

A p16 tumorszuppresszor expressziójának prognosztikai szerepe magyarországi szájüregi laphámrákokban

Vánkos Borbála Judit¹, Piurkó Violetta¹, Suba Zsuzsanna², Németh Zsolt²,
Tímár József, Kenessey István^{1,3}

Semmelweis Egyetem, ¹II. Sz. Patológia Intézet, ²Arc-, Állcsont-, Szájsebészeti és Fogászati Klinika, ³Országos Onkológiai Intézet, Nemzeti Rákregiszter és Biostatistikai Központ

Finanszírozási adatok: Kenessey István a Magyar Tudományos Akadémia – Bolyai János Kutatási Ösztöndíjprogram résztvevője. A kutatást továbbá az OTKA PD109580-as számú pályázata is támogatta.

A fej-nyaki régió laphámrákjának legfontosabb rizikófaktorai az alkohol- és dohányexpozíció, illetve a humán papillómavírussal (HPV) való fertőzés, mely utóbbi alcsoport jóval kedvezőbb klinikai prognózist mutat. A p16 tumorszuppresszor sejten belüli szintje magas kockázatú HPV-fertőzés mellett megemelkedik, ami lehetőséget teremt arra, hogy molekuláris diagnosztikai módszerek helyett immunhisztokémia segítségével diagnosztizáljuk a fertőző ágens jelenlétét. A témában megjelent legtöbb kutatás a fej-nyaki régió egészére fókuszált, és nem kezelte külön a szájüregi lokalizációt. Munkánk során a szájüregi régióból műtétielt eltávolított 67 rosszindulatú laphámraganatot p16-expresszióját vizsgáltuk, és vetettük össze a fej-nyaki régióban rutinszerűen meghatározott klinikopatológiai paraméterekkel. A műtéti anyagokból tissue microarray (TMA) blokkokat készítettünk, majd immunhisztokémiai vizsgálat segítségével megvizsgáltuk a p16, illetve több más ismert molekuláris marker (p53, Ki67, EGFR) expresszióját. A fej-nyaki régió laphámrákjait taglaló szakirodalmi adatokkal ellentétben saját szájüregi anyagunkban nem kaptunk összefüggést a fő klinikai paraméterekkel, a p16-pozitivitás csupán a recidíva tekintetében jelentett kedvező prognózist. A magi p53-pozitivitás főként a fiatalabb betegcsoportra volt jellemző. A p53- és az EGFR-expresszió statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott egymással. Megállapítottuk, hogy a fej-nyaki laphámrákokban alkalmazott molekuláris csoportosítás nem adaptálható teljes egészében a hazai szájüregi laphámrákokra. Felmerül az egyes etiológiai tényezők (HPV, dohányzás, alkohol) ko-expozíciós szerepe, ami megnehezíti az egyes kategóriák elkülönítését. Magyar Onkológia 59:352–359, 2015

Kulcsszavak: szájüregi daganatok, laphámrák, HPV, p16, prognózis

Beside smoking and alcohol consumption, human papillomavirus (HPV) infection is the most common risk factor of squamous cell carcinoma in the head and neck region (HNSCC). The latter group of patients associates with better prognosis. During HPV infection, the level of p16 tumor suppressor elevates, which could give an additional opportunity for diagnosis: instead of molecular diagnostic tools, the application of immunohistochemistry is acceptable. However, the majority of the published studies focused on the whole head and neck region and did not separately handled cancers of the oral cavity. Our recent work analyzed the expression of p16 in 67 oral squamous cancers, and compared to routine clinicopathologic parameters. From surgical samples tissue microarray blocks were

Levelezési cím: Dr. Kenessey István, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológia Intézet,
1091 Budapest, Üllői út 93. Tel.: +36-1-215-7300/53460, e-mail: steveken12@yahoo.com

Közlésre érkezett: 2015. szeptember 15. • Elfogadva: 2015. október 25.

prepared and expression of p16 as well as other molecular markers (p53, Ki67, EGFR) were studied. In contrast to previous studies on HNSCC, with the exception of recurrence, the expression of p16 was not found associated to clinicopathologic parameters. Nuclear stabilization of p53 appeared mainly in younger patients. The expression of p53 and EGFR significantly correlated to each other. We concluded that traditional molecular categorization of HNSCC could not be completely adaptable to Hungarian samples. Potential co-exposition of common etiological factors (e.g. HPV, smoking, alcohol) could blur borders between distinct categories.

Vánkos BJ, Piurkó V, Suba Z, Németh Z, Tímár J, Kenessey I. The prognostic role of expression of p16 tumor suppressor gene in Hungarian patients with oral squamous cell carcinoma. *Hungarian Oncology* 59:352–359, 2015

Keywords: oral tumor, squamous cell carcinoma, HPV, p16, prognosis

BEVEZETÉS

Hazánk számos szervrendszer daganatos megbetegedési gyakoriságát tekintve Európában élen jár, kiemelkedően aggasztó a fej-nyaki régió helyzete: 1975 és 1999 között az előfordulási gyakoriság mintegy 250 százalékos növekedést mutatott (1). A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint 2012-ben 2762 férfi és 977 nő új rosszindulatú daganatos megbetegedést diagnosztizáltak, az esetek 90 százaléka laphámrák (2). A fej-nyaki laphámrákos betegek 5 éves túlélése 35 százalék körüli, a halálozást elsősorban a lokális terjedés okozza.

