

**Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”  
Cluj-Napoca**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Unele aspecte ale tumorilor maligne multiple primitive**

Doctorand **Daciana Narcisa Chirilă**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Constantin Ciuce**

Cluj-Napoca 2012



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

<b>ABREVIERI</b>	11
<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Cancerul</b>	17
1.1. Incidență și mortalitate	17
1.2. Factori de risc	20
1.3. Screening	22
1.4. Prevenție, Dietă, Nutriție	22
<b>2. Tumorile maligne multiple primitive</b>	24
2.1. Clasificarea tumorilor maligne multiple primitive	25
<b>3. Date genetice despre cancer</b>	25
3.1. Glutation S-transferazele	28
3.1.1. GSTA1	29
3.1.2. GSTK1	30
3.1.3. GSTM1	30
3.1.4. GSTO1	31
3.1.5. GSTP1	31
3.1.6. GSTS1	32
3.1.7. GSTT1	32
3.1.8. GSTZ1	32
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	33
<b>1. Ipoteza de lucru. Obiective</b>	35
<b>2. Metodologie generală</b>	37

---

2.1. Extracția ADN-ului din piesele incluse în parafină	37
2.2. Extracția ADN-ului din sânge	37
2.3. Analiza genetică a GSTM1 și GSTT1	37
2.4. Analiza genetică a GSTP1	38
2.5. Analiza statistică	39
<b>3. Studiul 1 - Tumorile maligne multiple primitive din cadrul SCM Cluj-Napoca (ianuarie 2005 – iunie 2012)</b>	<b>41</b>
3.1. Introducere	41
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	41
3.3. Material și metodă	41
3.4. Rezultate	42
3.5. Discuții	50
3.6. Concluzii	54
<b>4. Studiul 2 - Glutacion S-transferazele M, T și P la pacientele cu cancer mamar multiple și asocierea de cancer mamar cu un alt cancer</b>	<b>55</b>
4.1. Introducere	55
4.2. Obiective	55
4.3. Material și metodă	55
4.4. Rezultate	56
4.5. Discuții	65
4.6. Concluzii	68
<b>5. Studiul 3 - Modificările genetice ale glutacion S-transferazelor M, P și T în tumorile maligne sincrone colorectale și asocierea sincronă a unui cancer colorectal cu un alt cancer</b>	<b>69</b>
5.1. Introducere	69
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	69
5.3. Material și metodă	69

---

5.4. Rezultate	72
5.5. Discuții	77
5.6. Concluzii	81
<b>6. Studiul 4 - Variante genice ale GSTM1, GSTT1 și GSTP1 la pacienții cu cancer multiple urologice și la cei cu asocierea unui cancer urologic cu un alt tip de cancer</b>	83
6.1. Introducere	83
6.2. Ipoteza de lucru. Obiective	83
6.3. Material și metodă	83
6.4. Rezultate	84
6.5. Discuții	90
6.6. Concluzii	93
<b>7. Concluzii generale</b>	95
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	97
<b>REFERINȚE</b>	99

Cuvinte cheie: tumori maligne multiple primitive – GSTM1 – GSTT1 – GSTP1 - variante genice

**STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**, structurat pe trei capitole, cuprinde câteva date succinte generale despre cancer, în special ratele incidenței și ale mortalității, așa cum au fost raportate de către ultima evaluare internațională prin proiectul Globocan 2008, inserându-se și datele oferite de România. Sunt trecuți apoi în revistă cei mai cunoscuți factori de risc, modalitățile de screening, precum și mijloacele de prevenție. Sunt oferite apoi caracteristicile tumorilor maligne multiple primitive și clasificarea acestora.

