

A HPV és egyes molekuláris markerek jelentősége fiatal, szájüregi daganatos betegeknél

Doktori értekezés

Dr. Csurgay Katalin

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Németh Zsolt, PhD., med. habil., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András PhD., DSc., med. habil., egyetemi tanár
Dr. Dr. Piffkó József PhD., med. habil., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy Péter PhD., DSc., med. habil.,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gyulai-Gaál Szabolcs PhD.,
egyetemi docens
Dr. Sultész Mónika PhD., főorvos

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés, irodalmi áttekintés	4
2.1. A szájüregi daganatok epidemiológiája és etiológiája.....	4
2.1.1. Dohányzás és alkoholfogyasztás, mint etiológiai tényező	8
2.1.2. Humán papillómavírus, mint etiológiai tényező	14
2.2. A szájüregi daganatok prognosztikai faktorai.....	20
2.2.1. Az életkor és egyéb tényezők szerepe.....	21
2.2.2. Immunhisztokémiai markerek.....	22
3. Célkitűzések	25
4. Módszerek	26
4.1. Beteganyag ismertetése.....	26
4.2. Módszerek.....	27
4.2.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok:.....	28
4.2.2. HPV fertőzés kimutatása és tipizálása PCR módszerrel	32
4.2.3. Statisztikai elemzések:	35
5. Eredmények	36
5.1. Klinikopatológiai paraméterek a teljes beteganyagban	36
5.2. Klinikopatológiai paraméterek a fiatal (50 év alatti) és az 50 év feletti korszakokban.....	42
5.3. Túlélési elemzések.....	44

5.4. Immunhisztokémiai markerekkel összefüggő eredmények.....	53
5.5. Full Spectrum HPV-DNS analízis eredménye:	55
6. Megbeszélés	56
7. Következtetések.....	60
8. Összefoglalás	62
9. Summary.....	63
10. Irodalomjegyzék	64
11. Saját publikációk jegyzéke	81
12. Köszönetnyilvánítás	83

1. Rövidítések jegyzéke

DAB	diamino-benzidin
DNS	dezoxiribonukleinsav
E	korai (Early)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESPAD	European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs
FFPE	fixált, paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded)
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPV	humán papillómavírus
HR	magas kockázatú (High Risk)
ISH	in situ hibridizáció
Ki67	nukleáris antigén
LR	alacsony kockázatú (Low Risk)
OS	teljes túlélés (Overall Survival)
p16	ciklin-dependens kináz inhibitor
p53	nukleáris fehérje (tumorszupresszor gén)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PFS	progressziómentes túlélés (Progression Free Survival)
Rb	retinoblasztóma fehérje
SCBT	Santa Cruz Biotechnology
TBS	Tris pufferelt sóoldat (Tris Buffered Saline)
TMA	tissue microarray
TTR	relapszusig eltelt idő (Time To Relapse)

2. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A fej-nyaki daganatok még napjainkban is a magasabb incidenciájú daganatok közé sorolhatóak. 2020-ban világszerte 747.000 embernél diagnosztizáltak a kórt, és a betegek közel fele bele is halt a betegségbe. Azt is tudjuk, hogy a fiatal populációban emelkedik az oropharyngeális daganatok előfordulása (Toporcov és mtsai 2015, Chaturvedi és mtsai 2013). Fontos kihangsúlyozni, hogy a fej-nyak daganat elnevezés több lokalizációjú daganatot foglal magába. Ide soroljuk a garat, gége, orrüreg, az orrmelléküregek, a kis és nagy nyálmirigyek daganatait, valamint az általunk vizsgált szájüregi daganatokat is.

Bár a szájüregi daganatok előfordulása világszerte csökkenő tendenciát mutat, ezzel szemben a fiatalkorban diagnosztizált szájüregi laphámdaganatok incidenciája továbbra is emelkedett (Glick és mtsai 2011). Ezeknek a daganatoknak az etiológiai tényezői, prognosztikai faktorai sok esetben nem tisztázottak, nem egyértelműek, ezért is intenzíven kutatott terület a fiatalkorban megjelenő malignus daganatok problematikája.

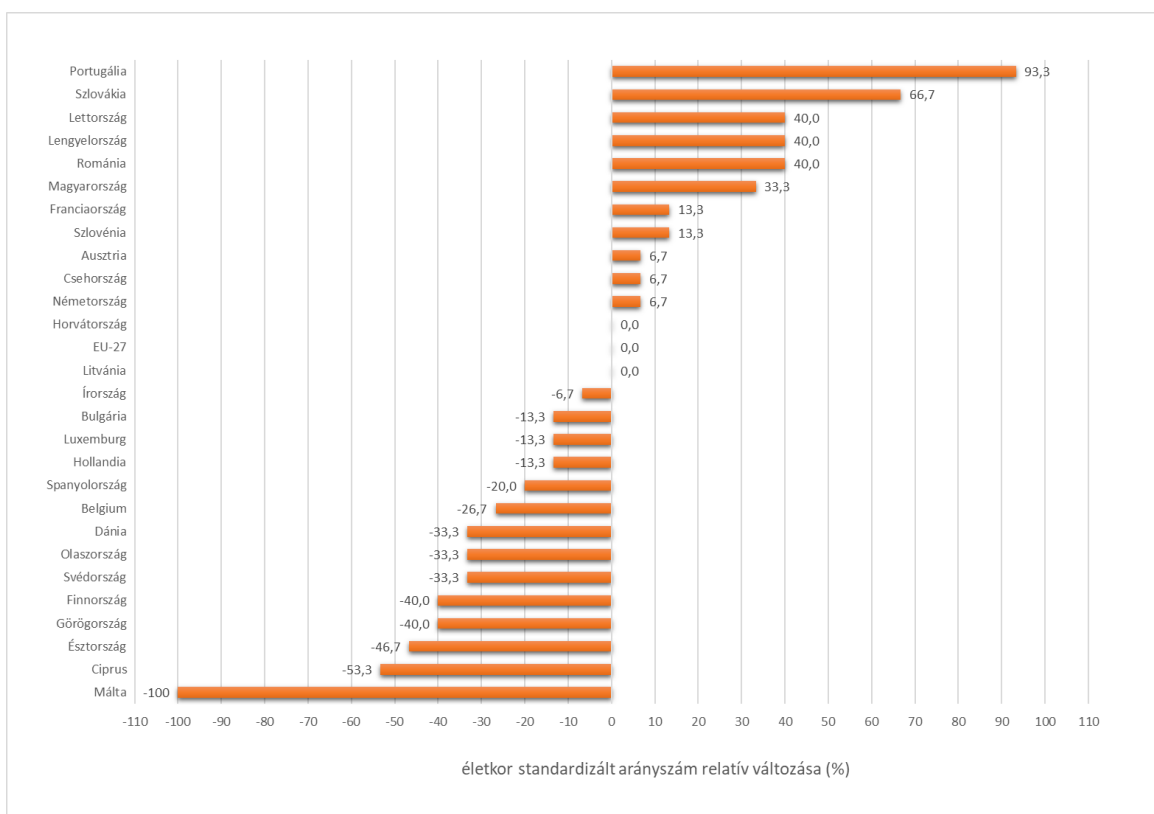
A carcinogenesis intenzív kutatása és a daganatterápia fokozatos fejlődése folyamatosan csökkenti a daganatos betegségek mortalitását (Edwards és mtsai 2014). A washingtoni Nemzeti Egészségügyi Intézet szerint a mortalitási értékek 2001- 2010 közötti időszakot tekintve évente - minden daganattípust vizsgálva - 1,5%-ot csökkentek, ugyanakkor a fiatalkori szájüregi daganatok növekvő előfordulása a mai napig problémát jelent. A 2006-2010 közötti időszakra vonatkozó adatok szerint, az Egyesült Államokban a szájüregi daganat a férfiaknál a 8., nőknél a 14. leggyakoribb daganat (Edwards és mtsai 2014, Wyganowska-Świątkowska M és mtsai 2015).

