

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО УШНИ, НОСНИ И ГЪРЛЕНИ БОЛЕСТИ

Д-р Станислав Христов Йорданов

Карцином на ларинкса – епигенетични и генетични промени.

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност: оториноларингология

Научен ръководител:

Проф. д-р Диана Петрова Попова, дмн

София 2015

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление 7.1. Медицина

Научна специалност:

03.01.35. Оториноларингология

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
2.1. ЛАРИНКС.....	8
2.2. КАРЦИНОМ НА ЛАРИНКСА.....	10
2.2.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ЛАРИНГЕАЛНИЯ КАРЦИНОМ	10
2.2.2. ЕТИОЛОГИЯ	13
2.2.3. ПАТОХИСТОЛОГИЧНИ ВАРИАНТИ НА МАЛИГНЕНИТЕ ЛАРИНГЕАЛНИ НЕОПЛАЗМИ... ..	16
2.2.4. СТАДИРАНЕ ПО TNM.....	17
2.2.5 КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ	17
2.2.6 РАЗПРОСТРАНЕНИЕ.....	19
2.2.7 ЛЕЧЕНИЕ НА ЛАРИНГЕАЛНИЯТ КАРЦИНОМ	19
2.3 МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА	21
2.3.1 КАКВО ПРЕДСТАВЛЯВА РАКЪТ?	21
2.3.2 КЛЕТЪЧЕН ЦИКЪЛ	27
2.3.3 ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ – ЕПИГЕНЕТИЧЕН МЕХАНИЗЪМ ЗА КОНТРОЛ НА ГЕННАТА ЕКСПРЕСИЯ И ВРЪЗКАТА МУ С КАРЦИНОГЕНЕЗАТА	32
2.3.4 CDKN2A И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА.....	38
2.3.5 MLN1 И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАНЦЕРОГЕНЕЗА	39
2.3.6 MGMT И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА	42
2.3.7 DAPK И РОЛЯТА И В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА	45
2.3.8 P53 И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА	46
3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	49
3.1 ЦЕЛИ	49
3.2 ЗАДАЧИ	49
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	50
4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ	50
4.2 БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ.....	50
4.3 ПРЕДВАРИТЕЛНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИЯ МАТЕРИАЛ.....	51
4.3.1 ЕКСТРАКЦИЯ НА ДНК ОТ ТУМОРНА ТЪКАН.....	51
4.4 ИЗСЛЕДВАНЕ НА МЕТИЛАЦИОНЕН СТАТУС ПОСРЕДСТВОМ MS-HRM (METHYLATION-SENSITIVE HIGH-RESOLUTION MELTING).....	51
4.5 ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	53
(Polymerase Chain Reaction – PCR)	53

ЕТАПИ НА ПОЛИМЕРАЗНАТА ВЕРИЖНА РЕАЦИЯ	56
4.6 ХОРИЗОНТАЛНА АГАРОЗНА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА	57
4.7 ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ	57
4.8 СЛЕДОПЕРАТИВНА ТЕРАПИЯ.....	59
4.9 СЛЕДОПЕРАТИВНО ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ	60
4.10 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ	60
5. РЕЗУЛТАТИ.....	61
5.1 КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ	61
5.2 АНАЛИЗ НА ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK.....	67
5.3 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЩИ CDKN2A	76
5.4 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЩИ TP53.....	78
5.5 ПРЕЖИВЯЕМОСТ	81
5.5.1 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ОСНОВНИЯ ПРОЦЕС	81
5.5.2 ЛОКАЛНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА И ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	84
5.5.3 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ.....	86
5.5.4 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И КЛИНИЧЕН СТАДИИ S	88
5.5.5 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ	89
5.5.6 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ	90
5.5.7 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ТЮТЮНОПУШЕНЕ	92
5.6 ТЮТЮНОПУШЕНЕ И ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK. ТЮТЮНОПУШЕНЕ И МУТАЦИИ НА ГЕНИТЕ CDKN2A И TP53.....	93
5.7 УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ И МЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK. УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ И МУТАЦИИ НА ГЕНИТЕ CDKN2A И TP53.	95
5.8 МЕТИЛИРАНЕ И СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ	96
5.9 МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИЯ ЛИМФЕН БАСЕЙН И МЕТИЛАЦИОННА ИНХИБИЦИЯ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ.....	97
5.9.1 МЕТИЛИРАНЕ НА MGMT И МЕТАСТАЗИРАНЕ.....	97
5.9.2 МЕТИЛИРАНЕ НА MLH1 И МЕТАСТАЗИРАНЕ.....	98
5.9.3МЕТИЛИРАНЕ НА CDKN2A И МЕТАСТАЗИРАНЕ	100
5.9.4 ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ НА DAPK И МЕТАСТАЗИРАНЕ	101
5.10 МУТАЦИИ НА CDKN2A И TP53 И МЕТАСТАЗИРАНЕ	103
5.10.1 МУТАЦИИ НА CDKN2A И МЕТАСТАТИЧНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ.....	103
5.10.2 МУТАЦИИ НА TP53 И МЕТАСТАЗИРАНЕ	104

5.11 МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ И ВРЪЗКАТА ИМ С РАННИ И КЪСНИ МЕТАСТАЗИ В РЕГИОНАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ	106
5.12 ИНАКТИВИРАНЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ И ЛОКАЛНОТО РАЗПРОЗТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА ПО СТАДИИ T0-4	108
5.13 ИНАКТИВИРАНЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ И ЛОКАЛНОТО РАЗПРОЗТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА ПО СТАДИИ S.....	109
5.14 ВРЪЗКА НА ПРЕЖИВЯЕМОСТТА С МЕТИЛИРАНЕТО И МУТАЦИИТЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ.....	110
5.14.1 МЕТИЛИРАНЕ НА MGMT И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	110
5.14.2 МЕТИЛИРАНЕ НА MLH1 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	112
5.14.3 МЕТИЛИРАНЕ НА CDKN2A И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	113
5.14.4 МЕТИЛИРАНЕ НА DAPK И ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	115
5.14.5 МУТАЦИИ НА CDKN2A И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	117
5.14.6 МУТАЦИИ НА TP53 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	118
6. ДИСКУСИЯ.....	121
7. ИЗВОДИ.....	129
8. ПРИНОСИ.....	130

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на ларинкса в световен мащаб е най-честата малигнена неоплазма от областта на главата и шията. Неговите клинични изяви в зависимост от локализацията могат да бъдат много ранни, което е предпоставка за ранна диагноза и добра прогноза. Туморът дълго време остава ограничен от здравата хрущялна рамка на гръкляна. Независимо от това честотата на това заболяване и срещата на общопрактикуващите лекари с него не е висока и проблемът за ранната диагностика остава нерешен. Поради липсата на симптоматика в ранните стадии, която да създава сериозен проблем за болния, честото и припокриване с хронични болестни състояния, характерни за пушачите и алкохолиците, води до подценяване на проблема от страна на пациента и късното търсене на лекарска помощ. Всичко това превръща тази нозологична единица от заболяване с много добри възможности за превенция, профилактика, ранна диагноза, лечение и добра прогноза, в такова с висока инвалидизация и смъртност. Независимо от прогреса на съвременната медицина при диагностиката и лечението на рака на ларинкса, петгодишната преживяемост остава около 50% и почти не се е променила за последните десетилетия. Докато основните етиологични фактори са добре проучени, то детайлните молекулни механизми на ларингеалната карциногенеза остават неразкрити. Именно в тях се крие ключът към успеха в борбата с това коварно заболяване. Повечето проучвания в тази насока разглеждат като цяло малигнените неоплазми на главата и шията. Много малко от тях са насочени конкретно към рака на гръкляна.

В този коварен процес на трансформиране на една нормална клетка в „агресивен хищник”, който е способен да доведе до пълна деструкция и смърт на организма, участват сложни механизми. В съвременната молекулна медицина все по-често се обръща внимание не само на

генетичните увреди, но и на различни епигенетични нарушения, които имат решаваща роля в контрола и регулацията на генната експресия. Един от тези механизми, който ние изследвахме е промоторното метилиране.

Човешкото тяло притежава сложни системи за контрол върху процесите на малигнена трансформация. Известно е, че тя представлява един многостъпален процес, включващ поредица от събития на молекулно ниво, които засягат геномната стабилност, пролиферацията, апоптозата, ДНК – възстановяването, инвазивността и др.

Няколко ключови туморсупресорни гени са най-често описвани в литературата, като участници в тази сложна мрежа от събития. Един от основните механизми на инхибиране на CDKN2A, MGMT, MLH1 и DAPK е промоторното метилиране. То блокира експресията им и тяхната контролираща роля върху епителните туморните клетки в ларингеалната мукоза. Чест обект на генетични промени е и „пазителят” на човешкия геном – TP53.

В настоящето изследване ние анализираме участието на тези пет важни туморсупресорни гени в ларингеалната карциногенеза.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. ЛАРИНКС

Човешкият ларинкс предпазва дихателните пътища, позволява контролиран достъп на въздух, участва в създаването на позитивно интраторакално налягане при кашляне и вдигане. Еволюционно при хората придобива и сложната фонаторна функция.

Границите на ларинкса се проектират от III до VI цервикален прешлен, като започват от *introitus laryngis* и достигат до долния ръб на крикоидния хрущял. Дели се на три етажа – супраглотис, глотис и субглотис. (1, 2). Фиг.1,2,3 и 4

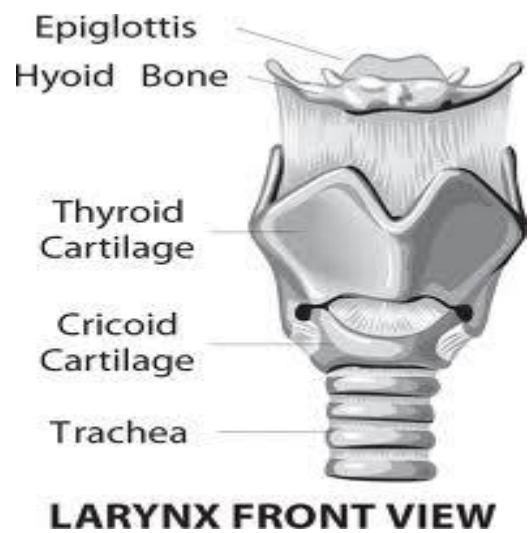
Ларингеалният скелет е изграден от няколко чифтни и нечифтни хрущяла. Към първата група се отнасят пръстеновидният, щитовидният хрущял и епиглотисът. Към малките нечифтни хрущяли принадлежат аритеноидните, роговидните, капковидните и сезамовидните хрущяли.

Ларингеалната лигавица е покрита основно с привидно многореден, цилиндричен, ресничест епител. В отделни участъци като истинските гласни гънки, интераритеноидното пространство и езичната повърхност на епиглотиса епителът е многослоен плосък. Лигавицата е осеяна с многобройни мукозни жлези концентрирани основно във венстрикулите, ариепиглотичните гънки и по ларингеалната повърхност на епиглотиса. Глотисът не притежава жлези. Моторната и сетивната инервация на ларинкса се осъществява от вагуса чрез горния и възвратния ларингеален нерв. Ларинксът се кръвоснабдява с артериална кръв от ларингеалните клонове на горната и долната тироидни артерии и крикотироидния клон на горната тироидна артерия. Вените следват съответните артерии (4).



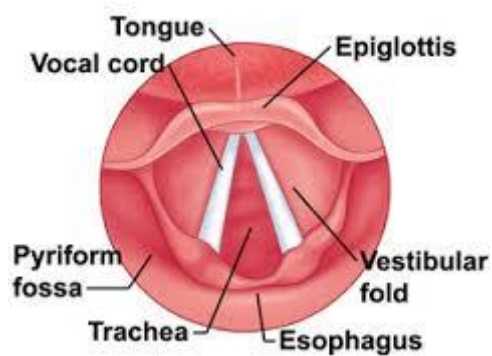
Фиг.1 Анатомия на ларинкса

Sebastian Kaulitzki



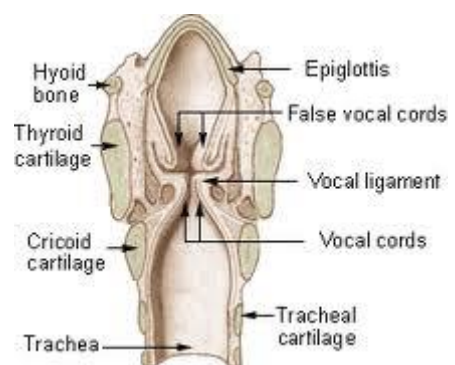
фиг.2 Анатомия на ларинкса

Bettina Sheppard M.A.



Фиг.3 Директна ларингоскопия на ларинкса

T. Graves



Фиг.4 Структура на ларинкса – коронарен срез

Wikipedia.org

Лимфният дренаж на ларинкса се разделя на две от истинските гласни гънки. Последните са без лимфни съдове, което обяснява късната поява на метастази при глотисните карциноми. Това се осъществява след разпространение на неоплазмата към другите етажи. Горната или супраглотичната лимфна мрежа се дренира от лимфни съдове вървящи паралелно на горните ларингеални вени и се вливат в горните дълбоки цервикални лимфни възли. Субглотичното пространство се дренира през лимфни съдове към долните дълбоки цервикални възли, като част от лимфата преминава през преларингеалните и претрахеалните нодули.

2.2. КАРЦИНОМ НА ЛАРИНКСА

2.2.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ЛАРИНГЕАЛНИЯ КАРЦИНОМ

Ежегодно по света се диагностицират около 500 000 нови случая на плоскоклетъчни карциноми на главата и шията. Сред тях плоскоклетъчният карцином на ларинкса е най-честата малигнена неоплазма.

Според SEER Cancer Statistics Review средната годишна заболеваемост от карцином на ларинкса за периода 2006-2010г е 3,4/100 000, като при мъжете тя е 6,0/100 000, а при жените - 1,3/100 000. Смъртността съответно е 1,1 общо, като за мъжете е 2,0, при жените 0,4/100 000. Петгодишната преживяемост за ларингеалния карцином от 52% за периода 1950-1954г. се е променила на 64,4% за периода 2003 - 2009 г. Както става ясно тази промяна е незадоволителна на фона на съвременните постижения на медицината и медицинските технологии. В 90% от случаите заболяването се диагностицира във възрастта над 45 г. (фиг.5)



Възрастово разпределение на заболялите за периода 2006-2010г. по данни на SEER Cancer Statistics Review

Фиг.5

Епидемиологичните данни за различните държави и региони варират като с най-висока заболеваемост са страните от Средиземноморието, Централна и Източна Европа. По отношение на пола мъжете са значително по засегнати от жените като на 10 мъже се пада по една жена.

По данни на националният раков регистър през 2010 г. в България са регистрирани 555 нови случая на рак на ларинкса при мъжете и 49 случая при жените. Това ще рече заболеваемост от 15,2/100 000 при българските мъже или 3,6% от злокачествените заболявания, а цифрите при жените са съответно 1,3/100 000 или 0,3%. За българската популация ракът на ларинкса заема 2,0% от всички злокачествени заболявания.

Изключително тревожен е и фактът, че по-голямата част от болните с карцином на ларинкса се диагностицират едва в III и IV клиничен стадии (фиг.4). Това ясно говори за нуждата от добра профилактична и общественообразователна програма на рисковите групи от населението. Фактът, че карциномът на ларинкса в голям процент от случаите се извява с ранна симптоматика и този орган е сравнително лесно достъпен за оглед

от един опитен специалист показва, че подобна профилактика би била високо ефективна за поставяне на ранна диагноза, с което и прогнозата на болните с това заболяване ще се подобри значително.

На фигури 2 и 3 е показано процентното разпределение на злокачествените заболявания при мъжете и жените в България за 2010г. по данни на националния раков регистър.



Фиг. 6



Фиг. 7



Разпределение на болните с карцином на ларинкса според клиничния стадий .

Фиг. 8

2.2.2. ЕТИОЛОГИЯ

Към основните доказани рискови фактори се отнасят тютюнопушенето, алкохолът и човешкият папилома вирус.

Тютюнът се определя като основен етиологичен фактор при до 98% от пациентите. (12) Установена е и пряка зависимост от дозата и продължителността на употреба на тютюневи изделия. Настоящите пушачи имат до 40 пъти по-висок риск. При бившите пушачи рискът остава до 3 пъти по-висок за период от 10 години. (13) Видът на тютюна и начинът на употреба също са от значение за риска. Тъмният тютюн е смятан за по-вреден от светлия и ръчно навитите цигари са по-опасни от фабричните. (14)

Алкохолът увеличава до 5 пъти рискът от ларингеален карцином и то предимно със супраглотична локализация като ефектът се мултиплицира при употреба на цигари.

Професии свързани с излагане на азбестов прах, дървесен и циментов прах, сажди и различни въглеводороди също са с повишен риск от развитие на ларингеален карцином в сравнение с контролите. Scott M Langevin et al правят проучване за връзката на професионалната експозиция на различни видове производствен прах и карциномите на главата и шията, което включва 951 случая с карциноми на главата и шията и 1193 контроли. Те представят доказателства, че професионалната експозиция на дървесен прах е свързана с повишен риск от карцином на ларинкса, както и експозицията на прах в кожарската промишленост повишава риска от карциноми на главата и шията. Установени са и гранични резултати за повишен риск от ларингеален карцином при експозиция на метални прахове. Не е установена сигнификантна връзка между експозицията на циментов прах и сажди и посочените малигнени заболявания. (15)

Диетата също е от голямо значение за развитието на карциноми на горните дихателни пътища и храносмилателния тракт. Редица проучвания сочат, че консумацията на сурови плодове и зеленчуци има доказан

протективен ефект, най-вероятно свързано с високото съдържание на витамин А и витамин С. (16) Диета, включваща злоупотреба с алкохол и висока консумация на месо и месни продукти, води до повишен риск от карциноми на горните дихателни и храносмилателни пътища. (18) Според някои автори употребата на турско/гръцко кафе също може да се определи като рисков фактор. (17)

Някои автори определят ларингеалния рефлукс като рисков кофактор при ларингеалната карциногенеза подобно на Баретовия хранопровод. Kaufman и Burke съобщават, че рефлуксът е самостоятелен рисков фактор при непушачи с карцином на ларинкса. (19) Установено е, че освен солната киселина друг съществен увреждащ агент е пепсинът. Хроничната експозиция на пепсин при рефлуксната болест играе ролята на промотор на туморогенезата на ларингеалния и фарингеалния епител. (20)

Нарастват доказателствата за връзката на някои вируси с редица злокачествени заболявания. За горните дихателни и храносмилателни пътища водеща роля има човешкият папилома вирус. Според някои автори субтипове 16 и 18 може да се идентифицират в до 40% от случаите с карцином на ларинкса (21), като литературните данни варират от 3% до 47% (92 – В 11). При други проучвания такава връзка не е открита. Независимо от тези противоречия ларингеалната папиломатоза се смята за преканцероза като според Cummins до 20% от болните развиват плоскоклетъчен карцином. Според повечето автори основните субтипове открити при тумори на ларинкса са типове 6 и 11, а също и тип 16 откриван при карциномите на устната кухина. Рискът от малигнена трансформация нараства значително при комбинация с алкохол и цигари. Средно около 10 години са необходими за трансформация на обикновената HPV инфекция в карцином. (22) Към онкогенните вируси трябва да се спомене и EBV, както и херпес вирусите. Ролята на последните в

ларингеалната карциногенеза все още не е доказана, но при някои други малигнени неоплазми в областта на главата и шията, като назофарингеалния карцином съществена.

2.2.3. ПАТОХИСТОЛОГИЧНИ ВАРИАНТИ НА МАЛИГНЕНИТЕ ЛАРИНГЕАЛНИ НЕОПЛАЗМИ

Най-честата малигнена неоплазма на ларинкса е плоскоклетъчният карцином. Той е отговорен за над 90% от случаите. Според степента на диференциация спиноцелуларният карцином на ларинкса може да се раздели по Broders в четири групи:

Група 1: (G1) – високодиференциран карцином – до 25% от клетките са недиференцирани;

Група 2: (G2) – умеренодиференциран карцином – от 25% до 50% недиференцирани клетки;

Група 3: (G3) – нискодиференциран карцином – от 50% до 75% недиференцирани клетки;

Група 4: (G4) – недиференциран анапластичен карцином – над 75% недиференцирани клетки.

Степента на диференциация определя до известна степен биологичното поведение на тумора. Високодиференцираните варианти се характеризират с по-бавен растеж, по-късно метастазиране и ниска лъчечувствителност. Нискодиференцираните, недиференцираните и анапластичните варианти са силно агресивни с бърз растеж, ранно метастазиране, но за сметка на това са значително по-чувствителни на лъче и химиотерапия. (27) Много често обаче поведението на тумора не се подчинява на тези постулати, което потвърждава мнението на Kleinzasser (1983), че биологичното поведение не зависи от диференциацията, а при карцинома на ларинкса се определя от локализацията. Освен класическият

плоскоклетъчен карцином могат да се наблюдават и други по-редки варианти.

2.2.4. СТАДИРАНЕ ПО TNM

Стадирането на карциномите на главата и шията по TNM отразява тежестта и разпространението на заболяването. Тази класификационна система е създадена за удобство при прогнозирането, както и при взимането на решения по отношение на терапията. На базата на тази класификация се определят 4 стадия на развитие на заболяването, всеки от които е със сходна преживяемост. Съобразно тези принципи сме стадирали и пациентите, които бяха включени в нашето изследване.

2.2.5 КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ

Както и при другите малигнени заболявания ларингеалният карцином може да се прояви с локални и общи симптоми. Като правило при този вид локализация на злокачествения процес наличието на общи симптоми на болестта без локални такива е изключение.

КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ ГЛОТИЧЕН КАРЦИНОМ

Положителната страна на тази локализация е, че дори минимална лезия, като carcinoma in situ е достатъчна за да се прояви клинично с промяна в гласа. По тази причина всеки пациент с промяна в гласа за период над 2-3 седмици подлежи на адекватна оценка от специалист по оториноларингология. Авансиралите лезии водят до обструкция на дихателните пътища със задух от инспираторен тип. Одинофагията е белег на дълбока туморна инфилтрация. Много важен белег при ларингоскопското изследване на гласните гънки е подвижността им. Запазената подвижност е благоприятна находка, което говори за повърхностен процес и възможност за органосъхраняваща оперативна интервенция. Обратното – фиксирането на гласната гънка е проява на дълбока инвазия на тумора. Поради почти пълната липса на лимфни

съдове в областта на глотиса наличието на метастази в регионалните лимфни възли е характерно за късните стадии на заболяването. Ранният глотичен карцином обикновено не дава метастази.

КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ СУПРАГЛОТИЧЕН КАРЦИНОМ

Карциномът с тази локализация обикновено се проявява с нехарактерни симптоми като драскане и дразнене в гърлото, чувство за чуждо тяло, затрудено преглъщане – прояви типични за хроничните фарингити и ларингити, които често съпътстват пушачите и алкохолиците. Това маскира растящата туморна маса. Когато оплакванията на пациента, като одиофагия със стрелкащи болки към ухото, фетор екс оре, го принудят да потърси лекарска помощ, обикновено процесът е силно авансирал с инфилтрация на перихондриума или обхващане на хипофаринкса. Не са изключени на този етап и шийни метастази, които рязко влошават прогнозата. Други белези могат да бъдат дразнещата суха кашлица с или без хемоптоие, промененият тембър на гласа. Дисфонията говори за ангажиране и на глотиса.

КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ СУБГЛОТИЧЕН КАРЦИНОМ

И при тази локализация началните симптоми могат да бъдат твърде дискретни като усещане за чуждо тяло. При ангажиране на глотиса или възвратния нерв с парализа на гласната гънка се проявява дрезгавост на гласа. При подобна „идиопатична“ парализа винаги трябва да влиза в съображение на диференциалната ни диагноза и скрито развиващ се субглотичен неопластичен процес. Много често обаче първата проява е инспираторната диспнея. Пробивът през крикотироидната мембрана може да се маскира като процес на щитовидната жлеза. Метастазите тук са твърде ранни.

Като цяло може да обобщим първите клинични изяви на ларингеалният карцином с правилото за трите „Д“: Супраглотис – Дисфагия, Глотис – Дисфония, Субглотис – Диспнея.

2.2.6 РАЗПРОСТРАНЕНИЕ

Разпространението на злокачествените тумори се осъществява чрез локална инвазия и метастазиране. Локалната инфилтрация на карцинома води до проникването му в кръвоносни, лимфни съдове и телесни кухини, което отваря пътища за метастазирането му. Метастазите са импланти от туморни клетки, които са се отделили от първичния тумор и се развиват самостоятелно в други части на организма. В много от случаите те се оказват по-сериозното предизвикателство за лечението на болния и значително влошават прогнозата.

Съществуват три основни пътя на дисеминация: „посяването“ на телесните кухини, лимфна и хематогенна дисеминация. За карциномите на главата и шията, в това число и на ларинкса, е характерно ангажирането на регионалните шийни лимфни възли. В по-напредналите стадии следва засягане на медиастиналните колектори. Наличието на далечни метастази е рядко и обикновено настъпва късно в хода на развитието на заболяването.

2.2.7 ЛЕЧЕНИЕ НА ЛАРИНГЕАЛНИЯТ КАРЦИНОМ

За изграждане на лечебна стратегия всеки конкретен пациент е необходимо да бъде обсъден на клиникорадиологична конференция състояща се от УНГ хирург, лъчетерапевт и химиотерапевт. (29;30)

Лечение в стадии 0:

При carcinoma in situ трябва много внимателно да преценим разпространението на тумора. Това е патохистологична диагноза, която зависи до голяма степен от мястото от което е взет материала за изследване. По данни от литературата около 2/3 от стадираните по този

начин неоплазми на ларинкса се оказват в последствие инвазивен карцином. Ето защо много от авторите, включително и ние, препоръчват този тумор да се третира като T1. (37;38). За предпочитане е хирургичната ексцизия на тумора. Някои автори предпочитат лъчетерапията. От изключителна важност за намаляване честотата на рецидивите е премахването на иританти като цигари, алкохол и гастроезофагеалният рефлукс.

Лечение в стадии I-II:

- Терапията на избор в тези стадии на заболяването е хирургична резекция или дефинитивна лъчетерапия.
- Лъчетерапията се предпочита при пациенти, които не биха могли да толерират извършването на хирургична интервенция.
- Радиационната доза зависи от размера на тумора като в ранните стадии стандартната доза е от 66 до 74Gy (2Gy/фракция дневно от понеделник до петък/ 7 седмици) (39).

Лечение в стадии III-IVB:

- Радикалното хирургичното лечение се прилага при локално авансирани случаи. Дефинитивната лъчетерапия, съчетаната лъче и химиотерапия или индукционната терапия са метод на избор при иноперабилни болни, пациенти с противопоказания за хирургично лечение или отказващи такова.
- При съчетаното лечение химиотерапията се прилага по време на лъчетерапията, като стандартната доза е от 66 до 74Gy (2Gy/фракция дневно от понеделник до петък/ 7 седмици)
- Конвенционалното фракциониране при съчетаната химиолъчетерапия е ≥ 70 Gy (2.0 Gy/фракция)

- Следоперативната лъчетерапия се прилага в доза от 60-66 Gy (2.0 Gy/фракция); предпочитаният интервал между операцията и лъчетерапията е ≤ 6 седмици.
- Решението да се лекува болният със съчетана химио-лъчетерапия вместо оперативно трябва да се вземе от мултидисциплинарен екип, състоящ се от УНГ хирург, лъчетерапевт и химиотерапевт.

Индукционната химиотерапия се прилага при пациенти в стадии III-IVB на заболяването с цел редукция на туморната маса предоперативно или преди дефинитивна лъчетерапия.

Решението да лекуваме пациента с индукционна химиотерапия вместо съчетана химио-лъчетерапия или оперативно, дефинитивна лъчетерапия или само химиотерапия трябва да се вземе от мултидисциплинарен екип състоящ се от УНГ хирург, лъчетерапевт и химиотерапевт. (32;33;34)

Лечение в стадии IVС при рецидиви и при иноперабилни метастази:

Метод на избор тук е химиотерапията

2.3 МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА

2.3.1 КАКВО ПРЕДСТАВЛЯВА РАКЪТ?

Ракът е втората по честота причина за смърт в света след сърдечносъдовите заболявания. Наименованието произхожда от гръцката дума *karkinos*, с която Хипократ е описвал карцинома някъде около 4-ти век п.н.е. По дефиниция понятието неоплазия буквално означава „нов растеж“. Терминът тумор се използвал първоначално за оток, причинен от възпаление. С времето обаче, значението на думата се променило и в наши дни е еквивалентно на неоплазма. Въпреки многото определения

може да твърдим, че точна дефиниция на понятието неоплазма все още няма. Според британският онколог Willis „Неоплазмата е абнормна тъканна маса, растежът на която изпреварва и не е координиран с този на нормалната тъкан, като персистира и след премахване на стимула, който го е предизвикал.“ (23). Днес знаем, че това се дължи на генетични промени, които позволяват автономна, ексцесивна и неуправляема пролиферация на клетки. Цялата клетъчна популация в даден тумор произхожда от една единствена генетично променена клетка.

