

Received: 2008.05.05
Accepted: 2008.08.13
Published: 2008.09.23

Uwarunkowania genetyczne nowotworów głowy i szyi*

Genetic predeterminations of head and neck cancer

Paweł Rusin¹, Łukasz Markiewicz¹, Ireneusz Majsterek^{1,2}

¹ Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytet Łódzki w Łodzi

² Zakład Chronofarmakologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Wzrastająca liczba chorych na raka powoduje konieczność poszukiwania nowych, skutecznych metod leczenia. Niezbędne do tego jest zrozumienie molekularnych podstaw transformacji nowotworowej. Obecnie stwierdza się, że nowotwory głowy i szyi (HNSCC) stanowią co najmniej 5% wszystkich zarejestrowanych w Polsce nowotworów złośliwych. Niewątpliwie podstawowe znaczenie dla etiologii nowotworów głowy i szyi mają czynniki egzogenne. Ryzyko występowania HNSCC zwiększają kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym, alkohol, wirusy o działaniu onkogennym oraz niehigieniczny tryb życia. Coraz częściej wskazuje się jednak na udział endogennych czynników zwiększających prawdopodobieństwo rozwoju HNSCC, a zwłaszcza uwarunkowań genetycznych. Do najlepiej poznanych czynników genetycznych w grupie nowotworów głowy i szyi należą mutacje genów kodujących enzymy metabolizmu ksenobiotyków (*GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1*), mutacje supresorowe (*TP53*, *RB1*, *BRCA1*, *ATM*), polimorfizmy genów naprawy DNA (*OGG1*, *XRCC1*, *XPD*, *RAD51*) oraz polimorfizmy i mutacje mitochondrialnego DNA. Należy zwrócić uwagę, iż ryzyko wystąpienia nowotworu głowy i szyi w umiarkowanym stopniu modulowane jest przez pojedyncze geny, mogą one jednak zasadniczo wpływać na efektywność leczenia. Stwierdza się natomiast, że koincydencja wystąpienia pewnych wariantów genowych w istotny sposób podnosi ryzyko rozwoju tej grupy nowotworów złośliwych u ludzi.

Słowa kluczowe:

nowotwory głowy i szyi • podatność genetyczna • uszkodzenia i naprawa DNA

Summary

The growing number of human cancers is the main reason for the search for new effective treatment strategies. The molecular basis for cancer transformation has to be elucidated in order to improve cancer treatment. It is stated that HNSCCs make up at least 5% of all registered malignant tumors in Poland. Exogenous factors influence HNSCC etiology. The prevalence of HNSCC is increased by several carcinogens, including tobacco smoke, life style, and others, such as oncogenic viral infections. It is more often emphasized that endogenous agents can also increase the risk of HNSCC development, especially genetic factors. The most recently characterized genetic factors for head and neck cancer are mutations in xenobiotic metabolism enzyme genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*), suppressors mutations (*TP53*, *RB1*, *BRCA1*, *ATM*), polymorphisms of DNA repair genes (*OGG1*, *XRCC1*, *XPD*, *RAD51*), and mutations in mitochondrial DNA. It has been observed that single-gene polymorphisms could affect treatment, whereas the coincidence of other gene mutations may increase the risk of human head and neck cancer development.

Key words:

head and neck cancer • genetic susceptibility • DNA damage and repair

* Praca finansowana z grantu N301 099 32/3581 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=869368>

Word count: 4728

Tables: 1

Figures: 3

References: 78

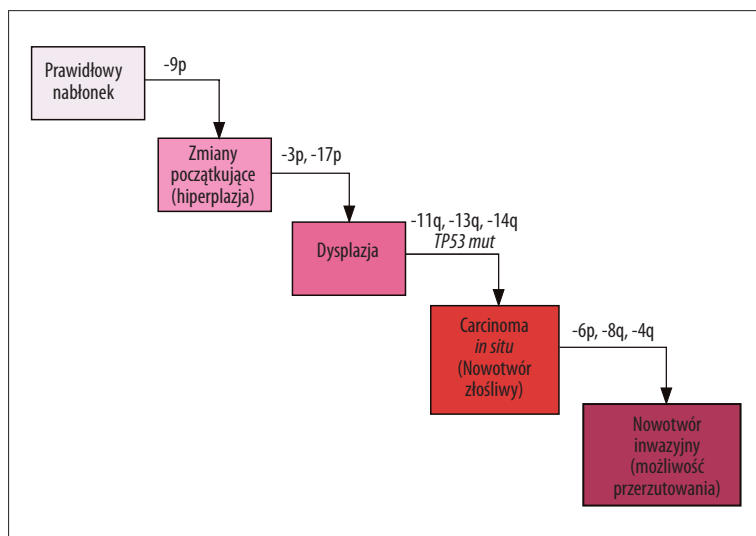
Adres autora: dr hab. prof. nadzw. Ireneusz Majsterek, Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: imajst@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **AIS** – zespół niewrażliwości na androgeny (androgen insensitivity syndrome); **ATM** – gen zespołu ataksja teleangiektazja (ataxia teleangiectasia mutated); **APC** – gen zespołu rodzinnej polipowatości jelita grubego (adenomatous polyposis coli); **BER** – naprawa przez wycinanie zasad (base excision repair); **BRCA1** – gen dziedzicznego raka sutka 1 (breast cancer 1); **BRCA2** – gen dziedzicznego raka sutka 2 (breast cancer 2); **CTH** – chemioterapia (chemotherapy); **EBV** – wirus Epsteina-Barr (Epstein-Barr virus); **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor); **GSTM1** – transferaza S-glutationowa M1 (glutathione S-transferase M1); **GSTP1** – transferaza S-glutationowa pi (glutathione S-transferase pi); **GSTT1** – transferaza S-glutationowa theta 1 (glutathione S-transferase theta 1); **HER2/neu** – ludzki receptor naskórkowego czynnika wzrostu 2 (human epidermal growth factor receptor 2); **HNSCC** – raki płaskonabłonkowe głowy i szyi (head and neck squamous cell carcinomas); **OGG1** – gen ludzkiej glikozydazy 8-oksoguaniny (human 8-oksoguanine glycosylase); **HPV** – ludzki wirus brodawczaka (human papilloma virus); **HR** – naprawa przez rekombinację homologiczną (homologous recombination repair); **IMRT** – radioterapia z modulacją intensywności dawki (intensity modulated radiotherapy); **LMDS** – miejsca wielokrotnych uszkodzeń DNA (locally multiply damaged sites); **MMR** – naprawa błędnie sparowanych zasad (mismatch repair); **MRP** – białka związane z opornością wielolekową (multidrug resistance-related protein); **NADH** – zredukowana postać dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen); **ND4** – gen podjednostki 4 dehydrogenazy NADH (dehydrogenase subunit 4); **NER** – naprawa przez wycinaie nukleotydów (nucleotide excision repair); **NHEJ** – naprawa przez niehomologiczne łączenie końców (non-homologous end-joining); **NPC** – rak nosowej części gardła (nasopharyngeal cancer); **ORF** – otwarta ramka odczytu (open reading frame); **PR** – złożony program leczenia nowotworów z udziałem cisplatyny i fluorouracylu; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **RB1** – gen supresorowy (retinoblastoma 1); **RTH** – radioterapia (radiotherapy); **UGT1A7** – transferaza urydylo-bisfosforoglukuronowa rodziny 1, peptyd A7 (UDP-glycosyltransferase 1 family, polypeptide A7); **UGT1A10** – transferaza urydylo-bisfosforoglukuronowa rodziny 1, peptyd A10 (UDP-glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10); **XMEs** – enzymy biorące udział w metabolizmie ksenobiotyków (xenobiotic-metabolizing enzymes); **XPD/ERCC2** – helikaza DNA (skóra pergaminowa, Xeroderma pigmentosum D/excision repair cross-complementing); **XRCC1** – czynnik dodatkowy ligazy DNA (X-ray repair cross complementing group 1).

1. WSTĘP

Raki płaskonabłonkowe głowy i szyi (head and neck squamous cell carcinoma - HNSCC) to nowotwory złośliwe wywodzące się z nabłonka płaskiego w obrębie głowy i szyi. Stanowią prawie 90% wszystkich raków głowy i szyi (pozostałe 10% to: raki gruczołowe, limfatyczne, przejściowe oraz raki ślinianek). W Polsce dotyczą one przede wszystkim krtani, stosunkowo często także języka i migdałków, rzadziej innych okolic jamy ustnej: gardła, nosa oraz zatok przynosowych. Przedstawione dane są specyficzne dla Polski, a różnią się znacznie od wskaźników skandynawskich czy też azjatyckich. Nowotwory nabłonkowe regionu głowy i szyi stanowią około 5% wszystkich zarejestrowanych w Polsce nowotworów złośliwych, w tym około 8% wśród mężczyzn i około 2% wśród kobiet, we-

dług Zakładu Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie (dane zebrane na podstawie rejestracji nowotworów złośliwych w Polsce przez placówki lecznicze, a także na podstawie kart zgonów). Raki narządów głowy i szyi najczęściej występują u osób po 45 roku życia. Wyjątek stanowi rak nosowej części gardła, charakteryzujący się występowaniem w dwóch szczytach zachorowalności – między 15 i 35 r.ż. oraz powyżej 50 r.ż. Zachorowalność na raka narządów głowy i szyi jest prawie pięciokrotnie wyższa wśród mężczyzn niż wśród kobiet. Dane statystyczne wskazują, że HNSCC stanowią 5% ogółu złośliwych nowotworów w krajach rozwiniętych oraz aż do 50% w krajach rozwijających się, stając się tym samym szóstą pod względem częstości występowania grupą nowotworów. Szacuje się, że rocznie na świecie 500 tys. osób zapada na tę choro-