În cadrul aspectelor genetice cunoscute, sunt amintite glutatión S-transferazele (GST), o superfamilie de gene care codifică proteine cu rol enzimatic complex (enzime de fază a II-a), ce catalizează adiția glutatiónului la acceptori electrofilii. Membrii familiei GST îndeplinesc și alte funcții importante: reglarea transcripției și a translației, transportul intracelular al ionilor. Aceste enzime participă la detoxifierea compușilor electrofilii (carcinogeni, medicamente, toxine din mediu, produși ai stresului oxidativ) prin conjugarea cu glutatiónul, reducând astfel interacțiunile dăunătoare ale acestor compuși cu anumite componente celulare esențiale (mai ales proteinele și acizii nucleici). Proprietățile specifice biochimice, imunologice și structurale permit clasificarea substanței solubile din GST în patru categorii principale: *alfa*, *mu*, *pi* și *theta*; trebuie însă să menționăm că la mamifere sunt cel puțin opt clase de gene independente, pe lângă cele menționate mai sus existând și *kappa*, *omega*, *sigma* și *zeta*. GST-le sunt implicate în numeroase cancere.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

**1. Ipoteza de lucru. Obiective:** Cancerele multiple primitive sunt tumorile maligne apărute la un individ fără a avea nici o legătură una cu cealaltă. Unele tumori pot să se dezvolte și să fie diagnosticate în același timp (tumori simultane), în decursul a 6 luni de la diagnosticarea primei tumori (tumori sincrone) sau la un interval de timp peste 6 luni după primul cancer diagnosticat (tumori metacrone); unele tumori apărute ulterior pot fi o consecință a unei terapii particulare (radioterapie, chimioterapie, sau hormonoterapie), ori poate să nu existe nici un fel de legătură între tumora index și cea ulterior apărută.

În primul studiu am dorit să evaluăm incidența acestor tumori maligne multiple primitive, analizând pacienții prezentați cu cel puțin un cancer primitiv în perioada ianuarie 2005 – iunie 2012 în SCM Cluj-Napoca, selectându-i pe cei cu cel puțin două cancere primitive. Celelalte trei studii au căutat polimorfismele a trei glutatión S-transferaze la pacienții cu cele mai frecvente asocieri de tumori maligne multiple primitive, comparându-le cu loturi de indivizi sănătoși, de ambele sexe. Am căutat să aflăm dacă există diferențe semnificative statistice la pacienții luați în studii și dacă putem considera modificările genetice ca factori de risc pentru diversele asocieri de tumori multiple.

**2. Metodologie generală:** Din materialul biologic al pacienților (sânge periferic și piese bioptice incluse în parafină) am extras materialul genetic utilizând două kit-uri diferite (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, MA, USA și QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Qiagen, Germany). ADN-ul a fost obținut și de la martorii din sânge periferic. Materialul genetic a fost procesat pentru identificarea variantelor genice ale celor trei GST: GSTM1, GSTT1 și polimorfismul Ile105Val GSTP1. Pacienții și martorii au semnat un acord informat. Studiul a fost aprobat de către Consiliul Etic al SCM Cluj-Napoca. Am efectuat analiza genetică a GST-lor M și T, menționând faptul că

tehnica utilizată nu poate face diferențierea între indivizii heterozigoți (+/0) și cei homozigoți (+/+), dar pune în evidență genotipurile nule (-/-).

Pentru analiza statistică s-au folosit programele SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiunea 20 și programul Medcalc versiunea 12.3. Pentru analiza univariată a variabilelor nominale am folosit testul  $\chi^2$ . Ca prag de semnificație statistică am stabilit valoarea de 0,05 a parametrului p.

### **3. Studiul 1. Tumorile maligne multiple primitive din cadrul SCM Cluj-Napoca (ianuarie 2005 – iunie 2012)**

**3.1. Introducere:** Cancerelor multiple primitive reprezintă o categorie cu care avem posibilitatea de a ne întâlni din ce în ce mai frecvent în ultimii ani, datorită apariției și perfecționării a numeroase mijloace de investigație, în special metode imagistice, pentru fiecare tip de cancer în parte, reușind la un număr apreciabil de pacienți ca diagnosticul să fie stabilit în stadii utile din punct de vedere terapeutic.

**3.2. Ipoteza de lucru. Obiective:** Am evaluat numărul total al pacienților cu tumori multiple maligne primitive, asocierile între diferitele tipuri de cancer, cele mai frecvente tumori apărute în funcție de localizarea primei tumori, timpul până la apariția celei de a doua, a treia sau chiar a celei de a patra tumori.

**3.3. Material și metodă:** Studiul este retrospectiv, desfășurat în cadrul Spitalului Clinic Municipal din Cluj-Napoca, în perioada ianuarie 2005-iunie 2012, fiind analizați pacienții cu cel puțin două cancere primitive.

