

BIOMARKEREK ALKALMAZÁSA SORÁN FELMERÜLŐ PROBLÉMÁK MALIGNUS ÉS NEM MALIGNUS BETEGSÉGBEN SZENVEDŐ ALKOHOLISTÁK ESETÉBEN

Gundy Sarolta¹, Székely Gábor¹, Farkas Gyöngyi¹,
Pulay Attila², Remenár Éva³

Országos Onkológiai Intézet, ¹Onkocytogenetikai Osztály, ²Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet, Alkohológiai Osztály, Budapest, ³Fej-Nyaksebészeti Osztály

Az alkoholizálásból és a dohányzásból eredő rákfogékonyság genetikai biomarkereinek alkalmazhatóságát számos tényező módosítja. Ezek között néhány új szempont: a különböző alkoholizáló betegcsoportok önbevallási készsége, az egészséges magyarok mutagénekkel szembeni hiperérzékenysége, vagy a citogenetikai biomarkerek vizsgálati objektumaként használt perifériás limfociták immunreakcióiban is betöltött szerepe. Fentiek tisztázásához 432 alkoholizáló fej-nyaki daganatos (FNyD), 62 (még) nem malignus alkoholos májbeteg (ALKM), illetve 101, szubjektíven panaszmentes krónikus alkoholistát (ALK) vizsgáltunk. A klinikailag alátámasztott kórképek ellenére az FNyD és ALKM betegeknek csak 50%-a vallott be szeszesital-fogyasztást, teljes önbevallást csak az alkoholelvonóra önként jelentkező ALK-k adtak. A megfelelően illesztett eset-kontroll citogenetikai biomarker-vizsgálatok alapján az ALK-k és az absztinensek spontán kromoszómaaberrációi (KA) nem különböztek. FNyD-ben és ALKM-ben viszont a 40–50%-kal emelkedett KA-gyakoriságban megnyilvánuló genetikai instabilitás a gyulladás szisztémás immunválaszához is köthető. Az egyéni rákhajlam becslésére szolgáló bleomycinnel indukált kromatid törés/sejt (break/cell; b/c) az eddig közltekkel ellentétben nem FNyD-ben (1,06 b/c), hanem az egészséges ALK-iban (1,52 b/c) volt a leggyakoribb, ami inkább a lokális genotoxikus expozíciókból (alkohol, dohány, táplálkozás szinergizmusa) eredő, nyálkahártyával asszociált immunreakciót tükrözheti. A magyar egészséges populáció közel 50%-ának hiperérzékenysége, szemben a 10–20%-os várttal, valószínűleg ebből eredhet. Ugyancsak ezzel magyarázható, hogy a különböző lokalizációjú FNyD betegek között a szájüregi daganatosok b/c hányadosa a legmagasabb, vagyis ahol a lokális mutagénhatás a legintenzívebb. Az alkoholizmus genotoxikológiai markereinek vizsgálatakor az önbevallás szubjektivitása epidemiológiai, a limfocita-szubpopulációk aránya és gyulladáásokban betöltött szerepe pedig immunológiai zavaró tényező lehet. Magyar Onkológia 52: 153–161, 2008

Kulcsszavak: alkohol, dohányzás, önbevallás, rákrizikó, gyulladás, kromoszóma

Applicability of alcohol- and smoking-related cancer-risk biomarkers might be modified by several factors. Among those, reality of self-reports on alcohol consumption of alcoholic patients with different diseases and extreme high mutagen hypersensitivity of Hungarians, as well as the immunologic role of peripheral lymphocytes as experimental objects of cytogenetic biomarkers seem to be new viewpoints of interest. To clarify these problems, 432 head and neck cancer patients (HNCP), 62 alcoholics with alcoholic hepatitis (ALCL), and 101 disease-free chronic alcoholics (ALC) were examined. Despite clinically confirmed alcohol-related diagnoses (and GGT and MCV values) only about half of HNCPs and ALCLs reported about any alcohol consumption, in contrast to the realistic self-reports of ALCs. In cytogenetic case control investigations no difference between the spontaneous rate of chromosomal aberrations (CAs) of healthy controls and ALCs was found, however, genetic instability expressed as a 40–50% elevation rate of CAs in HNCPs and ALCLs might be associated with systemic inflammatory reaction of lymphocytes. Bleomycin sensitivity assay showed the highest break/cell (b/c) values not in HNCPs (1.06 b/c) as it was reported earlier, but in „healthy” ALCs (1.52 b/c). This phenomenon can be related to the local effect of genotoxins (alcohol, smoking, and in particular the diet), which probably reflects merely a reaction of mucosal immune system. Nearly 50% of mutagen-hypersensitive Hungarian controls, in contrary to the expected 10–20% ones, might also be explained by this. Similarly, HNCPs with oral cancer, where the local mutagen effect was the most intensive, had the highest b/c values. In conclusion, when cytogenetic biomarkers of alcoholism are examined, the subjective character of self-reports at epidemiologic level and immunologic role of lymphocyte subpopulations as genetic confounders must also be taken into consideration. Gundy S, Székely G, Farkas G, Pulay A, Remenár É. Problems occurring in the application of cytogenetic biomarkers for alcoholics with and without malignant diseases. Hungarian Oncology 52:153–161, 2008

Key words: alcohol, smoking, self-report, cancer risk, inflammation, chromosomes

A kutatás az NKFP 1B/020/04 számú téma támogatásával készült.

Közlésre érkezett:
2008. március 3.

Elfogadva:
2008. április 28.

Levelezési cím:
Dr. Gundy Sarolta
Országos Onkológiai
Intézet
1122 Budapest
Ráth György u. 7–9.
Telefon: (06-1) 224-8779
Fax: (06-1) 224-8776
E-mail: gundy@oncol.hu

BEVEZETÉS

Napjainkban szinte szállóige, hogy az alkoholizmus népbetegség. Nem csak a mértéktelen ivók szociális státuszának megváltozása jelent nehezen kezelhető társadalmi problémát, hanem a túlzott alkoholfogyasztás miatt kialakuló betegségek sokrétűsége is. Az alkohol legalább 60-féle betegségben játszik kóros szerepet és aggasztó, hogy a fogyasztásra visszavezethető mortalitás 1970 és 1995 között a 0–64 éves férfiak körében kilencszeresére, az ugyanezen korosztályba tartozó nők között pedig nyolcszorosára növekedett világszerte (16). Egy adott ország alkoholistáinak számát nem könnyű megállapítani. A legálisan értékesített italok alapján Magyarország közepes fogyasztó, de a feketekereskedelemben forgalmazott házi készítésű italok mennyiségét és különösen minőségi összetevőit nem ismerjük (7, 65, 72). Ezért a nemzetközi ajánlások az alkoholos májbetegség mortalitási adataiból végzik az extrapolációt, az ún. Jellinek-féle képlet alapján. Ennek megfelelően Magyarországon a 2000-es évek első felében még mindig 600–800 ezer alkoholbeteggel számolhattunk (7, 24, 39, 44, 50). Kiemelkedően nagy népességügyi teher a dohányzás is (19), különösen amiatt, hogy 2003 óta a nők első számú daganatos halál oka Magyarországon a dohányzással szoros összefüggésben kialakuló tüdőrák (57). A dohányzók számát az 1990-es évektől kezdődően országos reprezentatív mintavételekkel becsülik, de az alkoholfogyasztáshoz hasonlóan itt is csak közelítő információk állnak rendelkezésre. A felnőtt férfiak kb. 34–46%-a, a felnőtt nőknek pedig 18–28%-a dohányzik (37, 77). Ez a tendencia a férfiaknál bizonyos csökkenést, a nők és a fiatalok között viszont emelkedést mutatott az utóbbi években (74).