Ryc. 1. Model dynamiki uszkodzeń chromosomów w przebiegu nowotworów głowy i szyi [8]. Według tej hipotezy następuje utrata *loci* chromosomowych, która odpowiada progresji zmian histologicznych zachodzących w komórce. Mutację genu *TP53* oznaczono – *TP53 mut*, p – ramię krótkie chromosomu, q – ramię długie chromosomu, a znaki minus przy numerach chromosomów oznaczają delecję fragmentów chromosomów

bę [22]. W Stanach Zjednoczonych w 2004 r. odnotowano 38500 przypadków HNSCC, które stanowiły 3% wszystkich zarejestrowanych nowotworów złośliwych [32]. Regiony wysokiego ryzyka występowania raka krtani to: południowa Europa (Francja, Włochy, Hiszpania), południowa Ameryka (Urugwaj, Argentyna), zachodnia Azja (Turcja, Irak) w której raki krtani stanowią 4,7% wszystkich nowotworów złośliwych u mężczyzn. Rak nosowej części gardła (nasopharyngeal cancer – NPC) jest stosunkowo rzadki ale wykazuje bardzo charakterystyczne rozmieszczenie geograficzne. Na NPC rocznie zapada 80000 ludzi, co stanowi 0,7% wszystkich nowotworów złośliwych. Charakterystyczne jest znacznie częstsze występowanie tego rodzaju nowotworów w populacjach wywodzących się z południowych Chin, jak również podwyższona częstość w południowej Azji, północnych Indiach oraz północnej Afryce [49].

Raki głowy i szyi są nowotworami o udowodnionym podłożu egzogennym - czynnikami zewnętrznymi prowadzącymi do ich rozwoju są przede wszystkim kancerogeny obecne w dymie tytoniowym oraz wirusy onkogenne, takie jak: HPV (human papilloma virus) i EBV (Epstein-Barr virus) [15]. Wpływ kokancerogenów, takich jak wysokoprocentowe napoje alkoholowe, polega na pogłębianiu działania związków kancerogennych przez działanie fizjologiczne i fizykochemiczne. Jako jedną z przyczyn powstawania NPC uważa się również spożywanie dużej ilości solonej i konserwowanej żywności oraz sfermentowanych produktów dietetycznych [49]. Druga potencjalna grupa czynników leżących u podłoża HNSCC - czynniki endogenne – jest znacznie słabiej poznana, choć obecnie nie ma wątpliwości, że odgrywają one również istotną rolę. Mimo iż nowotwory te zawsze wyraźnie wiązano z czynnikami egzogennymi, zwrócono jednak uwagę, że tylko u części osób intensywnie palących papierosy i nadużywających wysokoprocentowych napojów alkoholowych rozwijają się HNSCC, ale występują one niekiedy także u osób o niewielkiej ekspozycji na kancerogeny [65]. Wśród czynników endogennych na pierwszym miejscu wymienia się uwarunkowania genetyczne, ale także bierze się pod uwagę upośledzenie funkcji układu odpornościowego oraz czynniki hormonalne [53].

2. CHARAKTERYSTYKA NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI

Typowym stanem przedrakowym błon śluzowych narządów głowy i szyi, przede wszystkim jamy ustnej, jest rogowacenie białe (leukoplakia – określenie makroskopowe białej, nieregularnej zmiany o rozmaitej powierzchni, która nie niesie ze sobą informacji czy jest to zmiana nowotworowa), w krtani uznawana za stan przedrakowy jest tzw. pachydermia – określająca zgrubienie skóry spowodowane przerostem tkanki łącznej połączone z rozrostem naskórka.

Nowotwory głowy i szyi mimo różnego przebiegu klinicznego mają wiele wspólnych cech. Ze względu na umiejscowienie prowadzą do różnego stopnia dysfunkcji dotyczących podstawowych czynności życiowych, takich jak oddychanie, odżywianie i mowa. Zachorowanie na HNSCC jest czynnikiem wystąpienia drugiego nowotworu w obrębie dróg oddechowych. U około 20% chorych dochodzi do jednoczesnego (synchronicznego) albo następowego (metachronicznego) rozwoju innego nowotworu, co pogarsza szanse przeżycia. Umiejscowienie nowotworu jest związane z jego budową mikroskopową. Raki o wysokim stopniu zróżnicowania rozwijają się zwykle w obrębie wargi, jamy ustnej, twardego i miękkiego podniebienia, nasady języka i krtani (stopień G1). Raki o pośrednim stopniu zróżnicowania (stopień G2) występują najczęściej w zatokach przynosowych i dnie jamy ustnej. Raki nisko zróżnicowane i niezróżnicowane (stopień G3) dominują w nosowej części gardła i jamie nosowej [31].

Naturalny przebieg choroby i podatność na zastosowane leczenie są związane ze stopniem zróżnicowania nowotworu. Raki wysoko i średnio zróżnicowane najczęściej naciekają miejscowo i dają przerzuty do anatomicznie najbliższych dla ogniska pierwotnego węzłów chłonnych, przerzuty odległe są rzadkie i nie przekraczają 20%. Odmienna korelacja dotyczy raków o niskim stopniu zróżnicowania charakteryzujących się dużą dynamiką wzrostu oraz wysokim, wynoszącym ponad 40%, odsetkiem przerzutów odległych (najczęściej do płuc). Cechują się wysoką promieniowością i chemiowrażliwością, nie jest to niestety jednoznacznie z promienio- lub chemiowyleczalnością [63,73].

3. DIAGNOSTYKA I ZASADY LECZENIA

Ocena stopnia zaawansowania nowotworu pozwala wybrać najlepszy schemat leczenia i w wiarygodny sposób określić jego wyniki. Podstawą rozpoznania jest biopsja wycinkowa pobrana z ogniska pierwotnego nowotworu. Na podstawie wyników przedstawionych badań określa się zaawansowanie kliniczne choroby nowotworowej zgodnie z klasyfikacją TNM, gdzie T (tumor – guz) określa zasięg guza pierwotnego, N (nodus – węzeł) stan regionalnych węzłów chłonnych, M (metastasis – przerzut) obecność lub brak cech rozsiewu. Określenie cech TNM umożliwia zakwalifikowanie danego nowotworu do konkretnego stopnia zaawansowania klinicznego, a głównym celem tej klasyfikacji jest określenie rokowania oraz planowania leczenia. Wybór optymalnej metody leczenia w przypadku nowotworów głowy i szyi jest uzależniony od stanu sprawności chorego, stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu, jego umiejscowienia i utkania histopatologicznego. Podstawowe metody leczenia onkologicznego to: chirurgia, radioterapia i chemioterapia, stosowane samodzielnie lub w skojarzeniu, w różnych sekwencjach czasowych.

Chirurgia jako samodzielna metoda leczenia znajduje zastosowanie w rakach o niskim stopniu zaawansowania (T1-2, N0) i wysokim lub średnim stopniu złośliwości histologicznej (G1-2). Zakres zabiegów chirurgicznych dotyczących ogniska pierwotnego, jak i układu chłonnego jest różnorodny i zawsze powinien być dostosowany do indywidualnego stanu chorego [63,73].

3.1. Radioterapia

Radioterapia (radiotherapy – RTH) to metoda bazująca na działaniu promieniowania jonizującego, wykorzystująca różnicę między promienioczułością nowotworu i otaczających go tkanek zdrowych. Reakcja bezpośrednia komórki nowotworowej na działanie radioterapii następuje, gdy napromieniowaniu zostaje poddany materiał genetyczny komórek – kwant promieniowania trafia bezpośrednio w nić DNA i uszkadza ją. Reakcja pośrednia zachodzi w chwili, gdy w komórkach nowotworowych dochodzi do radiolizy wody, w wyniku czego powstają wolne rodniki - cząsteczki o dużej energii, uszkadzające elementy ważne dla życia komórki. Samodzielna radioterapia jest leczeniem z wyboru we wczesnych stopniach zaawansowania raka gardła i krtani. Ponad 70% HNSCC charakteryzuje się niską lub średnią promienioczułością, która wymusza stosowanie odpowiednio wysokich dawek promieniowania. Standardowo procedurę radioterapii realizuje się za pomocą frakcjonowania konwencjonalnego (jedna dawka frakcyjna 1,8–2,0 Gy dziennie przez 5 dni w tygodniu; dawka całkowita 70–72 Gy). Jednak w ciągu ostatnich kilkunastu lat techniki radykalnej radioterapii chorych na raka narządów głowy i szyi uległy zasadniczym zmianom. Technika konformalna, oparta na trójwymiarowym planowaniu i realizacji leczenia, stosowana jest w większości przypadków. Umożliwia to bezpieczne podanie wysokiej, jednorodnej dawki w objętości napromienianej, z maksymalną ochroną tkanek prawidłowych. Napromienianie z modulacją intensywności dawki (intensity modulated radiotherapy – IMRT) jest najbardziej zaawansowaną postacią konformalnej radioterapii. Uzupełniającą radioterapię stosuje się rutynowo w warunkach frakcjonowania konwencjonalne-

