

# Genetic polymorphisms in some biotransformation enzymes and their impact on head and neck cancer susceptibility

## Citation for published version (APA):

Lacko, M. (2011). *Genetic polymorphisms in some biotransformation enzymes and their impact on head and neck cancer susceptibility*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110623ml>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20110623ml](https://doi.org/10.26481/dis.20110623ml)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Chapter 7

**Summary**, future implications and perspectives of this research

**Samenvatting**, toekomstige implicaties en perspectieven van dit onderzoek

**Súhrn**, možnosti budúceho uplatnenia a perspektívy tohto výskumu



## Summary

Tobacco and alcohol use and/or infection with oncogenic HVP are the most important etiological factors in head and neck carcinogenesis. However, little is known about the fact why some of the individuals exposed to tobacco (smoke) and alcohol do develop head and neck cancer, whereas others do not. Individual genetic predispositions based on polymorphisms in the genes coding for enzymes involved in biotransformation and detoxification of the (pro)carcinogens present in tobacco smoke and alcohol as well as genetic polymorphisms in other enzymes involved in the process of carcinogenesis might explain these inter-individual differences in head and neck cancer susceptibility .

**Chapter 1** is an introductory chapter which describes the role of phase I and II biotransformation enzymes in biotransformation and detoxification of (pro)carcinogens present in tobacco smoke. Polymorphisms in the genes coding for these enzymes may alter activity of these enzymes and influence biotransformation and elimination of (pro)carcinogens. Therefore not only the amount of (pro)carcinogens to which the mucosa of the UADT is exposed, but also the genetically determined capability to detoxify and eliminate these (pro)carcinogens might be an important risk modifying factor in head and neck carcinogenesis. A literature review of the genetic polymorphisms in phase I biotransformation enzymes mEH and COX-2 and the phase II biotransformation enzymes GSTM1, GSTT1, GSTP1, UGT1A7 and UGT1A10 with respect to their impact on head and neck cancer risk is given in this chapter.

**Chapter 2** describes the results of our case-control study on head and neck cancer risk in relation to genetic polymorphisms in the phase I biotransformation enzyme mEH. This enzyme is involved in detoxification of several intermediate metabolites, but mEH also activates some compounds like the procarcinogen BaP 7,8 oxide, present in tobacco smoke, which is transformed into an ultimate carcinogen. Two polymorphisms in the gene coding for mEH (*EPHX1*) are described. One of them (exon 3 variant at position 113 ) is associated with a 40% to 50% decreased enzyme activity, whereas the second polymorphism (exon 4 variant at position 139) increases enzyme activity with approximately 25%. According to different combinations of these genetic polymorphisms, the mEH activity can be predicted as low, intermediate or high. One would expect a reduced SCCHN risk in individuals with a

low or intermediate mEH activity (low concentration of carcinogens) when compared to a high mEH activity. In our study population consisting of 429 patients with cancer of oral cavity, pharynx or larynx and 419 healthy controls, either smokers or ex-smokers, we found no statistically significant differences in distribution of the polymorphisms with different predicted mEH activities between patients and controls. Non-significant differences in the distribution of these polymorphisms between patients and controls were also observed when stratified analysis with regard to smoking habits (moderate versus heavy smokers) and gender was performed. Although the homozygote variant of the exon 4 polymorphism was significantly more often found in patients with hypopharynx carcinoma when compared to the control group, no significant differences in the distribution of *EPHX1* polymorphisms according to predicted enzyme activities were discovered when analysed with respect to tumor site (larynx, oral cavity/oropharynx, hypopharynx). Our study, which is the largest on this topic so far, therefore does not demonstrate a risk-modifying effect of predicted altered mEH activity (due to genetic polymorphisms in *EPHX1*) in head and neck carcinogenesis.

**Chapter 3** presents the results of our study on *COX-2* polymorphisms and susceptibility to head and neck cancer. *COX-2* is a phase I enzyme catalyzing the conversion of arachidonic acid into prostaglandins, which are mediators of processes like cell proliferation, transformation, invasion, angiogenesis and others, which play an important role in carcinogenesis. Expression of the *COX-2* gene is inducible by pro-inflammatory and mitogenic stimuli. *COX-2* is present in head and neck cancer tissue and there is some evidence, that this enzyme might be also involved in head and neck carcinogenesis. Two of the three SNPs present in the *COX-2* promoter as described so far, (replacement of Guanine by Cytosine on base position -765 and replacement of Adenine by Guanine on base position -1195) significantly reduce the expression of this gene. In this chapter, we describe the results of our study on the relation between these functional polymorphisms in the *COX-2* promoter and risk for SCCHN. In total 431 patients with carcinoma of the oral cavity, pharynx or larynx and 438 healthy controls were investigated for the *COX-2* promoter polymorphisms. Statistical analysis showed no significant difference in the distribution of the *COX-2* gene promoter polymorphisms between patients and controls. The stratified analyses according to tumor site, age, smoking habits and alcohol consumption also showed no significant differences in the investigated *COX-2* polymorphisms between patients and controls. We can conclude that the above mentioned *COX-2*

promoter polymorphisms have no risk-modifying effect in head and neck carcinogenesis.

UGT1A7 is a phase II biotransformation enzyme involved in the conjugation and elimination of environmental toxins and (pro)carcinogens present in tobacco smoke. So far 11 different allelic variants of the gene coding for this enzyme have been found (*UGT1A7* \*1, \*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*8, \*9, \*10, \*11). Some of these *UGT1A7* variants showed a decreased catalytic activity to tobacco smoke (pro)carcinogens when compared to the enzyme coded by the wild type *UGT1A7*\*1 allele. **Chapter 4** deals with the genetic polymorphisms in *UGT1A7* in relation to head and neck cancer risk. We investigated 427 patients with carcinomas of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx or larynx and 420 healthy controls, smokers or ex-smokers, on the presence of *UGT1A7* genetic polymorphisms. Significant differences in the distribution of *UGT1A7* polymorphisms between patients and controls were observed. Surprisingly, polymorphisms coding for the high-activity UGT1A7 enzyme were more frequently present among patients than among controls. The stratified analyses showed, that these high activity polymorphisms were found significantly more often in patients with laryngeal carcinoma when compared to controls. The same trend, although not significant, was found for patients with carcinomas of the pharynx or oral cavity. Stratified analyses according to age, gender, smoking and alcohol consumption showed a higher prevalence of the predicted high-activity *UGT1A7* polymorphisms in the group of older patients (>60 years) heavy smokers (≥40 pack-years), or heavy drinkers (>4 units/day), when compared to the corresponding control subjects. In our study population therefore high activity *UGT1A7* polymorphisms were associated with an increased risk for SCCHN; and more especially in patients with laryngeal carcinoma, in older patients, in heavy smoking patients and in excessive alcohol drinkers. We also discussed possible explanations why high- instead of the expected low-activity UGT1A7 polymorphisms are associated with an increased risk for SCCHN.