2.1. A szájüregi daganatok epidemiológiája

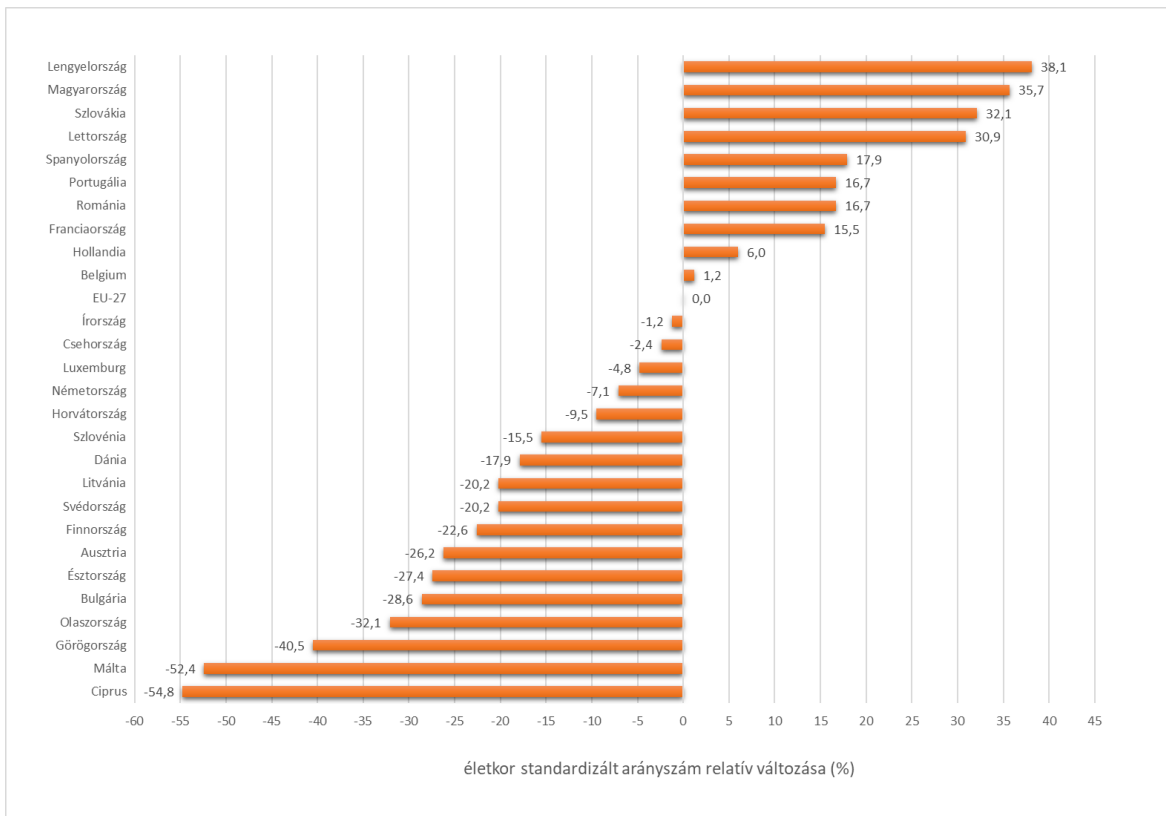
A WHO Globocan online adatbázis adatai alapján, 2020-ban a szájüregi és ajakdaganatok incidenciája a 17. helyen állt. Az összdaganatos megbetegedések gyakoriságának tekintetében, egy adott populációra vonatkoztatva, az 50 éves kor alatti korcsoportban ez az érték már a 14. helyet jelenti. A prevalencia azonos időintervallumban

történő elemzése alapján, az utolsó 5 éves periódust vizsgálva, a szájüregi és ajakdaganatok a 15., illetve a fiatalabb - 50 éves kor alatti - korosztály esetében a 11. helyen állnak (GLOBOCAN 2020).

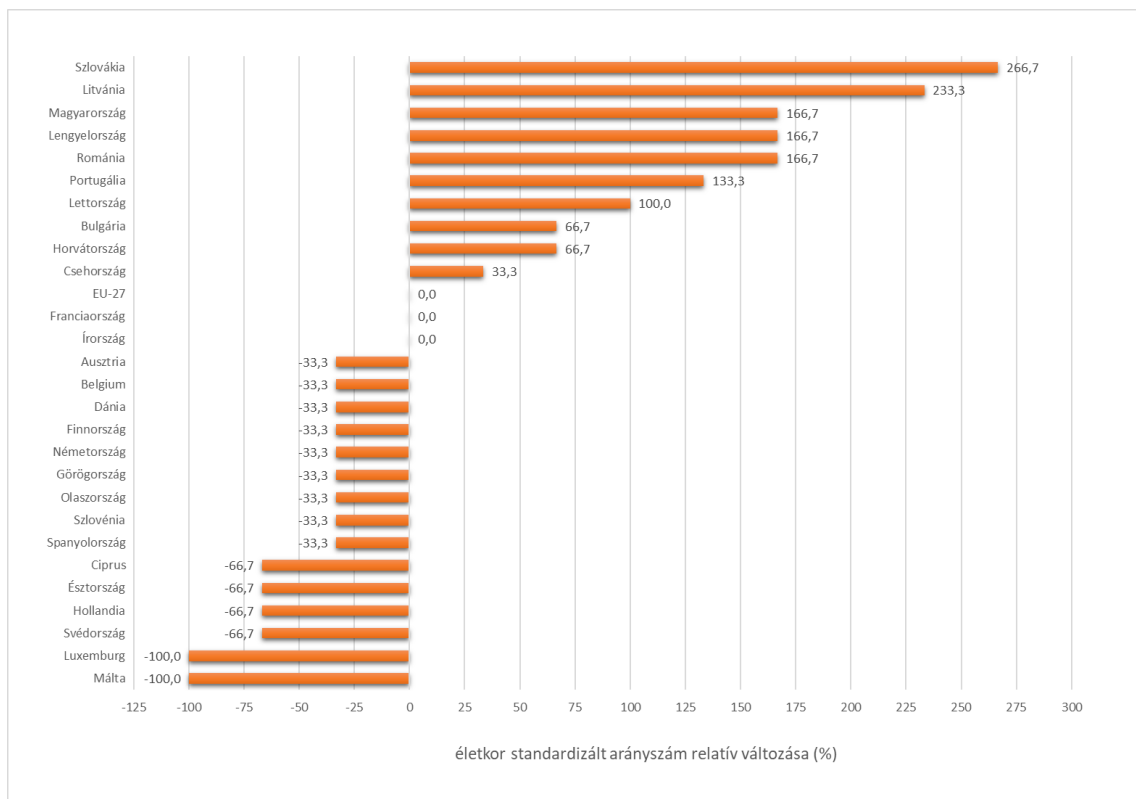
Magyarországon 2020-ban, az online adatbázis alapján 1.153 új esetet regisztráltak, melyből 133 fő 50 éves kor alatti, ajak és szájüregi daganatos beteg. Szájüregi rákok tekintetében Magyarország, mind férfiak, mind nők esetében az európai statisztikák élvonalában áll. (1. ábra, 2. ábra, 3. ábra)



1. ábra: Magyarország pozíciója a European Cancer Observatory adatai alapján: az ajak és szájüregi daganatos megbetegedések incidenciája 50 év alatt (ECIS 2020)



2. ábra: Magyarország pozíciója a European Cancer Observatory adatai alapján: ajak és szájüregi daganatos megbetegedések incidenciája 0-85+ év között (ECIS 2020)



3. ábra: Magyarország pozíciója a European Cancer Observatory adatai alapján: ajak és szájüregi daganatos mortalitás 50 éves kor alatt (ECIS 2020)

Egyre több, 50 évesnél fiatalabb szájüregi daganatos beteg jelentkezik, kerül kezelésre, akinél a két meghatározó etiológiai faktor, a dohányzás és az alkoholfogyasztás nem játszik döntő szerepet (Llewellyn és mtsai 2001). Világszerte és hazánkban is - a prevenciós kampányoknak köszönhetően - visszaszorulóban van a dohányzók, és az alkoholfogyasztók száma. A fiatal életkor és azon betegek emelkedő száma miatt, akiknél hiányoznak a “klasszikus” etiológiai faktorok felmerül, hogy más tényezők is szerepet játszanak a szájüregi daganatok patogenezisében.