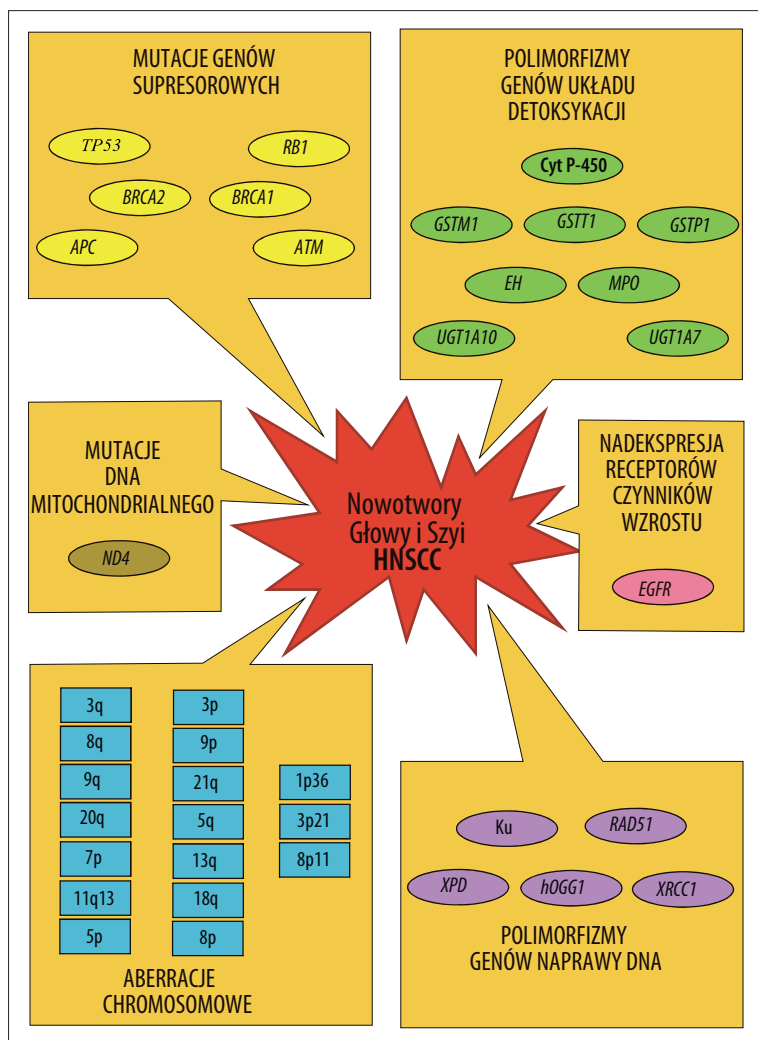
go, a rekomendowana dawka całkowita wynosi 55–60 Gy, z możliwością jej podwyższenia do 66–70 Gy na obszar szczególnie dużego ryzyka nawrotu [31]. Często stosuje się kojarzenie radioterapii z chemioterapią. Wyniki licznych badań klinicznych poświęconych chemioradioterapii wykazały ponad 10% wzrost skuteczności (wyleczalności) miejscowej, a także przeżyć całkowitych w porównaniu z chorymi wyłącznie napromienianymi [67].

3.2. Chemioterapia

Chemioterapia (chemotherapy – CTH) to jedna z podstawowych metod stosowana w leczeniu chorób nowotworowych, w tym HNSCC, wykorzystująca leki cytostaticzne działające na wszystkie żywe komórki: nowotworowe i prawidłowe, proporcjonalnie do szybkości ich wzrostu i dzielenia się. Większość nowotworów wzrasta wolniej niż komórki prawidłowe, dlatego chemioterapia wiąże się z ryzykiem uszkodzenia komórek prawidłowych. Tylko w przypadku ostrych białaczek i niektórych nowotworów układu chłonnego efekt terapii jest najszybszy, gdyż dynamika wzrostu tych komórek jest wyższa w porównaniu z najszybciej dzielącymi się komórkami zdrowego organizmu: układu krwiotwórczego i nabłonka przewodu pokarmowego. Mechanizm działania leków przeciwnowotworowych jest bardzo różnorodny: zakłócanie transkrypcji i replikacji kwasów nukleinowych, działające zaburzające syntezę białek oraz struktury błon komórkowych. Często używa się łącznie kilku leków (tzw. terapia wielolekowa), ponieważ istnieje większe prawdopodobieństwo, że nowotwór nie zdoła się obronić przed kilkoma czynnikami o różnym mechanizmie działania. Podstawowymi zasadami doboru cytostatyków w terapii wielolekowej jest aktywność poszczególnych leków w monoterapii, różne mechanizmy działania (addytywne/synergistyczne) oraz odmienne profile toksyczności (maksymalne dawki) i różna wrażliwość na ich działanie (cytostatyki niewywołujące oporności krzyżowej) [38]. Najczęściej stosowanym schematem wielolekowym w leczeniu nowotworów głowy i szyi jest program PF złożony z cisplatyny i fluorouracylu (synergistyczne działanie obu leków), który pozwala na osiągnięcie zmiennie wyższego odsetka odpowiedzi w porównaniu z cisplatyną lub fluorouracylem w monoterapii. W większości badań klinicznych nie stwierdzono jednak wydłużenia czasu przeżycia pod wpływem chemioterapii z zastosowaniem programu PF [34]. Chemioterapia jako samodzielna metoda leczenia cechuje się małą skutecznością, gdyż opiera się na niewybiórczym działaniu cytostaticznym lub antyproliferacyjnym w stosunku do komórek nowotworowych. Chemioterapii towarzyszy wiele objawów niepożądanych o różnym stopniu nasilenia, mogących utrudnić lub wręcz uniemożliwić dalsze leczenie, co pogarsza jego wyniki.

3.3. Terapia skojarzona

Niezadowolające wyniki radioterapii oraz mała skuteczność chemioterapii spowodowały kojarzenie obu tych metod w leczeniu nowotworów głowy i szyi. Początkowo stosowano chemioterapię indukcyjną, której celem było zmniejszenie masy guza i ułatwienie następnej radioterapii przez ograniczenie objętości tkanek napromienianych oraz zniszczenie ognisk mikroprzerzutów. Wprowadzenie chemioterapii indukcyjnej poprawiło komfort leczenia chorych, nie



Ryc. 2. Czynniki genetyczne zaangażowane w etiologii nowotworów głowy i szyi. Geny podzielono ze względu na funkcje ich produktów białkowych, uwzględniono również regiony chromosomów najczęściej ulegające aberracjom

zwiększyło odsetka późnych powikłań, ale też nie poprawiło wyników. Kierunek dalszych prób wytyczyła koncepcja tzw. współpracy przestrzennej promieniowania jonizującego i cytostatyków (głównie cisplatyny) na poziomie komórkowym, stosowanych w różnym czasie. Ich działanie powoduje uszkodzenia struktury DNA, a także utrudnia naprawę „szkod” popromiennych. Rutynowo radioterapia jest kojarzona z podawaniem cisplatyny w dawce 100 mg/m² w dniach napromieniania 1, 22, 43 lub w dawce 40 mg/m² podawanej co tydzień. [31]. Wyniki licznych badań klinicznych i metaanaliz poświęconych chemioradioterapii wykazały ponad 10% wzrost wyleczalności miejscowej, jak również przeżyć całkowitych w porównaniu z chorymi wyłącznie napromienianymi. Wartość korzyści terapeutycznych chemioradioterapii obniża jednak wysoki odsetek powikłań związanych z toksycznością leczenia [19,25,51].

W przypadku chorych, u których stwierdzono nawroty miejscowe, istotną rolę odgrywa czas, jaki upłynął od pierwotnego leczenia. Powtórna radioterapia jest możliwa jedynie w nielicznych przypadkach, w których objętość napromieniana może być ograniczona i umiejscowiona poza narządami krytycznymi. Przerzuty odległe natomiast, tylko w nielicznych przypadkach, mogą być leczone chirurgicznie

lub napromienianiem. Z tego powodu u większości chorych jedynym leczeniem przyczynowym jest chemioterapia, a u chorych na nawrotowe lub rozsiane raki narządów głowy i szyi stosowana jest, by uzyskać poprawę jakości życia, a także wydłużyć czas przeżycia [64]. Skuteczność leczenia środkami cytostатыcznymi jest jednak różna. Istnieją nowotwory, w których chemioterapia stosowana samodzielnie lub w skojarzeniu z innymi metodami przynosi wyraźną poprawę, np. rak sutki, rak jajnika, ostra białaczka limfatyczna i nielimfatyczna. W innych przypadkach, takich jak rak endometrium, gruczołu krokowego, przełyku, a przede wszystkim w nowotworach nosogardła, głowy i szyi chemioterapia nie prowadzi do wyleczenia, tylko do wydłużenia i poprawienia jakości życia [24].