In **Chapter 5** we describe the relation between genetic polymorphisms in *UGT1A1* and the risk of head and neck cancer. UGT1A1 is another phase II biotransformation enzyme belonging to the UGT family. Although UGT1A1 is involved in biotransformation and detoxification of some tobacco smoke carcinogens, this enzyme is probably not expressed in the mucosa of the Upper Aerodigestive Tract. However, UGT1A1 is the only enzyme which catalyses the glucuronidation of bilirubin and

therefore it is essential for the excretion of bilirubin. The serum concentration of bilirubin is inversely related to the activity of UGT1A1. Until recently, bilirubin was considered to be only a waste product of hemoglobin degradation. Recent research has shown however, that bilirubin may have an important anti-oxidant and anti-carcinogenic effect. High levels of bilirubin therefore may have a protective effect against cardiovascular diseases and probably also against cancer. Genetic polymorphisms in the TATA region of the *UGT1A1* promoter exist, which influence the transcriptional activity of this gene and subsequently also the UGT1A1 enzyme activity. In our study population of 421 patients with cancer of the oral cavity, pharynx and larynx and 417 healthy controls we found, that high activity *UGT1A1* polymorphisms (leading to low serum concentrations of bilirubin), are indeed associated with an increased risk for SCCHN. Stratified analysis has shown, that this high activity *UGT1A1* polymorphisms were more common in patients with laryngeal carcinoma, males, heavy smokers and excessive alcohol drinkers. The high activity *UGT1A1* polymorphisms were also more often present in patients with oral or pharyngeal cancer when compared to controls, but these associations were not statistically significant. We also found a linkage between the genetic polymorphisms in *UGT1A1* and *UGT1A7* in our study population, which may explain the dominating effect of the *UGT1A1* polymorphism, overruling the effects of the *UGT1A7* polymorphisms, as discussed in Chapter 4.

**Chapter 6** In contrast to diseases caused by an allelic variation or mutation of a single gene, many types of cancer including SCCHN can be considered from an etiological point of view as a complex disease, where the risk of disease development depends on external factors (exposure to carcinogens), together with the simultaneous presence of inconvenient variations in several genes involved in carcinogenesis. In this chapter we therefore evaluated the risk-modifying effect of different genetic polymorphisms of phase I biotransformation enzymes (mEH, COX-2) in combination with genetic polymorphisms of several phase II enzymes from the UGT family (UGT1A1, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B17). These are all enzymes involved in biotransformation and elimination of (pro)carcinogens (mEH, UGTs), or in other carcinogenesis related reactions (COX-2). We investigated whether the combination of different genetic polymorphisms in the genes coding for the above mentioned enzymes might have more impact on the risk of SCCHN when compared to the impact of each of these genes evaluated separately. Blood samples from 432 patients with cancer of the oral cavity, pharynx and larynx and

439 healthy controls were investigated for polymorphisms in genes coding for the above mentioned enzymes. In our study population, we could not find an additional effect on head and neck carcinogenesis for the investigated combinations of polymorphisms in the phase I and phase II biotransformation enzymes. In addition, no risk-modifying effect was found for the polymorphisms in *UGT1A8*, *UGT2B4*, *UGT2B7* or *UGT2B17* separately, which was not described before. However, we observed a risk-modifying effect on head and neck carcinogenesis for polymorphisms in *UGT1A6*; again the predicted high activity genotype was more common in cancer patients. We presumed, that this might be due to linkage disequilibrium between the *UGT1A6*, *UGT1A1* and *UGT1A7* polymorphisms, where the *UGT1A1\*28* polymorphism represents the true risk-modifying factor (associated with low bilirubin levels) overruling the *UGT1A6* and *UGT1A7* polymorphisms. The *UGT1A6* and *UGT1A7* polymorphisms are probably only markers of this risk-modification.

### **Future implications and perspectives of this research**

The main target of this research was to find the specific genetic polymorphisms in biotransformation enzymes as modulating factors in susceptibility to SCCHN. The possibility to recognize genetic predisposition and to identify individuals with increased risk for SCCHN, can contribute to the establishment of better prevention programs for this disease. Moreover, several biotransformation c.q. detoxification enzymes like *UGT1A1* potentially involved in carcinogenesis, are also involved in biotransformation and elimination of (chemo)therapeutics and other drugs, used in cancer treatment. Genetic polymorphisms in these enzymes (e.g. *UGT1A1\*28*) might influence treatment results as well as adverse effects of these drugs, which can differ between patients. Knowledge about polymorphisms in the genes coding for biotransformation enzymes as well as for other enzymes and proteins involved in carcinogenesis, might therefore be used in future, not only for identification of susceptible individuals, but also in decisions about the treatment of choice in patients with SCCHN and other malignancies.

Besides the above-mentioned implications, the results of this research may also help us to discover and elucidate new carcinogenic and anti-carcinogenic pathways involved in head and neck carcinogenesis. Such pathways might offer additional possibilities in the prevention and treatment of SCCHN. For example, we showed



that genetic polymorphisms in the UGT1A1 enzyme, important for conjugation and excretion of the strong anti-oxidant and anti-carcinogen bilirubin, might influence the risk for head and neck cancer, especially in heavy smokers and for laryngeal cancer. Further identification of this potential “bilirubin induced anti-carcinogenic effect” may offer therapeutic possibilities in primary and secondary prevention of head and neck cancer. Identification of new genetic polymorphisms in other genes involved in head and neck carcinogenesis, such as the genes involved in DNA-repair or apoptosis as well as identification of high-risk combinations of these genetic polymorphisms, may offer new perspectives for the patients.

Recent achievements in the Human Genome project with an increasing amount of newly identified SNPs and other genetic variations, together with the application of Genome Wide Association (GWA) studies to discover the relationship between genetic variations and susceptibility to diseases like cancer, will accelerate identification of new genetic factors involved in the etiology of many diseases including SCCHN. This will improve our knowledge about inter-individual differences in relation to SCCHN risk and will probably also lead to a more tailored individual approach, when dealing with the prevention and treatment of this disease. Hopefully, this new approach will lead to a decrease of the disease related mortality rates in patients with SCCHN.

On the other hand, broad implementation of genetic screening tests for multifactorial diseases such as SCCHN, will probably confront us also with new ethical questions and dilemmas: does the information about a high-risk genetic profile of an individual help in taking preventive measures and changing the unhealthy lifestyle? And what if not? Would the result of such genetic susceptibility testing for SCCHN influence medical insurance policy for high-risk individuals? Can everyone deal with “bad news” about his/her high-risk genetic profile? Might individuals who did not show a high-risk genetic profile be more inclined in participating in harmful behaviour (smoking, alcohol drinking) and therefore increase their risk for SCCHN? These and other issues, like the reliability and correct interpretation of the rapidly increasing numbers of commercial genetic screening tests, will become a challenge for both physicians as well as patients, in the near future.

## Samenvatting

Blootstelling aan tabak en tabaksrook is, samen met de consumptie van alcohol en infectie door oncogene HPV virussen, de meest belangrijke oorzaak van het ontstaan van een plaveiselcelcarcinoom in het hoofd-halsgebied (SCCHN). Weinig is echter bekend over het feit, waarom expositie aan een bepaalde hoeveelheid alcohol/tabaks-carcinogenen bij een deel van de blootgestelde populatie leidt tot ontwikkeling van SCCHN en bij een ander deel niet.