Az alkoholizálás és a dohányzás sajnos gyakran együtt járó káros szenvedély, így a két tényező egészségkárosító-, főleg rákkeltő hatása igen jelentős. A fej-nyaki daganatok kialakulása pl. 90%-ban vezethető vissza e multiplikatív hatásra, aminek következményeként hazánk az európai fej-nyaki daganatos halálozás listavezetője (35, 42, 45, 79). Mindemellett a fej-nyaki daganatban szenvedő betegek nagy részében gyakori kísérő betegség az alkoholos májkárosodás is, amiben szintén Magyarországon hal meg a legtöbb beteg (7, 43, 48, 69). Igaz, hogy az etanol egymagában nem rákkeltő, de a szeszes italokat – összetevőik és metabolikus termékeik miatt – az I-es veszélyességi csoportba tartozó karcinogének közé sorolja a Nemzetközi Rákügnökség (30). Hasonlóképpen a dohányfüstöt is, amelynek több száz összetevője között a poliaromás szénhidrátok, aromás aminok, nitrózaminok, a benzaldehid és a formaldehid a legagresszívabb rákkeltők (29, 77). Az alkoholfogyasztás és a dohányzás visszaszorítása a komplex rákkeltő hatás miatt talán éppen a fej-nyaki daganatok prevenciójában a legfontosabb célja (35). Ezt szolgálja a Nemzetközi Rákügnökség által létrehozott INHANCE (33) program is, amely a kis esetszámú epidemiológiai és klinikai tanulmányok következtetése alapján kíván kidolgozni egységes vizsgálati protokollt a fej-nyaki laphámrákok meg-

előzésére. Ehhez elengedhetetlen a különböző etnikai és demográfiai jellemzők ismerete, különösen hazánkban és néhány környező országban, amelyek a legkedvezőtlenebb halálozási mutatókkal rendelkeznek mind a fej-nyaki daganatok, mind az alkoholos májbetegségek statisztikájában (5). E térség országainak szocioökonomiai viszonyai, az emberek alkoholizálási, dohányzási és főleg táplálkozási szokásai jelentősen különböznek az eddig már vizsgált és kedvezőbb adatokkal rendelkező nyugati országok hasonló jellemzőitől.

Vizsgálataink első – epidemiológiai – részében az alkoholizálási szokásokra, az önbevallási készségre, illetve annak realitására kívántunk választ kapni fej-nyaki daganatos (FNyD) betegek, (még) nem malignus alkoholos májbeteg (ALKM), illetve klinikai állapotuk szerint egyébként egészséges krónikus alkoholisták (ALK) esetében. Köztudott, hogy az alkoholfüggő ember először akkor jelentkezik az orvosnál, amikor belgyógyászati panaszai vannak, miközben alkoholizálási szokásairól említést sem tesz, vagy annak szerepét erősen bagatellizálja. Ezért az alkoholizmusból fakadó bármely betegség megelőzésére irányuló vizsgálathoz, így a rákkockázatot becsülő biológiai markerek alkalmazásához is, számos zavaró szempontot kell tisztáznunk. Az alkoholizálás tényéről a kérdőíves felmérés mellett a laboratóriumi markerek (GGT, MCV) adhatnak pontosabb információt. A géntoxicitást vizsgáló citogenetikai biomarkerek „pozitivitása” esetében pedig nem csak az expozíciók (alkohol, dohányzás) mennyiségi és minőségi jellemzőit kell kiszűrni, hanem a potenciális mutagének/karcinogének endogén metabolizációja során, a genotoxikus hatás következtében kialakuló egyéb kísérő betegségek módosító szerepét is (43, 50). Tekintetbe kell vennünk azt is, hogy a citogenetikai – rákfogékonysági – biomarkerek vizsgálati objektumai túlnyomó többségben a perifériás vér limfocitái, amelyek a könnyű hozzáférhetőség miatt a helyettesítő szövet („surrogate tissue”) szerepét szolgálják. A belőlük nyert kromoszómák törékenységének vizsgálata a „minél több az aberráció, annál nagyobb a rákveszély” konklúzió alapján (6, 56), a szomatikus sejtgenetika bázisán történik. Ugyanakkor a limfociták a tumorigenezisben és a daganatellenes immunválaszban betöltött funkciójuk miatt olyan különleges sejtek, amelyek a szervezet immunállapotát is tükrözik, tehát zavaró („confounding”) tényezőként is számításba jöhetnek (12, 32, 75). A bleomycinnel *in vitro* indukált, emelkedett kromatid törés/sejt index pedig a mutagénekkel szembeni egyéni túlérzékenységben megnyilvánuló genetikai predispozíció mértékét hivatott kifejezni, szintén a limfocita rendszerben (14, 28, 67, 78).

BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK

A VIZSGÁLT BETEGCSOPORTOK

A vizsgált személyek demográfiai adatait az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az Országos Onkológiai Intézet Fej-Nyaksebészeti Osztályának beteganyagából 1996 és

1. táblázat. Az összes vizsgált egészséges személy és beteg, illetve a korra, nemre és dohányzási szokásra illesztett csoportok demográfiai adatai

Vizsgált csoportok	Esetszám n	Életkor év (átlag±SD)	Nem n (%)		Dohányzók n (%)
			Férfiak	Nők	
Összes egészséges kontroll	1376	39,1±11,8	699 (50,8)	677 (49,2)	563 (41%) férfi: 294 (42%) nő: 269 (39,7%)
Összes fej-nyaki daganatos beteg	432	55,3±9,2	374 (86,6)	58 (13,4)	432 (100)
Illesztett kontroll (1)	218	52,4±5,8	191 (87,6)	27 (12,4)	218 (100)
Fej-nyaki daganatos betegek	218	52,1±6,5	191 (87,6)	27 (12,4)	218 (100)
Illesztett kontroll (2)	62	53,6±10,9	52 (83,9)	10 (16,1)	62 (100)
Májbeteg alkoholisták	62	53,7±11,3	52 (83,9)	10 (16,1)	62 (100)
Illesztett kontroll (3)	101	46,3±9,5	67 (66,3)	34 (33,7)	84 (83,2)
Alkoholisták	101	46,4±9,5	67 (66,3)	34 (33,7)	84 (83,2)

2006 közötti kezelésben még nem részesült 432 beteget vizsgáltunk, akik szövettani diagnózisában (OOI, patológiai osztályok, vezetők: Dr. Szentirmay Zoltán, Dr. Orosz Zsolt) ajak-, nyelv-, garat- és gégelaphámrák szerepelt. A tumorok stádiuma a 2002-ben kiadott UICC beosztás szerint II-IV stádium volt.