4. CZYNNIKI GENETYCZNE NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI

Różnice aktywności genów związanych z metabolizmem wpływają na jakość ekspozycji komórki na kancerogeny (aktywacja i detoksykacja kancerogenów), natomiast różnice aktywności genów naprawy DNA (tzw. genów mutatorowych) warunkują sprawność usuwania uszkodzeń materiału genetycznego powstałych w wyniku działania kancerogenów. Zaburzenia w procesach naprawy uszkodzeń



DNA mogą powodować nieodwracalne zmiany w genomie, inicjując proces nowotworzenia. Dotychczas w grupie nowotworów głowy i szyi badaniami poddano kilka genów odpowiedzialnych za różne mechanizmy naprawy: błędnie sparowanych zasad (mismatch repair – MMR), naprawa przez wycięcie nukleotydu (nucleotide excision repair – NER), naprawa przez wycięcie zasady (base excision repair – BER) oraz naprawa przez rekombinację homologiczną (homologous recombination repair - HR) [61].

Ponadto, często występującymi zaburzeniami genetycznymi w komórkach raka głowy i szyi są mutacje genów supresorowych (np. genu *TP53*), sekwencje mikrosatelitarne (mutacje genów mismatch repair odpowiedzialnych za naprawę DNA), nadekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor – EGFR) oraz aktywacji protoonkogenów zaangażowanych w proces transformacji nowotworowej, takich jak *c-fos*, *c-jun* czy *HER2/neu* (human epidermal growth factor receptor 2) [15]. Markerem diagnostycznym związanym z predyspozycją do rozwoju raka płaskonabłonkowego mogą być również aberracje lub uszkodzenia chromosomów. Wyniki badań molekularnych wskazują, iż uwarunkowania genetyczne w tej grupie nowotworów mogą mieć istotny wpływ na prognozowanie i skuteczność leczenia pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym rozpoznawanym w obrębie głowy i szyi.

4.1. Mutacje supresorowe

Geny supresorowe nowotworów, to geny działające hamująco na procesy proliferacji komórkowej (geny bramkowe), bądź stabilizująco na procesy utrzymujące stabilność genetyczną komórki (geny opiekuńcze). Rola genów supresorowych w procesie karcynogenezy ujawnia się dopiero po inaktywacji obu alleli danego antyonkogeny. Do genów supresorowych zalicza się *TP53* (tumor protein 53), *RBI* (retinoblastoma 1), *BRCA1* (breast cancer 1), *BRCA2* (breast cancer 2), *APC* (adenomatous polyposis coli), *ATM* (ataxia teleangiectasia mutated) i wiele innych.

Gen supresorowy *TP53*, jak wykazano odgrywa istotną rolę w przebiegu nowotworów głowy i szyi, jego mutacje w nowotworach HNSCC są częstsze niż w innych chorobach nowotworowych. Mutacja genu *TP53* jest jedną z najczęściej rozpoznawanych zmian genetycznych w komórkach raka krtani [28]. Część mutacji powoduje powstawanie białka TP53 niestabilnego lub niefunkcjonalnego, niezdolnego do hamowania proliferacji podjętej przez komórkę [47]. Stwierdzono, że występowanie mutacji punktowych tego genu jest szczególnie częste [44]. W przebiegu raka głowy i szyi obserwuje się akumulację niefunkcjonalnego białka TP53 [59]. Natomiast nadekspresja genu *TP53* w niezmięnionej błonie śluzowej otaczającej nowotwory głowy i szyi wskazuje na zwiększone prawdopodobieństwo powstania drugiego pierwotnego nowotworu, niezależnie od tego czy powstaje białko funkcjonalne, czy uszkodzone [28].

Mimo że nowotwory głowy i szyi mają bezsprzeczne uwarunkowanie środowiskowe, rozwój tej grupy chorób stwierdza się u ludzi w niewielkim stopniu narażonych na kancerogeny. Zatem istnieje dodatkowy czynnik decydujący o wystąpieniu choroby. Wskazuje się czyn-

nik genetyczny, chociaż obserwacje kliniczne rzadko mówią o rodzinnym występowaniu nowotworów głowy i szyi. Zaobserwowano natomiast częste występowanie innych nowotworów w pierwszym stopniu pokrewieństwa. Identyfikacja czynnika genetycznego występowania danej cechy patogennej w odniesieniu do chorób nowotworowych zmierza w dwóch kierunkach. Poszukuje się zarówno genów tzw. wysokiej penetracji, których ekspresja prowadzi do rozwoju określonej choroby, jak i tzw. genów niskiej penetracji, które warunkują takie zakłócenia metabolizmu, że czynnik patogenny może doprowadzić do inicjacji nowotworzenia w poszczególnych narządach [13]. Liczba poznanych genów wysokiej penetracji jest niewielka, a najbardziej znanymi są geny supresorowe nowotworów: gen *BRCA1* (rak piersi) [43], gen *APC* (niektóre postaci raków jelita grubego) [37], gen *ATM* (nowotwory towarzyszące chorobie ataksja-teleangiectasia) [11] oraz *TP53*, który jest najważniejszym w tworzeniu nowotworów głowy i szyi. Należy jednak pamiętać, iż proces transformacji od inicjacji do progresji nowotworu, jest wieloetapowy i niezwykle złożony. Zatem poszukiwanie zróżnicowania genetycznego na poziomie genów odpowiedzialnych za metabolizm kancerogenów chemicznych i usuwanie uszkodzeń DNA, czyli genów niskiej penetracji jest niezbędne do pełnego wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw rozwoju nowotworów głowy szyi [75].

4.2. Nieprawidłowości genów układu detoksyfikacji

Geny kodujące enzymy biorące udział w metabolizmie xenobiotyków (xenobiotic-metabolizing enzymes – XMEs) są zaangażowane w procesy aktywacji i detoksyfikacji środowiskowych karcynogenów. Większość chemicznych karcynogenów wymaga aktywacji metabolicznej przez enzymy fazy I (cytochrom P-450), oraz następnie detoksyfikację przez enzymy fazy II (np. hydrolazy epoksydowe, transferazy glutationowe, N-acetylotransferazy i sulfotransferazy) [78].

Grupa enzymów GST (glutathione S-transferase) jest wielogenową rodziną białek katalizujących reakcję między zredukowanym glutationem, a toksycznymi dla komórki związkami. Enzymy klas μ , takie jak GSTM1 (glutathione S-transferase M1) i τ , takie jak GSTT1 (glutathione S-transferase theta 1) zaangażowane w detoksyfikację policyklicznych węglowodorów aromatycznych (np. epoksydy i hydroksylowane metabolity benzo a-pirenu) obecnych w dymie tytoniowym, są najważniejsze w powstawaniu raków dróg oddechowych. Polimorfizmy genu *GST* mogą być związane z całkowitą (*GSTM1* i *GSTT1*) lub częściową utratą aktywności enzymatycznej kodowanego białka GSTP1 (glutathione S-transferase pi). Rola mechanizmów detoksyfikacji w procesie karcynogenezy pozwala wysunąć hipotezę, iż różnice osobnicze w genach *GST* predysponują do wystąpienia raka w narządach głowy i szyi. Polimorfizm w genach *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* u ludzi jest związany z brakiem lub ograniczeniem aktywności enzymatycznej względem wielu substratów występujących w dymie tytoniowym [27]. Gen *GSTM1* został zmapowany na chromosomie 1p13.3 w trzech wariantach polimorficznych: substytucja C/G w pozycji 534 (*GSTM1a* i *GSTM1b*), postać nieaktywnego genu (null polymorphism) oraz całkowita delecja sekwencji genu. Najczęściej spotykanym wariantem *GSTM1* jest polimorfizm „null”, z czę-

stością 45–50% w różnych populacjach. Gen *GSTT1* został natomiast zmapowany na chromosomie 22q11.2. Możliwa jest heterozygotyczna delekcja jednego allelu *GSTT1-1* lub homozygotyczna delekcja obu alleli z pary - *GSTT1-0* [9]. Homozygotyczną delekcję genów *GSTM1* lub *GSTT* powiązano ze zwiększonym prawdopodobieństwem występowania raka płuc u rasy kaukaskiej, a delekcja genu *GSTT1* z ryzykiem rozwoju płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [4,26]. Natomiast w przypadku genu *GSTP1* jego polimorficzne warianty są raczej związane z rzadszym występowaniem nowotworów [60].

Innymi genami kodującymi białka podstawowe dla biotransformacji ksenobiotyków, które wiąże się z występowaniem nowotworów głowy i szyi są: *EH* – hydroksylaza epoksydowa [68,72], mieloperoksydaza (myeloperoksydaza – MPO) [10] oraz geny *UGT1A7* i *UGT1A10* [16,78].