Een van de mogelijke verklaringen is de individuele genetische predispositie, gebaseerd op de aanwezigheid van polymorfismen (variaties) in de genen die coderen voor enzymen betrokken bij biotransformatie en detoxificatie van (pro)carcinogenen aanwezig in tabaksrook en alcohol, of op genetische polymorfismen in enzymen die op een andere manier betrokken zijn bij carcinogenese.

**Hoofdstuk 1** is een introductie van dit proefschrift en beschrijft de rol van fase I en II biotransformatie enzymen bij de detoxificatie van (pro)carcinogenen aanwezig in tabaksrook. Polymorfismen in de genen die coderen voor enzymen betrokken bij biotransformatie van (pro)carcinogenen beïnvloeden de activiteit van deze enzymen en als zodanig ook de detoxificatie en eliminatie van (pro)carcinogenen. Dat betekent dat niet alleen de hoeveelheid carcinogenen waaraan het slijmvlies van het hoofd-hals gebied is blootgesteld, maar ook dat er een genetisch invloed is op de capaciteit van detoxificatie en eliminatie van (pro)carcinogenen, die waarschijnlijk een belangrijke risico-modulerende rol speelt in de hoofd-hals carcinogenese. Dit hoofdstuk geeft een overzicht van de literatuur over de genetische polymorfismen in fase I (mEH, COX-2) and fase II (GSTM1, GSTT1, GSTP1, UGT1A7 en UGT1A10) biotransformatie enzymen en hun invloed op het risico voor hoofd-halskanker.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de resultaten van onze “case-control “ studie naar het risico op hoofd-halskanker in relatie tot genetische polymorfismen in het fase I biotransformatie enzym epoxide hydrolase (mEH). Dit enzym is betrokken bij detoxificatie van intermediaire metabolieten, maar activeert ook enkele, in tabaksrook aanwezige chemische procarcinogenen, zoals BaP 7,8 oxide, dat wordt getransformeerd tot een carcinogeen. In de literatuur zijn twee polymorfismen beschreven in het gen van mEH (*EPHX1*). Eén daarvan (exon 3 variant op positie 113) is geassocieerd met een 40 tot 50% verlaging van de enzymactiviteit, terwijl het tweede polymorfisme (exon 4 variant op positie 139) de enzymactiviteit met ongeveer 25% verhoogt.

Afhankelijk van de verschillende combinaties van deze polymorfismen kan per persoon een lage, intermediaire of hoge enzymactiviteit worden voorspeld. Bij personen met lage of intermediaire enzymactiviteit (lage concentratie van carcinogenen) zou men een verlaagd risico op hoofd-halskanker, ten opzichte van de personen met een hoge enzymactiviteit, kunnen verwachten. In onze studie populatie bestaande uit 429 patiënten met mondholte- keelholte-, of strottenhoofdkanker en bij een controle groep van 438 gezonde individuen, hebben we geen statistisch significant verschil in de distributie van de genetische polymorfismen tussen de patiënten en de controle groep kunnen vinden. Hetzelfde geldt ook voor de analyse met stratificatie voor rookgedrag, alcoholgebruik en geslacht. Hoewel de homozygote variant van het exon 4 polymorfisme significant vaker aanwezig was bij de patiënten met hypofarynxcarcinoom ten opzichte van de controle groep, zijn er met betrekking tot de verwachte enzymactiviteit geen significante verschillen gevonden tussen de patiënten (apart geanalyseerd per tumorlocatie) ten opzichte van de controle groep. In onze, tot nu toe de grootste studie gepubliceerd over dit onderwerp, hebben we dus geen risicomodulerend effect van het *EPHX1* polymorfisme op hoofd-halskanker kunnen aantonen.

**Hoofdstuk 3** behandelt de resultaten van onze studie naar genetische polymorfismen in *COX-2* gen en het risico op hoofd-halskanker. *COX-2* is een fase I enzym dat de omzetting katalyseert van arachidonzuur naar prostaglandinen. Prostaglandinen zijn mediators betrokken bij de regulatie van belangrijke bioprocessen zoals proliferatie en transformatie van cellen, maar ook angiogenese (vorming van nieuwe bloedvaten), invasie en andere processen betrokken bij het ontstaan van kanker. Expressie van het *COX-2* enzym wordt gestimuleerd door pro-inflammatoire (ontsteking stimulerende) en mitogene (celdeling veroorzakende) stimuli. *COX-2* is aanwezig in het weefsel van hoofd-hals tumoren en er zijn aanwijzingen dat dit enzym betrokken zou kunnen zijn bij het ontstaan van hoofd-halskanker. Twee van de drie tot nu toe beschreven “single nucleotide polymorphisms” (SNPs) aanwezig in de *COX-2* promotor (vervanging van guanine door cytosine op positie -765 en adenine door guanine op positie -1195) reduceren de expressie van het *COX-2* gen aanzienlijk. Deze twee *COX-2* polymorfismen werden bepaald bij in totaal 431 patiënten met mondholte- keelholte-, of strottenhoofdkanker en bij een controle groep van 438 gezonde individuen (rokers of voormalige rokers). Statistische analyse liet geen significant verschil in de distributie van de onderzochte *COX-2* polymorfismen tussen de patiënten en controle groep zien. Hetzelfde geldt ook voor de analyse gestra-

tificeerd voor tumorlokalisatie, leeftijd, rookgedrag en alcoholconsumptie. We concluderen, dat de door ons onderzochte polymorfismen in het *COX-2* gen geen risicomoderend effect hebben op het ontstaan van hoofd-halskanker.

