

# A fej-nyaki daganatok progressziós és prognosztikai faktorainak vizsgálata

Doktori értekezés

**Dr. Dános Kornél Pál**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tamás László Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Móricz Péter Ph.D., osztályvezető főorvos  
Dr. Orosz Zsuzsanna Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Farkas Henriette Ph.D., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Glasz Tibor Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Katona Csilla Ph.D., főorvos

Budapest  
2015

## Tartalomjegyzék

<b>Tartalomjegyzék.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
<b>1. A témaválasztás indoklása.....</b>	<b>6</b>
<b>2. A fej-nyaki daganatos megbetegedések anatómiája, epidemiológiája és etiológiája .....</b>	<b>6</b>
2.1 Anatómia .....	6
2.2 Epidemiológia .....	7
2.3 Etiológia .....	8
<b>3. A fej-nyaki laphámsejtes daganatok kezelése.....</b>	<b>12</b>
<b>4. A prognózist meghatározó tényezők.....</b>	<b>15</b>
4.1. A beteg személyéhez köthető prognosztikai faktorok.....	15
4.2. A betegséggel kapcsolatos prognosztikai faktorok .....	17
4.3. Sejt- és molekulárbiológiai faktorok .....	22
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>30</b>
<b>4. Módszerek.....</b>	<b>31</b>
<b>1. Adatgyűjtés, betegek .....</b>	<b>31</b>
<b>2. A szövetminták feldolgozása .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Immunhisztokémia.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Fluorescens in situ hybridizáció (FISH).....</b>	<b>36</b>
<b>5. Statisztikai analízis .....</b>	<b>37</b>
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>38</b>
<b>1. Annak vizsgálata, hogy biomarker-expressziós szempontból egységesnek tekinthetők-e a fej-nyaki daganatok.....</b>	<b>40</b>
<b>2. A Ki67 fehérje és a túlélés, illetve betegség progressziója közötti összefüggés vizsgálata.....</b>	<b>40</b>
<b>3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve a hepatocita növekedési faktor-receptor (c-MET) citogenetikai eltérései és daganatos betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálata .....</b>	<b>42</b>
<b>4. A connexin 43 (Cx43) fehérje expressziójának vizsgálata fej-nyaki daganatokban .....</b>	<b>45</b>

<b>6. Megbeszélés</b> .....	<b>49</b>
<b>1. Annak vizsgálata, hogy biomarker-expressziós szempontból egységesnek tekinthetők-e a fej-nyaki daganatok</b> .....	<b>49</b>
<b>2. A Ki67 fehérje és a túlélés, illetve betegség progressziója közötti összefüggés vizsgálata.</b> .....	<b>50</b>
<b>3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve a hepatocita növekedési faktor-receptor (c-MET) citogenetikai eltérései és daganatos betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálata</b> .....	<b>51</b>
<b>4. A connexin 43 (Cx43) fehérje expressziójának vizsgálata fej-nyaki daganatokban</b> .....	<b>52</b>
<b>7. Következtetések</b> .....	<b>54</b>
<b>8. Összefoglalás</b> .....	<b>56</b>
<b>9. Summary</b> .....	<b>57</b>
<b>10. Irodalomjegyzék</b> .....	<b>58</b>
<b>11. Saját publikációk jegyzéke:</b> .....	<b>73</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>74</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

- 3DCRT – 3D conformal radiotherapy – 3D konformális besugárzás
- ACE 27 – Adult Comorbidity Evaluation 27 – Felnőtt komorbiditás-értékelő skála
- AgNOR – Argyrophilic proteins associated with the Nucleolar Organizer Regions – ezüstnitrát-reagenst tartalmazó koloidos festési eljárás, amellyel a sejtmagokon belül a magvacska szervező régió láthatóvá válik
- AJCC – American Joint Committee on Cancer – Amerikai „Közös” Rákbizottság
- ASCO – American Society of Clinical Oncology – Amerikai Klinikai Onkológiai Társaság
- BER – Base Excision Repair – a bázis kivágásával működő javítómechanizmus
- BSA – Bovine Serum Albumin – tehén szérum albumin
- BSCC – Basaloid Squamous Cell Carcinoma – bazaloid laphámsejtes rák
- CI – Confidence Interval – konfidencia intervallum
- CSCC – Conventional Squamous Cell Carcinoma – hagyományos laphámsejtes rák
- CDK – Ciklin-dependens kináz
- DNS – Deoxiribonukleinsav
- DSS – Disease-Specific Survival – betegségsspecifikus túlélés
- EBV – Epstein-Barr Vírus
- ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group – Keleti Kooperatív Onkológiai Csoport
- ECS – Extracapsular Spread – extrakapszuláris terjedés (nyirokcsomó-áttét esetén)
- EDTA – Etilén-diamin-tetraacetát
- EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor – epidermális növekedési faktor receptor
- EMT – Epithelhális-Mesenchimális tranzíció
- ERCC1 – Excision Repair Cross-Complementation Group 1
- FISH – Fluorescent In Situ Hybridization – fluorescens in situ hibridizáció
- GST – Glutation-S-transzferáz
- HER – Human Epidermal growth factor Receptor – az EGFR receptorcsalád másik megnevezése
- HIV – Humán Immundeficiencia vírus
- HNC – Head and Neck Carcinoma – fej-nyaki daganat
- HNSCC – Head and Neck Squamous Cell Carcinoma – fej-nyaki laphámsejtes daganat
- HPV – Humán papillomavírus
- HR – Hazard Ratio – relatív házárd



HSV – Herpes simplex vírus

IMRT – Intensity Modulated Radiotherapy – intenzitásmodulált sugárkezelés

ISH – In Situ Hybridization – in situ hibridizáció

MVD – Microvessel Density – mikroér denzitás

NCCN – National Comprehensive Cancer Network – Nemzeti Átfogó Onkológiai Hálózat

NCI – National Cancer Institute – Amerikai Ráktársaság

NER – Nucleotide Excision Repair – a nukleotid kivágásával működő javítómechanizmus

NR – Not Reached – A túlélési idők számításakor a mediánra vonatkoztatjuk, ha a követési idő alatt a betegeknek kevesebb, mint a fele halt meg

OR – Odds Ratio – esélyhányados

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen – proliferáló sejt nukleáris antigén

PCR – Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció

PD-1 – Programmed cell Death-1 receptor – A T-limfociták felszínén elhelyezkedő, azok aktiválódását gátló receptor

PF – Poliploid Frakció

qRT-PCR – quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – reverz transzkripció, kvantitatív polimeráz láncreakció

RR – Relative Risk – relatív kockázat

RTOG – Radiation Therapy Oncology Group – Sugárterápiás Onkológiai Társaság

SPF – S-phase Fraction – S-fázis-arány

TGF – Transforming Growth Factor – Transzformáló növekedési faktor

TMA – Tissue Microarray – Szöveti mikrochip

TNM – Tumor, Node, Metastasis – a primer tumor, nyirokcsomó metasztázis, ill. távoli metasztázis jelenlétét, ill kiterjedését mutató stádiumbeosztás

UICC – Union for International Cancer Control – Nemzetközi Rákellenes Unió

VC – Verrucous Carcinoma - verrukózus karcinóma

## **2. Bevezetés**

### **1. A témaválasztás indoklása**

Medikusként kezdtem tudományos diákköri, valamint klinikai munkát végezni a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház fül-, orr-, gégeészeti osztályán fej-nyaki onkológiai témában. Már ekkor láttam, hogy a fej-nyaki daganatos betegek többsége igen előrehaladott stádiumban került az egészségügy látóterébe, ezért - már amikor egyáltalán lehetséges volt - a kuratív beavatkozást csak a funkcionalitást (így az életminőséget is) jelentősen csökkentő, csonkoló műtét, és/vagy a jelentős mellékhatásokkal járó kemoterápia, illetve irradiáció jelenthette. Egyetemi tanulmányaim végeztével a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégeészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájának onkológia osztályán kezdtem dolgozni, ahol azt tapasztaltam, hogy azonos stádiumú és lokalizációjú betegségek között rendkívül nagy differencia lehet mind kórlefolyást, mind terápiás választ tekintve.

Éppen ezért tartom fontosnak a megelőzésen és a korai diagnosztizáláson túl, olyan új prognosztikai tényezők azonosítását, amelyek egyrészt magyarázzák ezeket a különbségeket, másrészt lehetővé teszik, hogy a radikalitás és a kemoterápiás toxicitás mértékét csökkentendő, a betegek személyre szabott kezelésben részesülhessenek, ezáltal megóvva őket a túlzottan agresszív terápia következményeitől.

### **2. A fej-nyaki daganatos megbetegedések anatómiája, epidemiológiája és etiológiája**

#### **2.1 Anatómia**

Fej-nyaki daganatok (HNC – Head and Neck Carcinoma) megnevezés alatt – szoros értelemben – a fej és a nyak nyálkahártyáiból kiinduló tumoros megbetegedéseket értjük, melyeket az alábbi lokalizációk szerint osztályozhatunk. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy ez a beosztás nem szigorú, tág értelemben ide tartozik minden olyan daganatos megbetegedés, amely a fejen és a nyakon jelenik meg, kivéve a szem, illetve szemüregi, valamint a központi idegrendszeri daganatokat. A pajzsmirigy malignómáit tradicionálisan nem a fej-nyaki daganatok témakörben tárgyaljuk azok speciális patológiai/hisztológiai és terápiás vonatkozásai miatt. A fej-nyaki tumorok lokalizációs osztályozása:

- Szájüreg (cavum oris) – amely magában foglalja az ajak, a bucca, a nyelv elülső

része, a szájfenék, kemény szájpad, alsó- és felső íny, valamint a retromoláris trigonum képleteit;

- Garat (pharynx) – amelyen belül megkülönböztetünk 3 további alrégiót:
  - Orrgaratként (nasopharynx) definiáljuk a garat felső, orrüreg mögötti szűk részét;
  - Szájgarat (oropharynx), melyhez a tonsilláris régió, a nyelvgyök, a lágy szájpad és a hátsó garatfal tartozik;
  - Algarat (hypopharynx), amelyhez a sinus pyriformist, a gége hátsó felszínét (postcricoid terület), az inferoposterior és inferolateralis garatfalat soroljuk;
- Gége (larynx) – szintén három szegmensre osztva:
  - Supraglottis - a gégeének az epiglottis csúcsától az álhangszalagig terjedő része, magában foglalva a már említett képleteken túl a kannaporcot, valamint az aryepiglotticus redőt;
  - Glottis - az álhangszalagtól a valódi hangszalag alatti 0,5 cm-es képzeletbeli vonalig;
  - Subglottis - melynek határai az előbb leírt képzeletbeli vonal és a gyűrűporc alsó szélé;
- Orrüreg valamint orrmelléküregek (cavum nasi et sinus paranasales) által alkotott régió, amelyhez az orrüregen kívül az arc-, homlok-, és iköblök (sinus maxillaris, frontalis et sphenoidalis), továbbá a rostasejtek (cellulae ethmoidales) tartoznak;
- Kis és nagy nyálmirigyek (glandulae salivares minores et majores) előbbiekhöz a szájüreg és felső légút szubmukózus nyálmirigyei, utóbbiakhoz a fültőmirigy, az állcsont és nyelv alatti mirigyek (glandulae parotidaeae, submandibulares et sublinguales) tartoznak.

## 2.2 Epidemiológia

A világ legnagyobb rákregisztere, a GLOBOCAN 2015-ben közzétett adatai alapján évente mintegy 600 000 új fej-nyaki daganatos betegséget diagnosztizálnak, ezzel ez a betegségcsoport az ötödik leggyakoribb malignitás (Ferlay et al., 2015). A magyar epidemiológiai adatokat tekintve megállapítható, hogy hazánkban ez az entitás a tüdő, vastagbél, illetve emlődaganatokat követően a 4. leggyakoribb daganatos megbetegedés.

2010-ben 5113 új fej-nyaki tumoros megbetegedést rögzítettek a Nemzeti Rákregiszterben, melyből kiindulási régiót tekintve: 1333 volt gége, 633 algarat, 1391 szájgarat, valamint 1175 szájüreg daganat, a fennmaradó, közel hatszáz eset pedig nyálmirigy, orr, ill. melléküreg valamint orrgarati daganat volt (Rákregiszter, 2011).

### **2.3 Etiológia**

A daganatok kialakulásában a legtöbb esetben egyszerre több tényező játszik szerepet. Mint több más daganattípus esetében, a fej-nyaki tumorok esetében is beszélhetünk külső (extrinsic), illetve belső (intrinsic) hajlamosító tényezőkről. A külső tényezők közül az egyik legfontosabb az alkoholfogyasztás, valamint a dohányzás. Ezek együttesen az említett tumorok 72%-áért felelősek (4%-ban csak alkoholfogyasztás, 33%-ban csak dohányzás, míg 35%-ban a két noxa együtt) (Hashibe et al., 2009).

Mindkét esetben feltételezhető az ún. „field cancerization” hatás, amelynek lényege, hogy nem pusztán egy, szolid daganat alakul ki az érintett területen, hanem több, egymással nem feltétlenül összefüggésben álló dysplastikus sejtcsoport, melyek a dedifferenciáció, illetve karcinogenezis különböző stádiumaiban vannak. Ennek oka valószínűsíthetően az, hogy a károsító hatás az egész nyálkahártyafelszínt károsította egy időben.

#### **2.3.1. Dohányzás**

A dohányfüstben mintegy 4800 különböző vegyület mutatható ki, ezek közül legalább 60 bizonyítottan karcinogén ágens (Hoffmann et al., 2001). Ezek között megtalálhatók policiklusos aromás szénhidrogének, mint például a benzpirén, dibenz(a,h)antracén és nitrózaminok, mint a nitrozonornikotin. A legtöbb rákkeltő vegyület a cigarettafüstben a sejten belüli metabolikus aktivációt követően válik aktív karcinogénné. Ezek a molekulák hozzákötődnek a DNS-hez (DNS-addukt), megváltoztatva annak szerkezetét. Fiziológiásan a különböző DNS-javító mechanizmusok (NER, BER, MMR) a hibát javítják, és nem íródik át a mutáció a DNS-szintézis során. A daganatos betegség kialakulásában az egyik legfontosabb tényező, hogy a hiba nem javítódik ki, ill. protoonkogéneket/tumorszupresszor géneket kódoló szakaszon jön létre. A dohányzás indukálta daganatokban az egyik leggyakrabban érintett tumorszupresszor fehérje a p53 (Pfeifer et al., 2002), melynek a fej-nyaki daganatok közel felében kimutatható a mutációja (Brennan et al., 1995).

Egy 1998-ban megjelent, 1361 főt vizsgáló, svéd eset-kontroll tanulmány adatai alapján a dohányzók a nemdohányzókhoz képest 6,5-szer nagyobb eséllyel (RR) betegszenek meg fej-nyaki daganatos kórképben. Bizonyítást nyert továbbá, hogy a kockázatnövekedés dózis-dependens, és az alkohollal együtt szinergista hatású (Lewin et al., 1998). A dohányzás elhagyása ugyanakkor szignifikáns mértékben csökkenti a rizikót: az alkalmi dohányosok a leszokást követően 15 évvel a soha nem dohányzókkal azonos kockázattal rendelkeznek (Andre et al., 1995).

Hazai epidemiológiai/etiológiai adatokat tekintve, munkacsoportunk 2014-ben publikálta egy 147 fej-nyak tumoros beteg, illetve 147 egészséges (nem tumoros) kontroll kérdőíves kikérdezésén alapuló tanulmányát (Szentkúti G, 2014). Ennek során azt találtuk, hogy betegeink 88%-a dohányzott, míg a kontroll mintában 54% volt a dohányosok aránya.

### ***2.3.2. Alkoholfogyasztás***

Több vizsgálat is igazolta, hogy az alkoholfogyasztás független rizikótényezője a fej-nyaki daganatoknak. A nemdohányzók esetében a napi 3, vagy annál több egység alkoholt (10 ml tiszta alkohol) fogyasztóknak mintegy kétszer nagyobb eséllyel (OR: 2,04) alakul ki fej-nyak rájuk (Hashibe et al., 2007).

Arra vonatkozóan, hogy az alkohol miként fejt ki karcinogénikus hatását, több elmélet is létezik. Feltételezhető, hogy az alkohol oldószere több rákkeltő anyagnak (így például megkönnyíti a dohányzás által bevitt vegyületek felszívódását a nyálkahártyán keresztül), továbbá ismert, hogy az alkohol elsődleges metabolitja, az acetaldehid közvetlen DNS-károsító hatású (Hashibe et al., 2007).

### ***2.3.3 Vírusfertőzések***

A daganatkialakulás virális elméletét Peyton Rous alapozta meg 1911-ben végzett kísérleteivel, melyek alapján azonosították az első onkogén vírust, a Rous-féle Sarcoma Vírust (RSV) (Weiss and Vogt, 2011).

A fej-nyaki daganatok esetében több vírus karcinogén szerepe is ismert.

#### ***2.3.3.1 Epstein-Barr Vírus***

Az egyik legerősebb összefüggést az Epstein-Barr Vírus (EBV) és a nasopharyngealis karcinóma el nem szarusodó formája (elsősorban az alacsony differenciált, ún.

lymphoepithelioma) között írták le (Liebowitz, 1994). Ez a daganattípus legnagyobb számban Dél- Kínában fordul elő, a Föld többi részén ritka megbetegedésnek tekinthető. Az Epstein-Barr vírus által okozott fertőzés emeli továbbá a hajassejtes leukaemia, illetve Burkitt-lymphoma kialakulásának kockázatát is (Goldenberg et al., 2004).

### 2.3.3.2 Humán papillomavírus

A dohányzás és a tüdőrák közötti ok-okozati kapcsolatot bizonyító cikk 1950-ben jelent meg (Doll and Hill, 1950). Ezt követően egy erőteljes dohányzásellenes kampány indult az Egyesült Államokban, amelynek hatására - mintegy 15-20 éves késéssel - a dohányzás indukálta daganatok incidenciája csökkenésnek indult. A fej-nyaki régió tumorainál megfigyelték a gége, az algarat, valamint a szájüregi daganatok gyakoriságának csökkenését. Meglepő módon azonban a szájgarati, azon belül a nyelvgyök és a szájpadli mandulák daganatainak incidenciája nem változott, sőt a 90-es évektől lassú növekedésnek indult, mely folyamat napjainkban is folytatódik (Ang and Sturgis, 2012). Ez a felfedezés intenzív kutatást eredményezett, amelynek egyik mérföldköve volt a 2000-ben, Gillison és munkatársai által publikált cikk, ami bizonyította az oksági összefüggést a humán papillomavírus (HPV) és a fej-nyaki daganatok egy csoportja között (Gillison et al., 2000).

Jelenlegi becslések szerint világviszonylatban az oropharyngeális laphámsejtes daganatok mintegy 18%-áért felelős a HPV (Herrero et al., 2003). Ez az arány országoként eltérő, az Egyesült Államokban valamivel 50% felett van, míg Svédországban 90%-körüli (Nasman et al., 2009).

Az egyéb fej-nyaki régiókban, mint gége, algarat, szájüreg, a HPV-asszociált daganatok aránya jóval kisebb (itt fontos megjegyezni, hogy a nyelvtest a szájüreghez, míg a nyelvgyök a szájgarathoz tartozik).

A primer infekció a legnagyobb valószínűséggel oro-genitális érintkezés útján jön létre, ugyanakkor a közelmúltban leírtak oro-orális terjedésre utaló bizonyítékokat is (D'Souza et al., 2009).

A HPV-infekciótól a fej-nyaki daganat kialakulásáig eltelt idő mintegy 10-15 év (Kreimer et al., 2013).

Ismert, hogy a fej-nyaki régió belül a *high-risk* HPV-infekció predilekciós helye az oropharynx, azon belül a tonsilla palatina és tonsilla lingualis. Egyes elméletek szerint a vírus megtelepedéséhez hozzájárul ennek a két struktúrának a szöveti képe. Mindkét esetben a felszínről betüremkedések, ún. kripták indulnak a mélybe, ahol nyiroksejtek

szűrnek be az epithelialis sejteket. A lymphocytás infiltráció a hámat szabálytalan fészkekre, illetve kötegekre osztja. Az így fellazult, hálószerű szövet neve retikuláris epithelium (Westra, 2012). A fent leírt kriptás felépítés révén a vírus könnyebben jut el a hám bazális sejtrétegéig, ahol képes megfertőzni a sejteket.

Szerotípust tekintve jóval kisebb diverzitás jellemzi a HPV-asszociált szájgarati daganatokat, összehasonlítva a cervix tumoraival: az esetek közel 90%-át a HPV 16 okozza (Kreimer et al., 2005).