4.3. Polimorfizmy genów mutatorowych naprawy DNA

Czynniki genotoksycznie aktywne mogą oddziaływać z DNA wywołując jego modyfikacje, które mogą prowadzić do mutacji oraz niestabilności genomowej. Dlatego ważną rolę pełnią prawidłowo działające systemy naprawy DNA niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Stwierdzono związek między zaburzeniami w genach mutatorowych naprawy DNA, a ryzykiem zachorowalności na nowotwory w przypadku raka jajnika, żołądka, endometrium, raka piersi, a także z rozwojem nowotworów głowy i szyi [46,50]. Dotychczas stwierdzono, że zaburzenia w systemach naprawy DNA, zwłaszcza systemu MMR mają wpływ na podatność na zachorowanie na nowotwory głowy i szyi w przypadku osób palących tytoń i pijących alkohol [71]. Odkrycie to ma tym bardziej istotne znaczenie kliniczne, gdyż zaburzenia w systemie naprawy MMR mogą wpływać na obniżenie wrażliwości komórek na związki genotoksycznie aktywne stosowane w leczeniu chorób nowotworowych [40]. Istnieją również doniesienia, które w bezpośredni sposób wskazują na związek polimorfizmów genów naprawy z predyspozycją do rozwoju raka płaskonabłonkowego. Na tej podstawie stwierdzono, że w przypadku genu *XRCC1* (X-ray repair cross complementing group 1) obecność allelu 399Gln obniża efektywność naprawy systemu BER oraz zwiększa ryzyko wystąpienia raka głowy i szyi u osób palących tytoń i pijących alkohol [29]. Ponadto u osób tych wykazano obniżoną efektywność naprawy oh8Gua (7,8-dihydro-8-oksyguanina) związaną z obecnością polimorficznego wariantu Cys326 genu glikozylazy *hOGG1* (human 8-oksyguanine glycosylase) [12]. Również w przypadku genu *XPD* (*xeroderma pigmentosum D*), biorącego udział w systemie naprawy NER stwierdzono, że polimorfizm Lys751Gln genu *XPD* ma istotny wpływ na podatność na wystąpienie nowotworów głowy [62].

4.4. Rekombinacja homologiczna

Pęknięcia dwuniciowe DNA są uszkodzeniami, które w sposób bezpośredni mogą prowadzić do transformacji nowotworowej przez inaktywację genów kodujących supresory nowotworów (np. w wyniku delekcji) i/lub aktywację onkogenów (np. w wyniku translokacji). Ponadto wskazuje się na pęknięcia dwuniciowe jako potencjalnie „letalne” uszkodzenia DNA, które jeśli nie zostaną naprawione przed

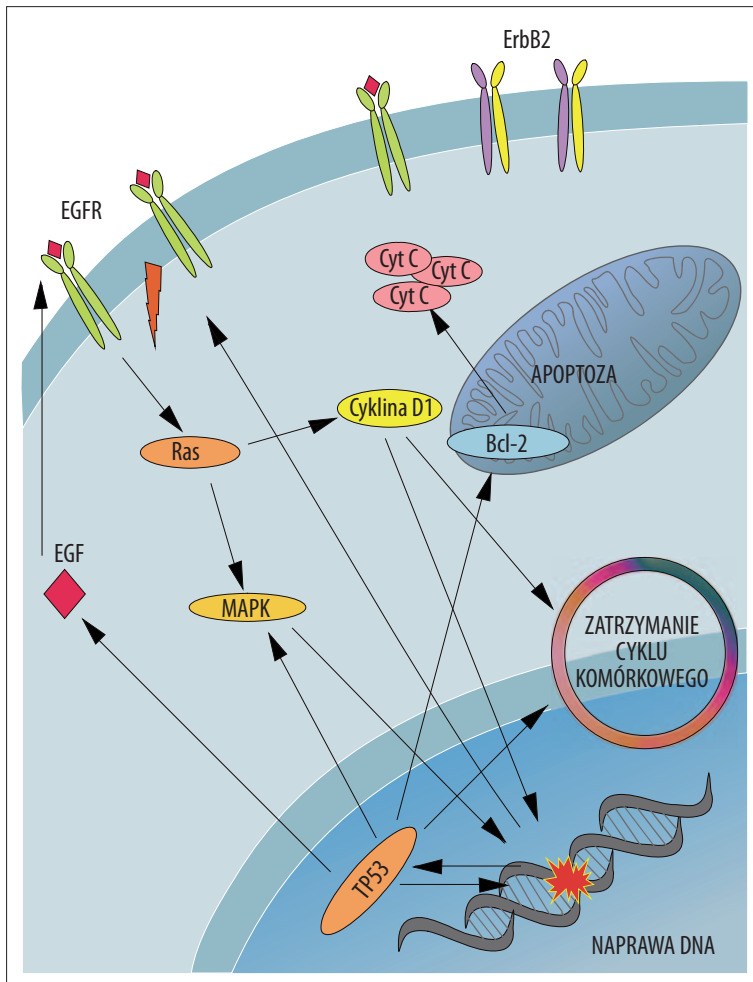
kolejnym cyklem podziału komórki, w bezpośredni sposób mogą prowadzić do jej śmierci [33]. Dlatego czynniki genotoksycznie aktywne, które generują dwuniciowe pęknięcia DNA, takie jak promieniowanie gamma, są szczególnie użyteczne w terapii komórek nowotworowych. W komórkach ssaków, zależnie od swoistości czynnika uszkadzającego, dominuje naprawa przez niehomologiczne łączenie końców NHEJ (non-homologous end-joining) nad naprawą homologiczną HR swoistą jedynie dla fazy S oraz późnej G2 cyklu komórkowego. HR polega na odtworzeniu pierwotnej struktury chromosomu z udziałem jego nieuszkodzonego homologu, a główną rolę pełni białko RAD51 (eukariotyczny homolog genu *recA*) [70]. Biorąc pod uwagę skorelowane działanie cytostatyków, takich jak cisplatyna i promieniowanie gamma, stosowane jako terapia skojarzona w zaawansowanych stadiach raka głowy i szyi, należy wspomnieć, że białko RAD51 oprócz udziału w naprawie homologicznej bierze udział w naprawie DNA, na tzw. drodze RAD-Plat (zsynchronizowane działanie promieniowania gamma oraz cisplatyny). Badania dowodzą, że RAD-Plat indukuje pęknięcia jedno- i dwuniciowe blisko adduktów cisplatyny, w wyniku czego można sądzić, że RAD-Plat bierze udział w tworzeniu lokalnie pojawiających się miejsc wielokrotnych uszkodzeń DNA (locally multiply damaged sites – LMDS) [45]. Uszkodzenia te preferencyjnie naprawiane są przez RAD-51 w naprawie homologicznej z wyłączeniem naprawy przez niehomologiczne łączenie końców. Obecność adduktów w DNA hamuje translokacje białka Ku do kompleksu DNA-PK, przez co kompleks jest nieaktywny i nie mogą się odbywać dalsze etapy tej naprawy w systemie NHEJ [69]. Ostatnie dane jednoznacznie dowodzą, że uszkodzenia indukowane na drodze RAD-Plat mogą stymulować rekombinację homologiczną przez rekrutację białka RAD51 w miejsce uszkodzenia. [14]. Wszystkie te doniesienia wskazują, że mogą na istotny związek procesów naprawy DNA z transformacją nowotworową u pacjentów z rakiem głowy i szyi. Dlatego niezwykle istotne wydają się badania zmierzające do określenia związku procesów naprawy DNA z podatnością na nowotwory głowy i szyi oraz odpowiedzią komórek na stosowane leczenie.

4.5. Nadekspresja receptorów naskórkowego czynnika wzrostu

Ludzki gen *EGFR* umiejscowiony jest na chromosomie 7p. Koduje on białko transmembranowe o masie 170 kDa, które odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji procesu proliferacji i różnicowania. Transdukcja sygnałów zewnątrzkomórkowych do cytoplazmy poprzez EGFR zależy nie tylko od wiązania liganda do domeny zewnątrzkomórkowej receptora, ale również od koncentracji EGFR w błonie plazmatycznej.

Nadekspresja genu *EGFR*, obserwowana w komórkach pochodzących z nowotworów piersi, płuc, jajników, jest wiązana z niepomyślnym rokowaniem, zwłaszcza w przypadku raków głowy i szyi [52]. Powód tej nadekspresji nie jest do końca poznany, szczególnie atrakcyjna wydaje się teoria wpływu polimorfizmów w genie *EGFR*. Pierwszy intron w tym genie zawiera polimorficzną sekwencję mikrosatelitarną (9-23 powtórzeń CA). Region ten, mimo że jest umiejscowiony ponad 1000 par zasad poniżej promotora pełni ważną rolę w regulacji transkrypcji [17]. Jak wy-





Ryc. 3. Molekularne mechanizmy transformacji nowotworowej; wzajemne powiązania czynników aktywowanych w nowotworach głowy i szyi: Bcl-2 – białko proapoptyczne; Cyt C – cytochrom C; EGF – naskórkowy czynnik wzrostu; EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; ErbB2 – onkogen z rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych, MAPK – kinazy aktywowane mitogenami, Ras – białko o aktywności GTP-azy pośredniczące w przekazywaniu sygnału komórkowego, TP53 – czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego

kazali Gebhardt i wsp., aktywność transkrypcyjna *in vitro* spada wraz ze wzrostem liczby powtórzeń CA w intronie 1 wspomnianego genu [20]. Dane dotyczące raka piersi sugerują, że posiadanie dłuższego allelu tego genu wiąże się z niższym poziomem transkrypcji [7]. Podobnie komórki guzów, które cechują się utratą heterozygotyczności w tym regionie, wykazują niższą ekspresję *EGFR*, kiedy krótszy allel został utracony [7,17]. Nadekspresję onkogenu *c-erbB-2* (*Her-2*, *Erb2B*), umiejscowionego na chromosomie 17 zaobserwowano w 75% pacjentów z HNSCC i wiązana jest z krótszą przeżywalnością [74].

