

Molekuláris epidemiológiai biomarkerek vizsgálata malignus fej-nyaki daganatokban

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Szanyi István

Programvezető: Prof. Dr. Ember István

Témavezetők: Dr. Kiss István

Prof. Dr. Gerlinger Imre

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2011

I. Bevezetés

I.1. Fej-nyaki tumorok epidemiológiája

A nemzetközi és az európai mortalitási adatok szerint a magyar férfiak az első, míg a magyar nők a második helyen állnak a daganatos mortalitási statisztikát illetően. A rosszindulatú daganatokat tekintve kiemelkedőek a fej-nyaki daganatokat érintő morbiditási és mortalitási statisztikák. Világszerte mintegy 540 000 új fej-nyaki laphámrákot diagnosztizálnak évente, melyek 50% feletti halálozási arányukkal komoly közegészségügyi problémát jelentenek. A hazai Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint a felső légúti- és tápcsatornai daganatok által okozott halálesetek száma nagymértékben megnőtt az 1970-es évek óta, ez különösen az ajak- és szájüregi malignus folyamatoknak köszönhető, melyek száma háromszorosára növekedett.

Klinikánk a Dél-dunántúli régió malignus fej-nyaki daganatok ellátásának centruma. Az összehasonlítás végett feldolgoztuk az 1983. január 1. és 2002. december 31. között újonnan diagnosztizált tumoros eseteinket. A feltüntetett 20 éves periódusban 3312 új tumort észleltünk és a magyar és nemzetközi adatokkal korreláló eredményeket kaptunk. Eredményeink szerint továbbra is a gégerákok vezetnek a listát, de nagy számban diagnosztizáltunk a korábbiaknak megfelelően hypopharynx daganatokat is. Úgy tűnik azonban, hogy a klasszikusan operálható, gégére lokalizálódó malignus daganatok kezdenek csökkenni, ahogyan nem látni a korábbiakban típusos, csak a tonsillára lokalizálódó, jó prognózisú tumorokat sem. Egyre gyakrabban találkozunk viszont több régióra kiterjedő tonsillo-lingualis daganatokkal, sokkal rosszabb gyógyulási esélyekkel. Az utóbbi évtizedekben e csoport számának ugrásszerű növekedése volt megfigyelhető, korrelálva a KSH adataival. Figyelemfelkeltő a kormegoszlást nézve, hogy egyre jobban a fiatalabb korosztály érintett, főként a mesopharynx és szájüregi malignus megbetegedések esetén. Megjelenésük 10-15 évvel korábbra tolódott, jelenleg a 45-55 éves korosztály a leginkább érintett.

Szomorú képet mutatnak az 1998 és 2002 között klinikánkon diagnosztizált 501 gége- (201), hypopharynx (96) és mesopharynx (204) tumoros páciens túlélési adatai is. A gégerákos csoport átlagos túlélése hónapokban számolva 62,1 hónap, a hypopharynx tumorosoké 49,1 hónap a mesopharynx daganatban szenvedő pácienseké pedig átlagosan 45,7 hónap. Az összes beteget tekintve a túlélés átlaga 52,9 hónap volt, szövettanilag csaknem valamennyi laphámrák (92,6 %).

I.2. Fej-nyak tumorok rizikófaktorainak csoportosítása

Hasonlóan más tumorokhoz, a fej-nyaki tumorok kialakulásának kockázatát exogén (környezeti) és endogén (genetikai) tényezők kölcsönhatása határozza meg. Az exogén tényezők közül jól ismert a

dohányzás, az alkoholfogyasztás, valamint a környezeti karcinogen anyagok fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatára gyakorolt hatása. Míg az örökletes, ún. magas penetranciájú genetikai faktorokat jól ismerjük, addig az alacsony penetranciájú, ún. egyéni érzékenységi tényezők szerepe még sok daganatnál, így a fej-nyaki daganatoknál sem pontosan tisztázott.

I.3. Prevenációs lehetőségek – prediktív epidemiológia

A legtöbb fej-nyaki daganat szövettanilag laphámrák. Habár fejlett sugár-, kemoterápiás és sebészi protokollok léteznek, a fej-nyaki malignus tumorban szenvedő betegek túlélése nem javult szignifikánsan az elmúlt évtizedekben. Annak ellenére, hogy a fej-nyaki régió fizikális vizsgálata egyszerű, a manifeszt elváltozások már viszonylag korán felfedezhetőek, szűrővizsgálat jelenleg nincs hazánkban. A rossz halálozási statisztikának egyik legfőbb oka, hogy a betegek többsége későn, előrehaladott stádiumban fordul orvoshoz, amikor regionális vagy távoli metastázis már jelen van, s a kuratív terápia eleve reménytelen. A fej-nyaki rákok morbiditásának és mortalitásának javulását a primer és szekunder prevención keresztül lehetne elérni. A primer prevenció a karcinogén anyagok elkerülésére összpontosít, fej-nyaki rákok esetében például a mérsékeltebb alkoholfogyasztásra és dohányzás mellőzésére. A szekunder prevenció (szűrés) a betegség korai, premorbid stádiumában való felismerését célozza. A primer és a szekunder prevenció határán mozog a prediktív és molekuláris epidemiológia, mely a korai biomarkerek segítségével mint érzékeny biológiai indikátorokkal az expozíció→betegség folyamat valamely lépését a definitív betegség diagnosztikus markereinek pozitívítása előtt jelzi. Így a manifeszt tumor megjelenése előtt, akár már az expozíció vagy a korai biológiai hatás stádiumában a veszélyeztetett populáció, illetve egyén azonosítása lehetővé válik, továbbá az egyéni érzékenység markereivel egyéni rizikóbecslés végezhető. A korai biomarkerek a daganatos betegségek esetében nemcsak prognózist, hanem a magas rizikót, a veszélyeztetettséget is jelezhetik, így primer prevenció intézkedések (kemo-, immun-és genetikai prevenció), intervenciók végrehajtásának kiindulási alapjai lehetnek: munkavédelem, a munka-és környezet-egészségügyi expozíció csökkentése vagy az egyének kiemelése a káros környezetből.

A terciér prevenció a betegek rehabilitációját, a szövődmények, a metastasisok, a recidivák kivédését jelenti.

Onkogén és tumor szuppresszor gén expresszió

Az olyan korai biomarkerek felismerésével, mint az onkogének és tumorszuppresszor gének expressziójának változása, mind a tumor fejlődése, mind pedig a terápia hatásossága (pl. minimális reziduális betegség) nyomkövethető. Mivel az onkogének és tumorszuppresszor gének döntő

szerepet játszanak a karcinogenezisben, ezen gének expressziójának elemzése megfelelő eljárásnak tűnik a karcinogén expozíció korai felismerésére.

A PhD értekezésben a *c-myc* és a *Ha-ras* onko-, valamint a *p53* tumor szuppresszor gén expresszióját tanulmányoztuk különböző stádiumú és primer lokalizációjú fej-nyaki tumoros esetekben a definitív terápia előtt és után. A tanulmányban vizsgált gének kulcsfontosságú fontos szerepet játszanak a karcinogenezisben; a *Ha-ras* gén a karcinogenezis iniciációjában, a *p53* gén a DNS károsodásra adott válaszban vesz részt. A *c-myc* onkogén a proliferációra és az immortalizációs folyamatokra fejt ki hatását.

A feltételezésünk az volt - Ember és mtsai-hoz hasonlóan, akik etilén-dioxid expozíció hatására emelkedett onkogén és tumorszuppresszor gén expressziót, valamint bizonyos daganattípusok megjelenését észlelték -, hogy a fenti gének expressziója az általunk tanulmányozott daganatos populációban is emelkedett.

Célunk annak bizonyítása volt, hogy a fej-nyak régió daganatai a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* gének expressziójának emelkedéséhez vezetnek.

Metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai

A daganatkialakulással kapcsolatos alacsony penetranciájú genetikai tényezők legnagyobb csoportját alkotják a metabolizáló enzimek gén polimorfizmusai. Az ún. I-es fázisú enzimek a szervezetbe került prokarcinogéneket aktíválják karcinogénné elektrofil metabolitokat képezve, majd a II-es fázisú enzimek valamilyen konjugációs reakcióval inaktíválják ezen metabolitokat, egyúttal megkönnyítve a szervezetből történő eliminálásukat is. A metabolizáló enzimek aktivitására sok tényező hatással van, de az egyik legjelentősebb az enzim genotípusa. A metabolizáló enzimek többsége ugyanis genetikailag polimorf, azaz többféle allélvariánsuk létezik. Ezen allélvariánsok között csak igen kis különbségek állnak fenn génszerkezetben, bázissorrendben, de jelentősebb különbségek lehetnek a gén expressziós szintjében, az enzimaktivitásában.

A metabolizáló enzimek génjeinek polimorfizmusai tehát hatással vannak az enzimek aktivitására, detoxifikáló képességére, s így a daganatok kialakulásának kockázatára. Jól ismert és sokat tanulmányozott enzimrendszer a citokróm P450 rendszer, mely a biotranszformáció első fázisaként molekuláris oxigén és NADPH felhasználásával hidroxilálja és aktiválja a policiklusos aromás szénhidrogéneket és nitrózaminokat-így pl. a dohányfüstben is megtalálható benzpirént- hatásos karcinogénekké. Ezután lép be a folyamatba a biotranszformáció második fázisaként pl. a

glukuronidáló enzimrendszer, mely a karcinogén metabolitokhoz cukrot kötve vízoldékony molekulaként megkönnyíti azok szervezetből történő kiválasztását.

PhD értekezésben mint alacsony penetranciájú genetikai tényezőt vizsgáltuk a citokróm P450 rendszerhez tartozó CYP1A1 I-es fázisú és a glukuronidációs rendszerhez tartozó UGT1A1 (uridin-difoszfát-glukuroniltranszferáz 1A1) II-es fázisú enzimek allél polimorfizmusának fej-nyak rákok kialakulásának kockázat- és betegtúlélést befolyásoló szerepét.

CYP1A1 enzim

A CYP1A1 gén a daganatok kialakulásának kockázatával szoros kapcsolatban van, hiszen terméke, az aril-hidrokarbon-hidroxiáz (AHH) I-es fázisú metabolizáló enzimként a policiklusos aromás szénhidrogének metabolizmusában játszik fontos szerepet. Az enzim legismertebb szubsztrátja a benzpirén, amely előfordul a cigarettafüstben, kipufogógázban, és egyéb égési folyamatok melléktermékeként. A CYP1A1 genetikai polimorfizmusai közül az egyik egy A-G polimorfizmus a 7-es exon területén, amely a fehérjében *Ile/Val* polimorfizmust eredményez. Az *Ile/Val* polimorfizmusnál az alléleket a kódolt aminosavak után *Ile* illetve *Val* alléleknek nevezzük, ahol az *Ile* homozigóta allél a gyakoribb, az *Ile* heterozigóta ill. *Val* homozigóta allél a ritka. Ázsiai, elsősorban japán populációkban a ritkább allél előfordulási gyakorisága 30-40% körüli, míg Európában kb. 10%. Az *Ile/Val* polimorfizmus összefüggésben van a dohányzás-okozta laphámrákok kialakulásával, mégpedig a ritkább allél jelentenek fokozott kockázatot. Magyarázata abban lehet, hogy a *Val* allél által kódolt enzim AHH aktivitása nagyobb, mint az *Ile*-enzimé s ez – megfelelő mennyiségű szubsztrát jelenléte esetén – a bekerült karcinogének gyorsabb, fokozottabb metabolikus aktivációját eredményezi.

Uridin-difoszfát-glukuroniltranszferáz 1A1 enzim

Az uridin-difoszfát-glukuroniltranszferáz 1A1 (UDP-glukuroniltranszferáz 1A1, vagy UGT1A1) egy enzim, ami a biotranszformáció második fázisát, a glukuronidációt katalizálja. A glukuronidáció egy fontos metabolikus folyamat, mely a lipofil toxikus anyagokat polárisabb, vízben oldódó, kevésbé mérgező és könnyebben kiválasztható összetevővé alakítja azáltal, hogy cukrot köt hozzájuk. Az UGT1A1 egyik fő metabolitja pl. a dohányfüstben is megtalálható benzpirén.

