

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО УШНИ, НОСНИ И ГЪРЛЕНИ БОЛЕСТИ

Д-р Станислав Христов Йорданов

Карцином на ларинкса – епигенетични и генетични промени.

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност: оториноларингология

Научен ръководител:

Проф. д-р Диана Петрова Попова, дмн

София 2015

Дисертационният труд е написан на 152 машинописни страници и включва 31 фигури и 47 таблици. Библиографският списък съдържа 176 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра по Ушни, Носни и Гърлени болести към Медицински факултет при Медицински университет – София съгласно правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ София на 02.10.2014г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.03.2015г от 13:00 часа в аудиторията на клиника по УНГ болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” ЕАД, гр. София, съгласно член 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и въз основа на заповед N РК 36-2702 от 25.11.2014г. на Ректора на МУ София, пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Диана Петрова Попова, д.м.н. – вътрешен член и научен ръководител.
2. Проф. д-р Иван Йорданов Чалъков, д.м. – вътрешен член
3. Проф. д-р Иван Тодоров Ценев д.м.н. – външен член
4. Доц. д-р Александър Вълков Вълков, д.м. – външен член
5. Доц. д-р Марио Петров Милков, д.м. – външен член

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ София и са на разположение в Катедрата по УНГ болести на Медицински факултет – София.

Номерацията на фигурите и библиографията не отговарят на тези в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	7
2.1 ЦЕЛИ	7
2.2 ЗАДАЧИ	7
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ	8
4.2 БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ.....	8
4.3 ПРЕДВАРИТЕЛНА ОБРАБОТКА НА БИОЛОГИЧНИЯ МАТЕРИАЛ.....	9
4.3.1 ЕКСТРАКЦИЯ НА ДНК ОТ ТУМОРНА ТЪКАН.....	9
4.4 ИЗСЛЕДВАНЕ НА МЕТИЛАЦИОНЕН СТАТУС ПОСРЕДСТВОМ MS-HRM (METHYLATION-SENSITIVE HIGH-RESOLUTION MELTING).....	9
4.5 ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	11
(Polymerase Chain Reaction – PCR)	11
ЕТАПИ НА ПОЛИМЕРАЗНАТА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	12
4.6 ХОРИЗОНТАЛНА АГАРОЗНА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА.....	13
4.7 ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ	14
4.8 СЛЕДОПЕРАТИВНА ТЕРАПИЯ.....	16
4.9 СЛЕДОПЕРАТИВНО ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ	16
4.10 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ	17
5. РЕЗУЛТАТИ.....	18
5.1 КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ	18
5.2 АНАЛИЗ НА ПРОМОТОРНОТО ХИПЕРМЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK.....	24
5.3 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЩИ CDKN2A	28
5.4 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЩИ TP53	30
5.5 ПРЕЖИВЯЕМОСТ	33
5.5.1 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ОСНОВНИЯ ПРОЦЕС	33
5.5.2 ЛОКАЛНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА И ПРЕЖИВЯЕМОСТ.....	34
5.5.3 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ.....	35
5.5.4 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И КЛИНИЧЕН СТАДИИ S	37
5.5.5 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ	38
5.5.6 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ	38
5.5.7 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ТЮТЮНОПУШЕНЕ	39