A virális géneket két csoportra oszthatjuk: korai és késői génekre, amelyek a vírus életciklusa során eltérő időben átíródó fehérjéket kódolnak. A korai fehérjék (E1, E2, E4, E5, E6 és E7 géntermékek) szerepe a virális genom replikációjának, a géntermékek transzkripciójának szabályozása. Ezzel szemben a késői fehérjék (L1 és L2 géntermékek) a kész vírus összeállításához nélkülözhetetlenek, mivel a kapszid alkotásában vesznek részt. A karcinogenezisben legjelentősebb két protein a virális E6 és E7 fehérje. Az E6 komplexet képez a sejt p53 tumorszupresszor fehérjével, és inaktiválja azt, hozzájárulva ezzel a malignus sejtek egyik alapvető jellemzőjéhez, az apoptózisgátláshoz. Az E7 a retinoblasztóma fehérjét (pRb) inaktiválja. A pRb funkciója az E2F transzkripciós faktorok gátlása. Az E7 fehérje okozta pRb degradáció hatására a sejt fokozott transzkripciót indít meg, fokozódik a proliferációs aktivitása. Mintegy negatív visszacsatolásként, a tumorszupresszor p16 fehérje expressziója fokozódik. Ez utóbbit használjuk ki a diagnosztikában, mint a HPV-infekció alternatív markerét.

#### 2.3.3.3 Egyéb vírusok

Leírták, hogy a szájúregi daganatos betegek szérumban magasabb a *Herpes Simplex Virus* (HSV) ellenes IgM-titer, mint a kontroll alanyok esetében, ami felveti a HSV oki szerepét a fej-nyaki daganatokban. Ez az összefüggés azonban nem bizonyult statisztikailag olyan erősnek, mint a korábban leírt két vírus esetében (Larsson et al., 1991). Az 1983-ban azonosított *Humán Immundeficiencia Vírus* (HIV) - számos más daganatos megbetegedés mellett - növeli mind a szájúregi tumorok, mind a fej-nyaki régióban előforduló non-Hodgkin lymphomák kialakulásának kockázatát (Langford et al., 1995).

### **2.3.4 Foglalkozási ártalmak**

Számos tanulmányban leírták, hogy különböző, foglalkozással összefüggésbe hozható kemikáliák, szerves és szervetlen anyagok fokozzák a fej-nyaki daganatos megbetegedések kockázatát. Fokozott rizikóval rendelkeznek azok az emberek, akik a tisztítószerként alkalmazott tetraklóretilénnel, azbeszttel, rovarirtó szerekkel, policiklusos aromás szénhidrogénnel dolgoznak, valamint a textilgyárakban, faiparban, építkezésen, fémiparban dolgozók (Vaughan et al., 1997), (Gordon et al., 1998).

#### Sugárzás

A korábban elszennvedett sugárhatás (akár terápiás is) a fej-nyaki régióban növeli a nyálmirigy tumorok, szarkómák, és egyéb daganatok kifejlődésének kockázatát (Sale et al., 2004).

### **2.3.5 Táplálkozási tényezők**

Néhány tanulmány szerint bizonyos szájüregi és garat tumorok kialakulása kapcsolatban állhat a magasabb arányú tartósítószer-bevitellel (Farrow et al., 1998), tojás, vörös hús fogyasztásával, bétel dió rágással, valamint a túlzottan alacsony mértékű karotinoid-bevitellel (Garewal and Schantz, 1995). Protektív faktornak tekinthető a vitamin- (főleg E és C), tej-, zöldség- és gyümölcsfogyasztás (Freedman et al., 2008), valamint a daganatmegelőzésben egyre nagyobb szereppel bíró zöld tea rendszeres ivása (Parkin et al., 1999).

### **2.3.6 Genetikai hajlamosító tényezők**

Tény, hogy a dohányzó, illetve nagyobb mennyiségű alkoholt rendszeresen fogyasztó emberek relatíve kis részénél alakul ki fej-nyaki rosszindulatú megbetegedés. Ebből megalapozottnak tűnik az a következtetés, hogy a megbetegedések hátterében valamilyen genetikai fogékonyság, vulnerabilitás megléte valószínűsíthető. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a fej-nyaki daganatos betegek első fokú rokonaiban nagyobb arányban fordulnak elő hasonló megbetegedésben szenvedők, mint a kontroll populációban (Foulkes et al., 1995).

## **3. A fej-nyaki laphámsejtes daganatok kezelése**

A daganatos betegségek kezelésében (így a fej-nyaki tumorok esetében is) 3 nagy modalitást különíthetünk el: a sebészi kezelés, sugárterápia, valamint gyógyszeres



terápia, mely utóbbin belül beszélhetünk „hagyományos” citotoxikus gyógyszerekről, valamint molekulárisan célzott (receptor, enzim, immune checkpoint..stb. gátló) kezelésről.

A sebészi terápia rendkívül sokat fejlődött az elmúlt évtizedekben.

Egyrészt mind a primer tumor, mind a nyaki áttétek kezelésében az onkológiai radikalitás mellett nagy hangsúly került a szerv/funkció megőrzésre, így például a különböző parciális gégereszekciók - megfelelő indikáció mellett - elfogadható funkciót biztosítanak a radikális műtétekkel megegyező túlélési mutatók mellett. A nyaki disszekciók tekintetében is sokat változott a daganatsebészek hozzáállása, a klasszikus, Crile-féle radikális nyaki blokkdisszekciót már meglehetősen ritkán végezzük, helyette a módosított radikális, illetve szelektív nyaki disszekciók kerültek előtérbe. Másrészt a mikrovaszkuláris lebenyek (pl. alkar-, antero-lateralis comblebeny) alkalmazásának fejlődésével a sebészi reszekabilitás határai is jelentősen kitolódtak.

A sugárkezelés a sebészi terápia mellett a másik definitív lokális kezelésnek tekinthető modalitás a fej-nyaki onkológiában. Az esetek döntő többségében teleterápiát alkalmazunk. A 3D konformális besugárzást (3DCRT) kezdi felváltani az ún. intenzitásmodulált sugárkezelés (IMRT), mely mind a mellékhatások, mind a terápiás eredmények tekintetében előnyösebbnek mondható. Lokoregionálisan előrehaladott betegség esetében, a primer definitív terápia során a kezelést kiegészítjük kemoterápiával is (a jelenleg leggyakrabban alkalmazott 7411-es protokollban összesen 3 alkalommal adott cisplatin), ebben az esetben konkomittáns kemoirradiációról beszélünk.

A fej-nyaki rákok citotoxikus kezelése tekintetében a platinaszármazékok (cisplatin és carboplatin), a taxánvegyületek (paclitaxel és docetaxel), az 5-fluorouracil, valamint a másodvonalban alkalmazott metotrexát a legfontosabbak. A definitív lokális kezeléshez viszonyítva beszélhetünk a (kemo)irradiációt, vagy sebészi terápiát megelőző indukciós (neoadjuváns) kemoterápiáról, a sugárkezeléssel együtt alkalmazott, fent már említett konkomittáns kemoirradiációs kezelésről, illetve a sebészi/sugárkezelést követő adjuváns kezelésről.

Jelenleg egy elfogadott célzott terápiás készítmény áll rendelkezésre a fej-nyaki daganatok kezelésében, a *cetuximab* (Erbix). A gyógyszer az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) külső doménje elleni (egér-humán) kiméra monoklonális antitest. Indikációja másodvonalban a lokoregionálisan előrehaladott fej-nyaki daganatok bio-radioterápiája (Bonner-séma szerint), valamint elsővonalban, cisplatinnal

és 5-fluorouracillal kiegészítve recidiv/metasztatikus faj-nyak tumorok kezelése (Extreme-séma).

Több szerrel folynak klinikai vizsgálatok, ezek közül kiemelendő a pan-HER gátló, tirozinkináz-inhibitor *afatinib*, mely recidiv/metasztatikus fej-nyak tumorokban szignifikáns mértékben növeli a progressziómentes túlélést metotrexáttal összehasonlítva (Machiels et al.) Mindenképpen meg kell említeni az immunmoduláns kezelést, (ún. immune checkpoint inhibitors), mely a klinikai vizsgálatok eredményei alapján melanoma malignum mellett egyre több szolid tumorban mutat rendkívül meggyőző eredményeket. A 2015. évi ASCO kongresszuson mutatták be annak a fázis I. vizsgálatnak az eredményeit, melyben recidiv/metasztatikus fej-nyaki daganatos betegeket kezeltek pembrolizumabbal (egy PD-1 receptor gátló), ennek során 24,8%-os objektív válaszdási rátát értek el, emellett mintegy 25%-ban tudtak elérni stabil betegséget (Seiwert TY, 2015).

A fej-nyaki daganatok kezelését többek között a stádium, a lokalizáció, valamint adott esetben a beteg preferenciái határozzák meg.

Korai stádiumú daganatok esetében (T1-2N0M0) primer (mono)terápiaként a sebészi eltávolítás, illetve az irradiációs kezelés jön szóba. A betegek túlélésének tekintetében a két modalitás hatékonysága megegyezik (Grégoire V., 2010).

Lokoreginalisan előrehaladott fej-nyaki daganatoknál (T3-4N0M0 vagy T1-4N1-3M0), kevés kivételtől eltekintve kombinált kezelést alkalmazunk. Ez magában foglalja – lokalizációtól és stádiumtól függően – többek között az indukciós kemoterápiát, a kombinált kemoirradiációs kezelést vagy a primer sebészi terápiát és az azt követő posztoperatív (kemo)irradiációs kezelést.

Recidiv/metasztatikus daganatok kezelésére törzskönyvezett elsővonalbeli terápiaként a kemoterápiával kombinált cetuximab alapú kezelés.

#### 4. A prognózist meghatározó tényezők

Ahhoz, hogy nyilatkozni tudjunk egy kórállapot kimeneteléről, ismernünk kell az adott betegség, a betegségben szenvedő ember bizonyos paramétereit, tulajdonságait, amiket egységesen *prognosztikai faktoroknak* nevezünk. Azokat a markereket, amelyek meghatározzák, illetve valamilyen módon előrevetítik a daganat kezelésre adott választát, *prediktív faktornak* nevezünk. Ezen tényezők ismeretének segítségével egyrészt megítélhető egy daganat agresszivitása, ami segítséget nyújt a kezelőorvosnak a terápia radikalitásának meghatározásában, másrészt megvalósulhat az egyénre szabott terápia: az adott egyénnek/tumornak *megfelelő, adekvát* kezelési mód kiválasztása.

##### 4.1. A beteg személyéhez köthető prognosztikai faktorok

###### 4.1.1 Nem, rassz

Az Egyesült Államokbeli *National Cancer Institute* (NCI) 2007-ben megjelent, több mint 40 000 beteg adatait feldolgozó vizsgálatban az összes fej-nyaki tumoros betegre nézve (kivéve a gégerákos betegeket) az 5 éves túlélés 57% volt. Nemek szerint különválasztva az eredmények a következők voltak: a férfi fej-nyaki daganatos betegek 5 éves túlélése 45%, míg a női betegeké 55% volt. Rasszok szerint külön vizsgálva az adatokat: a túlélés a fehér populációban 60% volt, míg a fekete bőrű (afro-amerikai) lakosságban 40% (Ries LAG, 2007).

A gégerák esetében azonban a férfiak 5 éves túlélése (61%) jobb volt, mint a nőké (58%). A rassz szerinti összehasonlításban a fehér népesség 5 éves túlélése (65%) ebben a betegségcsoportban is jobb volt, mint a fekete bőrű populációé (53%).

A fentiek alapján megfogalmazhatjuk, hogy a fej-nyaki daganatos betegségekben a bőrszín önálló prognosztikai tényező, az afro-amerikai lakosság túlélése kedvezőtlenebb a fehérbőrű népességhez viszonyítva. A nem szintén önálló prognosztikai faktor, eszerint a férfiak 5 éves túlélése a gégerák esetében kedvezőbb, az egyéb fej-nyaki tumorok esetében pedig kedvezőtlenebb a nők 5 éves túlélésénél.

###### 4.1.2 Életkor

Egy 2001-ben megjelent áttekintő tanulmány, amely 273 fő, 75 évnél idősebb fej-nyaki daganatos beteg prognosztikai mutatóit hasonlította össze a fiatalabb betegek adataihoz, megállapította, hogy az életkor *önmagában nem* befolyásolja a fej-nyaki daganatos betegek túlélését (Sarini et al., 2001). A jelenlegi ajánlások szerint az idős betegek esetében sem szabad eltérni a kezelési protokolloktól, és - megfelelő monitorozás

mellett - nem indikált csökkenteni a terápia radikalitásának mértékét, kivéve, ha egyéb kontraindikációk állnak fenn (ld. társbetegségek).

#### **4.1.3 Társbetegségek**

A komorbid megbetegedések, azaz azok az egyidőben fennálló kórállapotok, amelyek nem állnak kapcsolatban a daganatos (alap)betegséggel, szignifikáns mértékben befolyásolják a betegek túlélését (Singh et al., 1998). A fej-nyaki daganatos betegek többségének anamnézisében szerepel az alkoholfogyasztás és a dohányzás, mint káros szenvedély. A bennük diagnosztizálható komorbid elváltozások túlnyomórészt ezzel a két faktorról állnak összefüggésben: a betegek igen gyakran szenvednek szív- és érrendszeri, illetve légzőrendszeri megbetegedésekben (Borggreven et al., 2005). A társbetegségek hatásának kiértékelésénél először a Kaplan-Feinstein indexet (KFI) használták, amit eredetileg cukorbetegség kísérőbetegségeinek regisztrálásához alkottak meg. Ez alapján hozták létre később az ACE 27 (Adult Comorbidity Evaluation 27) rendszert, hogy megfelelően használható legyen daganatos betegek esetében is (Piccirillo, 2000). Ez utóbbi 27 különböző betegséget tartalmaz, amelyek fennállása esetén három fokozatú skálákon kell megjelölni azok súlyosságát.

A másik fontos skála az ún. ECOG-performance státusz, amely 0-tól 5-ig értékeli a beteg állapotát annak munkavégző képessége, ill. ágyhoz kötöttségének tekintetében. A legtöbb klinikai vizsgálatba való bevonás feltétele, hogy a beteg 0 vagy 1 ECOG státuszú legyen.

A társbetegségek egyrészt a daganatos betegség kezelésének megkezdését illetően kérdéshez vezethetnek, másrészt csökkenthetik a beteg toleranciáját a radiokemoterápia toxicitásával szemben, ami a kezelés felfüggesztését eredményezheti.

A kezelés megkezdése előtti alacsony hemoglobinszintről (*anaemia*) megállapították, hogy kedvezőtlen hatása van a lokális tumorkontrollra (magasabb a kiújulási arány), valamint betegek túlélésére. Ennek valószínű oka, hogy az anaemia fokozza a daganat sugárrezisztenciáját (Prosnitz et al., 2005). Ebből kifolyólag megfontolandó lehet a beteg anaemiájának rendezése a kezelés (radioterápia) megkezdése előtt.

#### **4.1.4. Szocioökonómiai státusz**

Több tanulmány is kimutatta, hogy az alacsonyabb szocioökonómiai helyzetű (alacsonyabb évi átlagjövedelem, alacsony iskolázottság) fej-nyakrákos betegek túlélése kedvezőtlenebb az ebből a szempontból jobb helyzetben lévő betegekenél (Leite and Koifman, 1998). Ennek a jelenségnek a legvalószínűbb oka, hogy az ilyen

helyzetű betegek nehezebben férnek hozzá a megfelelő szintű szakorvosi ellátáshoz, egészségnevelésük hiányos, valamint gyakran nem működnek együtt megfelelő mértékben kezelőorvosaikkal a terápia során (alacsony compliance). Mindenképpen törekedni kell a betegek megfelelő szintű és módú felvilágosítására, tájékoztatni kell őket a kezelés lehetséges mellékhatásairól, és igyekezni kell „megnyerni” őket az állapotuknak megfelelő terápiában való részvételre.

#### ***4.1.5. Alkoholfogyasztás és dohányzás***

Legtöbb, a szakirodalomban megjelent adat szerint a dohányzás és alkoholfogyasztás kedvezőtlen módon befolyásolja a fej-nyaki daganatos betegek túlélését (Ribeiro et al., 2000, de Cassia Braga Ribeiro et al., 2003). Ezáltal ezek a káros szenvedélyek nemcsak rizikótényezők, de prognosztikai faktorai is ennek a betegségcsoportnak. A dohányzó és/vagy alkoholt nagy mennyiségben fogyasztó betegekben az átlagosnál jóval gyakrabban alakulnak ki az elsőtől független, ún. második daganatok (Day et al., 1994). A dohányzás továbbá feltehetően fokozza a tumorok rezisztenciáját a sugár-, illetve kemoterápiával szemben (Raybaud et al., 2003).

## **4.2. A betegséggel kapcsolatos prognosztikai faktorok**

### ***4.2.1. A tumor lokalizációja***

Számtalan tanulmány látott már napvilágot arról, hogy miként határozza meg az elsődleges daganat fej-nyaki régió belüli lokalizációja a betegség várható kimenetelét. Részleteikben nem teljesen megegyező eredményekkel ugyan, de mindegyikben megállapították, hogy a tumor elhelyezkedése egy önálló prognosztikai tényező a betegség lefolyásában. Ez több tényezőre vezethető vissza: (a) bizonyos területek (pl. ajak, hangszalag) daganatai jóval hamarabb okoznak tüneteket, így azokat idejekorán felismerik, ellentétben más fej-nyaki tumorokkal, melyeket csak későn, előrehaladott stádiumban diagnosztizálnak; (b) az eltérő lokalizáció eltérő terápiás lehetőségeket jelent, mind a terápiás módszer, mind a radikalitás (R0 reszekció lehetősége) tekintetében; (c) a fej-nyaki régió rendkívül változatos nyirokelvezetése igen eltérő lehetőségeket teremt a daganatok metasztatizálására.

A fent már említett amerikai (NCI) tanulmányban a szájüregi, illetve garattumorok közül - az 5 éves túlélést tekintve - a legjobb prognózisúak az ajak- (94%) és nyálmirigy-tumorok (73%), míg a legkedvezőtlenebb lefolyásúak a hypopharynx daganatai (30%) voltak. A gégen belül egyértelműen a glottis daganatai a legjobb kórjóslatúak, a supra-, illetve subglotticus terület daganatai egyaránt rossz prognózisúak

(Ries LAG, 2007). Az Európában végzett EURO CARE vizsgálat eredményei a fentiekhez hasonlóak (Zigon et al., 2011).

#### **4.2.2. A betegség TNM-stádiuma a diagnózisakor**

A rosszindulatú daganatok stádiumokba sorolását először a 20. század elején kísérelték meg: Steinthal 1905-ben, majd később Paterson 1940-ben készített stádium-rendszert a mellrákhoz. Pierre Denoix, az Union Internationale Contre le Cancer (UICC) elnöke alkotta meg 1943 és 1952 között az ismert TNM-rendszert (Denoix, 1944). Mind az American Joint Committee on Cancer (AJCC), mind a UICC a TNM rendszert használta a stádiumbeosztáshoz, de más besorolási szabályokkal. 1982-ben, a 13. International Cancer Congress-en (Nemzetközi Daganat Kongresszus) azonban egységes stádiumbesorolási rendszert hoztak létre, melyet 1987-ben publikáltak (Hermanek).

A „T” a primer tumorra, az „N” a nyirokcsomó áttétekre, az „M” pedig a távoli áttétekre vonatkozik.

Amennyiben a beosztás a fizikális vizsgálaton, illetve képalkotó eljárásokkal végzett vizsgálatokon alapul, úgy klinikai (c) TNM, amennyiben az elváltozás(ok) kórszövetteni vizsgálatán alapul, úgy patológiai (p) TNM-klasszifikációról beszélünk. Míg előbbi a primer terápia módjának eldöntésében, utóbbi főként az adjuváns terápia megtervezésében játszik szerepet.

A legújabb TNM-klasszifikáció a 7., 2010-ben kiadott változat. Fej-nyaki onkológiai vonatkozásban egy fontos változás történt az előző kiadáshoz képest: korábban a pajzsporcot infiltráló gégerák T4a stádiumúnak számított, az új változatban azonban ha „csak” infiltrálja, akkor T3, míg ha át is töri, akkor T4a besorolású. Megemlítendő továbbá, hogy eltűnt a korábban alkalmazott Mx besorolás (amelyet „ismeretlen” távoli áttét esetén alkalmaztunk), jelenleg csak M0 és M1 beosztás létezik.

Statisztikailag erős összefüggés áll fenn a legtöbb fej-nyaki daganat diagnózisakor megállapított stádiuma és a várható kórjóslat között: minél alacsonyabb stádiumba tartozik a betegség, annál jobb a prognózisa (Ries LAG, 2007).

A jelenleg alkalmazott, TNM-klasszifikáción alapuló stádium-rendszer legfőbb előnye, hogy széles körben elterjedt és viszonylag könnyen alkalmazható a daganatok besorolására. Ugyanakkor sajnos ennek a módszernek is vannak korlátai, hátrányai: (a) Egy adott elváltozás besorolása nagymértékben függ a használt diagnosztikai eszközöktől, azok érzékenységétől, valamint a vizsgáló személytől (intra-observer

variabilitás). (b) A T- és N-klasszifikáció a daganat, illetve az áttét egydimenziós kiterjedését (legnagyobb átmérő) veszi figyelembe, nincs tekintettel a tényleges térbeli kiterjedésre, a térfogatra. Több publikáció jelent meg azonban, amely azt bizonyítja, hogy a primer tumor és a nyaki nyirokcsomó-áttét térfogata jobban korrelál a betegség prognózisával, mint az átmérő (Lodder et al., 2012). (c) A TNM-klasszifikáció alapján meghatározott stádium figyelmen kívül hagy több már azonosított, rendkívül fontos, önálló prognosztikai faktort (komorbiditás, nem, biomarker-pozitivitás..stb.).