A genetikai fogékonyság mellett a klasszikus környezeti rizikófaktorok közül kiemelhető a dohányzás és az alkoholfogyasztás szerepe (3, 4). Az egyre fiatalabb korosztályból kikerülő, nem dohányzó, alkoholt nem fogyasztó nők és férfiak megbetegedéseinek hátterében azonban a HPV-vel való fertőzöttség sejthető (3).

A HPV (humán papillómavírus) az onkogén DNS-vírusok közé tartozik, magas kockázatba tartozó altípusai (pl. 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39) a sejtciklus befolyásolásával elsősorban cervikális és fej-nyaki daganatok kialakulásában játszanak szerepet. A „high risk” vírusok E7 fehérjéje transzformáló hatását a retinoblasztóma (Rb) és az azonos családba tartozó p107 és p130 molekulák befolyásolásával éri el (5). A sejtciklus során a restrikciós szabályozási pontban a retinoblasztómafehérje köti az E2F transzkripciós faktort, így a sejtosztódás nem megy végbe. Azonban amikor az E7 inaktíválja, majd degradálja az Rb-t, az E2F szabaddá válik, a sejtciklus aktíválódik, korlátlan DNS-szintézis és osztódás megy végbe, ami kedvező környezetet teremt a vírusreplikáció számára (6–9). A p16 tumorsuppresszor viszont a ciklindependens kináz 4-gyel és 6-tal együttműködve fenntartaná az Rb-E2F-komplexet, a fenti inaktiváció tehát a visszacsatolás kiesése miatt végeredményben a p16 fokozott expressziójához vezet.

Ezzel szemben a klasszikus fej-nyaki laphámrákokra inkább a p16 funkcióvesztése jellemző: az esetek 54–82%-ában a molekula mutáció, hipermetiláció vagy a homozigotás elvesztése miatt nem fejeződik ki, ami kedvezőtlen

prognózist jelent (10, 11). Meg kell jegyezni azonban, hogy ugyan a p16-overexpresszió és a HPV-pozitivitás közötti korreláció magas, a két csoport nem teljesen azonos; az esetek körülbelül 15–20%-ában a p16-pozitív minták HPV-negatívnak bizonyulnak (12–15). Mindazonáltal, korábbi vizsgálatok alapján a p16-pozitív alcsoport a prognózist tekintve egységes megjelenést mutatott, akár sikerült igazolni a HPV-fertőzést, akár nem (12, 14, 16). Emiatt a legújabb ajánlások alapján érdemes lenne elvégezni a fej-nyak régió laphámrákjainál a p16 rutinszerű immunhisztokémiai vizsgálatát, mint egy, a vírusspecifikálásnál költségkímélőbb módszert a várható prognózis meghatározására.

Egyébiránt a fej-nyak régió laphámrákjainak jellemzésére jelenleg klasszikus prognosztikai faktorok használhatóak: anatómiai lokalizáció, differenciáltság, stádium, növekedési front, proliferációs aktivitás, ér- és ideginvázio, újabb apoptózisindex, mitózisindex, Ki67- és p53-expresszió (17, 18). Mindazonáltal a szakirodalom többsége nem kezeli külön entitásként a szájüregi laphámrákokat, egységesen a fej-nyak régió laphámrákjairól beszél.

Munkánk során célzottan, szájüregi daganatokra fókuszálva vizsgáltuk a fej-nyaki, illetve egyéb régiókban szokványosan alkalmazott markerek (p16, EGFR, p53) adaptálhatósági lehetőségeit. A vizsgált molekulák expresszióját összevetettük a betegcsoport klinikopatológiai paramétereivel és az anamnesztikus adatokkal. Emellett tanulmányoztuk, hogy a szájüregi daganatok esetében a p16 expressziójának vizsgálata elegendő információt szolgáltat-e a prognózis megadásához és az onkoterápiás tervezéshez, és kiválthatja-e a HPV-tipizálást.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Beteganyag

A vizsgálatainkhoz felhasznált 67 minta a Semmelweis Egyetem Arc-, Állcsont-, Szájsebészeti és Fogászati Klinikájának (Oralpatológiai Osztály) 2009 és 2011 közötti műtéti anyagából származott. A fókuszba bevont betegek életkora a mű-

tétnél a 23–89 év tartományba esett (medián=58,5 év). A betegek kategorizálásához a rendelkezésünkre álló szövettani lelet mellett a Semmelweis Egyetem betegellátó rendszerének (MedSol) adatbázisát vettük irányadónak. A rutin klinikopatológiai paraméterek (pl. stage, grade, reszekciós szél, recidíva) mellett gyűjtöttük a dohányzásra és az alkoholfogyasztásra irányuló adatokat is (1. táblázat). A túlélés tekintetében a Semmelweis Egyetem adatbázisa mellett a Nemzeti Rákregiszter és Biostatistikai Központ adataira támaszkodtunk.