5.6 ТЮТЮНОПУШЕНЕ И ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK. ТЮТЮНОПУШЕНЕ И МУТАЦИИ НА ГЕНИТЕ CDKN2A И TP53	41
5.7 УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ И МЕТИЛИРАНЕ НА ГЕНИТЕ MGMT, MLH1, CDKN2A И DAPK. УПОТРЕБА НА АЛКОХОЛ И МУТАЦИИ НА ГЕНИТЕ CDKN2A И TP53.	42
5.8 МЕТИЛИРАНЕ И СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ	44
5.9 МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИЯ ЛИМФЕН БАСЕЙН И МЕТИЛАЦИОННА ИНХИБИЦИЯ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ.....	45
5.9.1 МЕТИЛИРАНЕ НА MGMT И МЕТАСТАЗИРАНЕ	45
5.9.2 МЕТИЛИРАНЕ НА MLH1 И МЕТАСТАЗИРАНЕ.....	46
5.9.3МЕТИЛИРАНЕ НА CDKN2A И МЕТАСТАЗИРАНЕ	48
5.9.4 ПРОМОТОРНО МЕТИЛИРАНЕ НА DAPK И МЕТАСТАЗИРАНЕ	49
5.10 МУТАЦИИ НА CDKN2A И TP53 И МЕТАСТАЗИРАНЕ	51
5.10.1 МУТАЦИИ НА CDKN2A И МЕТАСТАТИЧНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ	51
5.10.2 МУТАЦИИ НА TP53 И МЕТАСТАЗИРАНЕ	52
5.11 МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ И ВРЪЗКАТА ИМ С РАННИ И КЪСНИ МЕТАСТАЗИ В РЕГИОНАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ	54
5.12 ИНАКТИВИРАНЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ И ЛОКАЛНОТО РАЗПРОЗТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА ПО СТАДИИ T0-4	56
5.13 ИНАКТИВИРАНЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ И ЛОКАЛНОТО РАЗПРОЗТРАНЕНИЕ НА ТУМОРА ПО СТАДИИ S.....	57
5.14 ВРЪЗКА НА ПРЕЖИВЯЕМОСТТА С МЕТИЛИРАНЕТО И МУТАЦИИТЕ НА ТУМОРСУПРЕСОРНИТЕ ГЕНИ.....	58
5.14.1 МЕТИЛИРАНЕ НА MGMT И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	58
5.14.2 МЕТИЛИРАНЕ НА MLH1 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	60
5.14.3 МЕТИЛИРАНЕ НА CDKN2A И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	61
5.14.4 МЕТИЛИРАНЕ НА DAPK И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	63
5.14.5 МУТАЦИИ НА CDKN2A И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	65
5.14.6 МУТАЦИИ НА TP53 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ	66
6. ДИСКУСИЯ.....	69
7. ИЗВОДИ.....	77
8. ПРИНОСИ	78

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. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

2.1 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

2.2 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.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В проведените изследвания бяха включени 105 пациенти с клинично и патохистологично доказан карцином на ларинкса плюс трима резервни. 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 молекулярна 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 използваха 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. (1,2) 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-GCGTTTTCGGATATGTTGGGATAGT (61°C)
- R-AACGACCCAAACACTCACCCAAA
- CDKN2A: F-CGGAGGAAGAAAGAGGAGGGGT (66°C)
- R-CGCTACCTACTCTCCCCCTCT
- MLH1: F-TAAAAACGAATTAATAGGAAGAG (56°C)
- R-TACCCGCTACCTAAAAAAATATAC
- 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 EpiTec 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 неметилирани, 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 некодиращата (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, които 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 MgCl₂.

ЕТАПИ НА ПОЛИМЕРАЗНАТА ВЕРИЖНА РЕАЦИЯ

- ПЪРВИ ЕТАП – ТЕРМИЧНА ДЕНАТУРАЦИЯ НА ДВОЙНОВЕРИЖНАТА ДНК

При 90 до 95°C 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°C.

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 ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

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 µl

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 – транслюминатор 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 rcf и стъпка на отстраняване на супернатантата (центрофугиране за 1 мин. при 160 rcf). Следва допълнително пречистване, като пробите се промиват със 70% етанол (20 мин. при 1650 rcf) 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 формаид.

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 (Ependorf).

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

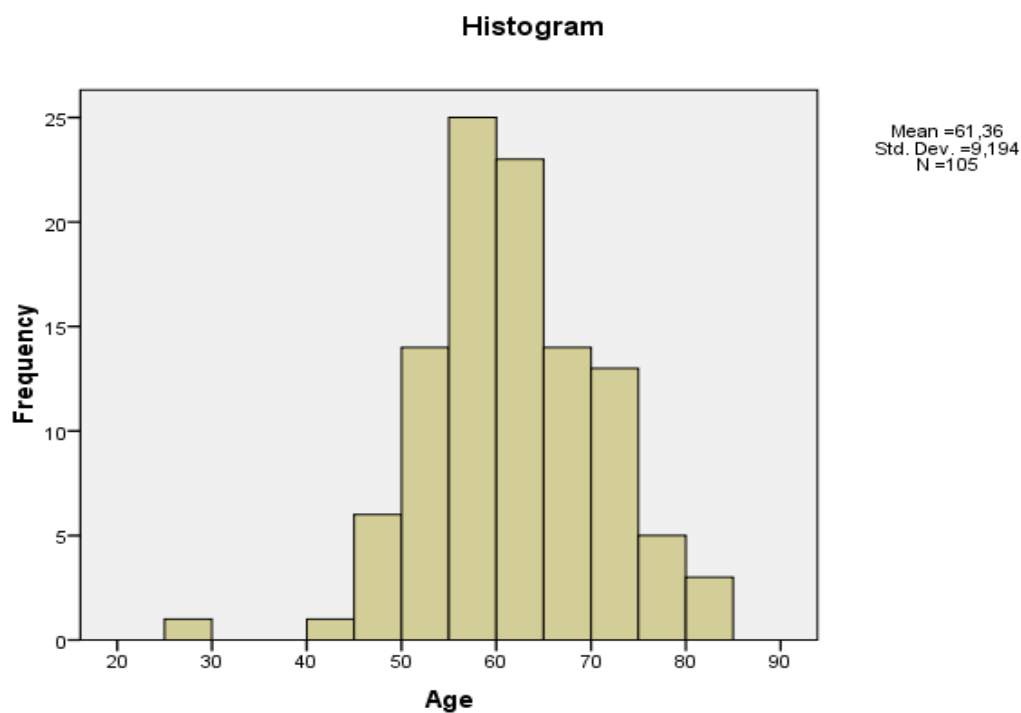
За статистическа обработка на резултатите се използва статистическа програма SPSS версия 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA). За определяне на връзката на промоторното хиперметиране и клиничните характеристики на пациентите използвахме тестът на Fisher и регресионен анализ. Стойности по-малки от 0.05 се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