Естественото развитие на един злокачествен тумор преминава през четири основни фази: 1.малигнена трансформация на таргетната клетка; 2.растеж на трансформираната клетъчна маса; 3.Локална инвазия; 4.метастазиране. Трябва да имаме предвид, че не винаги морфологичната характеристика на тумора отговаря на биологичното му поведение. Степента на диференциация на неопластичните клетки се определя от степента на морфологична и функционална прилика с нормалната клетъчна популация. Липсата на диференциация се нарича анаплазия. Доброкачествените тумори като цяло са добре диференцирани, докато малигнените варират от високодиференцирани до анапластични. Анаплазията включва множество морфологични промени като клетъчен полиморфизъм, ядрен атипизъм, висока митотична активност, загуба на нормален поляритет и неадекватна васкуларизация със зони на централна некроза.

Друг важен показател на неоплазмите е скоростта на растеж. Тя се определя от времето за удвояване на туморните клетки, фракцията от туморни клетки, която се дели активно и скоростта на загуба на туморни клетки от основната маса. Очевидно, за да имаме туморен растеж скоростта на пролиферация трябва да надвишава скоростта на апоптоза. Растежната фракция на туморните клетки има ключово значение за

чувствителността на неоплазмата към химиотерапия. Т.е. тумори, които са с нисък процент на репликиращи се клетки ще бъдат химиорезистентни. При подобни неоплазми може да се използва комбинирана стратегия като се извърши предварително туморредуцираща оперативна интервенция или лъчетерапия. Остатъчните клетки след това са с повишена митотична активност и съответно на това повишена чувствителност към химиотерапия. Като цяло латентният период, за който един тумор се извява клинично е непредсказуем и може да продължи дори и години. Това поражда необходимостта от откриване на ранни чувствителни диагностични и прогностични маркери.

Както споменахме по-горе нелетални генетични увреди лежат в основата на карциногенезата. Това води до клонална експанзия на единична прекурсорна клетка. Няколко основни типа гени се увреждат при малигнената трансформация. Към тях може да причислим растежиндуциращите протоонкогени, туморсупресорните гени, както и гените регулиращи апоптозата и ДНК възстановяването. Карциногенезата е многостъпален процес и туморната прогресия на молекулно ниво често е свързана с натрупване на повече от една генетична увреда. Тук може да споменем няколко съществени клетъчни промени, стоящи в основата на този сложен процес. Туморните клетки имат способността да пролиферират без външни растежни стимули като следствие на онкогенна активация. Другото свойство на злокачествените клетки е нечувствителността им към растежни инхибитори. Инактивацията на гени като p53 води до резистентност на тумора към апоптоза. Установяват се също така и дефекти в ДНК възстановяването. Малигнените клетки имат неограничен пролиферативен потенциал. Важно условие за реализирането на растежния потенциал на неоплазмата е неоангиогенезата индуцирана от

фактори като VEGF и др. Най-характерните черти на злокачествените тумори са локалната инвазия и метастазирането.

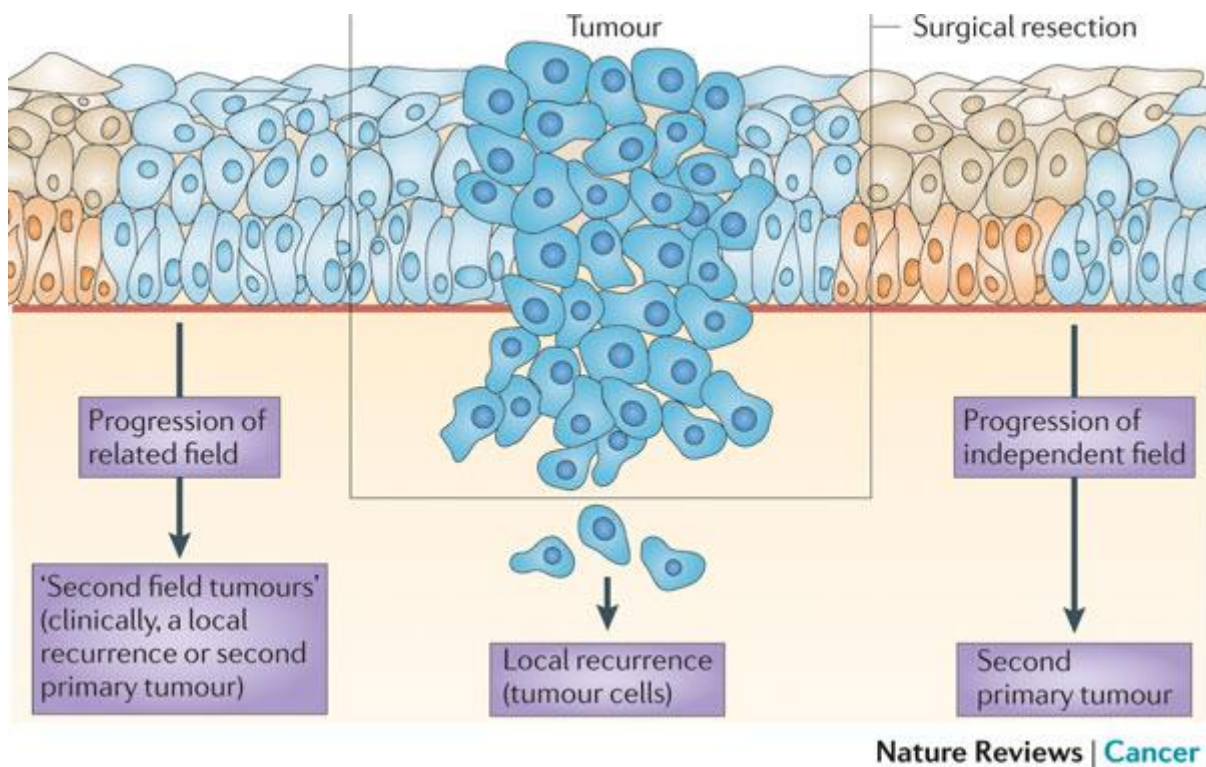
В основата на този многоетапен процес стои основно нарушаване на ДНК поправката. Това води до натрупване на мутации засягащи онкогени, туморсупресорни гени и гени регулиращи апоптозата. Резултат от всичко това е неконтролирана клетъчна пролиферация, неосъществяване на апоптозата и клонална експанзия. Когато този клетъчен клон избегне защитата на имунната система се стига до прогресивен растеж на тумора спомогнат от разрастването на нова съдова мрежа. Допълнителните мутации са отговорни за придобиването на агресивните качества като инвазивност и метастазиране.

По епидемиологични данни ракът на ларинкса на микроскопско ниво е хомогенно заболяване като над 95% от случаите се дължат на плоскоклетъчен карцином. На клинично ниво обаче се оказва, че той има доста хетерогенно биологично поведение, което често не се припокрива с общоприетите патохистологични и клинични класификации. Остават все още много нерешени въпроси по отношение на прогнозата, ефикасността на лечението и ранната диагностика. Непрестанното търсене на отговори на тези въпроси доведе до извода, че зад привидно еднородното заболяване се крие подчертана хетерогенност, както на клинично, така и на молекулно ниво. (59,60,61)

Ключов момент в патогенезата на карциномите на главата и шията е възникването им върху широки пренеопластични полета от генетично променени епителни клетки, които са клонално свързани с първичния карцином и често се простират извън макроскопски и микроскопски чистите резекционни линии. Този феномен наречен карцинизация на полето стои в основата на рецидивите и възникването на други първични тумори при един и същи пациент. Този термин е въведен още през 1953

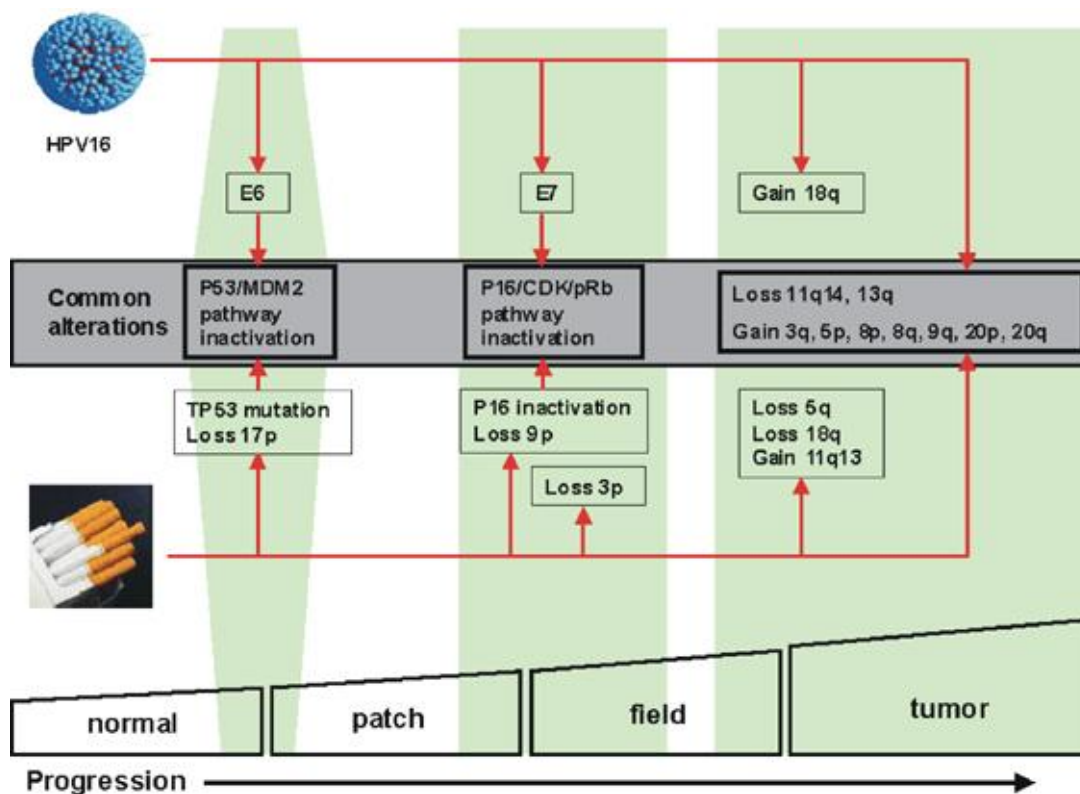
година от Slaughter et al.(62) (Фиг. 9). По данни на Gao X. и колектив от 2003 г. пациентите с карцином на ларинкса имат 14% риск от развитието на втори първичен тумор до 5-тата година, като на 10-тата година рискът нараства до 26%, на 15-тата - на 37%. (91)

Важен извод от казаното по-горе е, че изготвянето на молекулен профил на карцинома на ларинкса, би дало възможност за по-точна диагноза и прогноза по отношение риска.



Фиг. 9 Карцинизация на полето (Nature Reviews/ Cancer)

Карцинизацията на полето се обяснява с фактът, че злокачественото израждане на клетките представлява един многостъпален процес. Той включва поредица от молекулно-генетични промени, придаващи в крайна сметка малигнения фенотип. (Фиг.10) (63)



Фиг. 10 Прогресия на малигнената трансформация при карциномите на главата и шията (Smeets SJ et al)

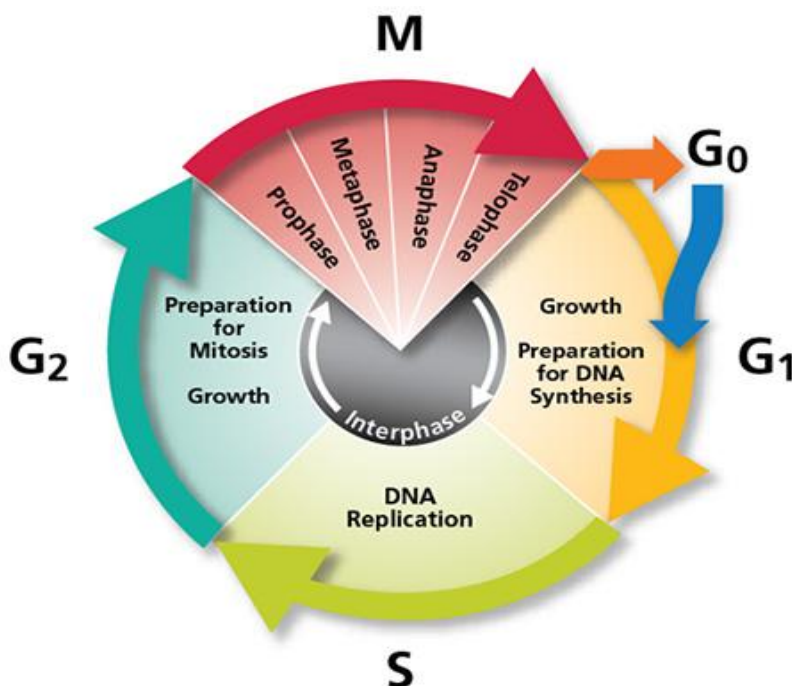
Smeets SJ et al. представят такъв многостъпален модел на генетичната прогресия при карциномите на главата и шията Фиг. 10. Те посочват два пътя на малигнизация в зависимост от етиологичния фактор – външни карциногени като цигареният дим и човешкият папилома вирус. Според тях началното събитие е повреда в p53/MDM2. При HPV-негативните пациенти това се осъществява най-често чрез мутации, а при HPV-позитивните се среща дивият тип p53, който се инактивира от E6 протеина на HPV16. (64,65) Следващият етап от този сложен процес е превръщането на групата от генетично променени клетки в поле, което експанзивно нараства и ангажира мукозата. Важно генетично събитие на този етап е увредата на p16/CDK/pRB пътя. (66) В случая при пушачите чрез мутация, хромозомна загуба или промоторно хиперметиране се

инактивира CDKN2A генът, който кодира p16. При HPV-позитивните вирусният протеин E7 се свързва и инактивира Rb. Следващият етап е формирането на малигнен тумор в полето на пренеопластичните клетки в резултат на посочените на фигурата промени, ключова роля при които играе CCND1 (Cyclin D1). Статистически анализ на карциномите на главата и шията показва, че за възникването им са необходими от 6 до 10 независими генетични увреди (93)

Както знаем ракът, в това число и ракът на ларинкса е системно заболяване, засягащо организма като цяло. Липсата на познание за детайлните патогенетични механизми за възникването му дава възможност за симптоматично, но не и за патогенетично таргетно лечение. Това обяснява и честата загуба на битката с него.

2.3.2 КЛЕТЪЧЕН ЦИКЪЛ

Основен момент в превръщането на една нормална клетка в малигнена е придобиването и на неограничен потенциал за делене. Важна роля за това свойство играе нарушеният контрол на клетъчния жизнен цикъл. (68)



Фиг. 11 Клетъчен
цикъл
(bdbiosciences.com)

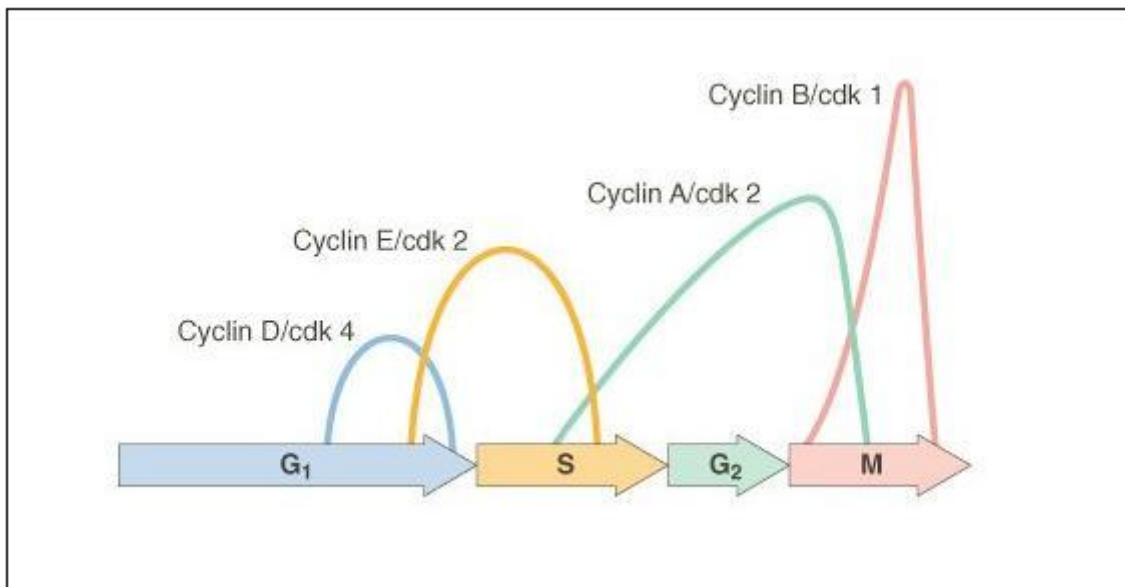
Клетъчният цикъл представлява жизненият цикъл на клетката. Той се състои от няколко фази. G0 е фазата на неделящата се клетка. В нея се намират два вида диференцирани клетки: едните са т.н. тихи стабилни клетки като хепатоцитите, клетките на бъбречния паренхим, гладкомускулните клетки, фибробластите, левкоцитите. Тези клетки могат да бъдат стимулирани да преминат към G1 фаза на клетъчния цикъл и да започнат да се делят. Подобно явление се наблюдава при процесите на регенерация след тъканна увреда. Другият тип са крайно диференцираните клетки, които не могат да влязат в цикъл на делене. Такива са невроните, напречноабраздените мускулни влакна и клетките на сърдечния мускул. Друг тип клетки са постоянно делящите се клетки, каквито са епителните и клетките на костния мозък и хемопоезата. В повечето случаи тези клетки се зараждат от стволови клетки с неограничен капацитет за делене. Идеята за стволовите клетки е една от най-вълнуващите в наши дни свързана с идеите и непрестанните проучвания в сферата на регенеративната медицина. (40;41)

Стволовите клетки се отличават с техния непрекъснат капацитет за делене като репликацията се извършва асиметрично. Едната от двете дъщерни клетки запазва характеристиките на стволова клетка, а другата претърпява процес на диференциация като се превръща в зряла неделяща се клетка. (42)

Митотичният цикъл е част от клетъчния жизнен цикъл. Той се състои от четири фази – G1,S,G2 и M. Първите три периода се обединяват в подготвителна или интерфаза. През пресинтетичния период (G1) клетката се подготвя за възпроизводство на наследствения материал. Синтезира се белтък активиращ гените, които контролират репликацията. За навлизането на клетката в синетичния период е необходима РНК синтезирана през G2 фазата. През S фазата се удвоява количеството на

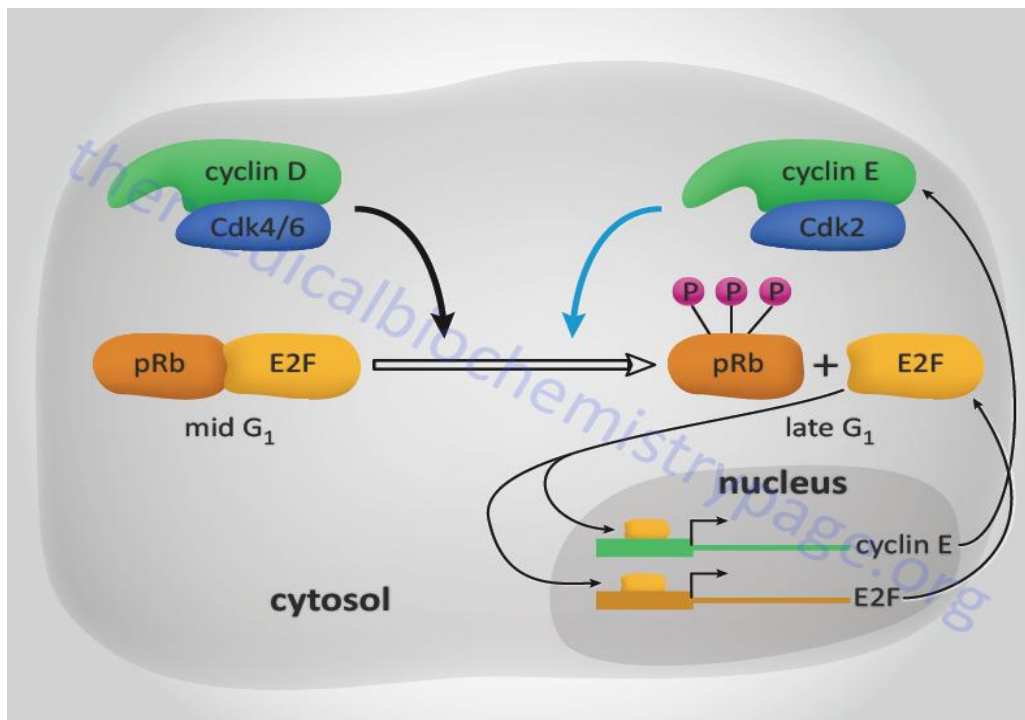
ДНК в ядрото. През краткия постсинтетичен период (G2) се синтезират белтъците на делителното вретено, удвояват се центриолите и се синтезира РНК, стимулираща репликацията в следващия митотичен цикъл. Следва същинското делене – митоза. То се състои от четири фази – профаза, метафаза, анафаза и телофаза.

Клетъчни гени, наречени прото-онкогени, участват в регулацията на нормалната клетъчна пролиферация. Дефекти в тези гени могат да ги превърнат в онкогени отключващи неопластичен растеж. Клетъчният цикъл представлява строго контролирана последователност от процеси имаща основна роля в клетъчната регенерация. Той е подложен на многостъпални регулаторни механизми. Такъв контрол при преминаването на клетката от G1 в S фазата се осъществява от протеини, наречени циклини и свързани с тях ензими – циклин-зависими кинази (CDKs). Комплексът циклин-CDK води до фосфорилиране на белтък – RB. Той се освобождава от комплекса с транскрипционния фактор E2F. Последният преминава в активно състояние като стимулира транскрипцията на гени, активиращи клетъчния цикъл. Други циклини са свързани с фазата G2/M. Активността Cyclin – CDK се контролира от CDK-инхибитори. Съществуват и механизми, които следят за грешки в ДНК репликацията. При установяването на такива се активират ДНК репарационни процеси или клетката се унищожава чрез апоптоза, медирана от p53-зависими механизми. Нарушаването на тези стриктно контролиращи процеси може да доведе до аномалии и малигнена трансформация. Една от основните характеристики на последната е неконтролираното клетъчно делене.



Фиг. 12 Експресията на комплексите Cyclin-CDK по време на клетъчния цикъл. (Modified from Pollard TD, Earnshaw WC: Cell Biology. Philadelphia, WB Saunders , 2002)

Cyclin D е първият от групата, инициращ клетъчния цикъл. Той се свързва с CDK4 в комплекс, който фосфорилира RB. Той играе ролята на пусков механизъм. При фосфорилирането му се освобождава транскрипционен фактор E2F и следва прогресия към S фаза. (фиг.13) В M-фазата клетъчни фосфатази хипофосфорилират RB и последващият цикъл се блокира. По-нататък цикълът преминава към синтетичната фаза и се иницира ДНК репликацията като се формира Cyclin E/CDK2 комплексът. Синтезата на Cyclin E и полимеразите необходими за синтез на ДНК се иницира от E2F.



Фиг. 13 Роля на Cyclin D/CDK4/6 в регулацията на клетъчния цикъл. (medicalbiochemstripage.org)

Прехода G₂/M се иницира от E2F медирана транскрипция на Cyclin A в комплекс с CDK2. Cyclin B/CDK1 комплексът стартира митозата. Инактивирането на този комплекс води до излизане на клетката от митотичен цикъл. От тук тя може да премине в нов или в стадии G₀.

Активността на комплексите Cyclin/CDK е стриктно регулирана от CDK-инхибитори. Те са от два основни класа Cip/Kip и INK4A/ARF. Те реално функционират като туморсупресори и често са увредени при различни видове тумори. Cip/Kip семейството се състои от три основни компонента - p21, p27 и p57, които се свързват с комплексите Cyclin/CDK и ги инактивират. Транскрипционната активация на p21 е зависима от туморсупресорния ген p53. Основаната му роля е регулаторна като стопа прогресията на клетъчния цикъл на увредени клетки или ги тласка към апоптоза. INK4A/ARF семейството има два основни продукта с туморсупресорни функции: p16INK4a и p14ARF. Те блокират клетъчния

цикъл. p16INK4a се конкурира с CyclinD и блокира фосфорилирането на RB като води до арест на цикъла във фаза G1. Често при малигнените неоплазми този ген е мутантен или инактивиран по механизма на промоторното хиперметиране. p14ARF също блокира цикъла на делене, но като въздейства върху p53 чрез блокиране на разграждането му. (44-48)

2.3.3 ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ – ЕПИГЕНЕТИЧЕН МЕХАНИЗЪМ ЗА КОНТРОЛ НА ГЕННАТА ЕКСПРЕСИЯ И ВРЪЗКАТА МУ С КАРЦИНОГЕНЕЗАТА

Някои от генетичните механизми, включени в неопластичната трансформация и прогресията на ПККЛ все още остават неизяснени. Наблюдават се както инактивация на тумор-супресорни гени като *TP53* и *CDKN2A* в около 50% от случаите, така и онкогенна активация, която обаче е по-слабо проучена. (49) Съществуват няколко основни механизма за подтискане експресията на тумор-супресорните гени, имащи отношение към етиологията на ларингеалния карцином. Първият се основава на мутации от типа точкови мутации, делеции и транслокации (50). Друг основен механизъм е ДНК метилирането на CpG – островите в промоторната област на гените. Този механизъм стои в основата на транскрипционното подтискане на тумор-супресорните гени като *CDKN2A* и др. Промоторното хиперметиране е важен епигенетичен механизъм, който има критична роля в регулацията на генната експресия и поддържане на клетъчните функции(51). Промоторният регион на ДНК е разположен откъм 5' края на съответния ген и съдържа специфична ДНК последователност, която има ключова роля в регулацията на генната експресия и транскрипция. В този участък се свързват РНК-полимеразата и протеини играещи ролята на транскрипционни фактори. По този механизъм в процеса на ларингеалната туморогенеза се инактивират важни туморсупресорни гени и такива отговорни за ДНК възстановяването, без да

се променя кодиращата последователност. (52) Характерното за тези промени е стабилното им унаследяване в поколението. ДНК метилирането се осъществява предимно в участъци на промотора, наречени CpG-острови. Болшинството от C-G – двойките в човешкия геном са химически модифицирани чрез ковалентно присъединяване на метилова група към въглерода, намиращ се на пета позиция в пиримидиновия пръстен на цитозина. Тяхната основна функция е да подтискат транскрипцията на съответния ген (53). Въпреки, че болшинството от CpG-последователностите в генома на човек са метилирани, 1 – 2 % от тях представляват неметилирани секвенции от ДНК и това са именно т. нар. CpG-острови (CGIs). (54) Тези секвенции са дълги от 100 до 1000 базови двойки с процентно съдържание на G+C поне 50%.

Характерно за промоторното метилиране е, че то участва и в процесите на контрол на експресията на тъканно специфични гени и по този начин – в процеса на клетъчна диференциация. (71) То стои в основата и на геномният импринтинг като осигурява моноалелната експресия на гените блокирайки единия от двата родителски алела. (81) Метилирането има и стабилизиращ ефект върху ДНК. (84) Т.е. ДНК метилирането не е патологичен, а нормален физиологичен процес.

CpG-островите обикновено са неметилирани в нормални клетки и съдействат за транскрипционното активиране на гените - (168). Метилирането им блокира генната експресия и транскрибиране на гена не се осъществява - Фиг.14 (57).