TMA

A paraffinba ágyazott blokkokat a II. Sz. Patológiai Intézetben dolgoztuk fel. Rutin hematoxin-eozin metszet fénymikroszkópos vizsgálata alapján minden anyagból kiválasztottunk két-két daganatos régiót. A megfelelő paraffinos blokkok 2 mm átmérőjű szövethengeréből TMA Master (3D Histech, Magyarország) segítségével tissue microarray blokkokat (TMA) készítettünk (19). A paraffinba ágyazott TMA több anyag szimultán vizsgálatát tette lehetővé ugyanazon antitest segítségével.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai jelölést BenchMark XT IHC/ISH (Roche, Németország) festőautomata segítségével végeztük, az XT UltraView DAB v3 kittel. A deparaffinálás EZ Prep (Ventana, Egyesült Államok) oldattal történt. Az epitópfeltárást két lépésben, előbb 95 °C-on, 30 percig, majd 100 °C-on, 4 percig végeztük Cell Conditioning Solution pH 8 (Ventana) oldattal. A szöveti peroxidáz működését UV INHIBITOR (Ventana) hozzáadásával 37 °C-on, 6 percig inkubálva blokkoltuk.

A primer antitesteknek 37 °C-on 32 perces inkubációs periódusa következett. A használt elsődleges antitestek egér monoklonális IgG típusúak voltak: p53 (Clone DO-7; DAKO, Dánia), Ki67 (Clone MIB-1; DAKO), EGFR (Clone 3C6; Ventana) és p16 (Clone CINtec; Ventana); mindegyiket 1:100 hígításban alkalmaztuk.

Másodlagos antitestként UV HRP UNIV MULT (Ventana) oldatot használtunk, 37 °C-on, 8 percig inkubáltunk. Előhíváshoz DAB (Ventana) kromogént vettünk igénybe. A magfestéshez HEMATOXYILIN II (Ventana) oldatot használtunk. Az egyes lépések között Reaction Buffer Concentrate (Ventana) oldatos mosásokat iktattunk be.

Értékelés

Az immunhisztokémiai jelöléseket fénymikroszkóp segítségével értékeltük ki (1. ábra), az értékelésnél korábban publikált módszerekre, illetve rutin diagnosztikai eljárásokra hivatkoztunk (20, 21). A p16- és p53-expressziót pozitív és negatív festődésű csoportba osztottuk. A Ki67-jelölődés értékelésénél százalékos rendszert alkalmaztunk,

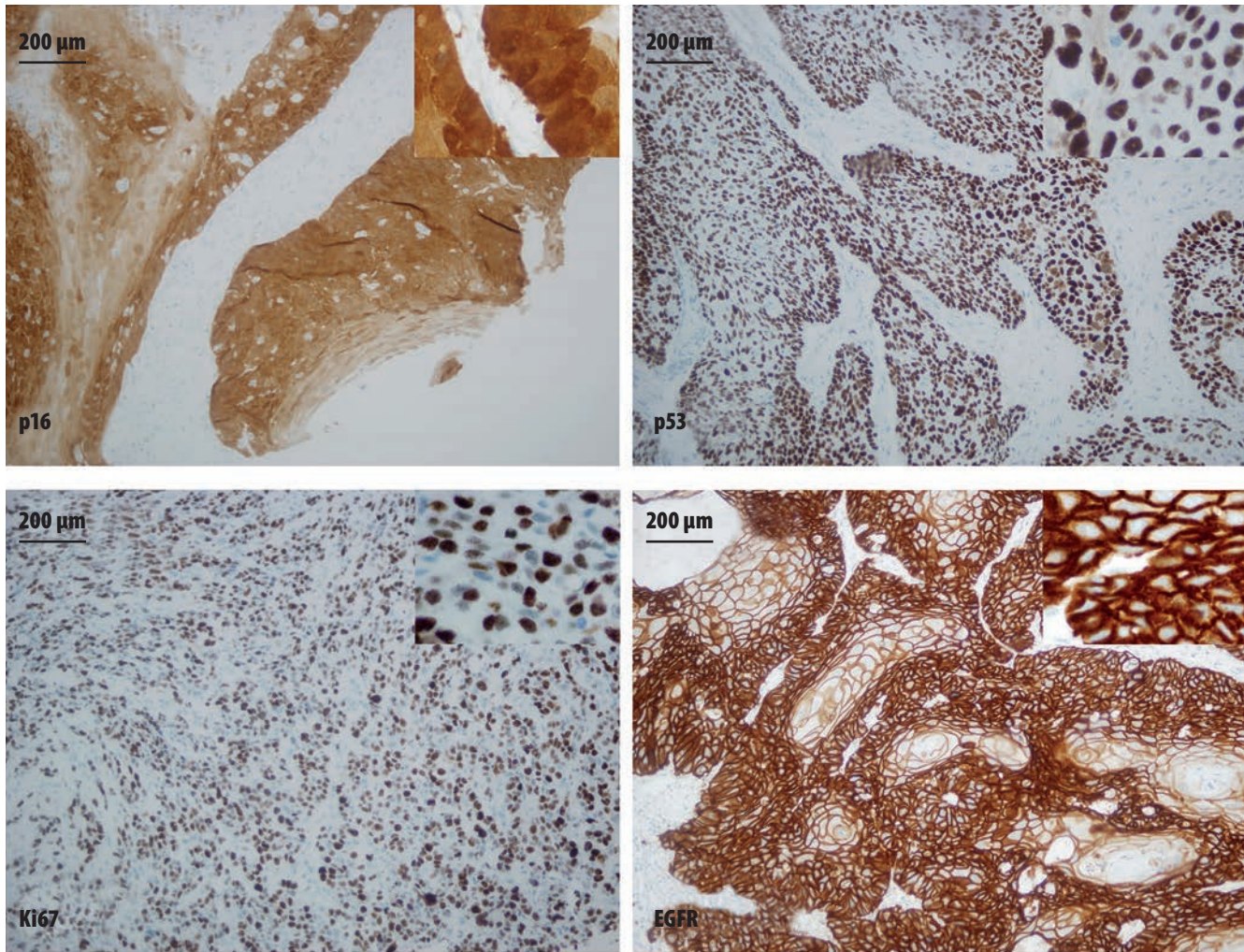
1. táblázat. A vizsgált betegcsoport karakterisztikája