Génjének leggyakoribb mutációja a gén promóter régiójának TATA-box régiójában a timin-adenin (TA) ismétlődések számában mutatkozó eltérés. A vad típus (UGT1A1 *1) normálisan 6 (TA) repeatet (A(TA)₆TAA) tartalmaz (6/6), míg a populáció mintegy 10-16%-ában eggyel több, 7 TA ismétlődés (UGT1A1 *28; 7/7) fordul elő homozigóta formában. Ez az eltérés az extra (TA) nukleotidok DNS polimorfizmusa kapcsán változó enzim expressziót eredményez, az extra TA dinucleotid insertiója esetén a transzkripció aktivitás a vad allél (UGT1A1*1) aktivitásának 30%-ára csökken.

Kemoprevenció

Célunk volt továbbá malignus fej-nyaki daganatok esetén a primer prevenció részeként olyan kemo-ill. immunpreventív szerek kutatása, melyek bevezetésével a veszélyeztetettek korai prevencióban részesülhetnek. Kemopreventív szerek azok a természetes formában létező, vagy mesterségesen előállított vegyületek, melyek daganatmegelőző hatásúnak bizonyultak és melyeket hatásuk alapján lehet egy csoportba sorolni, hiszen szerkezetük igencsak eltérő. Megemlítendő, hogy jelenleg nincs evidencián alapuló, hatásos kemoprevenziós szer. A legismertebb (részint természetes, részint szintetikus), többé-kevésbé bizonyított daganat-kemopreventív hatású anyagok: a szelén, az A, C, D3 vitamin és származékai, ez utóbbiak előanyagai (béta karotinok), különféle antioxidánsok a flavonglikozidok, indolok stb. Ugyanilyen hatásai vannak egyes zsírsavaknak (omega-3), vagy bizonyos növényi rost frakcióknak is. Ezek közül jó néhánynál mutattak ki hatást malignus fej-nyaki daganatokra is.

A primer prevenció egyik sikeres eszköze lehet a kemoprevenció, de minden lehetséges kemopreventív szert klinikai alkalmazása előtt vizsgálni kell. A Pécsi Tudományegyetem Népegészségtani Intézetében egy olyan teszt rendszer lett kifejlesztve, mely képes megbecsülni onkogén és tumor szuppresszor gén expresszió változások alapján a bioaktív vegyület potenciális kemopreventív hatását.

Plotnikov és kutatócsoportja írták le a bemetil (2-mercaptobenzimidazol) vegyületet, mely egy új gyógyszercsoporthoz, az actoprotectorokhoz tartozik, erős antimutagén hatást mutatva. In vivo vizsgálatok igazolták, hogy a bemetil csökkentette az ismert policiklusos aromás szénhidrogének egyik erős carcinogén hatással rendelkező tagjának, a 7,12-dimethylbenz[α]anthracén (DMBA) által indukált onko- és tumor szuppresszor gén overexpressziót rövid hatású vizsgálat során. A farmakológiai aktív 2-mercaptobenzimidazol (bemetil, tomerzol, afobazol) származékok csökkenteni tudják kémiai prooxidánsok mutagen hatásait a szabad-gyök oxidáció indukálta endogén mutagén képződés gátlásával. Egy kemopreventív szer antimutagén és rákellenes hatása közötti ko incidencia csaknem 90 %. Ezen tény és az előzetes in vitro vizsgálatok eredményei alapján megvizsgáltuk az afobazol DMBA indukálta onkogén (*Ha-ras*)/ szuppresszor gén (*p53*) overexpresszióra gyakorolt hatását egy rövid hatású teszt során. Célunk az afobazol in vivo kemopreventív hatásának igazolása volt.

II. Célkitűzések

1. Annak vizsgálata, hogy a fej-nyak régió malignus daganatai a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* gének expressziójának emelkedéséhez vezetnek, s így segítségükkel a tumor fejlődése, mind pedig a terápia hatásossága (pl. minimális reziduális betegség) korán felismerhető legyen.
2. A fenti génexpressziós vizsgálatok megbízható, a klinikai gyakorlatban is akár alkalmazható, perifériás vérből történő módszerének kidolgozása malignus fej-nyaki daganatoknál.
3. Annak bizonyítása, hogy van-e hatása a CYP1A1 enzim *Ile/Val* és az UGT1A1 enzim *1/*28 allélpolimorfizmusoknak a fej-nyak rákok kialakulásának kockázatára.
4. Annak vizsgálata, hogy a fenti allélpolimorfizmusok befolyásolják-e a fej-nyaki tumoros betegeink túlélését külön-külön és együtt is.
5. Az afobazol in vivo kemopreventív hatásának igazolása, mint akár a malignus fej-nyaki daganatok egyik lehetséges jövőbeni kemopreventív szere.

III. Anyagok és módszerek

III.1. C-myc és Ha-ras onkogének és p53 tumorszuppresszor génexpresszió változások vizsgálata

A daganatos csoport 116 beteget foglalt magába, a malignus fej-nyaki daganatok diagnózisára 2003 februárja és 2007 januárja között került sor a Pécsi Tudományegyetem Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinikáján. A primer kiindulási helyek a következők voltak: mesopharynx (32 eset), hypopharynx 16 eset, epipharynx (1 eset), gége (49 eset), szájüreg (9 eset), nyálmirigy (4 eset), bőr (2 eset) és orrmelléküreg (1 eset). Az onko-/tumorszuppresszor gének expresszióját vizsgáltuk a definitív terápia előtt és amennyiben lehetséges volt, azt követően. Az eredményeket továbbá egy 33 főből álló egészséges, daganatos betegségtől mentes csoport eredményeivel hasonlítottuk össze. A nem és kormegoszlást, valamint a dohányzási szokásokat tekintve nem volt eltérés a tumoros és a kontroll csoport között. Minden egyes résztvevőnél perifériás vérvételt követően fehérvérsejt izolálás és guanidium thiocyanate-phenol-chloroform-savas eljárással az össz-RNS extrahálása történt. A hibridizációt chemiluminescens anyaggal jelölt *c-myc*, *p53* és *Ha-ras* génspecifikus mintákkal végeztük. A jeleket röntgenfilmen detektáltuk, és Quantiscan szoftver átlagolása alapján értékeltük. Az eredményeket a β -aktin (konstitutíve expresszáldó endogén kontroll) százalékában fejeztük ki. A különböző csoportok összehasonlítása kétmintás Student t-tesztel történt.

III.2. Citokróm P450 1A1 (CYP 1A1) és az uridin-difoszfát-glukuronoziltransferáz 1A1 (UGT 1A1) enzimek allél-polimorfizmusának vizsgálata

A CYP1A1 Ile/Val és az UGT1A1 allél-polimorfizmus vizsgálat beteg és kontroll csoportja

A tumoros csoportot 142 fő alkotta (48 gége-, 42 hypopharynx- és 52 mesopharynx tumoros beteg), melyek mindegyike klinikánk beteganyagából került ki. A kontroll csoportot (150 fő) a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának más klinikáin ambuláns panaszokkal jelentkezők, vagy szűrővizsgálaton részt vevők alkották, és a vizsgálat idején illetve azt megelőzően semmilyen malignus betegség nem volt náluk kimutatható. A két csoport között átlagéletkorban, a nemek arányában, valamint a dohányosok és nemdohányzók arányában statisztikailag szignifikáns különbség nem volt.

A vizsgálathoz szükséges DNS-t a kontroll csoport esetén perifériás vénás vérből izolált fehérvérsejtekből, a beteg csoport esetén pedig a Klinikánkon vett, a definitív diagnózis alapját adó biopsziás szövetmintából (paraffin block) deparaffinálás után fenol-kloroformos módszerrel nyertük. A paraffinos blokkoknál lehetőség szerint a peritumorális ép szövetekből történt a DNS-izolálás, bár korábbi összehasonlító vizsgálataink szerint a SNP-ek esetén a tumormintából történő DNS izolálás is megbízhatóan használható a genotipizáláshoz.

UGT1A1 allél-polimorfizmus vizsgálata

Az UGT1A1 allél-polimorfizmus PCR (Techne Genius) vizsgálata esetén a TA-ismétlődések számának növekedése az UGT1A1 gén promóter régiójában két bázispárral hosszabb DNS-szakaszt eredményezett. A primerek: C = 5'-GTCACGTGACACAGTCAAAC-3' és D = 5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-3', melyek ellentétes irányokból 98, 100 és 102 bázispárt amplifikáltak a promóter régióból az UGT1A1 első exonján. A PCR-ral nyert és elektroforézis útján szétválasztott termékeket a képződött UGT1A1 génszakasz hosszúsága alapján három különböző genotípusba soroltuk: homozigóta variáns (TA)₇/(TA)₇, heterozigóta (TA)₆/(TA)₇ és vad típusú homozigóta (TA)₆/(TA)₆.

A CYP1A1 Ile/Val allélpolimorfizmus vizsgálata

A 7-es exonban levő *Ile/Val* polimorfizmust allélspecifikus PCR segítségével vizsgáltuk. Ez két csőben párhuzamosan zajlott, ahol ugyanaz volt az upstream primer, de a downstream primerek az utolsó bázisban különböztek egymástól. Abban a csőben volt termék, ahol a downstream primer teljes egészében komplementer volt a DNS templát szekvenciával.

A primer szekvenciák az alábbiak voltak:

upstream: GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT

downstream: AAGACCTCCCAGCGGGCAAT

AAGACCTCCCAGCGGGCAAC

A keletkezett termékeket 1.8 %-os agaróz gélben történt elektroforézissel tettük láthatóvá.

Statistikai analízis

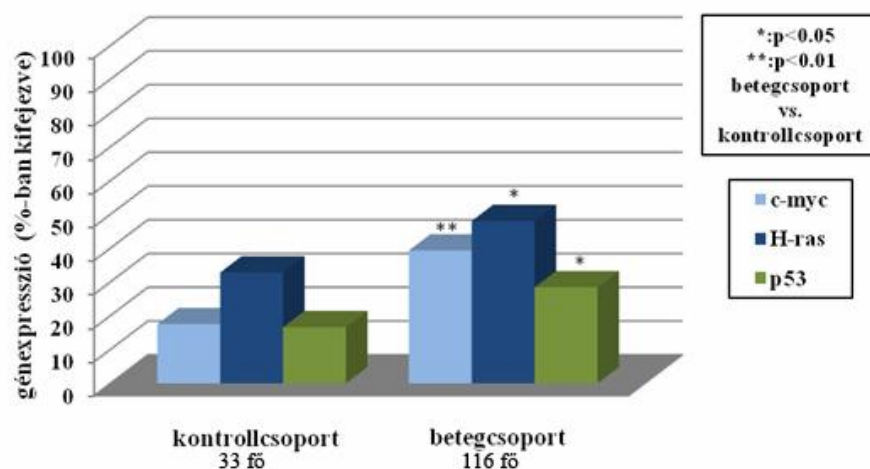
A túléléseket log rank teszttel hasonlítottuk össze, a csoportok közötti allélgyakoriságokat esélyhányados (odds ratio, OR,) 95 % megbízhatósági tartomány (confidence interval, CI) kiszámításával, valamint χ^2 próbával elemeztük. A kiértékelés az SPSS 19.0 statisztikai programmal (SPSS Inc., Chicago, USA) készült.

III.3. Az afobazol in vivo kemopreventív hatásának vizsgálata

Az afobazol-t Professzor Sergey Seredenintől kaptuk felhasználásra (State Zakusov Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia). Hat 6-8 hetes nőstény CBA/Ca (érzékeny H-2^K haplotípusú) egérből álló, összesen hat csoportot használtunk vizsgálatainkhoz. 4 csoport intraperitonealisan (i.p.) kukoricaolajban oldott DMBA-val volt kezelve. A négy csoportból három emellett kapott i.p. desztillált vízben oldott afobazolt. Az első csoport állat az afobazolt a DMBA kezelés után 24 órával, a második csoport egyszerre, a harmadik csoport a DMBA kezelés előtt 24 órával kapta meg. Az ötödik csoport kukoricaolajat és desztillált vizet kapott, a hatodik csoport afobazolt desztillált vízben. Az állatokat felboncoltuk 24, 48, 72 órával az utolsó kezelés után. A thymus, a lép, a máj, a vese, a tüdő, a csontvelő és nyirokcsomók lettek eltávolítva. RNS-t izoláltuk guanidin-izotiocianát-fenol-kloroform módszer szerint, majd kemolumineszcensen jelölt *p53* és *Ha-ras* génspecifikus próbákkal hibridizáltunk a gyártó utasításai szerint. A jeleket rtg-filmen detektáltuk, a kiértékelést Quantiscan software segítségével végeztük. Az eredményeket a konstitutív módon expresszált endogén kontroll β -aktin százalékában adtuk meg.