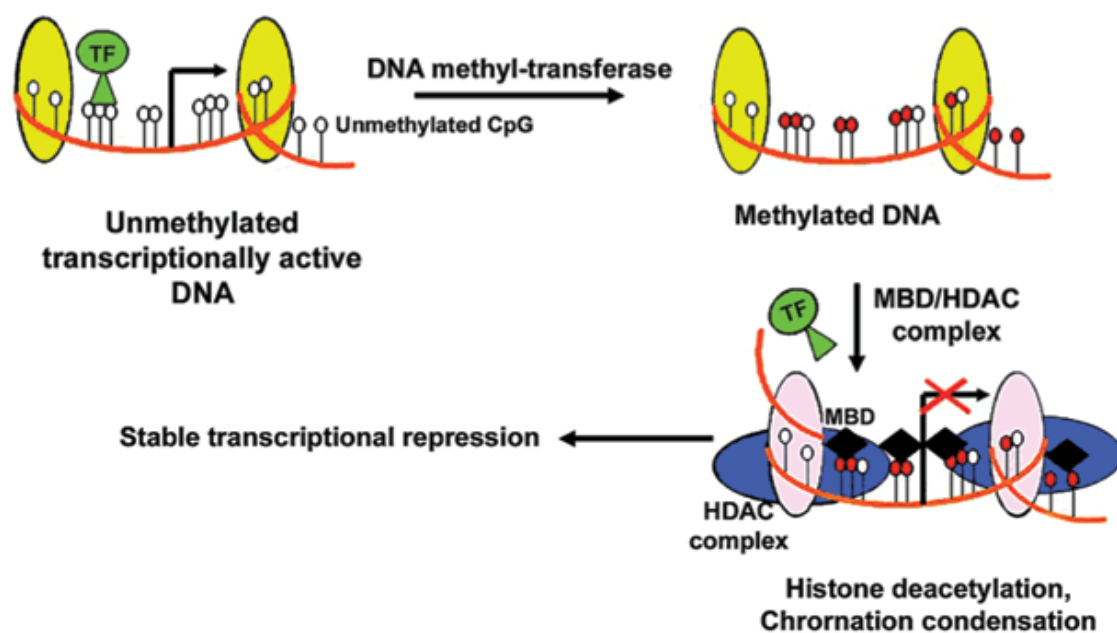


Figure 1 – Epigenetic silencing of gene expression. DNA methyl-transferases carry out the methylation of CpG dinucleotides, which triggers the process of gene silencing by recruitment of methyl binding domain (MBD) and Histone deacetylases (HDAC) to bind to the methylated DNA. This results in histone deacetylation and chromatin condensation leading to loss of transcription factor binding and subsequent repression of transcription.

Фиг.14 Схематично изображение на метилирани CpG – острови в промоторния регион на гена. Секвенциите, разположени пред кодиращата последователност на гена са метилирани, формират се "затворени" нуклеозомни структури, хистоновите опашки са метилирани, което предотвратява протичането на транскрипцията (Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nature genetics 2007, 39(4) : 457-466).

Важен посредник между метилираните CpG – острови и хистонмодифициращите гени са метил-свързващите протеини (MBDs). Те водят до структурни промени в хистоновите белтъци (хистоново деацетиране) и хроматина, които създават транскрипционна инактивация. (72) MBD протеините са свързани с хиперметираните

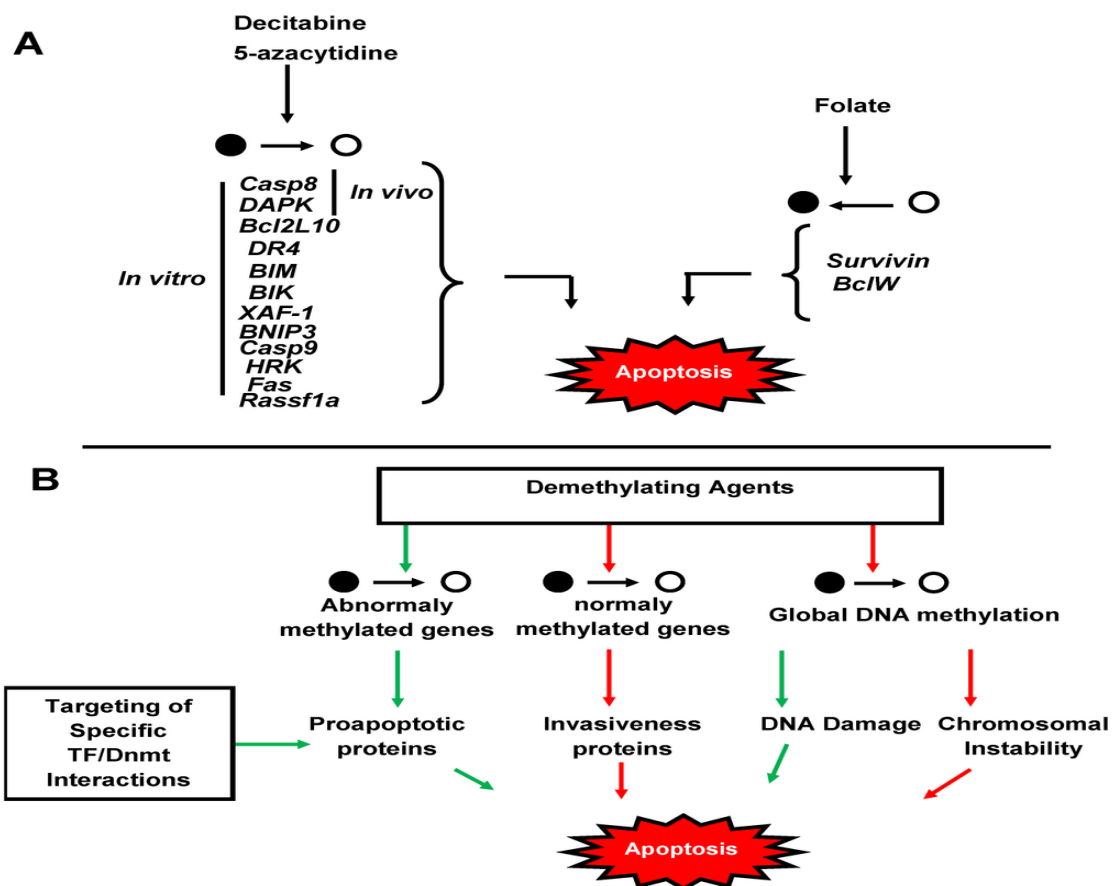
промотори на туморсупресорните гени като показват изключителна туморна специфичност. (73-75)

Защо при едни тумори се наблюдава подчертано хиперметиране, а при други не? Този въпрос продължава да ни вълнува. Според едни автори това се дължи на все още не открити хиперметилirани гени за съответния вид тумор, а според други по-изразено хиперметиране се наблюдава при тумори в региони изложени на по-голяма експозиция на външни канцерогени, какъвто е карциномът на ларинкса. (76,77)

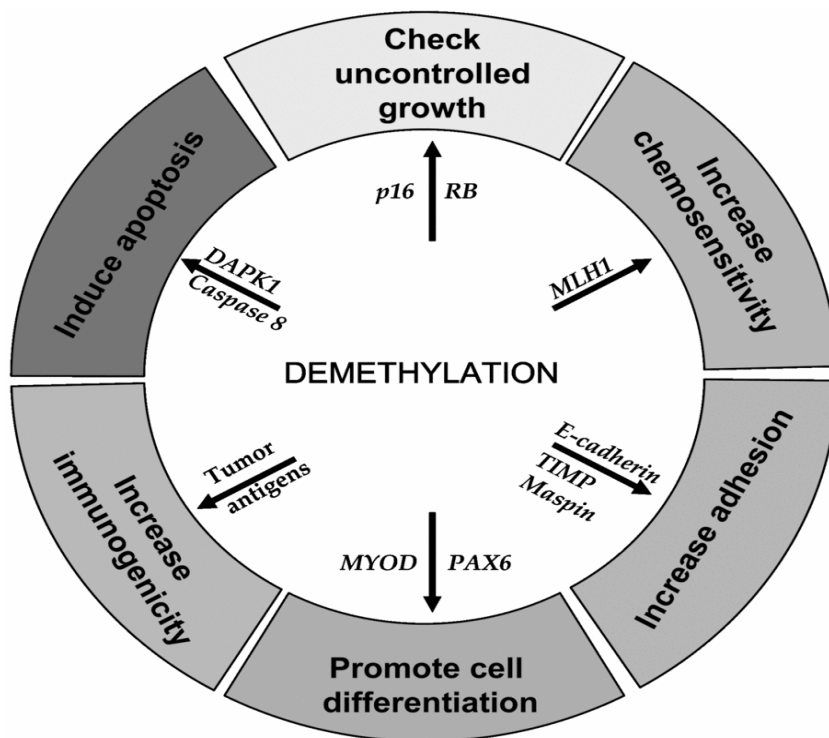
Има няколко хипотези за поддържането на метилационния статус. На този етап е доказано съществуването на ДНК-метилтрансфери (DNMT) – ензими участващи пряко в този процес.(78) Открит е и ензимът деметилаза – ензим, който поправя грешки в метилирането. (79) Четвъртият възможен механизъм за продуциране на хиперметилirани CpG–острови е свързан с хромозомното ремоделиране чрез хистонова метилтрансфераза. Предполага се, че хистоновите модификации предшестват директното метилиране на ДНК (80).

Когато нормалният за клетката процес на метилиране засегне и инактивира туморсупресорни гени, участващи в контрола на клетъчния цикъл (p16, p14 и др.) (151,152,169,170), или в ДНК репарационните системи (MLH1, MGMT, BRCA1) (168,90), карциномния метаболизъм (*GSTP1*), апоптозата (*DAPK*, *APAF-1*, *p14ARF*), хормоналният отговор (*RARB2*) и клетъчната адхезия (*CDH1*, *CDH3*) се превръща в отключващият патогенетичен механизъм на туморогенезата. От друга страна ДНК хипометилирането води до хромозомна нестабилност, загуба на геномен импринтинг, повишаване честотата на делециите и транслокациите, като всичко това повишава риска от малигнена дегенерация. (85,86,87,88)

Съществува голям интерес в търсенето на терапевтични агенти с деметиращи свойства, които да активират инхибираните чрез процеса на хиперметиране туморсупресорни гени. Потенциален проблем пред подобен новаторски подход при лечението на злокачествените неоплазми се явява установената хромозомна нестабилност при геномно хипометиране. Това води до индукцията на тумори при опитни мишки, което е и поредното доказателство, че епигенетичните промени имат съществена роля в туморогенезата.(55) Освен това при потенциално активиране на туморсупресорни гени при деметиращата терапия съществува реална възможност за активиране и на онкогени, подтиснати по механизма на промоторното метилиране (Фигл 15).



Фиг. 15 Роля на ДНК-деметиращите агенти върху апоптозата – противоречиви резултати (Eric Hervouet, Mathilde Cheray et al.)



Фиг. 16 Цели на епигенетичната терапия
(www.biochemsoctrans.org)

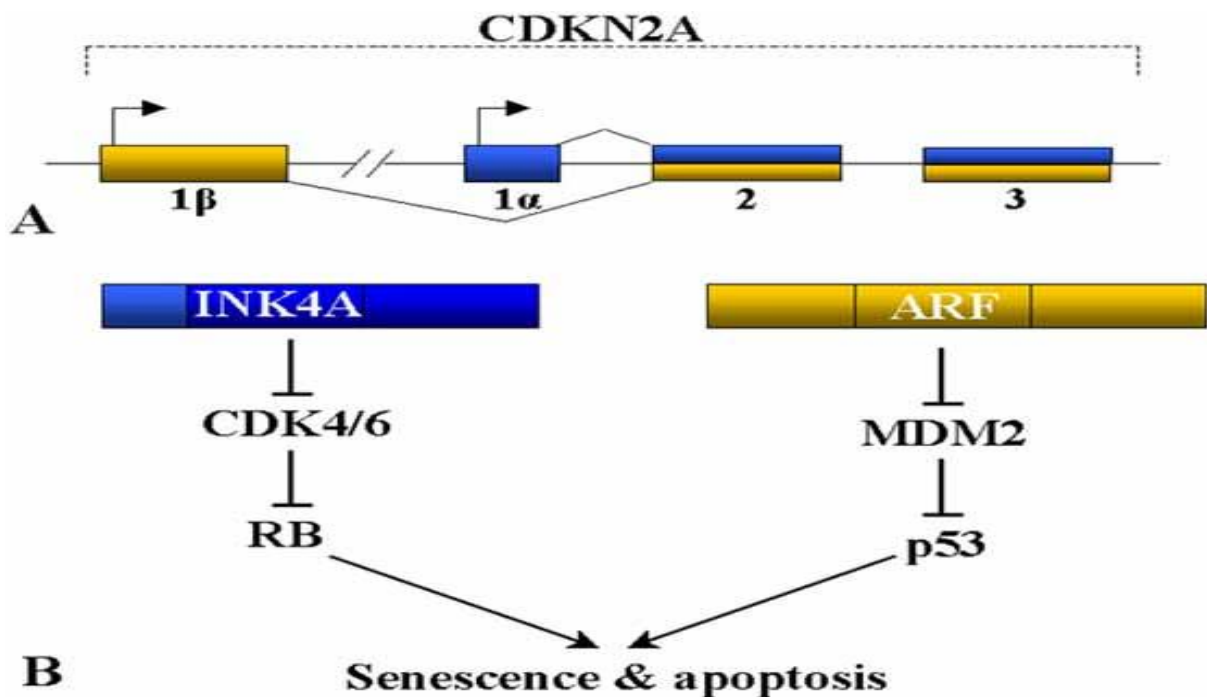
На фигура 16 са показани целите на епигенетичната терапия. Тя е фокусирана върху деметилирането на промоторните региони на аберантно инхибирани гени на малигнените клетки. Деметилирането води до многообразни ефекти. Деметилирането на *MLH1* например се последва от активацията на този ген и повишаване на чувствителността към химиотерапия. По подобен начин деметилирането и реактивирането на *E-cadherin*, *MYOD*, туморни антигени, *DAPK1* и *p16* води до клетъчна адхезия и диференциация, повишена имуногенност на туморните клетки, индукция на апоптозата и инхибиране на неконтролирания клетъчен растеж.

Епигенетични и генетични увреди имат доказана роля в карциногенезата на ларингеалния карцином и на карциномите на главата и шията като цяло (98,171) Промоторното хиперметилиране е един от важните фактори при възникването на рака на гръкляна (100,101,172). По

данни от публикуваната до сега литература най-често инхибираните гени по този механизъм при карцинома на ларинкса са CDKN2A, MGMT, MLH1 и DAPK (98, 100, 103, 104, 171)

2.3.4 CDKN2A И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА

Генът CDKN2A е разположен в локус 9p21 на човешкия геном и изпълнява ролята на тумор-супресорен ген като инхибира клетъчния цикъл. Той има два продукта – p16INK4a (инхибитор на киназа 4) и алтернативният на него p14ARF (alternative reading frame). Те се различават по първия си екзон и имат еднакъв 2-ри и 3-ти. P16INK4a се конкурира с Cyclin D за свързване с CDK4, инхибира комплекса Cyclin D/CDK4 като по този начин предотвратява фосфорилирането на RB и блокира клетъчния цикъл в късната G1 фаза. p14ARF също спира клетъчния цикъл, но като инхибира разграждането на p53 от утилизиращия го ензим.



Фиг. 17 Туморсупресорна активност на CDKN2A (Omar Kabbarah и Lynda Chin Harvard Medical School, Boston, USA)

Липсата на функционален p16INK4A продукт следователно води до хиперфосфорилирането на Rb1, в резултат на което се стига до освобождаване на E2F и прогресия на клетъчния цикъл. (105) За разлика от p16INK4A, p14ARF инхибира MDM2 ензима, който разгражда p53. Активираният p53 активира p21. Последният блокира CyclinE/CDK2 медираното фосфорилиране на RB и от там се стопира клетъчния цикъл по описания вече механизъм.

Установени са три основни пътя на инактивиране на CDKN2a при карциномите на главата и шията (106,107,169,170) със следните средни честоти – промоторно хиперметиране (33%), точкова мутация (15%) и хомозиготна делеция (22%). (110,107, 112-115, 116-127) Според различните автори честотата на метилирането варира от 17% до 67%. Интересен е фактът, че този ген си повишава експресията с напредване на възрастта, което най-вероятно е свързано с клетъчното стареене. (128)

Смята се, че CDKN2A се уврежда в ранните етапи на ларингеалната карциногенеза като се засяга в до 80% от случаите. (157-160) Процентът на мутациите на гена при карциноми на главата и шията варира в широки граници по данни на различните автори – от 9% до 58%. (161-163) Най-често в процесът се засяга екзон 2. (161,164)

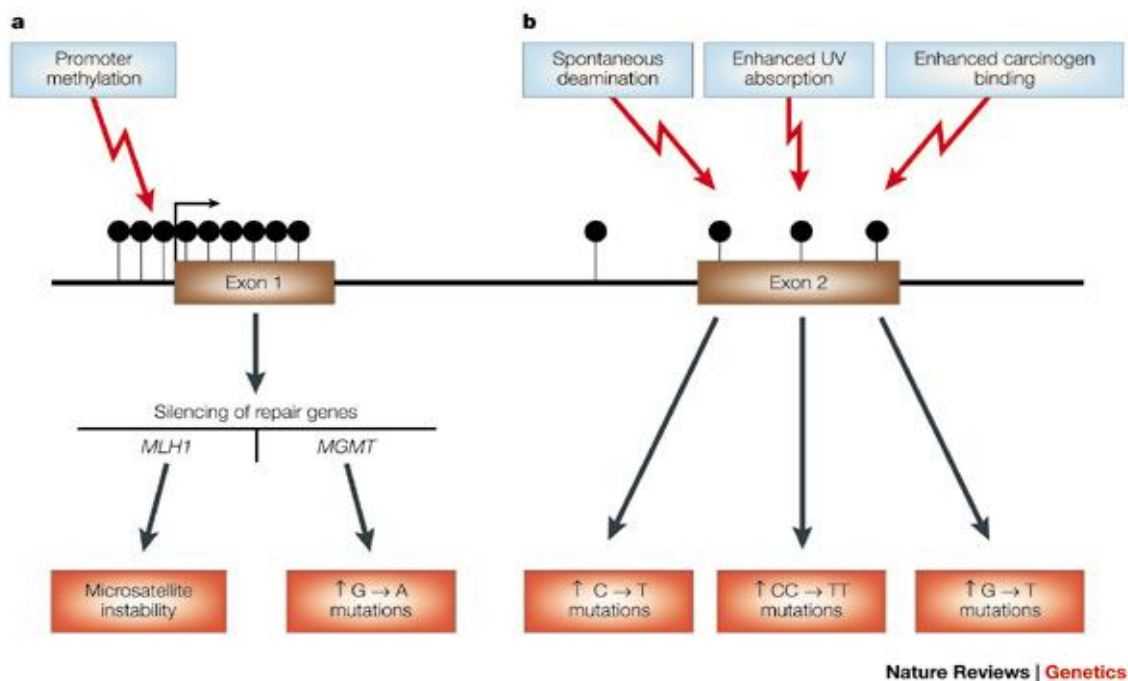
2.3.5 MLH1 И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Генът MLH1 е локализиран в 3p21.3 локуса на човешкия геном. *MLH1 (human mutL homolog 1)* се отнася към *Mismatch Repair Genes (MMR)*.

Човешкият организъм е изложен непрестанно на въздействието на различни карциногени от заобикалящата го среда. Тяхното въздействие води до непрестанни ДНК увреди. Грешки в генома на клетките възникват и спонтанно при ДНК репликацията. Организмът ни обаче има изградени

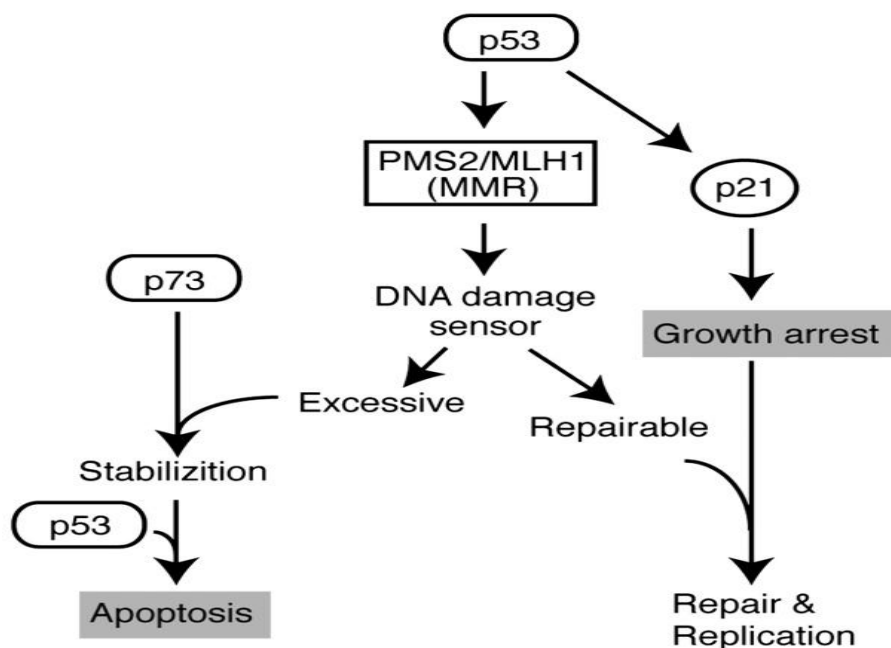
сложни репарационни системи предпазващи ни от неопластична трансформация.(129) Хората, родени с дефекти в репарационните системи на клетките са с подчертана геномна нестабилност и висок онкогенен риск. Самите ДНК възстановяващи гени нямат директен неопластичен ефект, но дефектите в тях водят до мутации в други гени и от там до малигнена клетъчна трансформация. От това може да заключим, че при инхибицията на ген като MLH1 чрез промоторно хиперметиране една епигенетична увреда води след себе си до каскада от генетични дефекти. (130).

Промоторно метилиране на MLH1 гена е установено при 23-47% от туморите на ларинкса (171,132). Не се открива асоциация между промоторното хиперметиране на MMR гените и размера на туморите, както не е установена и връзка с наличието на метастази в лимфните възли или стадия на заболяването (133). За разлика от очакваната микросателитна нестабилност, наблюдавана при неполипозния дебелочревен карцином, при карцинома на ларинкса инактивирането на MLH1 не води до този дефект. Същият феномен е наблюдаван и при овариален карцином (Arzimanoglou 2002), което потвърждава факта, че геномната стбилност се контролира и от други гени. Установена е и корелация с патохистологичния статус. Според някои проучвания инактивирането на този ген е в корелация с по-ниска степен на диференциация на ларингеалния карцином. (136) Според други обаче инактивирането на MLH1 се среща предимно при високодиференцираните варианти на ларингеален карцином, докато при CDKN2a се наблюдават предимно нискодиференцирани. (171)



Фиг. 18 Промоторно хиперметиране на *MLH1* и *MGMT* (Peter A Jones and Stephen B Baylin/ Nature Reviews).

Хиперметирането на *MLH1* води до микросателитна нестабилност, а на промотора на *MGMT* – до G→A мутации. Подобен процес на метилиране може да засегне освен промотора и кодиращите езони на гена, което също повишава мутационната честота и появата на C→T транзиционни мутации, които са чести при карцинома на кожата. Много интересен е и факта, че метилираните CpG-острови са предпочитано място за свързване и въздействие на карциногени от цигарения дим, което някои автори го свързват пряко с карциномите на горните дихателни и храносмилателни пътища при пушачите. (111)



Фиг.19 Роля на MLH1 и PMS2 при апоптозата и ареста на клетъчния растеж при ДНК увреда

(Jiguo Chen and Ivan Sadovski PNAS 2005, vol.102 no.13).

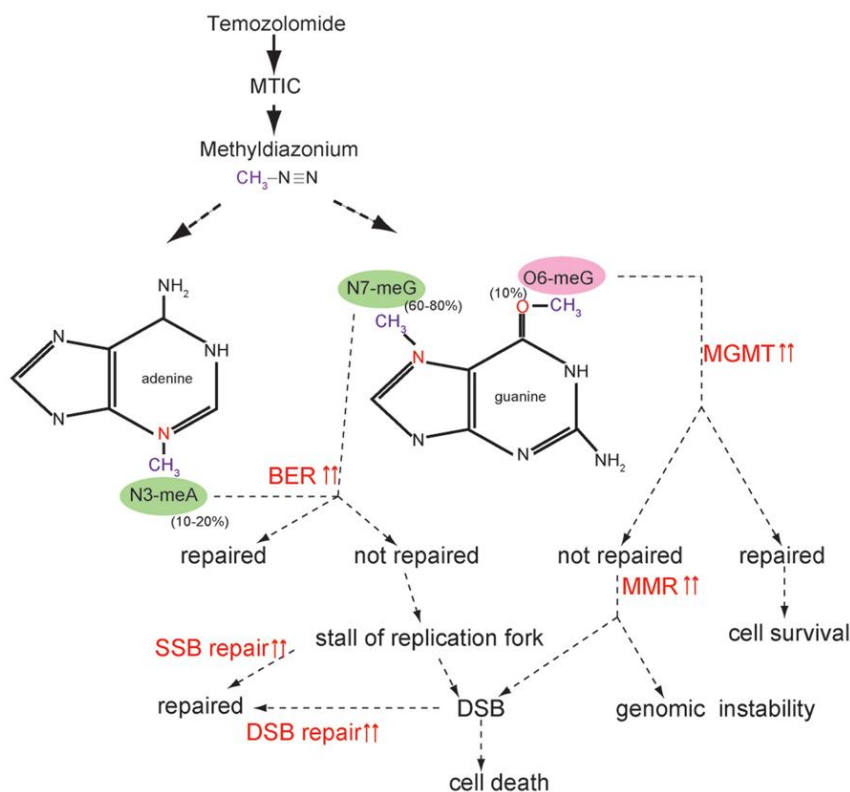
MLH1 и PMS2 протеините се индуцират от p53 при ДНК увреда и функционират като сензори. При преминаване на допустимия критичен праг на поражението се стига до индукция на апоптозата. При възстановим дефект се активира арест на клетъчния цикъл и ДНК възстановителните системи.

2.3.6 MGMT И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА

MGMT е друг представител от репарационната система на клетката, който е локализиран в късото рамо на хромозома 10 (10q26). Той защитава организма от алкилиращи агенти. (134) Под тяхно въздействие базата гуанин се метилира или алкилира и се превръща в O-6-метилгуанин. Тази дефектна база при репликацията се чете като аденин. В действителност G→A е характерен белег за много видове човешки тумори. (174) Натрупването на такава грешка може да засегне други ключови гени като

p53, K-ras онкогена и други. При поправка на погрешно сдвоените бази метил-трансферазата захваща метиловата група от алкилирания гуанин, при което базата се възстановява. Метил-трансферазата обаче претърпява необратима инактивация, в резултат на което метилираният белтък се натрупва в клетката като краен продукт на реакцията.

Много интересен е фактът, че инхибирането на MGMT създава предпоставки за мутации и туморогенеза, но при глиобластома например е доказано, че високата активност на този ген е свързана с по-лоша прогноза. Причината за това е резистентността на тумора на химиотерапия с алкилиращи агенти, като темозоломид. При епигенетичната инактивация на експресията му приложената терапия води до генетични увреди индуциращи цитотоксичност и апоптоза. (138)



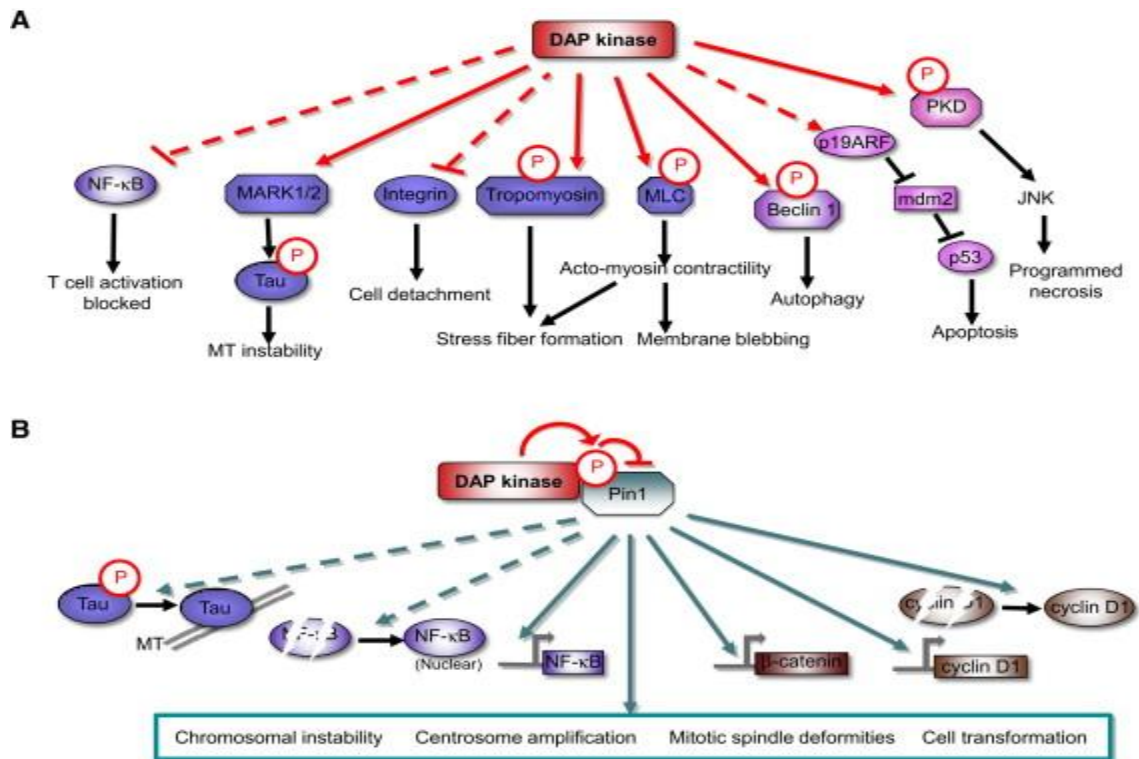
Фиг. 20 (Koji Yoshimoto, Masahiro Mizoguchi, Nobuhiro Hata et al. Front. Oncol. (2012) 10.3389)

В организма темозоломидът се конвертира в метилдiazониев катион, който е и активният алкилиращ агент. При активен MGMT дефектът се възстановява и това води до оцеляване на туморната клетка. При нефункциониращ ензим под въздействието на MMR гените клетката се тласка към апоптоза. Когато те обаче работят неправилно, това води до амплификация на геномната нестабилност. Наличието на алтернативни репарационни системи може да обясни наличието на резистентност към препарата (Фиг. 20). (139)

При голяма част от туморите при човека липсва експресия на MGMT(174,141,142). Загубата на експресия на този репарационен ген се дължи на мутации, но при по-голямата част от случаите – на хиперметилиране на регулиращия го промоторен участък. (143,144-146).