**3.4. Rezultate:** 217 pacienți (4,33%) au fost diagnosticați cu tumori maligne multiple primitive, 110 femei (50,69%) și 107 bărbați (49,30%). 54 de pacienți (24,88%) au prezentat tumori sincrone (apărute în decurs de 6 luni de la diagnosticul inițial al unei tumori maligne primitive), dar cei mai mulți pacienți (163, reprezentând 75,11%) au avut cancere metacrone. Vârsta pacienților a fost între 17 și 95 ani. Cei mai mulți pacienți au dezvoltat două tumori, dar au fost pacienți și cu 6 tumori. Analiza datelor obținute a relevat o aglomerare de tumori mamare multiple, tumori maligne aparținând sferei urologice, cancere multiple primitive sincrone cu localizare colorectală.

**3.6. Concluzii:** Procentul cancerelor multiple din totalul tumorilor maligne primitive este în concordanță cu datele din literatură. Cel mai frecvent am întâlnit cancere metacrone. Repartiția pe sexe a fost sensibil egală, cu o ușoară preponderență a sexului feminin. Cele mai frecvente tumori maligne multiple primitive au fost cele mamare, apoi colorectale și cele din sfera urologică (de vezică urinară, rinichi și prostată).

#### **4. Studiul 2. Glutacion S-transferazele M, T și P la pacientele cu cancer mamare multiple și asocierea de cancer mamar cu un alt cancer**

**4.1. Introducere:** Cancerul mamar la femei se situează pe primul loc în rândul tumorilor maligne, iar mortalitatea prin acest cancer ocupă și ea cel dintâi loc; pentru ambele sexe cancerul mamar ocupă locul al doilea, după cel pulmonar. Superfamilia GST-lor are rol protector al ADN-ului împotriva distrucției produse prin agenți exogeni și endogeni oxidativi, prin conjugarea compușilor xenobiotici (ierbicide, insecticide, carcinogene din mediu, agenți alchilanți, compuși de platină) cu glutacionul, favorizând excreția tuturor acestora prin urină. Rolul acestor gene în cancerul de sân a oferit rezultate variate în studiile efectuate.

**4.2. Obiective:** Cercetarea caută să ofere un răspuns la întrebarea dacă polimorfismul a trei dintre GST-le cunoscute (GSTM1, GSTT1 și GSTP1) este sau nu legată de un risc crescut de dezvoltare a cancerelor mamare sau a asocierii cancerului mamar cu alte cancer.

**4.3. Material și metodă:** Am selectat dintre pacientele cu cancer mamar operate în Clinica Chirurgie V Cluj-Napoca, un număr de 59 paciente care au fost diagnosticate cu cancer mamare multiple sau asociere de cancer mamar și alt tip de cancer. Au fost incluse în studiu și 18 dintre pacientele selecționate ca fiind operate pentru un cancer mamar și având dezvoltată ulterior cel puțin încă o tumoră malignă primitivă.

**4.4. Rezultate:** Am constatat diferențe semnificative statistic pentru genotipul nul GSTM1, sau prezența oricărui genotip nul (GSTM1 sau GSTT1).

**4.6. Concluzii:** În studiul nostru genotipul nul GSTM1 este un factor de risc pentru cancerle mamare sincrone și pentru asocierile de cancer mamar cu unul extramamar. Prezența genotipului nul (GSTM1 sau GSTT1) reprezintă un factor de risc pentru cancerul mamar multiplu (bilateral sau sincron).

#### **5. Studiul 3. Modificările genetice ale Glutacion S-transferazelor M, P și T în tumorile maligne sincrone colorectale și asocierea sincronă a unui cancer colorectal cu un alt cancer**

**5.1. Introducere:** În anul 2008 în întreaga lume cancerul colorectal a ocupat al III-lea loc ca incidență a cancerului la bărbați și locul al II-lea la femei.

**5.2. Ipoteza de lucru. Obiective:** Datele din literatura de specialitate oferă rezultate diferite în ceea ce privește aportul GSTM1, GSTT1 și GSTP1 în cancerul colorectal. Am evaluat variantele genice ale pacienților având tumori multiple maligne colorectale sincrone, precum și al pacienților cu o asociere sincronă a unui cancer localizat în sfera colorectală cu un alt tip de cancer.