Az oropharyngeális rákoknál merül fel elsősorban a HPV-eredet, mint etiológiai faktor (Choi és mtsai 2008, Marur és mtsai 2010). Ma már tudjuk, hogy a fej-nyaki daganatok 40%-ában lehet integrált HPV-t kimutatni, ezek között is a cervixrákban megszokott onkogén HPV-törzseket, jelezve a karcinogenezis hasonlóságát a két daganatlokalizációban (Szentirmay és mtsai 2005). A fej-nyaki daganatok 95% laphámrák. A túlélési ráta recidíva,

vagy metasztázis(ok) esetén rendkívül alacsony, ezért is lényeges új biomarkerek felkutatása és hatékonyabb terápiák kidolgozása. A prognosztikai értékű biomarkerek ismeretének segítségével könnyebben elkülöníthetőek a rizikópáciensek.

2.1.1. Dohányzás és alkoholfogyasztás, mint etiológiai tényező

Köztudott, hogy szoros összefüggés van az életmód és a daganatos morbiditás között. A két legismertebb etiológiai faktor a dohányzás és az alkoholfogyasztás. Általánosságban elmondható, hogy a kettő a legtöbb esetben együtt jár. A WHO adatai alapján a világon 1,1 milliárd ember dohányzik, hazánkban ez hozzávetőlegesen 2 millió embert érint. *Hashibe és mtsai* egy több mint 10.000 fős beteganyagot dolgoztak fel. Összesen 10.244 fej-nyaki daganatos beteg került beválogatásra ebbe a vizsgálatba, a kontrollcsoportot 15.227, nem tumoros beteg alkotta. Olyan dohányosokat vizsgáltak, akik szinte soha nem fogyasztottak alkoholt és olyan betegeket, akik rendszeresen isznak, viszont soha nem dohányoztak. A betegek 16%-a soha nem ivott és 11%-uk nem is dohányzott. A kontroll csoportban ezek a számok 27% és 38% voltak. Ezek alapján azt állapították meg, hogy a dohányzás jelentősebb szerepet játszik a fej-nyaki daganatok kialakulásában, mint az alkoholfogyasztás. A nem alkoholizálók körében a tumorok 24%-ért a dohányzás tehető felelőssé. Akik nem dohányoztak, azoknál is megemelkedett a daganat kialakulásának kockázata, de a daganatoknak csak a 7%-ért tehető felelőssé (*Hashibe és mtsai 2007*). Úgy tűnik, hogy a hagyományos faktorok nem játszanak azonban döntő szerepet az 50 évesnél fiatalabb betegeknél. Egy fiatal betegnél az is kétséges, hogy az expozíciós idő elegendő hosszú-e a tumor keletkezéséhez. *Llewellyn és mtsai* kimutatták, hogy a fiatal populációban is jelen vannak az életmódbeli rizikótényezők, és ezek szintén megemelkedett kockázattal járnak. Számos kutatás szerint azonban a fiatal populációnál jelentkező szájüregi daganatok fő etiológiai faktora nem a mértéktelen alkoholfogyasztás és dohányzás (*Grigolato és mtsai 2021, Llewellyn és mtsai 2001*).

Az *Eurobarometer* szerint, évente, Európa-szerte, közel 700.000 ember halálát okozza a dohányzás, pedig az egyik legelkerülhetőbb halálok lehetne. Rengeteg törekvés van arra, hogy ezt a káros szokást minél jobban visszaszorítsák, de az Európai Unióban a dohányosok száma továbbra is magas. Arányuk a teljes népesség körében 26%, a 15-24 éves korosztályban pedig 29%. 2016 május óta számos irányelv igyekszik szabályozni a dohánytermékek gyártását, értékesítését, különböző uniós és nemzetközi együttműködések is folynak. Elsődleges cél, hogy minél kevesebben szokjanak rá a dohányzásra, illetve minél többen szokjanak le erről a káros szokásról. A kampányok szerves témája a fiatalok dohányzása, mivel a dohányosok 93%-a a felmérések szerint 26 éves kora alatt kezd el dohányozni (Eurobarometer 2014).

1. táblázat: Eurostat 2014-es és 2019-es dohányzási adatok: mindkét nem, az első oszlopban az összes életkor alapján feltüntetve (2019), második oszlopban a 15-44 év közötti korosztály dohányzói (2014). Az utolsó két oszlopban az összes életkor dohányzói nemek szerinti bontásban (2019). A számok százalékban kifejezve jelölik a naponta rendszeresen dohányzók számát (Eurostat 2014, 2019)

<i>DOHÁNYZÁS</i>	<i>összeletkor (2019)</i>	<i>15-44év (2014)</i>	<i>összeletkor nők (2019)</i>	<i>összeletkor férfiak (2019)</i>
<i>Maximum</i>	28,7	34,7	20,7	28,7
<i>Minimum</i>	6,4	7,6	6,5	6,4
Európai Unió- 27 ország (2020 tól)	18,4	22,3	14,8	18,4
Európai Unió - 28 ország (2013-2020)	-	21,5	-	-
Belgium,	14,6	18,8	11,8	14,6
Bulgária	28,7	34,7	20,7	28,7
Csehország	19,3	23,1	15,7	19,3
Dánia	11,7	11,4	11,8	11,7
Németország	21,9	17,7	18,6	21,9
Észtország	18,9	24,6	13,5	18,9
Írország	13,8	13,8	12,7	13,8
Görögország	23,6	32,2	17,9	23,6
Spanyolország	19,7	26,2	16,4	19,7
Franciaország	17,8	27,3	15,4	17,8
Horvátország	21,8	28,1	19,2	21,8
Olaszország	16,5	20,3	12,7	16,5
Ciprus	21,2	29	12,8	21,2
Lettország	22,1	28,8	12,1	22,1
Litvánia	18,4	23,4	9,5	18,4
Luxemburg	10,5	15,2	9,2	10,5
Magyarország	19,3	29,9	17,3	19,3
Málta	19,4	21,1	16,8	19,4
Hollandia	14,6	18,9	12,8	14,6
Ausztria	20,2	30,1	17,5	20,2
Lengyelország	18,4	20,5	14,2	18,4
Portugália	11,5	21,1	7,2	11,5
Románia	18,7	23,6	7,5	18,7
Szlovénia	16,6	20,8	14,8	16,6
Szlovákia	20,4	25,6	15,1	20,4
Finnország	9,9	12,7	7,8	9,9
Svédország	6,4	7,6	6,8	6,4
Egyesült Királyság	-	16	-	-
Izland	7,5	10,5	6,5	7,5
Norvégia	10,2	9,4	9,4	10,2
Törökország	27,3	29,5	14,4	27,3

Ha az 1. táblázat adatait alaposan megnézzük, akkor jól látható, hogy az európai országok közül Magyarországon a dohányzás jóval átlag feletti értékeket mutat. A számok sokkal inkább a maximum értékhez közelítenek, amelyek azt jelzik, hogy az emberek hány százaléka dohányzik naponta. Az első táblázatban az első oszlop az összéletkorra vonatkozik, míg a második oszlop a 15-44 év közötti korosztályt jellemzi mindkét nem esetén. Az utolsó két oszlopban nemek szerinti bontásban láthatjuk a dohányzók adatait.