4.6. Mutacje w DNA mitochondrialnym

Mitochondrialny DNA (mtDNA) to pozajądrowy składnik ludzkiego genomu. Jego kolista, dwuniciowa cząsteczka o wielkości 16 kpz, koduje łącznie 13 różnych białek, w tym enzymy łańcucha oddechowego oraz dwie cząsteczki rRNA i 22 tRNA [3]. MtDNA jest szczególnie podatny na uszkodzenia oksydacyjne w następstwie oddziaływania z powstającymi w procesie fosforylacji oksydacyjnej reaktywnymi formami tlenu ROS (reactive oxygen species). Ponadto, z powodu braku histonów oraz mniej sprawnych mechanizmów naprawy, uszkodzenia mtDNA są znacznie częstsze niż DNA jądrowego [58,77]. Palenie papierosów powoduje zwiększenie poziomu H_2O_2 oraz $O^{\cdot -}$. Niektóre warianty polimorficzne genów w mtDNA mogą powo-

wać zmiany w poziomie fosforylacji oksydacyjnej, a co za tym idzie w poziomie ROS [5,36].

Gen *ND4* (NADH dehydrogenase subunit 4) koduje podjednostkę 4 kompleksu dehydrogenazy NADH (nicotina-mide adenine dinucleotide hydrogen). Kompleks ten pełni ważną rolę w metabolizmie karcynogenów, dlatego modyfikacje jego funkcji mogą odpowiadać za akumulację szkodliwych dla organizmu związków. Zaburzenie funkcji dehydrogenazy NADH może prowadzić do uszkodzenia DNA i zapoczątkować wieloetapowy proces nowotworzenia [2]. Wskazuje się, że geny enzymów łańcucha oddechowego są szczególnie podatne na działanie czynników oksydacyjnych w starzejących się komórkach [41]. Allegra i wsp. [2] zbadali 10 linii komórkowych HNSCC od 9 pacjentów i wykryli 8 somatycznych mutacji oraz 5 polimorfizmów. Wszystkie opisane polimorfizmy nie wiązały się ze zmianą sekwencji aminokwasów, natomiast 3 z 8 analizowanych mutacji genu *ND4* były związane z taką zmianą, co może sugerować modyfikacje aktywności enzymatycznej białka (tab. 1). Dane te świadczą o tym, że mutacje punktowe mtDNA mogą być użytecznym markerem do wyznaczania predyspozycji osobniczej rozwoju raków głowy i szyi, tym bardziej że są stabilne. Mutacje *ND4* są utrwalane, mimo iż komórki nowotworowe stale ewoluują, jak wskazują wyniki biopsji wykonanych w odstępie sześciu tygodni [2].

Tabela 1. Mutacje somatyczne i polimorfizmy w genie podjednostki 4 mitochondrialnej dehydrogenazy NDAH (NDA) w komórkach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (HNSCC) (wg Allegra)

Umiejscowienie	Stadium nowotworu	Pozycja mutacji (pz)	Zmiana sekwencji DNA	Zmiana sekwencji aminokwasowej
Guz węzła chłonnoego	III	11812	A→G	L→L
Rak krtani	IV	11288	C→T	L→F
		11306	C→G	A→G
Rak krtani	IV	11125	C→G	E→E
Guz węzła chłonnoego	II	11203	T→C	F→I
		11479	insercja G	przesunięcie ORF
Rak krtani	IV	11812	A→G	L→L
		11719	G→A	G→G

Umiejscowienie	Stadium nowotworu	Pozycja polimorfizmu (pz)	Zmiana sekwencji DNA	Zmiana sekwencji aminokwasowej
Guz węzła chłonnoego	II	11298	T→C	T→T
		11467	A→G	L→L
Rak krtani	IV	10873	T→C	P→P
		11002	A→G	Q→Q
Guz węzła chłonnoego	II	11719	G→A	G→G

4.7. Aberracje chromosomowe

Badania podłoża genetycznego nowotworów mogą być prowadzone nie tylko na poziomie molekularnym, ale również na poziomie subkomórkowym dotyczącym chromosomów jako najwyższy poziom zorganizowania materiału genetycznego w komórce. Aberracje chromosomów są jednym z najlepiej rozpracowanych zagadnień w biologii nowotworów głowy i szyi. W tego typu nowotworach najczęściej występują następujące aberracje: amplifikacje 3q, 8q, 9q, 20q, 7p, 11q13, i 5p, delecje 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q i 8p oraz miejsca podatne na pęknięcia 1p36, 3p21, 8p11 [65]. Na podstawie przeprowadzonych badań należy zwrócić uwagę na częsty i wysoki stopień rearanżacji materiału genetycznego w chromosomach 3 i 8. Zastanawia częsta utrata chromosomu Y, dlatego prowadzone badania zmierzają do identyfikacji w chromosomie Y genów związanych z progresją tej choroby nowotworowej. Wskazuje się również związek między utratą chromosomu Y, a nadmierną zapadalnością mężczyzn na raka krtani [35]. Ponadto, w 97% przypadków pierwotnych HNSCC wykazano częściową lub całkowitą utratę ramienia p chromosomu 3 [6]. W ramieniu krótkim uwagę zwracają 3 subregiony w regionie 3p12–p21. Występuje tu m.in. gen supresorowy *FHIT* (3p14.2). Protoonkogen AIS – zespołu niewrażliwości na androgeny (androgen insensitivity syndrome) położony jest właśnie w tym chromosomie w najmniejszym amplifikowanym regionie 3q26–q27, który odgrywa rolę w transformacji nowotworowej [65]. Amplifikację i/lub rearanżację regionu 11p13 potwierdzono w 30–60% przypadków HNSCC [1,39,54]. W rejonie tym znajdują się onkogeny, takie jak: *int-2* (*FGF-3*), *hst-1* (*FGF-4*), cyklina D1 (*prad-1*, *bcl-1*) i *ems-1*. Gen cykliny D1 reguluje przejście fazy cyklu komórkowego G1/S oraz inicjację syntezy DNA. W nowotworach głowy i szyi w 30–34% przypadkach, również potwierdzono amplifikację onkogeny *bcl-1* [42,76]. Obecnie, w celu pogłębienia diagnostyki HNSCC, uszkodzenia chromosomów wykorzystuje się jako markery do przewidywania przebiegu

choroby. Różnorodność aberracji chromosomowych oraz dynamika ich występowania w przebiegu nowotworów głowy i szyi, zachęcają do poszukiwania swoistych zmian genetycznych charakterystycznych dla danego stadium choroby. Badania nad tym zagadnieniem zintensyfikowano po opublikowaniu modelu progresji genetycznej HNSCC przebiegającej jednocześnie z postępowaniem choroby, tzw. hipotezy Califano [8,23].

5. MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK RAKA GŁOWY I SZYI

Oporność komórek nowotworowych na cytostatyki stosowane w leczeniu jest bardzo ważnym problemem w chemioterapii. Genetycznym podłożem oporności komórek nowotworowych wobec cytostatyków jest utrata zdolności do apoptozy, która może być spowodowana mutacją genów supresorowych, takich jak gen *TP53*, czy *p28*, odpowiedzialnych za kontrolę cyklu komórkowego. Ponadto, lekooporność może być spowodowana nadekspresją genów kodujących ludzkie transportery ABC, glikoproteinę P i białka oporności wielolekowej zmniejszającej wewnątrzkomórkową akumulację (multidrug resistance-related protein – MRP) i wreszcie enzymów bezpośrednio uczestniczących w reakcjach detoksyfikacji leków, takich jak transferaza S-glutationowa; GST (glutathione S-transferase) [21]. Niemniej istotną rolę odgrywało modulowanie efektywności działania mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA [57]. Zdolność indukcji uszkodzeń DNA przez czynniki genotoksycznie aktywne może stanowić o skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Dlatego współdziałanie naprawy DNA z cyklem komórkowym oraz hamowaniem apoptozy może warunkować wrażliwość komórek nowotworowych na leczenie z zastosowaniem czynników genotoksycznie aktywnych w tym cytostatyków oraz promieniowania.

W badaniach mających na celu wykazanie roli naprawy DNA w efektywności leczenia nowotworów głowy i szyi stosowano limfocyty krwi obwodowej oraz tkankę docelową z biopsji guzów [30,48]. Paływoda i wsp. zmierzali poziom uszko-



dzeń DNA w sześciu punktach pomiarowych pomiędzy 0 i 180 min, w czasie inkubacji naprawczej, której poddano limfocyty od 48 pacjentów z HNSCC oraz od 38 zdrowych ludzi po poddaniu działaniu promieniowania γ . Badania te wykazały zwiększony poziom uszkodzeń i zmniejszoną zdolność do ich naprawy w limfocytach pacjentów z HNSCC w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [48]. Iwakawa i wsp. [30] porównali uszkodzenia DNA po 15 min naprawy w limfocytach 86 pacjentów z HNSCC oraz 10 próbach kontrolnych ludzi zdrowych (bez nowotworów). Uszkodzenia były znacząco wyższe w komórkach pacjentów z rakiem w porównaniu z kontrolą [30]. Uzyskane wyniki potwierdził Saha i wsp. analizując kinetykę naprawy w pierwszych 15 minutach. Jego grupa wykazała, że naprawa uszkodzeń DNA w komórkach pobranych od pacjentów z nowotworami głowy i szyi jest znacznie mniej efektywna niż u ludzi zdrowych [57].