**5.3. Material și metodă:** 19 de pacienți cu cancer primitiv multiple colorectale sincrone și 9 pacienți care au prezentat tumori maligne sincrone multiple, dintre care una cu localizare colorectală și cealaltă cu o altă localizare au fost analizați genetic, în comparație cu loturi de martori.

**5.4. Rezultate:** Am constatat diferențe semnificative statistic pentru genotipul nul GSTM1.

**5.6. Concluzii:** Colectomia totală cu ileo-rectoanastomoză cu rezervor ileal în J este o soluție practică pentru rezolvarea cancerelor multiple sincrone colorectale. 78,9% dintre pacienții cu cancer sincrone colorectale au fost fumători, acesta fiind cunoscut ca factor de risc în mai multe tipuri de cancer. Genotipul nul GSTM1 este un factor de risc pentru dezvoltarea cancerelor sincrone colorectale. Genotipul nul GSTM1 reprezintă un

factor de risc pentru asocierea sincronă a unui cancer colorectal cu un alt cancer. Genotipul nul GSTT1 și polimorfismul Ile105Val al GSTP1 pentru pacienții luați în studiu nu reprezintă factori de risc pentru cancerurile sincrone colorectale și asocierea sincronă a unui cancer colorectal cu un alt cancer.

#### **6. Studiul 4. Variante genice ale GSTM1, GSTT1 și GSTP1 la pacienții cu cancere multiple urologice și la cei cu asocierea unui cancer urologic cu un alt tip de cancer**

**6.1. Introducere:** Cancerurile cu localizare în sfera urologică sunt în creștere în ultimii ani, în special cel prostatic, acesta situându-se pe locul al doilea ca incidență la nivel mondial.

**6.2. Ipoteza de lucru. Obiective:** Am căutat dacă pacienții cu cancere multiple urologice prezintă, față de loturile de martori corespunzători, diferențe semnificative ale variantelor genice ale GSTM1, GSTT1 și GSTP1.

**6.3. Material și metodă:** Studiul genetic s-a efectuat la 34 de pacienți cu cancere urologice multiple și la 23 pacienți cu asociere de cancer urologic și un alt cancer, comparativ cu loturi similare de martori.

**6.4. Rezultate:** Pentru pacienții cu cancere urologice multiple am constatat diferențe semnificative statistic pentru genotipul nul GST1 și pentru prezența unui genotip nul GSTM1 sau GSTT1; pentru pacienții cu cancer urologic asociat unui alt cancer genotipul nul GSTM1 și GSTT1 sunt factori de risc.

**6.6. Concluzii:** Genotipul nul GSTT1 reprezintă un factor de risc pentru pacienții având mai multe tumori maligne urologice. Genotipul nul GSTM1 sau GSTT1 este mai frecvent întâlnit la pacienții cu neoplazii multiple urologice. Genotipul nul GSTM1 și GSTT1 reprezintă factori de risc pentru pacienții cu tipuri diferite de cancer, cel puțin unul fiind în sfera urinară.

#### **7. Concluzii generale**

1. Tumorile maligne multiple primitive sunt din ce în ce mai des întâlnite în practica medicală, odată cu îmbunătățirile obținute prin diagnosticarea în stadiu util terapeutic al afecțiunii neoplazice, urmate de terapia modernă aplicată care, pe de o parte oferă șanse reale de vindecare și astfel o supraviețuire mai lungă ceea ce permite posibilitatea apariției unei noi tumori maligne primitive, iar pe de altă parte prin ea însăși poate reprezenta un factor de risc ce favorizează apariția unui nou cancer. Numărul de cancere primitive multiple constatat în cadrul studiului întreprins în SCM Cluj-Napoca pe perioada ianuarie 2005-iunie 2012 se încadrează cu procentul oferit de datele din literatură.