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ

В направеното проучване бяха включени 105 пациенти с ларингеален карцином плюс трима резервни. 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 1.). Вижда се ясна тенденция за нарастване на заболяемостта след 50 годишна възраст.



Фиг. 1 Възрастово разпределение

Групата болни включва представители на 4 етноса – български, арменски, турски и цигански, като българите представляват основната част с 93,3%. (Таблица 1.)

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	

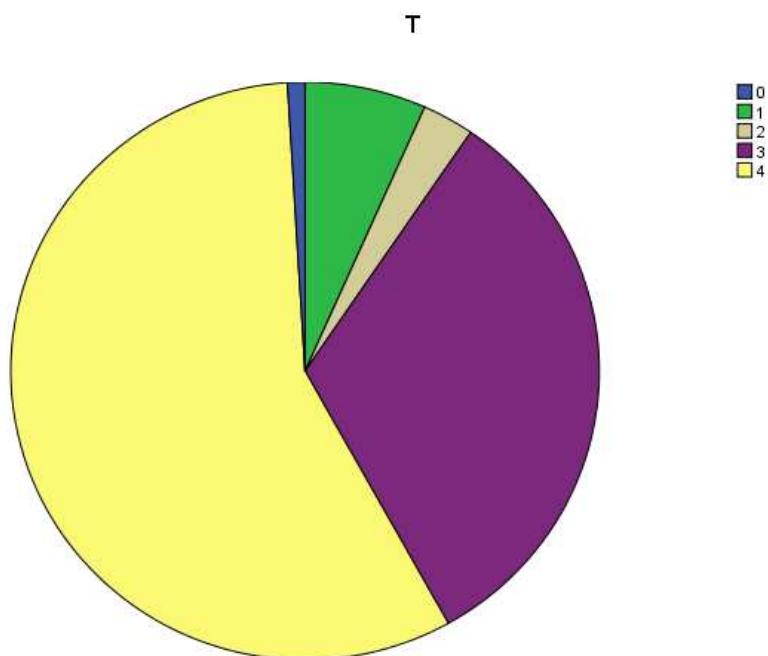
Таблица. 1

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.2), (Таблица 2) 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. 3. и Таблица 3).

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	

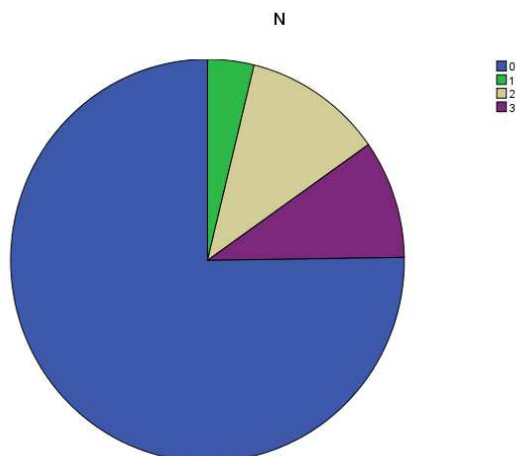
Таблица 2: Разпределение на пациентите според локалното разпространение на процеса. 89,5% от болните в групата са диагностицирани едва в Т3 и Т4 стадий на заболяването.