Na podstawie wyników uzyskanych przez Rusina i wsp. [55] można wnioskować, że komórki raka głowy i szyi mogą nabywać oporność na radio- i chemioterapię w wyniku obniżonej wrażliwości na uszkodzenia DNA. Ponadto, na podstawie tych obserwacji wydaje się, że szczególnie w przypadku przerzutów u pacjentów z HNSCC, nieefektywny system naprawy uszkodzeń DNA może zwiększać częstość mutacji, co prowadzić może do promocji niestabilności genomowych i w konsekwencji do wielu nieprawidłowości leżących u podstaw transformacji nowotworowej [55]. Ważną rolę w tym mechanizmie odgrywa gen supresorowy *TP53*, którego ekspresja wzrasta w komórkach w odpowiedzi na uszkodzenia DNA i jest związana z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1.

Komórki prawidłowe, które nie są w stanie naprawić uszkodzeń DNA ulegają apoptozie, niestety w komórkach nowotworów głowy i szyi dochodzi do mutacji w obrębie tego genu, czego wynikiem jest zaburzenie cyklu komórkowego. Dlatego, pomimo wysokiego poziomu indukowanych uszkodzeń DNA, komórki nowotworowe nie wchodzą na drogę apoptozy. Wiąże się z to opornością na radio- i chemioterapię prowadzącą do obniżenia efektywności leczenia pacjentów z HNSCC [33].

6. PODSUMOWANIE

Publikowane dotąd wyniki badań przynoszą niejednorodny obraz etiologii nowotworów głowy i szyi, ale na ich podstawie można wysnuć końcowe wnioski, że pojedyncze geny enzymów metabolizujących kancerogeny oraz enzymów naprawczych w umiarkowanym stopniu modulują ryzyko wystąpienia nowotworu głowy i szyi, mogą jednak wpływać na efektywność leczenia. Dla rozwoju nowotworów głowy i szyi, dopiero koincydencja wystąpienia pewnych wariantów genowych podnosi ryzyko genetyczne w istotny sposób. Co ciekawe, rola czynnika genetycznego uwiidocznia się wyraźniej przy umiarkowanej ekspozycji na dym tytoniowy, gdyż duża ekspozycja maskuje znaczenie czynnika genetycznego. Udział czynnika genetycznego zarysowuje się silniej w przypadku drugich pierwotnych nowotworów niż w przypadku pojedynczych guzów pierwotnych. Wreszcie, co zostało niezaprzeczalnie potwierdzone w badaniach eksperymentalnych, geny kodujące enzymy naprawcze najsilniej determinują ryzyko genetyczne rozwoju nowotworów głowy i szyi [18,56].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Akervall J.A., Jin Y., Wennerberg J.P., Zätterström U.K., Kjellén E., Mertens F., Willén R., Mandahl N., Heim S., Mitelman F.: Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 1995; 76: 853–859
- [2] Allegra E., Garozzo A., Lombardo N., De Clemente M., Carey T.E.: Mutations and polymorphisms in mitochondrial DNA in head and neck cancer cell lines. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 2006; 26: 185–190
- [3] Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N.: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 1999; 23: 147
- [4] Benhamou S., Lee W.J., Alexandre A.K., Boffetta P., Bouchardy C., Butkiewicz D., Brockmüller J., Clapper M.L., Daly A., Dolzan V., Ford J., Gaspari L., Haugen A., Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Ingelman-Sundberg M., Kalina I., Kihara M., Kremers P., Le Marchand L., London S.J., Nazar-Stewart V., Onon-Kihara M., Rannug A., Romkes M., Ryberg D., Seidegard J., Shields P., Strange R.C., Stücker I., To-Figuera J., Brennan P., Taioli E.: Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1343–1350
- [5] Bianchi N.O., Bianchi M.S., Richard S.M.: Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat. Res.*, 2001; 488: 9–23
- [6] Bockmühl U., Schwendel A., Dietel M., Petersen I.: Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 1996; 56: 5325–5329
- [7] Buerger H., Gebhardt F., Schmidt H., Beckmann A., Huttmacher K., Simon R., Lelle R., Boecker W., Brandt B.: Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of *egfr* is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res.*, 2000; 60: 854–857
- [8] Califano J., van der Riet P., Westra W., Nawroz H., Clayman G., Piantadosi S., Corio R., Lee D., Greenberg B., Koch W., Sidransky D.: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.*, 1996; 56: 2488–2492
- [9] Capoluongo E., Almadori G., Concolino P., Bussu F., Santonocito C., Vendittelli F., Galli J., Zuppi C., Ameglio F., Paludetti G., Giardina B.: GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. *Clin. Chim. Acta*, 2007; 376: 174–178
- [10] Cascorbi I., Henning S., Brockmüller J., Gephart J., Meisel C., Müller J.M., Lodenkemper R., Roots I.: Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant –463A of myeloperoxidase gene. *Cancer Res.*, 2000; 60: 644–649
- [11] Cavaciuti E., Laugé A., Janin N., Ossian K., Hall J., Stoppa-Lyonnet D., Andrieu N.: Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 42: 1–9
- [12] Cho E.Y., Hildesheim A., Chen C.J., Hsu M.M., Chen I.H., Mittl B.F., Levine P.H., Liu M.Y., Chen J.Y., Brinton L.A., Cheng Y.J., Yang C.S.: Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 1100–1104
- [13] Cloos J., Reid C.B., Snow G.B., Braakhuis B.J.: Mutagen sensitivity: enhanced risk assessment of squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, 1996; 32B: 367–372
- [14] Corde S., Biston M.C., Elleaume H., Estève F., Charvet A.M., Joubert A., Ducros V., Bohic S., Simionovici A., Brochard T., Nemoz C., Renier M., Tropès I., Fiedler S., Bravin A., Thomlinson W., Le Bas J.F., Balosso J.: Lack of cell death enhancement after irradiation with monochromatic synchrotron X rays at the K-shell edge of platinum incorporated in living SQ20B human cells as cis-diamminedichloroplatinum(II). *Radiat. Res.*, 2002; 158: 763–770
- [15] Dzikowska J., Wojciechowska U., Tarkowski W., Zatoński W.A.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2000 roku. Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa, 2003
- [16] Elahi A., Bendaly J., Zheng Z., Muscat J.E., Richie J.P. Jr., Schantz S.P., Lazarus P.: Detection of UGT1A10 polymorphisms and their association with orolaryngeal carcinoma risk. *Cancer*, 2003; 98: 872–880