2. Cele mai frecvente asocieri constatate în cadrul tumorilor maligne multiple primitive analizate au fost de cancere mamare multiple, asociere de cancer mamar cu un alt cancer, cancere colorectale sincrone, cancere sincrone de colon și rect asociat unui alt tip de cancer, cancere urologice multiple și asocieri de cancer urologic cu un alt tip de cancer. La pacientele luate în studiu, chiar dacă în comparație cu martorii au existat mai multe cazuri cu modificări genetice ale GSTT1 și GSTP1, acestea nu au fost semnificative statistic, astfel cele două variante genice la pacientele noastre nu au constituit un factor de risc pentru dezvoltarea cancerelor multiple mamare sau cancer mamar asociat altor cancere.



3. În cancerelor mamare multiple și asocierile de cancer mamar cu un alt tip de cancer am constatat că GSTM1 reprezintă un factor de risc. Prezența oricărei alele nule GSTM1 sau GSTT1 este un factor de risc pentru dezvoltarea acestor cancere.

4. În cancerelor sincrone colorectale și cele asociate unui alt tip de cancer, apărut sincron cu cel colorectal, GSTM1 a reprezentat un factor de risc pentru dezvoltarea cancerelor multiple. GSTT1 și polimorfismul Ile105Val al GSTP1 nu reprezintă factori de risc pentru pacienții cu cancere colorectale sincrone sau asocierea sincronă a unui cancer colorectal cu un alt cancer.

5. În cancerelor urologice multiple și cele asociate (urologice și non-urologice) am constatat că GSTT1 reprezintă un factor de risc. La fel, prezența oricărei alele nule a GSTM1 sau GSTT1 reprezintă un factor de risc pentru aceste cancere.

### **8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Abordează o tematică dificilă, cu un volum imens de informație, necesitând abordarea celor mai multe tipuri de cancere și în mod particular a celor mai frecvente dintre acestea.

Cuprinde totalitatea cazurilor clinice de cancere primitive multiple din cadrul unui Spital Clinic, pe o perioadă de 7,5 ani.

Se bazează pe studii genetice care în țara noastră s-au efectuat doar pentru studiul pacienților cu cancer pulmonar.

Nu au fost publicate studii legate de variantele genice ale GSTM1, GSTT1 și GSTP1 în cancerelor multiple primitive, nici în țara noastră și nici în străinătate.

A încercat să ofere și soluții terapeutice pentru anumite asocieri de tumori maligne multiple primitive.

Rezultatele obținute identifică anumiți factori de risc în cancerelor multiple mamare, colorectale, urologice, precum și în asocierile de cancere multiple variate, dintre care cel puțin unul este localizat la nivelul sânelui, colonului și rectului, vezicii urinare, prostatei sau rinichiului.

**“Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy**

**Cluj-Napoca**

PhD Thesis

**Some aspects of multiple malignant primitive tumors**

PhD candidate **Daciana Narcisa Chirilă**

Scientific coordinator **Prof. Dr. Constantin Ciuce**

Cluj-Napoca 2012



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

Contents	
<b>ABREVIATIONS</b>	11
<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE</b>	15
<b>1. The cancer</b>	17
1.1. Incidence and mortality	17
1.2. Risk factors	20
1.3. Screening	22
1.4. Prevention, Diet, Nutrition	22
<b>2. Multiple malignant primitive tumors</b>	24
2.1. Classification of multiple malignant primitive tumors	25
<b>3. Genetic data in cancer</b>	25
3.1. Glutathione S-transferases	28
3.1.1. GSTA1	29
3.1.2. GSTK1	30
3.1.3. GSTM1	30
3.1.4. GSTO1	31
3.1.5. GSTP1	31
3.1.6. GSTS1	32
3.1.7. GSTT1	32
3.1.8. GSTZ1	32
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	33
<b>1. Working Hypothesis. Objectives</b>	35
<b>2. Methodology</b>	37
2.1. The DNA extraction from paraffin embedded-samples	37
2.2. The DNA extraction from blood	37