Az *Eurobarometer* szerint az alkoholfogyasztással összefüggő megbetegedések a korai elhalálozások 7%-áért felelősek. A dohányzáshoz hasonlóan, számos egészségügyi program igyekszik visszaszorítani az alkoholfogyasztást és alkoholizmussal összefüggő ártalmakat (2. táblázat).

Az ESPAD (European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs) 2019-es tanulmánya szerint az összes ESPAD országot figyelembe véve, a diákok több mint a fele ivott már alkoholt legalább egyszer eddigi élete során. Az ESPAD átlag 79% volt. A legmagasabb értékek (90% vagy több) Csehországban, Dániában és Magyarországon mutatkoztak, ez ismét rámutat arra, hogy hazánkban a helyzet nem javult érdemben az elmúlt évek adataihoz képest. Az elemzésekből továbbá az is kiderül, hogy az ESPAD országok diákjainak 47%-a ivott alkoholt a megkérdezésük előtti 1 hónapban. Magyarország, Csehország, Görögország, Ausztria, Németország és Dánia esetében ez az érték 61-74% között helyezkedik el. A teljes lerészegedést vizsgálva pedig azt találták, hogy a diákok 13 %-a volt már részeg a megkérdezésük előtti hónapban. Magyarországon az alkoholfogyasztás legtöbb prevalencia-értéke mindkét nemnél nő, emelkedett a tömény italok, cider és sör fogyasztása. Nőtték az italfajtánkénti mennyiségek, a nagyivás és lerészegedés is enyhe emelkedést mutat a 2019-es adatok alapján. (ESPAD report 2019)

2. táblázat: Alkoholfogyasztás gyakorisága a 2019-es adatok alapján, 15 éves kor felettiéknél, százalékban kifejezve (Eurostat 2019)

<i>ALKOHOLFOGYASZTÁS</i>	<i>százalék</i>
<i>Maximum</i>	20,7
<i>Minimum</i>	0,5
Belgium	9,7
Bulgária	10,2
Csehország	7,8
Dánia	9,6
Németország	7,5
Észtország	1,3
Írország	2,4
Görögország	5,9
Spanyolország	13
Franciaország	9,9
Horvátország	10,2
Olaszország	12,1
Ciprus	4
Lettország	1,2
Litvánia	0,8
Luxemburg	8,9
Magyarország	6,3
Málta	7,9
Hollandia	8,3
Ausztria	5,7
Lengyelország	1,6
Portugália	20,7
Románia	2,9
Szlovénia	6,6
Szlovákia	4,1
Finnország	-
Svédország	1,8
Egyesült Királyság	7,5
Izland	1
Norvégia	1,4
Törökország	0,5

Mindemellett, találunk olyan vizsgálatokat, mint melyet *Bachar és mtsai* készítettek, ahol 291 izraeli, orális laphámrákos beteg adatait dolgozták fel, közülük pedig 116 betegnél sem dohányzás, sem alkoholfogyasztás nem szerepelt az anamnézisben. A 40 év alatti, nem dohányzó - nem alkoholizáló csoportnál szignifikánsan rosszabb túlélési rátát figyeltek meg, ez rávilágít arra, hogy a fiatal betegek esetében elkülöníthető egy homogén csoport, ahol újabb etiológiai faktorok keresése válik szükségessé (Bachar és mtsai 2011).

Az etiológiai faktoroknak és egyéb patológiai tényezőknek jelentős szerepe van a prognózis szempontjából.

Régóta ismert, hogy a dohányzás az alkoholabúzzsal együtt, a legjelentősebb etiológiai faktorok közé tartozik a laphám eredetű fej-nyaki daganatok kialakulásánál. A fej-nyaki daganatos betegek 75% a hosszú ideje dohányzik és rendszeresen fogyaszt alkoholt. Az is tény, hogy a dohányzás carcinogén hatását az alkohol jelentősen felerősíti. Számos vizsgálat írja le, hogy a dohányzás mennyire megnöveli a daganat kialakulás kockázatát. *Blot és mtsai* szerint a dohányzók esetében nőknél 3-szoros, a férfiaknál 1,9-szeres a tumor kialakulásának kockázata (Blot és mtsai 1988).

Míg globálisan az ajak és szájüregi daganatok a 17. leggyakrabban előforduló tumornak számítanak, addig Dél-Kelet Ázsiában (India, Banglades, Pakisztán és Sri Lanka) az összes daganatelőfordulásnak egyharmadát teszik ki.

Egy Indiában végzett vizsgálat kapcsolatot keresett a dohányzási szokások, a HPV infekció, a p53 polimorfizmus és a szájüregi laphámrák kockázata között. Leírták, hogy a tanulatlanság, a rossz szociális körülmények, valamint az éveken át tartó rossz szokások együttesen felelősek Indiában a szájüregi daganatos betegek számának drámai emelkedéséért. A p53 polimorfizmus és a rák kialakulásának kockázata között nem találtak szignifikáns összefüggést, de megfigyelték, hogy a HPV infekció növeli a daganat kialakulásának esélyét (Chakrobarty és mtsai 2014). A világon évente a közel 380.000 szájüregi daganatos esetből, 135.929 esetet kizárólag Indiában regisztráltak (Boyd és mtsai 1988). Három csoportba osztották a dohányzási szokásokat: a dohányzók, a dohányt rágók és a mindkettőt használók. Azt találták, hogy a dohányzók száma szignifikánsan

alacsonyabb volt a daganatos betegeknél, mint a kontrollcsoportnál (nem daganatos, egészséges, de valamilyen módon dohányzó betegeknél). A dohányt rágók száma viszont szignifikánsabb magasabb a daganatosoknál, a kontrollcsoport eredményeihez képest. A mindkettőt használók esetében pedig mindkét csoportban hasonlóak voltak az eredmények (Chakrobarty és mtsai 2014).

2.1.2. Humán papillómavírus, mint etiológiai tényező

Azoknál a szájüregi daganatos betegeknél, akiknél a korábbiakban kifejtett etiológiai faktorok egyike sem áll fenn, felvetődik a virális carcinogenezis szerepe. *Löning és mtsai* már 1985-ben leírták az összefüggést a laphámrákok és humán papillómavírus között (Löning, 1985). A HPV pozitív orális és oropharyngeális daganatok egyre fiatalabb korban és előrehaladott állapotban jelentkeznek (nyirokcsomó áttétekkel), általában olyan betegeknél, akiknél a klasszikus rizikófaktorok (alkohol, dohányzás) nincsenek jelen. Több munkacsoport leírta a HPV pozitív és negatív daganatok közötti különbségeket a terápiás válasz, túlélés és lehetőség rizikófaktorok szempontjából. (Gillison és mtsai 2015, Bharti és mtsai 2013, Gillison és mtsai 2000, Fakhry és mtsai 2008) (3. táblázat).