Фиг. 2 Разпределение по Т-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 3: Разпределение на групата според наличието на метастази в регионалните лимфни възли към момента на поставяне на диагнозата.



Фиг.3 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 4: 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 5 и Таблица 6).

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 5 : 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		

Таблица 6 : 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”.

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 7).

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 7: 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 8).

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 8: 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 9, 10).

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 9: 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 10: 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 11).

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 11: 0 – пациенти, при които не се установява метилиране на нито един от изследваните гени; 1- пациенти с метилиран 1 ген; 2 – пациенти с

метириани 2 гена; 3 – пациенти с метириани 3 гена; 4 – пациенти, при които чрез промоторно метириране са инхибириани и четирите от изследваните гени

Най-висока честота на метириране бе установена при гена на метилгуанинметилтрансферазата (MGMT), където 59 от туморите (60,8%) бяха с блокирана транскрипция по този механизъм. Вторият по честота на метириране е CDKN2A с 46 от туморите (47,4%). MLH1 беше метириран 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 метириране. Установихме 15 генетични изменения в екзон 1 и екзон 2 на гена (таблица 12). 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 синтезирианият 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 полиморфезъм 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 12: Мутации в туморсупресорния ген CDKN2A: М – missense, N – nonsense, S – silent, FS – frameshift mutation, SNP – single nucleotide polymorphism; с червен цвят са обозначени новооткритите мутации

5.4 ГЕНЕТИЧНИ АБЕРАЦИИ АНГАЖИРАЩИ TP53

При проведеното от нас изследване открихме 48 генетични аберации на гена TP53 при 56 от общо 108 изследвани пациента (51.9%); (таблица13). 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 13: Генетични аберации на туморсупресорния ген TP53 при пациенти с карцином на ларинкса: M – missense, N – nonsense, S – silent,

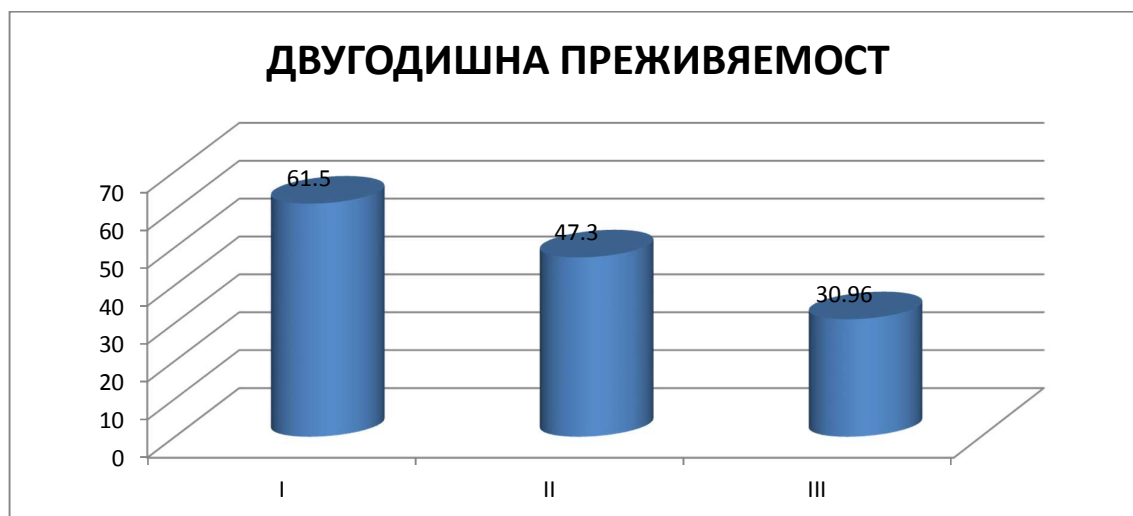
SNP – single nucleotide polymorphism, червено – нова, неописвана до сега генетична аберация.

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. 4 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.