IV. Eredmények

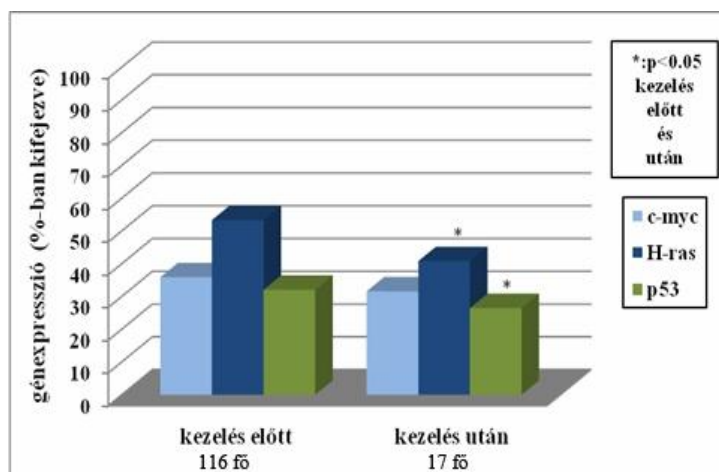
IV.1. C-myc, Ha-ras és p53 génextpressziós vizsgálatok eredményei



1. ábra

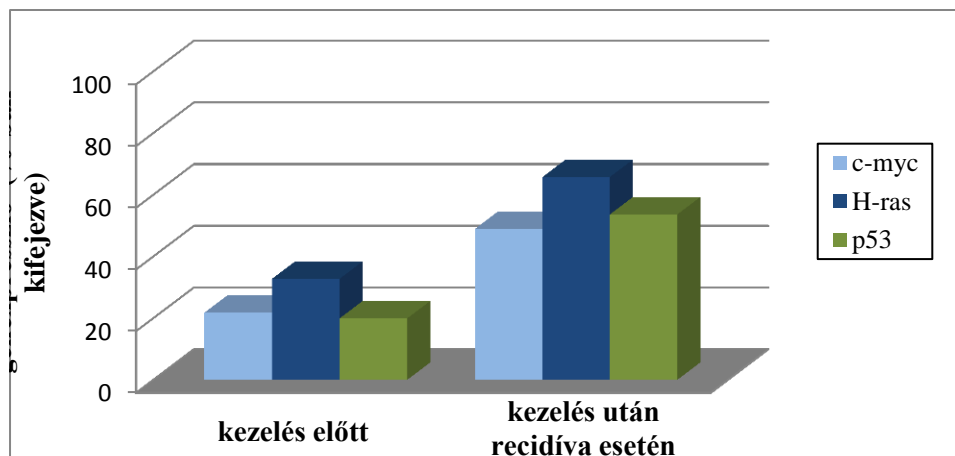
A *c-myc*, *H-ras* és *p53* gének expressziója a fej-nyaki daganatos és a kontrollcsoportban a β -aktin szint százalékában kifejezve

A daganatos csoportban szignifikánsan magasabb expressziót találtunk a *c-myc* (39.3 %, $p < 0.01$), *H-ras* (48.4 %, $p < 0.05$) és *p53* (28.4 %, $p < 0.05$) gének tekintetében a kontrollcsoportéhoz képest (17.6 %, 32.8 % és 16.6 %) (1. ábra).



2. ábra

Fej-nyaki daganatos betegek *c-myc*, *H-ras* és *p53* génextpressziói a kezelés előtt és után daganatmentes stádiumban a β -aktin szint százalékában kifejezve



3. ábra

A *c-myc*, *H-ras* és *p53* gének expressziója kezelés előtt és után a tanulmányban szereplő egyetlen recidív fej-nyaki tumoros esetben a β -aktin szint százalékában kifejezve

A definitív kezelés előtti és utáni vérvétel között eltelt idő 2 év volt. A kezelés előtti vérmintát adó 116 betegből csak 18 főt sikerült elérni a kezelés utáni vérvétel céljából. A fennmaradó 98 beteget vagy nem sikerült elérni, vagy elhunytak a kezelést követő második év végére. A tanulmányt befejező 18 betegből 17 bizonyult klinikailag recidívamentesnek. Mind a 17 beteg csökkent expressziót mutatott a *c-myc* (36.9 %→30.6 % No S), *Ha-ras* (54.8 %→39.4 %, szignifikáns: $p < 0.05$) és a *p53* (33 %→24.9 %, szignifikáns: $p < 0.05$) gének vonatkozásában. (2. ábra). Recidívát 1 betegnél észleltünk. Ebben az egyedüli esetben az összes vizsgált expresszió emelkedett volt (*c-myc* 21.7 %→48.9 %, *Ha-ras* 32.7 %→65.7 %, *p53* 19.9.% →53.6 %) (3. ábra).

IV.2. CYP1A1 és az UGT1A1 enzimek allélpolimorfizmus vizsgálatának eredménye

A CYP1A1 *Ile/Val* ill. az UGT1A1 allél-polimorfizmusok vizsgálata során a PCR technikával elemzett mintákból származó eredményeket, melyek a különböző allélok előfordulási gyakoriságát mutatják az egészséges és a tumoros csoportban, az I. ill. a II. táblázatban foglaltuk össze.

Genotípus	Tumor				Kontroll csoport
	Larynx	Hypopharynx	Mesopharynx	Összes	
<i>Ile/Ile</i>	34 (70,83 %)	31 (73,81 %)	33 (63,50 %)	98 (69,01 %)	119 (79,33 %)
<i>Ile/Val</i>	14 (29,17 %)	11 (26,19 %)	18 (34,60 %)	43 (30,29 %)	31 (20,67 %)
<i>Val/Val</i>	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	1 (1,90 %)	1 (0,7 %)	0 (0,0 %)

I. Táblázat

A CYP1A1 *Ile/Val* allél-polimorfizmusának megoszlása a tumoros és a kontroll csoportban

A populációban ritkább heterozigóta, ill. *Val* homozigóta genotípusok a tumoros csoportban (Össz: 30,99%, OR: 1,72, 95% CI: 1,02-2,96, p=0,044), ezen belül is különösen a mesopharynx tumoroknál (36,50%, OR: 2,21, 95% CI: 1,18-4,38, p= 0,022) szignifikánsan nagyobb arányban voltak jelen, mint az egészséges kontroll csoportban (20,67%). Tehát úgy tűnik, hogy a nagyobb enzimaktivitást mutató heterozigóta és *Val* homozigóta genotípus a fej-nyak rákok kockázatát emeli.

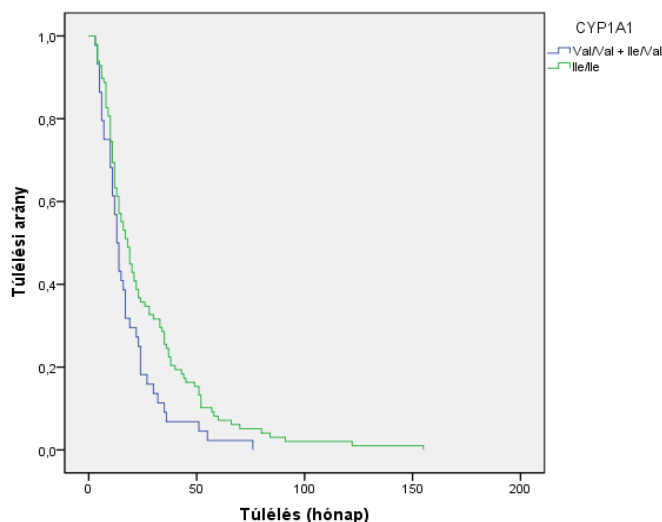
Genotípus	Tumor				Kontroll csoport
	Larynx	Hypopharynx	Mesopharynx	Összes	
TA(6)/TA(6)	17 (35,40 %)	11 (26,20 %)	20 (38,45 %)	48 (33,80 %)	64 (42,65 %)
TA(6)/TA(7)	19 (39,60 %)	19 (45,20 %)	21 (40,40 %)	59 (41,55 %)	70 (46,70 %)
TA(7)/TA(7)	12 (25,00 %)	12 (28,60 %)	11 (21,15 %)	35 (24,65 %)	16 (10,65 %)

II. Táblázat

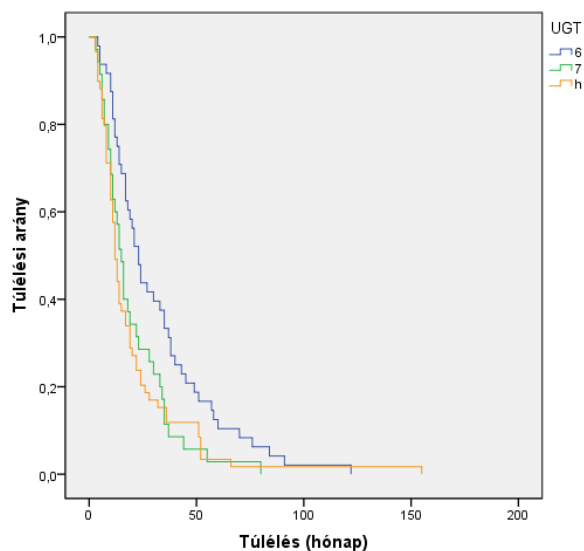
Az UGT1A1 allél-polimorfizmusának megoszlása a tumoros és a kontroll csoportban

Az UGT1A1*28 allélre homozigóta [TA(7)/TA(7)] genotípus előfordulási arányánál hasonló adatokat látunk, az egészséges csoportban az UGT1A1*28 allélre homozigóta betegek előfordulása szignifikánsan kisebb (OR: 2.74, 95% CI: 1.45-5.18, p= 0.002). Eredményeink alapján a fej-nyaki tumorok kialakulására kockázatnövelő hatással bír az UGT1A1*28 allélre homozigóta genotípus.

A másik kérdés, melyre választ kerestünk, hogy van-e befolyása a CYP1A1 és az UGT1A1 genetikai polimorfizmusának a tumoros betegek túlélésére. A teljes betegcsoportban a CYP1A1 *Ile/Val* allélvariánsok és az UGT1A1 promóter régió genotípusa szerinti túlélési görbéket a 4. ill. 5. ábrán szemléltetjük. A CYP1A1 esetén a leghosszabb átlagos túléléseket az *Ile* allélre homozigóta személyeknél látjuk (26,69 hónap), a heterozigóta betegek átlagos túlélése szignifikánsan rosszabb (18,02 hónap, p= 0,018), az egyetlen *Val* allélre homozigóta beteg átlagos túlélése a legrosszabb: 11 hónap. Az UGT1A1 vizsgálatánál az átlagos túléléseket tekintve a vad típusú allélre (UGT1A1*1) homozigóta csoport túlélése (31,6 hónap) szignifikánsan hosszabb a heterozigóta csoporténál (19,9 hónap, p=0,009), és a homozigóta UGT1A1*28 egyénekénél (20,2 hónap, p=0,006).