3. táblázat: HPV pozitív és negatív daganatok közötti különbségek (Bharti és mtsai 2013)

	HPV+	HPV-
lokalizáció	tonsilla nyelvgyök, lágyszájpad (mesopharynx)	bárhof/orális mucosa
szövettan	basaloid- kevésé differenciált	keratinizált- jól differenciált
életkor	fiatal (30-50 év)	idősebb (50-70 év)
stage	T ₃₋₄ , N ₂₋₃	változó
incidencia	növekvő	csökkenő
biomarker	p16 overexpresszió p16, Rb inaktiváció ciklin D1 csökkenés EGFR csökkenés	p16 csökkenés, p53, p16 mutáció ciklin D1 EGFR és survivin overexpresszió
nem	3:1 ffi/nő	3:1 ffi/nő
rizikófaktor	szexuális szokások: orális szex francia csók több partner	dohányzás/alkohol
túlélés	jobb, sugár- és kemoterápia érzékeny	rosszabb
távoli metasztázis	ritkább	gyakoribb
recidíva	ritkább	gyakoribb
5 éves túlélési arány	60-90%	20-70%

A HPV molekuláris biológiája:

Papovaviriade családba tartozó DNS vírus, több mint 200 különböző genotípussal rendelkezik. *Shope és Hurst* 1933-ban azonosították az első papillóma vírus részletet egy nyúl papillomatosisából (*Shope és mtsai* 1933). *Harald zur Hausen* német virológus találta meg a kapcsolatot a HPV vírus és a cervixcarcinomás esetek között. 1983-ban

munkatársaival beazonosította a HPV 16-ot, majd nem sokkal később a HPV 18-at. Egyértelműen kimutatható vált a vírus a méhnyakrákos biopsziákból (zur Hausen 1983). Az elmúlt 25 év molekuláris biológiai és epidemiológiai vizsgálatai egyértelműen beazonosították az onkogén HPV törzseket, mint lehetséges etiológiai faktorokat a különböző daganatos megbetegedések esetén, beleértve a fej-nyak régió daganatait (4. táblázat). A HPV fertőzés és méhnyakrák közötti okozati összefüggést a WHO már 1995-ben elismerte, majd 2005-ben ismét megerősítette (WHO 1995, Cogliano és mtsai 2005).

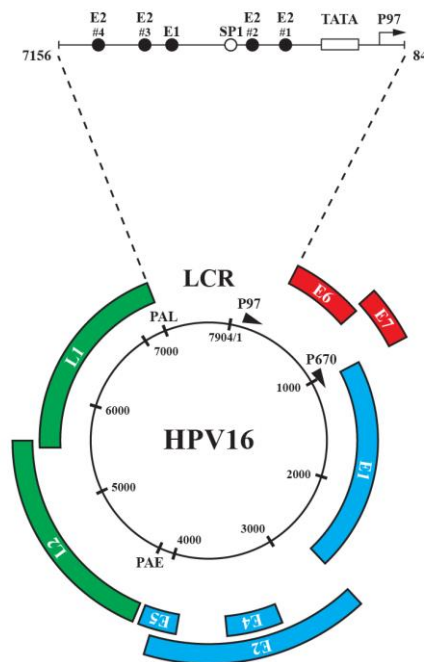
4. táblázat: Malignitási potenciáljuk alapján csoportosított Humán papillómavírus (HPV) típusok (Burd 2003)

Magas rizikó/high risk	Alacsony rizikó/low risk
HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	HPV 6, 11, 42, 43, 44

A humán papillómavírus (HPV) a malignus elváltozások pathogenezisében betöltött szerepe miatt az utóbbi időben egyre inkább az érdeklődés középpontjába került. Már 1983-ban publikáltak arra vonatkozó bizonyítékot, hogy a vírusnak szerepe van a szájüregi laphámrák kialakulásában (Syrjänen és mtsai 1983) Az orális és cervikális nyálkahártya közötti morfológiai hasonlóságok miatt - az anogenitális régióhoz hasonlóan - a szájüregben is a leggyakoribb HPV típus, a HPV 16 (Syrjänen és mtsai 2003).

A HPV a bőr- és a nyálkahártyaelváltozások egyik leggyakoribb kórokozója (5. táblázat). Világszerte a leggyakoribb, szexuális úton terjedő vírus. Világviszonylatban ez évente 630 millió fertőzött beteget jelent, a lakosság 9-13%-át (WHO 2001). Kimutatható a genitális traktus, az urethra, a bőr, a gége és az orrüreg, az arcüreg nyálkahártyájában, valamint a szájüregben. Egy lehetséges - jelenleg is intenzíven kutatott - etiológiai faktor az onkogén genotípusú (16, 18) HPV-vírus fertőzés. A humán papillómavírus (HPV) egy 7.900 bázis hosszú DNS-vírus, amelynek ma több, mint 200 genotípusát ismerjük. A genom 7 korai

fehérjét kódol (E1-7). A ma ismert HPV-vírusok egymástól a kódolt E6 és E7 fehérjékben különböznek, a daganatkeltő képességük alapján alacsony, közepes és magas rizikócsoportokba sorolhatjuk őket. A vírus okozta malignus transzformáció mechanizmusa ma még nem pontosan ismert. A magas rizikócsoportba tartozó vírusok genomja megfelelő körülmények között beépül a gazdasejt genetikai állományába. A cirkuláris vírusgenom felszakad és az E1, valamint az E6 és E7 régiók integrálódnak a gazdasejt DNS-ébe, E2-E5-ig a régiók elvesznek, ezeket soha nem lehet kimutatni a tumoros sejtekből. A vírus szaporodásakor ezek az elveszett régiók kontrollálják az E6-E7 működését, amelyek így kikerülnek a normál szabályozás alól, és mint onkogének gátolják a gazdasejtek p53- és pRb- génjeinek fiziológias működését (4. ábra) (Doorbar és mtsai 2006, Khode és mtsai 2014). A HPV vírusinfekció okozta malignus transzformáció valószínűsége függ a vírus fajtájától (5., 6. ábra), egyéb szinergista mechanizmusok (alkoholfogyasztás, dohányzás) jelenlététől, valamint a gazdaszervezet immunstátuszától (Kumaraswamy és mtsai 2011).



4. ábra: A HPV 16 vírusgenom felépítése (Doorbar 2006)

A HPV-t, mint lehetséges etiológiai faktort elsősorban a nem dohányzó és nem alkoholizáló daganatos betegekkel hozzák összefüggésbe. *Lindel és mtsai* a szájüregi, oropharyngeális, laryngeális és hypopharynx daganatoknál is figyeltek meg HPV pozitivitást, dohányzó és alkoholizáló betegeknél. A szájüregi daganatok HPV 20, HPV 60, míg a hypopharynx tumorok HPV 6, HPV 16 pozitivitást mutattak. Azoknál a betegeknél, akik HPV 16 szeropozitívak, 2-szer, 3-szor nagyobb eséllyel alakulhat ki fej-nyak daganat. Más, hasonló vizsgálatok a high risk HPV vírusokkal találtak hasonló összefüggést, vírusinfekció esetén 6-14 szerez az esély a daganatos elváltozás kialakulására (*Lindel és mtsai 2009*).

Nagyobb kockázatot jelent a HPV infekció kialakulására a férfi nem, más, szexuális úton terjedő betegségek (pl. HIV-fertőzés), és egyéb, súlyos immundeficienciák.

Sok vizsgálat írja le rizikótényezőként a szexuális szokások változását, amikor a kórtörténetben korai szexuális élet, több partner, korábbi genitális szemölcsök szerepelnek. Az orális szex terjedése is jelentős rizikófaktor.