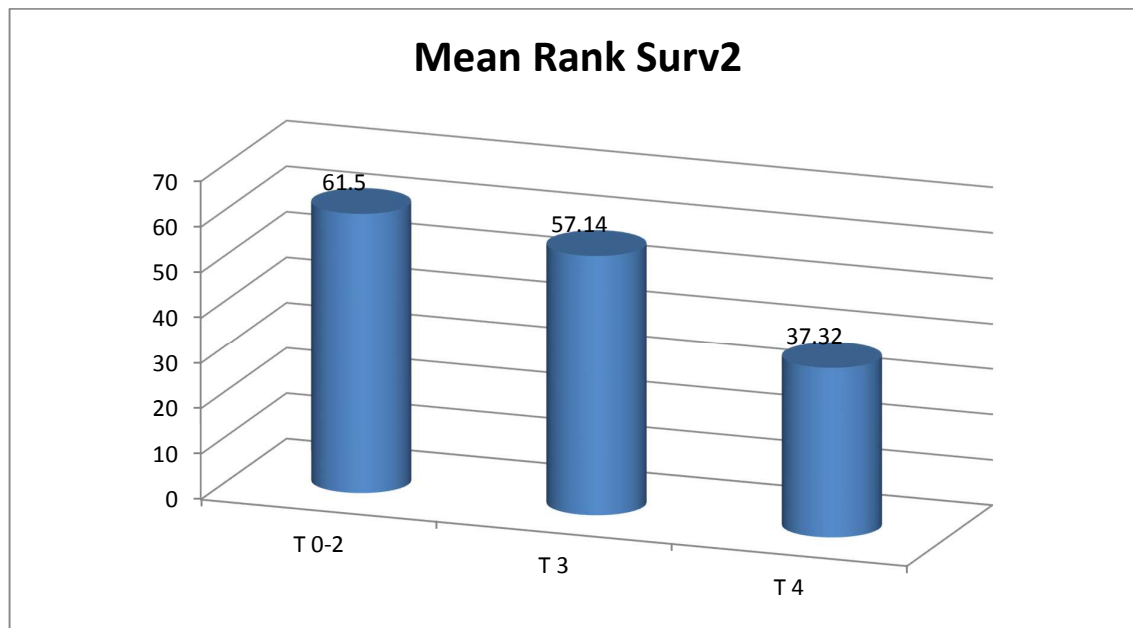
При определяне и на 1-, 3- и 4-ри годишната преживяемост отново ясно и категорично се потвърди посочената зависимост.

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 T. Тези от тях в стадии T0, T1 и T2 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 T3 се включиха в група 2. Група номер 3 обединяваше тези от тях с крайно авансирания T4 стадий на болестта.

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 ранен стадий на заболяването, т.е. в група

номер 1 са едва 11 души. Втората група или болните в стадии Т3 са 34, а тези в стадии Т4 – 60 души. За трима данните за стадирането на болестта са изгубени и не са включени в обработката. На фигура 5 е показана двугодишната преживяемост на посочените три групи от пациенти като резултатите са посочени чрез метода на Kruskal-Wallis за средните ранкове.



Фиг. 5 Локално разпространение на карцинома на ларинкса и двугодишна преживяемост: T0-2 – I-ва групар; T3 – II-ра група; T4 – III-та група.

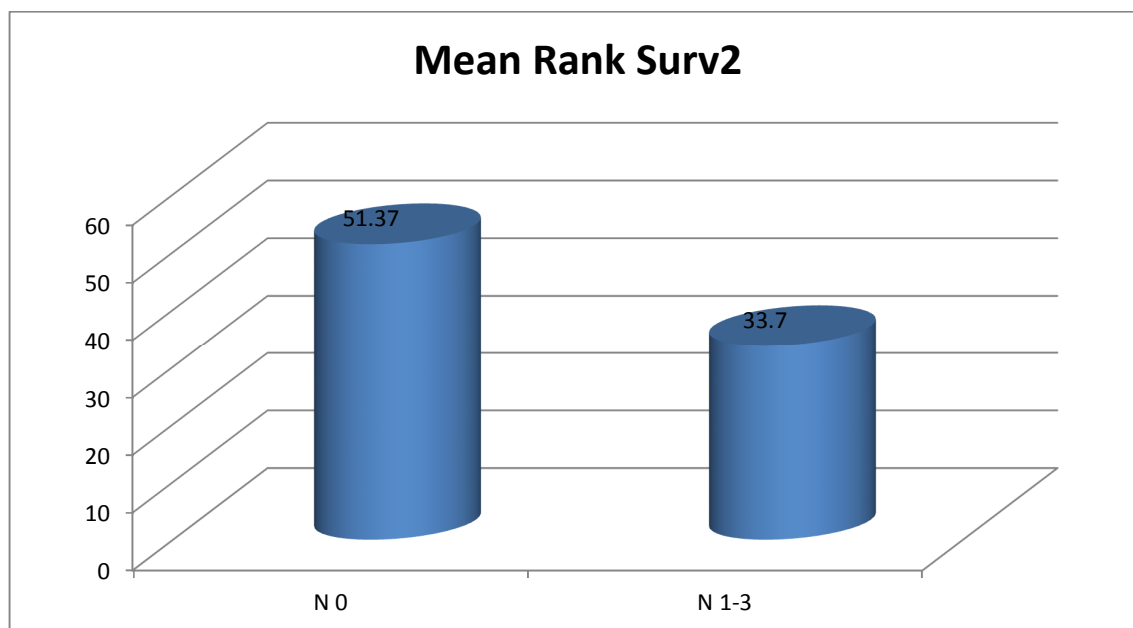
5.5.3 ПРЕЖИВЯЕМОСТ И МЕТАСТАЗИ В ШИЙНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ

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

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 ѝ на подгрупи, ще ни даде твърде малък брой в група за статистическа достоверност на резултатите. Получената корелация е изобразена на фигура 6. 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

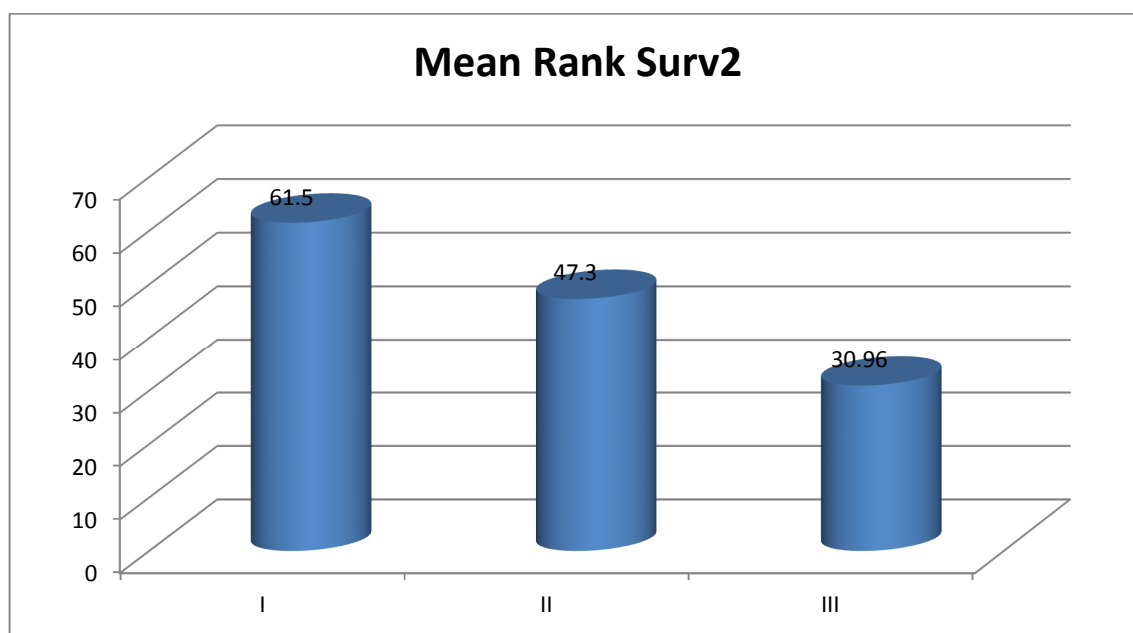


Фигура 6: Двугодишна преживяемост и наличие на метастази в регионалните лимфни възли. Първа група – N0 (без локорегионални метастази); Втора група – N1-3 (наличие на локорегионални метастази).

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 7. Преживяемостта на изследваната от нас група логично намалява прогресивно с нарастване на стадия на заболяването.

ПРЕЖИВЯЕМОСТ И КЛИНИЧЕН СТАДИЙ



Фигура 7: 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% - умеренкодиференциран 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.

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 14.

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 14: 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 15.

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 15: 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 инициран 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 16.

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 пушещи 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 – пушещи до 20 ц./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 16: 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 17.

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 17: 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 MLH1 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 18: 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 19).

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 19: 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 неметиранни 60% (45 човека). От това може да твърдим, че метилирането на MLH1 повишава риска от дисеминация на основния процес (Таблица 20)

Crosstab

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

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 20: 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 21).

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	32,0%	15,5%	47,4%
	Total	(41,33%)	(68,18%)	
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 21: 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 22).

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			
1	Count	32	9	41
	% of Total	33,0% (42,67%)	9,3% (40,91%)	42,3%
	Total			
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 22: 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 23).