#### **4.2.3. A tumor vastagsága**

A primer daganat vastagsága és a nyaki nyirokcsomó-áttétek kialakulásának valószínűsége között szoros összefüggés áll fenn (Gonzalez-Moles et al., 2002). O-charoenrat és munkatársai leírták, hogy amennyiben egy szájüregi daganat mélysége meghaladja az 5 mm-t, úgy valószínűleg (occult) nyirokcsomó áttét már jelen van, és az elektív nyaki disszekciót el kell végezni (O-charoenrat et al., 2003).

#### **4.2.4. Extrakapszuláris terjedés (ECS)**

Fej-nyaki daganatos betegekben az áttéti nyirokcsomó tokját áttörő daganatsejtek jelenléte jól korrelál a lokoregionális kiújulás és a távoli metasztázis kialakulásának valószínűségével, és nagymértékben rontja a betegek túlélését. Woolgar és munkatársai egy 173 szájüregi daganatos beteg adatait feldolgozó tanulmányban közölték, hogy nem találtak szignifikáns különbséget a makroszkóposan (azaz szabad szemmel is jól látható), illetve a csak mikroszkóposan detektálható, extrakapszuláris terjedést mutató nyirokcsomó-áttéttel rendelkező betegek 3-éves túlélései között. (A 3-éves túlélések makroszkópos, mikroszkópos ECS, illetve intranodális terjedés esetében: 33%, 36% és 72%) (Woolgar et al., 2003). A jelenleg érvényben lévő NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ajánlás alapján, ha a nyaki blokkdisszekátumban ECS igazolható, úgy a betegnek posztoperatív (kemo)radioterápiában kell részesülnie (Network).

#### **4.2.5. A daganat differenciáltsági foka (grade)**

Egyes szerzők szignifikáns összefüggést találtak a fej-nyaki tumorok szövettani differenciáltsága és a betegség prognózisa között. Eszerint minél éretlenebb egy daganat (ezáltal minél magasabb a grade), annál valószínűbb a metasztatizálás valószínűsége, és annál rosszabb a várható túlélés (Takes, 2004). Más szerzők szerint azonban nincs összefüggés a grade és a prognózis között (Leite and Koifman, 1998). E diszkrépancia valószínű magyarázata, hogy a szerzők, illetve munkacsoportjaik eltérő grade-

rendszereket használtak, így a kérdés megválaszolásához még további vizsgálatokra van szükség.

#### **4.2.6. A gyulladáshoz való reakció mértéke**

A tumoros folyamat által kiváltott lokális gyulladás mértéke a gazdaszervezet reakcióját tükrözi a daganattal szemben. A lokális gyulladáshoz való reakció mértéke és a nyirokcsomó-metasztázis jelenlétének valószínűsége között erős pozitív összefüggést írtak le (Takes et al., 1997). Kimutatták továbbá, hogy az eozinofil infiltráció jelenléte a daganatszövetben nem korrelál ugyan az áttétképzés valószínűségével, de a betegek túlélését kedvezően befolyásolja (Lowe and Fletcher, 1984).

#### **4.2.7. A tumor szövettani típusa**

A legtöbb fej-nyaki daganat a már korábban részletezett konvencionális laphámsejtes karcinóma (CSCC) típusba tartozik. Ennek a szövettani típusnak igen magas a metasztatikus potenciálja, a betegség prognózisa rossz. Jóval ritkább típusok a verrukózus karcinóma (VC), valamint a bazaloid laphámsejtes karcinóma (BSCC). Az előbbivel kapcsolatban elfogadott álláspont, hogy prognózisa igen kedvező, melynek valószínű oka, hogy ritkán ad metasztázist. Hajlamos azonban a lokális kiújulásra, ezt a tényt kezelésénél figyelembe kell venni (Addante and McKenna, 2006). A bazaloid altípust a HPV infekcióval hozzák összefüggésbe, habár jelentek meg tanulmányok HPV-negatív bazaloid laphámrákokról (Begum and Westra, 2008). Az a kérdés, hogy önmagában a bazaloid megjelenési forma (függetlenül a HPV-státusztól) jobb prognózisú-e, még vitatott (Ang and Sturgis, 2012).

A többi altípussal kapcsolatban (orsósejt-szerű, adenozkvamózus, akantolítikus karcinóma) ritkaságuk miatt még nem készültek átfogó tanulmányok, így prognózisbeli tulajdonságaik még nagyrészt ismeretlenek.

#### **4.2.8. Éréjdonképződés (angiogenesis) mértéke a tumorszövetben**

A rosszindulatú daganatok egyik sajátossága, hogy képesek indukálni új erek képződését. Ez a jelenség egy fontos tényező a tumor progressziójában és az áttétképzésben. Az angiogenesis mértékének meghatározásához a legegyszerűbb módszer a malignus szövetből vett szövettani metszeten lévő erek - immunhisztokémiai festés után történő - számolása (Ezen alapul az MVD - microvessel density és a Chalkey-módszer is).



A fej-nyaki daganatokban kimutatható angiogenesis mértéke és a betegség prognózisa között összefüggés mutatkozik: a fokozott érújdonképződés növeli a metasztázisok kialakulásának valószínűségét (Shpitzer et al., 1996).

#### ***4.2.9. Késlekedés a terápia megkezdésében***

Tekintve, hogy az előrehaladott állapotú fej-nyaki daganatos betegek túlélési mutatói jóval kedvezőtlenebbek a korai stádiumú betegeknél, a diagnózist követően a lehető legrövidebb időn belül el kell kezdeni a kezelést. Amennyiben a kórisme és a terápia megkezdésének időpontja között több idő telik el, a daganat tovább fejlődhet, (új) metasztázisok jelenhetnek meg, így a betegség stádiuma magasabbá válhat (upstaging). Ennek természetesen hatása van a prognózisra (ld. a stádiumbeosztás és a túlélés kapcsolatánál), és a tervezettől eltérő terápiás eljárást tehet szükségessé.

Egy tanulmányban, melyben azt vizsgálták, hogy mennyi idő kell a fej-nyaki daganatos betegségeknek az upstaging bekövetkeztéhez, azt találták, hogy korai (lokalizált) stádiumú elváltozások lokoregionálisan előrehaladottá válásához szükséges idők mediánja 11,3 hónap volt. Az előrehaladott állapotú betegségek és az inkurábilis állapotok közötti idők mediánja 3,8 hónap volt, míg ez utóbbi állapotból a betegek haláláig eltelt idők mediánja 4 hónap volt. A szerzők megállapították, hogy a késlekedés a terápia megkezdésében szignifikánsan rontotta a betegség prognózisát (Kowalski and Carvalho, 2001).

#### ***4.2.10. Tumorsejtek távolsága a reszekciós széltől***

A kuratív onkológiai sebészet egyik alapvető szabálya a daganat épben (ép szövetben) történő kimetszése. A reszekciós szél tumoros pozitivitása a fej-nyaki daganatok esetében (is) jelentős mértékben növeli a lokális kiújulás esélyét, és csökkenti a túlélési időt (Loree and Strong, 1990). Ahhoz, hogy szignifikáns mértékben javuljon a prognózis, és csökkenjen a kiújulás esélye, legalább 5 mm-es daganatmentes szövetnek kell körülvennie a malignus elváltozást (Johnson et al., 1997). Ennek érdekében javasolt a (legalább) 10 mm-es épszövet-szegéllyel történő kimetszés alkalmazása a fej-nyaki daganatok sebészi kezelésénél. Amennyiben nem ítéhető meg biztonsággal, hogy az elváltozás eltávolítása kellő radikalitással történt, intraoperatív gyorsfagyasztás és azonnali hisztopatológiai kiértékelés segíthet annak eldöntésében, hogy szükséges-e további szövetet reszekálni. Ha a reszekciós szél nem negatív, és nem lehetséges (megfelelő funkcionalitás mellett) több szövetet eltávolítani, akkor posztoperatív radioterápiát, illetve radiokemoterápiát kell alkalmazni.

### 4.3. Sejt- és molekulárbiológiai faktorok

#### 4.3.1. Humán papillomavírus-státusz

2010-ben Kie Kian Ang és munkatársai állapították meg 743 oropharyngealis daganatos beteg vizsgálata után (az RTOG 0129 vizsgálat adatainak feldolgozásával), hogy a HPV-pozitív fej-nyaki daganatok nemcsak patogenezist, de prognózist tekintve is önálló entitást képeznek: azok a betegek, akik tumorában detektálható a HPV DNS-e lényegesen jobb túlélésre számíthatnak, mint a HPV-negatív daganattal rendelkező páciensek (Ang et al., 2010). A dohányzás azonban ebben az esetben is kedvezőtlen hatással van a kórjóslatra, tehát azok a betegek, akiknek HPV-pozitív daganatuk van, és emellett dohányoznak, rosszabb túléléssel rendelkeznek, mint a nem dohányzó, HPV-pozitív betegek. A TAX 324 fantázianevű vizsgálatban 80 hónapos követési idő után a vizsgálatba bevont HPV-pozitív fej-nyaki tumoros betegek 79%-a volt életben, míg a HPV-negatív betegek mindössze 31%-a (Ang and Sturgis, 2012).

A kedvezőbb túlélés több tényezővel magyarázható. A HPV-pozitív daganatokban megfigyelhető az E6 és E7 virális onkoproteinek expressziója. Az E6 a p53 tumorszuppresszor fehérje funkcióját gátolja, de a p53-at kódoló gén nem változik meg, vad típusú marad. Az E7 a retinoblasztóma proteint (pRb) gátolja, szintén fehérjeszerkezeti szinten, a gén „intaktsága” mellett. Egyrészt elképzelhető, hogy a virális proteinek jelenléte növeli a daganat immunogenitását (a HPV-pozitív daganattal rendelkező betegekben szerológiailag kimutatható az anti-E6 és E7 antitestek jelenléte). Másrészt, mivel a fő tumorszuppresszor gének nem változnak meg (ellentétben a HPV-negatív, dohányzás és alkohol indukált daganatokban) a virális proteinek degradálódását eredményező terápia „felszabadítja” a daganatképződés-ellenes proteineket, és a tumorban megindulhat az apoptózis folyamata. Érdekes és fontos megfigyelés továbbá a p16 tumorszuppresszor gén expressziójának fokozódása a HPV-pozitív tumorokban, amely szintén éles kontrasztban áll a HPV-negatív daganatokban észlelt csökkenéssel. A fentiek alapján a HPV-negatív tumorok jellemző bimarker profilja: emelkedett (mutáns) p53, alacsony p16 és emelkedett pRb szint, míg a HPV-pozitív tumorok esetében ez a következőképpen alakul: alacsony p53, emelkedett p16 és alacsony pRb szint.

A HPV-eredet igazolásának gold standardja a virális géntermékek átírásának kimutatása (E6/E7 mRNS kimutatás), qRT-PCR (reverz transzkripció, kvantitatív polimeráz láncreakció) technikával, azonban ez az eljárás igen költséges, és fixált szöveten nem,

vagy csak nehezen alkalmazható (Smeets et al., 2007, Jordan et al., 2012). A jelenlegi ajánlás alapján az elsődleges szűrést p16 immunhisztokémiával végezzük, amely módszernek 80-85%-os specificitása van, ugyanakkor 100%-os a szenzitivitása. Ez utóbbi technika jóval olcsóbb, és egyszerűen ivitelezhető, így a klinikai (patológiai) gyakorlatban elterjedhet. A p16-pozitív esetek HPV-eredetét in situ hybridizációs eljárással, vagy HPV (DNS) PCR technológiával erősíthetjük meg (Adelstein et al., 2009).

A fenti prognosztikai adatok vezettek olyan, jelenleg zajló klinikai vizsgálatok tervezéséhez, amelyekben azt vizsgálják, hogy a HPV-pozitív daganatok kevésbé agresszív terápiára is megfelelően reagálnak-e. A terápiás toxicitás csökkentését megcélzó vizsgálatok közül kiemelendő a csökkentett dózisú sugárkezelés hatékonyságának összevetése standard dózisú sugárkezelésével, valamint cisplatin alapú kemoirradiációs kezelés összevetése cetuximab alapú bioradioterápiával a lokoregionális kontroll és túlélés tekintetében (ECOG 1308 és RTOG 1016 klinikai vizsgálatok).

A jelenlegi ajánlások alapján azonban (megfelelő szintű evidenciák hiányában) molekulárbiológiai markerek egyelőre nem játszanak, nem játszhatnak szerepet a terápiás döntés meghozatalában, csak és kizárólag klinikai vizsgálat keretein belül. Ezekből kifolyólag a HPV-státusz alapján sem megengedett a fej-nyaki daganatos betegek standard terápiától eltérő kezelése.

#### ***4.3.2. Onkogének expressziója (EGFR, Ciklin D1)***

A protoonkogének fiziológiás, döntően a jelátvitelben részt vevő molekulák, működésüket tekintve növekedési faktorok, receptorok és transzkripciós faktorok. Aktiválódásuk esetén, azaz egy vagy több génhiba megjelenésekor keletkeznek belőlük az onkogének. A protoonkogének aktiválódása létrejöhet új termék keletkezésével (pl. pontmutáció, leolvasásikeret-eltolódás következtében), vagy a „normális termék” nem megfelelő időben és/vagy mennyiségben való termelődésével (pl. amplifikáció következtében).

#### **EGFR**

Az epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR) egy transzmembrán fehérje, amit fiziológiásan az EGF (Epidermal Growth Factor) vagy a TGF (Transforming Growth Factor) aktivál. Normális működése során

részt vesz a sejtproliferációban, differenciálódásban és a migrációban. A daganatsejtekben azonban ez a fehérje szerepet játszik a kóros proliferációban, az apoptózis gátlásában és a metasztázis-képzésben is. A EGFR-expresszió mértékéről bebizonyosodott, hogy egy önálló prognosztikai faktor a fej-nyaki daganatokban. Mind a fokozott EGFR-termelés, mind az emelkedett génkópia-szám egyaránt negatív prediktorai a teljes túlélésnek (Ang et al., 2002). Hazai kutatók vizsgálataikban azt találták, hogy az emelkedett génkópia-számmal szemben az EGFR fokozott aktivitása kedvezőbb prognózisra utal (Szabo et al., 2011).

Annak ellenére, hogy az EGF receptor expressziója a fej-nyaki daganatok mintegy 80-90%-ában kimutatható, az EGFR ellenes monoklonális antitest *cetuximab* alkalmazása az EGFR-pozitív fej-nyaki daganatoknak csak egy részénél mutat jelentős eredményeket (a Bonner-vizsgálatban *cetuximab* hozzáadása a sugárkezeléshez 64-ről 74%-ra emelte az objektív válaszadási rátát, míg az Extreme vizsgálatban a készítmény hozzáadása a platina + 5-fluorouracil terápiához 20-ról 36%-ra növelte a válaszadási rátát) (Bonner et al., 2006, Vermorken et al., 2008).

A target-terápia elleni rezisztenciának több oka lehet, így például EGFR génjének egy trunkált külső domént eredményező specifikus mutációja (EGFRvIII) (Sok et al., 2006). Rezisztenciához vezethet még az EGFR-ről induló, legjelentősebbnek tartott szignáltranszdukciós kaszkád, a RAS-RAF-MEK-ERK útvonal tagjainak aktiváló mutációja (pl. HRAS mutáció), vagy egyéb, ezzel párhuzamos kaszkádok aktivációja (PI3K-AKT-mTOR) (Rampias et al., 2014).

#### Cyclin D1

Fiziológiásan a sejtciklus G1-S átmenetét szabályozó Cyclin D1 molekula overexpressziójáról és amplifikációjáról is bebizonyosodott, hogy önálló prognosztikai jelentőségük van a fej-nyaki daganatokban kórlefolyásában (Miyamoto et al., 2003). Az emelkedett Cyclin D1-szintet összefüggésbe hozták a regionális nyirokcsomó-metasztázisok kialakulásának fokozott kockázatával, így az előrehaladott stádiummal is.

#### PI3K

A foszfatidil-inozitol 3-kináz a lipid-kinázok csoportjába tartozó szignáltranszdukciós enzim, mely a PI3K/Akt/mTOR útvonalon keresztül részt vesz a differenciációban, proliferációban, ill. migrációban. Egyes elméletek szerint ennek az útvonalnak a fokozott aktivitása tehető felelőssé az anti-EGFR terápia szembeni rezisztenciáért. A

közelmúltban írták le, hogy fej-nyaki tumorokban, elősorban a HPV-pozitív tumorokban fordul elő mutációja (The Cancer Genome Atlas, 2015).

#### MET

A MET, más néven c-MET vagy hepatocita növekedési faktor receptor egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező membránreceptor, amelynek fiziológias ligandja a hepatocita növekedési faktor (HGF). Kóros aktivációja daganatokban rossz prognózissal társul, szerepet játszik a tumor növekedésében, új erek létrehozásában, valamint a távoli áttétek kialakításában. (Gentile et al., 2008)

#### **4.3.4. Tumorszupresszorok inaktiválódása (p53, p21)**

A szupresszorgének legfontosabb funkciója a proliferáció gátlása. Érinthetik a jelátvitelt, a proliferáció szabályozását, a genom épségének őrzését, a génhibák kijavítását vagy az apoptózis indukálását.

#### p53

A p53 legfontosabb funkciója annak megakadályozása, hogy a kijavítatlan génhibákat a sejtek az utódsejteknek továbbadják - ezért nevezik a p53-at a genom őrzőjének. Egyrészt képes leállítani a sejtciklust a G1 fázisban, lehetőséget (és időt) teremtve a hiba kijavítására, másrészt aktiválhatja az apoptózis programját abban az esetben, ha a hibát nem sikerül kijavítani. Funkciózavarának oka lehet a p53 génjének mutációja, valamint a normális p53 fehérje inaktiválódása. Az inaktiválódást okozhatja a mutáns p53 (komplexet képezve a vad típusú fehérjével), de okozhatják virális fehérjék is (ld. feljebb a HPV-fehérjék leírásánál).

Az alkoholfogyasztás, illetve dohányzás asszociált fej-nyaki daganatokban igen gyakori a p53 funkciójának génmutáció okozta kiesése (Brennan et al., 1995). Egyes vizsgálatok szerint a mutáns p53 jelenléte szignifikáns mértékben rontja a betegek túlélését, valamint a daganat neoadjuváns kemoterápiára adott válaszát, továbbá valószínűleg összefüggésben áll a magasabb metasztatikus potenciállal (Poeta et al., 2007, Temam et al., 2000, Tamas et al., 2000).

#### p21

A ciklin-dependens kináz inhibitor p21 a WAF1, illetve CIP1 gének terméke. Expresszióját a p53 fehérje fokozza azáltal, hogy a p21 génjének promoter régiójához kötődik. Expressziójának mértéke fordítottan arányos a T-értékkel, valamint a

stádiummal. A p21 termelő tumorról rendelkező betegeknek magasabb a betegség-specifikus túlélésük (disease-specific survival) (Xie et al., 2002).

#### 4.3.5. ERCC1

Az ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) fehérje a platina alapú tumorellenes szerek okozta DNS-károsodás kijavításában játszik kulcsfontosságú szerepet. A fej-nyaki tumorok 60-70%-ában kimutatható a ERCC1 fokozott termelődése. Kimutatták, hogy a fehérje expresszója egy önálló prognosztikai faktor: a fokozott ERCC1-termelő tumoros betegek túlélése szignifikánsan alacsonyabb, mint az alacsony ERCC1-expressziójú tumoros betegeké (Jun et al., 2008).

In vitro kísérletekkel bizonyították, hogy az ERCC1 aktivitásának gátlásával növelhető a sejtek ciszplatin-szenzitivitása (Chang et al., 2005). Cobo és munkatársai által végzett randomizált klinikai vizsgálatban, tüdőrákos betegeknél azt találták, hogy az alacsony ERCC1-expressziójú daganatos betegek szignifikáns mértékben jobban reagáltak ciszplatin alapú terápiára, mint a magas ERCC1-expressziójú tumoros betegek (Cobo et al., 2007). Egy 96 fej-nyaki daganatos beteget érintő vizsgálatban azt találták, hogy az immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva *alacsony* ERCC1-expressziójú tumorok mintegy négyszer nagyobb eséllyel reagáltak ciszplatin-alapú kezelésre, mint a magas ERCC1-expressziójú daganatok (Handra-Luca et al., 2007).

#### 4.3.7. $\beta$ -tubulin

A  $\beta$ -tubulin a citoskeleton mikrotubulusainak alkotásában vesz részt, valamint feltehetőleg szabályozza a mitokondriális membrán permeabilitását. A fehérje a taxánok csoportjába tartozó daganatellenes szerek (paclitaxel, docetaxel) elsődleges támadáspontja. A kemoterápiás szerek hatására a mikrotubuláris rendszer stabilizálódik, felfüggesztődik a mitotikus és szekréciós tevékenység, a sejtek elpusztulnak. In vitro vizsgálatokból azonban kiderült, hogy a magas  $\beta$ -tubulin expresszió fokozza a ciszplatin ellenes rezisztenciát is (Cullen et al., 2009).