Az alkoholizálási szokásokra bizonytalan választ adókat, vagy azt egyértelműen tagadókat, valamint az 1%-nyi nemdohányzókat az illesztett eset-kontroll vizsgálatokból kihagytuk. A zömmel idős betegcsoportban a daganatok egyértelmű és pontos lokalizáció szerinti besorolása alapján a biomarker-vizsgálatokhoz végül 218 FNyD beteg mellé tudtunk nemben, korban, illetve dohányzási szokásokban egészséges kontrollokat illeszteni. A dohányzási szokások tekintetében viszonylag homogén csoportokat úgy tudtunk kialakítani, hogy mind az egészségesek, mind a betegek közül a legalább 5 év óta naponta több mint 10 szál cigarettát szívókat választottuk be. Alkoholistának a 40 g-nál (nőknél 20 g-nál) több tiszta alkoholnak megfelelő mennyiségű fogyasztókat tekintettük. Az egészségesek között alkoholizálásról senki nem számolt be, és emelkedett gamma-glutamiltanszferáz (GGT) és MCV (Mean Corpuscular Volume – átlagos vörösvértest-térfogat) értékkel senki sem került be az illesztett kontrollok közé.

Az elfogyasztott alkohol mennyiségének számítása Burim és munkatársai szerint, a következő képlet alapján történt (10):

$$\text{Alkohol (g/nap)} = \frac{\text{dózis (ml)} \times 0,8\% \text{ etanol az alkoholos italban}}{100}$$

ahol a sör 5%, a bor 12–15%, a konyak 47%, a vodka, whisky és pálinka pedig 50% alkoholtartalom alapján becsülhető.

A 62 alkoholista májbeteg részben az OOI beteganyagából, részben a Szent László Kórház Hepatológiai Belgyógyászati Osztályáról (vezető: Dr. Telegdy László) és az ORFI Gasztroenterológiai Osztályáról (vezető: Dr.

Nemesánszky Elemér) került ki, akiknek diagnózisa az anamnézis, a klinikai adatok (májbiopszia) és a laboratóriumi leletek alapján alkoholos zsírmájnak és cirrózisnak bizonyult. Dohányzási és alkoholizálási szokásaik az FNyD-vel megegyeztek. A fenti „alkoholizáló” csoportok mellett 101, belgyógyászati problémától mentes, önként jelentkező krónikus alkoholistát is teszteltünk (Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet, vezető: Prof. Dr. Nagy Zoltán). A hepatitis B és C, valamint a HPV-fertőzés az összes esetben kizáró okként szerepelt.

Az 1376, munkaalkalmassági vizsgálaton megjelent, alkoholt egyáltalán nem, vagy csak ritka alkalmanként fogyasztó egészséges személyeket a kor, a dohányzási szokások és a nemek vonatkozásában csoportosítottuk. A dohányzók esetében a kritériumok a betegekével megegyeztek. Valamennyi csoportban a speciális környezeti expozíció, valamint a családokban előforduló rákhalmozódás szintén kizáró kritérium volt. A szubpopulációk kikérdezése kérdőíves formában történt, a vérminták feldolgozására közel azonos időben került sor.

A SEJTEK TENYÉSZTÉSE, FELTÁRÁSA, A KROMOSZÓMÁK ÉRTÉKELÉSE

a.) *Spontán kromoszómatorékenység. Konvencionális kromoszómaanalízis*

A vérminták tenyésztése és a kromoszómák értékelése a WHO előírások alapján első osztódásban lévő sejteken, kódolással történt (11). A kódok felnyitása az értékelést követően történt meg. Az aneuploid sejtek 46±2 kromoszómát tartalmaztak, a strukturális aberrációk között a kromatid- és kromoszóma-típusú aberrációkat, illetve az aberrációt hordozó „aberráns sejtek” értékelését végeztük el (26).

b.) *Indukált kromatidtorékenység. Bleomycin-teszt*

A konvencionális módszerrel megegyezően, de a 2. osztódási ciklus bekövetkeztéig, 72 óráig tenyésztettük a

limfocitákat. Ennek lejárta előtt 5 órával 30 µg/ml végkoncentrációban bleomycinnel kezeltük a sejt kultúrákat, amit kolcemides blokkolás és a szokásos sejteltérítés, illetve festés követett. A kromatid-típusú aberrációk értékelése Hsu és munkatársai (28) ajánlásai alapján történt. A mutagénnel szembeni hiperérzékenység küszöbét 1 törés/sejt értéknél vontuk meg (70). A kódolt lemezeken mindkét módszerrel 100-100 metafázist számoltunk.

STATISZTIKAI MÓDSZEREK

A statisztikai eljárás leíró statisztikai elemzéssel kezdődött (kétféle t -próbák), a kétoldali kapcsolatok elemzéséhez korrelációanalízist alkalmaztunk. Konvencionális kromoszómaanalízisnél az eredmények összehasonlításához Wilcoxon- és χ^2 -tesztet használtunk. A bleomycin-teszt b/c átlagértékeit Student-féle t -próbával, illetve Mann-Whitney U -teszttel, az életkor mutagénérzékenységre irányuló hatását pedig regressziós analízissel vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

EPIDEMIOLOGIAI MUTATÓK

Az egészségesek és betegek alkoholizálási és dohányzási szokásainak parametrikus értékeit az 1. és 2. táblázat foglalja össze. Az egészséges populáció viszonylag nagy hányada, 41%-a dohányzott: a férfiak 42, a nők közel 40%-a szívott 10 szál cigarettánál többet, legalább 5 éve. A dohányzási, és különösen

az alkoholizálási szokások finomabb részletezésében a betegek bizonytalansága, vagy „szépítő szándéka” dominált, így a biomarkerek vizsgálatához a szigorú eset-kontroll kritériumoknak csak kevesebben feleltek meg. Ezzel szemben a saját akaratukból elvonóra jelentkezők (ALK) 100%-os hajlandóságot mutattak az ivási szokások akár részletes bevallására is. Minthogy az FNyD és az ALKM csoportok jelentős része alulértékelt vagy tagadta káros szenvedélyét, közülük csak azokat minősítettük alkoholistának, akik maguk, és/vagy hozzátartozóik nyilatkozata alapján mértékletes és gyakori alkoholfogyasztásról számoltak be, továbbá gamma-GT-koncentrációjuk, valamint MCV-értékük is kóros adatokat jelzett (gamma-GT>40 IU/l; MCV>95% fl). Az alkoholizálási szokások önbevallás szerinti értékelése tehát a fejnyaki daganatos betegek és a májbeteg alkoholisták körében nem mutat reális képet: a 432 FNyD betegből 218-nál (51%) volt megközelítően megbízható az önbevallás, de még az alkoholos májbetegség tipikus klinikai tüneteit produkáló, és a bizonyított diagnózis miatt hospitalizált ALKM-ek 45%-a is tagadta, vagy alulértékelt káros szenvedélyét. Az FNyD betegek 21%-a, az ALKM-eknek pedig 18%-a vallott be >99 g/nap alkoholfogyasztást, szemben az ALK csoport 85%-ával. A gamma-GT-átlagok az extrém magas szórás mellett ALKM-ben érték el a legmagasabb koncentrációkat. Sem közöttük, sem az FNyD betegek között nem számoltak be kereskedelmi forgalomban nem kapható alkoholtartalmú italok fogyasztásáról, míg az elvonóra jelentkező, önmaguk szokásait megközelítően reálisan bevalló alkoholisták 25%-a ismeretlen eredetű italokat is rendszeresen fogyasztott.

