

# A fej-nyaki daganatok progressziós és prognosztikai faktorainak vizsgálata

Doktori tézisek

**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

# Bevezetés

## Általános megfontolások

Fej-nyaki daganatok (HNC – Head and Neck Carcinoma) megnevezés alatt – szoros értelemben – a fej és a nyak nyálkahártyáiból kiinduló tumoros megbetegedéseket értjük. E daganatok mintegy 90%-a laphámrák. A 2015-ös GLOBOCAN adatai alapján évente mintegy 600 000 új fej-nyaki tumoros betegséget fedeznek fel világszerte. Magyarországon ez a szám átlagosan 5000 új eset/év. Mortalitását tekintve ez a betegcsoport igen nagy változatosságot mutat, a korai stádiumú (T1-2N0M0) tumoros betegek 5 éves túlélése 80-90% között van. A lokoregionálisan előrehaladott betegségben (T3-4N0M0 vagy T1-4N1-3M0) szenvedők 5 éves túlélése 40-50% közé tehető, míg a recidív/metasztatikus tumoros betegek medián túlélése 7-9 hónap.

A prognózist meghatározó tényezők közül kiemelendő a TNM-stádium, a betegség lokalizációja, a fennálló társbetegségek, a tumoros infiltráció mélysége, valamint áttétes nyirokcsomó esetén az extrakapszuláris terjedés fennállása vagy hiánya. Fontos prognosztikai faktor továbbá a humán papillomavírus (HPV)-státusz, ismert, hogy a HPV-pozitív tumorok prognózisa szignifikáns mértékben jobb a HPV-negatív, dohányzás/alkoholfogyasztás által indukált daganatokénál.

## A vizsgált markerek

*p16*

A p16<sup>INK4</sup> egy ciklin-dependens kináz gátló, amely az aktív ciklin D - CDK 4/6 komplex kialakulását gátolja. Ennek eredményeként

elmarad a retinoblasztóma fehérje foszforilációja, így a sejtciklus leáll a G1 fázisban. Az utóbbi évtizedben több publikáció jelent meg azzal kapcsolatban, hogy a p16<sup>INK4</sup> fokozott termelődése a fej-nyaki tumorokban az esetek mintegy 80%-ában összefüggésben áll a HPV-pozitivitással, így felhasználható ún. helyettesítő (surrogate) markerként a vírus indukálta daganatok kimutatására.

#### *Ki67*

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 felhasználható, mint proliferációs marker.

#### *p53*

A p53 legfontosabb funkciója annak megakadályozása, hogy a kijávitatlan génhibákat a sejtek az utódsejteknek továbbadják - ezért nevezik a p53-at a genom őrzőjének. Az alkoholfogyasztás, illetve dohányzás asszociált fej-nyaki daganatokban igen gyakori a p53 funkciójának génmutáció okozta kiesése. Egyes vizsgálatok alapján fokozott termelődése rossz prognózissal társul fej-nyaki daganatokban.

#### *EGFR*

Az 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.

#### *Connexin 43*

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. Jelenleg 21 connexin izoforma ismert, amelyek mind méretükben, mind töltés-specifitásukban különböznek. Ismert, hogy a fehérje expressziója emlő tumorban és vesesejtes rákban csökkent, továbbá az, hogy a csökkent termelődés egyes tumorok esetében rosszabb prognózissal társul.

#### *Foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K)*

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.

#### *c-MET*

A c-MET egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptor, amelynek ligandja a HGF (hepatocita növekedési faktor). A fehérje szerepet játszik az EMT-ben (epithelialis-mesenchimalis tranzíció), a proliferációban, migrációban továbbá az invázióban. Fokozott termelődése gyakori laphámrákokban, és gyakran rossz prognózissal társul.

# 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, amelyek 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.

# Módszerek

## Beteganyag

A kutatás során a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház fül-orr-gégészeti osztályán, 2000 és 2008 között, fej-nyaki laphámrák miatt kezelt betegek tumormintáit használtuk fel. Két kohorszot vizsgáltunk, az egyikben a betegek sebészi, ill. irradiációs kezelésben részesültek, számuk 226 volt. A másik kohorszban 90 beteg szerepelt, az ő esetükben a primer terápia irradiációs kezelés volt.