Данните за промоторно хиперметилиране на MGMT при карцинома на ларинкса варират значително между отделните автори – от 16% до 50%.(147, 173,149, 150)

2.3.7 DAPK И РОЛЯТА И В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА



Фиг. 21. DAPK сигнална мрежа. (Shani Bialik, Adi Kimchi Mol. Cell (2011), 42;2:139-141)

Pin1 е свързан с регулацията на много клетъчни функции като митоза, клетъчен цикъл, туморогенеза, имуен отговор, невропротекция и апоптоза. Неговата експресия е стриктно контролирана при нормалните клетки и нараства драматично при малигнените неоплазми. Критична роля в тази изключително важна за клетката система оказва DAP киназата.

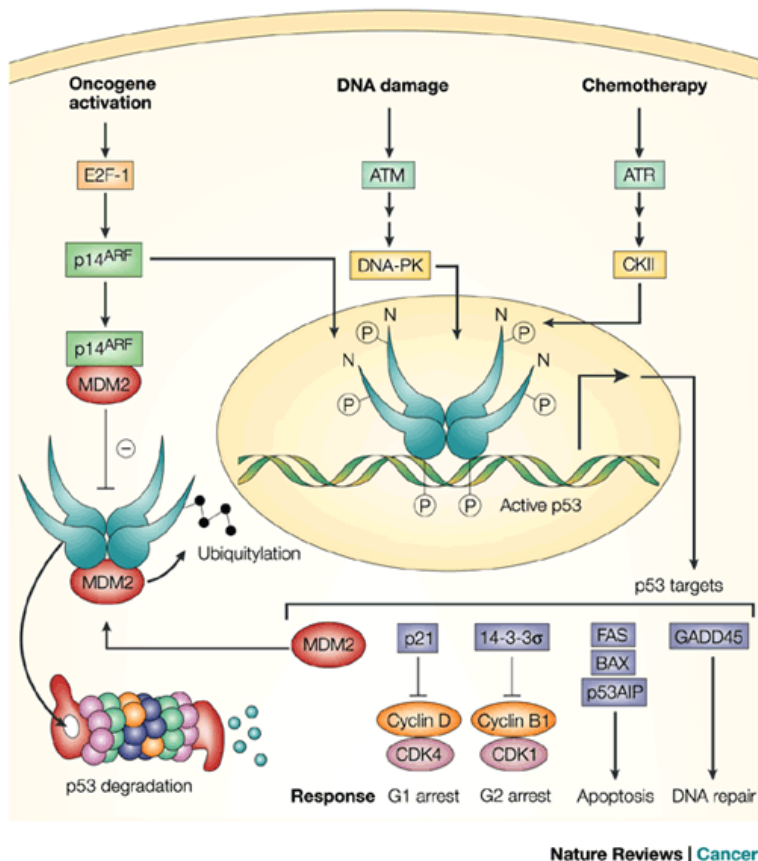
DAPK в норма фосфорилира Pin1 блокира натрупването му в ядрото и подтиска активността му. Така се блокира транскрипцията на всички гени от DAPK – път, които са свързани с клетъчната пролиферация и преживяемост (транскрипционен фактор NFκB, β-catenin участващ в междуклетъчните контакти, Cyclin D1 – регулатор на клетъчния цикъл). Промоторното хиперметиране на DAPK е свързано с епигенетичната му

инактивация и отпадане на контрола му върху Pin1. Всичко това води след себе си до хромозомна нестабилност, центромерна амплификация, деформации на делителното вретено и клетъчна трансформация. (153) DAPK е най-добре позната като медиатор на клетъчната смърт чрез апоптоза и автофагия. Установено е, че инхибицията на Pin1 потиска повишената клетъчна миграция, която се наблюдава при изчерпаването на DAPK при пациенти с карцином на гърдата. Т.е. DAPK притежава и антиметастатични функции. Дали това е така при карцинома на ларинкса?

Данните за степента на промоторно хиперметиране на DAPK при карцинома на ларинкса в литературата са оскъдни. Повечето проучвания са правени за карциномите на главата и шията като цяло. По данни на Wei-Jia Kong и екип от 2005г. степента на промоторно хиперметиране при ларингеалния карцином е 67,2% като не е намерена връзка със степента на диференциация на тумора и T-стадия. Екипът обаче е установил съществена разлика на промоторното хиперметиране между пациентите без клинично доказани метастази и тези с такива. (165)

2.3.8 P53 И РОЛЯТА МУ В ЛАРИНГЕАЛНАТА КАРЦИНОГЕНЕЗА

На фигура 15 може да се види ключовата регулаторна роля на p53 в туморния контрол. Не случайно той е наречен „пазител” на генома и е най-честата цел на генетична повреда при човешките тумори. При над 50% от тях се откриват мутации в този ген. P53 е ДНК свързващ протеин, който контролира транскрипцията на група други протеини. Около 80% от мутациите засягат свързващият се с ДНК участък. Така се получава функционално неактивен белтък. Друг механизъм за потискане е повишената утилизация на p53 от MDM2. (69,70)



Фиг.22 Роля на p53 в регулацията на клетъчния цикъл и туморния контрол. (Nature Reviews/Cancer)

Главните функции на p53 са арест на клетъчния цикъл и индукция на апоптозата в отговор на ДНК увреда. Арестът на клетъчния цикъл се осъществява чрез p53 зависима транскрипция на CDK инхибитора p21. Това позволява репарирането на ДНК. След това следва бързо разграждане. Ларингеалният карцином има характерен образ на p53 аберациите, който го отличава от други локализации. Установените мутации са по-постоянни, но по-редки в сравнение с белодробния карцином (35% и 60% съответно). При повечето карциноми на главата и шията настъпват промени в ДНК-свързващия домен - екзон 5 до екзон 8. При карцинома на ларинкса мутациите се концентрират в екзон 5. (94). Обект на разработка на генната терапия е въвеждането на див тип p53 чрез модифицирани аденовируси при модели на ларингеален рак. *In vivo*

проучвания демонстрират, че интратуморното въвеждане на подобен рекомбинантен аденовирус води до сигнификантна инхибиция на туморния растеж. (95). Допълнителни проучвания разкриват, че котрансфера на див тип p53 с имуномодулиращи гени като GM-CSF (гранулоцитно-макрофагеален колония стимулиращ фактор) и B7-1 гена индуцира клетъчна апоптоза и повишава имуногенността на туморните клетки, което дава стратегии на комбинираната генна терапия на ларингеалния карцином (96,97).

P53 често се инактивира при прехода от преинвазивен към инвазивен стадий на ларингеалния карцином. При карциномите на главата и шията засягането на p53 се наблюдава при 60-80% от случаите. (154,155) Приблизително 75% от мутациите са missense и засягат ДНК свързващия участък на p53, кодиран от екзони 5-8. (156)

3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

3.1 ЦЕЛИ

- Да се направи оценка на ролята на гените MGMT, MLH1, CDKN2a, DAPK и Trp53 в ларингеалната карциногенеза
- Да се изследва връзката на установените епигенетични и генетични промени с клиничния профил на пациентите и развитието на ларингеалния карцином

3.2 ЗАДАЧИ

1. Да се изследва инактивацията на туморсупресорните гени MGMT, MLH1, CDKN2A и DAPK по механизма на промоторно хиперметиране при пациенти с ларингеален карцином.
2. Да се изследва честотата на мутациите в туморсупресорните гени CDKN2A и TP53.
3. Да се направи анализ на връзката между промоторното метилиране и мутациите в посочените гени с тютюнопушенето и употребата на алкохол.
4. Да се анализира връзката на промоторното метилиране и мутациите в тези гени с клиничния стадий и прогресията на ларингеалния карцином.
5. Да се направи анализ на връзката на изследваните гени с процеса на метастазиране.
6. Да се установи има ли връзка на промоторното метилиране и мутациите на изследваните от нас гени с преживяемостта и прогнозата.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В проведените изследвания бяха включени 105 пациенти с клинично и патохистологично доказан карцином на ларинкса. Всички те са оперирани в клиниката по УНГ болести на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” гр. София за периода от 2009 – 2012г. Предоперативно клиничната диагноза бе потвърдена с ендоскопска ларингеална щипкова биопсия под обща интубационна анестезия и патохистологично изследване. Последното даваше данни за вида на малигнената неоплазма и степента на диференциация. На нито един от включените в проучването болни не бе прилагана предоперативна химио или лъчетерапия. Всеки участник бе подробно информиран за естеството и целите на провежданите изследвания в деня преди извършването на хирургичната интервенция. След получаването на писмено информирано съгласие бе снета подробна анамнеза и клиничен статус. Пациентите се стадираха предоперативно и интраоперативно по TNM класификацията на СЗО. Видът на извършваната оперативна интервенция се определяше от стадия на развитие на малигнената неоплазма и придружаващите заболявания при щателна преценка на анестезиологичния и оперативния риск, като всичко това се съобразяваше и с информираното решение на пациента.

4.2 БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

Интраоперативно до 15-тата минута след отстраняването на тумора се взимаше материал от неоплазмата от макроскопски здрав участък и от метастатични лимфни възли при наличието на такива. Материалът бе поставян в стерилни контейнери за да се избегне замърсяване с чужда ДНК и бе етикетирани подробно, след което се поставяше и се транспортираше до Центъра по молекулна медицина в дюар с течен азот. В центъра съхранението се извършваше при температура от -80°C.

4.3 ПРЕДВАРИТЕЛНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИЯ МАТЕРИАЛ

4.3.1 ЕКСТРАКЦИЯ НА ДНК ОТ ТУМОРНА ТЪКАН

Екстракцията на ДНК от свежо-замразената туморна тъкан беше извършена посредством QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) според дадените от производителя инструкции. Качеството и количеството на ДНК материала бе оценено с NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

4.4 ИЗСЛЕДВАНЕ НА МЕТИЛАЦИОНЕН СТАТУС ПОСРЕДСТВОМ MS-HRM (METHYLATION-SENSITIVE HIGH-RESOLUTION MELTING)

MS - HRM бе проведено, като се използва метилационно независими праймери (MIPs) за бисулфитно модифицирана ДНК, които хибридизират към и амплифицират еднакво, както метилираните така и неметилираните последователности. Праймерите бяха продуцирани съгласно описаните в литературата стандарти. (166,167) Праймерите е необходимо да съдържат лимитиран брой CpG-динуклеотиди и те трябва да се държат възможно по-далече от 3' края на праймерите. Наличието обаче на един или два CpG позволява контрол на PCR отклоненията чрез нагласяване на подходящата температура за реакцията. Използвана бе следната последователност от праймери:

- MGMT : F-GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT (61°C)
R-AACGACCCAAACACTCACAAA
- CDKN2A: F-CGGAGGAAGAAAGAGGGGGT (66°C)
R-CGCTACCTACTCTCCCCCTCT
- MLH1: F-TAAAAACGAATTAATAGGAAGAG (56°C)
R-TACCCGCTACCTAAAAAATATAC
- DAPK: F-GGGAGTCGTTAGGAATGTGGT (63°C)
R-TCACTAAAAACAATCTCTCTCCAA

MS-HRM анализ бе направен на Rotor Gene Q (Qiagen, Valencia, CA), като за добавъчно багрило се използва SYTO®9. Реакционната смес съдържаше 30ng бисулфитно модифицирана ДНК, 1xPSR буфер, 1,5 mM MgCl₂, 100µM dNTPs, 120nM от всеки праймер, 1.2 µM SYTO®9 и 1.5 U Taq Polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) при финален обем от 25µl. Цикълът започна с денатурация на 95°C за 3 минути, последвано от 40 цикъла за MGMT, 35 цикъла за CDKN2A и 50 цикъла за MLH1 и DAPK при 95°C за 10s. Следва загряване за 20s при посочените по-горе в таблицата температури, елонгация на 72°C за 20s и финална синтеза при 72°C за 2 минути. HRM бе проведено при температури от 65 до 90°C при температурно покачване от 0.2°C/s.

За контроли бяха използвани метилирани и неметилирани EpiTect Control DNAs на Qiagen, Valencia, CA. Междинни проценти от метилирана ДНК (25%, 50% и 75%) бяха приготвени чрез разреждане и използвани за оптимизиращите фази и за профилиране на пробите от ларингеален карцином. По време на фазите на оптимизация всички контроли – неметилираните, 25%, 50%, 75% и 100% метилираните се използваха за прецизиране на подходящите условия и за определяне на точните температури на топене в зависимост от нивото на метилиране. Най-ниска температура на топене се наблюдава при неметилираните, а най-висока – при 100% метилираните.

За оценка на метилационния статус на пробите се използваха три контроли – неметилирани, 50% метилирани и 100% метилирани. Пробите се охарактеризираха според най-близката крива на топене. Поради липса на микродисекция и взимането на материал от сърцевината на тумора в него съществуваше възможност за наличие и на малки количества нормални клетки, чиято ДНК да повлияе на резултатите. За това пробите се отчитаха за метилирани, когато се определяха към групата на 50% и

100% метилираните, а останалите – за неметираните, като се анализираха качествено, а не количествено.

4.5 ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ

(Polymerase Chain Reaction – PCR)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод използван в молекулярната биология и молекулната диагностика. Съкращението PCR идва от английски – polymerase chain reaction. Чрез нея могат да се амплифицират ДНК участъци и да добием големи количества копия от нищожно малко материал. Методът е разработен от *Kary Mullis* в 1985г. PCR е ключова техника, която се използва при повечето анализи в молекулярната медицина, различни клинични диагностични тестове и в съдебната медицина. Чрез PCR могат да се откриват инфекциозни агенти, алелни полиморфизми, да се установи точно типа тъкан за трансплантация, установяване на мутации и изработка на ваксини. Необходими са два вида праймери – прав и обратен. Първият се свързва с кодиращата верига (в посока 5'-3'), а другият се свързва с не кодиращата (в посока 3'-5'). Тези праймери (около 20 бази) хибридизират със срещуположните вериги и служат като субстрат на полимеразата, създаваща комплементарни вериги чрез добавка на нуклеотиди. Четирите вида нуклеозид-трифосфати, полимеразата, матрицата, праймерите, магнезиев дихлорид и подходящ буфер оформят реакционната смес. Амплификацията протича в 20-40 повтарящи се цикъла, всеки състоящ се от 2-3 термични стъпки: денатурация на двойно верижната ДНК (93-95⁰C), свързване на олигонуклеотидните праймери към двата края на таргетната секвенция (50-70⁰C), копиране на желаната последователност чрез удължаване на праймерите от термостабилната (Taq) полимераза (70-75⁰C). Секвенцията между праймерите може да се копира множество пъти. Амплифицираните фрагменти може да се разделят на агарозна гел

електрофореза според размера си, както и чрез високо ефективна течна хроматография и капилярна електрофореза. Визуализацията става след оцветяване на гела с етидиев бромид или SYBR Green и флуоресценция на УВ светлина (трансилюминатор).

Във всяка амплификационна реакция участват няколко съставки. Първата е едноверижна матрица ДНК, получена след термична денатурация на геномната ДНК. Таq полимеразата е термостабилна полимераза необходима за синтеза на ДНК копия. Оптималната температура за синтез с Таq полимеразата е 72°C. Необходими са и праймери, които представляват къси синтетични олигонуклеотиди (14–40 нуклеотида), комплементарни на ограничаващите амплифицираната последователност участъци. От тях започва синтезата на ДНК при всеки нов цикъл на PCR–реакцията. Оптималната концентрация на праймерите в амплификационната реакция е 0,1 – 1,0 μM .

В реакционната смес се добавят и четирите дезоксинуклеотидтрифосфати – dATP, dGTP, dTTP, dCTP в еквимоларни количества. Оптималната концентрация е 20-200 μM за всеки нуклеотид. Необходим ни бе и реакционен буфер, който осигурява подходящото рН=8,3–9,0 на средата и необходимите йони за работа на ензима. Включва в състава си 10-50 mM Tris-HCl с рН=8,3-9,0; до 50mM KCl и 0,5-5,0 mM MgCl_2 .

Секвенциите на използваните в настоящата работа праймери са представени в

Таблица 1.

Праймер	Секвенция	Големина на продукта
CDKN2A_ex1_F	5` CGCCAGCACCGGAGGAAGAAAGA 3`	432bp
CDKN2A_ex1_R	5` TCGCCAGGAGGAGGTCTGTGATTA 3`	
CDKN2A_ex2_F1	5` ACAAGCTTCCTTTCCGTCATGCCG 3`	244bp
CDKN2A_ex2_R1	5` CCAGGCATCGCGCACGTCCA 3`	
CDKN2A_ex2_F2	5` TTCCTGGACACGCTGGTGGT 3`	242bp
CDKN2A_ex2_R2	5` TCTGAGCTTTGGAAGCTCTCAG 3`	
CDKN2A_ex3_F	5` CCGGTAGGGACGGCAAGAGA 3`	169bp
CDKN2A_ex3_R	5` CTGTAGGACCTTCGGTGACTGATGA 3`	
TP53_ex.5F	5` CTTTGCTGCCGTCTTCCAGTT 3`	334bp
TP53_ex.5R	5` TCAGTGAGGAATCAGAGGCCT 3`	
TP53_ex.6F	5` CTGGGGCTGGAGAGACGACA 3`	257bp
TP53_ex.6R	5` CTGCTCACCTGGAGGGCCACT 3`	

TP53_ex.7F	5` CCCCTGCTTGCCACAGGT 3`	240bp
TP53_ex.7R	5` GGTCAGAGGCAAGCAGAGG 3`	
TP53_ex.8F	5` ATGGGACAGGTAGGACCTGA 3`	259bp
TP53_ex.8R	5` GTGAATCTGAGGCATAACTGC 3`	

ЕТАПИ НА ПОЛИМЕРАЗНАТА ВЕРИЖНА РЕАЦИЯ

- ПЪРВИ ЕТАП – ТЕРМИЧНА ДЕНАТУРАЦИЯ НА ДВОЙНОВЕРИЖНАТА ДНК

При 90 до 95°С се осигурява пълно разделяне на двойноверижната ДНК до едноверижни матрици за амплификация.

- ВТОРИ ЕТАП - ХИБРИДИЗАЦИЯ

Представява свързване на праймерите и комплементарните им участъци от матричната едноверижна ДНК. Температурата за осъществяване на това взаимодействие е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и дължината на използваните праймерни секвенции ($4x/G+C/ + 2x/A+T/= t^{\circ}C$).

- ТРЕТИ ЕТАП – СИНТЕЗ НА ДНК КОПИЯ (ЕЛОНГИРАНЕ)

Осъществява се комплементарен синтез на ДНК копия при оптимална температура за максимална ДНК-полимеразна активност. Обикновено тази температура е 72°С.

За извършването на PCR амплификацията ползвахме апарат **BIOER XP 96-well 0.2 ml**.

Продуктите, получени в резултат на PCR реакцията, се разделят електрофоретично на 2% агарозна гел електрофореза и визуализират чрез оцветяване с етидиев бромид.

4.6 ХОРИЗОНТАЛНА АГАРОЗНА ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА

Хоризонталната, агарозна гел - електрофореза дава възможност ДНК – фрагментите да се разделят според молекулната им маса. Тази техника е използвана за определяне *качеството и количеството* на амплификационните продукти. Идентифицирането им се извършва спрямо подходящ молекулен маркер с известна концентрация. Разтвореният в агарозния гел *етидиев бромид* се интеркалира между базите в ДНК молекулата и позволява визуализирането ѝ на UV – светлина. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално рН, фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анода). За анализ и разделяне на PCR продукти се използваха 1.5% агарозен гел (1,5g агароза+20mlTBE буфер рзредени до 100ml с дейонизирана вода) и 5 μ л етидиев бромид с концентрация от 10mg/ml. TBE буферът бе приготвен от 90mM Tris HCl (54g) +90mM борна киселина (27,5g)+ 1mM Na₂EDTA (4,78g) разредени до 1000ml с дейонизирана вода. За визуализацията използвахме UV – трансилюминатор MiniBisPro-Bio Imaging Systems.

4.7 ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ

Секвенирането на PCR продуктите е референтен метод за директен ДНК анализ. При него определянето на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори, работещи на принципа на полиакриламидната електрофореза. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да продължи синтеза на ДНК.

Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез денатурираща полоакриламидна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията.

Директното секвениране протича в няколко последователни етапа. Първоначално е необходима ДНК амплификация посредством PCR. Получените продукти се оценяват чрез хоризонтална агарозна гел-електрофореза. Следва пречистване на продуктите с ExoSAP микс за да се отстранят динуклеотидите, праймерите, солите и неспецифичните продукти. Пречистващият разтвор съдържа два хидролитични ензима – екзонуклеаза I и алкална фосфатаза. Първият ензим разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, а вторият – излишните дезоксинуклеотиди. ExoSAP се смесва в равни съотношения с дейонизирана вода и се прибавя към PCR продукта в количества 1,5 µl PCR продукт: 1,2 µl ExoSAP. Сместа се инкубира на PCR апарат, при следните условия: 30 минути на 37°C и 15 минути на 80°C за инактивиране на двата ензима. Пречистените проби могат да се съхраняват на -20 °C преди пристъпване към секвенционна реакция.

Китът за секвенционната реакция Big Dye[®] Terminator kit v3.1, (Applied Biosystems), включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди, всеки един от които е свързан с различно багрило. Секвенционната реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери. Секвенционната реакция включва етапи на денатурация, хибридизация и елонгация.

След секвенирането следва преутаяване с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Пречистването на продукта включва два етапа. Към пробите се добавя натриев ацетат, ЕДТА и 95% етанол. Така приготвените проби се инкубират за 15 минути на тъмно. Следва центрофугиране за 30 мин. при 3000 gcf и стъпка на отстраняване на супернатантата (центрофугиране за 1 мин. при 160 gcf). Следва допълнително пречистване, като пробите се промиват със 70% етанол (20 мин. при 1650 gcf) и още една стъпка на аспириране. Така приготвените утайки се изсушават на стайна температура, без пряка светлина и се разтварят в 14 µl високо дейонизиран формаamid.

Последният етап е електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции: Секвенционните реакции се обработват и отчитат след нанасяне на автоматичния секвенатор ABI3130xl Sequence Genetic Analyzer, Applied Biosystems. Крайният резултат представлява файл, съдържащ информация за анализираната проба и електроферограма, съдържаща ДНК секвенцията под формата на пикове в различни цветове в зависимост от белязания нуклеотид.

За целите на секвенирането ползвахме автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems) и центрофуга 5810R за плаки (Eppendorf).

4.8 СЛЕДОПЕРАТИВНА ТЕРАПИЯ

Всеки пациент след проведеното оперативно лечение бе представен пред онкологична комисия, състояща се от УНГ хирург, патолог, лъчетерапевт и химиотерапевт. В зависимост от стадия на заболяването, придружаващите заболявания и общото състояние болните се разделиха на групи – такива подлежащи само на проследяване, болни за следоперативна лъчетерапия, за химиотерапия или за съчетана химио- и лъчетерапия.

4.9 СЛЕДОПЕРАТИВНО ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ

Проследяването на болните се извършваше по възприет график. През първата година от оперативната интервенция контролните прегледи се извършваха ежемесечно, през втората година – на всеки три месеца, през третата година – на 6 месеца и до края на петата година – веднъж годишно. Два пъти годишно през първите 2 години на пациентите се извършваше контролно компютъртомографско изследване и ехографско изследване на коремни органи, след което образното изследване се извършваше веднъж годишно до края на петата година. Една част от болните по време на проследяването спряха да се явяват на контролни прегледи и връзката с тях бе изгубена.

4.10 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

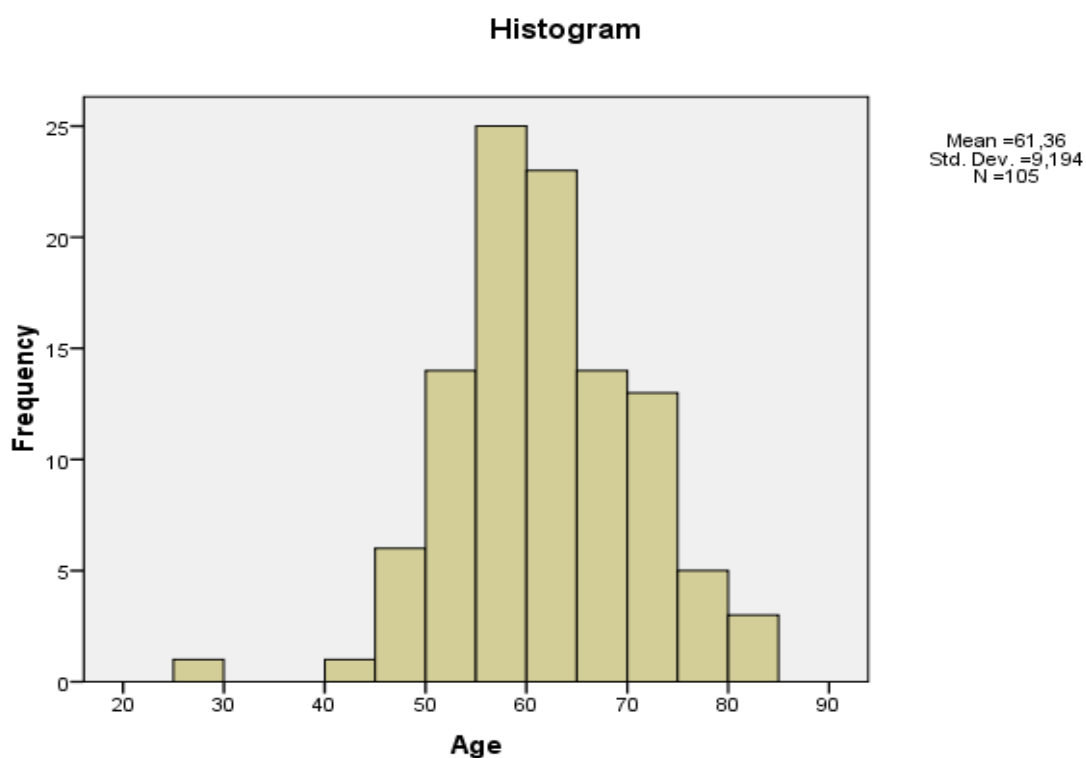
За статистическа обработка на резултатите се използва статистическа програма SPSS версия 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA). За определяне на връзката на промоторното хиперметиране и клиничните характеристики на пациентите използвахме тестът на Fisher и регресионен анализ. Стойности по-малки от 0.05 се смятаха за статистически значими.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ

В направеното проучване бяха включени 105 пациенти с ларингеален карцином. При всички диагнозата бе поставена предоперативно посредством ендоскопска биопсия под обща анестезия и патохистологично изследване. При нито един от болните не беше провеждана предоперативна лъче- или химиотерапия. От всеки болен бе взето писмено информирано съгласие за участие в генетичното изследване и бе снета подробна анамнеза. Оперативното лечение беше извършено в Отделението по онкологични заболявания на главата и шията към Клиниката по УНГ болести на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” гр. София съгласно медицинските стандарти и след предварително стадиране на заболяването по TNM класификацията на СЗО. Биологичен материал беше взет от централната част на тумора до 15-тата минута от отстраняването му. Взеха се и проби от макроскопски здрав участък от лигавицата, както и от отстранени при операцията метастатични лимфни възли. Материалът се поставяше в стерилни контейнери с цел предотвратяване замърсяването с чужда ДНК и се замразяваше в дюар с течен азот. Пробите се транспортираха до Центъра по Молекулна Медицина, където съхранението им се извършваше при температура от -80°C .

