy i szyi. Stwierdzili, że niepowodzenia są w absolutnej większości spowodowane przez niecałkowite usunięcie komórek nowotworowych. Według tych autorów, jedynymi wiarygodnymi markerami genetycznymi są ekspresja *eIF4E* i *TP53*, ale staranność zabiegu chirurgicznego nie zostawia wiele miejsca dla analizy genetycznej. Podobne spostrzeżenia podają Upile i wsp. [55], którzy jednak bardziej ostrożnie wypowiadają się w kwestii poszerzania pola operacji. W tegorocznej publikacji autorstwa Califano i wsp. [56] postuluje się natomiast konieczność intensyfikacji badań genetycznych, wskazując na takie obszary, jak ekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu, LOH oraz wycisza-

nie genów supresorowych przez hipermetylację sekwencji promotorowej.

*Praca powstała dzięki grantowi MNSzW NN 409 290 736.*

## Piśmiennictwo

1. Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001; 132 (suppl. 1): 75-115.
2. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 195-215.
3. Huang X, Pateromichelakis S, Hills A, et al. p53 mutations in deep tissues are more strongly associated with recurrence than mutation-positive mucosal margins. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6099-106.
4. Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 2006; 94: 561-8.
5. Szukala K, Sowińska A, Wierzbicka M, et al. Does loss of heterozygosity in critical regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? *Mutat Res* 2006; 600: 67-76.
6. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 188-96.
7. Weinberg RA. Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1092-5.
8. Basil CF, Zhao Y, Zavaglia K, et al. Common cancer biomarkers. *Cancer Res* 2006; 66: 2953-61.
9. Karamouzis MV, Grandis JR, Argiris A. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. *JAMA* 2007; 298: 70-82.
10. Wierzbicka M, Szyfter W, Bień S i wsp. Zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne dla wybranych nowotworów głowy i szyi. *Post Chir Głowy Szyi* 2006; 5 (supl. 1): S6-39.
11. Bradley PJ, MacLennan K, Brakenhoff RH, Leemans CR. Status of primary tumour surgical margins in squamous head and neck cancer: prognostic implications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15: 74-81.
12. Szyfter K, Hemminki K, Szyfter W, et al. Aromatic DNA adducts in larynx biopsies and leukocytes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2195-9.
13. Szyfter K, Hemminki K, Szyfter W, et al. Tobacco smoke-associated N7-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leukocytes. *Carcinogenesis* 1996; 17: 501-6.
14. Phillips DH. DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutat Res* 2005; 577: 284-92.
15. Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, et al. 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.
16. Lydiatt WM, Anderson PE, Bazzana T, et al. Molecular support for field cancerization in the head and neck. *Cancer* 1998; 82: 1376-80.
17. van Oijen MG, Slotweg PJ. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 249-56.
18. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, et al. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24: 198-206.
19. Garcia SP, Park HS, Novell M, Wright NA. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: The spread of mutated clones in epithelial cells. *J Pathol* 1999; 187: 61-81.
20. Szyfter K, Kiwerska K, Rydzanicz M i wsp. Mutacje supresorowego genu przeciwnowotworowego TP53 w nowotworach tytoniozależnych. *Przeg Lekar* 2009; 66: 603-7.
21. Holstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.



22. Tabor MP, van Houten VMM, Kummer JA, et al. Genetic differences between primary head and neck tumors and metastases depend on mutational status of the p53 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33: 168-77.
23. Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, et al. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 1997; 100: 2133-7.
24. Gasparotto D, Maestro R, Barzan L, et al. Recurrences and second primary tumors in the head and neck region: differentiation by p53 mutation analysis. *Ann Oncol* 1995; 6: 933-9.
25. Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, et al. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1580-6.
26. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 429-35.
27. Nathan CO, Sanders K, Abreo FW, et al. Correlation of p53 and the proto-oncogene *elF4E* in larynx cancers: prognostic implications. *Cancer Res* 2000; 60: 3599-604.
28. Nathan CO, Amirghahri N, Rice F, et al. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Laryngoscope* 2002; 112: 2129-40.
29. Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, et al. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2718-25.
30. van Houten VM, Leemans CR, Kummer JA, et al. Molecular diagnosis at surgical margins and local recurrence in head and neck patients: a prospective study. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3614-20.
31. Homan N, Nees M, Conradt C, et al. Over expression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 290-6.
32. Bolshakov S, Walker CM, Strom SS, et al. p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 228-34.
33. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al. TP53 mutations and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007; 357: 2552-61.
34. Jaworska M, Kolaszka Z, Liszka J, et al. Ekspresja niektórych molekularnych markerów immunohistochemicznych i ocena ich znaczenia w rakach płaskonabłonkowych jamy ustnej i wargi. *Otolaryngol Pol* 2008; 62: 175-81.
35. Bilde A, von Buchwald C, Dabelsteen E, et al. Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 72-8.
36. Wolf C, Flechtenbacher C, Dietz A, et al. p53-positive tumor-distant squamous epithelia of the head and neck reveal selective loss of chromosome 17. *Laryngoscope* 2004; 114: 698-704.
37. Bongers V, Snow GB, de Vries N, et al. Second primary head and neck squamous cell carcinoma predicted by the glutathione S-transferase expression in healthy tissue in the direct vicinity of the first tumor. *Lab Invest* 1995; 73: 503-10.
38. Patel BP, Shah SV, Shukla SN, et al. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck* 2007; 29: 564-72.
39. Becker MT, Shores CG, Yu KK, Yarbrough WG. Molecular assay to detect metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 21-7.
40. Graveland AP, de Maaker M, Braakhuis BJ, et al. Molecular detection of minimal residual cancer in surgical margins of head and neck cancer patients. *Cell Oncol* 2009; 31: 317-28.
41. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymański M, Polz D. Short fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of HPV in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: Clinico-pathological evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265 (suppl 1): S89-96.
42. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004; 40: 145-53.
43. Maruya S, Issa JP, Weber RS, et al. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3825-30.
44. Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 4494-9.
45. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 2006; 7: 77-82.
46. Martone T, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Association between tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5089-94.
47. Tan HK, Saulnier P, Auperin A, et al. Quantitative methylation analyses of resection margins predict local recurrences and disease-specific deaths in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2008; 99: 357-68.
48. Sinha P, Bahadur S, Thakar A, et al. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. *Head Neck* 2009; 31: 1423-30.
49. Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 39-44.
50. Rosin MP, Cheng X, Poh C, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 357-62.
51. Sardi I, Franchi A, Ferriero G, et al. Prediction of recurrence by microsatellite analysis in head and neck cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 201-6.
52. Teman S, Casiraghi O, Lahaye JB, et al. Tetranucleotide microsatellite instability in surgical margins for prediction of local recurrence of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4022-8.
53. Szukała K, Brieger J, Bruch K, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 13q in larynx cancer patients: analysis of tumor, margin and clinically unchanged mucosa. *Med Sci Monit* 2004; 10: CR233-40.
54. Slootweg PJ, Hordijk GJ, Schade Y, et al. Treatment failure and margin status in head and neck cancer. A critical view on the potential value of molecular pathology. *Oral Oncol* 2002; 38: 500-3.
55. Upile T, Fisher C, Jerjes W, et al. The uncertainty of the surgical margin in the treatment of head and neck cancer. *Oral Oncol* 2007; 43: 321-6.
56. Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral Oncol* 2009; 45: 440-6.

#### Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Krzysztof Szyfter  
Instytut Genetyki Człowieka PAN  
ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań  
tel. +48 61 657 92 20, faks +48 61 823 32 35  
e-mail: szyfkris@man.poznan.pl