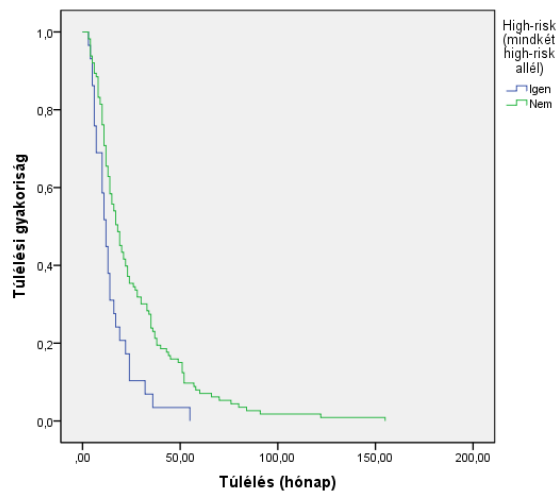


4. ábra Fej-nyak tumorok túlélési görbéi a CYP1A1 *Ile/Val* allél-polimorfizmusa szerint



5. ábra Fej-nyak tumorok túlélési görbéi az UGT1A1 promóter régiójának genotípusai szerint

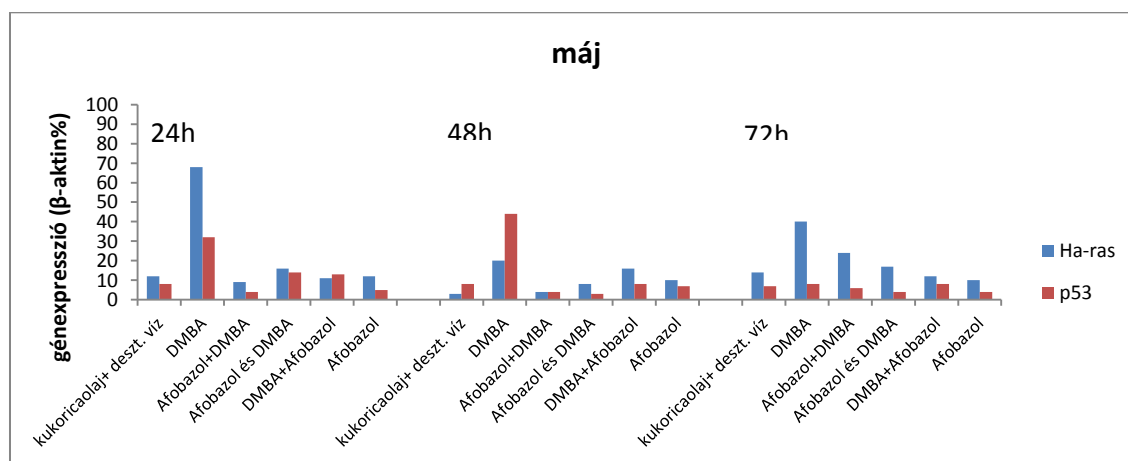
Végül vizsgáltuk betegcsoportunkban, hogy a két high-risk allél (CYP1A1 *Ile/Val* + UGT1A1*28) együttes hordozása hogyan befolyásolja a túlélést. Eredményeinket a 6. ábrán szemléltetjük. Összesen a 142 betegből 29 beteg hordozta mindkét high-risk allélt. Átlagos túlélésük 14,62 hónap volt, szignifikánsabb kisebb a csak egy, vagy egy high-risk allélt sem hordozókénál 26,35 hónap túléléssel (OR:2,149, 95% CI: 1.111-4,157, p: 0,001).



6. ábra A két high-risk allél együttes hordozásának hatása a túlélésre

IV.3. Az afobazole in vivo kemopreventív hatásának vizsgálatának eredménye

Az afobazol in vivo kemopreventív hatásának vizsgálata kapcsán a DMBA megnövelte a *Ha-ras* és a *p53* expresszióját a májban, a lépben, a tüdőben, a nyirokcsomókban és a csontvelőben. Az afobazol önmagában adva nem befolyásolta a gének expresszióját. Az afobazol a DMBA-val együtt adva csökkentette a DMBA indukálta overexpressziót mind a *Ha-ras*, mind a *p53* esetén. A DMBA indukálta génexpresszió leginkább akkor csökkent, amikor az afobazolt egy időben adtuk a DMBA-val, így mindkét gén expressziója valamennyi szövetben csökkent. A DMBA indukálta génexpresszió további csökkenését tapasztaltuk 48 óra után négy szövetben: a májban, a lépben, a tüdőben és a nyirokcsomókban. Kisebb génexpresszió növekedés volt megfigyelhető mindkét gén esetében a kezelés után 72 órával. Ez az afobazol idő-dependens hatásával magyarázható. (7.ábra-máj)



7.ábra

Ha-ras and *p53* génexpresszió növekedés egérben 24, 48, 72 órával a DMBA és afobazol adását követően a kontroll anyagokkal összehasonlítva. (Afobazol +DMBA: afobazol kezelés 24 órával a DMBA előtt; Afobazol és DMBA: afobazol kezelés egyidőben a DMBA-val; DMBA+Afobazol: afobazol kezelés 24 órával a DMBA után; kukorica olaj+desztillált víz, DMBA és afobazol önmagában, mint kontroll adva)

V. Megbeszélés

A modern és naprakész diagnosztikus eljárások és kezelési lehetőségek ellenére a fej-nyaki tumoros betegek túlélési aránya továbbra is kedvezőtlen. Az 5 éves túlélés a definitív diagnózistól számítva kevesebb, mint 50 %, de bizonyos típusú daganatoknál csupán mindössze 25 %. Habár a gyakran alkalmazott képalkotó vizsgálatok, mint például az UH, CT, MRI, valamint a szövettani értékelés korai diagnózishoz segítenek, alkalmazásukkal csak manifeszt tumorok detektálhatók. A modern diagnosztikus és therápiás lehetőségek ellenére romló mortalitási adatokat mutató, fej-nyak rákokkal kapcsolatos hazai és nemzetközi statisztikai felmérések tükrében a prevenció egyre több országban a kutatások fókuszába került. Molekuláris biológiai markerek alkalmazásával az expozíció és a daganat kialakulásának korai jelei már jóval korábban, még a fenotípusos változások előtt kimutathatók. Hangsúlyoznunk kell, hogy a molekuláris biológiai markerek segítségével történő tumorkimutató rendszeres szűrést igényelne.

Az onkogének és tumorszuppresszor gének expressziójának elemzése -karcinogenezisben játszott fontos szerepük miatt - megfelelő eljárásnak tűnik a karcinogén expozíció korai felismerésére. Ezen gének szignifikánsan fokozott expresszióját mutatták ki expozíciónak kitett, nyilvánvaló tumortól mentes, valamint különböző típusú daganatokban (agydaganat, pancreas tumor és papilláris pajzsmirigy daganat) szenvedő betegekben, mely a géneknek korai biológiai válaszok biomarkereiként való használhatóságukat sugallja.

Jelen értekezésben a *Ha-ras* és *c-myc* onkogének, valamint a *p53* tumorszuppresszor gén szignifikáns over-expresszióját mutattuk ki fej-nyaki tumoros betegek fehérvérsejtjeiből nyert RNS mintákon a kontroll csoporttal összehasonlítva. Rámutattunk, hogy a definitív kezelést követően a recidívával nem rendelkező betegeknél csökkent a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* gének expressziója, míg a tanulmányban szereplő egyedüli recidív esetben szignifikánsan fokozott volt az expresszió. Ez az első értekezés malignus gége-garat tumorok monitorozására perifériás fehérvérsejtből nyert RNS-nek mint biomarkernek a felhasználásával.

A tumor klinikai megjelenését a vizsgált gének emelkedett expressziója feltehetően ebben a csoportban is megelőzte, ahogy ez más tumoros csoportoknál is igazolódott szűrő- vizsgálatok segítségével.

A leírt eljárás hasznos lehet a definitív terápia után kialakuló, klinikailag még tünetmentes tumor recidívák felismerésére. Eredményeink jelen esetszám mellett csak figyelemfelkeltőek. A vizsgált génextpressziós változások biomarkerként való alkalmazásához további, nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek.

A daganatkialakulás kockázati tényezője lehet exogén, pl. foglalkozási vagy környezeti karcinogén expozíció, azonban endogén, genetikai tényezők is befolyásolják a tumor létrejöttét. Több magas penetranciájú, pl. örökletes genetikai faktort ismerünk, de az alacsony penetranciájú genetikai tényezők még kevésbé ismertek. Az alacsony penetranciájú genetikai tényezők csoportjába tartoznak a környezeti karcinogéneket detoxifikáló, metabolikus enzimek polimorfizmusai. Jelen tanulmányban a CYP1A1 I-es fázisú és az UGT1A1 II-es fázisú metabolikus enzimek allél-polimorfizmusának fej-nyak rákok kockázat- és túlélését befolyásoló szerepét vizsgáltuk.

A CYP1A1 enzim *Isoleucin/Valin (Ile/Val)* allél-polimorfizmusa jól ismert, ahol a homozigóta *Val*, illetve a heterozigóta (*Ile/Val*) enzim AHH aktivitása nagyobb, mint a homozigóta *Ile*-enzimé. Ez a karcinogének gyorsabb, fokozottabb metabolikus aktivációját eredményezi. Az UGT1A1 enzim génjének sok genetikai variációja ismert, ezek közül is kiemelendő az UGT1A1*28, mely számos betegség létrejöttében szerepet játszik, és csak a vad allél (UGT1A1*1) expressziós aktivitásának harmadával rendelkezik, gyengébb karcinogén inaktivációs tevékenységgel.

Vizonylag kevés közlemény vizsgálta a CYP1A1 *Ile/Val* allél-polimorfizmusát. Kaukázusi populációban az *Ile/Val* heterozigóta genotípus van jelen nagyobb arányban fej-nyaki rákoknál és szinte alig fordul elő a *Val/Val* homozigóta genotípus. Tanulmányunkban CYP1A1 *Ile/Val* allél-polimorfizmust vizsgálva hasonló eredményeket kaptunk. A heterozigóta variáns tumoros csoportunk 30,29%-át adta, míg az egészséges csoportban 20,67 %-ban volt jelen, a 142 fős tumoros csoportunkból 1 beteg genotípusa volt csak *Val/val* homozigóta (0,7%). Tanulmányunkban a fej-nyaki tumorok kialakulásának kockázatát emelő, nagyobb enzimaktivitást mutató, a populációban ritkább heterozigóta, ill. *Val* homozigóta genotípusok a tumoros csoportban (Össz: 30,99%), ezen belül is a mesopharynx tumoroknál (36,50%) szignifikánsan nagyobb arányban voltak jelen, mint az egészséges kontroll csoportban (20,67%), így kijelenthetjük, hogy a CYP1A1 *Ile/Val*, ill. *Val/Val* allél-polimorfizmusa rizikó tényezőként fogható fel a fej-nyaki tumorok kialakulásában hasonlóan más tanulmányokhoz.

A CYP1A1 *Ile/Val* allél-polimorfizmusnak fej-nyaki tumorok prognózisára, túlélésére gyakorolt hatását ezidáig azonban még nem vizsgálták. Tanulmányunkban tumoros betegeink túlélési idejét ismerve, azokkal összevetve vizsgáltuk meg az egyes genotípusok túlélésre gyakorolt hatását. Elvárásainknak megfelelően az egyes genotípusok enzimaktivitásával megegyezően a leghosszabb átlagos túléléseket az *Ile/Ile* allélre homozigóta egyéneknél látjuk, a heterozigóta betegek átlagos túlélése szignifikánsan rosszabb ($p=0,018$). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a ritkább előfordulású, de metabolikusan aktívabb CYP1A1 *Ile/Val*, ill. *Val/Val* genotípusok a fej-nyak rákok túlélését rontják.

Tanulmányunk második felében a II-es fázisú UGT1A1 gén allél-polimorfizmusát vizsgáltuk. A CYP1A1 génnel ellentétben az UGT1A1 gén irodalma jóval kisebb. A vad allél (UGT1A1*1) expressziós

aktivitásának harmadával rendelkező UGT1A1*28 variáns hatását a gén kifejeződésére azonban szintén számos betegség esetén vizsgálták. Jelen tanulmányunkban malignus fej-nyaki tumoroknál az UGT1A1 gén promóter régió allél-polimorfizmusát, mint kockázati tényezőt, valamint túlélést befolyásoló szerepét vizsgáltuk. Tanulmányunkban a teljes tumoros csoportot tekintve a csökkent enzimaktivitással és ezáltal gyengébb karcinogén inaktivitással rendelkező UGT1A1*28 allélre homozigóta betegek előfordulása szignifikánsan nagyobb volt (24,65%) az egészséges csoporthoz képest (10,65%) ($p=0,002$). Ennek alapján kijelenthetjük, hogy az UGT1A1*28 kockázati tényezőként hat a fej-nyaki daganatok kialakulására.

A túléléseket elemezve megállapítottuk, hogy a homozigóta vad genotípus túlélése a leghosszabb, az UGT1A1*28-ra homozigóta és heterozigóta páciensek túlélése szignifikánsan rövidebb. Ezen eredmények szerint az UGT1A1*28 allél negatív irányban befolyásolja a túlélést.