UGT1A7 is een fase II biotransformatie enzym betrokken bij de conjugatie en eliminatie van toxinen aanwezig in ons milieu maar ook van (pro)carcinogenen uit tabaksrook. Tot nu toe zijn er 11 verschillende varianten beschreven van het gen dat codeert voor dit enzym (*UGT1A7\*1, \*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*8, \*9, \*10, \*11*). Enkele van deze varianten vertonen een verlaagde katalytische activiteit voor carcinogenen uit tabaksrook ten opzichte van het meest voorkomende (“wild type”) *UGT1A7\*1* allele. Zoals in **Hoofdstuk 4** beschreven werd bij 427 patiënten met mondholte-, keelholte-, of strottenhoofdkanker en bij een controle groep bestaande uit 420 gezonde individuen (rokers of voormalige rokers) het *UGT1A7* polymorfisme bepaald. Verrassenderwijs waren juist de polymorfismen die coderen voor hoge UGT1A7 enzymactiviteit (hoge detoxificatie van carcinogenen) statistisch significant vaker aanwezig in de patiënten groep in vergelijking met de controle groep. Gestratificeerde analyse liet zien dat dit verschil nog meer significant was in de subgroep patiënten met strottenhoofdkanker ten opzichte van de controle groep. Hetzelfde geldt ook voor de subgroep van oudere patiënten (> 60 jaar), zware rokers (≥ 40 “pack-years”) en bovenmatige alcohol drinkers (>4 alcoholische eenheden per dag) in vergelijking met de bijbehorende controle subgroep. Concluderend kunnen we zeggen dat in onze studiepopulatie genetische polymorfismen die coderen voor de hoge UGT1A7 enzymactiviteit geassocieerd zijn met een verhoogd risico op hoofd-halskanker. Een mogelijke verklaring voor het feit dat juist de polymorfismen die geassocieerd zijn met een hoge enzymactiviteit vaker voorkomen bij patiënten met hoofd-halskanker, wordt besproken in de discussie van dit hoofdstuk.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we de relatie tussen genetische polymorfismen in *UGT1A1* en het risico op hoofd-halskanker. UGT1A1 is een andere fase II enzym dat behoort tot de UGT familie. Hoewel het enzym UGT1A1 betrokken is bij biotransformatie en detoxificatie van enkele carcinogenen uit tabaksrook, komt dit enzym waarschijnlijk niet tot expressie in het slijmvlies van het hoofd-hals gebied. UGT1A1 is echter het enige enzym dat de conjugatie van bilirubine katalyseert en is daardoor essentieel voor de excretie van bilirubine uit het lichaam. De serumconcentratie van bilirubine is omgekeerd evenredig aan de UGT1A1 activiteit. Tot voor kort werd bilirubine slechts als een afvalproduct van de heem (hemoglobine) afbraak be-

schouwd. Recent onderzoek heeft echter aangetoond, dat bilirubine waarschijnlijk ook een belangrijke antioxidant is en mogelijk over anti-carcinogene werking beschikt. Een hoge serumspiegel van bilirubine kan daarom mogelijk beschermen tegen cardiovasculaire ziektes en misschien zelfs tegen kanker. Genetische polymorfismen in de TATA regio van de *UGT1A1* promotor (*UGT1A1*\*28 polymorfisme) beïnvloedt de transcriptie activiteit van het gen (het proces waarbij het gen wordt gekopieerd naar mRNA) en daardoor wordt ook de *UGT1A1* enzymactiviteit beïnvloed. In onze studie populatie, bestaande uit 421 patiënten met mondholte-, keelholte- en strottenhoofdkanker en uit 417 gezonde controle individuen, konden we aantonen dat *UGT1A1* polymorfismen gepaard gaande met een hoge *UGT1A1* activiteit (met een verwachte lage serum spiegel van bilirubine) inderdaad geassocieerd zijn met een verhoogd risico op hoofd-halskanker. Gestratificeerde analyse liet zien dat polymorfismen die leiden tot hoge *UGT1A1* activiteit vaker vertegenwoordigd waren in de subgroep patiënten met strottenhoofdkanker, mannen, zware rokers ( $\geq 40$  "pack-years") en bovenmatig alcohol drinkers ( $>4$  alcoholische eenheden per dag). Ook hebben we in onze studie populatie een verband aangetoond tussen de genetische polymorfismen in *UGT1A1* en *UGT1A7*. Het *UGT1A1* polymorfisme speelt in de hoofd-hals carcinogenese waarschijnlijk een dominante rol ten opzichte van het *UGT1A7* polymorfisme, hetgeen de resultaten vermeld in hoofdstuk 4 kunnen verklaren.

In contrast tot de ziekten die veroorzaakt zijn door een allelische variatie of de mutatie van een enkel gen, kunnen we verschillende typen kanker, inclusief hoofd-hals kanker, beschouwen als een complexe ziekte, waar het risico op het ontstaan afhankelijk is van externe factoren (expositie aan carcinogenen), in combinatie met de simultane aanwezigheid van "ongunstige" varianten in meerdere genen betrokken bij de carcinogenese. In **hoofdstuk 6** evalueren we het risico modifierend effect van fase I biotransformatie enzymen (mEH, COX-2) in combinatie met enkele fase II biotransformatie enzymen van de UGT familie (*UGT1A1*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B17*). Deze enzymen zijn betrokken in biotransformatie en eliminatie van (pro)carcinogenen (mEH, UGTs) of in andere voor carcinogenese belangrijke processen (COX-2). Wij hebben onderzocht of een combinatie van verschillende genetische polymorfismen in de genen die coderen voor de bovenvermelde enzymen meer impact op het hoofd-halskanker risico heeft, in vergelijking met een impact geanalyseerd per individueel gen. Hiervoor hebben wij bloedmonsters van 432 patiënten met mondholte-, keelholte- en strottenhoofdkan-

ker en van 439 gezonde controle individuen onderzocht op polymorfismen in genen die coderen voor de bovengenoemde enzymen. In onze studie populatie konden wij geen extra risico-modulerend effect vinden voor de combinatie van genetische polymorfismen in fase I en fase II biotransformatie enzymen. Ook hebben we geen risico-modulerend effect gevonden voor de onderzochte polymorfismen in *UGT1A8*, *UGT2B4*, *UGT2B7* en *UGT2B17* apart, wat niet eerder beschreven was. Wij hebben wel een correlatie gevonden tussen het onderzochte polymorfisme in *UGT1A6* en het hoofd-halskanker risico, waarbij de polymorfismen geassocieerd met verwachte hoge enzymactiviteit vaker aanwezig waren in de patiënten groep dan in de controle groep. Wij veronderstellen dat dit waarschijnlijk het gevolg is van het verband dat er bestaat tussen de polymorfismen in *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT1A7*, waarbij het *UGT1A1* (*UGT1A1\*28*) polymorfisme de ware risico-modulerende factor vertegenwoordigt (gekoppeld aan de serum bilirubine waarde), die het effect van de *UGT1A6* en *UGT1A7* polymorfismen aan zich ondergeschikt maakt.

### **Toekomstige implicaties en perspectieven van dit onderzoek**

Het belangrijkste doel van dit onderzoek was om te onderzoeken of specifieke genetische polymorfismen in biotransformatie enzymen een modulerende rol spelen bij het ontstaan van hoofd-halskanker. De mogelijkheid om genetische predispositie te herkennen en het identificeren van personen met een verhoogd risico op hoofd-halskanker, kan bijdragen aan het ontstaan van betere preventie programma's voor deze ziekte.

Bovendien zijn meerdere biotransformatie/detoxicatie enzymen zoals *UGT1A1*, die mogelijk betrokken zijn bij de carcinogenese, ook betrokken bij de biotransformatie en eliminatie van chemotherapeutica- en andere medicijnen die gebruikt worden in de behandeling van kanker. Genetische polymorfismen in deze enzymen (zoals *UGT1A1\*28*) zouden de behandel resultaten zowel als de neveneffecten van deze medicijnen, die per patiënt verschillen, kunnen beïnvloeden. In de toekomst kan kennis over polymorfismen in genen die coderen voor zowel biotransformatie enzymen, als voor andere enzymen of proteïnen betrokken bij de carcinogenese, gebruikt worden voor de identificatie van individuen met verhoogd risico, maar ook in beslissingen over de behandelingskeuze bij patiënten met hoofd-halskanker of andere maligniteiten.