Групата пациенти включва 99 мъже и 6 жени. Възрастовото разпределение е представено на фиг. (Фиг 23). Вижда се ясна тенденция за нарастване на заболяемостта след 50 годишна възраст.



Фиг. 23 Възрастово разпределение

Групата болни включва представители на 4 етноса – български, арменски, турски и цигански, като българите представляват основната част с 93,3%. (Таблица 2.)

Етническа група	Брой	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Арменци	1	1,0	1,0	1,0
Българи	98	93,3	93,3	94,3
Роми	2	1,9	1,9	96,2
Турци	4	3,8	3,8	100,0
Общо	105	100,0	100,0	

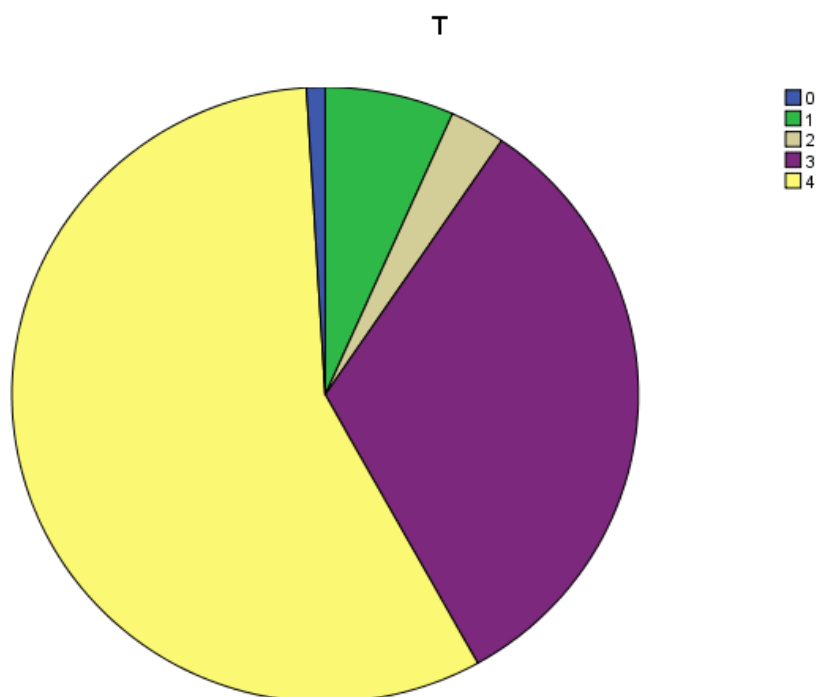
Таблица. 2

Болните бяха разделени на три групи в зависимост от локализацията на процеса. Група номер 1 включва 13 души (12,4%) , при които е засегнат само глотиса. Втората група включва по-голямата част от болните, а именно – 75 човека (71,4%) със засегнат супраглотис и/или субглотис. При група номер 3 включваща 17 човека (16,2%) се наблюдаваше ангажиране на хипофаринкса и/или корена на езика. Тези три групи според локализацията може да ги определим и като прогностични групи с ясно изразена зависимост с преживяемостта.

Показаното разпределение на групите в зависимост от локалното разпространение на заболяването според TNM класификацията, изразява тревожната тенденция за диагностицирането му в късните стадии. При включените в изследването пациенти диагнозата е поставена в T3 и T4 стадий в 89,5% от случаите. (Фиг.24), (Таблица3) При поставяне на диагнозата разпространение в регионалните шийни лимфни възли се установи при 24,8% от пациентите. При 75,2% от случаите такива не бяха открити. (Фиг. 25 и Таблица 4).

T				
T стадий	Брой пациенти	Процент	Валидни проценти	Кумулативни проценти
T0	1	1,0	1,0	1,0
T1	7	6,7	6,7	7,6
T2	3	2,9	2,9	10,5
T3	34	32,4	32,4	42,9
T4	60	57,1	57,1	100,0
Total	105	100,0	100,0	

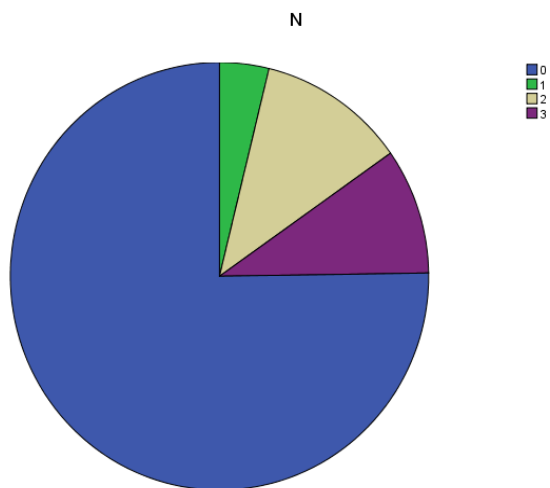
Таблица 3: Разпределение на пациентите според локалното разпространение на процеса. 89,5% от болните в групата са диагностицирани едва в T3 и T4 стадий на заболяването.



Фиг. 24 Разпределение по T-категорията: 0- T0, 1- T1, 2-T2, 3- T3, 4- T4

N				
N стадий	Брой пациенти	Процент	Валидни проценти	Кумулативни проценти
N0	79	75,2	75,2	75,2
N1	4	3,8	3,8	79,0
N2	12	11,4	11,4	90,5
N3	10	9,5	9,5	100,0
Общо	105	100,0	100,0	

Таблица 4: Разпределение на групата според наличието на метастази в регионалните лимфни възли към момента на поставяне на диагнозата.



Фиг. 25 Разпространение на процеса в регионалните шийни лимфни възли 0 – N0, 1 - N1, 2 – N2, 3 – N3

При патохистологичното изследване се определи степента на диференциация на ларингеалния карцином. Най-често се срещаха умеренодиференцираните варианти, а най-редки бяха нискодиференцираните тумори. Последните представляват едва 6,9%.

G				
Степен на диференциация	Брой пациенти	Процент	Валидни проценти	Кумулативни проценти
G1	37	35,2	36,6	36,6
G2	57	54,3	56,4	93,1
G3	7	6,7	6,9	100,0
Общо	101	96,2	100,0	
Липсващи данни	4	3,8		
Общ брой	105	100,0		

Таблица 5: Разпределение на групата според резултатите от патохистологичното изследване.

Резултатите в изследваната група пациенти потвърждават факта, че тютюнопушенето е сред водещите етиологични фактори в патогенезата на ларингеалния карцином. Непушачите представляват едва 8,9%. 40,6%

пушат до 1 кутия дневно, 38,6% - между 1 и 2 кутии дневно, останалите 11,9% пушат над 2 кутии на денонощие. Подобни са и резултатите за другият водещ етиологичен фактор – алкохолът. Едва 20,8% от групата са болни неупотребяващи или рядко употребяващи алкохол. Всички останали консумират спиртни напитки ежедневно, като 38,6% - в големи количества (Таблица 6 и Таблица 7).

Тютюнопушене					
		Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Групи според количество цигари	0	9	8,6	8,9	8,9
	1	41	39,0	40,6	49,5
	2	20	19,0	19,8	69,3
	3	19	18,1	18,8	88,1
	4	12	11,4	11,9	100,0
	Общо	101	96,2	100,0	
Липсващи данни		4	3,8		
Общо		105	100,0		

Таблица 6 : Разпределение на пациентите според тютюнопушенето.

0 - Непушачи 1 - До 20 циг./дн. 2 - 20-30 циг./дн. 3 - 30-40 циг./дн. 4 >40 циг./ дн.

Алкохол					
		Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Групи според количество алкохол	0	21	20,0	20,8	20,8
	1	16	15,2	15,8	36,6
	2	25	23,8	24,8	61,4
	3	39	37,1	38,6	100,0
	Общо	101	96,2	100,0	
Липсващи данни		4	3,8		
Общо		105	100,0		

Таблица7 : Разпределение според употребата на алкохол.

0 - Неупотребяващи или рядко употребяващи алкохол 1- До 100мл. конц./дн. 2 - 100-200 мл. конц. /дн. 3 - > 200мл. конц./дн.

5.2 АНАЛИЗ НА ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK

Метилационният статус на изследваните от нас гени бе осъществен по метода MS-HRM (METHYLATION-SENSITIVE HIGH-RESOLUTION MELTING), който е описан в раздела „Материали и Методи”. Резултатите

от метилирането на MGMT, MLH1, CDKN2A и DAPK за всеки отделен пациент са представени в таблица 8 :

Пациент №	Промоторно хиперметиране на MGMT	Промоторно хиперметиране на MLH1	Промоторно хиперметиране на CDKN2A	Промоторно хиперметиране на DAPK
1	M/U	M/U	U	M/U
2	M/U	M/U	M/U	M/M
3	U	M/M	U	M/M
4	U	M/M	U	U
5	M/M	M/U	M/U	M/M
6	U	U	M	U
7	U	M/U	U	M/M
8	M/M	M/U	M/U	U
9	M/U	M/M	U	M/M
10	M/M	M/U	M/U	M/U
11	U	U	U	U
12	M/M	M/U	U	M/U
13	M/M	M/M	M/U	M/U
14	M/M	M/U	M	U
15	M/M	M/U	M/U	M/M
16	M/M	U	M/U	M/U
17	M/U	M/M	M	M/M
18	M/U	M/U	M	U

19	M/U	M/U	M	M/U
20	M/M	U	M	U
21	M/U	M/U	U	M/M
22	M/M	M/U	U	M/U
23	M/U	M/U	M	U
24	U	M/U	M/U	M/M
25	U	U	U	M/U
26	M/U	M/U	M	U
27	U	M/U	U	U
28	M/U	U	M	M/U
29	U	U	M/U	M/U
30	M/U	M/U	U	M/M
31	M/U	M/U	M	M/M
32	U	U	U	M/U
33	M/U	M/U	U	M/M
34	U	U	M	M/U
35	M/U	U	M/U	U
36	M/M	M/U	M	U
37	M/U	M/U	M/U	M/M
38	-	-	-	-
39	U	M/U	U	M/U
40	-	-	-	-

41	M/U	M/U	U	U
42	U	M/U	M/U	M/U
43	M/U	U	M	U
44	U	U	U	U
45	U	U	M	U
46	U	U	M/U	U
47	U	U	M/U	M/U
48	U	U	U	U
49	U	U	U	M/M
50	U	U	M/U	M/U
51	U	U	M	M/U
52	M/U	U	M/U	M/U
53	U	U	U	M/U
54	U	U	M	U
55	U	U	U	U
56	U	U	U	U
57	M/U	U	U	U
58	U	U	U	U
59	U	U	U	M/U
60	M/U	U	M/U	U
61	M/U	U	U	U
62	M/M	U	M/U	U

63	M/U	U	U	U
64	M/U	M/M	U	M/M
65	M/M	M/U	M/U	M/M
66	M/M	U	U	M/M
67	M/U	M/U	U	U
68	U	U	U	U
69	U	M/M	U	U
70	M/U	U	M	U
71	M/M	U	M/U	U
72	M/U	U	M/U	U
73	M/U	U	U	U
74	-	-	-	-
75	M/U	U	U	U
76	U	U	M/U	U
77	M/U	U	M/U	U
78	M/U	U	U	U
79	M/M	U	M/U	U
80	M/U	M/M	U	M/U
81	M/U	U	M/U	U
82	M/U	U	U	U
83	M/U	M/M	U	U
84	M/M	U	U	U

85	M/U	U	U	M/U
86	M/U	M/U	U	U
87	U	M/U	U	M/M
88	M/U	M/U	U	U
89	M/U	U	U	U
90	M/M	M/U	M/U	U
91	M/U	M/U	U	U
92	U	M/U	M	U
93	M/U	M/U	U	U
94	U	M/U	M/U	U
95	M/U	U	U	U
96	U	U	U	U
97	U	U	U	U
98	U	U	M/U	M/U
99	U	U	U	U
100	U	M/U	U	U

Таблица 8: Анализ на промоторното метилиране на гените MGMT, MLH1, CDKN2a и DAPK чрез MS-HRM. В червено са означени положителните за метилиране проби.

Извърши се статистическа обработка на получените резултати. Анализ на метилационния статус се осъществи на 100 пациенти, като при трима от тях пробите не бяха качествени и отпаднаха от обработката на

данните. От реално проучените 97 души промоторно метилиране на гена MGMT бе установено при 60,8% (Таблица 9).

MGMT_HRM				
Групи според метилирането	Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Неметилиран	38	36,2	39,2	39,2
Метилиран	59	56,2	60,8	100,0
Общо	97	92,4	100,0	
Липсват данни	8	7,6		
Общо	105	100,0		

Таблица 9: Промоторно метилиране на гена MGMT.

След извършването на метилационен анализ се установи, че транскрипцията на MLH1 е блокирана по този епигенетичен механизъм в 46,4% от изследваните пациенти с карцином на ларинкса (Таблица 10).

MLH1_HRM				
Групи според метилирането	Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Неметилиран	52	49,5	53,6	53,6
Метилиран	45	42,9	46,4	100,0
Общо	97	92,4	100,0	
Липсват данни	8	7,6		
Общо	105	100,0		

Таблица 10: Промоторно метилиране на гена MLH1.

Степента на метилиране беше изследвана и за другите два гена – CDKN2a и DAPK, като бяха установени следните резултати: 47,4% метилиране при първия и 42,3% - при втория ген (Таблица 11, 12).

CDKN2A_HRM				
Групи според метилирането	Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Неметилиран	51	48,6	52,6	52,6
Метилиран	46	43,8	47,4	100,0
Общо	97	92,4	100,0	
Липсват данни	8	7,6		
Общо	105	100,0		

Таблица 11: Честота на промоторното метилиране на гена CDKN2A

DAPK_HRM				
Групи според метилирането	Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Неметилиран	56	53,3	57,7	57,7
Метилиран	41	39,0	42,3	100,0
Общо	97	92,4	100,0	
Липсват данни	8	7,6		
Общо	105	100,0		

Таблица 12: Честота на промоторното метилиране на гена DAPK.

Интересни резултати се получиха при обединяването на изследваните пациенти в групи в зависимост от броя инхибирани гени по пътя на промоторното метилиране. Едва при 10,3% от болните не беше установено метилиране на нито един от посочените туморсупресорни гени. При останалите 89,7% поне един от тях е инхибиран, а при 10,3% е блокирана транскрипцията и на четирите гена (Таблица 13).

ОБЩ МЕТИЛАЦИОНЕН СТАТУС – БРОЙ МЕТИЛИРАНИ ГЕНИ					
		Брой пациенти	Проценти	Валидни проценти	Кумулативни проценти
Има данни	0	10	9,5	10,3	10,3
	1	24	22,9	24,7	35,1
	2	32	30,5	33,0	68,0
	3	21	20,0	21,6	89,7
	4	10	9,5	10,3	100,0
	Общо	97	92,4	100,0	
Липсват данни		8	7,6		
Общ брой		105	100,0		

Таблица 13: 0 – пациенти, при които не се установява метилиране на нито един от изследваните гени; 1- пациенти с метилиран 1 ген; 2 – пациенти с

метилирани 2 гена; 3 – пациенти с метилирани 3 гена; 4 – пациенти, при които чрез промоторно метилиране са инхибирани и четирите от изследваните гени

Най-висока честота на метилиране бе установена при гена на метилгуанинметилтрансферазата (MGMT), където 59 от туморите (60,8%) бяха с блокирана транскрипция по този механизъм. Вторият по честота на метилиране е CDKN2A с 46 от туморите (47,4%). MLH1 беше метилиран в 46,4% от случаите (45 болни). Най-ниска честота на метилиационно инхибиране бе установена при DAPK – 41 пациента (42,3%).

5.3 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЩИ CDKN2A

Извършихме изследване за генетични аберации на туморсупресорния ген CDKN2A при 108 пациенти, включващи цялата изследвана по-горе група плюс още 8 допълнителни, неизследвани за промоторно метилиране. Установихме 15 генетични изменения в екзон 1 и екзон 2 на гена (таблица 14). Те се откриха при 16 от общо 108 болни или при 14,2%, като включват 6 frameshift мутации (мутации водещи до изместване рамката на четене), 4 nonsense, 3 missense, 1 silent mutation и 1 SNP (single nucleotide polymorphism). От тези генетични аберации може да изключим мутацията в единичен нуклеотид, тихата мутация и тази в кодон 148, която представлява полиморфизъм, т.к. те не предизвикват клинично значима промяна в синтезията от гена активен продукт. Остават 11 болни (10,2%) с инактивиран чрез посочените мутации CDKN2A ген. 10 от аберациите се откриха в екзон 2 и 4 – в екзон 1. Пациент № 77 имаше мутации и в двата екзона, докато №63 бе с две мутации в екзон 2. Изследвахме и екзон 3 на този туморсупресорен ген. Открихме полиморфизъм в единичен нуклеотид – rs11515 в 3'UTR региона.

Много интересен факт е, че след преглед на публикуваната литература и базаданни (HGMD, COS-MIC, dbSNP) установихме, че 7 от

откритите от нас генетични аберации не са описвани до този момент. Това включва две инсерции в екзон 1, три делеции и две точкови мутации в екзон 2.

Екзон	Генетична аберация	АА промяна	Пациент №	Ефект	Публикувани мутации
1	c.1-34 g>t	–	77	FS	Yes
1	c.34ins10bp	–	24	FS	No
1	c.35C>A	p.S12top	97	N	Yes
1	c.58insA	–	2	FS	No
1	c.150+37 g>c	–	16	SNP	dpSNP rs45456595
2	c.181G>T	p.E61Stop	39	N	Yes
2	c.205G>T	p.E69Stop	83	N	Yes
2	c.216C>A	p.C72Stop	48	N	Yes
2	c.243C>T	p.P81P	64	S	No
2	c.260 □7del8bp	–	63	FS	No
2	c.269T>C	p.F90S	63	M	No
2	c.342delC	–	93	FS	No
2	c.343G>T	p.V115L	27	M	Yes
2	c.441delC	–	46	FS	No
2	c.442G>A	p.A148T	53, 73, 77, 108	M	Yes
3	c.471+29 g>c	–	1-108 w/o 77	SNP	dbSNP rs11515

Таблица 14: Мутации в туморсупресорния ген CDKN2A: M – missense, N – nonsense, S – silent, FS – frameshift mutation, SNP – single nucleotide polymorphism; с червен цвят са обозначени новооткритите мутации

5.4 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЦИ TP53

При проведеното от нас изследване открихме 48 генетични аберации на гена TP53 при 56 от общо 108 изследвани пациента (51.9%); (таблица15). Това включва 5 полиморфизма на единичен нуклеотид и 43 мутации при 47 болни (43.5%). Основната част от мутациите (72,1%) са точкови. 21 от тях са missense мутации основно в 5-ти екзон и 9 са nonsense, равномерно разпределени в четирите изследвани екзона. И тук, както и при CDKN2A, установихме 8 нови генетични аберации на TP53, които не са описвани до сега в литературата. Интересен е и фактът, че при 57,1% от карциномите с мутация в CDKN2A открихме мутации и на TP53.

ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ НА TP53 ПРИ ПАЦИЕНТИ С КАРЦИНОМ НА ЛАРИНКСА					
Екзон	Генетична аберация	Промяна AA	Пациент №	Ефект	Публикувани мутации
5	c.392A>T	p.N131I	103	M	Yes
5	c.394A>G	p.K132E	62	M	Yes
5	c.406 □9del4bp	-	32	FS	No
5	c.406C>T	p.Q136Stop	83	N	Yes
5	c.415A>T	p.K139Stop	14	N	Yes
5	c.464C>A	p.T155N	24	M	Yes
5	c.466_9del4bp/ insTCC	-	48	FS	No

5	c.468_9del2bp	-	20	FS	Yes
5	c.469G>T	p.V157F	37	M	Yes
5	c.473G>T	p.R158L	102	M	Yes
5	c.474_506del33bp	-	78	FS	No
5	c.487T>C	p.Y163H	64	M	Yes
5	c.488A>G	p.Y163C	39,97	M	Yes
5	c.503_55del53bp	-	51	FS	No
5	c.524G>A	p.R175H	13,46	M	Yes
5	c.527G>T	p.C176F	4,29	M	Yes
5	c.546C>A	p.C182Stop	84	N	Yes
6	c.578A>G	p.H193R	76	M	Yes
6	c.601_42del42bp	-	60	FS	No
6	c.610G>T	p.E204Stop	40	N	Yes
6	c.614A>G	p.Y205C	54	M	Yes
6	c.637C>T	p.R213Stop	26	N	Yes
6	c.638G>T	p.R213L	69	M	Yes
6	c.639A>G	p.R213R	11,19,20,53,5 5,80	SNP	dbSNP rs1800372
6	c.659A>G	p.Y220C	25	M	Yes
6	c.672+1 g>a	-	15,86	Splice site	Yes
6	c.672+31 a>g	-	14,23,97,104	SNP	dbSNP rs34949160
6	c.672+48 g>a	-	66	SNP	dbSNP rs17884607
7	c.673-36 g>c	-	69	SNP	dbSNP Rs1788060

					4
7	c.673-19 g>a	-	28	SNP	Yes LARC TP53 database
7	c.680C>A	p.S227Y	106	M	Yes
7	c.706 T>A	p.Y236N	72	M	Yes
7	c.715A>G	p.N239D	31	M	Yes
7	c.721_6del6bp	-	96	FS	No
7	c.729_730GG>T T	p.M243_G244 >IC	56	M	Yes
7	c.734G>T	p.G245V	52	M	Yes
7	c.742C>T	p.R248W	2	M	Yes
7	c.782_782+18del 19bp	-	52	FS	No
8	c.796G>T	p.G266Stop	106	N	Yes
8	c.818G>T	p.R273L	58,94	M	Yes
8	c.824G>T	p.C275F	89	M	Yes
8	c.844C>T	p.R282W	42	M	Yes
8	c.852_63del12bp	-	75	FS	No
8	c.853delG	-	36	FS	Yes
8	c.871A>T	p.K291Stop	28	N	Yes
8	c.880G>T	p.E294Stop	18	N	Yes
8	c.880delG	-	45	FS	Yes
8	c.892G>T	p.E298Stop	22,93	N	Yes

Таблица 15: Генетични аберации на туморсупресорния ген TP53 при пациенти с карцином на ларинкса: M – missense, N – nonsense, S – silent,

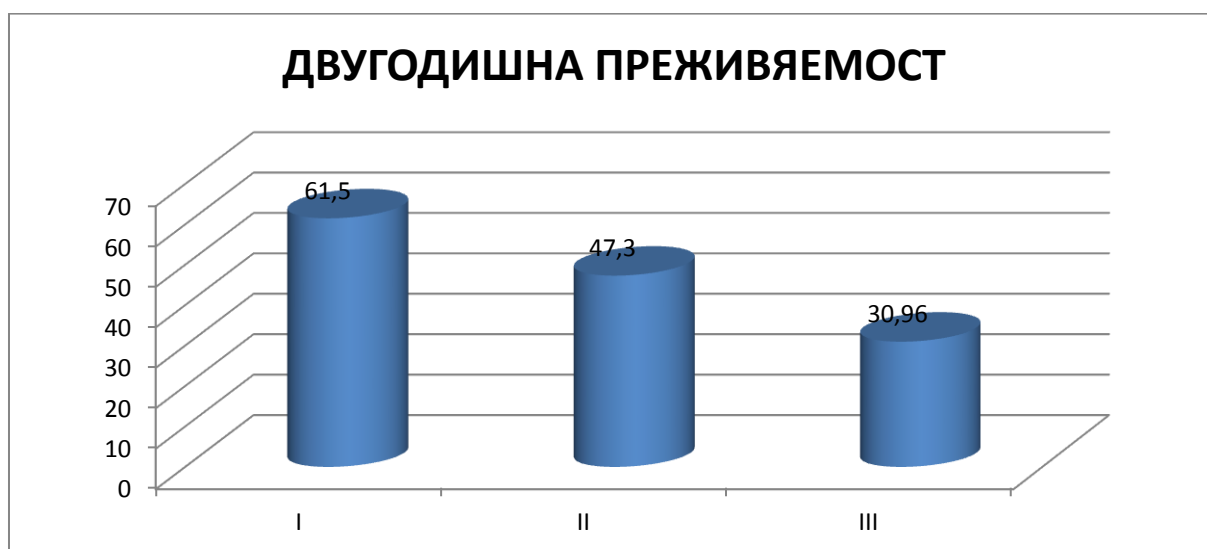
SNP – single nucleotide polymorphism, червено – нова, неописвана до сега генетична аберация.

5.5 ПРЕЖИВЯЕМОСТ

5.5.1 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ОСНОВНИЯ ПРОЦЕС

Извърши се подробен анализ на връзката на клиничните показатели и изследваните молекулни промени с преживяемостта на пациентите в групата. Както бе споменато по-горе болните се разпределиха в три прогностични групи в зависимост от локализацията. Първата група включва пациентите, при които процесът засяга само глотиса. Във втората група се обединиха болните, при които карциномът ангажира супраглотиса и/или субглотиса. Група номер три се състои от пациентите със засягане на хипофаринкса и/или корена на езика. Данни за двугодишната преживяемост се събраха за 93 човека. За останалите от групата липсват данни за следоперативното развитие на болестта. В първата и третата прогностична група според локализацията на основният процес имаше по 13 човека. Най-голяма е втората група с 67 души.

Използан бе тестът на Kruskal-Wallis за средните ранкове и χ^2 - тестът за статистическа обработка на резултатите.



Фиг. 26 Зависимост на двугодишната преживяемост от локализацията на ларингеалния карцином. Група I – болни при които е засегнат само глотиса. Група II – болни при които се наблюдава засягане на супраглотиса и/или субглотиса. Група III – болни при които е засегнат хипофаринкса и/или корена на езика.

Получи се ясна статистически значима разлика в преживяемостта на трите групи. Установените от нас резултати потвърждават правилото, че в прогностичен план разпространението на процеса извън глотиса и особено към хипофаринкса и корена на езика влошава значително преживяемостта на пациентите с рак на ларинкса.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ	БРОЙ ПАЦИЕНТИ	ДВУГОДИШНА ПРЕЖИВЯЕМОСТ / MEAN RANK
1	13	61,50
2	67	47,30
3	13	30,96
ОБЩ БРОЙ	93	

Test Statistics ^{a,b}	Двугодишна преживяемост
Chi-Square	12,387
Df	2
Asymp. Sig.	,002

a. Kruskal Wallis Test

b. b. Grouping Variable: Локализация

Таблица 16: Статистически анализ на двугодишната преживяемост при карцинома на ларинкса в зависимост от локализацията на процеса.

Установи се ясна статистически значима зависимост между локализация и преживяемост.

Локализация 1 - болни при които е засегнат само глотиса; Локализация 2 - болни при които се наблюдава засягане на супраглотиса и/или субглотиса; Локализация 3 - болни при които е засегнат хипофаринкса и/или корена на езика; Двугодишната преживяемост – изразена в среден ранк.

При определяне и на 1-, 3- и 4-ри годишната преживяемост отново ясно и категорично се потвърди посочената зависимост. (Таблица 17)

Test Statistics^{a,b}

	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	10,636	12,387	20,358	17,181	19,903
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,005	,002	,000	,000	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Localiz_Categor

Таблица 17: Статистически анализ на връзката между локализация на основния процес и преживяемостта за 1, 2, 3 и 4 години.

Surv 1 – едногодишна преживяемост, Surv 2 – двугодишна преживяемост, Surv 3 – тригодишна преживяемост, Surv 4 – четиригодишна преживяемост, Surv – обща преживяемост.