A két un. high-risk allél (CYP1A1 *Ile/Val*, UGT1A1*28) túlélésre gyakorolt hatásának ismeretében kézenfekvő volt, hogy megvizsgáljuk a két allél együttes hordozása milyen mértékben változtatja meg a túlélést. Előzetes feltételezéseinknek megfelelően szignifikánsan kisebb átlagos túlélése volt a két allélt egyszerre hordozó betegeknek, összehasonlítva a csak egy, vagy high risk alléllal nem rendelkezőkkel. Ez az eredmény is megerősíti a két metabolikus enzim szoros együttműködését, hiszen a két high-risk allél együttes hordozása a túlélést tovább rontja.

Bár a CYP1A1 és az UGT1A1 genetikai polimorfizmusok és a fül-orr-gégészeti területen kialakuló daganatok közti kapcsolat további nagyobb elemszámú vizsgálattal történő tanulmányozása szükséges, eredményeink mégis előrevetítik, hogy a CYP1A1 *Ile/Val* ill. *Val/Val* variánsok, valamint az UGT1A1*28 biomarkerként való felhasználása hasznos segítséget nyújthat a prevencióban és prognosztikai tényezőként alkalmazható az egyénre szabott terápia kialakításában.

Amennyiben a fenti, vagy a fentiekhez hasonló molekuláris prediktív epidemiológiai biomarker vizsgálatokkal egyéni rizikóbecslést végzünk, megismerjük az egyén érzékenységét, a primer prevenció egyik hatékony eszközéhez, a kemoprevencióhoz is fordulhatunk segítségért. A primer prevenció speciális formája a kemoprevenció, amikor is kifejezetten betegségmegelőzési célzattal olyan gyógyszert, illetve természetes vagy mesterségesen előállított vegyületet vagy vegyületeket fogyasztunk, amelynek hatását e téren már bizonyították. Mint említettük, Plotnikov és orosz munkacsoportja írta le először a bemitil (2-mercaptobenzimidazol) vegyületet, mely egy új gyógyszercsoporthoz, az actoprotectorokhoz tartozik, erős antimutagén hatást mutatva. Az aktív bemitil származékok, így pl. az afobazol antimutagén hatását előzetes in vivo vizsgálatok már igazolták. Mivel egy kemopreventív szer antimutagén és rákellenes hatása közötti átfedés csaknem 90 %, így az előzetes in vitro vizsgálatok eredményei alapján megvizsgáltuk mint lehetséges

kemopreventív szer, az afobazol DMBA indukálta onkogén (*Ha-ras*)/ szuppresszor gén (*p53*) overexpresszióra gyakorolt hatását. Az afobazol hatása a DMBA indukálta *Ha-ras* és *p53* gének overexpressziójára időfüggő volt. A legerősebb szuppresszor hatást 48 órával az afobazol kezelés után figyeltünk meg. 72 órával a kezelést követően azonban a két gén kismértékű expresszió növekedése volt újra látható, mely az afobazol kemopreventív hatásának csökkenését jelzi. A kemopreventív hatás az afobazol és a DMBA kezelés beadási idejétől is függött. A legjelentősebb DMBA indukálta overexpresszió csökkenést az afobazol és a DMBA egyidőben történő adásánál láttunk, amikor mindkét gén overexpressziója minden szövetben csökkent.

Eredményeink azt sugallják, hogy az afobazol hatással lehet a DMBA metabolikus aktivációjára, felelős lehet a vegyület mutagen aktivitásáért. Megfigyeléseink tovább erősítik korábbi in vitro eredményeken alapuló feltételezésünket, miszerint az afobazol in vivo kemopreventív hatással rendelkezik.

Az individuális kockázat ismeretében bizonyos betegségek megjelenése a primer és szekunder prevenció eszközeivel megelőzhető lenne. A genetikai rizikótényezők nem változtathatók meg, de segítségükkel azonosíthatók a fokozottan veszélyeztetett csoportok, akiknél különösen fontos a környezeti kockázati tényezők elkerülése, és a rendszeres követés, immun- és kemoprevenció alkalmazása. A jövőbeni daganatmegelőzés egyik legfontosabb feladata olyan biomarkerek kutatása, amelyek a mutagénnel szembeni általános érzékenység mellett az egyén genetikai polimorfizmusát is mérik, ezáltal segítve a személyre szabott terápia hatásosságának növelését. Az egyén pontos genetikai hajlamosító tényezőit figyelembe véve a terápia hatékonysága előre felbecsülhető, illetve ennek ismeretében a kezelés eredményessége növelhető. Jó prognosztikai faktorok esetén a mellékhatások tekintetbe vételével tudunk dönteni a kezelésről, vagy kedvezőtlen esetben agresszívebb, hatékonyabb terápia tervezhető.

VI. Új eredmények összefoglalása

- Jelen értekezésben kimutattuk, hogy a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* gének expressziója a malignus fej-nyaki tumorokban szenvedő betegeknél szignifikánsan magasabbak volt, mint a kontrollcsoportban. A definitív kezelést követően a recidívával nem rendelkező betegeknél csökkent a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* gének expressziója, recidiva esetén emelkedett. A leírt eljárás hasznos lehet a definitív terápia után kialakuló, klinikailag még tünetmentes tumor recidívák felismerésére.
- Először alkalmaztunk malignus gége-garat tumorok monitorozására perifériás fehérvérsejtből nyert RNS-t, mint molekuláris és prediktív epidemiológiai biomarkert. A kidolgozott módszer megbízható, a jövőben a klinikai gyakorlatban is könnyen alkalmazható lehet.
- Szignifikáns összefüggést találtunk a CYP1A1 *Ile/Val* ill. *Val/Val* allél és az UGT1A1*28 allél gyakorisága és a fej-nyaki daganatok fokozott kockázata között.
- Elsőként vizsgáltuk a CYP1A1 *Ile/Val* valamint az UGT1A1 allél-polimorfizmusok fej-nyak rákok túlélésére gyakorolt hatását, s eredményeink szerint a CYP1A1 *Ile/Val* és a *Val/Val* allél variánsok, valamint az UGT1A1*28 allél variáns a malignus fej-nyaki daganatos betegek túlélési idejét szignifikánsan csökkentik.
- Az afobazol csökkentette a DMBA indukálta onkogén (*Ha-ras*)/szuppresszor gén (*p53*) overexpressziót in vivo, mely hatás idődependens volt. Az afobazol hatással lehet a DMBA metabolikus aktivációjára, felelős lehet a vegyület mutagén aktivitásáért. Megfigyeléseink tovább erősítik korábbi in vitro eredményeken alapuló feltételezésünket, miszerint az afobazol potenciális in vivo kemopreventív hatással rendelkezik.

X. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Ember István Professzor Úrnak, hogy doktori iskolájába befogadott, köszönetet mondok munkámban nyújtott folyamatos segítségéért, lelkesítő szavaiért. Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Kiss István Tanár Úrnak munkámhoz nyújtott önzetlen segítségét, türelmét. Köszönetet mondok Gerlinger Imre Professzor Úrnak ösztönzéséért, sok segítségéért. Külön köszönettel tartozom a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet dolgozóinak a munkám alapjául szolgáló kiváló labormunkákért, nevezetesen Brunnerne Bayer Zsuzsának, Herczeg Mónikának, Déri Tibornénak. S nem utolsósorban hálásan köszönöm családomnak a sok türelmet, segítségüket.

Investigations of molecular epidemiologic biomarkers in malignant head and neck tumors

PhD thesis

István Szanyi MD

Program leader: Prof. Dr. med. habil. István Ember Dsc

Consultants: Dr. med. habil. István Kiss PhD

Prof. Dr. med. habil. Imre Gerlinger PhD

Pécs University

Medical Faculty

2011, Pécs

I. Introduction

I.1. Epidemiology of head and neck cancers

Hungary is one of the leaders in malignant diseases worldwide. According to the international and great European mortality data Hungarian man takes the first, Hungarian women takes the second place. Among the malignancies the morbidity and mortality statistics of head and neck tumors are outstanding. Head and neck squamous cell carcinomas with worldwide yearly diagnosed 540 000 new cases and a significant lethality above 50% report a serious public health problem. Based upon the data of Hungarian Central Statistical Office (HCSO) the number of deaths caused by the upper airway and alimentary duct tumors has been increased greatly from the 1970-ies until now, particularly lip and oral cavity malignant tumors which increased threefold. Data of Demographic yearbook 2005 of HCSO showed that the mortality of malignant lip, oral cavity-and pharyngeal cancers' is as high as 15.5/100 000 person.

I.2. Etiology and risk factors of head and neck cancers

Similarly as for other tumours, the risk of development of tumours in the head and neck region is determined by the interaction of exogenous (environmental) and endogenous (genetic) factors. Exogenous factors such as smoking, alcohol consumption and environmental carcinogens have clear effects on the risk of development of head and neck cancers. Hereditary, high-penetrating genetic factors are well known, though the roles of low-penetrating, individual sensitivity factors have not yet been elucidated in many tumour types, including head and neck tumours.

I.3. Prevention-predictive epidemiology

Although radiotherapeutic, chemotherapeutic and surgical protocols have been developed, the survival of patients suffering from head and neck malignancies has not improved significantly in recent decades. Despite the simplicity of physical examinations in the head and neck region and the fact that manifest mutations can be diagnosed relatively early, general screening is not performed in Hungary at present. One of the cardinal causes of the unfavourable mortality is that the majority of the patients turn to the doctor when the condition is at an advanced stage, regional or distant metastases are present and curative therapy is out of the question. Improvements in morbidity and mortality of head and neck cancers can be achieved by the primary and secondary prevention. The primary prevention concentrates on the avoidance of the carcinogenic agents in cases of the head and neck cancers e.g. alcohol consumption and smoking. The secondary prevention (screening) helps

for the recognition of the disease in the early, premorbid stage. At border of the primary and secondary prevention molecular and predictive epidemiology with the recognition of early biomarkers plays an important role in cancer prevention. By the aid of these early biomarkers the exposure→disease process can be recognised before the positivity of the diagnostic markers of the definitive disease. So that identification of exposed population or persons even though in stage of the exposure or the early biological effect before the appearance of the manifest tumors, primary preventive intervention can be followed. Moreover this method may be a reliable biomarker for monitoring the tumor development and the efficiency of therapy in malignant head and neck cancers from the view of tertiary prevention.

Expression of oncogen and tumor suppressor gene

With the recognition of early biomarkers, such as changes in oncogene and tumor suppressor gene expression, tumor development and the efficiency of therapy (e.g. "minimal residual disease") can be monitored. Since oncogenes and tumor suppressor genes play a crucial role in carcinogenesis, analysis of oncogene and tumor suppressor gene expressions is an appropriate method for the early detection of carcinogen exposure. The onco-/suppressor gene expressions (*c-myc*, *Ha-ras*, *p53*) on RNA originated from peripheral white blood cells of patients suffered from head and neck cancers were investigated before and after the definitive treatment. The genes which were investigated in this study play an important role in carcinogenesis, *Ha-ras* in the initiation of carcinogenesis and *p53* in response to DNA damage, *c-myc* exerts its effect in the proliferation and immortalization processes. In this study the changes in expression of the *c-myc* and *Ha-ras* oncogenes and the *p53* tumour suppressor gene were investigated in cases of head and neck cancers in different stages and involving different primary sites, before and after the definitive therapy. We hypothesized that, similarly to the findings of Ember *et al.*, who detected increased oncogen and suppressor gene expressions as biomarkers for ethylene-oxide exposure and the appearance of certain cancers, the expressions of these genes would be elevated in our cancer population, too. Our aim, therefore, was to prove that cancers localized in the head and neck region can cause elevation expressions of the *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* genes

Allelic polymorphisms of metabolizing enzymes

Similarly as for other tumours, the risk of development of tumours in the head and neck region is determined by the interaction of exogenous (environmental) and endogenous (genetic) factors. Exogenous factors such as smoking, alcohol consumption and environmental carcinogens have clear effects on the risk of development of head and neck cancers. Hereditary, high-penetrating genetic

factors are well known, though the roles of low-penetrating, individual sensitivity factors have not yet been elucidated in many tumour types, including head and neck tumours. The gene polymorphisms which belong in this latter group increase the individual sensitivity to only a small degree, but in consequence of their high prevalence they have a greater influence on the overall risk of the population than that of the rare, high-penetrating alleles. The largest group of low-penetrating genetic factors is comprised of the gene polymorphisms of metabolizing enzymes. The phase I enzymes activate the procarcinogens to electrophilic carcinogens, after which the phase II enzymes inactivate these metabolites by conjugation, thereby promoting their elimination from the organism. Thus, besides the environmental carcinogens, the activity of metabolizing enzymes also influences the concentration and impacting time of carcinogens in the organism and the risk of the development of tumours. One of the most important factors on which the activity of metabolizing enzymes depends is the genotype of the enzyme. Most metabolizing enzymes are genetically polymorphic. The allelic variants vary slightly from each other in gene structure and base sequences, but may do so significantly in gene expression and enzyme activity. The cytochrome P450 (CYP) system, a well-known and well-studied enzyme system, is the most important component in the first phase of biotransformation. It hydroxylates and activates the polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrosamines (for example, benzopyrene in cigarette smoke) into effective carcinogens through the utilization of molecular oxygen and NADPH. The glucuronidating enzyme system then steps into the process as part of the second phase of biotransformation. It binds glucose to carcinogenic metabolites and facilitates their excretion from the organism in water-soluble form. In the present study, we carried out an analysis of the phase I enzyme CYP1A1, which belongs in the CYP system, and the phase II enzyme uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1 or UGT1A1), which belongs in the glucuronidating system, as low-penetrating genetic factors.