A TAX 324 fázis-3 vizsgálatból kiderült, hogy fej-nyaki daganatokban immunhisztokémiai módszerrel kimutatott alacsony szintű  $\beta$ -tubulin expresszió a betegek megnövekedett progressziómentes, illetve teljes túlélésével jár együtt, a fehérjét fokozottan expresszáló csoportokhoz viszonyítva.

További eredményei a vizsgálatnak, hogy a  $\beta$ -tubulin-t alacsony mértékben expresszáló daganatos betegben a docetaxel hozzáadása az indukciós kezelés során alkalmazott szerekhez (5-FU és ciszplatin) jelentős mértékben növeli a túlélést. A  $\beta$ -tubulin

felülexpressziót mutató daganatok esetében azonban nincs különbség a docetaxellel, illetve anélkül végzett indukciós kezelések között a túlélés tekintetében (Cullen et al., 2009).

#### **4.3.8. Glutation-S-transzferáz $\pi$**

A glutation egy tripeptid, melynek feltételezett funkciója a DNS védelme az azt károsító behatásoktól, így például az oxigén szabadgyököktől, valamint a DNS-támadáspontú kemoterápiás szerektől. A glutation-S-transzferáz (GST) enzimek katalizálják a glutation citotoxikus szerekhez való kötődését, ezáltal azoknak a sejtől való eltávolításukat. A fej-nyaki daganatokban előforduló legjelentősebb GST izoform a GST $\pi$ . Kimutatták, hogy a GST $\pi$  fokozott expressziója negatív prediktora a túlélésnek fej-nyaki daganatos betegek esetében. Azt is leírták továbbá, hogy részben a GST $\pi$  expresszió felelős a fej-nyaki daganatok ciszplatin-rezisztenciájáért (Shiga et al., 1999).

#### **4.3.10. Sejtproliferációs aktivitás**

A daganat proliferációs aktivitásának mérésére több eljárás is rendelkezésre áll (Pich et al., 2004): Az ún. *növekedési frakció markerei* közé tartozik a Ki67 (illetve MIB-1) antitest, amivel az aktív, nem G0 fázisban lévő sejteket detektálhatjuk. A sejtciklus *fázisspecifikus markerei* többek között az SPF (S-phase fraction - S-fázis-arány), melyet detektálhatunk többek között bromdeoxyuridinnel, áramlási citometriával, illetve PCNA (proliferating cell nuclear antigen) immunhisztokémiával. Szintén fázisspecifikus az M-fázis arány, mely egyszerűen kalkulálható a jelen lévő mitotikus alakok számolásával. A *ciklusidő* számolására az egyik legpontosabb módszer az ún. AgNOR-érték (argyrophilic proteins associated with the nucleolar organizer regions) használata. A mozaikszó olyan ezüsttel festhető fehérjéket jelöl, melyek a DNS-hez kötődve a nukleolusz alkotásában vesznek részt. Az AgNOR-érték és a proliferáció gyorsasága között nagyon szoros összefüggés áll fenn: minél magasabb ez a szám, annál gyorsabb a proliferáció.

Még nem született konszenzus arról, hogy fej-nyaki daganatos sejtek proliferációjának mértéke és a betegség prognózisa között van-e összefüggés. A vizsgálatok többsége azonban megállapította, hogy a korreláció fennáll: a magasabb proliferációs aktivitás kedvezőtlen hatással van a terápiás válaszkészségre és a túlélésre. Érdekes tanulmányt jelentetett meg egy német munkacsoport: vizsgálataik szerint a tumor invazív széli részén mérhető AgNOR-érték és a betegek teljes-, illetve betegségmentes túlélése között erőteljes statisztikai összefüggés áll fenn. A kutatás a proliferációs aktivitás



mellett az invazív szél prognózisban játszott szerepét is hangsúlyozza (Piffko et al., 1997).

A gyorsan és kontrollálatlanul osztódó daganatos sejtek gyakran eredményeznek a normális DNS-tartalomtól eltérő aneuploid állapotot. Több szerző is elismeri a ploidotást a fej-nyaki daganatok önálló prognosztikai faktoraként. A legtöbb tanulmányban az aneuploiditás nyirokcsomó-metasztázis jelenlétének magasabb valószínűségére és kedvezőtlen kórlefolyásra utal (Massano et al., 2006).

Hazai kutatók azt találták, hogy magasabb S-fázis arány esetén a daganatok sugárrezisztenciája magasabb a kontrollhoz viszonyítva. Alacsonyabb S-fázis arány és poliploid frakció (PF) esetén nagyobb teljes, valamint metasztázismentes túlélést találtak, mint magas SPF, illetve PF értékű daganatok esetében (Kraxner et al., 2001, Tamas et al., 2000).

#### **4.3.11. Ciklooxygenáz-2 expresszió**

Erős összefüggést találtak a közelmúltban a fej-nyaki daganatok 2-es típusú ciklooxygenáz enzim (COX-2) expressziója és a magasabb kiújulási arány, így a rövidebb betegségmentes túlélés (disease-free survival) között (Itoh et al., 2003). Az emelkedett COX-2 expresszió kimutatható volt a tumorok invazív frontjában elhelyezkedő sejtek citoplazmájában, a körülöttük lévő stromában és erekben. Ez a megfigyelés arra a következtetésre vezetett, hogy az enzim elsősorban a tumoros invázióban és a metasztázis-képzésben játszik szerepet (Thomas et al., 1999). Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy a fokozott COX-2 termelés összefüggésben áll a daganatok rezisztenciájával a sugárkezeléssel szemben. Ugyanakkor ha a daganatokat in vitro COX-2 gátlókkal kezelték, javult a tumorok radioterápiára adott válasza (Terakado et al., 2004).

#### **4.3.12. Connexinek**

A connexinek connexonokba rendeződve vesznek részt a réskapcsolatok (gap junction) alkotásában. A gap junction-ok a sejt homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet azáltal, hogy lehetővé teszik kis molekulák és ionok transzmisszióját (Sohl and Willecke, 2004). Jelenleg 21 izoformájuk ismert. A közelmúltban vált ismertté, hogy több daganattípusban csökken az expressziójuk, és sejtvonalakon végzett kutatások



során az expresszió mesterséges fokozása a normál fenotípus helyreállítását eredményezi. Vese és emlőrákban ismert, hogy a csökkent connexin-expresszió rosszabb prognózissal társul. (Naus and Laird, 2010)

### **3. Célkitűzések**

Mind az irodalmi adatokból, mind saját klinikai tapasztalatunk során azt láthatjuk, hogy ugyanazon régióból kiinduló, azonos stádiumú fej-nyaki daganatok között jelentős különbségek lehetnek mind a túlélés, mind a terápiára adott válasz tekintetében. Kutatásunk célja volt olyan prognosztikai markerek azonosítása, melyek alapján megítélhető a tumor agresszivitása, és segítséget nyújthat a megfelelő terápia kiválasztásában.

1. Annak vizsgálata, hogy biomarker-expressziós szempontból egységesnek tekinthetők-e a fej-nyaki daganatok;
2. A Ki67 fehérje és a túlélés, illetve a betegség progressziója közötti összefüggés vizsgálata;
3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve a hepatocita növekedési faktor-receptor (c-MET) citogenetikai eltérései összefüggenek-e a daganatos betegség stádiumával;
4. A connexin 43 (Cx43) fehérje expressziójának vizsgálata fej-nyaki daganatokban.

## 4. Módszerek

### 1. Adatgyűjtés, betegek

A vizsgált minta a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház Fül-Orr-Gégészeti osztályán, 2000-2008 között kezelt fej-nyaki daganatos betegek közül lettek kiválasztva. A vizsgálatból kizárásra kerültek: a nyálmirigy daganatos betegek, nasopharyngealis karcinómában szenvedő betegek, illetve egyéb, nem laphámsejtes rákos betegek. A szövetminták a kórház patológiáján tárolt, formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkok voltak. A klinikai adatokat a kórház medikai rendszeréből, illetve a kórlapokból regisztráltuk.

1. Az első kohorszban 226 beteg szerepelt (177 férfi, 49 nőbeteg), átlagéletkoruk 58 (36-89) év volt. A primer terápia 124 beteg esetében sebészi, míg 102 beteg esetében irradiációs kezelés volt. Az anatómiai megoszlásokat az 1., a daganatok stádiumait a 2. táblázat tartalmazza.

2. A második kohorszba a csak irradiációs kezelésben részesült betegek kerültek. Számuk 90 volt, átlagéletkoruk 57 év volt (36-85). Lokalizációbeli megoszlásukat a 3., stádium szerinti megoszlásukat a 4. táblázat tartalmazza.

**1. Táblázat** Az első kohorszban lévő betegek tumorának anatómiai elhelyezkedése

<b>Lokalizáció</b>	<b>No.</b>	<b>Százalék</b>	
Cavum oris	12	5,3%	
Oropharynx	69	30,6%	
Hypopharynx	43	19%	
Larynx	supraglotticus	42	18,5
	glotticus	43	19%
	transglotticus	17	7,6

**2. Táblázat** Az első kohorszban lévő betegek tumorának stádiumbeosztása

<b>Stádium</b>	<b>Százalék</b>
I.	16%
II.	12,3%
III.	24,2%
IV.	47,5%

**3. Táblázat** Az irradiációs kezelésben részesült betegek tumorának anatómiai elhelyezkedése

<b>Lokalizáció</b>	<b>No.</b>	<b>Százalék</b>	
Cavum oris	5	5,5%	
Oropharynx	38	42,2%	
Hypopharynx	29	32,2%	
	supraglotticus	13	14,4%
Larynx	glotticus	4	4,4%
	transglotticus	1	1,1%

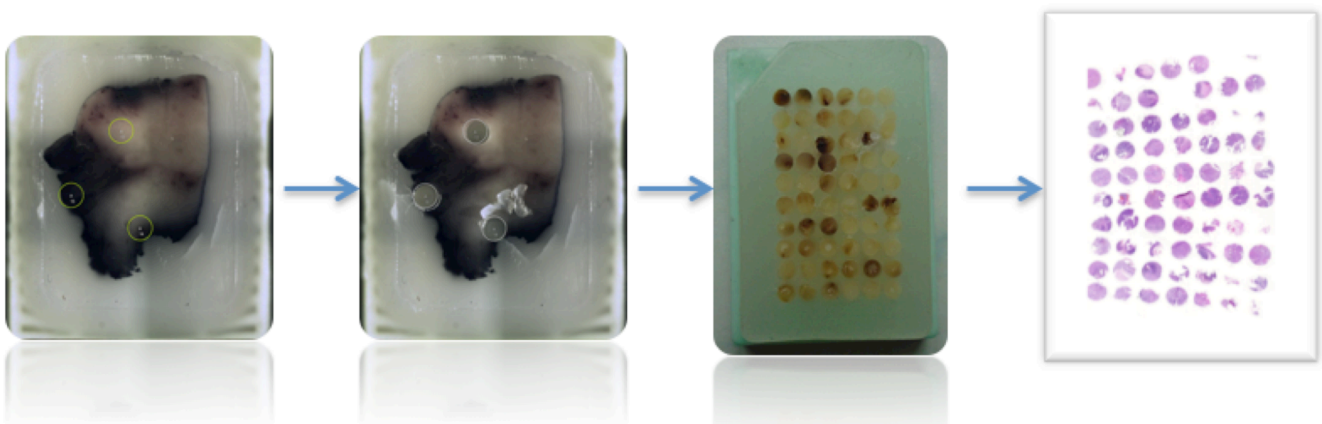
**4. Táblázat** A második kohorszban lévő betegek tumorának stádiumbeosztása

<b>Stádium</b>	<b>Százalék</b>
I.	1,1%
II.	5,3%
III.	26,3%
IV.	67,4%

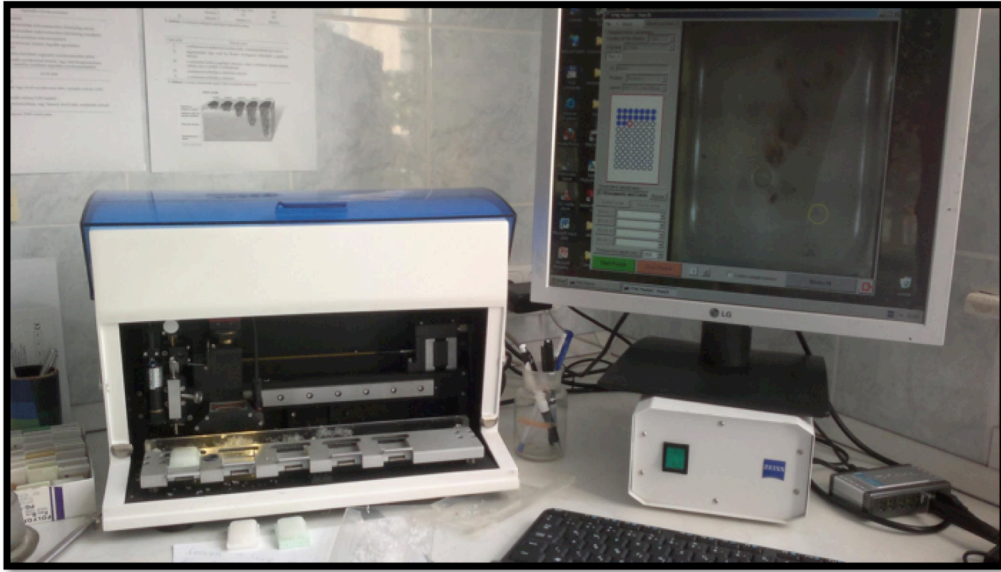
## 2. A szövetminták feldolgoása

A vizsgálatokhoz a betegek tumorából készült, formalin-fixált, paraffinba ágyazott blokkokat használtuk fel. Az eredeti blokkhoz tartozó hematoxilin-eozin metszeten azonosítottuk a daganatszövetet, illetve a legmagasabb daganatsejt-arányú területeket, és ezekből készítettünk ún. szöveti mikrochipeket (TMA - Tissue Microarray). Az eljárás lényege, hogy egyetlen paraffin blokkba ágyazunk több tíz (mérettől függően akár több száz) reprezentatív (tumor) mintát. Az ebből készült metszeteken igen költséghatékonyan végezhetünk immunhisztokémiai, illetve bizonyos molekulárbiológiai vizsgálatokat (Jawhar, 2009).

A blokkok elkészítését a 3DHISTECH (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) cég TMA Master eszközén végeztük. 7x10-es méretű TMA blokkokat készítettünk, melyen minden minta 2 mm átmérőjű volt. A lemetszést követően a metszeteink vastagsága 4  $\mu\text{m}$  volt.



**1. ábra:** A TMA metszet elkészítésének folyamata: Az eredeti (donor) blokkon azonosítjuk a tumorszövetet (a hozzá tartozó hematoxilin-eozin metszet segítségével), a TMA Master készülék alkalmazásával a kiválasztott területről egy szövethengert emelünk ki, melyet egy új blokkba (TMA blokk) implantálunk. Ezt követően erről készítünk metszeteket, az utolsó kép egy ilyen blokkról készült hematoxilin-eozin metszetet ábrázol.



**2. ábra:** A TMA Master készülék működés közben.

### 3. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a 4 µm vastagságú TMA metszeteken végeztük. Első lépésben a metszetek deparaffinálását végeztük el xilol, illetve alkohol sorral. Ezt követte az endogén peroxidázok blokkolása 15 percen keresztül, 3%-os hidrogén-peroxid oldattal. Az antigénfeltárást Tris-EDTA pufferben (pH: 9,0) végeztük 50 perces melegítés során. Az indifferens fehérjék blokkolása 5%-os BSA-azidban történt. Következő lépésben metszetet egyenletesen fedtük az 5%-os BSA-azidban megfelelően kihígított primer antitest oldattal, majd éjszakára párasító állványokban hagytuk inkubálódni a metszeteket. A primer antitestek tulajdonságait az 5. táblázat tartalmazza. 16 óra elteltével felhelyeztük a poszt-primer antitesteket (30 percig), majd a szekunder antitestként alkalmazott Novolink Polymer rendszert szintén 30 percre. Kromogénként UltraVision DAB festést használtunk. Ezt követően magfestést végeztünk hematoxilin-eozin felhasználásával.

A metszeteket digitalizáltuk a Panoramic Scan készülékkel (3DHISTECH, Budapest, Magyarország), azok kiértékelése számítógépen, a Panoramic Viewer szoftverrel történt.

A kiértékelést 3, egymástól független elemző végezte. Azok a szövetminták kerültek kiértékelésre, ahol legalább 200 tumorsejt, illetve 3 tumorfészek volt látható. Festődés szerint a tumorokat 4 kategóriába soroltuk: negatív - kevesebb, mint 5%-os tumorsejt festődési arány, enyhe - 6-20%-os festődés, közepes - 21-60%, és erős: 60%-nál magasabb festődési arány. A dichotomizáláshoz a legjobbnak a negatív-enyhe, illetve közepes-erős festődés szerinti csoportosítás bizonyult.

**5. táblázat:** A használt antitestek tulajdonságai

Név	Cx43	p53	p21 <sup>WAF1</sup>	Aurora A	Geminin	Ki67	p16 <sup>ink4</sup>	EGFR
<b>Gyártó</b>	Cell Signaling	Novocastra	DAKO	Cell Signaling	Leica Novocastra	DAKO	LabVision-Thermo	Ventana-Roche
<b>Hígítás</b>	1:100	1:400	1:150	1:80	1:150	1:1	1:400	1:1

#### 4. Fluorescens in situ hybridizáció (FISH)

A FISH vizsgálatokat a 4 µm vastagságú, natív TMA metszeteken végeztük. Az immunhisztokémiához hasonlóan, itt is első lépésben deparaffinálást, illetve rehidrációt végeztünk. Ezt követően hőindukált antigén feltárást végeztünk citrát pufferben (pH 6) 30 percig. Az emésztés 37 C-on, pepszinnel történt hibridizátor készülékben.

Kétféle jelölt FISH reagenst használtunk: ZytoLight SPEC MET/CEN7 Dual Color, valamint ZitoLight SPEC PIK3CA/CEN3 Dual Color próbát (A PIK3CA a PI3K enzim katalitikus alegysége). Mindkét esetben a vörös szignál jelentette a centroméra specifikus jelölést (MET esetében a 7-es kromoszómán, PIK3CA esetében a 3-as kromoszómán). A zöld szín mindkét esetben a gént jelölte (MET esetében a 7q31.2, míg a PIK3CA esetében a 3q26.32-33 lókuszokon). A folyamat végén a sejtmagot DAPI-val jelöltük.

A mintákat ebben az esetben is digitalizáltuk a Panoramic Scan eszközzel, majd a kiértékeléshez a Panoramic Viewer szoftvert használtuk.

Minden mintán azonosítottunk 40 önálló (átfedést nem mutató) tumorsejt magot, és regisztráltuk a piros és zöld jelek számát.

A korábban publikált Cappuzzo-féle osztályozási rendszert vettük alapul: a 2, 3, illetve 4 és afeletti géntartalmat, gén/kromoszóma arányt, illetve a zöld és piros jelek (sejtmagonként) mediánját regisztráltuk. (Cappuzzo et al., 2005)

Hat csoportot különítettünk el:

- 1 – diszómia ( $\leq 2$  génkópia a sejtek több mint 90%-ában),
- 2 – alacsony triszómia ( $\leq 2$  génkópia a sejtek több mint 40%-ában, 3 génkópia a sejtek 10-40%-ában,  $\geq 4$  génkópia a sejtek kevesebb mint 10%-ában),
- 3 – magas triszómia (3 génkópia a sejtek több, mint 40%-ában,  $\geq 4$  génkópia a sejtek kevesebb mint 10%-ában),
- 4 – alacsony poliszómia ( $\geq 4$  génkópia a sejtek 10-40%-ában)
- 5 – magas poliszómia ( $\geq 4$  génkópia a sejtek több mint 40%-ában)
- 6 – amplifikáció (a MET/CEN7, illetve PIK3CA/CEN3 arány  $> 2$ )



## 5. Statisztikai analízis

A statisztikai adatfeldolgozáshoz a BMDP statisztikai szoftvercsomagot (Los Angeles, California, USA), illetve az SPSS szoftver (Chicago, IL, USA) 20-as verzióját használtuk.

A kategorikus változók közötti összefüggés vizsgálatára Pearson-féle khi-négyzet próbát használtunk, csoportonkénti alacsony várható (expected) elemszám esetén Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztunk.

Túlélési analízishez Kaplan-Meier vizsgálatot használtunk, a túlélésbeli különbségek vizsgálatát pedig log-rank teszttel végeztük. A relatív hazardok (HR) kiszámításához Cox-féle proporcionális hazard modellt alkalmaztunk. A túlélési vizsgálatokhoz a betegek betegség-specifikus túlélésével számoltunk. A túlélési idők középértékeként a mediánt használtam a dolgozatban (tekintettel arra, hogy a medián - szemben az átlaggal - nem érzékeny a kiugró /outlier/ értékekre). Amennyiben a követési idő alatt a betegek kevesebb, mint felénél következett be az esemény (betegség-specifikus halál), úgy a mediánt NR (Not Reached) értékkel jelöltem, és az átlagot tüntettem fel.

Minden elvégzett statisztikai teszt esetében 95%-os konfidencia intervallummal (95% CI) dolgoztunk, eredményeinket pedig akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a számított P értéke kisebb volt, mint 0,05.