Paraméter		Esetszám (%)
Nem	férfi	40 (59,7%)
	nő	27 (40,3%)
T	T1	4 (6%)
	T2	18 (26,9%)
	T3	33 (49,3%)
	T4	12 (7,5%)
N	N0	39 (58,2%)
	N1	7 (10,4%)
	N2	16 (23,9%)
	Nx	5 (7,5%)
Grade	Grade I	21 (31,3%)
	Grade II	42 (62,7%)
	Grade III	4 (6%)
Reszekciós szél	épben	43 (64,2%)
	nem épben	5 (7,5%)
	nem ismert	19 (28,4%)
Recidíva	igen	24 (35,8%)
	nem	39 (58,2%)
	nem ismert	4 (6%)
Lokalizáció	palatum durum	5 (7,5%)
	regio sublingualis	23 (34,3%)
	lingua	13 (19,4%)
	regio sublingualis + lingua	4 (6%)
	regio submandibularis	2 (3%)
	felső ajak	1 (1,5%)
	alsó ajak	1 (1,5%)
	gingiva mandibulae	9 (13,4%)
	garatívek	3 (4,5%)
	bucca	4 (6%)
	palatum molle	1 (1,5%)
lingua + bucca	1 (1,5%)	
Alkoholfogyasztás	nem	19 (28,4%)
	alkalmanként	19 (28,4%)
	rendszeresen	22 (32,8%)
	nem ismert	7 (10,4%)
Dohányzás	nem	15 (22,4%)
	jelenleg/korábban igen	45 (67,2%)
	nem ismert	7 (10,4%)

a forró pontokban 1000 sejt leszámlálásával adtuk meg a pozitív, illetve negatív reakció mutató sejtek arányát.

Az EGFR értékelésénél a H-score rendszert alkalmaztuk, mely figyelembe veszi a hám festődési intenzitását és a százalékos arányát is. Az intenzitás értéke lehetett 0, ha nem festődött, 1, ha a normálisnál kevésbé volt intenzív a festődés, 2-es kategóriába a normálissal megegyező, míg

1. ábra. Reprezentatív képek az immunhisztokémia segítségével vizsgált markerekről. Az ábrán erős pozitívást mutató esetek láthatóak. A nagy képek 200-szoros, az inzertek 600-szoros nagyítással készültek



a 3-as kategóriába a normálisnál erősebb intenzitású területek számítottak. Az adott intenzitású területek százalékat megszoroztuk az intenzitás értékével, az így kapott H-score értéke 0 és 300 között változhat (22).

A TMA szövetmintánként 2-2 anyagot tartalmazott, a numerikusan jellemzett értékelési módszereknél e kettő átlagával dolgoztunk.

Statisztika

A kategorikus adatok elemzését χ^2 -próba, illetve Fisher-féle egzakt teszt segítségével végeztük el. A nem normális eloszlást követő numerikus változókat Mann-Whitney-teszttel hasonlítottuk össze. A korrelációs együtthatót Spearman-féle rangkorreláció segítségével állapítottuk meg. Numerikus adatoknál a mediánt vettük küszöbértéknek, vizsgálati anyagunkat így transzformáltuk két csoportra.

Az utánkövetésnél a diagnózis felállításától a halálig, illetve az adatbázisokban a legutolsó időpontig terjedő időtartamot vettük figyelembe; az egyes betegcsoportok túlélése közötti különbséget log-rank statisztika segítségével határoztuk meg. Statisztikailag szignifikáns különbségnek azokat az eseteket tüntettük fel, ahol $p < 0,05$. A statisztikai analízist Statistica 12.0 szoftverrel végeztük el (StatSoft, Tulsa, OK).

EREDMÉNYEK

A p16 és az egyes klinikopatológiai és immunhisztokémiai paraméterek

A p16 vizsgálatánál pozitív és negatív csoportot hoztunk létre, pozitívnek az egyértelmű jelölődést tekintettük. Betegcsoportunkban a férfiak körében 11, a nők körében 9 minta,

azaz összesen 20 eset bizonyult pozitívnak, ami a vizsgált minták alig 30%-át jelentette.

A vizsgált klinikopatológiai paramétereket figyelembe véve a p16-pozitivitás a daganatok recidívahajlama tekintetében mutatott szignifikáns különbséget (2. táblázat). A 67 betegnél 24 esetben alakult ki recidíva, és míg a p16-pozitív esetek közül csak 2 recidivált, addig a negatív csoport közel felében újult ki a tumor. Vagyis a p16-pozitív csoportunk a recidíva szempontjából egyértelműen kedvező prognózisúnak bizonyult.