## Szövetteni feldolgozás

A betegek mintáiból ún. TMA (Tissue Microarray – szöveti mikrochip) blokkokat készítettünk. Ezt követően elvégeztük az immunhisztokémiai festéseket a fent részletezett markerekkel, illetve a PI3K és c-MET amplifikáció/poliszómia vizsgálatára a fluorescens in situ hibridizációs (FISH) reakciókat.

A metszeteket ezt követően digitalizáltuk.

## Szövetteni kiértékelés, statisztikai feldolgozás

A szövetteni kiértékelés számítógépen, a Panoramic Viewer alkalmazással történt (3DHISTECH). A kiértékelést 3 független elemző végezte. Az immunhisztokémiai kiértékelésnél a tumorsejtek festődési aránya alapján, 4-fokozatú skálán osztályoztuk a metszeteket: I: 0-5%; II: 6-20%; III: 21-60%; IV: 61-100%. A kiértékelést követően az eredményeket dichotomizáltuk. FISH esetében egy módosított Cappuzzo-féle rendszert használtunk, a 2, 3, illetve 4 és afeletti géntartalmat valamint a gén/kromoszóma arányt

regisztráltuk. Ezek alapján különítettünk el diszómias, triszómias, poliszómias mintákat, valamint amplifikációt.

A statisztikai analízis során Pearson-féle khi-négyszet próbát, illetve Fischer-féle egzakt tesztet használtunk, a túlélési analízisekhez Kaplan-Meier analízist log-rank teszttel, valamint Cox-féle regressziót végeztünk. Szignifikancia szintnek a 0,05-ös értéket tekintettük.

# Eredmények

## *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.

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% ( $P = 0,023$ ).

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

Szignifikáns összefüggést találtunk a Ki67 fehérje expressziója és a betegek túlélése között: a Ki67-pozitív tumoral rendelkező betegek túlélése rosszabb a Ki67-negatív tumoros betegekéhez képest (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 vizsgálatakor 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 ( $P = 0,007$ ).



*3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve a hepatocita növekedési faktor-receptor (c-MET) citogenetikai eltérései összefüggenek-e a daganatos betegség stádiumával*

Az említett gének citogenetikai eltérései, illetve a fej-nyaki daganatos betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálatok azt találtuk, hogy a PIK3CA (a PI3K génjének katalitikus alegysége) emelkedett kópiaszáma (amplifikáció, ill. magas fokú poliszómia) szignifikáns mértékben magasabb arányú volt az előrehaladott T-stádiumban lévő betegeknél ( $P=0,008$ ). Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a c-MET, illetve a daganatos betegség stádiuma között.

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

Erős pozitív összefüggést találtunk a betegek betegség-specifikus 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  $P=0,004$ ). Szignifikáns összefüggést találtunk továbbá a Cx43 és a p53 fehérje között: a fokozott p53 expresszió magas connexin 43 szinttel társult ( $P=0,036$ ).

## Következtetések

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: a 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.

Figyelembe véve a tényt, hogy a fej-nyaki rákok közül a hypopharynx tumorai járnak a legrosszabb prognózissal, míg a glottikus daganatok a legjobb túlélési mutatókkal, felmerül, hogy e jelenség hátterében a hypopharynx tumorok magasabb proliferációs aktivitása (ill. Ki67-pozitivitása)

3. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K), illetve hepatocita növekedési faktor receptor (c-MET) citogenetikai eltérései, valamint a betegség stádiuma közötti összefüggés vizsgálatakor azt az eredményt kaptuk, hogy a PI3K esetében az emelkedett gének számú előrehaladott T-stádiummal párosult. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a cMET és a betegség stádiuma között.

4. A connexin 43 fehérje fej-nyaki tumorokban 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 káros p53-expresszió. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Cx43-expresszió zavara elsősorban nem a mutáns p53 által dominált daganatokban fordul elő.

## 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