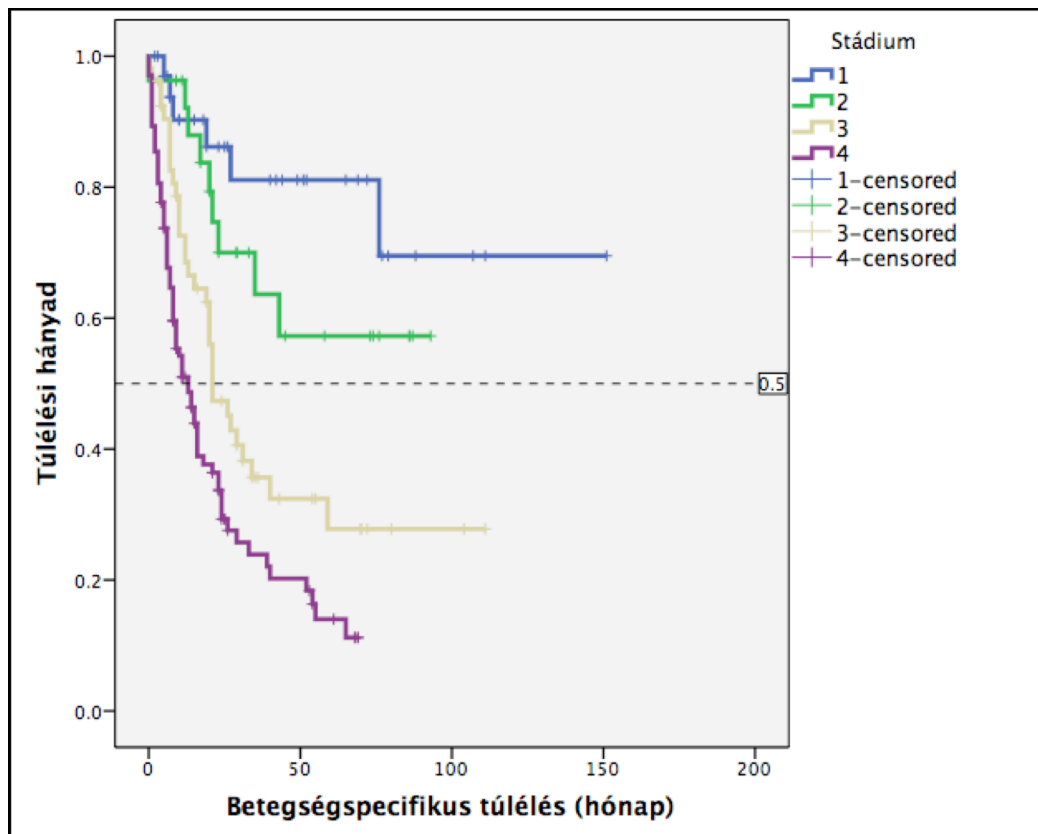
## 5. Eredmények

A módszereknél részletezett, első kohorszba tartozó 226 fej-nyaki tumoros beteg szövetmintáit vizsgáltuk TMA módszerrel. A vizsgálat során felhasznált immunhisztokémiai markerek a következők voltak: EGFR, Ki67, p16<sup>ink4</sup>, p53.

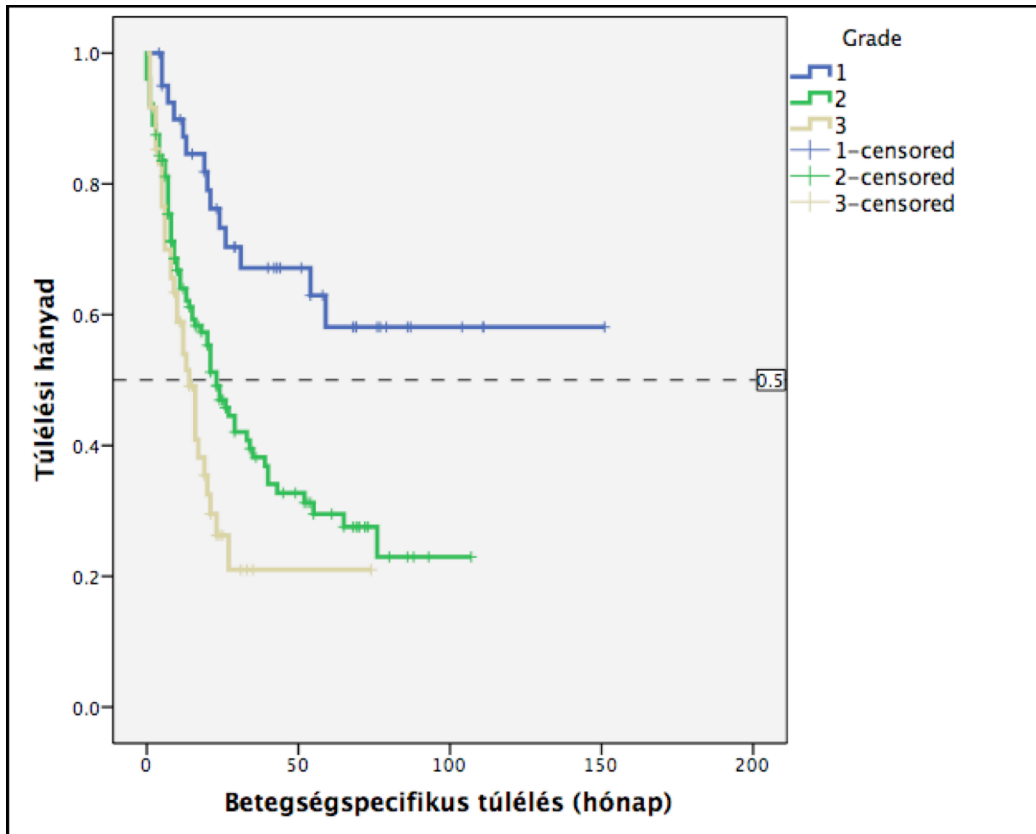
Statisztikailag szignifikáns összefüggés mutatkozott a stádium és a túlélés között (log-rank  $P < 0,001$ , 3. ábra). A medián túlélési idők a következők voltak: I. stádium: NR, átlag: 116,56 hónap, II. stádium: NR, átlag: 62,91 hónap, III. stádium: 21,0 hónap, IV. stádium: 13,0 hónap. Szintén szignifikáns összefüggést találtunk a szövettani grade és a betegek túlélése között: grade I - NR, átlag: 98,31 hónap, grade II - 23,0 hónap, grade III - 14,0 hónap (log-rank  $P < 0,001$ , 4. ábra).

A lokalizáció szerinti összehasonlításnál azt találtuk, hogy a legjobb prognózissal a glottikus tumorok (NR, átlag: 77,65 hónap), míg a legrosszabbal a hypopharynx tumorok járnak (12,0 hónap, log-rank  $P < 0,001$ , 5. ábra).

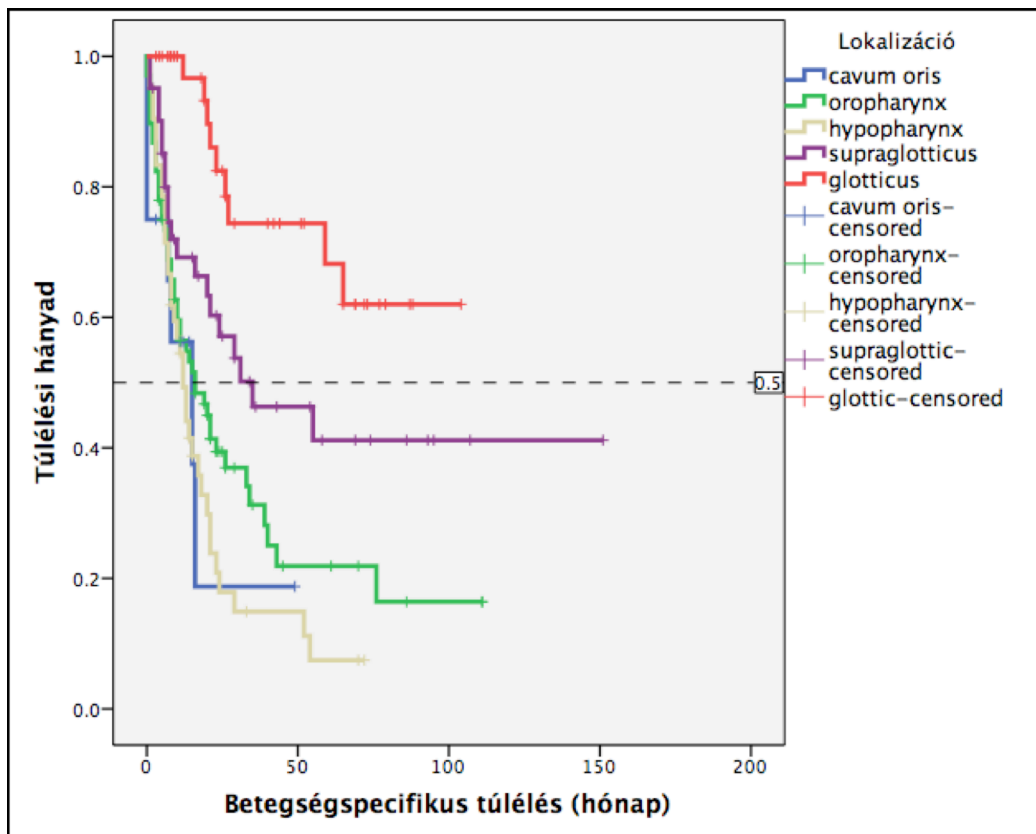
Sem nemek szerint, sem életkor szerint nem találtunk szignifikáns összefüggést a túléléssel ( $P = 0,594$ ; illetve  $P = 0,992$ ).



3. ábra: Stádiumok szerinti túlélés



4. ábra: Szöveti grade szerinti túlélés



5. ábra: Lokalizációk szerinti túlélés

## 1. Annak vizsgálata, hogy biomarker-expressziós szempontból egységesnek tekinthetők-e a fej-nyaki daganatok

A vizsgált markerek közül a Ki67, valamint az EGFR mutatott szignifikáns összefüggést a lokalizációval. (6. táblázat).

A hypopharynx tumorok 92,9%-a, a supraglotticus daganatok 85,4%-a, a transglotticus daganatok 76,5%-a, az oropharyngealis rákok 75,4%-a, a szájüregi daganatok 58,3%-a, míg a glotticus neopláziák 38,5%-a volt Ki67-pozitív ( $P < 0,001$ ).

Az EGFR esetében a százalékos megoszlások a következők voltak: szájüreg - 100%, supraglotticus gége - 95,1%, hypopharynx - 88,1%, oropharynx - 78,3%, transzglottikus tumorok - 76,5%, míg a glotticus régió tumorai esetében 71,1% ( $P = 0,023$ ).

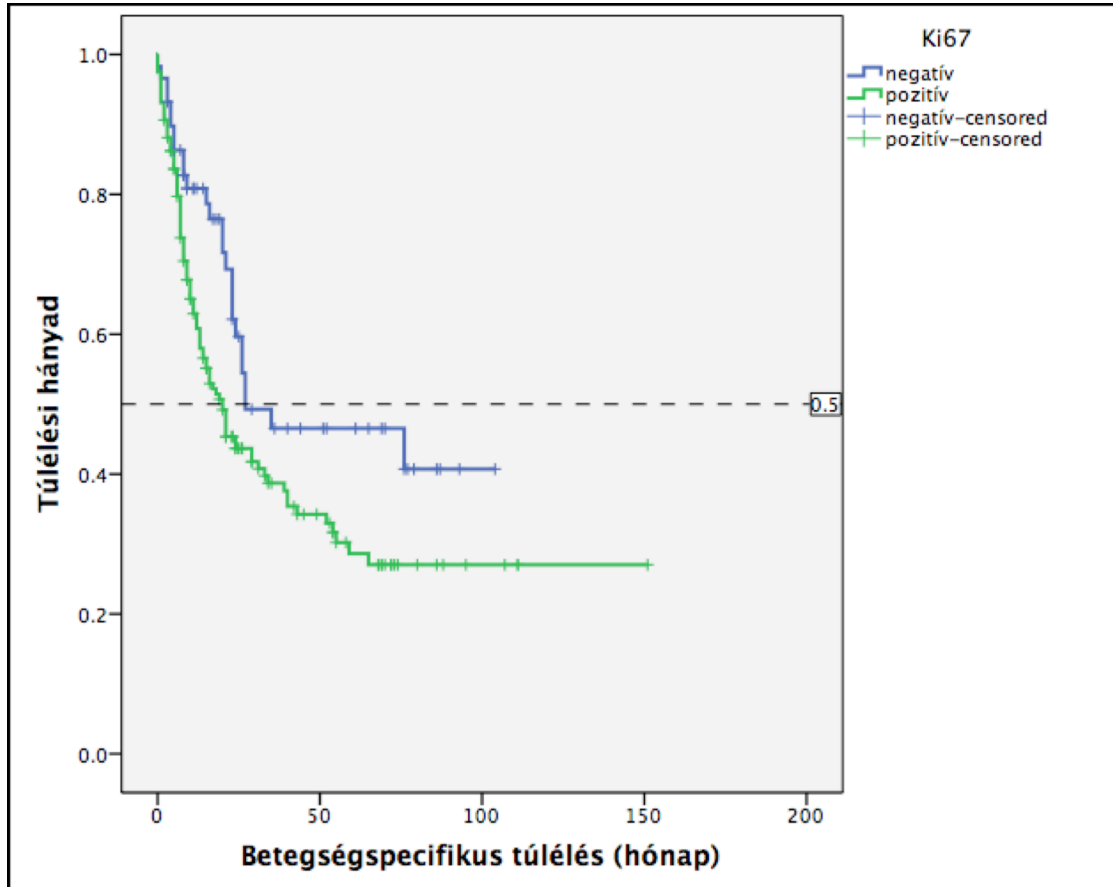
**6. táblázat:** Biomarker-expressziós arányok lokalizációk szerint

	<b>p16 poz.</b>	<b>Ki67 poz.</b>	<b>p53 poz.</b>	<b>EGFR poz.</b>
<b>Cavum oris</b>	25,0%	58,3%	50,0%	100%
<b>Oropharynx</b>	36,2%	75,4%	48,5%	78,3%
<b>Hypopharynx</b>	21,4%	92,9%	57,1%	88,1%
<b>Supraglotticus</b>	52,5%	85,4%	57,5%	95,1%
<b>Larynx</b> <b>Glotticus</b>	35,0%	38,5%	56,4%	71,1%
<b>Transglotticus</b>	29,4%	76,5%	46,7%	76,5%
<b>p-érték</b>	0,088	<b>&lt;0,001</b>	0,898	<b>0,023</b>

## 2. A Ki67 fehérje és a túlélés, illetve betegség progressziója közötti összefüggés vizsgálata.

Szignifikáns összefüggést találtunk a Ki67 fehérje expressziója és a betegek túlélése között: a Ki67-pozitív tumorral rendelkező betegek túlélése rosszabb a Ki67-negatív tumoros betegekéhez képest - 6. ábra (medián túlélés: 20 vs. 27 hónap; HR: 1,619; 95%CI: 1,050-2,498;  $P = 0,029$ ).

A betegség stádiuma és a Ki67-expresszió közötti kapcsolat vizsgálatkor azt találtuk, hogy a Ki67-pozitivitás nagyobb arányban fordult elő az előrehaladott (T3-4) stádiumban ( $P<0,001$ ), valamint a primer tumor Ki67-pozitivitása magasabb nyaki nodális státusszal társult ( $P=0,007$ ). 7. és 8. táblázat



6. ábra: A Ki67-pozitivitás és a túlélés kapcsolata

7. táblázat: A daganat T-stádium és a Ki67expresszió közötti összefüggés

	T1	T2	T3	T4
Ki67–negatív	48,7%	35,8%	14,1%	20,4%
Ki67–pozitív	51,3%	64,2%	85,9%	79,6%

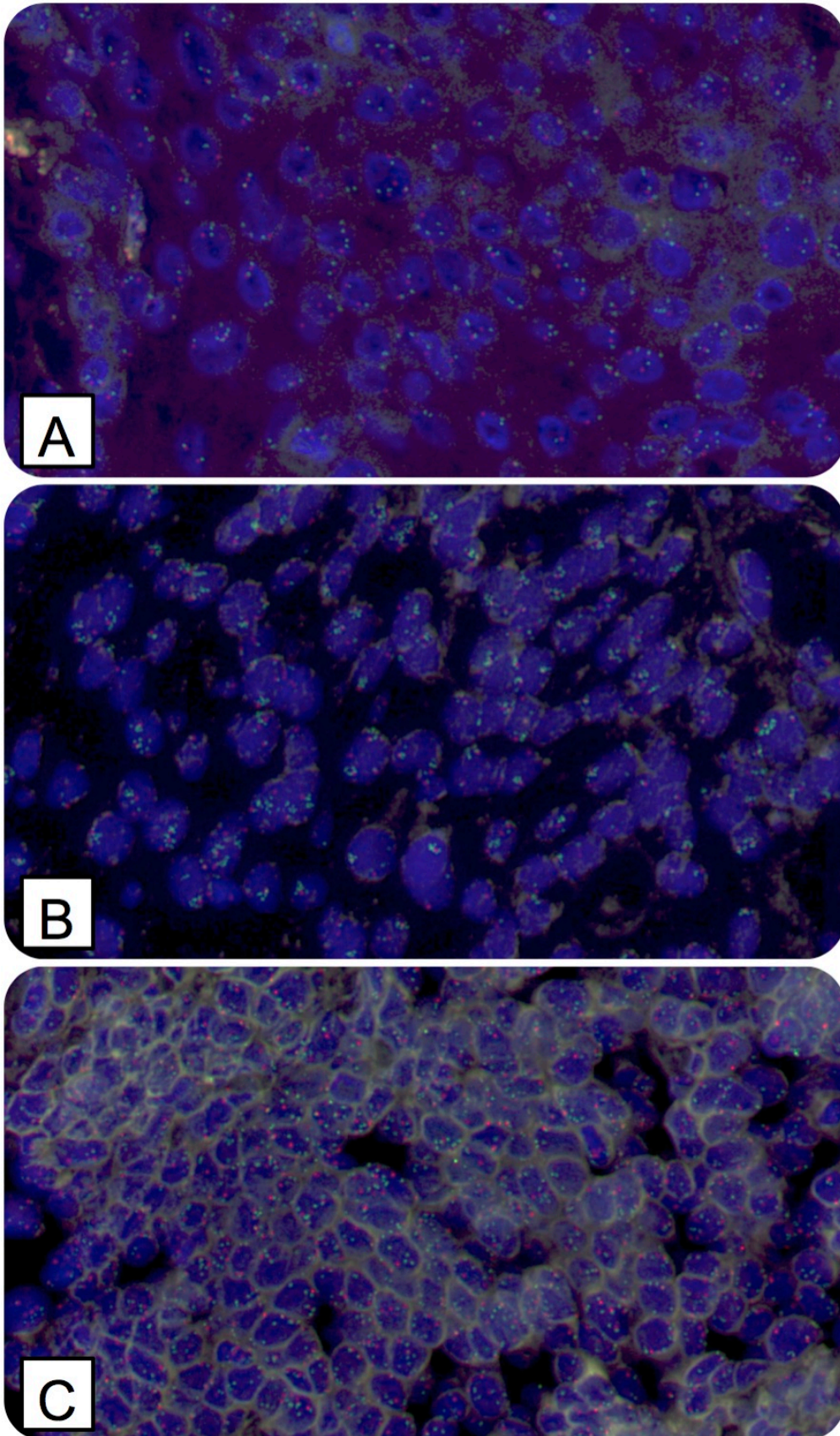
8. táblázat: A daganat N-stádiuma és a Ki67-expresszió közötti kapcsolat

	N0	N1	N2	N3
Ki67–negatív	38,1%	25%	14,8%	10%
Ki67–pozitív	61,9%	75%	85,2%	90%

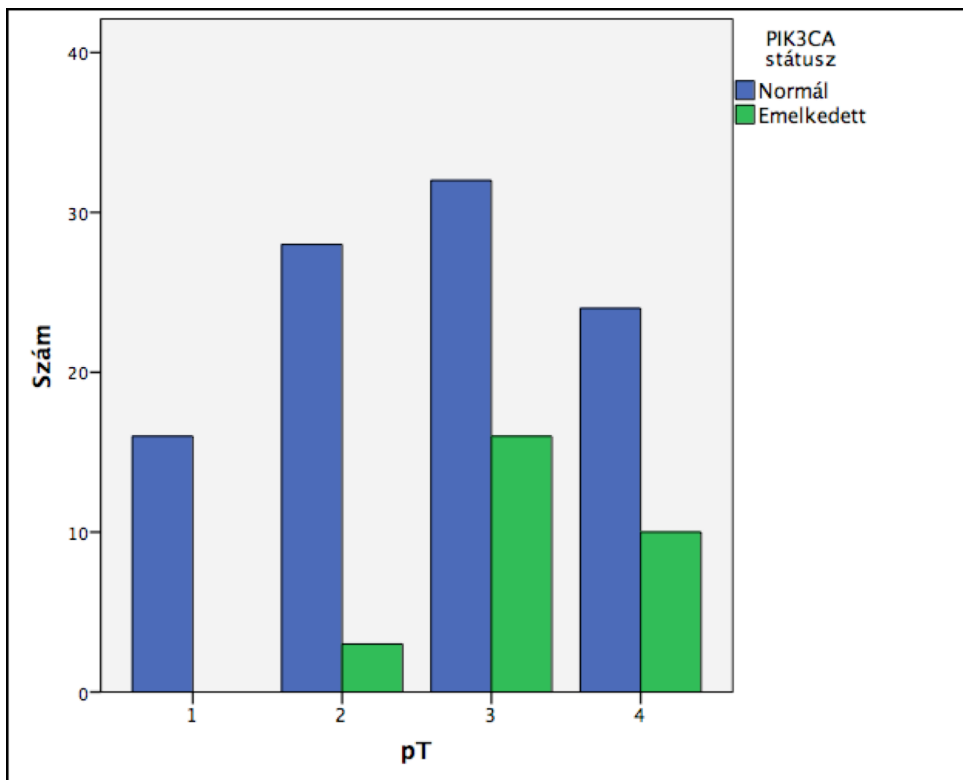
### **3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve a hepatocita növekedési faktor-receptor (c-MET) citogenetikai eltérései és daganatos betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálata**

Az első kohorszba tartozó 226 betegből 152-nek volt fluorescens in situ hybridizációra alkalmas szövetmintája. PIK3CA esetében a minták 5%-ában találtunk diszómiát, alacsony triszómiát 26,5%-ban, magas triszómiát 2%-ban, alacsony poliszómiát a tumorok 42%-ában, magas poliszómiát az esetek 20%-ában, míg amplifikációt 4,5%-ban. A c-MET citogenetikai eltéréseit tekintve az esetek 20%-ában találtunk diszómiát, alacsony triszómiát 44%-ban, magas triszómiát 2%-ban, míg alacsony poliszómiát 28%-ban, magas poliszómiát 5%-ban. A c-MET esetében amplifikációt nem találtunk (7. ábra).