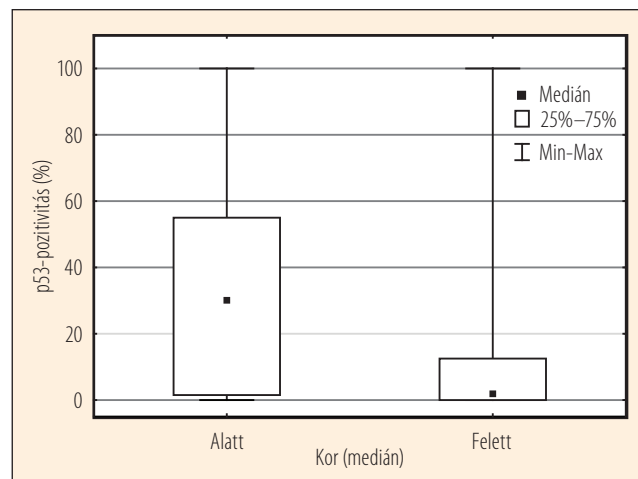
Ugyanakkor a p16-expresszió függetlennek bizonyult a nemtől, az életkortól, a TNM-től, a grade-től és a reszek-

2. táblázat. A p16-expresszió és a vizsgált paraméterek összefüggései

	p16-negatív	p16-pozitív	p
Nem – férfi	29	11	0,609 (χ^2)
Nem – nő	18	9	
Kor <58,5	23	10	0,936 (χ^2)
Kor >58,5	24	10	
T1	3	1	0,718 (χ^2)
T2	14	4	
T3	21	12	
T4	9	3	
N0	28	11	0,319 (χ^2)
N1	3	4	
N2	11	5	
M0	44	19	1 (Fisher)
M1	3	1	
Grade I	14	7	0,558 (χ^2)
Grade II	31	11	
Grade III	2	2	
Reszekció – épbén	30	13	1 (Fisher)
Reszekció – nem épbén	4	1	
Recidíva – nem	24	15	0,01* (Fisher)
Recidíva – igen	22	2	
p53-negatív	14	7	0,674 (χ^2)
p53-pozitív	33	13	
EGFR \leq 200 (medián)	25	13	0,372 (χ^2)
EGFR >200 (medián)	22	7	
Ki67 \leq 7,5% (medián)	24	11	0,768 (χ^2)
Ki67 >7,5% (medián)	23	9	
Dohányzás – nem	13	2	0,313 (Fisher)
Dohányzás – igen	32	13	
Alkohol – nem	11	8	0,076 (χ^2)
Alkohol – alkalmanként	17	2	
Alkohol – rendszeresen	17	5	

*statistikailag szignifikáns

2. ábra. A p53 festődése szájüregi laphámrákos betegek immunhisztokémiai vizsgálata során. A pozitivitás inkább a fiatalabb betegek tumoraira jellemző (Mann–Whitney-teszt, $p=0,01$). A kor mediánja 58,5 év volt



ciós szél érintettségétől. Ezenfelül a p16 expressziója nem mutatott szignifikáns összefüggést a p53-mal, az EGFR-rel és a Ki67-tel sem. A p16-pozitív és -negatív esetek között nem mutatkozott gyakorisági különbség a dohányzás és az alkoholfogyasztás tekintetében sem.

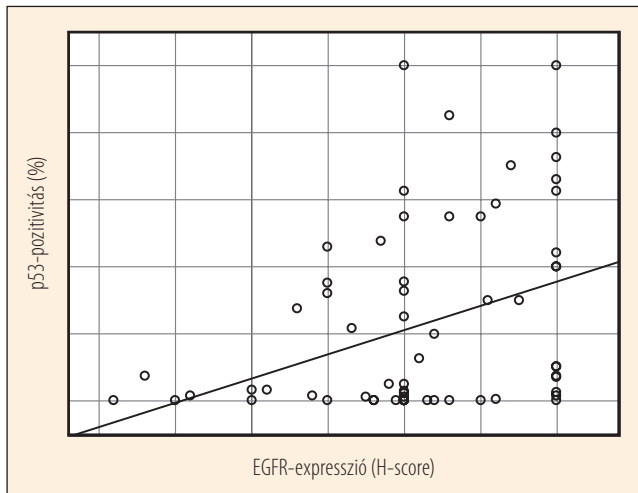
A vizsgált beteganyag további összefüggései

A p53 egy rövid életidejű molekula, melynek magi immunhisztokémiai pozitivitása funkcióvesztést vet fel. Az értékelésben egyrészt százalékos rendszert használtunk, másrészt nominális változóként külön kezeltük a negatív és a pozitív eseteket. A p53 magi stabilizálódása az életkorral mutatott szignifikáns összefüggést (2. ábra), a pozitivitás elsősorban a fiatalabb betegcsoportra volt jellemző. Emellett a pozitivitás viszonylag jól korrelált az EGFR-expresszióval ($p<0,05$, $R=0,362$; 3. ábra). A p53-expresszió a többi vizsgált paramétertől függetlennek bizonyult (χ^2 -próba, $p>0,05$; nem részletezett adat).

A Ki67 egy proliferációs marker, a sejtciklusban lévő sejtek magja festődik pozitívan. Az expresszió értékelésénél a numerikus értékeket a medián (7,5%) alkalmazásával alakítottuk nominálissá, így alacsony és magas expressziót mutató kategóriákat különítettünk el. A Ki67 vizsgálata során sem a többi tanulmányozott markerrel (p16, p53, EGFR), sem a rutin klinikopatológiai paraméterekkel (stage, grade, recidíva, dohányzás és alkoholfogyasztás) nem találtunk szignifikáns összefüggést (nem részletezett adat).