2. táblázat. A különböző betegcsoportok alkoholizálási szokásai önbevallás szerint

Alkoholfogyasztás önbevallás szerint	FNyD		ALKM		ALK	
	n	%	n	%	n	%
Összes beteg	432	100				
Ebből illeszthető	218	(51) 100	62	100	101	100
Megbízhatatlan*, de gamma-GT és MCV magas	46	21	28	45	0	0
Önbevallás a fogyasztás mennyisége alapján	172	100	34	100	101	100
„Sokat” iszik általában	5	3	2	6	0	0
Csak néha iszik „sokat”	21	12	2	6	0	0
<99 g/nap	110	64	24	71	15	15
100–199 g/nap	29	17	3	9	41	40
200–299 g/nap	7	4	0	0	27	27
300–399 g/nap	0	0	0	0	15	15
≥400 g/nap	0	0	3	9	3	3
GGT IU/l, átlag±SD**	101,4±149,6		403,2±644,4		132,0±145,9	

*Hozzá tartozók szerint sokat és rendszeresen fogyasztott alkoholt

**Kontroll GGT: 32,3±14,0

CITOGENETIKAI MUTATÓK

A 3. táblázatban az összes egészséges nem alkoholizáló, és az összes fej-nyaki daganatos beteg citogenetikai vizsgálati eredményeit vetettük össze. Ebből kitűnik, hogy a kromoszómaaberrációk mind a dohányzásból származó expozíciót, mind pedig a daganatos állapotot emelkedett értékkel jelzik. A dohányzó, de nem alkoholizáló egészségesek értékeihez képest 40%-kal magasabb az FNyD betegek aberránssejt-gyakorisága. Ez az emelkedett érték összefügghet az alkoholizálással és a daganatos állapottal is. A bleomycinnel indukált törés/sejt értékek szintén magasabbak FNyD-ben, mint az egészségesekben, de az utóbbiak között a dohányzási szokásoknak már nincs szerepe. A két populáció összehasonlításához a következőkben a lehető legnagyobb mértékű illesztéseket végeztük el. Nem csak a betegség malignitásának függvényében (FNyD vs. kontroll), hanem annak komplexitásában tartottuk szem előtt, hogy az alkoholizmus kísérő tünete lehet az alkoholos májkárosodás. A betegeket a kor és nem szerinti illesztések alapján úgy választottuk ki, hogy az MCV- és a GGT-értékük a normális határérték felett legyen, így anamnézisében a dohányzás mellett az alkoholfogyasztás is biztosan fennálló tényező maradjon.

A malignus (FNyD) és a premalignitásra gyanús (ALKM) állapotokat nagyon jól kifejezi az aberrációt hordozó sejtek magas aránya, ami mind a csoportokon belüli illesztett kontrolltól, mind pedig az egyébként nem beteg krónikus alkoholisták (ALK) értékeitől is különbözik (4. táblázat). A krónikus alkoholisták kromoszómaaberrációi azonban nem tértek el a kontrolltól, és közöttük a dohányzásnak sem volt aberrációkat növelő szerepe ($p=0,29$). Tehát ha nem áll fenn kísérő tünettől járó betegség, az alkoholisták és az absztinensek kromoszómakárosodása nem tér el. Ezzel szemben az indukált kromatid-törés/sejt értékek, amelyek az ún. egyéni genetikai rákhajlamot jeleznék, jelentősen meghaladták mind a májbeteg, mind a malignus betegcsoportok átlagértékeit, mégpedig a dohányzási szokásoktól függetlenül ($p=0,61$). Az „egészséges” alkoholisták 81,2%-a volt mutagénszenzitív, szemben az illesztett, nem alkoholizáló kontrollok 47,5%-ával. A malignus FNyD és az ALKM betegeknek mindössze 60%-a volt hiperérzékeny. Az egészséges dohányzók és nemdohányzók b/c értékeiben viszont nem volt különbség (3. táblázat), és mindkét csoport kb. fele bizonyult mutagénerzékenynek. Felmerült bennünk az is, hogy az alkohol és a dohányzás közvetlenül ható és metabolizált mutagén termékei a szervezet különböző anatómiai

3. táblázat. Spontán- és bleomycinnel *in vitro* indukált kromoszómaaberrációk gyakorisága egészséges kontrollokban és fej-nyaki daganatos betegeken

Csoportok (n)+	Kromoszómaaberrációk										Bleomycinnel indukált törés/sejt b/c \pm SD
	Kromatid-törés		Kromoszóma-törés		Dicentrikus+ ring		Aberráns sejt		Összes aberráció		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Összes kontroll (1376)	1912	1,39	456	0,33	195	0,14	2324	1,69	2563	1,87	1,04 \pm 0,47
Nem dohányzók (813)	1039	1,28	248	0,31	108	0,13	1281	1,58	1395	1,72	1,06 \pm 0,49
Dohányzók (563)	873	1,55 ^a	208	0,37 ^a	87	0,15	1043	1,86 ^a	1168	2,08 ^a	1,02 \pm 0,45
Összes fej-nyaki daganatos beteg (432)	921	2,15 ^{a,b}	227	0,53 ^{a,b}	100	0,23 ^{a,b}	1118	2,61 ^{a,b}	1248	2,91 ^{a,b}	1,15 \pm 0,48 ^{a,b}

+ Sejtszám (n \times 100)

^a Szignifikancia a nem dohányzó kontrollokhoz viszonyítva: $p \leq 0,05$

^b Szignifikancia a dohányzó kontrollokhoz viszonyítva: $p \leq 0,05$

4. táblázat. Fej-nyaki daganatos és alkoholista betegek egymás közötti és illesztett kontrollokkal való összehasonlító citogenetikai elemzése