---

2.3. Genetic analysis of GSTM1 and GSTT1	37
2.4. Genetic analysis of GSTP1	38
2.5. Statistical analysis	39
<b>3. Study no. 1 – Multiple malignant primitive tumors in SCM Cluj-Napoca (January 2005 – June2012)</b>	41
3.1. Introduction	41
3.2. Working hypothesis. Objectives	41
3.3. Material and method	41
3.4. Results	42
3.5. Discussions	50
3.6. Conclusions	54
<b>4. Study no. 2 – The Glutathione S-transferases M, T and P in patients with multiple breast cancers and association of breast cancer with another cancer</b>	55
4.1. Introduction	55
4.2. Objectives	55
4.3. Material and method	55
4.4. Results	56
4.5. Discussions	65
4.6. Conclusions	68
<b>5. Study no. 3 – Genetic changes of Glutathione S-transferases M, P and T in synchronous colorectal malignant tumors and synchronous association of colorectal cancer with another cancer</b>	69
5.1. Introduction	69
5.2. Working hypothesis. Objectives	69
5.3. Material and method	69
5.4. Results	72
5.5. Discussions	77

---

5.6. Conclusions	81
<b>6. Study no.4 – Genes variants of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in patients with multiple urologic cancers and association of urologic cancer with another cancer</b>	83
6.1. Introduction	83
6.2. Working hypothesis. Objectives	83
6.3. Material and method	83
6.4. Results	84
6.5. Discussions	90
6.6. Conclusions	93
<b>7. General conclusions</b>	95
<b>8. Originality and innovative contribution of the thesis</b>	97
<b>REFERENCES</b>	99

Key words: multiple malignant primitive tumors – GSTM1 – GSTT1 – GSTP1 – genes variants.

**Current stage of knowledge**, structured in three chapters, includes some brief general data about cancer, specially the incidence and mortality rates, as reported by the last international evaluation through Globocan 2008 project, along with Romania's data. Then, we reviewed the most known risk factors, screening modalities, and prevention methods. We present the characteristics of the multiple malignant tumors and their classification.

We mentioned among known genetic aspects the glutathione S-transferases (GST), a superfamily of genes which encodes proteins with complex enzyme role (phase II enzymes), catalysing the glutathione addition to electrophilic acceptors. GST family members have also other important functions: control of transcription and translation, intracellular transport of ions. These enzymes participate in electrophilic compound detoxification (carcinogens, drugs, environmental toxins, oxidative stress products) through conjugation with the glutathione, reducing the noxious interactions of these compounds with certain essential cellular compounds (especially proteins and nucleic acids). Specific biochemical, immunological and structural properties allow the classification of the soluble GST substance in four major categories: *alfa*, *mu*, *pi* and *theta*; but we have to mention that in mammals there are at least eight classes of independent genes, in addition to the already mentioned categories, being *kappa*, *omega*, *sigma* and *zeta*. The GST-ies are implicated in a lot of cancers.

## PERSONAL CONTRIBUTION

**1. Working hypothesis. Objectives:** The multiple primitive cancers are malignant tumors appeared in an individual without any link one with the other. Some tumors may develop and may be diagnosed in the same time (simultaneous tumors), within 6 months from the first tumor diagnosis (synchronous tumors) or over 6 months after the first cancer (metachronous tumors); some subsequent tumors may be a consequence of a peculiar therapy (radiotherapy, chemotherapy, or hormone therapy), or it may exist no link between the index tumor and the subsequent one.

The first study wished to evaluate the incidence of multiple malignant primitive tumors, analysing the patients admitted with at least one primitive cancer in SCM Cluj-Napoca between January 2005 to June 2012, selecting those with at least two primitive cancers. The other three studies searched for GST polymorphisms in patients having the most frequent associations of multiple malignant primitive tumors, in comparison with both sexes healthy controls. We searched for significant statistical differences in the studied patients and to see if we may consider the genetic changes as risk factors for diverse associations of multiple tumors.

**2. Methodology:** We extracted the genetic material from the patients' biological material (peripheral blood and paraffin-embedded samples), using two different kits (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, MA, USA and QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Qiagen, Germany). The DNA of controls was extracted from blood. The genetic material was processed to identify the genes variants of three GST-es: GSTM1, GSTT1 and Ile105Val GSTP1 polymorphism. The patients and controls have signed an informed consent. The study was approved by the Ethical Council of SCM Cluj-Napoca. We made the genetic analysis of GST M and T, mentioning that the used technique cannot differentiate between the heterozygous (+/0) and the homozygous (+/+) individuals, but renders obvious the null genotypes (-/-).

For statistic analysis we used the SPSS programs (Statistical Package for the Social Sciences), version 20, and the Medcalc programme, version 12.3. For the

univariate of nominal variables we used  $\chi^2$  test. The value lower than 0.05 of the p parameter was considered as statistical significance.