Az EGFR-expresszió értékelése során a H-score-t tekintettük irányadónak, küszöbértéknek szintén a mediánt (H-score=200) vettük, mely egyébként a normális expressziós

3. ábra. A p53-pozitivitás és az EGFR-expresszió összefüggése szájüregi laphámrákos betegek immunhisztokémiai vizsgálata során. A p53-pozitivitás és az EGFR-expresszió viszonylag jól korrelált egymással (Spearman-féle rangkorreláció, $p < 0,05$, $R = 0,362$)



intenzitásának felel meg (21). A fentebb taglalt p53-at kivéve az EGFR egyik további klinikopatológiai (stage, grade, recidíva, dohányzás és alkoholfogyasztás) és immunhisztokémiai módszerrel vizsgált (p16, p53, Ki67) paraméterrel sem mutatott szignifikáns összefüggést (χ^2 -próba, $p > 0,05$; nem részletezett adat).

A teljes túlélést befolyásoló faktorok

Log-rank statisztikai módszerrel értékelve csupán a hagyományos prognosztikai tényezők, a primer daganat mérete és a nyirokcsomó-érintettség mutattak összefüggést a túléléssel, emellett az áttétképződésnél tendenciózus különbség volt megfigyelhető. Elemzésünk alapján sem a differenciáltsági fok, sem az immunhisztokémia segítségével vizsgált markerek (p16, p53, EGFR, Ki67), sem az alkohol- és dohányfogyasztás nem befolyásolta a túlélést (3. táblázat). A recidíva túlélésre gyakorolt hatása az alacsony kiújulási esetszám miatt nem volt vizsgálható.

MEGBESZÉLÉS

Molekuláris szubttípus alapján a fej-nyaki laphámrákokat HPV-pozitív és -negatív csoportra oszthatjuk. A HPV-negatív csoporton belül elkülöníthetjük a p53-mutáns és a funkcióját veszítő p16-negatív altípust, illetve mindkét molekula vad formában is expresszálódhat.

A p16 expressziójának vizsgálata a cervikális és oropharyngealis régióban elfogadottan használható az aktív HPV kimutatásának helyettesítésére, ugyanis a p16-pozitív ese-

tek a HPV-diagnosztikától függetlenül egységes prognosztikai csoportnak bizonyultak (12, 14, 16). Korábban a p16-pozitivitást kedvező prognosztikai markernek találták, azonban egyes vizsgálatok szerint a molekula nem megbízható eszköz a HPV kimutatására (23). Ang és munkatársai *in situ* hibridizációval saját fej-nyaki anyaguk 63,8%-ában (206/323) detektáltak HPV-DNS-t, ezek 96,1%-a (198/206) bizonyult a 16-os törzsnek. Az irodalomban leggyakrabban fellelhető tanulmányokkal szemben e munkacsoport vizsgálata nem csupán a 16-os és 18-as törzsre irányult, hanem a leggyakoribb 13 high-risk altípus DNS-ét detektáló kórtét alkalmaztak (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Vizsgálataik során a HPV jelenléte és a p16 emelkedett szintje között erős, de nem teljes egyezést találtak ($\kappa = 0,80$; 95% CI, 0,73–0,87) (12). Ugyan egyes tanulmányok felvetik a p16 fokozott expressziójának HPV-fertőzöttségtől független kialakulását, azonban ennek lehetséges alternatív mechanizmusa egyelőre nem ismert (15, 24, 25).

A HPV-, illetve p16-pozitív fej-nyaki laphámrákok progressziója lassabb, növekedésük kevésbé agresszív, emellett jobban reagálnak a radio- és kemoterápiára is. A HPV-negatív esetekkel szemben a p16/HPV-pozitív betegek teljes és betegségmentes túlélése szignifikánsan hosszabb, valamint alacsonyabb a betegségspecifikus halálozási kockázat is (12, 26, 27). Saját, szájüregi laphámrákokra irányuló vizsgálataink során a p16-pozitív eseteknél prognózissal való összefüggést csak a recidívahajlam tekintetében találtunk, a többi hagyományos prognosztikai faktortól (TNM, grade) nem. Szentirmay és munkatársai 136 szájüregi és oropharyngealis daganatot megvizsgálva hasonló következtetésre jutottak: a HPV-vel

3. táblázat. Az egyes paraméterek és a túlélés közötti összefüggés

	P (log-rank)
Nem (férfi vs. nő)	0,403
Kor (medián felett vs. alatt)	0,191
T (T1-2 vs. T3-4)	0,043*
N (N0 vs. N1-2)	0,036*
M (M0 vs. M1)	0,067
Grade (I vs. II-III)	0,749
p16 (pozitív vs. negatív)	0,731
p53 (pozitív vs. negatív)	0,650
Ki67 (medián felett vs. alatt)	0,294
EGFR (medián felett vs. alatt)	0,295
Dohányzás (igen vs. nem)	0,977
Alkohol (nem vs. alkalmanként vs. rendszeresen)	0,183