CYP1A1

CYP1A1 belongs in the phase I metabolizing enzyme group. Since its product, aryl-hydrocarbon-hydroxylase (AHH), plays an important role in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, it is closely related to the risk of cancer development. The best-known substrate of the enzyme is benzopyrene, which occurs in cigarette smoke, exhaust fumes and by-products of further burning processes. The gene is located on chromosome 15 and one of its genetic polymorphisms is an A-G polymorphism on exon 7, which results in the protein in *Ile/Val* polymorphism. In the event of this polymorphism, the alleles *Ile* and *Val* are named after the encoded aminoacids. In Caucasian populations the *Ile* homozygous genotype is the most common, while the *Val* homozygotes occur rarely. The AHH activity of the enzyme encoded by the allele *Val* is greater than that of the *Ile*

enzyme, which results in faster and more enhanced metabolic activation of the procarcinogens. This allelic polymorphism has been brought into connection with the risk of certain tumors, including head and neck cancers.

UGT1A1

UGT1A1 is an enzyme that catalyses the second phase of the biotransformation, i.e. the glucuronidation. During this process, the binding of glucose to the lipophilic toxic materials leads to the production of more polar, water-soluble, less toxic and more easily excretable components. One of the main metabolites of group UGT1A1 is benzopyrene in cigarette smoke, which are risk factors for the majority of head and neck cancers. The UGT1A1 gene is located on the 2q37 chromosome locus and its promoter region has a number of genetic variants. One of the most common genetic polymorphisms is found in the TATA box region of the gene promoter region, and results in changes in the number of thymine-adenine (TA) repeats. The wild-type (UGT1A1*1) normally contains 6 TA repeats ((TA)₆/(TA)₆; 6/6), while in 10-16% of the population 7 TA repeats (UGT1A1*28; 7/7) occur in the homozygous form. In the event of the insertion of the extra TA dinucleotide, the transcriptic activity decreases to 30% of the activity of the wild-type (UGT1A1*1) allele.

Chemoprevention

Identification of exposed population or persons primary preventive intervention can be followed. As a part of primary prevention our aim was to study reliable chemo-and immunopreventive drugs in head and neck cancers. Chemoprevention is a successful method of primary prevention, but potential chemopreventive drugs must be evaluated prior to administration. A test system has already been developed in our institute to assess the potential chemopreventive effect of bioactive compounds by analysing the changes in the expression of an oncogene and a tumor suppressor gene. Plotnikov *et al* have reported that a compound, bemitil (2-mercaptobenzimidazole), showed a strong antimutagenic effect. In *in vivo* investigations bemitil reduced the 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) as a polycyclic aromatic hydrocarbon, genotoxic carcinogen-induced overexpression of oncogenes and tumor suppressor genes in a short-term test. Pharmacologically active 2-mercaptobenzimidazole (bemitil, tomerzole, afobazole) derivatives are able to reduce the mutagenic effects of chemical prooxidants by inhibition of free radical oxidation-induced endogenous mutagen formation. The coincidence between the antimutagenic and anticancer effects of a chemopreventive agent is almost 90 %. Based on this fact and also on the results of previous *in vitro* studies the *in vivo* effect of afobazole on DMBA-induced oncogene (Ha-ras)/suppressor (p53) gene expression was

investigated in a short-term test. DMBA is high can act as an initiator causing point mutations of oncogenes and tumor suppressor genes.

II. Objectives

1. Investigations of that the malignant head and neck tumors lead to increasing of expressions *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* genes, so with aid of that tumor development and the efficiency of therapy (e.g. "minimal residual disease") can be recognised in early stage.
2. Preparing of the method from peripheral blood of these gene expression investigation which can be reliable even in the clinical practice.
3. We set out to investigate that of CYP1A1 *Ile/Val* and the UGT1A1 *1/*28 allelic polymorphism as factors influencing the risk of the development of head and neck cancers.
4. We set out to investigate that of CYP1A1 *Ile/Val* and the UGT1A1 *1/*28 allelic polymorphism as factors influencing the overall survival of head and neck cancers separately and together.
5. Proof of in vivo chemopreventive effect of afobazol as even one of the possible future chemopreventive drugs of head and neck cancers.

III. Materials and methods

III.1 Investigations of changes in expressions of *c-myc*, *Ha-ras* oncogenes and *p53* tumor suppressor gene

Between February 2003 – January 2007 116 patients (95 males and 21 females) treated in our Institute with malignant head and neck cancers were involved into study. The onco-/supressor gene expressions were investigated before and if it was possible, after the definitive treatment. Their results were compared with that of a cohort of a control group which consists of 33 healthy, non smoker and non drinker patients (14 males and 19 females) suffered from not tumorous diseases. Peripheral blood samples were taken from every patients. From peripheral white blood cells the total RNA was isolated according to the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. RNA was dot-blotted onto Hybond N+ nitrocellulose membrane and hybridized with chemiluminescently labelled *c-myc*, *p53* and *Ha-ras* gene specific probes. The signals were detected on X-ray film and

dots were evaluated by using Quantiscan software. The results were expressed as the percentage of β -actin (constitutively expressed endogenous control).

III.2. Investigations of CYP 1A1 and UGT 1A1 allelic polymorphisms

Study groups for the allelic polymorphism investigation of CYP1A1 Ile/Val and UGT1A1

The tumour group consisted of 142 patients (48 with laryngeal, 42 with hypopharyngeal and 52 with mesopharyngeal tumours), all of them participating in care in the Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery. The control group (150 subjects) consisted of volunteers without malignant tumours. There was no statistically significant difference in age, sex distribution or smoking habits between the two groups. The DNA for the investigation was gained from peripheral blood in the control group, and from the histological biopsy samples, on which the definitive diagnosis (paraffin block) was based with deparaffination followed by phenol-chloroform method in the tumour group.

Investigation of UGT1A1 allelic polymorphism

In the PCR investigations of the UGT1A1 allelic polymorphism, the increased numbers of TA repeats resulted in a DNA fragment longer by two base pairs in the promoter region of the UGT1A1 gene. The primers were C = 5'-GTCACGTGACACAGTCAAAC-3' and D = 5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-3'. The separated products were classified into three different genotypes on the basis of the length of the developed gene section of UGT1A1: homozygous variant (TA)₇/(TA)₇, heterozygous (TA)₆/(TA)₇ and wild-type homozygous (TA)₆/(TA)₆.

Investigation of CYP1A1 Ile/Val allelic polymorphism

The *Ile/Val* polymorphism located in exon 7 was investigated by means of allele-specific PCR which is a frequently used method for *Ile/Val* genotyping. This was performed simultaneously in two tubes, where the upstream primers were same, whereas the downstream primers differed in the last base. The product was developed in the tube where the downstream primer was totally complementary with the DNA template sequence.

The sequences of the primers:

upstream: GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT

downstream: AAGACCTCCCAGCGGGCAAT

AAGACCTCCCAGCGGGCAAC

The end-products were visualized by means of electrophoresis in a 1.8% agarose gel.

Statistical analysis

The survivals were compared through the log rank test. The allelic frequencies were compared by logistic regression using the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) and were also tested with the χ^2 probe. The analysis was performed with the statistical program SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

III.3 Investigation of in vivo chemopreventive effect of afobazole

Chemicals: Afobazole was kindly provided by Professor Sergey Seredenin (State Zakusov Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia).

Six groups of six conventionally kept, 6-8 week-old female CBA/Ca (sensitive H-2^K haplotype) mice were used. Four groups were treated intraperitoneally (*i.p.*) with DMBA dissolved in corn oil. Three of the four groups were additionally treated *i.p.* with afobazole dissolved in distilled water. The first group of animals was administered afobazole 24 hours after, the second group parallel with, and the third group 24 hours prior to the DMBA treatment. The fifth group was administered corn oil and the sixth group was treated with afobazole in a corn oil solution. The animals were autopsied 24, 48 and 72 hours after the final treatment. The thymus, spleen, liver, kidney, lung, bone marrow and lymph nodes were removed. The total RNA was isolated according to the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method. The RNA was dot-blotted and hybridized with chemiluminiscently labelled *p53* and *Ha-ras* gene specific probes. The signals were detected on X-ray film and dots were evaluated by using Quantiscan software. The results were expressed as the percentage of β -actin (constitutively expressed endogenous control).

IV. Results

IV.1. Results of the investigations of *C-myc*, *Ha-ras* and *p53* gene expressions

The cancer group showed significantly higher gene expression levels of *c-myc* (39.3 %, $p < 0.01$), *Ha-ras* (48.4 %, $p < 0.05$) és *p53* (28.4 %, $p < 0.05$) than the healthy controls (17,6 %, 32,8 % and 16,6 %). The onco/tumor suppressor gene expression levels of head and neck cancer patients before and after the definitive treatment were also investigated. The follow-up time was 2 years. After two years in patients having no recurrence of tumor the expression of *c-myc* (36.9 % \rightarrow 30.6 % No S), *Ha-ras* (54.8 % \rightarrow 39.4 %, $p < 0.05$) és a *p53* (33 % \rightarrow 24.9 %, $p < 0.05$) was decreased. Reduction of the gene expression was significant in case of *Ha-ras* and *p53*. In only one case with recurrent tumor, all of the

investigated expressions were increased (*c-myc* 21.7 %→48.9 %, *Ha-ras* 32.7 %→65.7 %, *p53* 19.9% →53.6 %).

IV.2. Results of investigations of the CYP1A1 and UGT1A1 allelic polymorphism

The CYP1A1 *Ile* heterozygous and *Val* homozygous genotypes occurred with significantly higher frequency in the tumour group (total: 30.99%, OR: 1.72, 95% CI: 1.02-2.96, $p=0.044$), and particularly in the subgroup of mesopharyngeal tumours (36.50%, OR: 2.21, 95% CI: 1.18-4.38, $p=0.022$), than in the control group (20.67%). The *Ile* heterozygous and *Val* homozygous genotypes reflect elevated enzyme activity, and a higher risk of head and neck tumour formation. The homozygous UGT1A1*28 allele [TA(7)/TA(7)], which enhances the risk of the development of head and neck cancer, was significantly more frequent in the tumour group than in the control group. It was identified in 10.65% in the control group, in contrast with 20-30% in the different tumour subgroups, its overall frequency in the tumour group proving significantly higher than that in the control group (OR: 2.74, 95% CI: 1.45-5.18, $p=0.002$). In the case of CYP1A1, the presence of the homozygous *Ile/Ile* allele was accompanied by a significantly longer survival (mean 26.69 months), than in the case of the heterozygous allele (mean 18.02 months, $p=0.018$). The only patient with the homozygous *Val* allele displayed the worst survival (11 months). As concerns the survival rates relating to UGT1A1, the homozygous wild types (UGT1A1*1) demonstrates the longest mean survival (31.6 months), as compared with 20.2 months for the homozygous UGT1A1*28 variants, which barely differed from that for the heterozygous (19.9 months). Patients with a homozygous wild-type allele survived significantly longer than the heterozygous individuals ($p=0.009$) or the homozygous UGT1A1*28 carriers ($p=0.006$). Finally, the effect on the survival of bearing both high-risk alleles (CYP1A1 *Ile/Val* + UGT1A1*28) was investigated in the tumour group. 29 of the 142 patients had both high-risk alleles. Their mean survival was 14.62 months, which was significantly less than the 26.35-month mean survival for the patients with only one high-risk allele ($p=0.001$).