Csoport (n)	Aberráns sejt (% \pm SE)	b/c min-max	b/c \pm SD	b/c>1,00 az esetek %-ában
Fej-nyaki daganatos betegek (218)	2,82 \pm 0,15 ^{a,b}	0,32–2,82	1,06 \pm 0,49 ^{c,d}	60,1
Illesztett kontroll (218)	1,98 \pm 0,12	0,31–3,20	0,97 \pm 0,46	52,5
Májbeteg alkoholista (62)	2,76 \pm 0,24 ^{a,b}	0,23–3,31	1,30 \pm 0,67 ^{c,d}	60,1
Illesztett kontroll (62)	2,08 \pm 0,22	0,17–2,04	0,95 \pm 0,41	49,2
Alkoholista (101)	1,95 \pm 0,16	0,49–2,68	1,52 \pm 0,57 ^c	81,2
Illesztett kontroll (101)	2,04 \pm 0,17	0,13–2,20	0,95 \pm 0,57	47,5

^a Az illesztett kontrolltól szignifikánsan különbözik ($p < 0,05$)

^b Az alkoholisták csoportjától szignifikánsan különbözik ($p < 0,04$)

^c Az illesztett kontrolltól szignifikánsan különbözik ($p < 0,04$)

^d Az alkoholisták csoportjától szignifikánsan különbözik ($p < 0,01$)

5. táblázat. Fej-nyaki laphámrákos betegek aberrációt hordozó sejtjeinek átlaga és a rákkockázat, a daganat kiindulási helye szerint

Daganat kiindulási helye (BNO)	n	Aberráns sejt átlag ± SE	Érzékenyek n (%)	b/c ± SD	OR (95%-os CI)
Szájüreg (C02-06) Nyelv, fogíny és foggyökérhártya, szájfenék, kemény- és lágy szájpad, nyelvcsap, pofanyálkahártya, retromoláris területek	77	2,65 ± 0,22 ^a	47 (61)	1,13 ± 0,56 ^a	2,22 (1,26-3,89) ^b
Szájgarat (C01, 09-10) Nyelvgyök, mandula, egyéb oropharynx	39	2,79 ± 0,28 ^a	23 (59)	1,18 ± 0,45 ^a	2,03 (0,98-4,22)
Algarat (C12-13)	52	3,21 ± 0,35 ^a	29 (56)	0,96 ± 0,46	1,23 (0,67-2,27)
Gége (C32)	40	2,85 ± 0,40 ^a	22 (55)	0,97 ± 0,46	0,67 (0,34-1,32)
Fej-nyaki daganatos betegek (összes)	218	2,82 ± 0,15 ^a	127 (58,3)	1,06 ± 0,49 ^a	1,62 (1,11-2,36) ^b
Illesztett kontrollok	218	1,98 ± 0,12	101 (46,3)	0,97 ± 0,46	1,00

^a Az illesztett kontrolltól szignifikánsan különbözik ($p \leq 0,009$)

^b Az illesztett kontrollhoz viszonyított szignifikánsan emelkedett mutagénérzékenység

képleteiben különböző módon hatnak. Feltételeztük, hogy a citogenetikai markerek is másképpen jeleznek, ha a fej-nyaki daganatok kiindulása szerinti genetikai instabilitást, illetve a mutagénérzékenységet vizsgáljuk. A fej-nyaki daganatok lokalizációja szerint a szájüregtől távolodó alsóbb régiókban kialakult tumorok (algarat, gége) esetében a betegek kromoszómaaberrációkat hordozó limfocitáinak aránya magasabb, mint a szájüregi daganatban szenvedőknél (5. táblázat). Ezzel szemben a fej-nyak felső régióinak daganatosainál éppen fordított arányt mutat az indukált törés/sejt index: a gége és az algarat daganataiban szenvedőknél találjuk a legalacsonyabb mutagénérzékenységet. A daganatos állapotot kifejező indukált b/c érték esélyhányadosa tehát ott a legmagasabb, ahol az alkohol és a dohányfüst szinergikus hatása közvetlenül és legnagyobb koncentrációban érvényesül, vagyis a szájüregben.

MEGBESZÉLÉS

AZ ALKOHOLFOGYASZTÁS ÖNBEVALLÁSON ALAPULÓ REALITÁSA

Az orvos-beteg találkozások alkalmával arra a kérdésre, hogy mit, mennyit és milyen gyakorisággal isznak, az FNyD és az ALKM csoportok betegei vagy alulértékelték ivási szokásaikat, vagy absztinensnek vallották magukat. Az emelkedett GGT és MCV laboratóriumi markerek, valamint a heteroanamnézis erősítették meg azt a gyanúnkat, hogy a betegek valóban alkoholizálnak (36, 51, 52).

Az FNyD betegek közül így is csak 51%-ról állapíthattuk meg kellő biztonsággal, hogy a betegség kialakulásához alkoholizálásuk is jelentősen hozzájárult, ALKM-ben pedig a májbiopszia döntő eredményének ellenére a bevallók aránya csupán 55% volt. Az önbevallás tehát hiányos és ennek a tudományos igényességen kívül társadalmi üzenete is van. Az alkoholfogyasztók és az absztinensek aránya kultúránként eltér, sőt egy adott kultúrán belül is változhat. Ahogy a normák for-

málják az alkoholfogyasztási szokásokat, ugyanúgy kialakítják az absztinencia megnyilvánulási formáit is. A betegek fele az orvos rákérdezésekor feltételezhetően azért nem tartotta magát alkoholistának, mert úgy szocializálódott, hogy a környezete, sőt maga a társadalom is elfogadó még a nagy mennyiségű szeszfogyasztással szemben is. Az a beteg, aki az öntudatlan állapothoz képest ritkábban részegeedik le, sem a saját, sem pedig környezete szemében nem tűnik alkoholfüggőnek (20). Ezért tartottuk fontosnak, hogy laboratóriumi markereket is vizsgáljunk az alkoholizálás bizonyítására. Az alkoholfogyasztás egyik leggyakrabban használt laboratóriumi markere a gamma-glutamiltranszferáz (GGT) enzim, ami a celluláris oxidáció folyamatában kulcsregulátornak számít (1, 17). Biztosítja a sejtek anti-oxidáns/antitoxikus védelmét, a proliferáció/apoptózis-egyensúlyt, amely ha zavart szenved, az alkohol bomlástermékei – főleg az acetaldehid – mutagén és/vagy karcinogén hatásához vezet (60). Minthogy az alkoholizmusnak egyetlen optimális laboratóriumi markere sincs, a szérum-GGT-érték – a zavaró faktorok teljes kiszűrésével – megbízhatóbb markernek tűnik, mint az önbevallás (27, 36). A legmagasabb GGT-értékeket – az elvártnak megfelelően – az alkoholisták májbetegségeknél találtuk, ahol a diagnózist (májbiopszia) követő hospitalizálás, vagyis az alkoholfogyasztás abbahagyása után gyakran alig, vagy egyáltalán nem normalizálódik a GGT-szint (54). Az FNyD betegek alacsonyabb átlagértékei pedig vélhetően azzal magyarázhatók, hogy a betegség tüneteinek megjelenésekor ők már kevesebbet ittak, így a GGT a műtét idejére már csökkent. Minthogy azonban mindhárom betegcsoportban a GGT magasabb volt, mint a kontrollokban, ez arra utal, hogy a huzamosabb alkoholizálás a máj károsodásához vezethet, aminek nem csak a beteg gyógyítása és gyógyulása szempontjából (63), hanem az alkoholisták populációk bármiféle biológiai paraméterének vizsgálatakor is következményei lehetnek. Az alkoholizálás másik laboratóriumi markere az emelkedett MCV érték, ami a feltételezések szerint az etanol metabolitjainak hematotoxi-

kus hatására, azoknak a sejtmembránon való átjutása következtében a megváltozott lipidmetabolizmusra és eritrocita-instabilitásra vezethető vissza (41, 53). Nagy valószínűséggel ez nem csak az eritrocitákra, hanem a vér egyéb alakos elemeire is érvényes, mint ahogy ezt az alábbiakban látni fogjuk.