*statistikailag szignifikáns

való fertőzöttség és a stádium, illetve a szöveti differenciáltsági fok egymástól független paraméternek bizonyult (6). Saját munkacsoportunk egyik korábbi vizsgálata a fej-nyak régió egészére irányult, a hazai anyagból származó laphámrákos minták csupán kisebb hányada (22,5%) volt szájüregi eredetű (20). Mindazonáltal a HPV-pozitivitás itt sem mutatott túlélési előnyt (20). Ehhez hasonlóan jelenlegi, célzottan a szájüregi laphámrákokat célzó munkánk során a p16-pozitivitás nem korrelált sem a túléléssel, sem egyéb prognosztikai klinikopatológiai paraméterrel. Azonban, tekintve, hogy a vizsgált betegek 67%-a dohányzott, 33%-a rendszeresen ivott, feltételeztük, hogy ezek a tényezők ko-expozíciós faktorként hatva felülírták az önmagában egyébként kedvező prognózist jelentő HPV-indukciós hatást. Ezt támasztják alá gyakorisági elemzéseink, miszerint a p16-pozitív és -negatív alcsoport dohányzási és alkoholfogyasztási szokásai arányait tekintve lényegileg nem különböztek egymástól. Ang és munkatársainak elemzése saját eredményeinket is magyarázza, miszerint a fej-nyaki régió daganatai esetén minden doboz elszívott cigaretta rontja a várható prognózist és a túlélést, mely hatás mind a HPV/p16-pozitív, mind a negatív esetekben is azonos mértékben érvényesül (12). Magyarországon a felnőtt lakosság 28–29 százaléka aktív dohányos (férfiak 32–34%; nők 24–25%), emellett a népesség mintegy 44%-a passzív dohányos (28). Saját betegcsoportunkban önbevallás alapján csupán mintegy 15%-ban nem kellett a dohányzással mint a prognózist módosító tényezővel számolni.

A p16-festődésre irányuló vizsgálataink során a pozitívnek bizonyuló esetek száma (20/67) nem érte el a 30%-ot. Több más, szájüregi daganatokra fókuszáló nemzetközi tanulmány ennél jóval alacsonyabb arányokról (11–15%) számolt be (29, 30). Ezzel szemben a fej-nyaki régió egészében a p16-pozitív esetek aránya az irodalmi adatok alapján 53–78% között változik (12, 14, 31). Ugyanakkor Szentirmay és mtsainak magyarországi vizsgálatai alapján a szájüregi és oropharyngealis régióban előforduló daganatok esetében a HPV-pozitivitás eléri a 48,5%-ot (6). Ezek alapján a hazai szájrakos esetek HPV-prevalenciája nagyságrendileg a nemzetközi adatokkal összevethető, azonban a magyar beteganyagban a klasszikus etiológiai tényezők (dohányzás és alkoholfogyasztás) úgy tűnik, hogy nagyobb súllyal érvényesülnek. Emiatt fordulhat elő, hogy a p16-pozitivitás jó prognózist meghatározó szerepe saját beteganyagunkban nem érvényesül. A p16 expressziója csak a recidívahajlammal mutatott erős összefüggést, a túléléssel nem, vagyis saját anyagunkon a p16-ot nem lehetett prognosztikai markerként alkalmazni.

Ugyanakkor a p16 nem mutatott összefüggést a többi immunhisztokémiai módszer segítségével diagnosztizált markerrel sem. Ugyan a Ki67 több humán tumorban, például emlőrákban önálló prognosztikai tényezőnek bizonyult

(32), azonban saját szájüregi laphámrákos anyagunkban a proliferációs marker ilyen célra nem bizonyult alkalmasnak. Ez lényegében összezseng azon korábbi vizsgálatok eredményével, miszerint a fej-nyaki daganatokban a Ki67 semmilyen összefüggést nem mutatott a patológiai paraméterekkel, a túléléssel vagy a terápiára adott válasszal (33, 34).

A p53-pozitivitás saját kutatásunk eredményei alapján csak az életkorral és az EGFR-expresszióval mutatott szignifikáns összefüggést, a többi vizsgált klinikopatológiai paraméterrel és az anamnesztikus adatokkal nem. Korábbi vizsgálatokkal összhangban megerősítettük, hogy a nukleáris stabilizáció inkább a fiatalabb korú fej-nyaki tumoros betegekre jellemző (35). Ugyan egyes, a fej-nyaki régió daganatait érintő vizsgálatok szerint a p53-mutáció a sugárterápia negatív prediktív markere (36), saját vizsgálatunk az onkológiai kezelés hatásfokára nem terjedt ki. Túlélési eredményeink a p53-pozitivitás negatív prognosztikai markerként való használatát sem támasztják alá. Mindazonáltal azok a vizsgálatok, melyek szerint p53-mutáció mellett hamarabb alakul ki recidíva, rövidebb lesz az általános és a betegségmentes túlélés is, nem fókuszáltak a szájüregi daganatokra, a fej-nyaki régió laphámrákjait egységes entitásként kezelték (37). Korábban a fej-nyak régióban a p53 mutációja dohányzásfüggőnek bizonyult (38), azonban ez az összefüggés saját szájüregi anyagunkon nem igazolódott. Amennyiben az egyes etiológiai tényezők (dohányzás és HPV) ko-expozíciós szerepe kölcsönösen kizárható lenne, akkor a p16 fokozott expressziója és a p53-pozitivitás sem mutatna átfedést.