Naast de hierboven genoemde implicaties, zullen de resultaten van dit onderzoek ons helpen bij de ontdekking en opheldering van nieuwe “pathways” in carcinogenese en anti-carcinogenese met betrekking tot hoofd-halskanker. Dit kan ons extra mogelijkheden voor preventie en behandeling van deze ziekte verschaffen. We hebben bijvoorbeeld aangetoond dat het genetische polymorfisme in UGT1A1 (*UGT1A1\*28*), dat belangrijk is voor de conjugatie en uitscheiding van het anti-oxidant en anti-carcinogeen bilirubine, het risico op hoofd-hals kanker zou kunnen beïnvloeden, in het bijzonder bij zware rokers en bij het voorkomen van strottenhoofdkanker. Nadere analyse van dit mogelijk “bilirubine geïnduceerde anti-carcinogeen effect” zou ons therapeutische mogelijkheden kunnen bieden in primaire en secundaire preventie van hoofd-halskanker. Identificatie van nieuwe polymorfismen in andere genen betrokken bij de carcinogenese van hoofd-halskanker, zoals in genen betrokken bij DNA-herstel of cel apoptose en de identificatie van risico verhogende combinaties van deze polymorfismen, zullen hopelijk voor onze patiënten nieuwe perspectieven bieden.

Recente successen bereikt in het Menselijk Genoom Project met een toenemend aantal nieuw geïdentificeerde genetische varianten, in combinatie met Genoom-Brede Associatie studies waarbij de relatie tussen de genetische variaties en vatbaarheid voor ziektes zoals kanker in kaart worden gebracht, zal de identificatie van genetische factoren die een rol spelen bij het ontstaan van veel ziektes, inclusief hoofd-halskanker, versnellen. Dit zal onze kennis over inter-individuele verschillen in het risico op hoofd-halskanker verbeteren en zal waarschijnlijk resulteren in een betere individuele benadering van preventie en behandeling van deze ziekte. Hopelijk zal deze nieuwe benadering leiden tot een daling van het aantal sterftegevallen door hoofd-halskanker.

Aan de andere kant zal het breed inzetten van genetische screeningstesten voor multifactoriële ziekten zoals hoofd-halskanker, ons confronteren met nieuwe ethische vragen en dilemma’s. Helpt de informatie over een hoog risico genetisch profiel in het nemen van preventieve maatregelen en bij het veranderen van de ongezonde levensstijl? En zo niet, wat dan? Zullen de resultaten van zulke genetische vatbaarheids tests voor hoofd-halskanker de zorgverzekeraars beïnvloeden in hun beleidskeuzes voor individuen met een verhoogd risico? Kan iedereen omgaan met slecht nieuws over zijn of haar ongunstig genetisch profiel? Zullen individuen die geen hoog risico profiel hebben juist meer geneigd zijn om ongezond gedrag te

vertonen (zoals roken en alcohol drinken) en daarmee hun risico op hoofdhalskanker vergroten?

Deze en andere onderwerpen, zoals de betrouwbaarheid en de correcte interpretatie van een snel toenemend aantal commerciële genetische screeningstesten, zullen in de nabije toekomst steeds meer een uitdaging vormen voor zowel de arts als voor de patiënten.





## Súhrn

Expozícia karcinogénnym (nádorotvorným) sploďinám prítomným v tabakovom dyme a v metabolitoch alkoholu, je spolu s infekciou spôsobenou nádorotvornými sérotypmi HPV vírusov najčastejšou a najdôležitejšou príčinou vzniku zhubných nádorov horných dýchacích a prehltacích orgánov (tiež nazývaných zhubnými nádormi hlavy a krku). Doteraz neobjasneným však zostáva fakt, prečo u niektorých jedincov vystavených nádorotvorným vplyvom tabaku a alkoholu dochádza k vzniku maligného nádoru, kým u iných jedincov vystavených tým istým škodlivým vplyvom ku vzniku nádoru nedochádza. Pravdepodobne tu zohráva dôležitú úlohu individuálna genetická predispozícia podmienená polymorfizmami (variáciami) v génoch kódujúcich tvorbu enzýmov potrebných na biologickú premenu (biotransformáciu) a zneškodnenie (detoxifikáciu) prekarcinogénov a karcinogénov prítomných v tabaku a v alkohole. Taktiež polymorfizmy v iných génoch zodpovedných za tvorbu enzýmov a ostatných bielkovín podieľajúcich sa na karcinogéneze (alebo na ochrannom účinku proti vzniku nádorov) zohrávajú pravdepodobne dôležitú úlohu v individuálnych rozdieloch v predispozícii k zhubným nádorovým ochoreniam v oblasti hlavy a krku.

V **prvej časti** tejto knihy opisujeme úlohu ktorú zohrávajú enzýmy 1. a 2. biotransformačnej fázy v biologickej premene a zneškodňovaní (pre)karcinogénov prítomných v tabaku a tabakovom dyme. Vrodené polymorfizmy v štruktúre génov kódujúcich pre tieto enzýmy môžu ovplyvňovať aktivitu detoxifikačných enzýmov voči (pre)karcinogénom a môžu viesť k významnému zníženiu ich enzymatickej účinnosti, či dokonca k ich úplnej afunkčnosti a tým aj k neschopnosti zneškodniť karcinogénnu látku. To znamená, že nielen rozdiely v expozícii slizničných povrchov horných dýchacích a prehltacích orgánov na určité množstvo nádorotvorných sploďín, ale aj individuálne geneticky podmienené odlišnosti v schopnosti zneškodnenia a eliminovania týchto látok môžu zohrávať dôležitú úlohu v individuálnych rozdieloch v predispozícii ku vzniku zhubných nádorov hlavy a krku.

V tejto časti podávame taktiež súhrnný popis dostupnej literatúry o genetických polymorfizmoch v biotransformačných enzýmoch 1. fázy akými sú mikrozomálna epoxid-hydroláza (mEH) a cyclooxygenáza-2 (COX-2) ako aj v biotransformačných enzýmoch 2. fázy patriacich do rodiny glutathion S-transferáz (GST): GSTT1, GSTP1 a do rodiny uridin 5'-difosfo-glucuronozyltransferáz (UGT): UGT1A7, UGT1A10 a ich vplyvu na riziko vzniku zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku.