IV.3. Results of investigation of the in vivo chemopreventive effect of afobazole

DMBA increased the expression of *Ha-ras* and *p53* in the liver, spleen, lung, lymph nodes and bone marrow. Coadministration of afobazole and DMBA resulted in a decrease of DMBA-induced overexpression of both *Ha-ras* and *p53*. Reduction of the DMBA-induced gene expression was most striking when afobazole was given in parallel with DMBA, the expression of both genes in all the investigated tissues was reduced. A decrease in the reduction of DMBA-induced gene expression levels was observed after 48 hours in four tissues: the liver, spleen, lung and lymph nodes. A slight

increase of the expression of both genes was also observed 72 hours after the treatment. This could be explained as a time-dependent effect of afobazole.

V. Discussion

In spite of the modern diagnostic processes and up-to-date therapy, the survival of head-and neck tumors shows a sad picture. The 5 year survival, from the definitive diagnosis is below 50% but it also can be 25% in certain types of cancers. Though the present examining methods such as physical examination, ultrasound, CT, MRI, histology lead to an early diagnosis, they can only detect the presence of manifest tumors. The absence of screening gives a further problem in cases of head and neck cancers. Thus the late recognition greatly restricts the success of therapy. Early signs of the exposure and tumor development could be detected by the molecular biological markers even before the phenotypical changes. Since oncogenes and tumor suppressor genes play a crucial role in carcinogenesis, analysis of oncogene and tumor suppressor gene expressions is an appropriate method for the early detection of carcinogen exposure. In earlier studies a significant overexpression of these oncogenes and suppressor genes was detected in white blood cells of exposed patients without any malignant disease and in patients suffering from various types of tumors, suggesting that they could be used as biomarkers of an early biological response. Our results demonstrate the expressions of detected genes (*c-myc*, *Ha-ras* and *p53*) on RNA originated from patient's peripheral white blood cells suffered from malignant head and neck cancers were significantly higher than in the healthy control group. As we know this was the first approach to monitor pharyngolaryngeal tumors using RNA expression from peripheral white blood cells as a biomarker. After the definitive treatment, in patients having no recurrence of tumor the expression of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* was decreased, but in the only one recurrent case the expression was significantly increased. The clinical manifestation of the tumour was presumably preceded by increased expressions of the investigated genes in this group too, as verified by screening investigations in other tumorous group. The described method might be useful to detect tumour recurrence without clinical signs after definitive cancer treatment.

Besides the exogenous risk, the likelihood of tumour development is influenced by endogenous and genetic factors. Although the majority of hereditary, high-penetrancy genetic factors have been identified, the low-penetrancy genetic factors remain relatively less well known. The polymorphisms of metabolizing enzymes that detoxify the environmental carcinogens belong in this low-penetrancy group. In the present study, the roles of the allelic polymorphisms of the phase I and phase II

metabolizing enzymes CYP1A1 and UGT1A1 respectively, in the risk of development of head and neck cancers and in the duration of survival were analysed. The changes in activity of these enzymes may have a significant impact on the development of head and neck tumours. This activity is greatly dependent on the allelic polymorphisms of their coding genes. The isoleucine/valine (*Ile/Val*) allelic polymorphism of the CYP1A1 gene is well known: the AHH activity of the enzyme carrying the homozygous *Val* or heterozygous genotype is higher than that of the enzyme of homozygous *Ile* genotype. This results in the quicker and more intense metabolic activation of the carcinogens. Several genetic variants of the gene of the UGT1A1 enzyme are known, of which UGT1A1*28 is of high importance: although it possesses only one-third of the activity of the wild type (UGT1A1*1) and a weaker carcinogen inactivation capacity, it plays a role in the development of numerous diseases.

We found that the rare heterozygous and the *Val* homozygous genotypes, which increase the risk of development of head and neck tumours and exhibit enhanced activity levels, were present significantly more frequently in the tumour group (30.99%), and especially in the mesopharyngeal tumour subgroup (36.50%), than in the controls (20.67%). Thus, it can be concluded that the *Ile/Val* and *Val/Val* allelic polymorphisms of CYP1A1 are risk factors for the development of head and neck tumours, as reported earlier by other authors.

The impact of the *Ile/Val* allelic polymorphism of CYP1A1 on the prognosis and survival of patients with head and neck malignancies has not been studied previously. The effect of each genotype on the duration of survival could be assessed in the present study. Not surprisingly, in accord with the different levels of enzyme activity, the longest survival period was observed for the individuals with the homozygous genotype as regards the *Ile/Ile* allele. The heterozygous genotype was associated with a significantly shorter mean survival ($p=0.018$). The results reveal that the rare, but metabolically comparatively active CYP1A1 *Ile/Val* and *Val/Val* genotypes were associated with a shorter survival in head and neck cancers.

In the second part of the study, the allelic polymorphism of the phase II UGT1A1 gene was examined. In contrast with the CYP1A1 gene, far fewer studies have been reported on the UGT1A1 gene. The allelic polymorphism of the promoter region of the UGT1A1 gene as a risk factor in head and neck malignancies, and its impact on the survival rate, were investigated by the present study. In our study, the incidence of patients with the homozygous variant genotype (UGT1A1*28), which has a decreased enzyme activity and a decreased carcinogen inactivation function, was significantly higher (24.65%) among the the tumour patients than in the control group (10.65%) ($p=0.002$). It may therefore be stated that UGT1A1*28 can act as a risk factor for the development of head and neck tumours.

Survival analysis indicated that the subjects with the homozygous wild genotype survived longest, the duration of survival of the UGT1A1*28 homozygous and heterozygous patients proving significantly shorter. This demonstrates that the UGT1A1*28 allele exerts a negative influence on the survival. For a more exact risk assessment of the effect of the UGT1A1*28 allele on the development of head and neck cancers, further investigations including more factors and larger case numbers are clearly necessary.

In the knowledge of the effects of the two high-risk alleles (CYP1A1 *Ile/Val* and UGT1A1*28) on the duration of survival, it appeared obvious to investigate their joint effect. As expected the survival of the patients carrying the two alleles together proved to be significantly shorter than those of the patients without or with only one high-risk allele. This result might suggest a possible co-operation of the two enzymes, since the survival was more strongly reduced in the case of the combined allelic polymorphism. Investigations of the connection between the CYP1A1 and the UGT1A1 genetic polymorphisms and the development of head and neck cancers on higher case numbers are necessary, but our results already suggest that use of the CYP1A1 *Ile/Val* and *Val/Val* variants and UGT1A1*28 as biomarkers can provide help in the prevention while their prognostic value can promote planning of the individual therapy. When the individual risks are known, the appearance of certain diseases may be blocked by means of primary and secondary prevention. One of the effective tools of primary prevention is the chemoprevention.

Pharmacologically active 2-mercaptobenzimidazole, the afobazole has previously shown a tendency to decrease reactive oxygen species (ROS) accumulation and induce an increase in catalase (antioxidative) activity in rats. The antimutagenic activity determined by its antioxidant properties was dependent on the dose and treatment schedule. The coincidence between the antimutagenic and anticancer effects of a chemopreventive agent is almost 90 %.

In the present study with the effect of DMBA on the expression of *Ha-ras* oncogene was in agreement with previous results and the effect of afobazole on the DMBA-induced expression of the *Ha-ras* and *p53* genes was time dependent. The most effective suppressor effect was observed 48 hour after afobazole treatment. In contrast, a slight increase of expression of the two genes was evident again 72 hours after administration indicating a decrease of the chemopreventive effect of afobazole. The chemopreventive effect also depended on the administration schedule. The most striking reduction of DMBA-induced overexpressions were seen with parallel administration of afobazole and DMBA when the overexpression of both *Ha-ras* and *p53* was reduced in all tissues.

Our findings suggest that afobazole might have an influence on the metabolic activation of DMBA, responsible for the mutagenic activity of the compound. These observations further strengthen our previous assumption, based on *in vitro* results, that afobazole has an *in vivo* chemopreventive effect.

VI. Summary of the new findings

- We demonstrated that the expression of the *Ha-ras* and *c-myc* oncogenes and the *p53* tumor suppressor gene was significantly higher in patients with head and neck cancer than in the control group. Decreased expression of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* was demonstrated in patients with no tumor recurrence after definitive treatment, whereas overexpression was found in case of recurrence. The described method might be useful to detect tumor recurrence without clinical signs after definitive cancer treatment.
- This was the first approach to the monitoring of pharyngolaryngeal tumors by using the expression of RNA from peripheral WBCs as a molecular and predictive biomarker. This could be a reliable and applicable method of the clinical practice in future.
- Our study has revealed a significant connection between the incidence of the CYP1A1 *Ile/Val*, *Val/Val* and UGT1A1*28 alleles and an increased risk of head and neck cancers.
- This was the first approach on the effects of the allelic polymorphisms of CYP1A1 *Ile/Val* and UGT1A1 on the survival of head and neck tumour patients; the survival duration was decreased significantly for subjects carrying the CYP1A1 *Ile/Val* and *Val/Val* and UGT1A1*28 allelic variants.
- The afobazole reduced the DMBA-induced overexpression of the *Ha-ras* and *p53* genes *in vivo*, which was time dependent effect. The afobazole might have an influence on the metabolic activation of DMBA, responsible for the mutagenic activity of the compound. These observations further strengthen our previous assumption, based on *in vitro* results, that afobazole has an *in vivo* chemopreventive effect.

Közlemények-Publications

A tézisek alapját képező in extenso közlemények - The thesis is based on the following publications:

1. Szanyi I., Gőbel Gy., Ablonczy R., Gerlinger I., Lujber L., Pytel J.: Rosszindulatú fej-nyaki daganatok epidemiológiai adatainak elemzése 1983-2002 között a Dél-Dunántúli Régióban. *Magyar Epidemiológia*, **4**: 197-206, 2007.

2. Szanyi I., Lujber L., Gerlinger I., Pytel J., Bauer M., Csejtej A., Szele E., Gombos K., Kiss N., Seredenin S., Yarkova M., Ember I.: In vivo effects of Afobazole (2-Mercaptobenzimidazole Derivate) on the 7,12-Dimethylbenz (α) anthracene -induced Oncogene and Supressor Gene Expression. *In Vivo*, **21**: 1059-1064, 2007. imp. f.: 1,143 cit. index: 2

3. Szanyi I., Bauer M., Pytel J., Gerlinger I., Gőbel Gy., Böröczki G., Szabadi É., Fehér K., Ember Á., Ember I., Kiss I.: Changes in expressions of oncogenes and TP53 tumour suppressor gene as biomarkers in malignant head and neck cancers. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **268**: 1041-1046, 2011. 2009-es imp.f.: 1,167

4. Szanyi I., Ráth G., Móricz P., Somogyvári K., Révész P., Gerlinger I., Orsós Zs., Ember I., Kiss I.: Effects of cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) and UGT-glucuronyltransferase 1A1 (UGT 1A1) allelic polymorphisms on the risk of development and the prognosis of head and neck tumors. *European Journal of Cancer Prevention*. Közlésre elfogadva 2011.

Egyéb közlemények – Other publications

1. Szuhai K., Méhes G., Kosztolányi Gy., Kajtár P., Szanyi I., Lendvai G., Pajor L.: Interfázis citogenetika alkalmazása a DNS tartalom változásának megítélésére gyermekkori acut lymphoid leukaemiában (ALL).

Orvosi Hetilap, **138**: 3111-3119, 1997.

2. Pajor L., Szuhai K., Méhes G., Kosztolányi G., Jáksó P., Lendvai G., Szanyi I., Kajtár P.: Combined Metaphase, Interphase Cytogenetic and Flow Cytometric Analysis of DNA Content of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia.