A fej-nyaki laphámrákok többségére az EGFR túlzott expressziója jellemző (39). Korábbi vizsgálatok alapján a fokozott expresszió negatív prognosztikai tényezőnek bizonyult (20, 39, 40). Ezzel szemben saját, szájüregi laphámrákokat célzó vizsgálataink során az EGFR-expresszió nem mutatott összefüggést sem az egyes klinikopatológiai paraméterekkel, sem a túléléssel. Ugyan az EGFR-expresszió korrelált p53-pozitivitással, azonban az irodalmi, a szájüreget nem kiemelten kezelő adatoknak ellentmondva a p16-tól függetlennek bizonyult (41).

Eredményeink alapján hazai viszonylatban a szájüregi laphámrákok esetén a p16 prognosztikai markerként nem alkalmazható, ugyanis az egyes etiológiai faktorok ko-expozíciója (dohányzás, alkoholfogyasztás, HPV) felülírja a kedvezőbb besorolást. A p16-negativitás csupán a recidíva kialakulását jelezte. Vagyis a fej-nyaki régió laphámrákjainak nemzetközi gyakorlatban alkalmazott molekuláris klasszifikációja a hazai szájüregi laphámrákokra nem adaptálható.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani *Szatmári Istvánnak* a Rákregiszterhez nyújtott informatikai segítségéért.

IRODALOM

1. Kásler M, Ottó Sz. Európai és hazai kihívások az onkológiában. *Magy Onkol* 52:21–33, 2008
2. <http://onkol.hu/hu/rakregiszter-statisztika>
3. Johnson NW. Az oralis carcinomák etiológiája és rizikófaktora, különös tekintettel a dohányzásra és az alkoholfogyasztásra. *Magy Onkol* 45:115–122, 2001
4. Secretan B, Straif K, Baan R, et al. A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 10:1033–1034, 2009
5. Kelley MJ, Otterson GA, Kaye FJ, et al. CDKN2 in HPV-positive and HPV-negative cervical-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 63:226–230, 1995
6. Szentirmay Z, Pókus K, Tamás L, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer Metastasis Rev* 24:19–34, 2005
7. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30(Suppl 5):F55–70, 2012
8. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350, 2002
9. Bosch FX, Dürst M, Schwarz E, et al. The early genes E6 and E7 of cancer associated human papilloma viruses as targets of tumor suppression? *Behring Inst Mitt* (89):108–121, 1991
10. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 59:445–453, 2006
11. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18:5311–5317, 1999
12. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New Engl J Med* 363:24–35, 2010
13. Lewis JS Jr. p16 immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 6(Suppl 1):S75–82, 2012
14. Lewis JS Jr., Thorstad WL, Chernock RD, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 34:1088–1096, 2010
15. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 116:2166–2173, 2010
16. Mirghani H, Amen F, Moreau F, et al. Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Oral Oncol* 50:1–9, 2014
17. Gődény M, Kásler M. A képkövető vizsgálómódszerek alkalmazása daganatok esetében. *Magy Onkol* 48:167–190, 2004
18. Valenciano A, Henriquez-Hernandez LA, Lloret M, et al. New biological markers in the decision of treatment of head and neck cancer patients. *Clin Transl Oncol* 16:849–858, 2014
19. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844–847, 1998
20. Szabó B, Nelhübel GA, Kárpáti A, et al. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 47:487–496, 2011
21. Nelhübel GA, Károly B, Szabó B, et al. The prognostic role of claudins in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 20:99–106, 2014
22. McCarty KS, Jr., Szabo E, Flowers JL, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res* 46(8 Suppl):4244s–4248s, 1986
23. Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, et al. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck* 33:1622–1627, 2011
24. Robinson M, Schache A, Sloan P, Thavaraj S. HPV specific testing: a requirement for oropharyngeal squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Pathol* 6(Suppl 1):S83–90, 2012
25. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* 36:945–954, 2012
26. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121:1813–1820, 2007
27. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100:261–269, 2008
28. Cselkó Z, Kovács G. Dohányzási szokások Magyarországon: az utóbbi évtized felméréseinek elemzése. *Orv Hetil* 154:1454–1468, 2013
29. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 49:1–8, 2013
30. Jayasurya R, Sathyan KM, Lakshminarayanan K, et al. Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol* 18:1056–1066, 2005
31. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, et al. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer* 135:2404–2412, 2014
32. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 139:539–552, 2013
33. Nagy B, Tiszlavicz L, Eller J, et al. Ki-67, cyclin D1, p53 and bcl-2 expression in advanced head and neck cancer. *In Vivo* 17:93–96, 2003
34. Rodrigues RB, Motta Rda R, Machado SM, et al. Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx. *Braz J Otorhinolaryngol* 74:855–859, 2008
35. Adduri R Sr, Kotapalli V, Gupta NA, et al. P53 nuclear stabilization is associated with FHIT loss and younger age of onset in squamous cell carcinoma of oral tongue. *BMC Clin Pathol* 14:37, 2014
36. Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 94:713–722, 2002
37. Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 111:1878–1892, 2001
38. Blons H, Laurent-Puig P. TP53 and head and neck neoplasms. *Hum Mutat* 21:252–257, 2003
39. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62:7350–7356, 2002
40. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 114:160–163, 1990
41. Lassen P, Overgaard J, Eriksen JG. Expression of EGFR and HPV-associated p16 in oropharyngeal carcinoma: correlation and influence on prognosis after radiotherapy in the randomized DAHANCA 5 and 7 trials. *Radiother Oncol* 108:489–494, 2013