### **3. Study no. 1 – Multiple malignant primitive tumors in SCM Cluj-Napoca (January 2005 – June 2012)**

**3.1. Introduction:** The multiple primitive cancers represent a category we may encounter more frequently in the last years, because many investigation means emerged and were improved, especially imagistic methods for each kind of cancer, being able in a considerable number of patients the diagnosis to be established in useful therapeutical stages.

**3.2. Working hypothesis. Objectives:** We evaluated the number of patients with multiple malignant primitive tumors, the associations between different types of cancers, the most frequent tumors developed depending on the first tumor site, the time till the second, the third or the fourth tumor appeared.

**3.3. Material and method:** The study was a retrospective one, realized in SCM Cluj-Napoca, between January 2005 – June 2012, analysing the patients with at least two primitive cancers.

**3.4. Results:** 217 patients (4.33%) were diagnosed with multiple malignant primitive tumors, 110 women (50.69%) and 107 men (49.30%). 54 patients (24.88%) had synchronous tumors (developed within 6 months from the diagnosis of an initial primitive malignant tumor), but most patients (163, representing 75.11%) had metachronous cancers. The patients were between 17 and 95 years. The most of them developed two cancers, but there were patients with six tumors. The data analysis revealed an agglomeration of multiple breast tumors, malignant urologic tumors and synchronous colorectal multiple primitive cancers.

**3.6. Conclusions:** The percentage of multiple cancers among all primitive malignant tumors was concordant with bibliography data. We encountered more frequent metachronous cancers. The sex distribution was sensible equal, with a slight preponderance for females. The most frequent multiple primitive malignant tumors were on breast, colorectal and urological (bladder, kidney and prostate).

#### **4. Study no. 2 – The Glutathione S-transferases M, T and P in patients with multiple breast cancers and association of breast cancer with another cancer**

**4.1. Introduction:** The breast cancer is on the first place among malignant tumors in women, and the mortality rate is also on the first place; for both sexes the breast cancer is on the second place, after the pulmonary cancer. The GST superfamily has a DNA protective function against the damages produced by exogenous and endogenous oxidative agents, by conjugation of xenobiotic compounds (herbicides, insecticides, environmental carcinogens, alkylants agents, platinum compound) with the glutathione, inducing their excretion through urine. In studies their role in breast cancer offered various results.

**4.2. Objectives:** The research was looking for an answer to the question if the three known GST-es (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) polymorphisms are linked with an increased risk to develop breast cancers or an association of breast cancer with other cancers.

**4.3. Material and method:** We selected 59 patients with multiple breast cancers or an association of a breast cancer and another cancer, from the patients diagnosed with a breast cancer in the Vth Surgical Clinic Cluj-Napoca. We included also 18 patients surgically treated for breast cancer, which developed later at least one another malignant tumor.

**4.4. Results:** We found statistical significant differences for the null GSTM1 genotype, or any of GSTT1 or GSTM1 null genotype.

**4.6. Conclusions:** In our study the null GSTM1 genotype is a risk factor for synchronous breast cancers and for the association of a breast cancer with another cancer. The null GSTM1 or GSTT1 genotype is a risk factor for multiple breast cancers (bilateral or synchronous).

#### **5. Study no. 3 – Genetic changes of Glutathione S-transferases M, P and T in synchronous colorectal malignant tumors and synchronous association of colorectal cancer with another cancer**

**5.1. Introduction:** In 2008 throughout the world the colorectal cancer was on the third place in men and on the second place in women.

**5.2. Working hypothesis. Objectives:** The specialty literature data offer diverse results about the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 role in colorectal cancer. We evaluated the genes variants of the patients with synchronous colorectal cancers and a synchronous association of colorectal cancer with another cancer.

**5.3. Material and method:** we performed genetic analysis of 19 patients with synchronous multiple malignant primitive colorectal cancers and of 9 patients with an association of synchronous cancers, a colorectal one and another cancer, together with controls.