Cytometry, **34**: 87-94, 1998. imp. f.: 2,317 Cit.index: 15

3. Gerlinger I., Dóczy T., **Szanyi I.**, Bánhegyi Gy., Pytel J.: A craniofacialis resectio szerepe a rosszindulatú orrmelléküreg-daganatok sebészi kezelésében.
Fül-,orr-,gégegyógyászat, **49**: 152-160, 2003.
4. **Szanyi I.**, Bauer M., Nagy Gy., Pytel J.: Perilympa-fistula gyanúja miatt végzett exploratív tympanotomiák eredményei.
Fül-,orr-,gégegyógyászat, **49**: 201-206, 2003.
5. Móricz P., Solt J., Ráth G., **Szanyi I.**, Pytel J.: Hangprotézis alkalmazása total laryngectomia és partialis pharyngectomia után kialakult algarat-nyelőcső átmenet szűkülete esetén.
Fül-,orr-,gégegyógyászat, **50**: 340-344, 2004.
6. Lujber L., Gerlinger I., **Szanyi I.**, Pytel J.: Ellenőrző gasztroszkópia a beültetett tápszondán keresztül perkután endoszkópos gasztrosztóma készítésekor.
Fül-,orr-,gégegyógyászat, **50**: 327-329, 2004.
7. **Szanyi I.**, Göbel Gy., Ablonczy R., Móricz P., Pupp L., Lujber L., Pytel J.: Rosszindulatú daganatok a PTE ÁOK Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika beteganyagában 1983-2002 között.
Fül-,orr-,gégegyógyászat, **50**: 372-375, 2004.
8. Gerlinger I., Ráth G., **Szanyi I.**, Pytel J.: Myringoplasty for anterior and subtotal tympanic membrane perforations using the KTP laser.
European Archives of Oto-rhino-laryngology, **263**: 816-819, 2006. imp.f.:0,822 cit. index: 2
9. Németh Á., **Szanyi I.**, Dombi Zs., Csontos Zs., Pytel J., Göbel Gy., Bauer M., Ember Á.: Elevated Gene Expressions in Peripheral Leukocytes as a Biomarker of Pharyngolaryngeal Tumour Patients.
Central European Journal Occupational and Environmental Medicine, **11**: 16-20, 2005.
10. Gerlinger I., Bakó P., **Szanyi I.**, Móricz P., Ráth G., Lujber L., Móricz K., Pytel J.: Lézerstapedotomia - az otoscleroticus stapes fixatio korszerű megoldása.
Orvosi Hetilap, **148**: 2241-2247, 2007.
11. Gerlinger I., Bakó P., **Szanyi I.**, Móricz P., Ráth G., Lujber L., Móricz K., Pytel J.: Lézer stapedotomia Nitinol piston alkalmazásával.
Fül-,orr-,gégegyógyászat, **53**: 100-108, 2007.

12. Gombos K., Szele E., Kiss I., Varjas T., Puskás L., Kozma L., Juhász F., Kovács E., **Szanyi I.**, Ember I.: Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics Proteomics*, **4**: 403-409, 2007.
13. Gerlinger I., Kárász T., Somogyvári K., Ráth G., **Szanyi I.**, Móricz P., Boenisch M.: Extracorporeal septal reconstruction with polydioxanone (PDS) foil. *Clinical Otolaryngology*, **32**: 465-470, 2007. imp. f.: 1,477 cit. index: 3
14. Rath G., Bauer M., Pytel J., Vona I., **Szanyi I.**, Lujber L., Gerlinger I.: Ionomer cement for reconstruction of the long process of the incus: the Pecs experience. *Clinical Otolaryngology*, **33**: 116-120, 2008. imp. f.: 1,614 cit. index: 2
15. Lujber L., Gerlinger I., Fábíán Gy., **Szanyi I.**, Telegdy I., Pytel J.: A novel and inexpensive model for practising upper gastrointestinal endoscopy and percutaneous endoscopic gastrostomy techniques. *Endoscopy*, **40**: Suppl 2: E73, 2008. imp. f.: 6,091
16. Göbel Gy., Németh Á., **Szanyi I.**, Bauer M., Pytel J., Gerlinger I., Szalma J., Ember I.: Fej-nyaki daganatok molekuláris epidemiológiájának aktuális kérdései, különös tekintettel a nyálmirigy daganatokra. *Magyar Epidemiológia*, **5**: 31-40, 2008.
17. Gerlinger I., Göbel Gy., **Szanyi I.**, Tóth E., Weininger Cs.: Primary carcinoma of the frontal sinus: a case report and review of the literature. *European Archives of Oto-rhino-laryngology*, **265**: 593-597, 2008. imp. f.: 0,843 cit. index: 1
18. Gerlinger I., Tóth M., Lujber L., **Szanyi I.**, Móricz P., Somogyvári K., NémethA., RáthG., PytelJ., Mann W.: Necrosis of the long process of the incus following stapes surgery: New anatomical observations. *Laryngoscope*, **119**: 721-726, 2009. imp. f.: 2,018
19. Pfund Z., Trauninger A., **Szanyi I.**, Illes Z.: Long-lasting airplane headache in a patient with chronic rhinosinusitis. *Cephalalgia*, **30**: 493-495, 2010. imp. f.: 3,464 cit. index: 1

20. Nádasi E., Clark JS., **Szanyi I.**, Varjas T., Ember I., Baliga R., Arany I.: Epigenetic modifiers exacerbate oxidative stress in renal proximal tubule cells.

Anticancer Research, **29**: 2295-2299, 2009. imp. f.: 1,428

21. Kádár B., Gombos K., Szele E., Göbel Gy., **Szanyi I.**, Ember I.: Az Isoflurane in vivo hatástani vizsgálata.

Magyar Epidemiológia, **5**: 181-190, 2008.

22. Csejtei A., Tibold A., Koltai K., Varga Zs., **Szanyi I.**, Göbel Gy., Prantner I., Steffler D., Fehér G., De Blasio A., Ember I., Kiss I.: Association between XRCC 1 polymorphisms and head and neck cancer in Hungarian population.

Anticancer Research, **29**: 4169-4173, 2009. imp. f.: 1,428 Cit. index: 1

23. Göbel Gy., Gombos K., Szele E., Kálmán E., Budán F., Gerlinger I., Fiscina F., **Szanyi I.**, Ember Á., Németh Á., Ember I.: Retrospective analysis of malignant salivary gland tumors in Hungarian population between 1987-2006.

European Journal of Oncology, **14**: 209-215, 2009. imp. f.: 0,325

24. Szanyi I., Gerlinger I., Lujber L., Szabadi É., Burian A., Révész P., Ember I., Kiss I.: Onkogén és tumorszuppresszor génexpresszió változások biológiai markerként való alkalmazása malignus fejnyaki daganatokban.

Fül-orr-gégegyógyászat, **57**: 66-72, 2011.

Citálható absztraktok – The list of abstracts

Csontos Zs., Kiss I., **Szanyi I.**, Csejtei A., Bujdosó L., Illényi L., Kassai M., Lukács L., Ember I., Horváth Ö. P.: Génexpressziós profilváltozás colorectalis daganatokban Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.

Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp: 36

Gergely P., Kádár B., Ember Á., Nádasi E., Varjas T., Orsós Zs., **Szanyi I.**, Kiss I.: Flavin -7 állatkísérletes vizsgálata különös tekintettel kulcs, onko és szupresszorgének expressziójára Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.

Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:42

Herczeg M., Brunner Zs., **Szanyi I.**, Kiss I., Orsós Zs., Zólyomi A., Csontos Zs., Molnár K., Gergely P., Kádár B., Ember I.: Stimulin BLT fantázianevű készítmény állatkísérletes vizsgálata Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:44

Szanyi I., Németh Á., Dombi Zs., Csontos Zs., Gőbel Gy., Ember I.: Az emelkedett onkogén aktiváció, mint biomarker, vizsgálata leukocitákban faringolaringeális tumoros megbetegedésekben Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:83

K. Gombos, E. Szele, M. Herczeg, Zs. Brunner, **I. Szanyi**, K. Molnár, P. Gergely, Gy. Mucsi, Zs. Varga, I. Ember: A VitaCalen® krónikus fogyasztása során észlelt eredményeink állatkísérletes modellben IIIrd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs
Magyar Epidemiológia Supplementum, III. évfolyam 2006, pp: S41

I. Szanyi, Á. Németh, A. Csejtej, I. Prantner, E. Pázsit, L. Lujber, M. Bauer, I. Ember: Onco/suppressor gén expresszió, mint perifériás vér biomarkere sebészileg kezelt fej-nyaki daganatos esetekben IIIrd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs
Magyar Epidemiológia Supplementum, III. évfolyam 2006, pp: S77

Gőbel Gy., Németh Á., **Szanyi I.**, Bauer M., Pytel J., Gerlinger I., Szalma J., Ember I.: A fej-nyaki daganatok molekuláris epidemiológiájának aktuális kérdései különös tekintettel a nyálmirigy tumorokra NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19.
Magyar Epidemiológia Supplementum, V. évfolyam, 2008, pp:45

Szanyi I., Gőbel Gy., Ablonczy R., Gerlinger I., Lujber L., Bauer M., Pytel J.: Rosszindulatú fej-nyaki daganatok epidemiológiai adatainak elemzése 1983-2002 között a Dél-dunántúli régióban NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19.
Magyar Epidemiológia Supplementum, V. évfolyam, 2008, pp:94

F. Budán, Gy. Góbel, **I. Szanyi**, M. Bauer, G. Nowrasteh, Zs. Varga, J. Cseh, G. Horváth, I. Prantner, P. Perjési, I. Ember, Z. Gyöngyi: Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by N-Methyl-N-Nitrosourea 8th International Conference of Anticancer Research Greece, Kos 17-22 October, 2008.
Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3223: A78

B. Kádár, K. Gombos, E. Szele, Gy. Góbel, **I. Szanyi**, I. Ember: Effects of Isoflurane on NFKB1, GADD45 α JNK1 expressions in the vital organs of CBA/Ca mice 8th International Conference of Anticancer Research Greece, Kos 17-22 October, 2008.
Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3296: A231

K. Gombos, E. Szele, L. Puskás, L. Kozma, F. Juhász, Gy. Góbel, **I. Szanyi**, I. Ember: Analysis of the connections between signal transduction mechanisms in early-stage thyroid tumours 8th International Conference of Anticancer Research Greece, Kos 17-22 October, 2008.
Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3296: A232

A. Csejtej, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Varga, **I. Szanyi**, Gy. Góbel, I. Prantner, D. Steffler, I. Ember, I. Kiss: Association between XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer in Hungarian population 8th International Conference of Anticancer Research Greece, Kos 17-22 October, 2008.
Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3517: A676

Góbel Gy., Gerlinger I., Pytel J., **Szanyi I.**, Szele E., Gombos K., Ember I.: A malignus nyálmirigy daganatok retrospektív IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology Pécs, 28-29 November, 2008.
Magyar Epidemiológia Supplementum V. évfolyam, pp: S.145, 2008.

Kádár B., Gombos K., Szele E., Góbel Gy., **Szanyi I.**, Ember I.: Az Isoflurane hatása az NFKB1, JNK1 és GADD45 α gének expressziós mintázatára IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and Predictive Epidemiology Pécs, 28-29 November, 2008.
Magyar Epidemiológia Supplementum V. évfolyam, pp: S.150, 2008.

Kádár B., Gombos K., Szele E., Gőbel Gy., **Szanyi I.**, Ember I.: Az Isoflurane hatása apoptotikus jelátviteli gének expressziójára NETT XVII. Nagygyűlése Marosvásárhely, 2009. április 17-19.

Magyar Epidemiológia VI. évf. 1. szám: S53, 2009.

Gőbel Gy., Gerlinger I., Pytel J., **Szanyi I.**, Szele E., Gombos K., Ember I.: Malignus nyálmirigy daganatok epidemiológiai sajátosságai NETT XVII. Nagygyűlése Marosvásárhely, 2009. április 17-19.

Magyar Epidemiológia VI. évf. 1. szám: S44, 2009.

Ember Á., Budán F., Kiss I., Gőbel Gy., Gombos K., Kiss Zs., Horváth Ö. P., **Szanyi I.**, Horváth G., Csontos Zs., Faluhelyi Zs., Ember I.: Perifériás vér génexpresszióinak vizsgálata; egy potenciális új biomarker a rosszindulatú betegségek monitorozásában NETT XVII. Nagygyűlése Marosvásárhely, 2009. április 17-19.

Magyar Epidemiológia VI. évf. 1. szám: S35, 2009.

I. Szanyi, Zs. Orsós, P. Móricz, I. Ember, I. Kiss: Effect of UDP-glucuronyltransferase 1A1 allelic polymorphisms on the risk of development and prognosis of head and neck cancers International Conference of Preventive Medicine and Public Health Pécs, 19-20 November 2010.

Magyar Epidemiológia VII. évf. 4. szám: S58, 2010.