Az alkoholizálásra gyanús kórképek vizsgálatánál tehát a rutinszerű, vagy a speciálisan rendszeresített kérdőívek mellett a laboratóriumi markerek vizsgálata is elengedhetetlen, mert mint példánk mutatják, megközelítően hiteles önbevallás csak a kezelésre önként jelentkező alkoholfüggő betegek körében várható (22).

A CITOGENETIKAI MARKEREK A VIZSGÁLATI OBJEKTUM, A T-LIMFOCITÁK SZEMPONTJÁBÓL

A legtöbb kromoszómaaberrációt hordozó sejtet FNyD-ben találtuk, ami a daganat jelenléte miatt az egész szervezet csökkent reparációs kapacitását jelzi, és ami hasonlóan magas gyakoriságot mutat a malignitásra hajlamosító ALKM-ben is. Ezzel szemben a nem beteg alkoholista kromoszómaaberrációi a kontrollal azonos gyakorisággal fordultak elő. A hosszan tartó alkoholizálás és a dohányzás sokféle DNS-károsító molekula generalizálásával jár együtt. A fej-nyaki daganatos és a májgyulladásos alkoholista esetében valószínűleg a közös tényező, a krónikus gyulladási folyamatok jelenléte okozza a nagymértékű sejtkárosodást. Gyulladásos állapotokban a szabadgyökök, a reaktív oxigénfajták fokozottabb mennyiségben termelődnek, szisztémásan, lokálisan és celluláris szinten is, ami kifejezettebb endogén oxidatív stresszel és lipidperoxidációval párosul (9, 40, 73). Tehát ha az alkohol és a dohányzás együttes hatását a kromoszómaaberrációk – mint biomarkerek – szintjén mérjük, akkor igen fontos annak kizárása, hogy a krónikus expozíciót követi-e a szervezetben valamilyen gyulladási folyamat. Számos esetben éppen azért ellentmondóak az eredmények az alkohol és/vagy a dohányzás genotoxikus hatásáról – mint ahogy azt az „egészséges” alkoholista kapott eredményeink is megerősítették –, mert a kutatók az egyedek kiválasztásakor ezzel a lehetőséggel egyszerűen nem számolnak (47, 58).

Feltételezésünket alátámasztja az a tény is, hogy a gyulladási folyamatok és a daganatok kialakulása között igen szoros kapcsolat áll fenn. Az anti-tumor immunitást, illetve a tumormentességet a különféle T-limfocita-szubpopulációk biztosítják, tehát szerepük mind a tumorigenezisben, mind a gyulladási folyamatok mechanizmusában egyértelmű (2, 18, 21). A citogenetikai biomarkerek alkalmazásánál a kromoszómák kinyerése a perifériás vér T-limfocitáiból történik, phytohemagglutinin (PHA) mitogénnel történő stimulációt követően. FNyD-ben és ALKM-ben nyilván más a szubpopulációk összetétele, mint ALK-ban és a kontrollban. Mind FNyD-ben, mind ALKM-ben a proinflammatorikus citokinek és a kemokinek felszabadulása, az adhéziós fehérjék szerepe a sejt-vándorlásban, vagy a sejtek közötti

kooperációban megváltozik, ez pedig tovább kedvez a DNS-mutációk halmozódásának. ALKM-ben főleg a hepatociták környezetében, FNyD-ben pedig a tumorokban és a nyirokcsomókban belül, tehát mind a lokális, mind pedig a szisztémás immunválaszok szintjén a T-sejtek recirkulációja, a mitogén stimulusra (PHA-ra) adott válasza különbözik a kontrolltól és a nem beteg alkoholistákétól (31, 32). Valószínű, hogy a gyulladási folyamatok közben az ily módon véráramba jutott limfociták DNS-sérülései tükrözik leginkább az endogén expozíciók generálta genetikai instabilitást (12, 23, 66).

Természetesen ezt a folyamatot egyéb genetikai faktorok is befolyásolják, mint pl. az adott egyén alkoholbontó és reparációs enzimeinek polimorfizmusa (34, 55, 63). Az alkohol bomlásterméke, az acetaldehid miközben növeli az oxidatív stresszt, a szabad gyökök képződését, mintegy körfolyamatban segíti elő az endotoxinok további felszaporodását. Az acetaldehid metabolizmusa során a fő enzimatis utak szereplői az alkoholdehidrogenáz (ADH), a citokróm P450 enzimrendszer, a katalázok, valamint az aldehiddehidrogenáz (ALDH), amelyeknek számos genetikai variánsa létezik. Éppen ezért az alkohol lebomlásában – a reparációs enzimekhez hasonlóan – nagy interindividuais különbségek mutathatók ki (8, 76).

A perifériás vér limfociták kromoszómaaberrációinak gyakorisága tehát a szervezetre jellemző általános rákfogékonyság mellett a szisztémás és lokális immunválasszal is kapcsolatban áll, és így tulajdonképpen mindkét jelenségnek biomarkere.

Ezzel szemben a bleomycinnel *in vitro* indukált emelkedett kromatid-törés/sejt értékeket, amelyek általában a mutagénnel szembeni túlérzékenységben megnyilvánuló genetikai predispozíció mértékét fejezik ki, elsősorban a lokális genotoxikus expozícióból származó, helyi immunreakciók alakulása befolyásolhatja. A spontán kromoszómakárosodás legalacsonyabb mértékét az „egészséges” alkoholistaiban találtuk, viszont a mutagénnel szembeni érzékenység náluk volt a legmagasabb. Ez az érzékenység a szakirodalom tanúsága szerint az FNyD betegek 80–90%-ára jellemző, szemben az egészségesek 10–20%-os érzékenységi arányával (14, 28, 49, 67, 71, 78). Vizsgálataink szerint a fej-nyaki laphámrákos magyar betegek 60%-a, az egészséges embereknek viszont meglepően nagy hányada, 46%-a volt mutagénszenzitív. A krónikus alkoholistaiknak viszont 81%-a hiperszenzitív, vagyis közel abban az arányban, mint a külföldi szakirodalmak daganatos populációja. Ennek egyik oka az lehet, hogy az általunk Magyarországon vizsgált alkoholistaik 25%-a bevallottan is illegális kereskedelemről származó, ismeretlen összetételű alkoholos italokat is fogyaszt. Ezek nagy mennyiségben tartalmaznak mutagén/karcinogén hatású rövid láncú alifás alkoholokat (72), amelyek lebontását más és többféle enzimrendszer biztosítja, mint a viszonylag „tisztább” szeszekét. Ezt a folyamatot tovább komplikálja a konjugáló és detoxikáló, valamint a reparációs enzimek polimorfizmusa (55), amelyek nagy valószínűséggel

az etnikai hovatartozástól is függenek (46, 61). Az sem zárható ki, hogy a limfociták genotoxikus bleomycin-hatásra adott reakciója az „egészséges” alkoholistákban sokkal kevésbé a szisztémás, inkább a nyálkahártyával asszociált immunrendszerrel áll kapcsolatban (32, 75). Ezért az *in vitro* indukált bleomycinérzékenységre az a T-limfocita-populáció reagál legelőször, amelynek feladata a nyálkahártyával kapcsolatba kerülő solubilis fehérjékre adott immunválasz során aktiválódik (32).