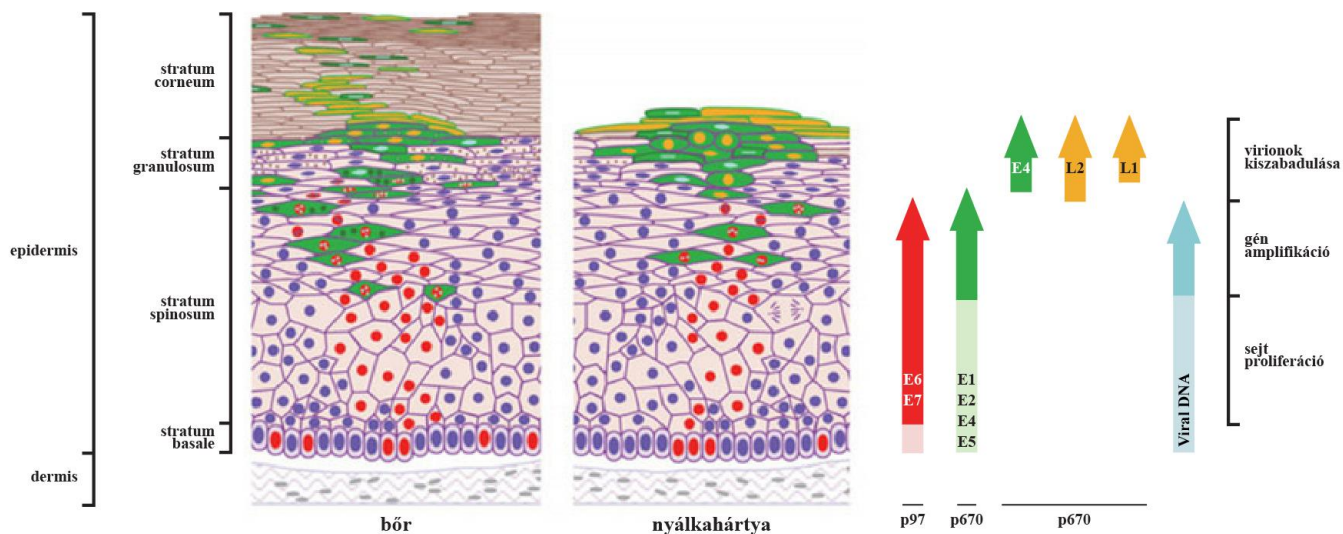
Syrjänen és mtsai házaspárok szájnyálkahártyáját tanulmányozták, eredményeik alapján a szájüreg fontos behatolási kapu a HPV fertőzés számára (*Syrjänen és mtsai 2007*).

Herrero és mtsai azt találták, hogy a HPV 16 fertőzés 1,5-szeresére növeli a szájüregi rák kialakulásának kockázatát, és 3,5-szer nagyobb a kockázata az oropharyngeális rák kialakulásának (*Herrero és mtsai 2003*). A lokalizációt, egyben az oropharyngeális és orális fogalmat elkülönítve ez azt jelenti, hogy a nyelvgyöknél és attól hátrafelé haladva a tumor kialakulásának kockázata többszörösére nő a tisztán szájüregi, nyelvgyöktől előrefelé elhelyezkedő daganatokhoz képest.

A vizsgálatok alapján a HPV pozitív daganatok jóval érzékenyebbek a radio-kemoterápiára, mint a HPV negatív daganatok.

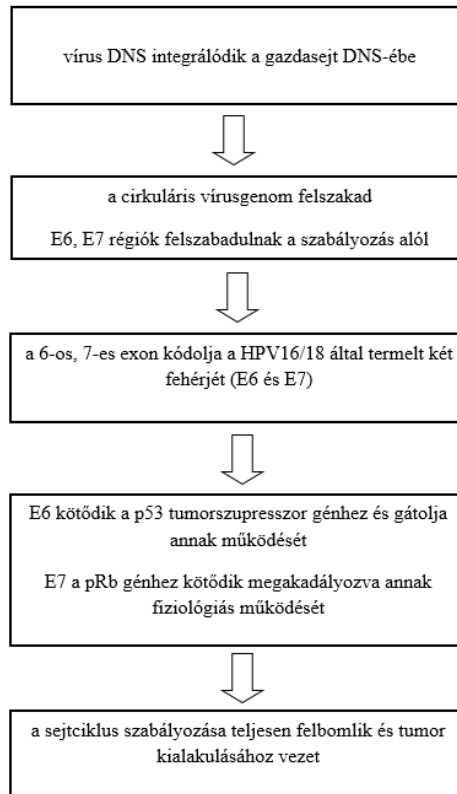
5. táblázat: A HPV vírusokkal társuló proliferatív nyálkahártya-eltérések (Khode és mtsai 2014)

Papillóma	HPV-6, 11, 16
Verruca vulgaris	HPV-2, 4, 6, 11
Condyloma acuminatum	HPV-6, 11, 13, 32
Fokális epitheliális hyperplasia	HPV-13 (1, 32, 6, 11)
Leukoplákia	HPV-11, 16
Anogenitális szemölcsök	HPV-6, 11, 40, 42-44, 54, 55, 74
Anogenitális intraepitheliális neoplasma	HPV-6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 40, 45, 51, 52, 56, 61, 64, 72-74
Méhnyakrák	HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
Cervikális adenocarcinoma	HPV-16, 18
Koilocyticus dysplasia	HPV-31, 33, 35, 16, 18, 6, 11
Laphámrák	HPV-16, 18, 33



5. ábra: A HPV fertőzés folyamata (Doorbar 2006)

Virális onkogenitás mechanizmusa



6. ábra: A virális onkogenitás mechanizmusa (Khode és mtsai 2014)

2.2. A szájüregi daganatok prognosztikai faktorai

A megfelelő terápia felállításához nélkülözhetetlen a prognosztikai faktorok minél alaposabb ismerete, illetve figyelembevétele a kezelés megválasztásakor. Az egyes prognosztikai faktorok lehetnek beteggel kapcsolatos paraméterek (pl: életkor, nem, káros szokások, általános állapot), valamint daganattal kapcsolatos tényezők (szöveti típus, grade, immunhisztokémiai jellegzetességek, daganatlokalizáció, TNM stádium, morfológiai jellemzők). Az irodalom áttekintésekor azt láthatjuk, hogy a betegség prognózisát erősen befolyásolhatja a beteg életkora, a klasszikus etiológiai faktorok megléte vagy nemléte, és a különböző immunhisztokémiai markerekben jelentkező eltérések. Egy 172 cikket magába foglaló metaanalízis megerősítette a daganattal kapcsolatos prognosztikai faktorokon belül

a perineurális invázió, a limfovaszkuláris és extranodális terjedés, csontérintettség, és a reszekciós szél érintettségének negatív szerepét a túlélésben (Dolens és mtsai 2021). Nyelvdaganatoknál az előrehaladott stádium és az alacsony szöveti differenciáltság bizonyult negatív prognosztikai faktornak (Boonpoapichart és mtsai 2021).

2.2.1. Az életkor és egyéb tényezők szerepe

Az életkor egy sokat vitatott klinikai tényező, sokszor merül fel, hogy van-e összefüggés a betegség lefolyása és a beteg életkora között. *Byers és mtsai* már 1975-ben leírták laphámrákos fiatal betegeknél, hogy erre a betegcsoportra az agresszívabb terjedés, és a korai recidíva jellemző. Egy saját, korábbi kutatásunkban arra az eredményre jutottunk, hogy a fiatal betegek hamarabb, és alacsonyabb stádiumú daganattal jelentkeznek az orvosnál, valamint a káros magatartási tényezők közül a dohányzást vizsgálva, kevesebben, és kevesebbet is dohányoznak. Gyakrabban és hamarabb jelentkezik a relapszus, a daganatspecifikus túlélés az 50 évesnél fiatalabb betegeknél szignifikánsan rövidebb (Németh és mtsai 2013).

Egy brazil munkacsoport szintén leírja, hogy a fiatal életkor, az előrehaladott stádium és a nem kombinált terápia negatívan befolyásolják a túlélést. 5 éves teljes túlélés csak 39% volt szájüregi daganatos betegeknél (Ferreira és mtsai 2020).

A káros szokások, mint dohányzás és alkoholfogyasztás erős kockázati tényezők a szájüregi tumorok kialakulásában, főleg ha mindkettő egyidejűleg fennáll. Mivel a fiataloknál - mint prediszponáló tényezőket - sokan elvetették (például az expozíciós idő rövidege miatt), más irányba indult a fiatalkori carcinogenezis vizsgálata. Saját kutatásunkban, a genetikai eltérések és a HPV vizsgálata mellett azonban ezek megismerésére is nagy hangsúlyt fektettünk. Ennek oka, hogy előzetes felméréseink alapján, a fiatalok a prevenció kampányok ellenére is, sajnos épp eléggé hódolnak mindkét káros szokásnak.