**Druhá časť** knihy je venovaná opisu výsledkov našej (case-control) štúdie zameranej na riziko vzniku zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku vo vzťahu ku geneticky podmieneným polymorfizmom v biotransformačnom enzyme 1. fázy, mEH. Tento enzým sa podieľa na zneškodnení niekoľkých intermediárnych metabolitov, ale mEH taktiež aktivuje niektoré zlúčeniny ako napríklad potenciálne karcinogénny BaP 7,8 oxid prítomný v tabakovom dyme, ktorý je reakciou katalyzovanou mEH premenený na definitívny, silno nádorotvorný metabolit. V gène kódujúcom syntézu mEH (*EPHX1*) existujú dve varianty ovplyvňujúce funkciu vytvoreného enzýmu. Jeden z týchto variantov (exon 3 variant na 113 pozícii génu) je spojený so 40-50% znížením funkcie enzýmu, kým druhý variant (exon 4 variant na 139 pozícii génu) zvyšuje enzymatickú aktivitu o približne 25%. Kombinácia výskytu týchto dvoch genetických polymorfizmov u jedného jedinca určuje celkovú enzýmovú aktivitu, ktorá môže byť buď znížená, stredná, či zvýšená. Na základe horeuvedeného je možné predpokladať, že jedinci so strednou či nízkou aktivitou mEH (spojenou s nižšou koncentráciou karcinogénnych metabolitov) majú nižšiu šancu na získanie zhubného nádoru v oblasti hlavy a krku v porovnaní s jedincami s vysokou aktivitou tohto enzýmu. V našom súbore pozostávajúcom zo 429 pacientov so zhubnými nádorami ústnej dutiny, hltana alebo hrtana a z kontrolnej skupiny pozostávajúcej zo 419 zdravých jedincov (fajčiarov a bývalých fajčiarov) sme však nezistili žiadne štatisticky signifikantné rozdiely v distribúcii genetických polymorfizmov s predpokladanou rozdielnou aktivitou mEH enzýmu medzi pacientmi a kontrolnou skupinou. Taktiež neboli zistené žiadne rozdiely medzi týmito dvomi skupinami po vykonaní stratifikovanej analýzy v závislosti od intenzity fajčenia (silní fajčiari v porovnaní s ostatnými jedincami) a v závislosti od pohlavia. V analýze podľa lokalizácie zhubného nádoru sme zistili, že homozygotný výskyt polymorfizmu na 4 exone sa vyskytuje štatisticky signifikantne častejšie v skupine pacientov s nádorom lokalizovanom v hrtanovej časti hltana (hypopharynx) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Avšak distribúcia genetických variantov *EPHX1* génu vzhľadom na predpokladanú hodnotu enzymatickej aktivity sa medzi jednotlivými lokalizáciami zhubných nádorov (ústna dutina, hltan, hrtan) nelíšila. V našej, doteraz najväčšej, štúdií publikovanej na túto tému sme teda nepreukázali žiadny signifikantný riziko modulujúci vplyv mEH aktivity (podmienenej horeuvedenými genetickými polymorfizmami) na vznik zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku.

V **tretej časti** tejto knihy prezentujeme výsledky nášho výskumu zameraného na polymorfizmy v *COX-2* gène a ich vzťahu k prípadnej zvýšenej predispozícii na tvorbu

zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku. COX-2 je biotransformačný enzým 1. fázy, ktorý katalyzuje premenu kyseliny arachidónovej na prostaglandíny. Prostaglandíny su mediátormi procesov súvisiacich s proliferáciou, transformáciou a invazívnou aktivitou buniek, ale aj s angiogenezou (novotvorbou ciev) a ďalšími procesmi hrajúcimi dôležitú úlohu pri vzniku zhubných nádorov. Expresia COX-2 génu (proces aktivácie COX-2 génu vedúci ku tvorbu COX-2 enzýmu) je indukovaná zápalovými a delenie buniek podporujúcimi podnetmi. COX-2 enzým je prítomný v zhubných nádoroch hlavy a krku a existujú dôkazy na to, že tento enzým sa môže aktívne podieľať na vzniku týchto nádorov. Dva z troch doteraz známych polymorfizmov jednotlivých nukleotidov (nukleotid je základná stavebná časť genetického materiálu) v promótoře COX-2 génu (zámena bázy guanín za cytozín na pozícií -765 a zámena bázy adenín za guanín na pozícií -1195) signifikantne znižujú expresiu tohto génu. V tejto časti opisujeme výsledky našej štúdie na riziko vzniku zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku vo vzťahu k vyššie uvedeným polymorfizmom v COX-2 géne. V súbore pozostávajúcom zo 431 pacientov so zhubnými nádormi dutiny ústnej, hltana alebo hrtana a 438 zdravých kontrolných jedincov (fajčiarov a bývalých fajčiarov) sme zisťovali výskyt polymorfizmov v promótoře COX-2 génu. Štatistická analýza nevykázala žiadne rozdiely v distribúcii týchto polymorfizmov medzi pacientami a kontrolným súborom. Taktiež v stratifikovanej analýze v závislosti od lokalizácie tumoru, veku, pohlavia, intenzity fajčenia a konzumácie alkoholu, neboli zistené žiadne rozdiely vo výskyte COX-2 polymorfizmov medzi pacientami a kontrolným súborom zdravých jedincov. Na základe týchto výsledkov sme dospeli k záveru, že vyššie uvedené polymorfizmy v promótoře COX-2 génu nemajú žiadny riziko ovplyvňujúci vplyv na vzniku zhubných nádorov hlavy a krku.

UGT1A7 je biotransformačný a detoxifikačný enzým 2. fazy podieľajúci sa na konjugácii a eliminácii environmentálnych toxínov a (pre)karcinogénov prítomných v tabakovom dyme. Doteraz bolo zistených 11 rozličných polymorfných variantov v géne kódujúcom tvorbu tohto enzýmu (UGT1A7 \*1, \*2 \*3 \*4, \*5, \*6, \*7, \*8, \*9, \*10, \*11). Niektoré z týchto genetických variantov vykazujú v porovnaní s najčastejšie sa vyskytujúcim základným typom génu (UGT1A7\*1) výrazne zníženú katalytickú aktivitu voči (pre)karcinogénom v tabakovom dyme. Vo štvrtej časti knihy sa zaoberáme genetickými polymorfizmami v UGT1A7 géne a ich vplyvu na vznik zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku. V našom súbore pozostávajúcom zo 427 pacientov s nádormi dutiny ústnej, hltana, alebo hrtana a kontrolnou skupinou zdravých jedincov (fajčiarov a bývalých fajčiarov) sme zisťovali výskyt genetických

polymorfizmov v UGT1A7 géne. Ukázalo sa, že distribúcia týchto polymorfizmov je štatisticky signifikantne rozdielna medzi skupinou pacientov a kontrolnou skupinou. Polymorfizmy kódujúce tvorbu UGT1A7 enzýmu s vysokou aktivitou a tým aj s vysokou schopnosťou zneškodniť škodlivé karcinogénne látky, boli prekvapivo častejšie prítomné u pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Stratifikovaná štatistická analýza v závislosti od lokalizácie nádoru ukázala, že polymorfizmy s predpokladanou vysokou aktivitou boli ešte signifikantnejšie prítomné v podskupine pacientov so zhubným nádorom hrtana. Stratifikácia podľa veku, pohlavia, intenzity fajčenia a intenzity konzumácie alkoholu ukázala signifikantne zvýšený výskyt polymorfizmov s vysokou aktivitou enzýmu UGT1A7 v podskupine starších pacientov (>60 rokov), silných fajčiarov (1 balíček cigariet denne počas viac ako 40 rokov) a nadmerných užívateľov alkoholu (>4 alkoholické jednotky za deň) v porovnaní s korešpondujúcou podskupinou kontrolného súboru. To znamená, že zvýšená aktivita UGT1A7 enzýmu bola v našom súbore neočakávane spojená so štatisticky signifikantne zvýšeným rizikom tvorby zhubných nádorov v horných dýchacích a prehltacích orgánoch; a to hlavne u pacientov s nádormi hrtana, u starších pacientov, silných fajčiarov a u jedincov s nadmerným užívaním alkoholu. V tejto kapitole predkladáme taktiež možné vysvetlenie prečo práve polymorfizmy so zvýšenou (namiesto s predpokladanou zníženou) enzymatickou aktivitou sú spojené s väčším rizikom tvorby zhubných nádorov v horných dýchacích a prehltacích orgánoch.