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% (16,46%)	1,0% (3,85%)	13,3%
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)
Fisher's Exact test				,180	,088

Таблица 23: 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%

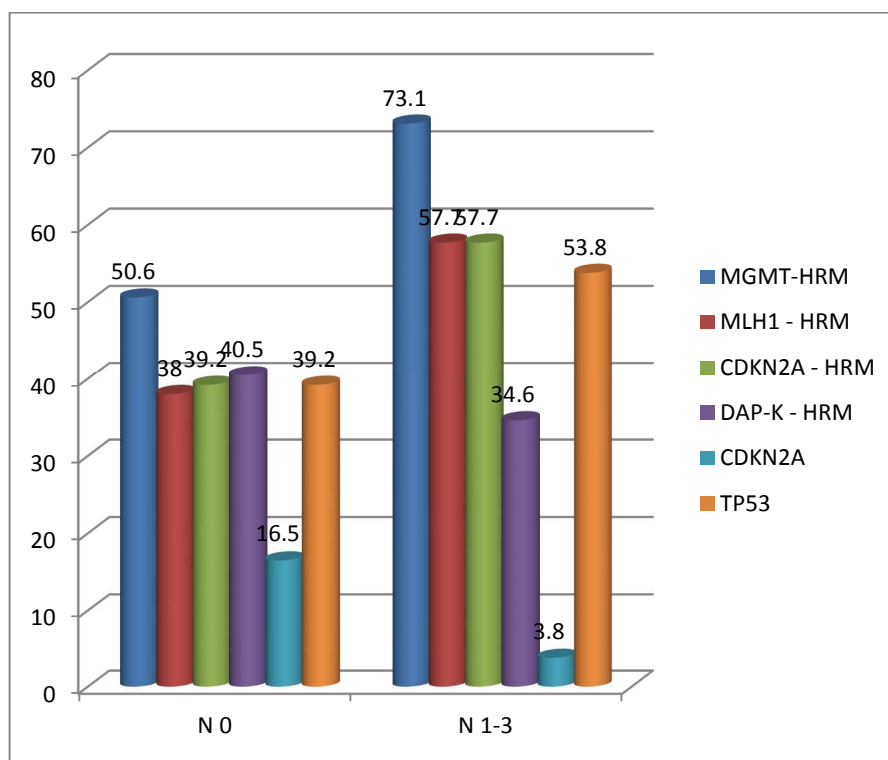
Chi-Square Test					
	Value	Df	Asymp.Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,704	1	,192		

Таблица 24: 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 8 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. 8 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 (Таблица25).

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 25: 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

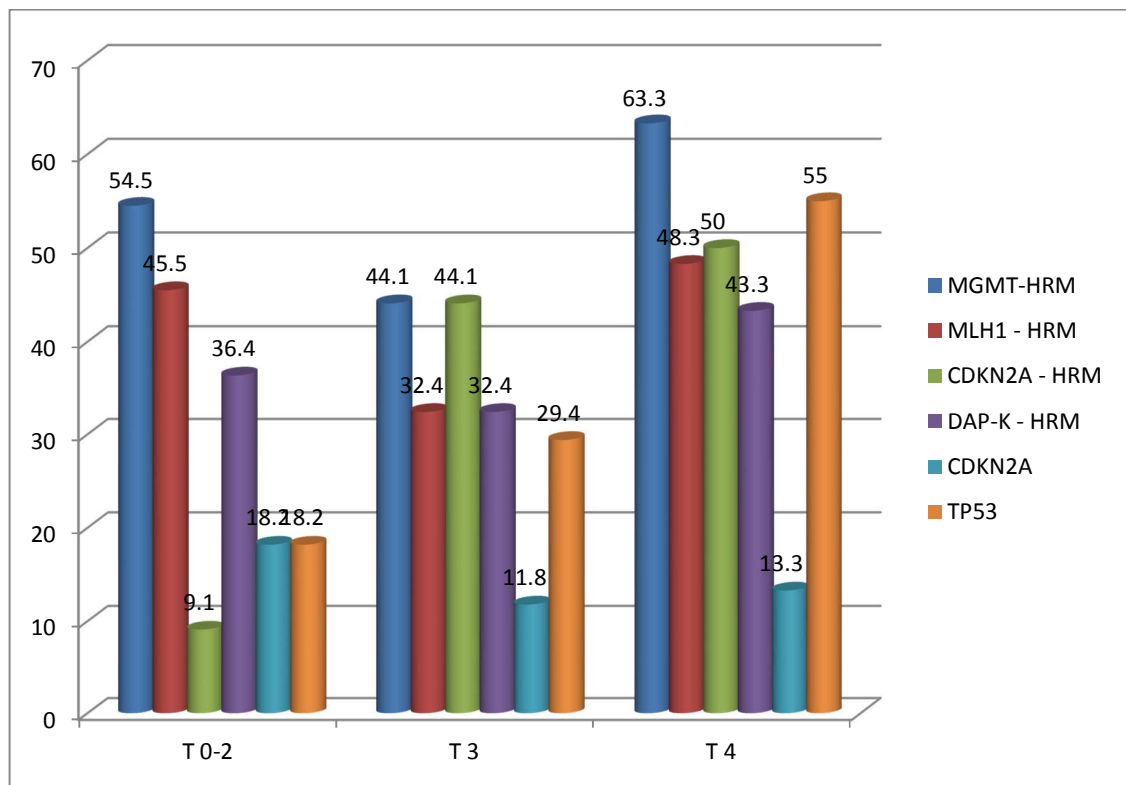
Честотата на инактивация на CDKN2A чрез промоторно метилиране и на TP53 чрез мутации нараства с локалното авансиране на карцинома. На границата на статистическата значимост бяха и резултатите за общият метилационен статус ($\chi^2 = 5,992$, $p = 0,05$), за който също се установи нарастване броя на метилираните гени с напредване на заболяването (Таблица 26, Фиг. 9).