5.5.2 ЛОКАЛНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА И ПРЕЖИВЯЕМОСТ

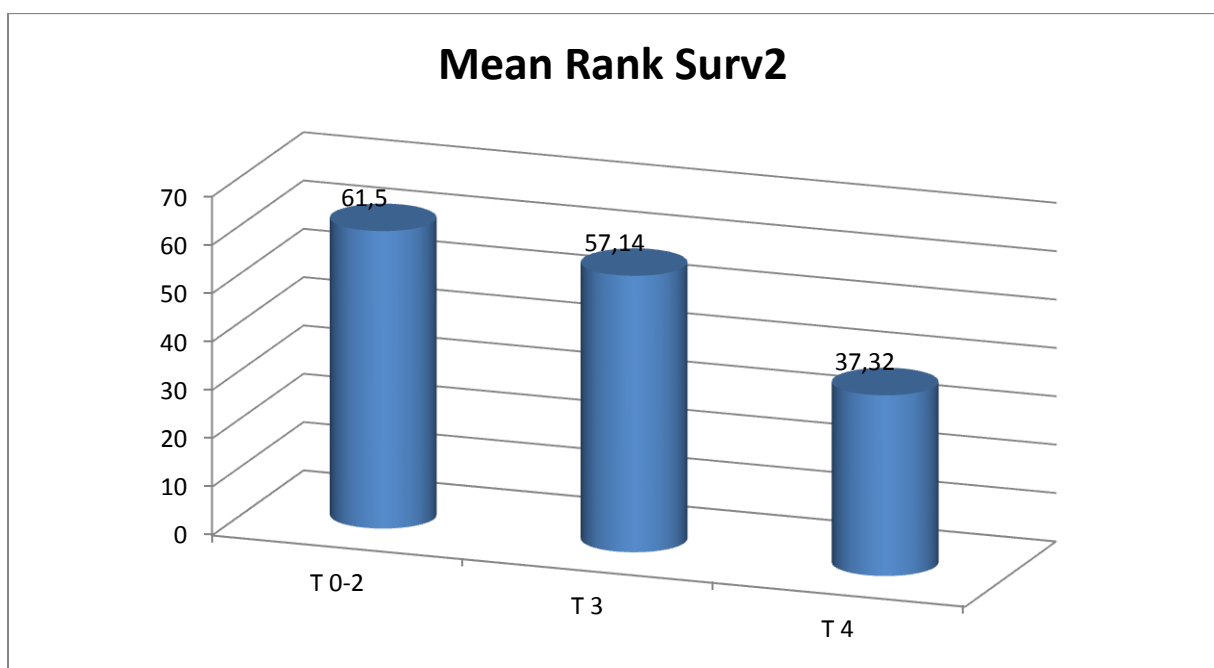
Направихме и анализ на връзката на преживяемостта с локалното разпространение и авансиране на карцинома. Болните бяха разделени в три групи според стадия Т. Тези от тях в стадии Т0, Т1 и Т2 се обединиха в група 1. Причината за това обединение бе, че това са болни с добра прогноза и освен това разделянето на по-малки групи няма да ни даде статистически значим брой от пациенти, които да сравняваме. Болните в стадии Т3 се включиха в група 2. Група номер 3 обединяваше тези от тях с крайно авансирания Т4 стадии на болестта.

Test Statistics^{a,b} ЛОКАЛНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА И ПРЕЖИВЯЕМОСТ					
	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	4,386	20,950	16,971	25,601	18,844
df	4	4	4	4	4
Asymp. Sig.	,356	,000	,002	,000	,001

Таблица 18: Статистически анализ на зависимостта на преживяемостта от локалното развитие на туморния процес.

Surv 1 – едногодишна преживяемост, Surv 2 – двугодишна преживяемост, Surv 3 – тригодишна преживяемост, Surv 4 – четиригодишна преживяемост, Surv – обща преживяемост.

Резултатите от този анализ потвърждават доказаният вече факт, че прогресията на заболяването влошава рязко преживяемостта на болните с карцином на ларинкса. Това заболяване от прогностично благоприятно в стадии T0-2 се превръща в такова със сериозна прогноза по отношение на терапевтичните възможности в стадии T3-T4. Много показателен е фактът, че от включените 108 болни в раннен стадии на заболяването, т.е. в група номер 1 са едва 11 души. Втората група или болните в стадии T3 са 34, а тези в стадии T4 – 60 души. За трима данните за стадирането на болестта са изгубени и не са включени в обработката. На фигура 27 е показана двугодишната преживяемост на посочените три групи от пациенти като резултатите са посочени чрез метода на Kruskal-Wallis за средните ранкове.



Фиг. 27 Локално разпространение на карцинома на ларинкса и двугодишна преживяемост: T0-2 – I-ва групар; T3 – II-ра група; T4 – III-та група.

5.5.3 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ

Анализирахме също така и връзката на преживяемостта с наличието на локорегионални метастази.

Test Statistics^{a,b}

	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	11,888	11,187	11,842	5,772	7,668
df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	,008	,011	,008	,123	,053

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: N

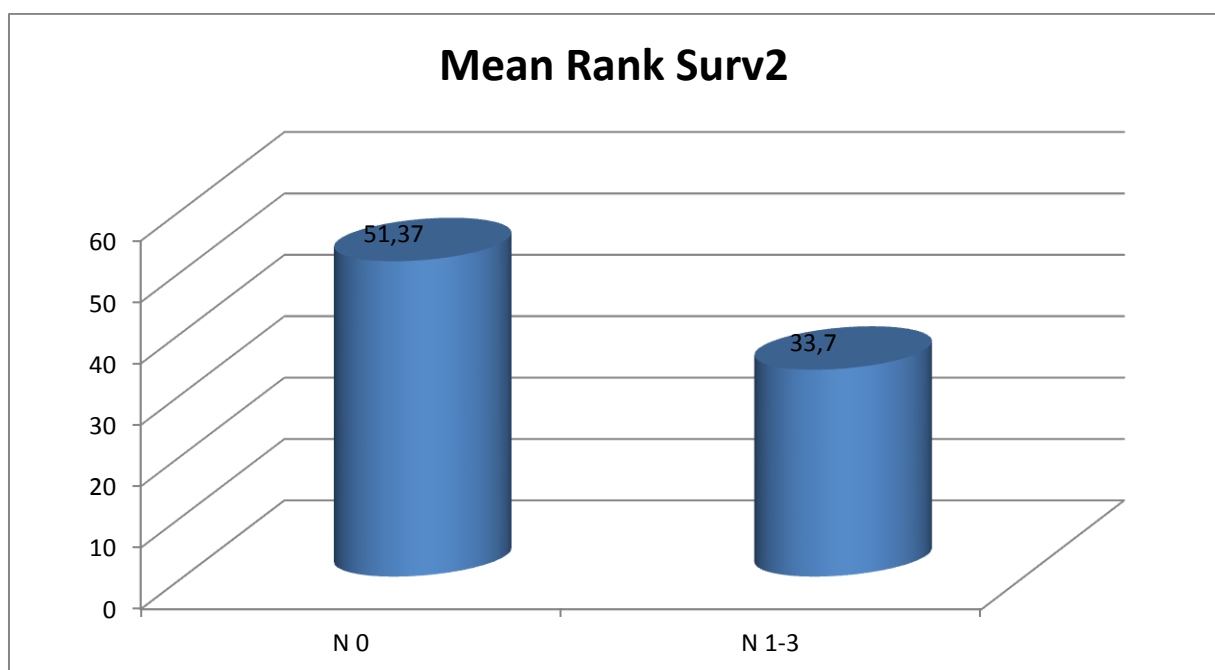
Таблица 19: Статистически анализ на преживяемостта и наличието на метастази в регионалните шийни лимфни възли към момента на операцията.

Surv 1 – едногодишна преживяемост, Surv 2 – двугодишна преживяемост, Surv 3 – тригодишна преживяемост, Surv 4 – четиригодишна преживяемост, Surv – обща преживяемост; С червено са означени резултатите със статистическа значимост – $p < 0.05$.

От направеният анализ се вижда ясна статистически значима зависимост между преживяемост и наличие на метастази в шийните

лимфни възли. Болните бяха разделени на две групи по отношение на този показател. Първата група се състои от пациенти без данни от образната диагностика, клиничния статус, интраоперативната находка и патохистологичното изследване за наличие на разпространение на процеса в шийния лимфен басейн, т.е. стадий N0. Втората група бяха пациентите, при които се установиха такива данни – стадий N1, N2, и N3. Група номер 2 беше обединена поради малкия брой пациенти и разделянето и на подгрупи, ще ни даде твърде малък брой в група за статистическа достоверност на резултатите. Получената корелация е изобразена на фигура 28. Преживяемостта на пациентите с локорегионални метастази е значимо по-малка от преживяемостта на тези без наличие на ангажирани лимфни възли.

ПРЕЖИВЯЕМОСТ И АНГАЖИРАНЕ НА РЕГИОНАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ



Фигура 28: Двугодишна преживяемост и наличие на метастази в регионалните лимфни възли. Първа група – N0 (без локорегионални метастази); Втора група – N1-3 (наличие на локорегионални метастази).

5.5.4 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И КЛИНИЧЕН СТАДИЙ S

Потвърди се и очакваната корелация в групата между преживяемостта и клиничния стадий S. С напредването на стадия преживяемостта намалява обратно пропорционално. Посочената връзка е изобразена на таблица 20 и фигура 29. Преживяемостта на изследваната от нас група логично намалява прогресивно с нарастване на стадия на заболяването.

Test Statistics^{a,b}

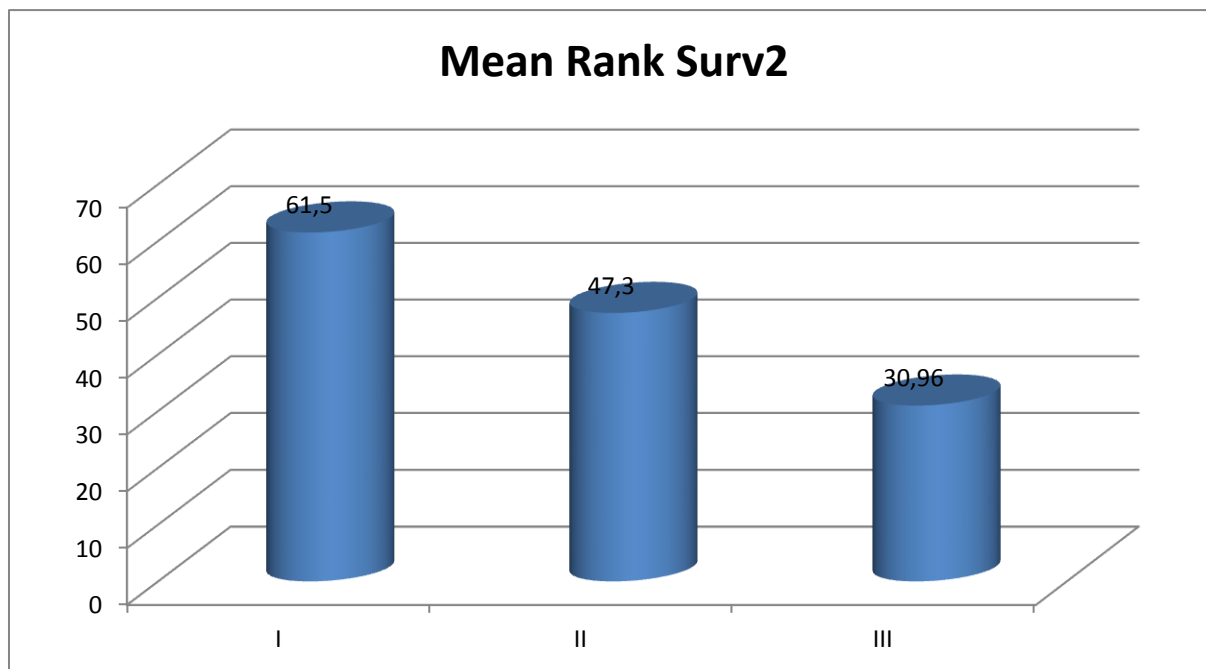
	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	9,160	21,219	19,374	22,143	18,558
df	5	5	5	5	5
Asymp. Sig.	,103	,001	,002	,000	,002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Stage

Таблица 20: Зависимост между преживяемост и клиничен стадий S. Surv 1 – едногодишна преживяемост, Surv 2 – двугодишна преживяемост, Surv 3 – тригодишна преживяемост, Surv 4 – четиригодишна преживяемост, Surv – обща преживяемост.

ПРЕЖИВЯЕМОСТ И КЛИНИЧЕН СТАДИЙ



Фигура 29: Преживяемост и клиничен стадий. Група I – клиничен стадий S0-2; Група II – клиничен стадий S3; Група III – клиничен стадий S4; Mean Rank Surv 2 – двугодишна преживяемост изразена в среден ранк по метода на Kruskal-Wallis.

5.5.5 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ

Както ни е известно, степента на диференциация на злокачествените тумори е свързана до известна степен с биологичната агресивност на тумора и склонността му да дава метастази. Обикновено нискодиференцираните варианти са с по-бърз растеж и дисеминация, което би ги определило, като прогностично по-неблагоприятни. От туморите, които изследвахме установихме 36,6% вискодиференциран плоскоклетъчен карцином, 56,4% - умеренодиференциран и едва при 6,9% - нискодиференциран карцином. Обратно на общоприетото мнение за връзка на степента на диференциация с биологичното поведение на

малигнома ние не установихме статистически значима корелация между степен на диференциация и преживяемост. Резултатите от това са видни на таблица 21. Показателят за статистическа значимост $p > 0,05$.

ПРЕЖИВЯЕМОСТ / СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ Test Statistics (a,b)

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Grading

Test Statistics^{a,b}

	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	1,648	,634	2,039	1,212	,590
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,439	,728	,361	,545	,744

Таблица 21: Връзка между преживяемост и степен на диференциация.

5.5.6 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ

При снемането на анамнеза за основните рискови фактори в изследваната от нас група болни се оказа, че едва 20,8% от тях не употребяват алкохол или го правят епизодично, 15,8% консумират до 100мл концентрат дневно, 24,8% - между 100 и 200 мл концентрат за денонощие, а останалите 38,6% са тежки алкохолици. Значението на фактора алкохол в етиопатогенезата на карцинома на ларинкса и

хипофаринкса се смята за доказано от многобройни проучвания. От нашите данни за консумацията във включените в настоящето изследване пациенти също може да заключим, че ролята му като инициатор на канцерогенезата е значителна. Интересно обаче за нас беше дали употребата му има значение за преживяемостта на карциномно болните? Резултатите от проведения статистически анализ са представени в таблица 22.

АЛКОХОЛ/ПРЕЖИВЯЕМОСТ

	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	3,089	3,400	5,846	5,535	5,332
Df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	,378	,334	,119	,137	,149

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Alcoch. Categor

Таблица 22: Зависимост между консумация на алкохол и преживяемост. Няма статистически значима зависимост между консумация на алкохол и преживяемост. $P > 0.05$

От получените резултати коефициентът на значимост $p > 0,05$ за всички изследвани категории за преживяемост. Това ни дава основание да заключим, че алкохолът има значение като инициатор на злокачествения

процес, но не и в последващата прогресия, т.е. няма статистическа значимост за връзка между употребата и преживяемостта.

5.5.7 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ТЮТЮНОПУШЕНЕ

Подобно на описаното по-горе изследване се опитахме да анализираме и значението на другия основен рисков фактор при ларингеалния карцином – тютюнопушенето. То също е доказано като водещ етиологичен фактор. Изследвахме връзката му с преживяемостта на болните. Резултатите са показани в таблица 23.

ТЮТЮНОПУШЕНЕ/ПРЕЖИВЯЕМОСТ Test Statistics^{a,b}

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Cig Categ

	Surv1	Surv2	Surv3	Surv4	Surv
Chi-Square	1,808	,229	2,290	1,566	2,096
Df	4	4	4	4	4
Asymp. Sig.	,771	,994	,683	,815	,718

Таблица 23: Преживяемост и тютюнопушене. Няма статистически значима зависимост между тютюнопушене и преживяемост. Коефициентът на значимост $p > 0,05$.

Отново изводът, който може да направим е, че тютюнопушенето има значение за индуцирането на ларингеалната карциногенеза, но не и за прогнозата. Веднъж иницииран малигненият процес и при пушачите и при непушачите прогресира по независими от карциногените в цигарения дим механизми.

В заключение може да кажем, че алкохолът и цигарите участват като индуктори на злокачествения процес, но не и в неговата прогресия.

5.6 ТЮТЮНОПУШЕНЕ И ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK. ТЮТЮНОПУШЕНЕ И МУТАЦИИ НА ГЕНИТЕ CDKN2A И TP53

Интересно бе да разберем каква е ролята на етиологичният фактор цигарен дим при инхибирането на изследваните от нас туморсупресорни гени MGMT, MLH1, CDKN2A и DAPK по механизма на промоторно метилиране, както и за гените CDKN2A и TP53 чрез мутации. За целта направихме сравнителен анализ на честотата на метилиране и мутации на посочените гени с тютюнопушенето, като използвахме тестът на Kruskal-Wallis. Получените резултати обединихме в таблица 24.

Открихме ясна статистически значима връзка на тютюнопушенето и метилирането на гена CDKN2A като инхибирането на гена по този механизъм бе значително по-често при пушачите и то при тези пушеци повече от кутия и половина дневно ($\text{Chi-Square} = 9,904$; $p < 0,05$). Резултати близки до статистическата значимост се откриха също и по отношение на броя метилирани гени като пациентите с метилирани всички от четирите изследвани такива са основно тежки пушачи. Близки до статистическата значимост са и резултатите от анализа на връзката между тютюнопушене и мутации в гена TP53 ($p = 0,069$) в случаи, че разделим болните на пет групи по отношение на този показател – I-ва група – непушачи (9 човека), II – ра група – пушеци до 20ц./дн., III – та група – 20-30 ц./дн., IV – та група – 30-

40 ц./дн. и V – та група - > 40 ц./дн. Ако разделим пациентите на пушачи и непушачи резултатите са значително по-убедителни, като честотата на мутациите на TP53 при пушачите е почти два пъти по-голяма (44,9% при пушачите и 28,6% при непушачите). И тук обаче не може да постигнем статистическа значимост поради малкия реален брой на непушачите.

ТЮТЮН / МЕТИЛИРАНЕ Test Statistics (a,b)

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Cig_Categ

	MGMT- HRM	MLH1 - HRM	CDKN2A - HRM	DAP- K - HRM	CDKN2A	TP53	Inact CDKN2A	HRM_ Categor
Chi-Square	3,851	4,915	9,904	1,025	1,181	8,707	5,765	8,775
df	4	4	4	4	4	4	4	4
Asymp. Sig.	,427	,296	,042	,906	,881	,069	,217	,067

Таблица 24: Статистически анализ на връзката на тютюнопушенето с честотата на метилиране на гените MGMT, MLH1, CDKN2A и DAPK, както и с честотата на мутациите при CDKN2A и TP53.

5.7 УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ И МЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK. УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ И МУТАЦИИ НА ГЕНИТЕ CDKN2A И TP53.

Направихме сравнение на степента на метилиране на изследваните от нас гени с употребата на алкохол, както и връзката на последната с честотата на мутациите в два от тях. Получените резултати могат да бъдат видяни в таблица 25.

АЛКОХОЛ / МЕТИЛИРАНЕ Test Statistics (a,b)

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Alcochol_Categ

	MGMT -HRM	MLH1 - HRM	CDKN2 A - HRM	DAP- K - HRM	CDKN 2A	TP53	Inact CDKN2A	HRM_Ca tegor
Chi-Square	10,810	6,782	1,703	3,997	2,761	,360	3,503	,291
df	3	3	3	3	3	3	3	3
Asym p. Sig.	,013	,079	,636	,262	,430	,948	,320	,962

Таблица 25: Употреба на алкохол и честота на метилиране и мутации на туморсупресорните гени.

От получените данни можем да направим заключение, че степента на метилиране е в права зависимост с употребата на алкохол и честотата му нараства с повишаване на консумацията. Тези данни се получиха при разпределението на пациентите по групи в зависимост от количеството.

При разпределението на пациентите според абсолютното количество консумиран алкохол се получи много интересна обратна зависимост ($p=0.025$) между честотата на метилиране и алкохолната консумация. Повечето от пациентите консумиращи алкохол над 100мл./дн. имаха неметиран MLH промотор, докато метилирането бе по-често при тези с консумация под 100мл./дн.

5.8 МЕТИЛИРАНЕ И СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ

Открихме, че колкото по-ниско диференциран е карциномът, толкова по-висока е честотата на метилиране на гена MLH1. Подобна корелация за останалите 3 изследвани гена, както и за общият метилационен статус не беше установена.

			Grading
Spearman's rho	MGMT_HRM	Correl. Coefficient	1,000
		Sig. (2-tailed)	.
		N	101
	MLH1_HRM	Correl. Coefficient	,223*
		Sig. (2-tailed)	,032
		N	93
	CDKN2A_HRM	Correl. Coefficient	,169
		Sig. (2-tailed)	,104
		N	93
	DAPK_HRM	Correl. Coefficient	-,077
		Sig. (2-tailed)	,461
		N	93
	HRM_CATEGOR	Correl. Coefficient	,159
		Sig. (2-tailed)	,127
		N	93

Таблица 26: Честота на метилиране и степен на диференциация. Ген_HRM – метилиране на съответния ген; HRM_CATEGOR – общ метилационен статус.

5.9 МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИЯ ЛИМФЕН БАСЕЙН И МЕТИЛАЦИОННА ИНХИБИЦИЯ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ

Анализирайки ефекта на промоторното метилиране и инхибирането на транскрипцията на съответните туморсупресорни гени установихме статистически значима права корелация между него и наличието на локорегионални метастази в шийния лимфен басейн. Такава връзка се потвърди за три от изследваните гени – MGMT, MLH1 и CDKN2A, за които се доказва повишена честота на блокиране по този механизъм при пациентите с установени метастази по време на извършването на оперативното лечение. От това може да предположим, че блокирането на тези гени има съществено значение в процеса на дисеминация. Това се потвърждава и от факта, че нито един от пациентите, при който и четирите от изследваните гени са били неметилирани не е имал разпространение в лимфните възли на шията.

5.9.1 МЕТИЛИРАНЕ НА MGMT И МЕТАСТАЗИРАНЕ

Метилирането на MGMT при пациентите с шийни метастази в групата е 86,36%, докато при тези без наличие на метастази е 53,33% (Таблица 27).

Crosstab

		Nx Регионални метастази		
		N 0	N 1-3	Total
MGMT_HRM 0	Count	35	3	38

	% of Total	36,1% (46,67%)	3,1% (13,64%)	39,2%
1	Count	40	19	59
	% of Total	41,2% (53,33%)	19,6% (86,36%)	60,8%
Total	Count	75	22	97
	% of Total	77,3% (100%)	22,7% (100%)	100,0%

Chi-Square Test					
	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi Square	7,788	1	,005		

Таблица 27: Метилиране на MGMT и метастазиране в регионалните лимфни възли.

0 – неметилирани; 1- метилирани; N0 – липса на метастази в шийните лимфни възли; N1-3 – наличие на метастази.

$$\chi^2 = 7,788, p = 0,005 < 0,05$$

5.9.2 МЕТИЛИРАНЕ НА MLH1 И МЕТАСТАЗИРАНЕ

От общо 97 болни 22 са с доказани при оперативното лечение метастази в регионалните лимфни възли, а останалите 75 са без клинично и с методите на образната диагностика доловими такива. От заболялите с

метастази 22 човека, 15 са с метилиран промотор на MLH1 гена или това прави 68,18%. Тези с неметилиран ген са съответно 31,82%. При пациентите без дисеминация съотношението е обратното - метилирани – 40% (30 човека) и неметилирани 60% (45 човека). От това може да твърдим, че метилирането на MLH1 повишава риска от дисеминация на основния процес (Таблица 28)

Crosstab

		Nx		
		N 0	N 1-3	Total
MLH1_HRM 0	Count	45	7	52
	% of	46,4%	7,2%	53,6%
	Total	(60%)	(31,82%)	
1	Count	30	15	45
	% of	30,9%	15,5%	46,4%
	Total	(40%)	(68,18%)	
Total	Count	75	22	97
	% of	77,3%	22,7%	100,0%
	Total	(100%)	(100%)	

Chi-Square Test					
	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi Square	5,432	1	,020		

Таблица 28: Метилиране на MLH1 и метастазиране в регионалните лимфни възли.

0 – неметилирани; 1- метилирани; N0 – липса на метастази в шийните лимфни възли; N1-3 – наличие на метастази.

$$\chi^2 = 5,432, p = 0,020 < 0,05$$

5.9.3 МЕТИЛИРАНЕ НА CDKN2A И МЕТАСТАЗИРАНЕ

При пациентите с локорегионални метастази се установява 68,8% честота на метилиране на CDKN2A, докато при тези без доказани такива, честотата на метилиране е 41,33%. Тази разлика е също със статистическа значимост ($\chi^2 = 4,918, p = 0,027 < 0,05$) и води до заключението, че това е поредният ген чиято дисфункция е от значение за метастазирането. (Таблица 29).

Crosstab

		Nx		
		N 0	N 1-3	Total
CDKN2A_HRM 0	Count	44	7	51
	% of	45,4%	7,2%	52,6%
	Total	(58,67%)	(31,82%)	

1	Count	31	15	46
	% of Total	32,0% (41,33%)	15,5% (68,18%)	47,4%
	Total	75	22	97
Total	Count	75	22	97
	% of Total	77,3%	22,7% (100%)	100,0%

Chi-Square Test					
	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi Square	4,918	1	,027		

Таблица 29: Метилиране на CDKN2A и метастазиране в регионалните лимфни възли.

0 – неметилирани; 1- метилирани; N0 – липса на метастази в шийните лимфни възли; N1-3 – наличие на метастази.

$$\chi^2 = 4,918, p = 0,027 < 0,05$$

5.9.4 ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ НА DAPK И МЕТАСТАЗИРАНЕ

При направеното изследване на четвъртият ген от поредицата – DAPK, противно на очакванията ни, не установихме асоциация с метастатичния риск. Процентът на туморите с метилиран промотор бе по-малък в сравнение с неметилираните, както в случаите на разпространение, така и в случаите на незасегнати шийни лимфни възли. Освен това

съотношението и в двата случая е почти еднакво. От по-долната таблица се вижда ясно липсата на статистически значима корелация (Таблица 30).

Crosstab

		Nx		
		N 0	N 1-3	Total
DAP_K_HRM 0	Count	43	13	56
	% of Total	44,3% (57,33%)	13,4% (59,09%)	57,7%
1	Count	32	9	41
	% of Total	33,0% (42,67%)	9,3% (40,91%)	42,3%
Total	Count	75	22	97
	% of Total	77,3% (100%)	22,7% (100%)	100,0%

Chi-Square Test					
	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi Square	,022	1	,883		

Таблица 30: Статистически анализ на връзката на метилирането на DAPK и метастазирането в регионалните л.в.

0 – неметилирани; 1- метилирани; N0 – липса на метастази в шийните лимфни възли; N1-3 – наличие на метастази.

$$\chi^2 = 0,22, p = 0,883 > 0,05$$

5.10 МУТАЦИИ НА CDKN2A И TP53 И МЕТАСТАЗИРАНЕ

5.10.1 МУТАЦИИ НА CDKN2A И МЕТАСТАТИЧНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ

От групата изследвани болни бяха установени 14 пациента с потенциално функционално значими мутации на гена CDKN2A. Връзка на генетичните аберации на последния с ангажиране на регионалните лимфни възли не бе установена. При пациентите с метастази се установи 3,85% честота на мутациите в този туморсупресорен ген, а при тези без налични такива – 16,46%. От това следва, че по наши данни липсва корелация между мутации в гена и метастазиране (Таблица 31).

Crosstab

		Nx		
		N 0	N 1-3	Total
CDKN2A 0	Count	66	25	91
	% of Total	62,9% (83,54%)	23,8% (96,15%)	86,7%
1	Count	13	1	14
	% of Total	12,4%	1,0%	13,3%

		(16,46%)	(3,85%)	
Total	Count	79	26	105
	% of Total	75,2%	24,8%	100,0%
		(100%)	(100%)	

Chi-Square Test					
	Value	df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Fisher's Exact test				,180	,088

Таблица 31: Анализ на връзката мутации в гена CDKN2A и разпространение в регионалните л.в.

0 – без мутации на CDKN2A; 1- мутации на CDKN2A; N0 – липса на метастази в шийните лимфни възли; N1-3 – наличие на метастази.

p > 0,05

5.10.2 МУТАЦИИ НА TP53 И МЕТАСТАЗИРАНЕ

Не открихме зависимост между мутациите на туморсупресорния ген TP53 и риска от дисеминация в лимфните възли. По наши данни процентът на мутации при налични метастази при болните в групата е 53,85%, а при липса на такива – 39,24%. При статистическата обработка на данните не се установи статистическа значимост – p>0,05.