- [17] Etienne-Grimaldi M.C., Pereira S., Magné N., Formento J.L., Francoual M., Fontana X., Demard F., Dassonville O., Poissonnet G., Santini J., Bensadoun R.J., Szeptowski P., Milano G.: Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann. Oncol.*, 2005; 16: 934–941
- [18] Gal T.J., Huang W.Y., Chen Ch., Hayes R.B., Schwartz S.M.: DNA repair gene polymorphisms and risk of second primary neoplasms and mortality in oral cancer patients. *Laryngoscope*, 2005; 115: 2221–2231
- [19] Garden A.S., Asper J.A., Morrison W.H., Schechter N.R., Glisson B.S., Kies M.S., Myers J.N., Ang K.K.: Is concurrent chemoradiation the treatment of choice for all patients with Stage III or IV head and neck carcinoma? *Cancer*, 2004; 100: 1171–1178
- [20] Gebhardt F., Bürger H., Brandt B.: Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations – a link between genetics and epigenetics. *Histol. Histopathol.*, 2000; 15: 929–936
- [21] Geisler S.A., Olshan A.F., Cai J., Weissler M., Smith J., Bell D.: Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head Neck*, 2005; 27: 232–242
- [22] Giefing M., Wierzbicka M., Szyfter K.: Drugie pierwotne nowotwory głowy i szyi - przegląd teorii wyjaśniających ich powstawanie oraz najnowszej terminologii. *Współcz. Onkol.*, 2004; 8: 466–474
- [23] Gollin S.M.: Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck*, 2001; 23: 238–253
- [24] Hao D., Ritter M.A., Oliver T., Browman G.P.: Platinum-based concurrent chemoradiotherapy for tumors of the head and neck and the esophagus. *Semin. Radiat. Oncol.*, 2006; 16: 10–19
- [25] Harari P.M., Ritter M.A., Peteret D.G., Mehta M.P.: Chemoradiation for upper aerodigestive tract cancer: balancing evidence from clinical trials with individual patient recommendations. *Curr. Probl. Cancer*, 2004; 28: 7–40
- [26] Hashibe M., Brennan P., Strange R.C., Bhisey R., Cascorbi I., Lazarus P., Oude Ophuis M.B., Benhamou S., Foulkes W.D., Katoh T., Coutelle C., Romkes M., Gaspari L., Taioli E., Boffetta P.: Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 1509–1517
- [27] Hayes J.D., Strange R.C.: Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 2000; 61: 154–166
- [28] Homann N., Nees M., Conrad C., Dietz A., Weidauer H., Maier H., Bosch F.X.: Overexpression 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: 290–296
- [29] Hsieh L.L., Chien H.T., Chen I.H., Liao C.T., Wang H.M., Jung S.M., Wang P.F., Chang J.T., Chen M.C., Cheng A.J.: The XRCC1 399Gln polymorphism and the frequency of p53 mutations in Taiwanese oral squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003; 12: 439–443
- [30] Iwakawa M., Goto M., Noda S., Sagara M., Yamada S., Yamamoto N., Kawakami Y., Matsui Y., Miyazawa Y., Yamazaki H., Tsuji H., Ohno T., Mizoe J., Tsujii H., Imai T.: DNA repair capacity measured by high throughput alkaline comet assays in EBV-transformed cell lines and peripheral blood cells from cancer patients and healthy volunteers. *Mutat. Res.*, 2005; 588: 1–6
- [31] Jasse J., Kawecki A., Krzakowski M.(red.): Nowotwory nablónkowe narządów głowy i szyi. W: Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych u dorosłych. *Polska Unia Onkologii*, Warszawa, 2003; 11–25
- [32] Jemal A., Tiwari R.C., Murray T., Samuels A., Ward E., Feuer E.J., Thun M.J.: *Cancer statistics, 2004*. *CA Cancer J. Clin.*, 2004; 54: 8–29
- [33] Kastan M.B., Bartek J.: Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004; 432: 316–323
- [34] Kawecki A.: Ocena skuteczności i wskazań do chemioterapii chorych na nawrotowe i rozlane raki narządów głowy i szyi. *Nowotwory*, 2001; 51: 1–65
- [35] Kujawski M., Jarmuż M., Rydzanicz M., Szukała K., Wierzbicka M., Grenman R., Golusiński W., Szyfter K.: Frequent chromosome Y loss in primary, second primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Lett.*, 2004; 208: 95–101
- [36] Lewis P.D., Baxter P., Griffiths P.A., Parry J.M., Skibiński D.O.: Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncogenic cells of Warthin's tumour. *J. Pathol.* 2000; 191: 274–281
- [37] Lynch H.T., de la Chapelle A.: Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 348: 919–932
- [38] Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*. PWN, Warszawa, 2001
- [39] Meredith S.D., Levine P.A., Burns J.A., Gaffey M.J., Boyd J.C., Weiss L.M., Erickson N.L., Williams M.E.: Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995; 121: 790–794
- [40] Moreland N.J., Illand M., Kim Y.T., Paul J., Brown R.: Modulation of drug resistance mediated by loss of mismatch repair by the DNA polymerase inhibitor aphidicolin. *Cancer Res.*, 1999; 59: 2102–2106
- [41] Mornstad H., Pfeiffer H., Yoon C., Teivens A.: Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int. J. Legal Med.*, 1999; 112: 98–100
- [42] Namazie A., Alavi S., Olopade O.I., Pauletti G., Aghamohammadi N., Aghamohammadi M., Gornbein J.A., Calcaterra T.C., Slamon D.J., Wang M.B., Srivatsan E.S.: Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*, 2002; 112: 472–481
- [43] Nanda R., Huo D., Cook M., Chen L., Hope K., Cummings S., Olopade O.I.: Outcomes after breast cancer in an ethnically diverse cohort of high-risk patients: Differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 18S
- [44] Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P., Glover T., Collins F.S., Weslon A., Modali R., Harris C.C., Vogelstein B.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 1989; 342: 705–708
- [45] Nikjoo H., O'Neill P., Wilson W.E., Goodhead D.T.: Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 2001; 156: 577–583
- [46] Nowacka-Zawisza M., Bryś M., Romanowicz-Makowska H., Kulig A., Krajewska W.M.: Genetic instability in the RAD51 and BRCA1 regions in breast cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2007; 12: 192–205
- [47] Olivier M., Hussain S.P., Caron de Fromentel C., Hainaut P., Harris C.C.: TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci. Publ.*, 2004; 157: 247–270
- [48] Palyvoda O., Mukalov I., Polanska J., Wygoda A., Drobot L., Widel M., Rzeszowska-Wolny J.: Radiation-induced DNA damage and its repair in lymphocytes of patients with head and neck cancer and healthy donors. *Anticancer Res.*, 2002; 22: 1721–1725
- [49] Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2005; 55: 74–108
- [50] Peltomäki P.: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 1174–1179
- [51] Pignon J.P., Bourhis J., Domenge C., Designe L.: Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*, 2000; 355: 949–955
- [52] Pomerantz G.R., Grandis J.R.: The role of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr. Oncol. Rep.*, 2003; 5: 140–146
- [53] Remenár E., Számel I., Budai B., Vincze B., Gaudi I., Gundy S., Kásler M.: Increase of hypophyseal hormone levels in male head and neck cancer patients. *Pathol. Oncol. Res.*, 2007; 13: 341–344
- [54] Rubin J.S., Qiu L., Etkind P.: Amplification of the *Int-2* gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Laryngol. Otol.*, 1995; 109: 72–76
- [55] Rusin P., Olszewski J., Morawiec-Bajda A., Przybyłowska K., Kaczmarczyk D., Golinska A., Majsterek I.: DNA damage and repair in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) after radiation treatment: Clinical applications. *Head Neck*, 2008; (w druku)
- [56] Rydzanicz M., Wierzbicka M., Gajęcka M., Szyfter W., Szyfter K.: The impact of genetic factors on the incidence of multiple primary tumors (MTP) of the head and neck. *Cancer Lett.*, 2005; 224: 263–278
- [57] Saha D.T., Davidson B.J., Wang A., Pollock A.J., Orden R.A., Goldman R.: Quantification of DNA repair capacity in whole blood of patients with head and neck cancer and healthy donors by comet assay. *Mutat. Res.*, 2008; 650: 55–62
- [58] Sawyer D.E., Van Houten B.: Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat. Res.*, 1999; 434: 161–176



- [59] Shin D.M., Charuruks N., Lippman S.M., Lee J.J., Ro J.Y., Hong W.K., Hittelman W.N.: p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001; 10: 603–609
- [60] Singh M., Shah P.P., Singh A.P., Ruwali M., Mathur N., Pant M.C., Parmar D.: Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat. Res.*, 2008; 638: 184–194
- [61] Sturgis E.M., Clayman G.L., Guan Y., Guo Z., Wei Q.: DNA repair in lymphoblastoid cell lines from patients with head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1999; 125: 185–190
- [62] Sturgis E.M., Zheng R., Li L., Castillo E.J., Eicher S.A., Chen M., Strom S.S., Spitz M.R., Wei Q.: XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 2219–2223
- [63] Szawłowski A., Szmjdt J. (red.): *Zasady diagnostyki i chirurgicznego leczenia nowotworów w Polsce*. Fundacja – Polski Przegląd Chirurgiczny, Warszawa, 2003
- [64] Szutkowski Z., Kawecki A., Fijuth J.: Powtórne napromienianie nowotworów terenu głowy i szyi. *Nowotwory*, 1998; 48: 917–922
- [65] Szyfter K.: Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. *Postępy chirurgii głowy i szyi*, 2002; 1: 5–19
- [66] Szyfter K., Jaskula-Sztul R., Kujawski M.: Czynniki genetyczne w raku krtani. *Post. Biol. Kom.*, 1998, 25: 123–136
- [67] Tai H.C., Hsieh C.H., Clifford Chao K.S., Liu S.H., Leu Y.S., Chang Y.F., Hsiao H.T., Chang Y.C., Yc Huang D., Chen Y.J.: Comparison of radiotherapy strategies for locally advanced hypopharyngeal cancer after resection and ileocolic flap reconstruction. *Acta Otolaryngol.*, 2008; 13: 1–7
- [68] To-Figueras J., Gene M., Gómez-Catalán J., Piqué E., Borrego N., Caballero M., Cruellas F., Raya A., Dicenta M., Corbella J.: Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett.*, 2002; 187: 95–101
- [69] Turchi J.J., Henkels K.M., Zhou Y.: Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. *Nucleic Acids Res.*, 2000; 28: 4634–4641
- [70] Van Dyck E., Stasiak A.Z., Stasiak A., West S.C.: Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature*, 1999; 398: 728–731
- [71] Wei Q., Eicher S.A., Guan Y., Cheng L., Xu J., Young L.N., Saunders K.C., Jiang H., Hong W.K., Spitz M.R., Strom S.S.: Reduced expression of hMLH1 and hGTBP/hMSH6: a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7: 309–314
- [72] Wenghoefer M., Pesch B., Harth V., Broede P., Fronhoffs S., Landt O., Brüning T., Abel J., Bolt H.M., Herberhold C., Vetter H., Ko Y.D.: Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Arch. Toxicol.*, 2003; 77: 37–41
- [73] Wierzbicka M., Szyfter W., Bień S., Maciejewski B., Składowski K., Milecki P.: Zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne dla wybranych nowotworów głowy i szyi. *Post. Chir. Głowy i Szyi*, 2006; 5: 6–39
- [74] Xia W., Lau Y.K., Zhang H.Z., Liu A.R., Li L., Kiyokawa N., Clayman G.L., Katz R.L., Hung M.C.: Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 1997; 3: 3–9
- [75] Yu G.P., Zhang Z.F., Hsu T.C., Spitz M.R., Schantz S.P.: Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett.*, 1999; 146: 93–101
- [76] Yu Z., Weinberger P.M., Haffty B.G., Sasaki C., Zerillo C., Joe J., Kowalski D., Dziura J., Camp R.L., Rimm D.L., Psyrri A.: Cyclin D1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1160–1166
- [77] Zastawny T.H., Dąbrowska M., Jaskólski T., Klimarczyk M., Kuliński L., Koszela A., Szczęśniewicz M., Śliwińska M., Witkowski P., Oliński R.: Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Rad. Biol. Med.*, 1998; 24: 722–725
- [78] Zheng Z., Park J.Y., Guillemette C., Schantz S.P., Lazarus P.: Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 19: 1411–1418