Ezt látszik alátámasztani az is, hogy az FNyD betegek mutagénérzékenysége a daganatlokalizációtól függően jelentkezett. Az alkohol és a dohányfüst közös bejutási kapuja a szájüreg, míg a garat, és főleg a gége inkább a dohányfüsttel kerül kapcsolatba. Megállapítottuk, hogy azokban az anatómiai képletekben, ahol a dohány-alkohol szinergizmus a mutagének koncentrációjából fakadóan a legnagyobb, ott a legintenzívebb a genotoxikus hatás és így az azt jelző b/c értékek is a legmagasabbak. Ezzel szemben az egyre inkább felhíguló mutagénkoncentrációkban a szinergikus hatás csökken (garat, gége), viszont a kromoszómaaberrációk száma, vagyis a genetikailag is determinált (a T-limfociták kromoszómaaberrációiban is megjelenő) rákkockázat nő. A szakirodalomban az egyes FNyD-lokalizációkhoz köthető érzékenységekről nincs képünk, ugyanis a betegek mutagénérzékenységét eddig csak összességében, legfeljebb 1–2 fej-nyaki régióban vizsgálták (13, 15, 25, 67, 68). A mi eredményeinktől való nagyfokú eltérés egyik oka éppen ez lehet.

Természetesen ez továbbra sem ad kielégítő választ arra, hogy az egészséges kontrollok mutagénérzékenysége Magyarországon miért olyan magas. Az eddig vizsgált nyugat-európai és amerikai egészséges populációk életviteli és táplálkozási szokásai, különösen az antioxidáns vitaminpótlás tekintetében valószínűleg kedvezőbbek, mint a magyaroknál (59, 64), ezért nem véletlen a daganatos halálozásban betöltött listavezetői szerepünk (4, 5, 38).

A fentiek alapján tehát megállapíthatjuk, hogy a perifériás limfociták spontán kromoszómaaberrációi – mint biomarkerek – nem csak a daganatra való genetikai hajlamot, a csökkent reparációkészséget, hanem a genetikai összetevők mellett a szervezet immunológiai állapotát (gyulladásos folyamatok) is jelzik. A mutagénérzékenységet kifejező b/c értékek pedig inkább az expozíciók, a szervezetnek az alkohollal, dohányzással és más mutagénekkel szembeni, főleg lokális hatásból eredő, és kevésbé markáns szisztémás reakcióján keresztül fejezik ki a rákfogékonyságot. Amikor az alkoholistáknál a rákfogékonyság citogenetikai biomarkereinek specificitását értékeljük (kromoszómaaberráció, *in vitro* bleomycin-érzékenység), a keringő limfocitáknak az immunotoxicitásban betöltött szerepére is gondolnunk kell (3). Ezen kívül elkerülhetetlen az ún. „pozitív kontroll” állítása (malignus, premalignus állapotú beteg vs. klinikailag egészséges exponált), valamint az önbevallás hiányosságai miatt a laboratóriumi markerek vizsgálata. Ez a közlemény az első, ami a fenti problémákra is igyekszik ráirányítani a figyelmet.

Köszönetnyilvánítás: A szerzők hálás köszönetüket fejezik ki Frigyesi Mária, Kiss Krisztina és Vass Nagyzezsda asszisztenseknek a kiváló technikai munkáért.

IRODALOM

- Allen JP, Litten RZ. The role of laboratory tests in alcoholism treatment. *J Subst Abuse Treat* 20:81–85, 2001
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539–545, 2001
- Biró A, Pállinger É, Falus A, et al. Immunotoxicológiai vizsgálatok alkalmazása a kockázati csoportok jellemzésében. *Magyar Onkológia* 48:137–139, 2004
- Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7:149–156, 2006
- Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C, et al. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer* 119:884–887, 2006
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, et al. Chromosomal aberrations and cancer risk: Results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* 165:36–43, 2006
- Bosetti C, Levi F, Lucchini F, et al. Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 46:827–839, 2007
- Brennan P, Lewis S, Hashibe M, et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 159:1–16, 2004
- Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity—a review. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1073–1082, 1997
- Burim RV, Canalle R, Takahashi CS, et al. Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics. *Mutat Res* 560:187–198, 2004
- Carrano AV, Natarajan AT. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204:379–406, 1988
- Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, et al. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2008, doi:10.1016/j.oraloncology.2007.11.001
- Cloos J, Braakhuis BJM, Steen I, et al. Increased mutagen sensitivity in head-and-neck squamous-cell carcinoma patients, particularly those with multiple primary tumors. *Int J Cancer* 56:816–819, 1994
- Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88:530–535, 1996
- Cloos J, Steen I, Timmerman AJ, et al. DNA-damage processing in blood lymphocytes of head-and-neck-squamous-cell-carcinoma patients is dependent on tumor site. *Int J Cancer* 68:26–29, 1996
- Comprehensive handbook of alcohol related pathology. Eds. Preedy VR, Watson RR. Elsevier Academic Press, San Diego, 2005
- Conigrave KM, Davies P, Haber P, et al. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 98(Suppl 2):31–43, 2003
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867, 2002
- Didkowska J, Manczuk M, McNeill A, et al. Lung cancer mortality at ages 35–54 in the European Union: ecological study of evolving tobacco epidemics. *BMJ* 331:189–191, 2005
- Elekes Z. Alkohol és társadalom. Országos Addiktológiai Intézet, Budapest, 2004
- Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 10:153–169, 2002
- Fleming MF, Mundt MP, French MT, et al. Brief physician advice for problem drinkers: long-term efficacy and benefit-cost analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 26:36–43, 2002
- French SW. Alcoholic hepatitis: inflammatory cell-mediated hepatocellular injury. *Alcohol* 27:43–46, 2002
- Funk S. Új lehetőségek az alkoholizmus kezelésében. *Hippocrates* 5:94–99, 2003
- Gajecka M, Jarmuz M, Szyfter W, et al. Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep* 12:153–157, 2004