V **piatej časti** tejto publikácie opisujeme vzťah medzi polymorfizmami v géne kódujúcom tvorbu UGT1A1 enzýmu. Tento enzým je ďalším biotransformačným a detoxifikačným enzýmom 2. biotransformačnej fázy patriacim do rodiny UGT. Aj napriek tomu že tento enzým zasahuje do biotransformácie a detoxifikácie niektorých karcinogénov prítomných v tabakovom dyme, tento enzým sa s najväčšou pravdepodobnosťou nevyskytuje v sliznici horných dýchacích a prehltacích orgánov. Na druhej strane je ale UGT1A1 jediným enzýmom katalyzujúcim glukuronizáciu bilirubínu a je preto nesmierne dôležitý pri jeho vylučovaní z tela. Až donedávna bol bilirubin považovaný len za odpadový produkt vznikajúci pri rozklade krvného farbiva hemoglobínu. Najnovšie výskumy však odhalili, že bilirubin má pravdepodobne tiež dôležité antioxidačné účinky a môže zabraňovať tvorbe zhubných nádorov. Zvýšená hladina bilirubínu môže teda poskytovať ochranný efekt proti kardiovaskulárnym a nádorovým ochoreniam. Geneticky polymorfizmus v takzvanom TATA (Timín, Adenín) bloku prítomnom v

promotore *UGT1A1* génu (tento polymorfizmus sa označuje aj ako *UGT1A1\*28*) ovplyvňuje transkripčnú aktivitu tohto génu a tým následne aj aktivitu *UGT1A1* enzýmu. V našej populácii pozostávajúcej zo 421 pacientov so zhubnými nádormi v dutine ústnej, v hltane alebo v hrtane a 417 zdravými jedincami (fajčiarmi alebo bývalými fajčiarmi) sme zistili, že polymorfizmy spojené so zvýšenou aktivitou *UGT1A1* enzýmu (a tým vedúce k zníženej koncentrácii bilirubínu v krvnom sére), sú skutočne štatisticky signifikantne spojené so zvýšeným rizikom tvorby zhubných nádorov v oblasti horných dýchacích a prehltacích orgánov. Stratifikovaná štatistická analýza vykázala, že polymorfizmy so zvýšenou *UGT1A1* aktivitou sú ešte signifikantnejšie prítomné u pacientov so zhubnými nádormi hrtana, u mužov, silných fajčiarov a nadmerných užívateľov alkoholu. Zvýšený výskyt týchto polymorfizmov sme pozorovali aj u pacientov s malignými nádormi ústnej dutiny a hltana, avšak v porovnaní s kontrolnou skupinou nebola tato asociácia štatisticky dostatočne signifikantná. V našej populácii pacientov a kontrolných zdravých jedincov sme taktiež odhalili vzájomnú väzbu medzi polymorfizmami *UGT1A1* génu a v predchádzajúcej časti popisovanými polymorfizmami v *UGT1A7* géne. *UGT1A1* polymorfizmy zohrávajú pravdepodobne dominantnú (ochrannú) úlohu v procese tvorby nádorov v oblasti hlavy a krku, v porovnaní s polymorfizmami *UGT1A7* génu, čo môže vysvetliť výsledky opísané vo štvrtej časti tejto knihy.

Na rozdiel od ochorení ktoré sú spôsobené alelickými variantmi alebo mutáciami jedného samostatného génu zodpovedného za vznik ochorenia, väčšina zhubných nádorov, vrátane tých lokalizovaných v oblasti horných dýchacích a prehltacích orgánov, je z etiologického hľadiska považovaných za komplexné ochorenie. To znamená, že riziko získania takého zhubného nádoru je závislé na simultánnej prítomnosti viacerých rizikových génov podieľajúcich sa na vzniku nádoru a zároveň na externých faktoroch, akými sú napríklad expozícia na karcinogénne metabolity prítomné v tabakovom dyme a v alkohole. V **šiestej časti** knihy sa zaoberáme riziko modulujúcim efektom genetických polymorfizmov v enzýmoch 1. biotransformačnej a detoxifikačnej fázy (mEH, COX-2) v kombinácii s genetickými polymorfizmami enzýmov 2. biotransformačnej a detoxifikačnej fázy patriacich do rodiny UGT (*UGT1A1*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B17*) a ich spoločným vplyvom na vznik zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku. Tieto enzýmy sa podieľajú na biotransformácii a eliminácii (pre)karcinogénov (mEH, rodina UGT enzýmov), alebo na iných reakciách dôležitých v procese vzniku zhubného nádoru (COX-2). Zisťovali sme, či vzájomná a súčasne prítomná kombinácia rôznych

genetických polymorfizmov v génoch kódujúcich tvorbu týchto enzýmov bude viac vplývať na riziko získania zhubného nádoru v oblasti hlavy a krku, v porovnaní s polymorfizmami v týchto génoch vyhodnocovaných pre každý gén samostatne. Vo vzorkách krvi odobraných 432 pacientom so zhubným nádorom dutiny ústnej, hltana, alebo hrtana a 439 kontrolným zdravým jedincom (fajčiarom alebo bývalým fajčiarom) bola stanovená prítomnosť polymorfizmov v génoch kódujúcich tvorbu vyššie uvedených enzýmov. V našom súbore pacientov a kontrolných jedincov sme nezistili žiadny extra zvýšený nádorotvorný efekt kombinovaného účinku genetických polymorfizmov v enzýmoch 1. a 2. biotransformačnej fázy, v porovnaní s efektom jednotlivých polymorfizmov vyhodnocovaných osobitne. Taktiež sme nezistili žiadny samostatný riziko ovplyvňujúci efekt genetických polymorfizmov kódujúcich tvorbu enzýmov UGT1A8, UGT2B4, UGT2B7 a UGT2B17, čo doteraz ešte nebolo publikované. Na druhej strane sme zistili koreláciu medzi genetickými polymorfizmami v *UGT1A6* géne a zvýšeným rizikom vzniku zhubného nádoru v oblasti hlavy a krku. Aj v tomto prípade, podobne ako pri *UGT1A7* géne boli polymorfizmy spojené so zvýšenou aktivitou génu štatisticky signifikantne častejšie prítomné v skupine pacientov v porovnaní so zdravými jedincomi. Na základe našich výsledkov predpokladáme, že vysvetlením tohto faktu je vzájomná väzba medzi genetickými polymorfizmami v génoch kódujúcich enzýmy UGT1A1, UGT1A6 a UGT1A7. Polymorfizmus v géne *UGT1A1* (*UGT1A1\*28*) opísaný v predchádzajúcej časti predstavuje pravdepodobne pravý a podstatný faktor ovplyvňujúci riziko vzniku nádoru (účinnok tohto faktoru je sprostredkovaný pravdepodobne zmenami hladiny sérového bilirubínu) ktorý prevláda nad vplyvom detoxifikačného efektu enzýmov kódovaných *UGT1A6* a *UGT1A7* génmi. Polymorfizmy v týchto dvoch posledne zmienených génoch môžeme pravdepodobne považovať iba za “markery” tohto riziko ovplyvňujúceho efektu.