Az említett gének citogenetikai eltérései, illetve a fej-nyaki daganatos betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálatakor azt találtuk, hogy a PIK3CA emelkedett kópiaszáma szignifikáns mértékben magasabb arányú volt az előrehaladott T-stádiumban lévő betegeknél ( $P=0,008$ , 8. ábra). Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a c-MET, illetve a daganatos betegség stádiuma között.



7. ábra: Normál PIK3CA kópiaszám (A), PIK3CA amplifikáció (B), PIK3CA poliszómia (C)



**8. ábra:** A PIK3CA státusz és a pT paraméter közötti összefüggés



#### 4. A connexin 43 (Cx43) fehérje expressziójának vizsgálata fej-nyaki daganatokban

A vizsgálat során vizsgáltuk a connexin 43 fehérje expresszióját, a p53, p16<sup>INK4</sup> tumorszuppresszor fehérjéket, valamint sejtfázis-specifikus fehérjéket, mint aurora A, Geminin, illetve p21<sup>WAF1</sup>.

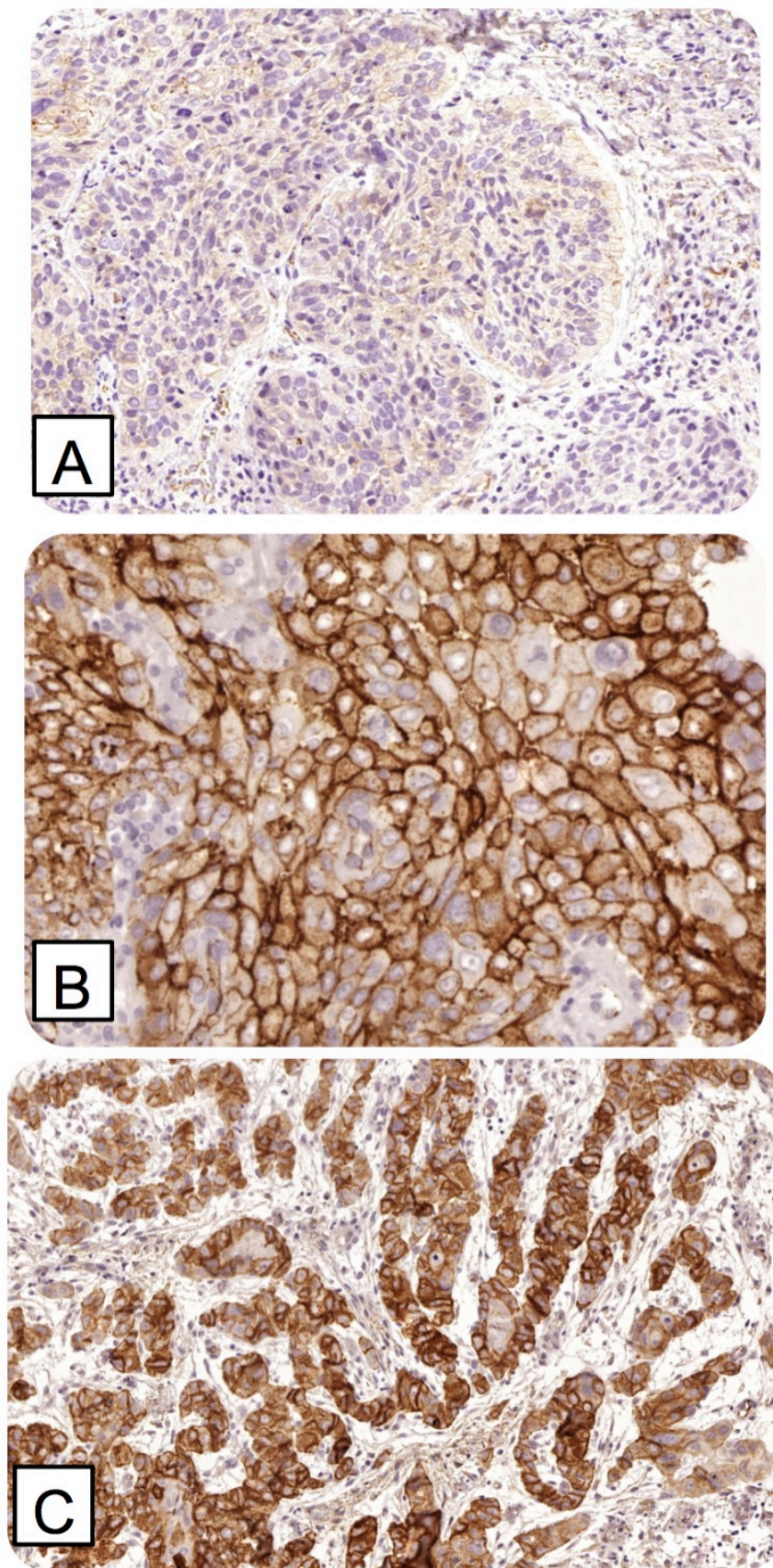
A vizsgált 90 mintából 60-bizonyult connexin-pozitívnak, míg 30 negatívnak (9./A ábra). A normál mukozális epitheliumban, illetve a daganatok egy részében a fehérje a sejtmembránban, valamint annak közvetlen közelében festődött (9./B ábra). A vizsgálat fej-nyaki tumorminták nagy részében a connexin 43 citoplazmatikus festődést mutatott (9./C ábra).

Erős pozitív összefüggést találtunk a betegek betegségsspecifikus túlélése és a fehérje expressziója között: A Cx43-pozitív tumorok szignifikánsan jobb prognózissal társultak (HR: 0,509; 95% CI: 0,315 – 0,822; P=0,006). A medián túlélés a Cx43-pozitív csoportban 15 hónap volt, míg 5 hónap a Cx43-negatív csoportban (log-rank P=0,004, 10. ábra). Szignifikáns összefüggést találtunk továbbá a Cx43 és a p53 fehérje között: a fokozott p53 expresszió magas connexin 43 szinttel társult (P=0,036, 11. ábra).

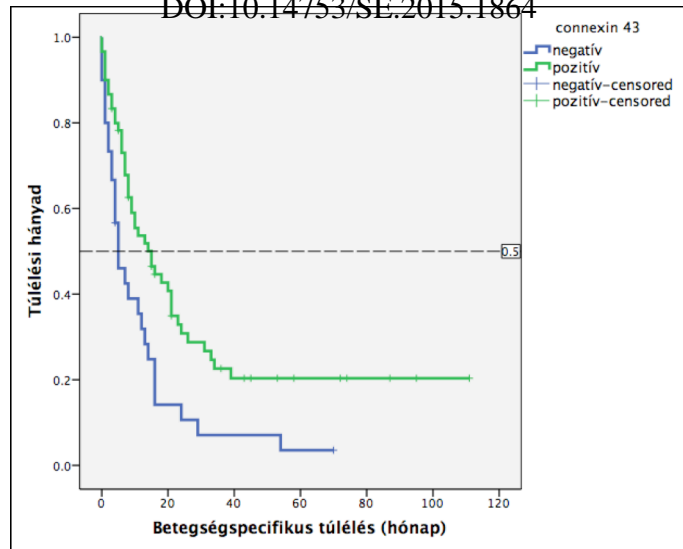
Nem találtunk összefüggést a Cx43 és a többi vizsgált fehérje expressziója között, sem pedig a többi klinikopatológiai paraméterrel, mint a T-, N-, M-stádiummal, szövettani grade-del, lokalizációval.

Szignifikáns összefüggést találtunk a p21<sup>WAF1</sup> és a betegek túlélése között: a p21<sup>WAF1</sup>-pozitív tumorok prognózisa szignifikáns mértékben jobb a p21<sup>WAF1</sup>-negatív tumorokkal összehasonlítva (HR: 0,444; 95% CI: 0,224 – 0,878; P=0,020). A medián túlélési idő a p21<sup>WAF1</sup>-pozitív tumorok esetében 15 hónap volt, míg a negatív csoportban mindössze 4 hónap (log-rank P=0,014, 12. és 13. ábra).

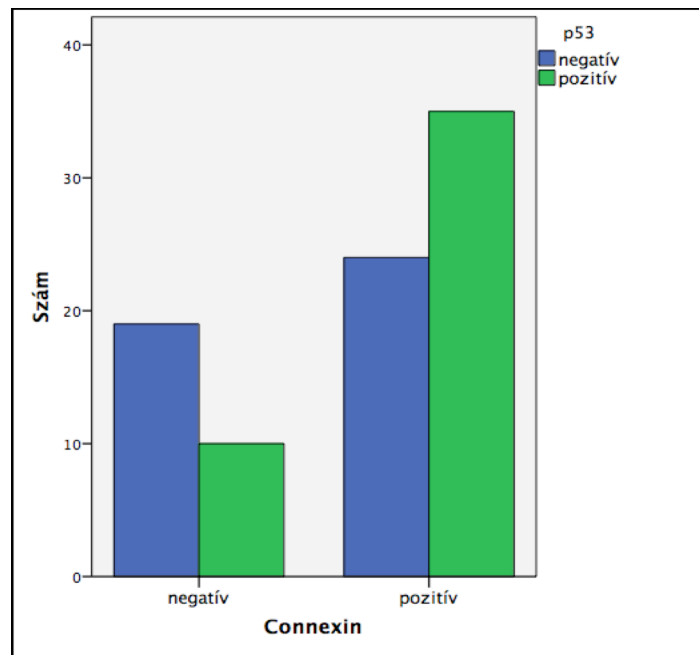
A többi vizsgált marker nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést a túléléssel, illetve az egyéb klinikopatológiai paraméterekkel.



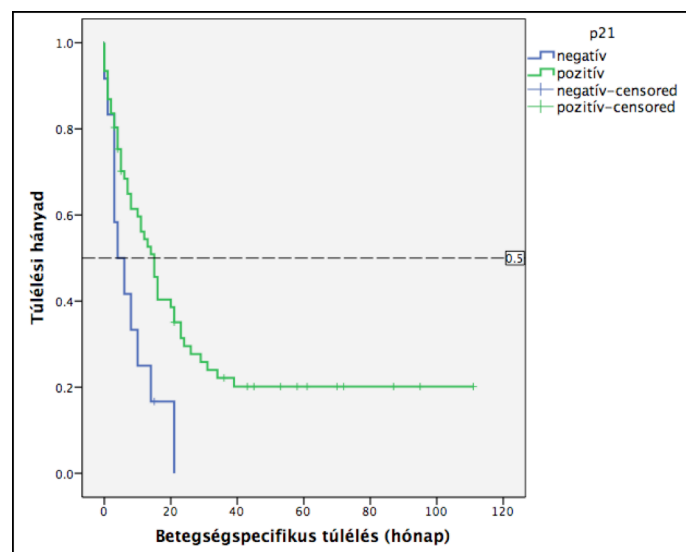
**9. ábra:** Cx43-negatív tumor (A), Cx43-membránpozitivitást mutató tumorsejtek (B), aspecifikus/citoplazmatikus festődést mutató daganatsejtek (C)



10. ábra: A Cx43 expresszió és a túlélés kapcsolata

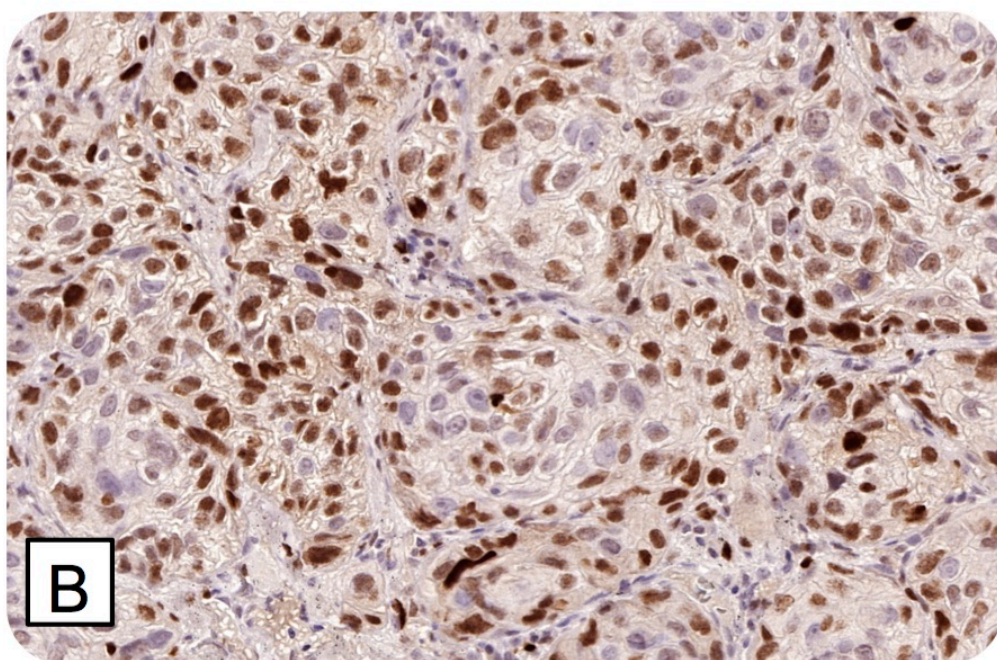
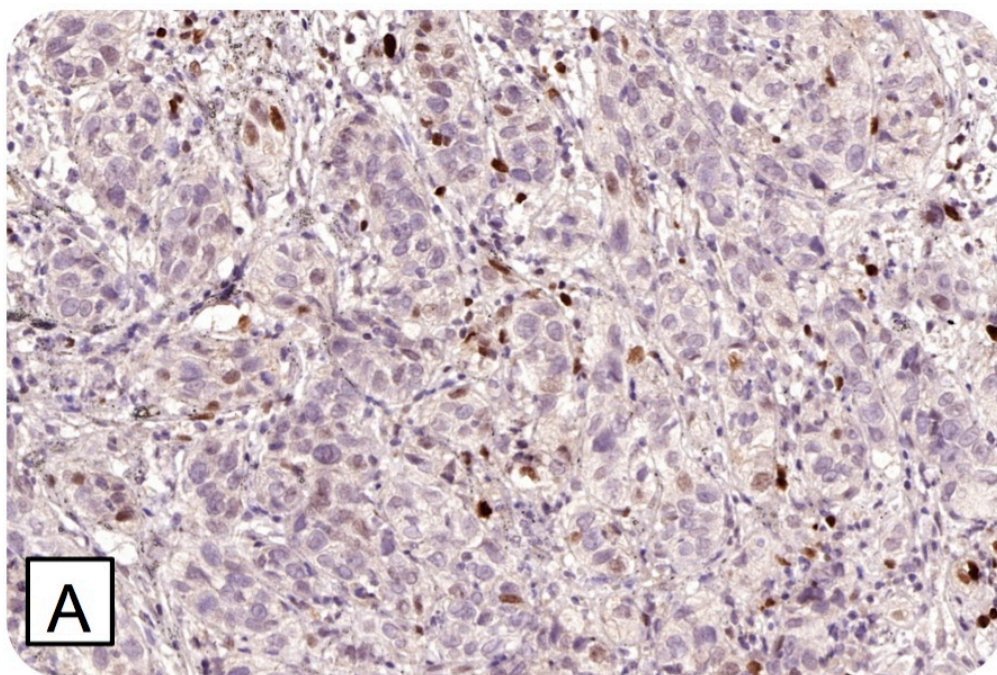


11. ábra: A Cx43 és a p53 expresszió közötti összefüggés



12. ábra: A p21 expresszió és a túlélés kapcsolata





13. ábra: p21<sup>WAF1</sup>-negatív (A) és p21<sup>WAF1</sup>-pozitív tumorsejtek (B)

## 6. Megbeszélés

Az első vizsgált kohorszunkban 226 beteg tumorának, illetve túlélési adatainak vizsgálata során a várt túlélésbeli különbségek megjelentek a betegség stádiuma alapján, mintél magasabb stádiumú volt a betegség, annál rosszabb volt a betegségspecifikus túlélés. A szövettani grade prognosztikai szerepe fej-nyaki daganatokban még vitatott, mi azonban egyértelmű, szignifikáns összefüggést találtunk: minél differenciáltabb a daganat, annál jobb a prognózisa. A daganatok lokalizációja szerinti összehasonlításnál az irodalomból ismert különbségek mutatkoztak meg: a glottikus tumorok rendelkeztek a legjobb túlélési mutatókkal, míg a hypopharynx daganatai voltak a legrosszabb prognózisúak.

### 1. Annak vizsgálata, hogy biomarker-expressziós szempontból egységesnek tekinthetők-e a fej-nyaki daganatok

Jelen vizsgálatunknak az volt a célja, hogy megvizsgáljuk, egységesnek tekinthetők-e a fej-nyaki daganatok biomarker-expressziós szempontból.

A p16<sup>INK4</sup> egy ciklin-dependens kináz gátló, mely az aktív ciklin D - CDK 4/6 kialakulását gátolja. Ennek eredményeként elmarad a retinoblasztóma fehérje foszforilációja, így a sejtciklus leáll a G1 fázisban (Nilsson et al., 2004). Az utóbbi évtizedben több publikáció jelent meg azzal kapcsolatban, hogy a p16<sup>ink4</sup> fokozott termelődése a fej-nyaki tumorok esetében az esetek mintegy 80%-ában összefüggésben áll a HPV-pozitivitással, így felhasználható ún. helyettesítő (surrogate) markerként a vírus indukálta daganatok kimutatására. Ismert továbbá, hogy a HPV-pozitív tumorok elsősorban az oropharyngealis régióban fordulnak elő (Ang and Sturgis, 2012).

Jelen vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns különbséget a p16<sup>INK4</sup>-expressziója és a daganat lokalizációja között. Legmagasabb arányban a supraglottikus régióban (52,5%) fordultak elő a p16<sup>INK4</sup>-pozitív tumorok, második legmagasabb arányban pedig az oropharyngealis régióban (36,2%), míg az arány a legalacsonyabb a hypopharyngealis régióban volt (21,4%).

A Ki67 fehérje fiziológias funkciója nem teljesen tisztázott. Ismert viszont, hogy csak és kizárólag a proliferáló sejtekben termelődik (jelen van a G1, S, G2 és M fázisban, de hiányzik a G0 fázisban). Ebből kifolyólag a Ki67 felhasználható, mint proliferációs marker, több tumortípusban írták le prognosztikai szerepét (Cattoretti et al., 1992, Matsumoto et al., 1999, Sittel et al., 2000).

Vizsgálataink során szignifikáns összefüggést találtunk a Ki67-expresszió és a tumorok elhelyezkedése között: Legmagasabb arányban a hypopharynx tumorokban volt jelen (92,9%), míg legritkábban a glottikus tumorokban volt detektálható (38,5%). A fentiek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a hypopharynx tumorok jóval nagyobb osztódási potenciállal rendelkeznek, mint a glottikus daganatok. Ez magyarázatot adhat arra a jelenségre, hogy a fej-nyaki daganatok közül a hypopharynx daganatoknak a legrosszabb a prognózisa, illetve rendelkeznek a legmagasabb metasztatikus potenciállal.

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) fokozott termelődése a fej-nyaki daganatok 80-90%-ában kimutatható (Grandis and Twardy, 1993). Vizsgálatunk során szignifikáns összefüggést találtunk a fehérje expressziója és a daganat lokalizációja között: legmagasabb arányban a szájüregi tumorokban volt kimutatható (100%), míg legalacsonyabb a glottikus tumorok esetében volt (71,1%).