**5.4. Results:** We found statistical significant differences in patients with null GSTM1 genotype.

**5.6. Conclusions:** The total colectomy with an ileal-rectal anastomosis with J-reservoir is a practical solution for resolving multiple synchronous colorectal cancers. 78.9% of the patients with colorectal synchronous cancers were smokers, smoking being a well-known risk factor in many types of cancer. The null GSTM1 genotype is a risk factor for synchronous colorectal cancer development. The null GSTM1 genotype is a risk factor for the synchronous association of a colorectal cancer with another



cancer. The null GSTT1 genotype and the Ile105Val GSTP1 polymorphism are not risk factors for the studied patients with synchronous colorectal cancer and a synchronous association of colorectal cancer with another cancer in our patients.

#### **6. Study no. 4. Genes variants of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in patients with multiple urologic cancers and association of urologic cancer with another cancer**

**6.1. Introduction:** The urologic cancers have an increasing incidence in the last years, especially the prostate cancer, which is situated on the second place worldwide.

**6.2. Working hypothesis. Objectives:** We were looking for significant differences between patients and controls of the genes variants of GSTM1, GSTT1 and GSTP1.

**6.3. Material and method:** The genetic study was made for 34 patients with multiple urologic cancers and for 23 patients with an association of an urologic cancer with another cancer, in comparison with controls.

**6.4. Results:** We found significant statistical differences for a null GSTT1 genotype and the presence of any null genotype (GSTT1 or GSTM1) in association with urologic multiple cancers; for the patients with the association of an urologic cancer with another cancer the null GSTM1 and GSTT1 genotypes are risk factors.

**6.6. Conclusions:** The null GSTT1 genotype is a risk factor for the patients with multiple urologic tumors. The null GSTM1 or GSTT1 genotypes are more frequently encountered in patients with multiple urologic cancers. The null GSTM1 and GSTT1 genotypes are risk factors for the patients with different types of cancer, one of them being urological.

#### **7. General conclusions**

1. Multiple malignant primitive tumors are more frequently encountered in medical practice, along with the improvements obtained by an useful stage diagnosis of neoplastic disease, followed by modern therapy applied, which, on the one hand offers real chances for cure and a longer survival which allows the possibility of development of a new malignant tumor, and on the other side, through itself, may represents a risk factor which favours the emergence of a new cancer. The number of multiple primitive cancers from our study made in SCM Cluj/Napoca between January 2005 – June 2012, is concordant with the percentage offered by bibliography.

2. The most frequent associations encountered in multiple malignant primitive tumors, which were analysed, were multiple breast cancers, association of breast cancer with another cancer, synchronous colorectal cancers, synchronous association of colorectal cancer with another cancer, urologic cancers and association of urologic cancer with another cancer. Even if existed more patients with genetic changes of GSTT1 and GSTP1 in comparison with controls, these were not statistically significant, that is why the variant genes in our patients did not constitute risk factors for the development of multiple breast cancers or breast cancer associated with another cancer.

3. GSTM1 is a risk factor for multiple breast cancers and association of breast cancer with another cancer. Any null GSTM1 or GSTT1 allele represent a risk factor for development of these cancers.

4. GSTM1 is a risk factor in development of synchronous colorectal multiple cancers and in association of synchronous colorectal cancer with another cancer.

GSTT1 and Ile105Val GSTP1 polymorphism do not represent risk factors in patients with synchronous colorectal cancers and the association of synchronous colorectal cancer with another cancer.

5. GSTT1 is a risk factor for multiple urological cancers and for association of a urologic and a non-urologic cancer. Also, the any null GSTM1 or GSTT1 allele constitute a risk factor for these cancers.

### **8. Originality and innovative contribution of the thesis**

The thesis approaches a difficult themes, with a tremendous volume of information, which requires to deal with the most types of cancer and specially the most frequent of them.

It comprises all the clinical cases of multiple primitive cancers from a Clinical Hospital, during 7.5 years.

It is based on genetic studies, which were performed in our country only for study of patients with pulmonary cancer.

There were not published studies neither in our country nor abroad concerning of genes variants of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in multiple primitive cancers.

Also the thesis tried to offer practical solutions for peculiar association of multiple malignant primitive tumors.

Our results identify some risk factors for multiple breast, colorectal, urological cancers, and also for the associations of various multiple cancers, one of them being breast, colorectal, bladder , prostate or kidney cancer.