МЕТИЛИРАНЕ И МУТАЦИИ / СТАДИЙ T 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

Таблица 26: Инхибиране на туморсупресорните гени и стадии T. В червено са означени резултатите със статистическа значимост.



Фиг. 9 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 РАЗПРОЗТРАНЕНИЕ 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 27).

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 27: 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 28: 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 29: 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 метилиране 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 МЕТИЛИРАНЕ НА MLH1 И ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Същият анализ на двугодишната преживяемост бе проведен и във връзка с метилирането на другия туморсупресорен ген в нашето изследване – MLH1. Подобна корелация обаче не бе установена. Това е видно от по-долните таблици (Таблица 30 и Таблица 31).

МЕТИЛИРАНЕ 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 30: Двугодишна преживяемост на пациентите в III клиничен стадий (SIII) и метилиране 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)

- a. Sx = IVA+IVB
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 31: 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)

- a. Sx = III

- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 32: 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)

- a. Sx = IVA+IVB
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 33: 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)

- Sx = III
- Kruskal Wallis Test , Ranks
- 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 34: 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)

- a. Sx = IVA+IVB
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 35: 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 36, 37)

МУТАЦИИ НА CDKN2A / ПРЕЖИВЯЕМОСТ 2 год. / S III

Test Statistics (a,b,c)

- a. Sx = III
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 36: 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 + S IVB

Test Statistics (a,b,c)

- a. Sx = IVA + IVB
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 37: 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)

- a. Sx = III
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks
- c. 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 38: 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)

- a. Sx = IVA + IVB
- b. Kruskal Wallis Test , Ranks

c. 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 39: 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 болелите 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% (3) и 53% (4). 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% (5,6). MLH1 е генът, който в научните статии е докладван да достига най-висока честота на метилиране - до 69% (от 23% до 69%) (4,7,8). Ние установихме честота от 46,4%. Подобни резултати се дадени и от Демокан и колектив (8). 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 (9,10). 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 (9,10,11, 12). 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 (13, 14).

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 (15). Друга публикация пък за колоректалния карцином обявява резултати за липсата на такава връзка (16). 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 (5,14), 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 (17). Някои автори съобщават за повишени нива на метилиране на MGMT и наличието на органи метастази при пациенти с малигнен меланом. Те от своя страна са с по-добра преживяемост от болните с неметилиран ген и метастази (18) Jing Yang и колектив пък съобщават за липсата на връзка на метилирането на гена на метилгуанин метилтрансферазата с лимфогенното метастазиране (19). 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. (20).

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 хиперметилиране 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. 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
2. 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
3. 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.
4. Steinmann K, Sander A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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.

9. Gleih LL, Salamone FN, (2002)Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 9:369-378
10. 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
11. Loyo M, Pai SI. The molecular genetics of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 2008; 41(4):657-72
12. 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
13. 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.
14. 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
15. 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.
16. 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
17. 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

18. 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.

19. 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

20. 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

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.