2.2.2. Immunhisztokémiai markerek

A sejtciklus szabályozásában, a DNS kijavításában onkogének, tumorszupresszor gének és ciklin-dependens kinázok vesznek részt. Az onkogének elősegítik a sejteknek a sejtcikluson való áthaladását, a sejtciklus G1-S átmenete során fejtik ki hatásukat. A tumorszupresszor gének ezzel szemben gátolják a sejtek G1-ből S fázisba, valamint a G2-ből M fázisba történő átmenetét (Ho és mtsai 2002).

A különböző malignus daganatok kialakulásához az onkogének változásai és a tumorszupresszor gének károsodásai vezetnek.

Ilyen változások az onkogénekben: az amplifikáció, a transzlokáció (kromoszóma törés, szabályozási zavar) és a pontmutáció, melyek fokozott működést eredményeznek.

A tumorszupresszor gének károsodásai: mutációs funkcióvesztés, heterozigótaság elvesztése, kromoszóma deléció, ezek vezetnek a proliferációs gátlás csökkenéséhez, gátolt apoptózishoz és a csökkenő génhiba-kijavításhoz.

p16:

1993-ban fedezték fel a p16 tumorszupresszor proteint, amelyet a CDKN2A gén kódol, és a humán 9-es kromoszóma rövid karján (9p21) található (Serrano és mtsai 1993).

A p16 fehérje kötődni képes a CDK4 és CDK6-hoz, így a CDK-k inaktív állapotba kerülnek, és nem tudnak a ciklin D-hez kapcsolódni, így a Rb fehérje foszforilálatlan marad, ezáltal a p16 fehérje közvetett úton gátolja meg a sejtproliferációt, a G1/S átmenetet (Koh és mtsai 1995, Rayess és mtsai 2012).

Azoknál a daganatos betegeknél, akiknél a p16 gén érintettségét igazolták, rosszabb prognózissal számolhatunk, hasonlóan a p53 gén mutációjához. A p16 gén inaktiválódása gyakran megfigyelhető a szájüregi tumoroknál. Olvashatunk tanulmányt, melyben leírják, hogy a p16 deléció hiányzik a fiatal korcsoportban, míg az idős betegeknél 50%-ban jelen van (O'Regan és mtsai 2006). A p16 gén érintettsége (homozigóta deléció, hipermetiláció)

egyértelműen magas rizikót és rosszabb prognózist jelent (Liggett és mtsai 1998, Shaw és mtsai 2012). A p16 overexpresszió prognosztikai jelentősége abban mutatkozik meg a fejnyak régió daganatainál, hogy fennállásakor kevesebb a lokális recidíva. Amikor hiányzik a p16 overexpresszió, meghatszorozódik a lokális kiújulás esélye (Weinberger és mtsai 2004). Számos vizsgálat mutatja meghatározó prognosztikai faktornak a humán papillómavírust és ezáltal a p16 expresszió megnövekedését a fejnyaki daganatoknál, kimondottan az oropharyngeális tumoroknál (Begum és mtsai 2003, Weinberger és mtsai 2004, Reimers és mtsai 2007, Ang és mtsai 2010, Khode és mtsai 2014).

p53:

Tumorszuppresszor gén, mely direkt módon vesz részt a sejtszabályozásban. A carcinogenezisben a leggyakrabban érintett tumorszuppresszor gén. A p53 locus a leggyakrabban mutálódott locus az emberi tumoroknál. A gén a 17 kromoszóma rövid karján található, 393 aminosavból álló nukleáris proteint kódol, mely a szervezet minden szövetében expresszálódik (Koelbl és mtsai 2001). A p53 feladata, hogy megvédje a sejteket a kémiai carcinogének, sugárzás és más egyéb mechanizmusok okozta DNS károsodástól úgy, hogy megállítja a sejtciklust, lehetővé téve a DNS repair rendszer működését vagy indukálja a programozott sejthalált (Chakrobarty és mtsai 2014).

Sokat vitatott kérdés a HPV E7 által mutálódott keratinocyták halhatatlansága, különösen a cytokeratin 7 és 19 filamentumoké, melyeknek szerepe van a szájüregi laphámrákoknál. A p53 gén mutációja talán a leggyakoribb gén-abnormalitás a laphám eredetű fejnyak daganatoknál, az esetek közel 50%-ában kimutatható (Favia és mtsai, 2004; Combes és mtsai 2014; Kashima és mtsai, 1990).

EGFR:

Az epidermális növekedési faktor család tagjai transzmembrán, tirozin-kináz receptorok. A családnak négy tagja van, ezek közül az egyik az EGFR, melynek fokozott termelése a fejnyak daganatok 90%-ban előfordul, ezért az új terápiás kezelések legfőbb célpontjává vált. Komplex terápia részeként már végeztek vizsgálatokat célzott EGFR terápiával, de

metasztázis és recidíva esetén kevesebb eredménnyel. Az afatinib, a cetuximab és a bevacizumab számos klinikai vizsgálat tárgyát képezik, amelyek segítenek megérteni a fejnyaki daganat terápiában elfoglalt szerepüket (Martinez-Useros és mtsai 2015, Miyauchi és mtsai 2019, Muraro és mtsai 2021). A magas EGFR pozitivitást negatív prediktív markerként tüntetik fel a kemoradioterápia hatékonyságát illetően. A mindennapi daganatterápiában a tumorok EGFR státuszának ismerete, hasonlóan a HPV státusz ismeretéhez, előrevetítheti a kemoradioterápia hatékonyságát (Kopper és mtsai 2011).

Ki67:

A Ki-67 fehérje olyan géntermék, mely a proliferáló (G1-S-G2-M) sejtekben expresszálódik, míg a nyugalmi fázisban lévő (G0) sejtekben nem. *Voelkel-Johnson és mtsai* transzgén egereken mutatták ki, hogy a Ki-67-expresszió a prostata carcinomák stádium-emelkedésével párhuzamosan emelkedik (Voelkel-Johnson, 2000). Mások, nagyjából azonos eredményeket kaptak emlőrákok immunhisztokémiai vizsgálata során (Penault-Llorca és mtsai 2017). *Ito és mtsai* fültőmirigyben próbálták elkülöníteni benignus és malignus tumorokat a Ki-67-expresszió alapján. Megállapították, hogy a benignus elváltozásokban alacsony, míg a malignus elváltozásokban magas a Ki67 megjelenése a sejtekben, eredményeik szerint az expresszió mértéke jelentős prognosztikai tényező lehet (Ito és mtsai 2000).

Az magas előfordulást mutató fiatalkori szájúregi laphámrákok, valamint a HPV asszociált tumorok miatt feltételezzük, hogy a fiatalkori szájúregi daganatok prognózisát a klasszikus dohányzási és alkoholfogyasztási szokások mellett, döntően befolyásolják a génexpressziós profilváltozások, és/vagy a HPV vírusfertőzés. A HPV-asszociált tumorokról tudjuk, hogy jobb prognózisúak, amennyiben azt feltételezzük, hogy a fiatalkori daganatok háttérében a vírusonkogenezis áll, saját, fiatal beteganyagunkon is jobb túlélési mutatókat kell találunk. Vita tárgyát képezi, hogy önmagában a HPV terjedése magyarázza-e a fiatalkori daganatok számának növekedését. Számos vizsgálat szerint, az egyén genetikai profiljának sérülése szintén meghatározó szerepet játszik a tumorprogresszióban. A fokozott EGFR, Ki67 expresszió, és a p53 mutáció rossz prognózist von maga után, mindezek ismerete segíthet kiszűrni a rizikóbetegeket (Kato és mtsai 2008).

3. Célkitűzések

Vizsgálatunk célja, hogy saját beteganyagunkat alapul véve kiszűrjük a fiatal betegcsoportba tartozó rizikópácienseket. A rizikócsoporthoz meghatározásával lehetőség nyílik szorosabb utánkövetés kialakítására, a daganatos betegek még egyénre szabottabb, célzottabb kezelésére.