A p53 tumorszupresszor fehérjét kódoló gén a leggyakrabban mutált gén humán tumorokban, mutációja nagyon gyakori a fej-nyaki malignómákban is (Somers et al., 1992). A p53 prognosztikai szerepe még nem teljesen tisztázott fej-nyaki tumorokban. Egyes szerzők negatív korrelációt találtak a p53 expresszió és a prognózis között (Bradford et al., 2003), míg mások (és többek között ez a vizsgálat is) nem tudták bizonyítani ezt az összefüggést (Perisanidis et al., 2012, Tamas et al., 2000).

Mind az irodalmi adatok alapján, mind saját klinikai gyakorlatunkban azt látjuk, hogy azonos stádiumú, különböző lokalizációjú fej-nyaki daganatok egészen eltérő biológiai viselkedést mutathatnak mind a kórlefolyást, mind a kezelésre adott választ tekintve. Hazai kutatók vizsgálataik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a az eltérő prognózis egyik oka a különböző régiók eltérő struktúrája, ugyanis a porcos, illetve kötőszövetes vázak gátat szabhatnak a tumor növekedésének (Repassy et al., 1988).

Jelen vizsgálatunk alapján azt a konklúziót vonhatjuk le, hogy az eltérő lokalizációjú fej-nyaki daganatok molekulárbiológiailag is eltérnek egymástól, tehát a fej-nyaki daganatok nem tekinthetők egységes entitásnak biomarker-expressziós szempontból.

## **2. A Ki67 fehérje és a túlélés, illetve betegség progressziója közötti összefüggés vizsgálata.**

A Ki67 több daganattípusban ismert, és klinikailag használt prognosztikai faktor, ugyanakkor fej-nyaki daganatokban prognosztikai szerepe még nem tisztázott (de

Azambuja et al., 2007, Pollack et al., 2004, Roland et al., 1994). Jelen vizsgálatunkban szignifikáns összefüggést találtunk a Ki67 fehérje expressziója és a betegek betegség-specifikus túlélése között, a tumor T-stádiuma, valamint a nyirokcsomó (N) státusza között. Megállapíthatjuk tehát, hogy fehérjét fokozottan expresszáló daganatok lokálisan (méretüket, valamint infiltrációjukat tekintve) előrehaladottabbak, nagyobb eséllyel adnak nyaki nyirokcsomó metasztázist, valamint rosszabb prognózissal rendelkeznek, mint a fehérjét nem, vagy alacsony mértékben termelő tumorok. Az előző fejezetben részletezettek alapján a hypopharynx daganatok rossz prognóziásaink egyike lehet a fokozott Ki67 termelés.

### **3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve a hepatocita növekedési faktor-receptor (c-MET) citogenetikai eltérései és daganatos betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálata**

A PI3K/Akt/mTOR kaszkád az egyik leggyakrabban károsodott útvonal humán tumorokban. A kaszkád első tagjának mutációi gyakoriak emlő, ill. colorectalis tumorokban, míg kópiaszám-eltérései gyakran fordulnak elő cervix és tüdő daganatokban (Forbes et al., 2015). Egy 2015-ben megjelent tanulmányban írták le, hogy HPV-pozitív fej-nyaki daganatokban gyakori az enzim katalitikus alegységének (PIK3CA) mutációja (The Cancer Genome Atlas, 2015).

A c-MET egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptor, melynek ligandja a HGF (hepatocita növekedési faktor). A fehérje szerepet játszik az EMT-ben (epithelialis-mesenchimalis tranzíció), a proliferációban, migrációban továbbá az invázióban. Az általa aktivált legfontosabb kaszkádok a Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK kaszkád), ill. a PI3K-Akt-mTOR útvonalak (Lesko and Majka, 2008). Fokozott termelődése gyakori laphámrákokban, és gyakran rossz prognózissal társul (Birchmeier et al., 2003).

A PIK3CA esetében a mintáink közel kétharmadában találtunk triszómiát, közel 5%-ban amplifikációt, míg a c-MET-et tekintve amplifikáció nem, poliszómia pedig 33%-ban volt jelen. Eredményeink alapján a primer tumorban a PIK3CA kópiaszám-emelkedése magasabb T stádiummal-társul. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az említett citogenetikai eltérés a daganatos betegség progressziójának későbbi, előrehaladottabb stádiumában jelenik meg. A c-MET esetében nem találtunk összefüggést a stádium és a betegség progressziója között.

#### **4. A connexin 43 (Cx43) fehérje expressziójának vizsgálata fej-nyaki daganatokban**

A connexinek a gap junctionok (réskapcsolat) alkotásában részt vevő strukturális fehérjék. Ezeknek a réskapcsolatoknak a szerepe az intercelluláris kommunikációban van azáltal, hogy lehetővé teszik ionok, illetve kis molekulák transzmisszióját (Sohl and Willecke, 2004). Jelenleg 21 connexin izoforma ismert, melyek mind méretükben, mind töltés-specificitásukban különböznek (Goodenough et al., 1996, Willecke et al., 2002). A fehérjék négy transzmembrán doménnel, két extracelluláris, illetve egy citoplazmatikus hurokkal rendelkeznek. Mind az N-, mind a C-terminális régió a citoplazmában helyezkedik el (Kumar and Gilula, 1996). Az utóbbi években jelentek meg olyan tanulmányok, melyek alapján felmerül, hogy a connexinek nemcsak strukturális funkcióval rendelkeznek, hanem tumorszupresszorként is funkcionálnak, és kapcsolatba léphetnek több intracelluláris szingáltranszdukciós fehérjével, mint például az src, így részt vehetnek a proliferációban, differenciációban, valamint az apoptózisban (Naus and Laird, 2010, Conklin et al., 2007).

A connexinek humán karcinogenezisben betöltött szerepét először hepatocelluláris karcinómákban írták le (Janssen-Timmen et al., 1986). Ismert, hogy a fehérje expressziója több daganattípusban csökkent, így például emlő tumorban és vesesejtes rákban, továbbá az, hogy a csökkent termelődés egyes tumorok esetében rosszabb prognózissal társul (Teleki et al., 2014, Yano et al., 2006).

Gége rákok esetében Schneider és munkatársai vizsgálataik során azt találták, hogy a daganatkialakulás alatt nem változik meg a connexin-expressziós mintázat (Schneider et al., 2002). Szintén gégerákok vizsgálata során egy tanulmányban nem találtak összefüggést a Cx43 fehérje termelődése és a betegek túlélése között (Sun et al., 2004).

Vizsgálatunkban szájüregi, garat- és gégerákos betegek tanulmányozása alapján szignifikáns összefüggés igazolódott a connexin 43 expresszió és a betegség-specifikus túlélés között: a csökkent connexin expresszió rosszabb prognózissal társult. Ez az eredmény szintén amellel szól, hogy a Cx43 tumorszupresszor funkcióval is rendelkezik. Megfigyeltük továbbá, hogy a connexin 43 fehérje szintje, illetve a p53 fehérje szintje között pozitív korreláció áll fent: A magas connexin szint magas p53 szinttel társul. Ismert, hogy a p53 szintje emelkedett a fej-nyaki laphámsejtes daganatok mintegy 50%-ában, elsősorban az alkoholfogyasztás és dohányzás indukálta tumorokban. Ezekben a tumorokban a p53 mutációja igen gyakori. A mutált p53



lebomlása korlátozott, így akkumulálódik a sejtben, mely az immunhisztokémiai vizsgálatok során „*overexpressió*”-ként jelenik meg (Tandon et al., 2010, Brennan et al., 1995). Eredményeink alapján azt valószínűsítjük, hogy a connexin 43 expresszió csökkenése egy, a mutált p53 által jellemzett karcinogenezistől eltérő útvonalban játszik szerepet, illetve vesz részt a daganat kialakulásában.

Korábbi vizsgálatok alapján felmerült, hogy összefüggés áll fenn a Cx43 expresszió és különböző sejtciklus szabályozó fehérjék között, mint például a p21<sup>WAF1</sup>. A p21<sup>WAF1</sup> fehérje egy ciklindependens-kináz inhibitor, mely a G1/S átmenet szabályozásában játszik szerepet (Sherr, 1996). Vizsgálatunk során a fehérje expressziója és a betegek túlélése között szignifikáns összefüggést találtunk: a csökkent p21<sup>WAF1</sup> expresszió rosszabb prognózissal társult. Ez a jelenség megfelel a Xie és munkatársai által publikált adatoknak (Xie et al., 2002). Nem találtunk azonban összefüggést a p21<sup>WAF1</sup> és Cx43 fehérje szintje között.

Az aurora A kináz egy szerin/treonin kináz, amely a mitózisban és meiózisban játszik szerepet. Azáltal, hogy a G2/M átmenetben termelődik, felhasználható sejtciklus markerként (Vader and Lens, 2008). A geminin a DNS re-replikációjának gátlásában vesz részt, szintje a G2/M átmenetben a legmagasabb (Diffley, 2004). A korábban már részletesen jellemzett Ki67 fehérje pedig csak a sejtciklusban részt vevő sejtekben található meg, a nyugvó (G0 fázis) sejtekben nem. Nem találtunk szignifikáns összefüggést az említett fehérjék és a betegek túlélése, illetve egyéb klinikopatológiai paraméterek között, sem pedig a fehérjék expressziója és a connexin 43 szintje között.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy a Cx43 egy megbízható prognosztikai marker fejnyaki daganatokban, expressziójának csökkenése szignifikánsan rosszabb prognózissal társul.

## 7. Következtetések

Doktori disszertációmban a fej-nyaki rosszindulatú daganatok prognosztikai faktorainak kutatásából származó eredményeinket foglaltam össze. Vizsgáltuk a fej-nyaki daganatokban olyan markerek expresszióját, mint a p16<sup>INK4</sup>, p53, EGFR, Ki67, p21<sup>WAF1</sup>, connexin 43, aurora A, és geminin, valamint a c-MET és foszfatidil-inozitol 3 kináz citogenetikai eltéréseit. Munkánk során az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. A fej-nyaki rákok biomarker-expressziós profiljának vizsgálatakor azt találtuk, hogy habár szövettanilag hasonló megjelenésűek ezek a daganatok, fehérje-expressziós szempontból nem tekinthetők egységes entitásnak. A Ki67 proliferációs marker fokozott termelődése szignifikánsan magasabb arányban található meg az algarat daganatainál, míg jóval alacsonyabb arányban a glottikus tumorokban. Ehhez hasonlóan az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) 100%-ban pozitív festődést mutatott szájüregi daganatokban, míg legalacsonyabb arányban a glottikus daganatokban volt kimutatható.
2. A Ki67 fehérje prognosztikai szerepének vizsgálatakor szignifikáns összefüggést fedeztünk fel a fehérje fokozott termelődése és a betegek túlélése között: az magasabb Ki67-szintet mutató tumorok prognózisa rosszabb, mint az alacsony Ki67-szintű tumoroké. Megfigyeltük továbbá, hogy a primer tumor magasabb Ki67 szintje magasabb T-stádiummal, valamint előrehaladottabb nyaki nyirokcsomó (N) státussal társul.
3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve hepatocita növekedés faktor receptor (c-MET) citogenetikai eltérései, valamint a betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálatakor azt az eredményt kaptuk, hogy a PI3K esetében az emelkedett génekópiaszám előrehaladott T-stádiummal párosult. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a cMET és a betegség stádiuma között.
4. A connexin 43 fehérje fej-nyak tumorban betöltött szerepének vizsgálatakor a következő eredmények mutatkoztak: a fehérje expressziójának csökkenése szignifikáns mértékben rontja a betegség prognózisát. Érdekes megfigyelés továbbá, hogy a Cx43-pozitív (tehát normál expressziójú) daganatok esetében szignifikáns mértékben magasabb arányú volt a kóros p53-expresszió. Ez alapján arra a

következtetésre jutottunk, hogy a Cx43-expresszió zavara elsősorban nem a mutáns p53 által dominált daganatokban fordul elő. Nem találtunk összefüggést a Cx43 termelődése és a sejtfázis-markerek között. Korábban már publikált adatoknak megfelelően a mi beteganyagunkban is azt találtuk, hogy a p21<sup>WAF1</sup> fehérje expressziójának csökkenése szignifikánsan rontja a betegség prognózisát.

## 8. Összefoglalás

Incidenciájukat tekintve a fej-nyaki daganatok világviszonylatban az ötödik leggyakoribb malignus daganatnak tekinthetők, míg ugyanez az entitás Magyarországon a negyedik leggyakoribb tumortípus. Tekintettel arra, hogy a betegség prognózisa rendkívül rossz, ill. a gyógyulás esélyét hordozó terápiás modalitások jelentős mellékhatásokkal, ill. életmódbeli romlással járnak, szükséges olyan új prognosztikai faktorok azonosítása, amelyekkel megjósolhatóvá válik a daganat agresszivitása, biológiai viselkedése.

Vizsgálatunkban 226, illetve 90 fej-nyaki daganatos beteget vontunk be, és immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk a daganatok biomarker-expressziós profilját (p16<sup>INK4</sup>, EGFR, Ki67, p53) anatómiai lokalizációk szerint. Vizsgáltuk továbbá a Ki67 expresszió prognosztikai szerepét, összefüggését a betegség-specifikus túléléssel, valamint a tumor stádiumával. Vizsgálataink során fluorescens in situ hybridizációval elemeztük a PIK3CA (a PI3K enzim katalitikus alegységének génje), valamint a c-MET amplifikációjának és poliszómiájának összefüggéseit a daganatos betegség progressziójával. További tárgyát képezte vizsgálatainknak a connexin 43 fehérje expressziójának immunhisztokémiai elemzése, valamint összefüggésének vizsgálata a túléléssel, tumorszuppresszorokkal és sejtfázis-markerekkel.

Szignifikáns összefüggést találtunk a Ki67, valamint az EGFR expresszió és a daganatok lokalizációja között. Előbbi legmagasabb arányban a hypopharynx tumoraiban, legkiebber arányban a glottikus daganatokban adott pozitív reakciót, míg az EGFR esetében legmagasabb arányú expressziót a szájüregi tumorokban, legalacsonyabb arányú termelődést pedig a glottikus malignómákban mértünk.

Statisztikailag szignifikáns összefüggés mutatkozott a Ki67-expresszió és a túlélés között: legjobb prognózissal a Ki67-negatív tumorok rendelkeztek, a pozitív expresszió jelentősen rontotta a betegség-specifikus túlélést. A Ki67-pozitivitás magasabb T, és N stádiummal társult. Szignifikáns összefüggést találtunk a PIK3CA amplifikáció, illetve poliszómia, valamint a betegség T-stádiuma között: az említett citogenetikai eltérések gyakoribbak voltak előrehaladott stádiumú tumorokban. A connexin 43 fehérje vizsgálata során azt találtuk, hogy az expresszió elvesztése/lecsökkenése szignifikáns mértékben növeli a betegség-specifikus halálozást. Statisztikailag jelentős összefüggés igazolódott a Cx43 expresszió és a p53 fehérje termelődése között, a p53 „overexpressziót” mutató daganatokban jelentősen ritkább volt a Cx expresszió elvesztése.

## 9. Summary

Head and neck cancers are the fifth most common malignancies worldwide, while in Hungary, this entity is the fourth most frequent cancer regarding their incidence. As the prognosis of this cancer type is rather poor, and the therapeutic modalities frequently bear serious side effects and cause considerable decline in quality of life, identification of novel prognostic markers - for predicting biological behaviour and aggressiveness of the disease - is emerging.

We analyzed the tumor samples of 226 and 90 patients suffering from head and neck squamous cell carcinoma. We used immunohistochemistry to detect regional differences in biomarker expression (p16<sup>INK4</sup>, EGFR, Ki67, p53). We also evaluated the correlation between Ki67 expression and disease-specific survival, tumor stage.

Fluorescent in situ hybridization was used to assess the amplification and polysomy of PIK3CA (the catalytic subunit of the enzyme PI3K) and c-MET. We were looking for possible correlations between the cytogenetic alterations and tumor progression.

We also evaluated the role of connexin 43 expression in head and neck cancers and its correlation with disease-specific survival, expression of tumorsuppressors and cell phase markers.

Significant correlation was revealed between the expressions of Ki67 and EGFR and tumor site. Ki67 expression was the highest among hypopharyngeal cancers, while the lowest in glottic tumors. EGFR overexpression was the most frequent in oral cancers and the less frequent in glottic malignancies.

Statistically significant association was found between Ki67 expression and survival: Ki67-negative cancers showed the best prognosis, while positive expression was associated with poorer prognosis. Ki67-positivity was associated with higher T and N stage.

Significant correlation was found between PIK3CA amplification, polysomy and tumor stage: these cytogenetic alterations were associated with higher T stage.

Analyzing the expression of connexin 43, we found that the loss of or decrease in Cx43 expression significantly increases disease-specific death. Statistically significant correlation was revealed between Cx43 expression and p53 level: loss of Cx43 expression was a rare event in tumors showing p53 overexpression. We did not unveil any significant correlation between connexin 43 expression and cell phase specific markers (Geminin, aurora A, p21<sup>WAF1</sup>, Ki67).

## 10. Irodalomjegyzék

Addante, R. R.Mckenna, S. J. 2006. Verrucous carcinoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 18, 513-9.

Adelstein, D. J., Ridge, J. A., Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., D'souza, G., Gravitt, P. E., Westra, W., Psyrri, A., Kast, W. M., Koutsky, L. A., Giuliano, A., Krosnick, S., Trotti, A., Schuller, D. E., Forastiere, A.Ullmann, C. D. 2009. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck*, 31, 1393-422.

Andre, K., Schraub, S., Mercier, M.Bontemps, P. 1995. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncology-European Journal of Cancer Part B*, 31B, 301-309.

Ang, K. K., Berkey, B. A., Tu, X., Zhang, H. Z., Katz, R., Hammond, E. H., Fu, K. K.Milas, L. 2002. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*, 62, 7350-6.

Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P.Gillison, M. L. 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363, 24-35.

Ang, K. K.Sturgis, E. M. 2012. Human Papillomavirus as a Marker of the Natural History and Response to Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 22, 128-142.

Begum, S.Westra, W. H. 2008. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol*, 32, 1044-50.

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E.Vande Woude, G. F. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 915-925.

Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K. Ang, K. K. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 354, 567-578.

Borggreven, P. A., Kuik, D. J., Langendijk, J. A., Doornaert, P., De Bree, R. Leemans, C. R. 2005. Severe comorbidity negatively influences prognosis in patients with oral and oropharyngeal cancer after surgical treatment with microvascular reconstruction. *Oral Oncol*, 41, 358-64.

Bradford, C. R., Zhu, S., Ogawa, H., Ogawa, T., Ubell, M., Narayan, A., Johnson, G., Wolf, G. T., Fisher, S. G. Carey, T. E. 2003. p53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head and Neck*, 25, 654-661.

Brennan, J. A., Boyle, J. O., Koch, W. M., Goodman, S. N., Hruban, R. H., Eby, Y. J., Couch, M. J., Forastiere, A. A. Sidransky, D. 1995. Association between Cigarette Smoking and Mutation of the p53 Gene in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 332, 712-717.

Cappuzzo, F., Hirsch, F. R., Rossi, E., Bartolini, S., Ceresoli, G. L., Bemis, L., Haney, J., Witta, S., Danenberg, K., Domenichini, I., Ludovini, V., Magrini, E., Gregorc, V., Doglioni, C., Sidoni, A., Tonato, M., Franklin, W. A., Crino, L., Bunn, P. A. Varella-Garcia, M. 2005. Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Protein and Gefitinib Sensitivity in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 643-655.

Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. Gerdes, J. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Pathology*, 168, 357-63.

Chang, I. Y., Kim, M. H., Kim, H. B., Lee, D. Y., Kim, S. H., Kim, H. Y. You, H. J. 2005. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 225-33.

Cobo, M., Isla, D., Massuti, B., Montes, A., Sanchez, J. M., Provencio, M., Vinolas, N., Paz-Ares, L., Lopez-Vivanco, G., Munoz, M. A., Felip, E., Alberola, V., Camps, C., Domine, M., Sanchez, J. J., Sanchez-Ronco, M., Danenberg, K., Taron, M., Gandara, D., Rosell, R. 2007. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 25, 2747-54.

Conklin, C., Huntsman, D., Yorlida, E., Makretsov, N., Turbin, D., Bechberger, J. F., Sin, W. C., Naus, C. C. 2007. Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Cancer Letters*, 255, 284-294.

Cullen, K. J., Schumaker, L., Nikitakis, N., Goloubeva, O., Tan, M., Sarlis, N. J., Haddad, R. I., Posner, M. R. 2009. beta-Tubulin-II expression strongly predicts outcome in patients receiving induction chemotherapy for locally advanced squamous carcinoma of the head and neck: a companion analysis of the TAX 324 trial. *J Clin Oncol*, 27, 6222-8.

D'souza, G., Agrawal, Y., Halpern, J., Bodison, S., Gillison, M. L. 2009. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 1263-1269.

Day, G. L., Blot, W. J., Shore, R. E., McLaughlin, J. K., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Liff, J. M., Preston-Martin, S., Sarkar, S., Schoenberg, J. B., J.F., F. 1994. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J Natl Cancer Inst*, 86, 131-7.

De Azambuja, E., Cardoso, F., De Castro, G., Jr., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M. J., Paesmans, M. 2007. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*, 96, 1504-13.