Crosstab

		Nx		
		N 0	N 1-3	Total
TP53 0	Count	48	12	60
	% of Total	45,7% (60,76%)	11,4% (46,15%)	57,1%
1	Count	31	14	45
	% of Total	29,5% (39,24%)	13,3% (53,85%)	42,9%
Total	Count	79	26	105
	% of Total	75,2% (100%)	24,8% (100%)	100,0%

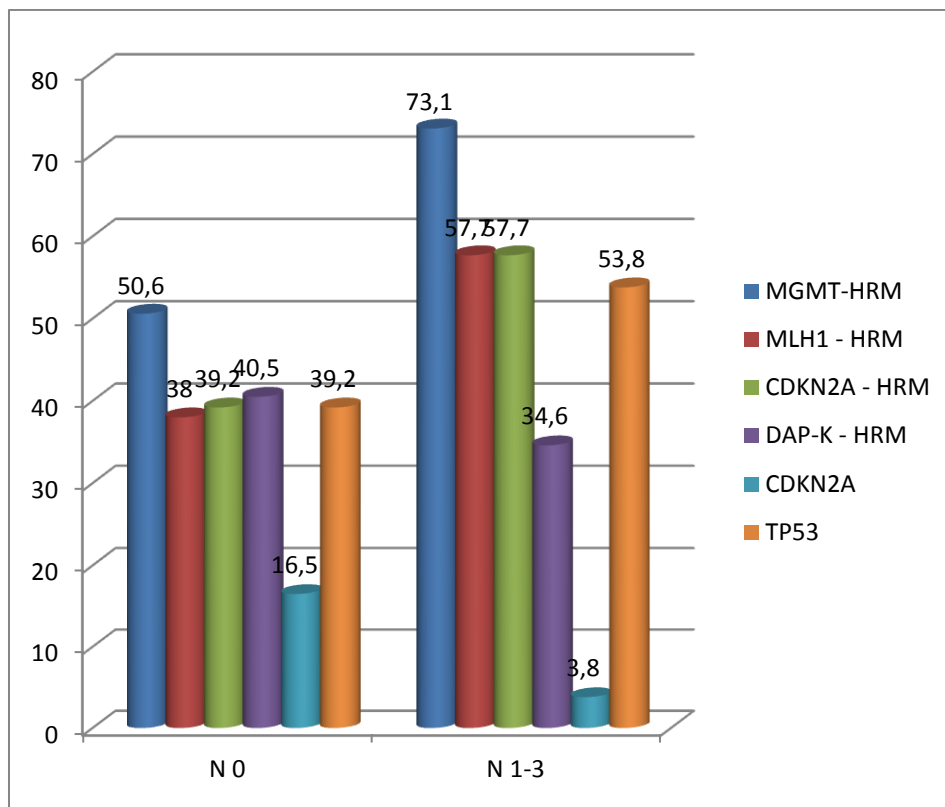
Chi-Square Test					
	Value	Df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,704	1	,192		

Таблица 32: Анализ на връзката мутации в гена TP53 и разпространение в регионалните л.в.

0 – без мутации на TP53; 1- мутации на TP53; N0 – липса на метастази в шийните лимфни възли; N1-3 – наличие на метастази.

$$\chi^2 = 1,704, p = 0,192 > 0,05$$

На фигура 30 е направен сборен модел на базата на проведените от нас генетични и епигенетични изследвания, който изобразява профила на пациентите с и без метастази в регионалните лимфни възли.



Фиг. 30 Молекулен профил на пациентите с карцином на ларинкса в зависимост от дисеминация на основния процес в регионалните лимфни възли. N0 – без метастази, N1-3 – пациенти с налични метастази.

5.11 МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ И ВРЪЗКАТА ИМ С РАННИ И КЪСНИ МЕТАСТАЗИ В РЕГИОНАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ

Решихме да разделим пациентите на две групи. Едната група се състоеше от такива, при които не установихме наличие на метастатични лимфни възли нито при извършването на оперативното лечение, нито по време на периода на проследяване. Във втората група обединихме болните с доказани ранни и късни метастази. На тази основа анализирахме отношението на промените, които изследвахме и риска от поява на локорегионални метастази (Таблица33).

МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ / РАННИ И КЪСНИ МЕТАСТАЗИ

Test Statistics (a,b)

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Metastasis Group

	MGMT- HRM	MLH1 - HRM	CDKN2A - HRM	DAP- K - HRM	CDKN2A	TP53	Inact CDKN2A	HRM_Categor
Chi-Square	5,116	5,185	1,966	1,241	,102	1,621	2,664	8,073
df	1	1	1	1	1	1	1	1
Asymp. Sig.	,024	,023	,161	,265	,749	,203	,103	,004

Таблица 33: Връзка на метилиране и мутации на туморсупресорните гени и наличието на ранни и късни метастази в регионалните лимфни възли.

ГЕН-HRM – Метилиране на съответния ген; CDKN2A и TP53 – мутации на тези два гена; Inact CDKN2A – сборна група обединяваща туморите с инактивиран ген и по механизма на промоторно метилиране, и чрез мутации. HRM-CATEGOR – общ метилационен статус. С червено са означени резултатите със статистическа значимост.

На базата на така получените резултати установихме, че метилационното инхибиране на гените MGMT и MLH1, както и повишаването на броя метилирани туморсупресорни гени е ясно свързано с повишен риск от дисеминация на малигнения процес.

5.12 ИНАКТИВИРАНЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ И ЛОКАЛНОТО РАЗПРОЗТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА ПО СТАДИИ T0-4

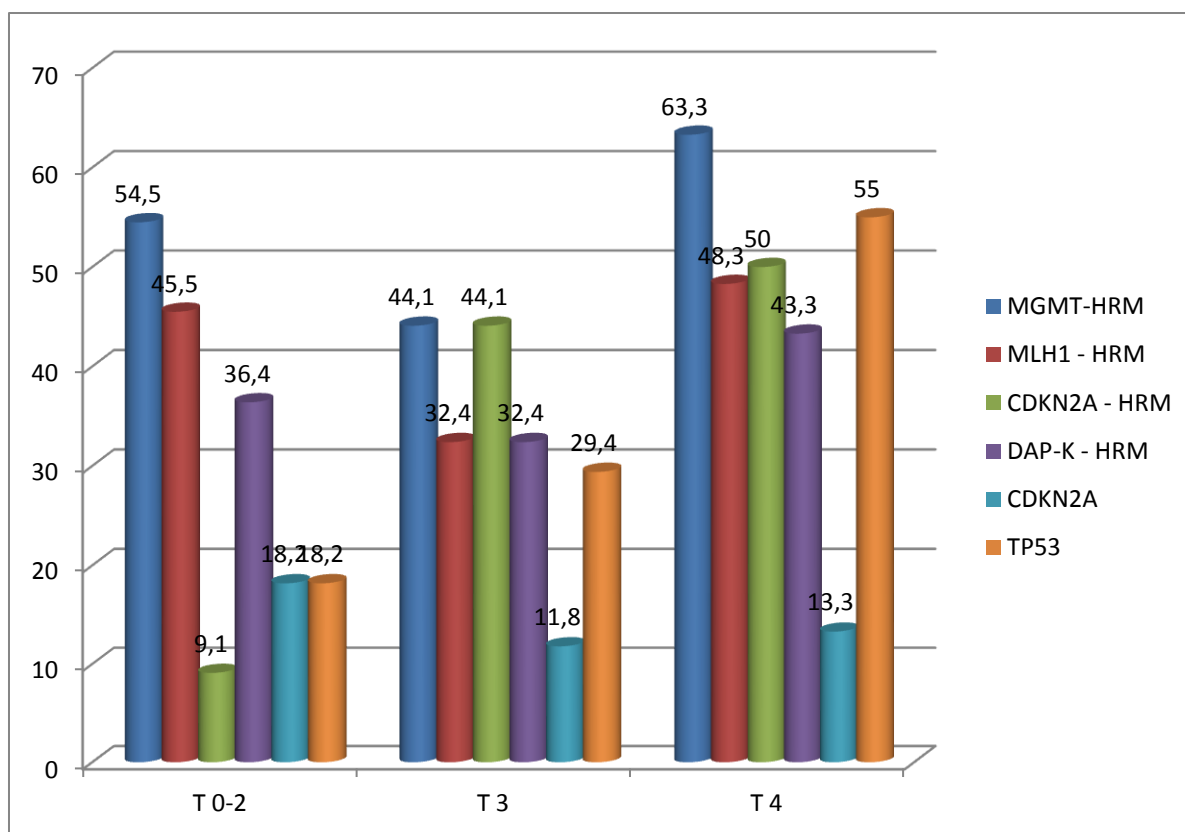
Честотата на инактивация на CDKN2A чрез промоторно метилиране и на TP53 чрез мутации нараства с локалното авансиране на карцинома. На границата на статистическата значимост бяха и резултатите за общият метилационен статус ($\chi^2 = 5,992$, $p = 0,05$), за който също се установи нарастване броя на метилираните гени с напредване на заболяването (Таблица34, Фиг.31).

МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ / СТАДИЙ Т Test Statistics (a,b)

- Kruskal Wallis Test
- Grouping Variable: Tx

	MGMT- HRM	MLH1 - HRM	CDKN2A - HRM	DAP- K - HRM	CDKN2A	TP53	Inact CDKN2A	HRM_Categor
Chi-Square	3,145	2,168	6,411	,993	,293	8,773	4,627	5,992
df	2	2	2	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,208	,338	,041	,609	,864	,012	,099	,050

Таблица34: Инхибиране на туморсупресорните гени и стадии Т. В червено са означени резултатите със статистическа значимост.



Фиг. 31 Молекулен профил на ларингеалния карцином в различните стадии на заболяването (T0-T4)

MGMT-HRM – честота на метилиране; MLH1-HRM – честота на метилиране; CDKN2A-HRM – честота на метилиране; DAPK-HRM – честота на метилиране; CDKN2A – честота на мутациите; TP53- честота на мутациите.

5.13 ИНАКТИВИРАНЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ И ЛОКАЛНОТО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА ПО СТАДИИ S

Същите резултати се потвърдиха и за стадирането по категорията S, но вече с убедителна статистическа значимост за общият метилационен статус ($\chi^2=8,583$, $p=0,014 < 0,05$). Това ще рече, че с напредване на заболяването според стадия S нараства метилирането на CDKN2A, мутациите на TP53 и общото метилиране (Таблица 35).

МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ / СТАДИЙ S Test Statistics (a,b)

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Sx

	MGMT- HRM	MLH1 - HRM	CDKN2A - HRM	DAP- K - HRM	CDKN2A	TP53	Inact CDKN2A	HRM_Categor
Chi-Square	3,604	3,202	7,486	1,830	,260	9,512	5,369	8,583
df	2	2	2	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,165	,202	,024	,401	,878	,009	,068	,014

Таблица 35: Инактивация на гените и стадий „S”. Червено – резултати със статистическа значимост.

5.14 ВРЪЗКА НА ПРЕЖИВЯЕМОСТТА С МЕТИЛИРАНЕТО И МУТАЦИИТЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ

5.14.1 МЕТИЛИРАНЕ НА MGMT И ПРЕЖИВЯЕМОСТ МЕТИЛИРАНЕ MGMT / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- a. Sx = III
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. Grouping Variable: MGMT_HRM

MGMT_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	14	13,61
	1	12	13,38
	Total	26	
		Surv 2	
Chi - Square		,028	
df		1	
Asymp. Sig.		,867	

Таблица 36: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и метилиране на гена MGMT.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2=0,028, p=0,867 > 0,05$$

МЕТИЛИРАНЕ MGMT / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S IVA + IVB

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = IVA+IVB
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: MGMT_HRM

MGMT_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	15	30,57
	1	34	22,54
	Total	49	
		Surv 2	
Chi - Square		3,858	
df		1	
Asymp. Sig.		,050	

Таблица 37: Двугодишна преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий (S IVA + S IVB) и метилиране на гена MGMT.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 3,858, p = 0,05$$

Установихме зависимост между двугодишната преживяемост на пациентите в S IV стадий на ларингеален карцином и промоторното

метиране на гена MGMT ($\chi^2=3,858$, $p = 0,05$). Може да определим инхибирането на транскрипцията му по този механизъм като лош прогностичен белег при авансиралите стадии на заболяването.

5.14.2 МЕТИРАНЕ НА MLH1 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Същият анализ на двугодишната преживяемост бе проведен и във връзка с метирането на другия туморсупресорен ген в нашето изследване – MLH1. Подобна корелация обаче не бе установена. Това е видно от по-долните таблици (Таблица 38 и Таблица 39).

МЕТИРАНЕ MLH1 / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- a. Sx = III
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. Grouping Variable: MLH1_HRM

MLH1_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	18	13,75
	1	8	12,94
	Total	26	
		Surv 2	
Chi - Square		,292	
df		1	
Asymp. Sig.		,589	

Таблица 38: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и метиране на гена MLH1.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$\chi^2=0,292$, $p =0,589 > 0,05$

МЕТИЛИРАНЕ MLH1 / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S IVA + IVB

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = IVA+IVB
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: MLH1_HRM

MLH1_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	24	26,08
	1	25	23,96
	Total	49	
		Surv 2	
Chi - Square		,318	
df		1	
Asymp. Sig.		,573	

Таблица 39: Двугодишна преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий (S IVA + S IVB) и метилиране на гена MLH1.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 0,318, p = 0,573 > 0,05$$

5.14.3 МЕТИЛИРАНЕ НА CDKN2A И ПРЕЖИВЯЕМОСТ МЕТИЛИРАНЕ CDKN2A / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = III
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: CDKN2A_HRM

CDKN2A_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	14	13,61
	1	12	13,38
	Total	26	
		Surv 2	
Chi - Square		,028	
df		1	
Asymp. Sig.		,867	

Таблица 40: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и метилиране на гена CDKN2A.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2=0,028, p=0,867 > 0,05$$

МЕТИЛИРАНЕ CDKN2A / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S IVA + IVB

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = IVA+IVB
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: CDKN2A_HRM

CDKN2A_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	23	26,57
	1	26	23,62
	Total	49	
		Surv 2	
Chi - Square		,612	
df		1	
Asymp. Sig.		,434	

Таблица 41: Двугодишна преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий (S IVA + S IVB) и метилиране на гена CDKN2A.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 0,612, p = 0,434 > 0,05$$

Не се установи статистически значима зависимост между двугодишната преживяемост и метилационната инхибиция на CDKN2A при пациенти с авансирал ларингеален карцином.

5.14.4 МЕТИЛИРАНЕ НА DAPK И ПРЕЖИВЯЕМОСТ МЕТИЛИРАНЕ DAPK / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- a. Sx = III
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. Grouping Variable: DAPK_HRM

DAPK_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	18	13,06
	1	8	14,50
	Total	26	
		Surv 2	
Chi - Square		,924	
df		1	
Asymp. Sig.		,336	

Таблица 42: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и метилиране на гена DAPK.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2=0,924, p=0,336 > 0,05$$

МЕТИЛИРАНЕ DAPK / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S IVA + IVB

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = IVA+IVB
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: DAPK_HRM

DAPK_HRM		N	Mean Rank
Surv2	0	28	26,70
	1	21	22,74
	Total	49	
		Surv 2	
Chi - Square		1,083	
df		1	
Asymp. Sig.		,298	

Таблица 43: Двугодишна преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий (S IVA + S IVB) и метилиране на гена DAPK.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 1,083, p = 0,298 > 0,05$$

Не установихме връзка между двугодишната преживяемост на пациенти в трети и четвърти клиничен стадий на карцином на гръкляна и промоторното метилиране на гена DAPK.

5.14.5 МУТАЦИИ НА CDKN2A И ПРЕЖИВЯЕМОСТ

При определяне на връзката на мутациите на гена CDKN2A и преживяемостта при пациентите с карцином на ларинкса в напреднал трети и четвърти стадий на болестта не се установи статистически значима корелация (Таблица 44, 45)

МУТАЦИИ НА CDKN2A / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = III
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: **CDKN2A_MUT**

CDKN2A_MUT		N	Mean Rank
Surv2	0	26	14,42
	1	2	15,50
	Total	28	
		Surv 2	
Chi - Square		,160	
df		1	
Asymp. Sig.		,690	

Таблица 44: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и мутации на гена CDKN2A.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 0,160, p = 0,690 > 0,05$$

МУТАЦИИ НА CDKN2A / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S IVA + SIVB

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = IVA + IVB
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: **CDKN2A_MUT**

CDKN2A_MUT		N	Mean Rank
Surv2	0	48	27,60
	1	6	26,67
	Total	54	
		Surv 2	
Chi - Square		,022	
df		1	
Asymp. Sig.		,883	

Таблица 45: Двугодишна преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий (S IV + S IV) и мутации на гена CDKN2A.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 0,022, p = 0,883 > 0,05$$

5.14.6 МУТАЦИИ НА TP53 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Сравнихме двугодишната преживяемост и на пациентите в III и IV стадий, като ги разделихме на две групи в зависимост от това дали притежават мутация на TP53, която инактивира гена. Подобна зависимост не бе установена и значима разлика в преживяемостта на двете групи не бе установена.

МУТАЦИИ НА TP53/ ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = III
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: TP53_MUT

TP53_MUT		N	Mean Rank
Surv2	0	21	14,17
	1	7	15,50
	Total	28	
		Surv 2	
Chi - Square			,691
df			1
Asymp. Sig.			,406

Таблица 46: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и мутации на гена TP53.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 0,691, p = 0,406 > 0,05$$

МУТАЦИИ НА TP53 / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S IVA + SIVB

Test Statistics (a,b,c)

- Sx = IVA + IVB
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- Grouping Variable: TP53_MUT

TP53_MUT		N	Mean Rank
Surv2	0	26	27,08
	1	28	27,89
	Total	54	
		Surv 2	
Chi - Square		,041	
df		1	
Asymp. Sig.		,839	

Таблица 47: Двугодишна преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий (S IV + S IV) и мутации на гена TP53.

Surv 2 – двугодишна преживяемост; N – брой пациенти; Mean Rank – среден ранк.

$$\chi^2 = 0,041, p = 0,839 > 0,05$$

6. ДИСКУСИЯ

В изследването, което проведохме бяха включени 99 мъже и 6 жени, което отговаря на честотата на разпространение на заболяването сред двата пола. Както и в групата, която изследвахме, така и в засегнатата популация карциномът на ларинкса засяга преимуществено мъжкия пол с честота 10 пъти по-висока от колкото при жените. Пикът на заболяването е между 50 и 75 годишна възраст, каквото е и възрастовото разпределение в изследваната група. В етническо отношение 93,3% бяха българи и 6,7% други като арменци, цигани и турци.

Едва 10,5% от пациентите, които изследвахме бяха в ранния T0-T2 стадий на заболяването, където прогнозата за траен контрол и излекуване е много добра. За съжаление карциномът на ларинкса, който ние открихме при 32,4% беше в стадий T3, а при 57,1% от хората - в T4 стадий. Това ни показва, че профилактиката и здравната култура на населението в България към момента са в изключително лошо състояние. Това води до висока смъртност при едно заболяване със сравнително благоприятни предпоставки за ранна диагноза и успешно лечение.

Открихме клинично доловими и чрез методите на образната диагностика метастази при $\frac{1}{4}$ от болните независимо от това, че близо 90% от тях бяха с локално авансирал процес. Това ни показва, че дисеминацията при рака на ларинкса се осъществява в по-късните етапи от развитието на болестта. Дали обаче това е така? Успяхме да проследим 90 човека от болните в групата, като ги разделихме на две подгрупи. Първата се състоеше от пациенти, при които не установихме метастатична дисеминация нито при първичния преглед и операцията, нито през периода на проследяване. Втората подгрупа включваше тези, при които диагностицирахме засягане на лимфните възли при първоначалната

хоспитализация или по-късно. Тогава нещата не изглеждаха в такава благоприятна окраска. Оказа се, че при 50% от тези 90 души сме имали наличие на метастатични лимфни възли. Необходимо е и да отбележим още два факта. Загубата на контакт с останалите 15 души е много вероятно да се дължи на леталния изход на заболяването. Да не забравяме, че пациентите с авансирал карцином са били подложени на следоперативна лъчетерапия и е напълно възможно, част от тези 50% без метастази да са имали микрометастази, които успешно са повлияни от телегаматерапията. Като извод може да кажем, че към момента на диагнозата имаме над 50% дисеминация в регионалните лимфни възли, което далеч надхвърля констатираните с клиничния преглед и образната диагностика 25%.

Независимо от това, че степента на диференциация на малигнените заболявания е свързана с биологичното им поведение и агресивността, за ларингеалният карцином изглежда, че по-голямо значение за прогнозата и преживяемостта има локализацията на тумора. Ние потвърждаваме възприетото в научните среди становище, че разпространението на тумора към хипофаринкса и корена на езика е свързано с най-висок риск от неблагоприятен изход.

Безспорна е ролята на доказаните етиологични фактори - цигари и алкохол. Едва 8,9% от заболелите са непушачи, а 20,8% не консумират алкохол. От 9 души непушачи 4 консумират ежедневно алкохол. 4,9% от болните не са били изложени на нито един от тези два рискови фактора.

Промоторното хиперметиране е широко разпространен механизъм на контрол на генната експресия. То е един нормално съществуващ в клетката процес, чрез който се регулира активността на гените. При засягането обаче на някои гени, каквито са туморсупресорните се отключват патологичните механизми на туморогенезата. То има ключова роля при много злокачествени неоплазми. С нашето изследване ние

направихме анализ на ролята на този процес в ларингеалната карциногенеза. Избрахме четири ключови туморсупресорни гени – MGMT, MLH1, CDKN2A и DAPK и определихме метилационния им статус чрез метода на метилспецифично високорезолуционно разтопяване (MS-HRM). Най-висока честота на промоторно метилиране сред изследваните от нас четири гена беше установена за гена на метилгуанинметилтрансфераза (MGMT). При 60,8% от изследваните болни с ларингеален карцином отчетохме положителен резултат за метилационно инхибиране на транскрипцията му. По наши данни това надхвърля публикуваните данни в научната литература, където честотата на метилиране на въпросния ген при карциномите на главата и шията варира между 23% (123) и 53% (99). Вторият по честота на промоторно метилиране в групата бе генът на циклинзависимия киназен инхибитор - CDKN2A. С честота от 47,4% данните ни са сходни с тези съобщени от други автори и вариращи от 9% до 63% (124,159). MLH1 е генът, който в научните статии е докладван да достига най-висока честота на метилиране - до 69% (от 23% до 69%) (98, 99,132). Ние установихме честота от 46,4%. Подобни резултати се дадени и от Демокан и колектив (132). Резултатите за DAPK при различните проучвания са в диапазона от 21% до 68%. Ние установихме честота от 42,3% при изследваната група пациенти.

Широките вариации на съобщените от различните автори резултати могат да се дължат на редица фактори като разнородността на включените в различните изследвания болни. Разликите могат да идват от разлики в стадия, етническата принадлежност, степента на диференциация и др. Не бива да забравяме и разликата в чувствителността на различните аналитични методи. Освен това молекулно-генетичните пътища за отключването на един и същ патологичен процес могат да бъдат най-

различни, като съществуват все още много неясноти по въпроса, които предстои да бъдат изследвани и открити в бъдещето.

Едва при 10,3% от пациентите не установихме метилиране на нито един от изследваните гени. При останалите 89,7% поне един от тези ключови туморсупресорни гени бе инхибиран по механизма на промоторно метилиране. Това определя ролята на този механизъм в ларингеалната карциногенеза като изключително голяма.

Освен промоторното хиперметиране, ние изследвахме и наличието на мутации на гените CDKN2A и TP53. При първият ген установихме генетични аберации при 14,2% от пациентите. При 10,2% се установяват мутации с функционално значение, т.е. такива водещи до продукцията на нефункциониращ протеин. При карциномите на главата и шията блокирането на гена чрез мутации варира от 9-58% при различните проучвания (162,163). Получените резултати показват, че при карцинома на ларинкса промоторното хиперметиране има много по-голямо значение за инхибирането на този туморсупресорен ген, в сравнение с генетичните механизми, каквито са мутациите. Независимо от начина на блокиране на гена, това би довело до нарушен контрол на клетъчния цикъл и неконтролиран клетъчен растеж. Това пък от своя страна представлява основна характеристика на малигнените неоплазми.

Заслуга на екипа провел изследването е откриването на седем нови генетични аберации на гена CDKN2A, които не са описвани до сега в научната литература. Това включва две инсерции в екзон 1, три делеции и две точкови мутации в екзон 2.

Изключително важният за туморния контрол ген, наричан още пазител на генома, също бе изследван за генетични аберации. Такива бяха установени при 43,5% от болните, което е в съответствие с публикуваните

данни в литературата (108, 131, 162, 163). Те засягат екзони 5,6,7 и 8. Най-висока честота се наблюдава при 5-ти екзон, което също е в съответствие с научните данни докладвани до момента. И при този ген, както и при CDKN2A открихме осем генетични промени, неописвани до този момент. Всички те са мутации с промяна на рамката на четене. Очевидно значението на генетичните увреди на гена TP53 при карциномите на ларинкса е значително по-голямо в сравнение с гена на циклин-зависимия киназин инхибитор.

Значението на локалното разпространение на малигнените заболявания, както и на наличието на метастази за преживяемостта и прогнозата е всеизвестно. Много интересни обаче са резултатите, които получихме за значението на алкохолната консумация и тютюнопушенето за преживяемостта на пациентите с ларингеален карцином. По данни от нашето проучване пушачите и алкохолиците имат равни шансове в битката с болестта с тези, които не пушат и не консумират алкохол. Това означава, че тези два фактора имат предимно значение на инициатори на малигнения процес, отколкото да участват в неговата прогресия.

Определяйки цигареният дим и алкохолът като основните етиологични фактори за възникването на карцинома на гръкляна, си задаваме въпросът за ролята им на индуктор на епигенетичните и генетични промени в изследваните от нас туморсупресорни гени. Резултатите, които получихме потвърдиха категоричната връзка на тютюнопушенето и промоторното метилиране на ключовият за контрола на клетъчния цикъл ген - CDKN2A. Близки до статистическата значимост бяха и резултатите за общия метилационен статус. Повечето пациенти с метилирани всички четири гена бяха активни пушачи, пушещи над кутия и 1/2 дневно, докато тези с неметилирани гени бяха под тази граница.

Няколко други доклада също потвърждават връзката на метилирането на CDKN2A и цигарената експозиция (135,172).

Установихме права зависимост между консумацията на алкохол и метилационното инхибиране на гена MGMT при разделянето на пациентите на групи в зависимост от дневното количество, което те приемат. Когато направихме анализ според абсолютното количество на етанола получихме много интересни резултати, които по наши данни не са описвани до сега в литературата. Оказа се, че тежките алкохолици са с висока честота на неметилиран MLH1 ген. Някои доклади съобщават точно обратното. За карциномът на дебелото черво например, се описва повишена честота на метилиране на MLH1 при повишен алкохолен прием (137). Друга публикация пък за колоректалния карцином обявява резултати за липсата на такава връзка (82). Допълнителни разширени изследвания по въпроса за евентуалната протективна роля на алкохола по отношение на MLH1 метилирането биха дали яснота по въпроса за подобна спорна зависимост.

Нискодиференцираните варианти на ларингеален карцином се свързват с повишена честота на метилиране на MLH1. Подобна зависимост за останалите изследвани от нас гени не бе установена.

Констатирахме повишени нива на метилиране на гените MGMT, MLH1 и CDKN2A при пациентите с доказани метастази в регионалните лимфни възли на шията. От това следва да кажем, че инхибирането на транскрипцията на въпросните туморсупресорни гени по този епигенетичен механизъм има отношение към процеса на лимфогенна дисеминация. Няколко проучвания подкрепят ролята на p16 в процеса на метастазиране (172,124), чрез стимулиране на ангиогенезата и лимфангиогенезата. Проучване на модели на мишки с карцином на панкреаса показва, че реактивирането на CDKN2A инхибира

лимфангиогенезата и разпространението на тумора по лимфен път (Schulz P et al. 2008). Друго проучване показва, че възстановяването на експресията на CDKN2A при глиомни клетки потиска секрецията на съдовоендотелен растежен фактор, инхибира ангиогенезата и клетъчната инвазия. Асоциацията на метастазирането с метилирането на MLH1 също се потвърждава и от други автори (104). Някои автори съобщават за повишени нива на метилиране на MGMT и наличието на органични метастази при пациенти с малигнен меланом. Те от своя страна са с по-добра преживяемост от болните с неметилиран ген и метастази (175). Jing Yang и колектив пък съобщават за липсата на връзка на метилирането на гена на метилгуанин метилтрансферазата с лимфогенното метастазиране (176). Подобни убедителни резултати получихме по отношение на MGMT, MLH1 и общото метилиране в групата на пациентите с метастази, установени не само при първоначалната хоспитализация, но и в периода на проследяване. В действителност ролята на този епигенетичен механизъм в ларингеалната карциногенеза може да се отбележи с факта, който констатирахме, че нито един от пациентите, при които няма нито един метилиран ген не е имал метастази в регионалните лимфни възли. От тук изхожда и нашето мнение, че акумулирането на метилирани туморсупресорни гени може да се използва, като прогностичен маркер за ангиоинвазивността на тумора. Това създава предпоставки за бъдещи проучвания върху ролята на деметилиращата терапия при пациенти с високи нива на метилиране на туморсупресорните гени.