### **Možnosti budúceho uplatnenia a perspektívy tohto výskumu**

Hlavným cieľom tohto výskumu bolo nájdenie špecifických genetických polymorfizmov v biotransformačných/detoxifikačných enzýmoch ktoré by mohli vysvetliť rozdielnosti v individuálnej predispozícii ku vzniku zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku. Možnosť odhalenia genetickej predispozície a identifikácie jedincov so zvýšeným rizikom, môže prispieť k zlepšeniu prevenčných programov zameraných na zníženie výskytu zhubných nádorov v tejto oblasti. Okrem toho,

viacero biotransformačných a detoxifikačných enzýmov ako napríklad UGT1A1, ktoré sa potenciálne podieľajú na (ochrane proti) vzniku týchto nádorov, sú tiež zapojené do biotransformácie a eliminácie chemoterapeutík a iných liečebných preparátov používaných v liečbe zhubných nádorov. Genetické polymorfizmy v týchto enzýmoch (napríklad *UGT1A1\*28*) môžu ovplyvňovať výsledky liečby ako aj nežiaduce účinky používaných liekov, ktoré sa môžu medzi jednotlivými pacientmi výrazne odlišovať. Znalosť polymorfizmov v génoch kódujúcich tvorbu biotransformačných enzýmov ako aj iných enzýmov a bielkovín podieľajúcich sa na tvorbe zhubných nádorov môžeme v budúcnosti využiť nielen na identifikáciu genetickej predispozície, ale aj za účelom optimálnej voľby liečby pre pacientov so zhubnými nádormi v oblasti horných dýchacích a prehltnacích orgánov a iných nádorových ochorení.

Okrem vyššie uvedeného využitia nám môžu výsledky podobne zameraného genetického výskumu pomôcť odhaliť a objasniť nové biologické pochody vedúce ku vzniku zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku, ako aj biologické pochody smerujúce k ochrane proti týmto nádorom. Tieto poznatky môžu poskytnúť ďalšie možnosti v prevencii a v liečbe nádorov v tejto lokalite. My sme napríklad našim výskumom preukázali, že geneticky polymorfizmus v UGT1A1 enzýme (*UGT1A1\*28*), ktorý je dôležitý pre konjugáciu a vylučovanie bilirubinu, môže ovplyvniť riziko vzniku zhubného nádoru v oblasti hlavy a krku (prevažne nádorov hrtana) a to hlavne u silných fajčiarov. Následné objasnenie tohto potenciálneho "bilirubinom ovplyvneného proti-nádorového efektu" nám môže ponúknuť ďalšie možnosti v primárnej a sekundárnej prevencii nádorov v tejto lokalizácii. Identifikácia nových polymorfizmov v génoch zapojených do tvorby zhubných nádorov v oblasti hlavy a krku, [akými sú gény podieľajúce sa na obnove nádorotvornými látkami poškodenej bunkovej DNA (DNA-repair) a gény vedúce k naprogramovanému odumretiu rakovinotvorným procesom poškodených buniek (apoptóza)] a odhalenie vysokorizikových kombinácií týchto polymorfizmov, môže ponúknuť nové perspektívy pre našich pacientov.

Nedávno boli dosiahnuté výrazné úspechy v rámci Ľudského Génového Projektu (Human Genom project), zavŕšeného kompletnou identifikáciou ľudského genetického materiálu, ktorá umožňuje odhaliť stále vzrastajúci počet nových genetických variácií akými sú napríklad jednotlivé nukleotidové polymorfizmy (Single nucleotide polymorphisms-SNPs), tvoriace takmer 80% medziľudských genetických variácií. Tieto poznatky spolu s aplikáciou rozsiahlych výskumov zameraných na zistenie genetických variantov v kompletnom genetickom materiáli



jednotlivca a vplyv týchto variantov na predispozíciu k zhubným nádorom, (tzv. Genome Wide Association-GWA štúdie) sa budú podieľať na urýchlenej identifikácii nových genetických faktorov zasahujúcich do vzniku mnohých ochorení vrátane zhubných nádorov horných dýchacích a prehltacích orgánov. Toto prispeje k zlepšeniu našich terajších znalostí o individuálnych rozdieloch v predispozícii a zvýšenému riziku vzniku týchto nádorov, čo vyústí pravdepodobne k viac "na mieru šitému" individuálnemu prístupu v prevencii a liečbe. Dúfajme, že tento nový prístup bude viesť k zníženiu úmrtnosti pacientov so zhubnými nádormi horných dýchacích a prehltacích orgánov, ktorá napriek medicínskym výtvarným výdobytkom uplynulých desaťročí zostáva stále relatívne vysoká.

Na druhej strane, obsahla implementácia genetických skriningových testov v multifaktoriálne podmienených ochoreniach akými sú aj zhubné nádory v oblasti hlavy a krku, nás bude konfrontovať s novými etickými otázkami a dilemami: Môže informovanosť o individuálnom vysokorizikovom genetickom profile pomôcť pri uplatnení preventívnych opatrení a zmeniť životný štýl jednotlivcov s takýmto rizikovým genetickým profilom? A čo ak nie? Bude znalosť výsledkov skriningových genetických testov ovplyvňovať politiku zdravotných poisťovní voči poistencom s vysokým rizikom k nádorovým ochoreniam a prípadným iným chorobám? Budeme pripravení na prijatie eventuálnej zlej správy o svojom prípadnom vysokorizikovom genetickom profile a dokážeme sa s tým vysporiadať? Môže sa stať, že jedinci ktorých testy nevykážu vysokorizikový genetický profil budú na základe tejto informácie viac inklinovať ku škodlivému životnému štýlu (fajčenie, konzumácia alkoholu) a tým práve zvyšovať svoje riziko vzniku zhubného nádoru v oblasti hlavy a krku? Odpoveď na tieto a ďalšie sporné otázky akými sú spoľahlivosť a správna interpretácia rýchlo vzrastajúceho počtu komerčne dostupných genetických skriningových testov, bude v dohľadnej budúcnosti tvoriť „ výzvu“ pre nás lekárov, ako aj pre našich pacientov.