26. Gundy S, Katz N, Füzy M, et al. Cytogenetic study of radiation burden in thyroid disease patients treated with external irradiation or radioiodine. *Mutat Res* 360:107–113, 1996
27. Hoeksema HL, de Bock GH. The value of laboratory tests for the screening and recognition of alcohol abuse in primary care patients. *J Fam Pract* 37:268–276, 1993
28. Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, et al. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 43:403–409, 1989
29. IARC. Tobacco smoking summary of data reported and evaluation tobacco smoking. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. IARC Monographs 38, Lyon, 1986
30. IARC. Alcohol drinking summary of data reported and evaluation alcohol drinking. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. IARC Monographs 44, Lyon, 1988
31. *Immunobiológia*. Szerk: Gergely J, Erdei A, Medicina, Budapest, 2000
32. *Immunobiology: the immune system in health and disease – sixth edition*. Eds. Janeway C, Travers P, Walport M, et al. Garland Science Publishing, New York, 2004
33. International Head and Neck Cancer Epidemiology, <http://in-hance.iarc.fr>
34. Ishikawa H, Ishikawa T, Yamamoto H, et al. Genotoxic effects of alcohol in human peripheral lymphocytes modulated by ADH1B and ALDH2 gene polymorphisms. *Mutat Res* 615:134–142, 2007
35. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 65:328–339, 2001
36. Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J. Serum gamma-glutamyl transferase, self-reported alcohol drinking, and the risk of stroke. *Stroke* 31:1851–1855, 2000
37. KSH. A dohányzás hatása a halandóságra Magyarországon, 1970–1999, Budapest, 2002
38. KSH. Az alkohol hatása a halandóságra Magyarországon, 1970–1999, Budapest, 2003
39. KSH. *Demográfiai évkönyv*. Budapest, 2004
40. Langseth L. Oxidants, antioxidants and disease prevention. ILSI Europe, Brussels, 1995
41. Latvala J, Parkkila S, Melkko J, et al. Acetaldehyde adducts in blood and bone marrow of patients with ethanol-induced erythrocyte abnormalities. *Mol Med* 7:401–405, 2001
42. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, et al. Trends in oral cancer mortality in Europe. *Oral Oncol* 40:433–439, 2004
43. Lengyel G, Fehér J. Az alkohol okozta májkárosodás klinikuma és kezelése. *Hippocrates* 5:79–84, 2003
44. Leon DA, McCambridge J. Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data. *Lancet* 367:52–56, 2006
45. Levi F, Lucchini F, Negri E, et al. Trends in cancer mortality in the European Union and accession countries, 1980–2000. *Ann Oncol* 15:1425–1431, 2004
46. Long JC, Knowler WC, Hanson RL, et al. Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. *Am J Med Genet* 81:216–221, 1998
47. Maffei F, Forti GC, Castelli E, et al. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res* 514:49–58, 2002
48. Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis and treatment of alcoholic liver disease. *Mayo Clin Proc* 76:1021–1029, 2001
49. Michalska J, Motykiewicz G, Kalinowska E, et al. Bleomycin sensitivity test in the exposed and reference human populations. *Mutat Res* 418:43–48, 1998
50. Morvai V. Az alkohol és a cardiovascularis betegségek. *Hippocrates* 5:88–91, 2003
51. Nemesánszky E, Juhász P. Az alkoholabusz és alkohol okozta szervi károsodások felismerése laboratóriumi vizsgálatokkal. *LAM* 3:304–310, 1993
52. Nemesánszky E, Pár A. A máj diagnosztikája. In: *Gasztroenterológia*, Szerk. Varró V., Medicina, Budapest, 1998, pp 385–412
53. Niemelä O, Parkkila S. Alcoholic macrocytosis--is there a role for acetaldehyde and adducts? *Addict Biol* 9:3–10, 2004
54. Niemelä O. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta* 377:39–49, 2007
55. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutat Res* 544:339–348, 2003
56. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 60:37–45, 2006
57. Ottó S, Kásler M. A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása: a népegészségügyi programok jellegzetességei és várható eredményei. *Magyar Onkológia* 49:99–107, 2005
58. Phillips BJ, Jenkinson P. Is alcohol genotoxic? A review of published data. *Mutagenesis* 16:91–101, 2001
59. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 39:155–165, 2004
60. Pompella A, Corti A, Paolicchi A, et al. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 7:360–366, 2007
61. Reich T, Edenberg HJ, Goate A, et al. A genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am J Med Genet* 81:207–215, 1998
62. Remenár É, Számel I, Budai B, et al. Szex szteroid- és hypophysishormonok valamint a májfunkció összehasonlító vizsgálata egészséges, alkoholisták és fej-nyaki laphámrákos férfiakban. *Magyar Onkológia* 46:329–333, 2002
63. Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, et al. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1137–1144, 2001
64. Seitz HK, Suter PM. Ethanol toxicity and nutritional status. In: *Nutritional Toxicology*. Eds. Cotsones FN, McKay MA. Taylor and Francis, London-New York, 2002, pp 122–154
65. Shkolnikov V, McKee M, Leon DA. Changes in life expectancy in Russia in the mid-1990s. *Lancet* 357:917–921, 2001
66. Smith GR, Missailidis S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J Inflamm* 1:1–12, 2004
67. Spitz MR, Fueger JJ, Beddingfield NA, et al. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Res* 49:4626–4628, 1989
68. Spitz MR, McPherson RS, Jiang H, et al. Correlates of mutagen sensitivity in patients with upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:687–692, 1997
69. Stickel F, Schuppan D, Hahn EG, et al. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut* 51:132–139, 2002
70. Székely G, Remenár É, Kásler M, et al. A kromoszómaanalízis és a bleomycin-teszt hazai alkalmazhatóságának vizsgálata a fej-nyaki laphámrák prevenciójában. *Orvosi Hetilap* 142:611–616, 2001
71. Székely G, Remenár É, Kásler M, et al. Does bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis* 18:59–63, 2003
72. Szűcs S, Sárváry A, McKee M, et al. Could the high level of cirrhosis in central and eastern Europe be due partly to the quality of alcohol consumed? An exploratory investigation. *Addiction* 100:536–542, 2005
73. Topinka J, Binkova B, Sram RJ, et al. DNA-repair capacity and lipid peroxidation in chronic alcoholics. *Mutat Res* 263:133–136, 1991
74. Vadász I. A tüdőgyógyászat és a dohányzás mai összefüggései. *Hippocrates* 7:13–18, 2005
75. Verastegui E, Morales R, Barrera JL, et al. Immunological approach in the evaluation of regional lymph nodes of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Immunol* 102:37–47, 2002
76. Whitfield JB. ADH and ALDH genotypes in relation to alcohol metabolic rate and sensitivity. *Alcohol Alcohol* 2(Suppl):59–65, 1994
77. WHO, EU. Health status overview for countries of Central and Eastern Europe that are candidates for accession to the European Union, 2002, Documents, E76888
78. Wu X, Gu J, Hong WK, et al. Benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin sensitivity and susceptibility to cancer of upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst* 90:1393–1399, 1998
79. Zatonski W, Rehm J. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer* 119:884–887, 2006