С локалното авансиране на малигнома на ларинкса установихме повишаване на честотата на метилиране на CDKN2A, на мутациите на пазителя на генома TP53, както и на общият метилационен статус. От тук следва и нашият извод, че тези епигенетични и генетични механизми участват както в инициацията, така и в прогресията на малигненият

процес. Подобни резултати за нарастване честотата на генетичните увреди на TP53 с нарастване на клиничния стадий е потвърдена и от други автори. (148).

7. ИЗВОДИ

1. Метилационният анализ установи, че при 89,7% от пациентите се наблюдава метилиране поне на един от изследваните туморсупресорни гени. От това може да направим извод, че този механизъм има съществена роля в процеса на ларингеална карциногенеза.
2. Мутации на гена CDKN2A се наблюдават при едва 14,2% от болните, което определя второстепенната им роля за инхибирането на гена. Инхибирането на TP53 чрез клинично значима мутация се наблюдава при 43,5% от болните и е важен фактор в малигнената трансформация при ларингеалния карцином.
3. Тютюнопушенето и алкохолът играят ролята на индуциращи фактори в процеса на ларингеална туморогенеза като засягат епигенетичния контрол на ключовите туморсупресорни гени - CDKN2A, MGMT и MLH1.
4. Инактивирането на изследваните туморсупресорни гени по пътя на промоторно метилиране и особено на CDKN2A, както и мутациите на TP53 са съществени за прогресията на малигнения процес и авансирането на заболяването при пациенти с карцином на ларинкса.
5. Откри се статистически значима зависимост между епигенетичното инактивиране на гените MGMT, MLH1 и CDKN2A по пътя на промоторно метилиране и наличието на метастази в регионалните лимфни възли. Това определя този механизъм като съществен в процеса на дисеминация. Акумулирането на метилирани туморсупресорни гени може да се определи като прогностичен маркер за ангиоинвазивността на тумора.
6. Установи се статистически значима зависимост между инхибирането на MGMT чрез промоторно хиперметиране и 2-годишната преживяемост на пациентите в IV клиничен стадий на ларингеален карцином. Метилирането на гена е лош прогностичен белег.

8. ПРИНОСИ

1. Проведеното от нас изследване е първото по рода си в България и едно от малкото проведени в света. Повечето описани в литературата проучвания разглеждат проблема ларингеален карцином в светлината на общото понятие - карциноми на главата и шията.
2. В процеса на изследване бяха открити седем аберации на гена CDKN2A, които не са описвани до сега в световната литература.
3. Откриха се осем нови мутации на TP53, които също не са описвани в световната литература.
4. Събраната банка от биологичен материал е основа за бъдещи нови проучвания по проблема.
5. Достигнати са изводи със статистическа значимост, за които съществуват оскъдни данни в световната литература.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Р.Д. Синелников и Я.Р.Синелников „Атлас по анатомия на човека.“ ISBN 5-225-01497-6 Издателство „Медицина“, Москва 1989
2. Димов Д, Георгиев Г „Ушни носни и гърлени болести“Издателство знание, 1998
3. Perlman A. „Normal swallowing physiology and evaluation.“ Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery. 1994; 2: 226-32.
4. Mendelsohn MS, McConnel FMS. „Function in the pharyngoesophageal segment.“ Laryngoscope. 1987; 97:483.
5. Цнев Ив. „Физиология и патофизиология на гръкляна.“ Клинико-морфологична риноларингология. 2003; 616-621
6. Mathieson L. and Carding P. „Physiology of the larynx.“ Scott-Brown’s Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery. 2008; 2159
7. Rosen C. A., Simpson B. „Anatomy and Physiology of the larynx“ Operative Techniques in Laryngology, 2008 XXVI ISBN 978-3-540-25806-3
8. /21/Bielamowicza S (2004) Perspectives on medialization laryngoplasty. Otolaryngol Clin N Am 37:139–160
9. Hirano M (1977) Structure and vibratory behavior of the vocal fold. In: Sawashima M, Cooper F (eds) Dynamic aspects of speech production. University of Tokyo, Tokyo, Japan, pp 13–30
10. Mathew OP, Abu-Osba YK, Thach BT (1982) Influence of upper airway pressure changes in respiratory frequency. Resp Physiol 29:223

11. Hirano M, Kakita Y (1985) Cover-body theory of vocal fold vibration. Speech science. College-Hill Press, San Diego
12. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). International Journal of Cancer. 1988; 41:483-91.
13. Falk RT, Pickle LW, Brown LM, Mason TJ et al Effect of smoking and alcohol consumption on laryngeal cancer risk in coastal Texas. Cancer Research 1989; 49: 4024-9.
14. Randall P Morton and Mark E Izzard „Epidemiology of Head and Neck Cancer.“ Scott-Brown’s Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery. 2008; 179: 2348-49
15. Scott M Langevin,¹ Michael D McClean,² Dominique S Michaud,³ Melissa Eliot,³ Heather H Nelson,^{4,5} and Karl T Kelsey^{3,6} „Occupational dust exposure and head and neck squamous cell carcinoma risk in a population-based case–control study conducted in the greater Boston area.“ Cancer Med. 2013 December; 2(6): 978–986.
16. Mettlin C, Graham S, Priore R, Marshal J, Swanson M. Diet and cancer of the oesophagus. Nutrition and Cancer. 1981; 2: 143-7
17. Vassileiou A, Vlastarakos PV, Kandiloros D, Delicha E, Ferekidis E, Tzagaroulakis A, Nikolopoulos TP. Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor. B-ENT. 2012;8(4):273-8.

18. F. Bravi^{1,2,*}, V. Edefonti², G. Randi¹, M. Ferraroni², C. La Vecchia^{1,2} and A. Decarli^{2,3} „Dietary patterns and upper aerodigestive tract cancers: an overview and review.” Oxford Journals Medicine Annals of Oncology Volume 23, Issue 12 Pp. 3024-3039.
19. Kaufman JA, Burke AJ. The aetiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. Otolaryngologic Clinics of North America 1997; 30: 1-19.
20. Kelly EA, Samuels TL, Johnston N. „Chronic Pepsin Exposure Promotes Anchorage-Independent Growth and Migration of a Hypopharyngeal Squamous Cell Line.“ Otolaryngol Head Neck Surg. 2013 Dec 27.
21. Brandsma JL, Steinberg BM, Abramson AL, Winkler B. „Presence of HPV type 16 related sequences in verrucous carcinoma of the larynx.“ Cancer research. 1986; 46: 2185-8
22. Nelke KH, Lysenko L, Leszczyszyn J, Gerber H. Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2013 Jul 15;67:610-6.
23. Willis RA: The spread of Tumors in the Human Body. London, Butterworth & Co, 1952
24. Leon Barnes Diseases of The Larynx, Hypopharynx and Trachea, Surgical Pathology of the Head and Neck, Third edition, 2009
25. Michaels L. Ear, nose and throat histopathology. New York: Springer-Verlag, 1987:387
26. Gream N, Helwig-Larsen K, Keiding N. Precision of histological grading of malignancy. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology. 1980;83:307-17

27. Roland NJ, Caslin AW, Nash J, Stell PM. The value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck*. 1992; 14: 224-9
28. Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours, UICC, 6th edn. New York: Wiley-Liss, 2002.
29. Pazdur R, Wagman L, Camphausen K, et al, eds. 12th ed. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. Norwalk, Conn: CMP Healthcare Media LLC; 2009.
30. National Comprehensive Cancer Network Head and Neck Cancers V 1.2012. Available at <http://www.nccn.org>.
31. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med*. Nov 27 2003;349(22):2091-8.
32. Garden AS, Harris J, Vokes EE, Forastiere AA, Ridge JA, Jones C, et al. Preliminary results of Radiation Therapy Oncology Group 97-03: a randomized phase ii trial of concurrent radiation and chemotherapy for advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol*. Jul 15 2004;22(14):2856-64.
33. Soo KC, Tan EH, Wee J, Lim D, Tai BC, Khoo ML, et al. Surgery and adjuvant radiotherapy vs concurrent chemoradiotherapy in stage III/IV nonmetastatic squamous cell head and neck cancer: a randomised comparison. *Br J Cancer*. Aug 8 2005;93(3):279-86.
34. Adelstein DJ, Lavertu P, Saxton JP, Secic M, Wood BG, Wanamaker JR, et al. Mature results of a phase III randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy with radiation therapy alone in patients with stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. Feb 15 2000;88(4):876-83.

35. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, Cullen K, Sarlis N, Tishler R, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* Feb 2011;12(2):153-9
36. Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortés-Funes H, Hitt R, et al. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* Aug 20 2005;23(24):5568-77
37. Steiner W, Ambrosch P. Endoscopic laser surgery of the upper aerodigestive tract: with special emphasis on cancer surgery. Berlin: Thieme, 2000
38. Peretti G, Piazza C, Bolzoni A, Mensi MC, Rossini M, Parrinello G et al. Analysis of recurrences in 322 Tis, T1 or T2 glottic carcinomas treated by carbon dioxide laser. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology.* 2004; 113:853-8
39. Dey P, Arnold D, Wight R, MacKenzie K, Kelly C, Wilson J. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2002; CD002027
40. Rosenthal N: Prometheus vulture and stem-cell promise. *N Engl J Med* 349:267, 2003
41. Korbling M, Estrov Z: Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349:570, 2003

42. Weissman I: Stem cells, units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 100:157, 2000
43. Bartek J, Lukas J: Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13:738, 2001
44. Walworth NC: Cell-cycle checkpoints kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12:697, 2000
45. Sherr CJ, McCormick F: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2:103, 2002
46. Sherr CJ: The INK4a/ARF network in tumor suppression.. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:731, 2001
47. Lowe SW, Sherr CJ: Tumor suppression by INK4a/ARF: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13:77, 2003
48. Roberts JM, Sherr CJ: Bared essentials of CDKN2 and Cyclin E.. *Nat Genet* 35:9, 2003
49. Nadal A, Cardesa A: Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003, 442(1):1-7.
50. Davis CD, Uthus EO: DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ 2004, 229(10):988-995.
51. Esteller M: Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics* 2007, 16 Spec No 1:R50-59.
52. Esteller M: Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4:351,2003

53. Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 2002, 16(1):6-21
54. Cooper DN, Taggart MH, Bird AP: Unmethylated domains in vertebrate DNA. *Nucleic acids research* 1983, 11(3):647-658.
55. Feinberg AP: Genomic imprinting and cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd edition, New York, McGraw-Hill, 2002, p43-55
56. Kruman II, Henderson GI, Bergeson SE. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(7):740-7
57. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics* 2007, 39(4):457-466.
58. Esteller M: Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* 2008, 358(11):1148-1159.
59. Chung C.H. et al Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer cell* 5, 489-500 (2004)
60. Hopkins. J et al Genetic polymorphism and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 17, 490-499 (2008)
61. Smeets. S. J. et al. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. *Cell. Oncol.* 31. 291-300 (2009)
62. Slaughter, D.P., Southwick, H. W. and Snejkal, W.: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963-968 (1953).

63. Smeets S.J., Braakhuis B.J.M., Abbas S. et al.; Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* (2006) 25, 2558-2564, Nature Publishing Group
64. Van Hauten, V.M.M et al, Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 93, 232-235 (2001)
65. Wiest T., Schwarz E., et al. Involvement of intact HPV 16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21, 1510-1517 (2002)
66. Tabor MP, Brakenhoff RH, Van Houten VMM, Kummer JA, Snel MHJ, Snijders PJF et al. *Clin Cancer Res* 7: 1523-1532 (2001)
67. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ. *Clin Cancer Res* 10: 3607-3613 (2004)
68. Kastan M.B., & Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323 (2004)
69. Onel K, Corden-Cardoc C, MDM2 and Prognosis. *Mol Cancer Res* 2:1, 2004
70. Shumeli A., Oren M.: Regulation of p53 by MDM2: fate is in the numbers. *Mol. Cell* 13(1): 4-5
71. Futscher B.W., Oshiro M.M., Wozniak R.J., Holtan N., Haniagan C.L., Duan H., Domann F.E. : Role for DNA methylation in the control of cell type specific MASPIN expression. *Nat Genet.*, 31,175-179 (2002)
72. Ballestar E. and Estaller M., Methyl CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochem. Cell Biol.*, 83, 374-384 (2005)

73. Ballestar E., Paz M.F., Valle L., Wei S., Fraga M.F., Espada J., Cigudosa J.C., Huang T.H., Esteller M.; Methyl CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBOJ*, 22, 6335-4635 (2003)
74. Klose R.J., Sarraf S.A., et al. DNA binding selectivity of MeCP2 due to requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol. Cell.*, 19, 667-678 (2005)
75. Lopez-Serra L., Ballestar E., Fraga M.F. et al. A profile of MBD protein occupancy of hypermethylated promoter CpG-islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res.*, 66, 8342-8346. (2006)
76. Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. *Nat. Genet.* (2000), 24, 132-138
77. Esteller M, Corn P.G., Baylin S.B. and Herman J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* (2001), 61, 3225-3229
78. Vertino PM, Sekowski JA, Coll JM, Applegren N, Han S, Hickey RJ, Malkas LH: DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 2002, 1(6):416-423.
79. Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M: DNA methylation is a reversible biological signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96(11):6107-6112.
80. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH: Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics* 2003, 13(12):759-766.
81. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R: DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Seminars in cancer biology* 2002, 12(5):389-398.

82. Gay LJ, Arends MJ, Mitrou PN, et al. MLH1 promoter methylation, diet and lifestyle factors in mismatch repair deficient colorectal cancer patients from EPIC-Norfolk. *Nutr Cancer* 2011; 63(7):1000-10
83. Laytragoon-Lewin N, Chen F, Castro J, et al. DNA content and methylation of p16, DAPK and RASSF1A gene in tumour and distant, normal mucosal tissue of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 2010; 30(11):4643-8
84. Bestor TH. Transposons reanimated in mice. *Cell* 2005; 122:322-5
85. Karpf AR, Matsui S, Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:8635-9
86. Feinberg AP. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res* 1999; 59:Suppl:1743s-1746s
87. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299:1753-55
88. Kaneda A, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2: common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* 2005;65:11236-40
89. Liu W, Guan M, Su B, et al. Rapid determination of AKAP12 promoter methylation levels in peripheral blood using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) analysis: application in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2010;411(13-14):940-6
90. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:564-9

91. Gao X, Fisher SG, Mohideen N, et al. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56:427-35
92. Su PF, Huang WL, Wu HT, Wu CH, Liu TY, Kao SY. P16(INK4A) promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner. *Oral Oncol* 2010;46(10):734-9
93. Myriam Loyo, Sara I. Pai. The Molecular Genetics of Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Clin N Am* 41 (2008) 657-672
94. Bosh FX, Ritter D, Enders C, et al. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer* 2004, 111:530-8
95. Wang Q, Han D, Wang W, Adenovirus-mediated p53 gene therapy of human laryngeal cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1998; 20:418-21
96. Qiu Z, Lao M, Wu C. Co-transfer of human wild type p53 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes via recombinant adenovirus induces apoptosis and enhances immunogenicity in laryngeal cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 167:25-32
97. Qui ZH, Wu CT, Lao MF et al. Growth suppression and immunogenicity enhancement of hep-2 or primary laryngeal cancer cells by adenovirus-mediated co-transfer of human wild type p53, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1 genes. *Cancer Lett* 2002; 182:147-54
98. Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J Otolaryngolog* 2005;26(1):12-7

99. Steinmann K, Sander A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009; 22(6):1519-26
100. Wong TS, Gao W, Li ZH, Chan JY, Ho WK. Epigenetic dysregulation in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Oncol* 2012;2012:739461
101. Makitie AA, Monni O. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2009;9(9):1251-60
102. Supic G, Kozomara R, Brancovic-Magic M, Jovic N, Magic Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009;45 (12):1051-7.
103. Paluszczak J, Misiak P, Wierzbicka M, Wozniak A, Baer-Dubowska W. Frequent hypermethylation of DAPK, RARbeta, MGMT, RASSF1A and FHIT in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa. *Oral Oncol* 2011;47(2):104-7
104. Liu K, Huang H, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. Promotor hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;126(5): 548-53
105. Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 366(6456):704-707.
106. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436-440

107. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D (1994) Rates of p16(MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 265:415-417
108. Loyo M, Pai SI. The molecular genetics of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 2008; 41(4):657-72
109. Benett KL, Karpenko M, Lin MT, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008;68(12):4494-9
110. Danahey DG, Tobin EJ, Schuller DE, Bier-Laning CM, Weghorst CM, Lang JC. P16 mutation frequency and clinical correlation in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* (1999) 119:285-288
111. Peter A Jones and Stephen B Baylin: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review Genetics* 3, 415-428 (2002)
112. Reed AL, Califano J, Carins P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Swell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D High frequency of p16 (CDKN2/ MTS1/ INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* (1996) 56:3630-3633
113. Jares P, Fernandez PL, Nadal A, Cazorla M, Hernandez L, Pinyol M, Hernandez S, Traserra J, Cardesa A, Campo E p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* (1997)15:1445-1453
114. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T, Inactivation of the p14ARF, p15INK4B and p16INK4A genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37:498-504 (2001)
115. Tripathi Bhar A, BanerjeeS, Chunder N, Roy A, Sengupta A, Roy B, Roychowdhury S, Panda CK Differential alterations of the genes in the

CDKN2A-CCND1-CDK4-RB1 pathway are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:642_650 (2003)

116. Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, Goodrow TL Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumor of the head and neck. *Cancer Res* 54:5050-5053 (1994)

117. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. *Nat Genet* 11:210-212 (1995)

118. Olshan AF, Weissler MC, Pei H, Conway K, Anderson S, Fried DB, Yarbrough WG Alterations in p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. *Oncogene* 14:811-818(1997)

119. Riese U, Dahse R, Fiedler W, Theuer C, Kosciely S, Ernst G, Beleites E, Claussen U, von Eggeling F Tumor suppressor gene p16 (CDKN2A) mutation status and promoter inactivation in head and neck cancer. *Int J Mol Med* 4:61-65 (1999)

120. Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA, High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumors. *Br J Cancer* 81:677-683 (1999)

121. Sanchez-Gespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 60:892-895(2000)

122. Poi MJ, Yen T, Li J, Song H, Lang JC, Schuller DE, Pearl DK, Casto BC, Tsai MD, Weghorst CM Somatic INK4A-ARF locus mutations: a significant

mechanism of gene inactivation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol Carcinog* 30:26-26(2001)

123. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61(3):939-42.

124. Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK, CDH1 and ADAM 23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173(1):31-7

125. Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A, INK4A-ARF alterations and p53 mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch* 441:133-142 (2002)

126. Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* 132:735-743(2006)

127. Kosciensky S, Dahse R, Ernst G, von Eggeling F The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 69:30-36 (2007)

128. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE: p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006, 443(7110):453-457.

129. Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366 (2001)

130. Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur. J. Cancer*, 36, 2294-2300 (2000)
131. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346-355
132. Demokan S, Suoglu Y, Demir D, Gozeler M, Dalay N: Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Ann Oncol* 2006, 17(6):995-999.
133. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW et al: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95(12):6870-6875.
134. Esteller M. and Herman J.G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O-6-methylguanine DNA-methyltransferase in human cancer. *Oncogene*, 23, 1-8 (2004)
135. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, et al. p16 (INK4a) and histology-specific methylation of CpG-islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001;61(8):3419-24.
136. Robert Smigiel, Agnieszka Stembalska-Kozłowska, Farhad Mirghomizadeh, Tomasz Krecicki, Tomasz Zatonski, David Ramsey, Monika Horobiowska, Jozef Jagielski, Nikolaus Blin, Maria Sasiadek Correlation among loss of heterozygosity, promoter methylation and protein expression of MLH1 in larynx cancer, *Oncol. Report*, 11(3) 707-710, ISSN 1791-2431, (2014)

137. Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS, Kim H. Effect of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(25):3834-41.
138. Monika E Hegi Ph D., Annie-Claire Diserens M.Sc., Thierry Gorlia M.Sc., et al.: MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma; *N Engl Med* (2005); 352:997-1003
139. Koji Yoshimoto, Masahiro Mizoguchi, Nobuhiro Hata et al. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Front. Oncol.* (2012) 10.3389
140. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med* 2005;352(10):997-1003
141. Gerson SL, Allay E, Vitantonio K, Dumenco LL: Determinants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 1995, 1(5):519-525.
142. Citron M, Graver M, Schoenhaus M, Chen S, Decker R, Kleynerman L, Kahn LB, White A, Fornace MGMT in human normal and tumor tissues. *Journal of the National Cancer Institute* 1992, 84(5):337-340.
143. Qian XC, Brent TP: Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer research* 1997, 57(17):3672-3677.
144. Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO: Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *The Journal of biological chemistry* 1994, 269(25):17228-17237.
145. Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW: Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA

methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Molecular and cellular biology* 1997, 17(9):5612-5619.

146. Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Califano JA: Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 2004, 130(1):39-44.

147. Taioli E, Ragin C, Wang XH, Chen J, Langevin SM, Brown AR, Gollin SM, Garte S, Sobol RW: Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC cancer* 2009, 9:354.

148. Boyle JO, Hakim J, Koch W et al. The incidence of p53 mutations increase with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993; 53:4477-4480

149. Dikshit RP, Gillio-Tos A, Brennan P, De Marco L, Fiano V, Martinez-Penuela JM, Boffetta P, Merletti F: Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Cancer* 2007, 110(8):1745-1751.

150. Shin-ichiro Maruya, Jean-Pierre J.Issa, Randal S. Weber et al. Differential Methylation Status of Tumor Associated Genes in Head and Neck Squamous Carcinoma: Incidence and Potential Implications. *Clin. Cancer Res.* (2004); 10: 3825-3830

151. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9700-4

152. Gonzales-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissue correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-5

153. Shani Bialik, Adi Kimchi: Pin-Pointing a new DAPK function: The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is negatively regulated by DAPK-mediated phosphorylation. (2011) 42; 2:139-141
154. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11:9-22
155. Mountzios G, Rampias T, Psyrri A (2014) The mutational spectrum of squamous cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Ann Oncol* doi:10.1093/annonc/mdu143
156. Xu J, Reumers J, Couceiro JR et al. (2011) Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* 7:285-295
157. Nobori T, Miura K, Wu DJ et al. (1994), Deletions of the CDKN2A gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756
158. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT et al. (1994) Frequent somatic mutations and homozygous deletions of p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8:27-32
159. Agnese V, Corsale S, Calo V, et al (2006) Significance of p16INK4a hypermethylation in primary head/neck and colorectal tumors: is it a specific tissue event? Results of 3 years GOIM prospective study. *Ann Oncol* 17(suppl. 7): 137-141
160. Pierini S, Jordanov SH, Mitkova AV, et al. (2013) Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1 and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head and Neck* doi: 10.1002/hed.23413
161. Kiwerska K, Rydzanicz M, Kram A et al. (2010) Mutational analysis of CDKN2A gene in group of 390 larynx cancer patients. *Mol Biol Rep* 37:325-332

162. Gleih LL, Salamone FN, (2002)Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 9:369-378
163. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. (2011) Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333:1154-1157
164. Jares P, Nadal A, Fernandez PL, et al. (1999) Dysregulation of p16MTS1/CDK4I protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous cell carcinoma of the larynx. *Int J Cancer* 81:705-711
165. Wei-Jia Kong, Song Zhang, et al. Methylation associated silencing of Death-associated-protein-kinase gene in laryngeal squamous cell cancer. (2005) *Laryngoscope*, 115,8:1395-1401
166. Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A., A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Res Notes* 2008;1:54
167. Cadiloro IL, Mikeska T, Hokland P, Dobrovic A. Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B(p15) gene. *Epigenetics Chromatin* 2008; 1(1):7
168. Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England journal of medicine* 2003, 349(21):2042-2054.
169. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancer. *Nat Med* 1995;1:682-92.
170. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB Inactivation of CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently

associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* (1995) 55:4525-4530

171. Sasiadek MM, Stembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Ramsey D, Kayademir T, blin N. Impairment of MLH1 and CDKN2A in oncogenesis of laryngeal cancer. *Br. J Cancer* 2004;90(8):1594-9

172. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstorm E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002;21(27):4231-6

173. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D, Promotor hypermethylation patterns of p16, O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase and death- associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 61:939-942 (2001)

174. Esteller M, Hamilton S.R., Burger PC, Baylin S, Herman JG nactivation of DNA repair gene O-6-methylguanine DNA-methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, 59, 793-797 (1999)

175. Cesinaro AM¹, Sartori G, Migaldi M, Schiroso L, Pellacani G, Collina G, Maiorana A. Prognostic significance of MGMT gene promoter methylation in differently treated metastatic melanomas. *Pathology*. 2012 Jun;44(4):313-7. doi: 10.1097/PAT.0b013e328353a0ff.

176. Jing Yang,¹ Xin-Bing Zhu,² Li-Xia He,³ Zhao-Wei Gu,¹ Ming-Zhu Jin,¹ And Wen-Yue Ji¹ Clinical significance of epigenetic silencing and re-expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase using epigenetic agents in laryngeal carcinoma Published online 2014. doi: 10.3892/ ol.2014.2662 PMID: PMC4247240

Списък с публикациите свързани с дисертационния труд:

1. **Йорданов С.**, Станчева Г., Мелничаров М., Попов Т., Горанова Т., Кънева Р., Генадиева М (2013) Карцином на ларинкса и хипофаринкса. Механизми на канцерогенезата. Medinfo ISSN 1314-0345; 3:35-36
2. **Йорданов С.**, Горанова Т., Генадиева М., Конов Д., Попов Т., Кънева Р., Рангачев Ю. (2014) Молекулни основи на ларингеалната карциногенеза и роля на промоторното хиперметиране – обзорна статия. Международен бюлетин по оториноларингология. 4/2014
3. Teodora A Todorova, **Stanislav H Jordanov**, Gergana S Stancheva, et al; Mutational Status of CDKN2A and TP53 Genes in Laryngeal Squamous cell Carcinoma. Pathology & Oncology Research 08/2014 ISSN 1219-4956 /Impact factor 1,806/
4. Pierini S, **Jordanov SH**, Mitkova AV, Chalakov IJ, Melncharov MB, Kunev KV, Mitev VI, Kaneva RP, Goranova TE. Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. Head Neck. 2014 Aug;36(8):1103-8

Участия в международни конгреси свързани с дисертационния труд:

1. Stancheva G, Goranova T, **Yordanov S**, Mitkova A, Chalakov I, Poptodorov G, Kaneva R, Mitev V, Gabrovsky N, Kunev K, “Promotor hypermethylation in Bulgarian patients with glial and laryngeal cancer.”, 21-st Meeting of European Association for Cancer Research, Oslo, Norway, 26-29 June 2010
2. Tzveova R, Stancheva G, **Yordanov S**, Mitkova A, Chalakov I, Kaneva R, Mitev V, Goranova T, “Promotor hypermethylation of DNA repair genes in Bulgarian patients with laryngeal carcinoma.”European Human Genetics Conference 2011, Amsterdam, The Netherlands, May 28-31, 2011
3. Stancheva G, Tzveova R, **Yordanov S**, Mitkova A, Chalakov I, Kaneva R, Mitev V, Goranova T “Promotor hypermethylation of CDKN2A gene in Bulgarian patients with laryngeal squamous cell carcinoma.” IV International Congress of Molecular Medicine, Yeditepe University, Istanbul, 27-30 June 2011
4. Stefanova M, **Yordanov S**, Tzveova R, Mitkova A, Chalakov I, Kaneva R, Mitev V, Goranova T, “The prevalence of microsatellite

instability and loss of heterozygosity in Bulgarian patients with laryngeal carcinoma. ”The European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm, 23-27 September 2011

Доклади на национални форуми:

- 1. Йорданов С, Чалъков И, Кунев К, Горанова Т, Станчева Г, Кънева Р, „Роля на промоторното хиперметиране в туморогенезата при карцином на ларинкса и хипофаринкса.”, XI Белинов симпозиум, Пловдив, 29-31 Октомври 2010**
- 2. Йорданов С, Горанова Т, Станчева Г, Мелничаров М, Чалъков И, Митев В, Кънева Р, Генадиева М, „Епигенетични промени при ларингеалната канцерогенеза” XIII Белинов симпозиум с международно участие, Златни пясъци, 28-30 септември 2012**

Авторът изразява благодарност и дълбок поклон пред паметта на своя първи научен ръководител проф. Кунчо Кунев, който даде идеята и своята подкрепа за реализирането на този труд.

Благодарност и към моят настоящ научен ръководител и всички мои учители и колеги от клиниката по УНГ болести на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”, на чиято всеотдайност и отношение дължа своето професионално развитие.

Специални благодарности на доц. Радка Кънева, Теодора Горанова, Гергана Станчева, Теодора Тодорова и всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, които помогнаха за завършения вид и съвременния облик на дисертационния труд.

Огромни благодарности към моето семейство за търпението и подкрепата, която ми бе нужна.