De Cassia Braga Ribeiro, K., Kowalski, L. P., Latorre Mdo, R. 2003. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129, 219-28.

Denoix, P. 1944. *Bull Inst Nat Hyg (Paris)* 1:(1-69) : 52-82.



Diffley, J. F. X. 2004. Regulation of Early Events in Chromosome Replication. *Current Biology*, 14, R778-R786.

Doll, R.Hill, A. B. 1950. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*, 2, 739-48.

Farrow, D. C., Vaughan, T. L., Berwick, M., Lynch, C. F., Swanson, G. M.Lyon, J. L. 1998. Diet and nasopharyngeal cancer in a low-risk population. *International Journal of Cancer*, 78, 675-679.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D.Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.

Forbes, S. A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S., Kok, C. Y., Jia, M., De, T., Teague, J. W., Stratton, M. R., Mcdermott, U.Campbell, P. J. 2015. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*, 43, D805-11.

Foulkes, W. D., Brunet, J. S., Kowalski, L. P., Narod, S. A.Franco, E. L. 1995. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: A case-control study. *International Journal of Cancer*, 63, 769-773.

Freedman, N. D., Park, Y., Subar, A. F., Hollenbeck, A. R., Leitzmann, M. F., Schatzkin, A.Abnet, C. C. 2008. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 122, 2330-2336.

Garewal, H. S.Schantz, S. 1995. Emerging role of beta-carotene and antioxidant nutrients in prevention of oral cancer. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 121, 141-144.

Gentile, A., Trusolino, L.Comoglio, P. 2008. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27, 85-94.

Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V.Sidransky, D.

2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 709-720.

Goldenberg, D., Benoit, N. E., Begum, S., Westra, W. H., Cohen, Y., Koch, W. M., Sidransky, D., Califano, J. A. 2004. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, 114, 1027-1031.

Gonzalez-Moles, M. A., Esteban, F., Rodriguez-Archilla, A., Ruiz-Avila, I., Gonzalez-Moles, S. 2002. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol*, 38, 394-7.

Goodenough, D. A., Goliger, J. A., Paul, D. L. 1996. Connexins, Connexons, and Intercellular Communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 475-502.

Gordon, I., Boffetta, P., Demers, P. A. 1998. A case study comparing a meta-analysis and a pooled analysis of studies of sinonasal cancer among wood workers. *Epidemiology*, 9, 518-524.

Grandis, J. R., Tweardy, D. J. 1993. Elevated levels of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research*, 53, 3579-3584.

Grégoire V., L. J.-L., Licitra L., Felip E. 2010. Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 21 (Suppl 5), vi184-vi186.

Handra-Luca, A., Hernandez, J., Mountzios, G., Taranchon, E., Lacau-St-Guily, J., Soria, J. C., Fouret, P. 2007. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13, 3855-9.

Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chu, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daut, A. W., Fabianova, E., Wunsch, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf, J., Olshan, A. F., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q. Y., Winn, D. M.,

Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z. F., Berthiller, J., Boffetta, P. 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99, 777-789.

Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S. C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Lence, J. J., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., McClean, M. D., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Purdue, M., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Shangina, O., Pilarska, A., Zhang, Z. F., Ferro, G., Berthiller, J., Boffetta, P. 2009. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 541-50.

Hermanek, P., Sobin, L. H. *TNM classification of malignant tumours*, Springer-Verlag, New York 1987.

Herrero, R., Castellsagué, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernández, L., Idris, A., Sánchez, M. J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F. X., Reidel, U., Snijders, P. J. F., Meijer, C. J. L. M., Viscidi, R., Muñoz, N., Franceschi, S. Group, F. T. I. M. O. C. S. 2003. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1772-1783.

Hoffmann, D., Hoffmann, I., El-Bayoumy, K. 2001. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol*, 14, 767-90.

Itoh, S., Matsui, K., Furuta, I., Takano, Y. 2003. Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. *Oral Oncol*, 39, 829-35.

Janssen-Timmen, U., Traub, O., Dermietzel, R., Rabes, H. M., Willecke, K. 1986. Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody. *Carcinogenesis*, 7, 1475-1482.

Jawhar, N. M. T. 2009. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine*, 29, 123-127.

Johnson, R. E., Sigman, J. D., Funk, G. F., Robinson, R. A. Hoffman, H. T. 1997. Quantification of surgical margin shrinkage in the oral cavity. *Head Neck*, 19, 281-6.

Jordan, R. C., Lingen, M. W., Perez-Ordenez, B., He, X., Pickard, R., Koluder, M., Jiang, B., Wakely, P., Xiao, W. Gillison, M. L. 2012. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 36, 945-54.

Jun, H. J., Ahn, M. J., Kim, H. S., Yi, S. Y., Han, J., Lee, S. K., Ahn, Y. C., Jeong, H. S., Son, Y. I., Baek, J. H. Park, K. 2008. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *British Journal of Cancer*, 99, 167-172.

Kowalski, L. P. Carvalho, A. L. 2001. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol*, 37, 94-8.

Kraxner, H., Tamas, L., Safrany, G., Ribari, O., Olah, I., Hidvegi, E., Repassy, G. Szende, B. 2001. Apoptotic and mitotic activity in squamous cell carcinoma cells after combined modality treatment with gamma-irradiation and dibromodulcitol. *Cell Biol Int*, 25, 599-606.

Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P. Franceschi, S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14, 467-475.

Kreimer, A. R., Johansson, M., Waterboer, T., Kaaks, R., Chang-Claude, J., Drogen, D., Tjonneland, A., Overvad, K., Quiros, J. R., Gonzalez, C. A., Sanchez, M. J., Larranaga, N., Navarro, C., Barricarte, A., Travis, R. C., Khaw, K. T., Wareham, N., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Peeters, P. H., Panico, S., Masala, G., Grioni, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-De-Mesquita, H. B., Laurell, G., Hallmans, G., Manjer, J., Ekstrom, J., Skeie, G., Lund, E., Weiderpass, E., Ferrari, P., Byrnes, G., Romieu, I., Riboli, E., Hildesheim, A., Boeing, H., Pawlita, M. Brennan, P. 2013. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 31, 2708-15.

Kumar, N. M.Gilula, N. B. 1996. The gap junction communication channel. *Cell*, 84, 381-8.

Langford, A., Langer, R., Lobeck, H., Stolpmann, H. J., Pohle, H. D., Reichart, P.Bier, J. 1995. Human immunodeficiency virus-associated squamous cell carcinomas of the head and neck presenting as oral and primary intraosseous squamous cell carcinomas. *Quintessence Int*, 26, 635-54.

Larsson, P. A., Edstrom, S., Westin, T., Nordkvist, A., Hirsch, J. M.Vahlne, A. 1991. Reactivity against herpes-simplex virus in patients with head and neck-cancer. *International Journal of Cancer*, 49, 14-18.

Leite, I. C.Koifman, S. 1998. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol*, 34, 347-52.

Lesko, E.Majka, M. 2008. The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. *Front Biosci*, 13, 1271-80.

Lewin, F., Norell, S. E., Johansson, H., Gustavsson, P., Wennerberg, J., Biorklund, A.Rutqvist, L. E. 1998. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck - A population-based case-referent study in Sweden. *Cancer*, 82, 1367-1375.

Liebowitz, D. 1994. Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein-Barr virus association. *Semin Oncol*, 21, 376-81.

Lodder, W. L., Pameijer, F. A., Rasch, C. R., Van Den Brekel, M. W.Balm, A. J. 2012. Prognostic significance of radiologically determined neck node volume in head and neck cancer: a systematic review. *Oral Oncol*, 48, 298-302.

Loree, T. R.Strong, E. W. 1990. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg*, 160, 410-4.

Lowe, D.Fletcher, C. D. 1984. Eosinophilia in squamous cell carcinoma of the oral cavity, external genitalia and anus--clinical correlations. *Histopathology*, 8, 627-32.

Machiels, J.-P. H., Haddad, R. I., Fayette, J., Licitra, L. F., Tahara, M., Vermorken, J. B., Clement, P. M., Gauler, T., Cupissol, D., Grau, J. J., Guigay, J., Caponigro, F., De

Castro, G., Jr., De Souza Viana, L., Keilholz, U., Del Campo, J. M., Cong, X. J., Ehrnrooth, E., Cohen, E. E. W. Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 16, 583-594.

Massano, J., Regateiro, F. S., Januario, G., Ferreira, A. 2006. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102, 67-76.

Matsumoto, M., Komiyama, K., Okaue, M., Shimoyama, Y., Iwakami, K., Namaki, S., Tanaka, H., Moro, I., Sato, H. 1999. Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki67. *Journal of Oral Science*, 41, 53-6.

Miyamoto, R., Uzawa, N., Nagaoka, S., Hirata, Y., Amagasa, T. 2003. Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 39, 610-8.

Nasman, A., Attner, P., Hammarstedt, L., Du, J., Eriksson, M., Giraud, G., Ahrlund-Richter, S., Marklund, L., Romanitan, M., Lindquist, D., Ramqvist, T., Lindholm, J., Sparen, P., Ye, W., Dahlstrand, H., Munck-Wikland, E., Dalianis, T. 2009. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*, 125, 362-6.

Naus, C. C., Laird, D. W. 2010. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10, 435-441.

Network, N. C. C. *Head and Neck Cancers (v.1.2015)* [Online]. Available: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/head-and-neck.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf) [Accessed 2015.08.08].

Nilsson, K., Svensson, S., Landberg, G. 2004. Retinoblastoma protein function and p16INK4a expression in actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin and links between p16INK4a expression and infiltrative behavior. *Modern Pathology*, 17, 1464-74.

O-Charoenrat, P., Pillai, G., Patel, S., Fisher, C., Archer, D., Eccles, S. Rhys-Evans, P. 2003. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncology*, 39, 386-390.

Parkin, D. M., Pisani, P. Ferlay, J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49, 33-64, 1.

Perisanidis, C., Perisanidis, B., Wrba, F., Brandstetter, A., El Gazzar, S., Papadogeorgakis, N., Seemann, R., Ewers, R., Kyzas, P. A. Filipits, M. 2012. Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 41, 40-46.

Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S. Hainaut, P. 2002. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 21, 7435-51.

Piccirillo, J. F. 2000. Importance of comorbidity in head and neck cancer. *Laryngoscope*, 110, 593-602.

Pich, A., Chiusa, L. Navone, R. 2004. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*, 15, 1319-29.

Piffko, J., Bankfalvi, A., Ofner, D., Rasch, D., Joos, U. Schmid, K. W. 1997. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol*, 182, 450-6.

Poeta, M. L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J. A., Ridge, J. A., Goodwin, J., Kenady, D., Saunders, J., Westra, W., Sidransky, D. Koch, W. M. 2007. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 357, 2552-61.

Pollack, A., Desilvio, M., Khor, L. Y., Li, R., Al-Saleem, T. I., Hammond, M. E., Venkatesan, V., Lawton, C. A., Roach, M., 3rd, Shipley, W. U., Hanks, G. E. Sandler, H. M. 2004. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *J Clin Oncol*, 22, 2133-40.

Prosnitz, R. G., Yao, B., Farrell, C. L., Clough, R., Brizel, D. M. 2005. Pretreatment anemia is correlated with the reduced effectiveness of radiation and concurrent chemotherapy in advanced head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 61, 1087-95.

Rákregiszter, N. 2011. 2010-ben felfedezett és bejelentett új rosszindulatú daganatok. 2011.10.17. ed. Nemzeti Rákregiszter: Nemzeti Rákregiszter és Biostatistikai Központ.

Rampias, T., Giagini, A., Siolos, S., Matsuzaki, H., Sasaki, C. T., Scorilas, A., Psyrri, A. 2014. RAS/ PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*.

Raybaud, H., Odin, G., Fafet, A., Santini, J., Monteil, R. A. 2003. [Genic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature]. *Pathol Biol (Paris)*, 51, 176-84.

Repassy, G., Czigner, J., Ribari, O., Lapis, K. 1988. The barrier-like role of activated connective tissue against the spread of supraglottic laryngeal carcinoma. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 245, 151-154.

Ribeiro, K. C., Kowalski, L. P., Latorre, M. R. 2000. Impact of comorbidity, symptoms, and patients' characteristics on the prognosis of oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 126, 1079-85.

Ries, L. A. G., Hirschtick, A. J., Keel, G. E., Eisner, M. P., Lin, Y. D., Horner, M. J. (Editors) 2007. SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. . Bethesda: National Cancer Institute, SEER Program.

Roland, N. J., Caslin, A. W., Bowie, G. L., Jones, A. S. 1994. Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 19, 13-18.

Sale, K. A., Wallace, D. I., Girod, D. A., Tsue, T. T. 2004. Radiation-induced malignancy of the head and neck. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 131, 643-645.



Sarini, J., Fournier, C., Lefebvre, J. L., Bonafos, G., Van, J. T.Coche-Dequeant, B. 2001. Head and neck squamous cell carcinoma in elderly patients - A long-term retrospective review of 273 cases. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 127, 1089-1092.

Schneider, B., Teschner, M., Sudermann, T., Pikula, B.Lautermann, J. 2002. Expression of Gap Junction Proteins (Connexin 26, 30, 32, 43) in Normal Mucosa, Hyperkeratosis and Carcinoma of the Human Larynx. *ORL*, 64, 324-329.

Seiwert Ty, H. R., Gupta S, Et Al 2015. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients (pts) with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): Preliminary results from KEYNOTE-012 expansion cohort. *J Clin Oncol*, 33.

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-7.

Shiga, H., Heath, E. I., Rasmussen, A. A., Trock, B., Johnston, P. G., Forastiere, A. A., Langmacher, M., Baylor, A., Lee, M.Cullen, K. J. 1999. Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 5, 4097-104.

Shpitzer, T., Chaimoff, M., Gal, R., Stern, Y., Feinmesser, R.Segal, K. 1996. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 122, 865-8.

Singh, B., Bhaya, M., Zimblar, M., Stern, J., Roland, J. T., Rosenfeld, R. M., Har-El, G.Lucente, F. E. 1998. Impact of comorbidity on outcome of young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 20, 1-7.

Sittel, C., Eckel, H. E., Damm, M., Von Pritzbuer, E.Kvasnicka, H. M. 2000. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 110, 1012-1017.

Smeets, S. J., Hesselink, A. T., Speel, E.-J. M., Haesevoets, A., Snijders, P. J. F., Pawlita, M., Meijer, C. J. L. M., Braakhuis, B. J. M., Leemans, C. R.Brakenhoff, R. H. 2007. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin

embedded head and neck cancer specimen. *International Journal of Cancer*, 121, 2465-2472.

Sohl, G.Willecke, K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, 62, 228-32.

Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Freilino, M. L., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B. Grandis, J. R. 2006. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res*, 12, 5064-73.

Somers, K. D., Merrick, M. A., Lopez, M. E., Incognito, L. S., Schechter, G. L. Casey, G. 1992. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Research*, 52, 5997-6000.

Sun, W. H., Liu, H. M., Li, Y. J., Ji, X. R. Liang, D. P. 2004. [A study of the relationship between the expression of connexin43, E-cadherin and biological behaviors of human laryngeal cancer]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 39, 293-7.

Szabo, B., Nelhubel, G. A., Karpati, A., Kenessey, I., Jori, B., Szekely, C., Petak, I., Lotz, G., Hegedus, Z., Hegedus, B., Fule, T., Dome, B., Timar, J. Tóvári, J. 2011. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 47, 487-496.

Szentkúti G, B. D., Dános K, Birtalan E, Tamás L 2014. A fej-nyaki daganatok magas incidenciájának és mortalitásának okai hazánkban. *Otorhinolaryngologia Hungarica*, 60, 77-80.

Takes, R. P. 2004. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol*, 40, 656-67.

Takes, R. P., Baatenburg De Jong, R. J., Schuurung, E., Hermans, J., Vis, A. A., Litvinov, S. V. Van Krieken, J. H. 1997. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 123, 412-9.

Tamas, L., Kraxner, H., Mechtler, L., Repassy, G., Ribari, O., Hirschberg, A., Szentkuti, G., Jaray, B.Szentirmay, Z. 2000. Prognostic significance of P53 histochemistry and DNA histogram parameters in head and neck malignancies. *Anticancer Research*, 20, 4031-4038.

Tandon, S., Tudur-Smith, C., Riley, R. D., Boyd, M. T.Jones, T. M. 2010. A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 19, 574-587.

Teleki, I., Szasz, A. M., Maros, M. E., Gyorffy, B., Kulka, J., Meggyeshazi, N., Kiszner, G., Balla, P., Samu, A.Krenacs, T. 2014. Correlations of Differentially Expressed Gap Junction Connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with Breast Cancer Progression and Prognosis. *PLoS ONE*, 9, e112541.

Temam, S., Flahault, A., Perie, S., Monceaux, G., Coulet, F., Callard, P., Bernaudin, J. F., St Guily, J. L.Fouret, P. 2000. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol*, 18, 385-94.

Terakado, N., Shintani, S., Yano, J., Chunnan, L., Mihara, M., Nakashiro, K.Hamakawa, H. 2004. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 40, 383-9.

The Cancer Genome Atlas, N. 2015. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517, 576-582.

Thomas, G. T., Lewis, M. P.Speight, P. M. 1999. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol*, 35, 227-33.

Vader, G.Lens, S. M. A. 2008. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1786, 60-72.

Vaughan, T. L., Stewart, P. A., Davis, S.Thomas, D. B. 1997. Work in dry cleaning and the incidence of cancer of the oral cavity, larynx, and oesophagus. *Occupational and Environmental Medicine*, 54, 692-695.

Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kaweckki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N.Hitt, R. 2008. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359, 1116-27.

Weiss, R. A.Vogt, P. K. 2011. 100 years of Rous sarcoma virus. *The Journal of Experimental Medicine*, 208, 2351-2355.

Westra, W. H. 2012. The Morphologic Profile of HPV-Related Head and Neck Squamous Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Clinical Management. *Head and Neck Pathology*, 6, 48-54.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U.Sohl, G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*, 383, 725-737.

Woolgar, J. A., Rogers, S. N., Lowe, D., Brown, J. S.Vaughan, E. D. 2003. Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol*, 39, 130-7.

Xie, X., Clausen, O. F.Boysen, M. 2002. Prognostic significance of p21waf1/cip1 expression in tongue squamous cell carcinomas. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 128, 897-902.

Yano, T., Fujimoto, E., Hagiwara, H., Sato, H., Yamasaki, H., Negishi, E.Ueno, K. 2006. Connexin 32 as an Anti-invasive and Anti-metastatic Gene in Renal Cell Carcinoma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 1991-1994.

Zigon, G., Berrino, F., Gatta, G., Sanchez, M. J., Van Dijk, B., Van Eycken, E., Francisci, S.Group, E. W. 2011. Prognoses for head and neck cancers in Europe diagnosed in 1995-1999: a population-based study. *Ann Oncol*, 22, 165-74.

## 11. Saját publikációk jegyzéke:

### A disszertációban felhasznált publikációk

**Danos K**, Brauswetter D, Birtalan E, Pato A, Bencsik G, Krenacs T, Petak I, Tamas L  
The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas

APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY In press: p. In press. (2015)

DOI: 10.1097/PAI.0000000000000212

Szentkuti G, **Danos K**, Brauswetter D, Kiszner G, Krenacs T, Csako L, Repassy G, Tamas L

Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 21:(3) pp. 643-650. (2015)

DOI: 10.1007/s12253-014-9869-4

### A témához kapcsolódó, de a disszertációban fel nem használt publikációk:

Szentkuti G, Brauswetter D, **Danos K**, Birtalan E, Tamas L

A fej-nyaki daganatok magas incidenciájának és mortalitásának okai hazánkban.

**OTORHINOLARYNGOLOGIA HUNGARICA** 60:(3) pp. 77-80. (2014)

Tamas L, Szentkuti G, Eros M, **Danos K**, Brauswetter D, Szende B, Zsakovics I, Krenacs T

Differential Biomarker Expression in Head and Neck Cancer Correlates with Anatomical Localization

**PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH** 17:(3) pp. 721-727. (2011)

DOI: 10.1007/s12253-011-9376-9

## **12. Köszönetnyilvánítás**

Hangsúlyozott köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Tamás Lászlónak a dolgozat elkészítéséhez nyújtott hathatós segítségével, valamint szakmai és erkölcsi ösztönzéséért.

Köszönet illeti továbbá Dr. Brauswetter Diánát, a fluorescens in situ hybridizációs vizsgálatok elvégzéséért, az immunhisztokémiai festésben nyújtott segítségével, valamint szakmai és baráti támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Krenács Tibornak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett laborban végezzük az immunhisztokémiai vizsgálatokat, valamint rendkívül értékes szakmai tanácsaival segítette munkánkat.

Köszönöm Dr. Kiszner Gergőnek és Balla Péternek az immunhisztokémiai módszerek, valamint a digitális metszetceldolgozás beállításához nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti lelkes TDK-hallgatóinkat, valamint Dr. Birtalan Edét, amiért segítettek a szövettani metszeteink kiértékelésében.

Hálásan köszönöm szüleimnek a folyamatos ösztönzést és bátorítást, amely nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom feleségemnek a PhD munka, valamint a dolgozat megírása alatt nyújtott folyamatos támogatásért.