Cél:

- A teljes beteganyag karakterisztikájának vizsgálata
- Az 50 évesnél fiatalabb (vizsgálati) és az 50 évesnél idősebb (kontroll) betegek klinikopatológiai paramétereinek összehasonlítása
- Az 50 évesnél fiatalabb (vizsgálati) betegek génexpressziós profiljának (EGFR, Ki67, p16, p53) összehasonlítása az 50 évesnél idősebb (kontroll) betegek génexpressziós profiljával (EGFR, Ki67, p16, p53)
- Az 50 évesnél fiatalabb betegek HPV-DNS státuszának összehasonlítása az 50 évesnél idősebb betegek HPV-DNS státuszával, PCR módszerrel
- A progresszió, és a túlélés vizsgálata
- Prognosztikus értékű klinikopatológiai paraméterek meghatározása
- A progressziómentes és teljes túlélés vizsgálata, subgroup elemzések alapján

4. Módszerek

4.1. Beteganyag ismertetése

A Semmelweis Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Arc-Állcsont-Szájsebészeti és Fogászati Klinika beteganyagán 2013 és 2018 közötti időszakban végeztük a vizsgálatot, szigorú beválogatási kritériumok szerint. A vizsgálatot részben retrospektív, részben prospektív módon végeztük. A kutatást az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) engedélyezte (határozat száma: 14497-4/2017/EKU).

Beválogatásra került minden olyan, 10-90 év közötti beteg, akinél próbaexcízió során laphámrák igazolódott. Lokalizációt tekintve csak nyelv, szájfenék, bucca, resecabilis, T₁₋₄, N_{0-2a2b2c}, M₀ stádiumú laphámdaganatokat vizsgáltunk.

Rögzítésre került a betegek életkora, neme, a diagnózis felállításának ideje a grade, a lokalizáció, a daganat kiterjedése, a nyirokcsomó státusz, a TNM, a stádiumbeosztás, és a káros szokások.

Kizáró kritériumnak tekintettük, ha a beteg anamnézisében korábban szerepelt már szájüregi daganatos betegség. Kizáró ok volt továbbá az is, ha műtétet, kemoterápiát, sugárterápiát kontraindikáló megbetegedése volt, valamint ha a javasolt kezelések bármelyikébe nem egyezett bele. Amennyiben a műtét, illetve a kezelés során a beteg általános állapota jelentős romlást mutatott, a vizsgálatban a továbbiakban nem vett részt.

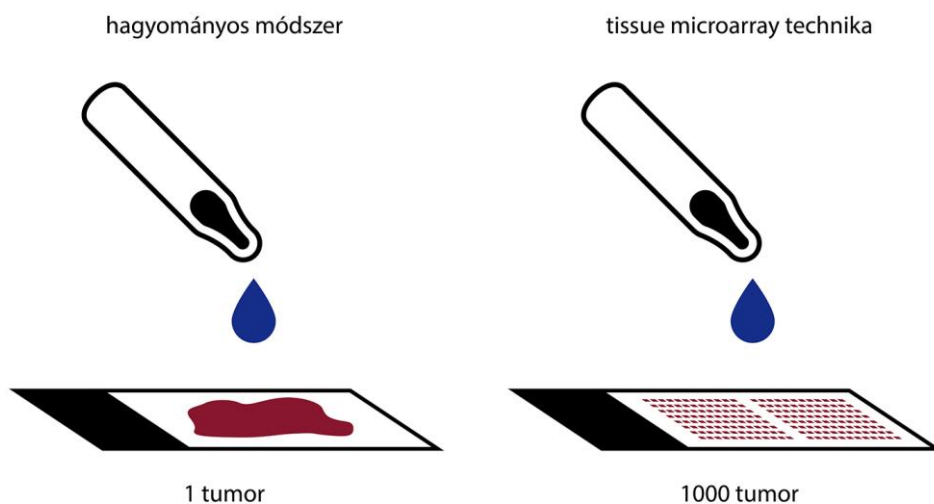
A betegek részletes betegtájékoztató és beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A vizsgálatban való részvételüket bármikor, indoklás nélkül visszavonhatták.

A vizsgálati és kontroll betegcsoportokat életkor szerint alakítottuk ki. Az 50 éves kor alatti (fiatal) daganatos betegek alkotják a vizsgálati, az 50 éves kor feletti pedig a kontroll betegcsoportot. 101 fő került elsődlegesen beválogatásra 68 férfi és 33 nő, közülük 6 beteg 30 éves, vagy annál fiatalabb volt. A vizsgálatok során 2 fő esetében az immunhisztokémiai eredmény bizonytalansága miatt, 11 fő esetében egyéb okból történt kizárás, így végül 50 fő tartozott a kontroll és 38 fő a vizsgálati betegcsoportba. A férfi/nő megoszlás 61/27 volt. Az átlagéletkor 53 év, a legfiatalabb beteg 22, a legidősebb 85 éves volt.

4.2. Módszerek

Szöveti multiblokk-tissue microarray (TMA) (7. ábra)

A technika lényegét nagyszámú, paraffinba ágyazott tumorszövetmintából származó szövethengerek egy recipiens blokkba történő összeépítése képezi, mely után ezen a multiblokkon, azonos körülmények között, az immunhisztokémiai reakciók elvégezhetőek. Egy TMA blokkba kerülnek összeépítésre a kontroll betegcsoport szövethengerei, egy másikba pedig a vizsgálati betegcsoport szöveti core-jai. A módszer segítségével, standard reakciókörülmények között (azonos inkubációs idő, hőmérséklet, antigén feltárás, reagens-koncentráció) lehet egyidejűleg akár több száz mintát vizsgálni, ez a kapott eredmények sokkal nagyobb pontosságát eredményezi. Míg a hagyományos módszernél egy-egy mintában több száz gén expressziója vizsgálható, az általunk használt TMA-módszerben egy-egy gén vizsgálható esetünkben (p53, p16, Ki67, EGFR) sok száz mintában (Krenács és mtsai 2006).



7. ábra: Hagományos módszer: 1 tumor; tissue microarray technika: 1000 tumor (Krenács és mtsai 2006)

A rutin klinikopatológiai paraméterek mellett, immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a két betegcsoport p53, p16, Ki67, EGFR génexpressziós profilját.

Minden paraffinos szövetmintából kiválasztásra került a vizsgálathoz szükséges daganatos régió, hogy ezekből szövethengereket képezve, egy TMA blokkba összeépítve, elvégezhetőek legyenek az immunhisztokémiai reakciók (a kiválasztást minden esetben ugyanaz a személy végezte).

4.2.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok:

A p16 (SCBT), EGFR (SCBT), Ki67 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) savókat 1:100, míg a p53 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) savót 1:200 hígításban alkalmaztuk, detektáló rendszerként a Bond Polymer Refine Detection-t (DS9800) használtuk. A kit Bond automatán használható, mely polimer alapú, biotinmentes detektáló rendszer, DAB előhívóval.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat 4 µm vastagságú, formalinban fixált, paraffin blokkokon végeztük. A lemezeket xilollal deparaffináltuk, ezt követően különböző erősségű alkoholok sorozatával dehidráltuk. Az endogén peroxidáz aktivitást szobahőmérsékleten, 30 perces, 3%-os hidrogén-peroxidban való történő inkubációval blokkoltuk. Ezt követően a lemezeket 30 perces, TBS pufferrel (pH 7,4) való öblítés után az elsődleges antitestekkel, EGFR-rel, p53-mal és Ki-67-tel inkubáltuk. Következő lépésként a lemezeket ismét lemostuk TBS-sel. Miután a másodlagos antitesteket hozzáadtuk, a lemezeket ismét 30 percig mostuk. A standard DAB-n keresztül az antigén-antitest komplexek barna pigmentként rajzolódtak ki. A lemezeket haematoxilinnel színeztük, majd ezt követte a blottolás, szárítás és lefedés.

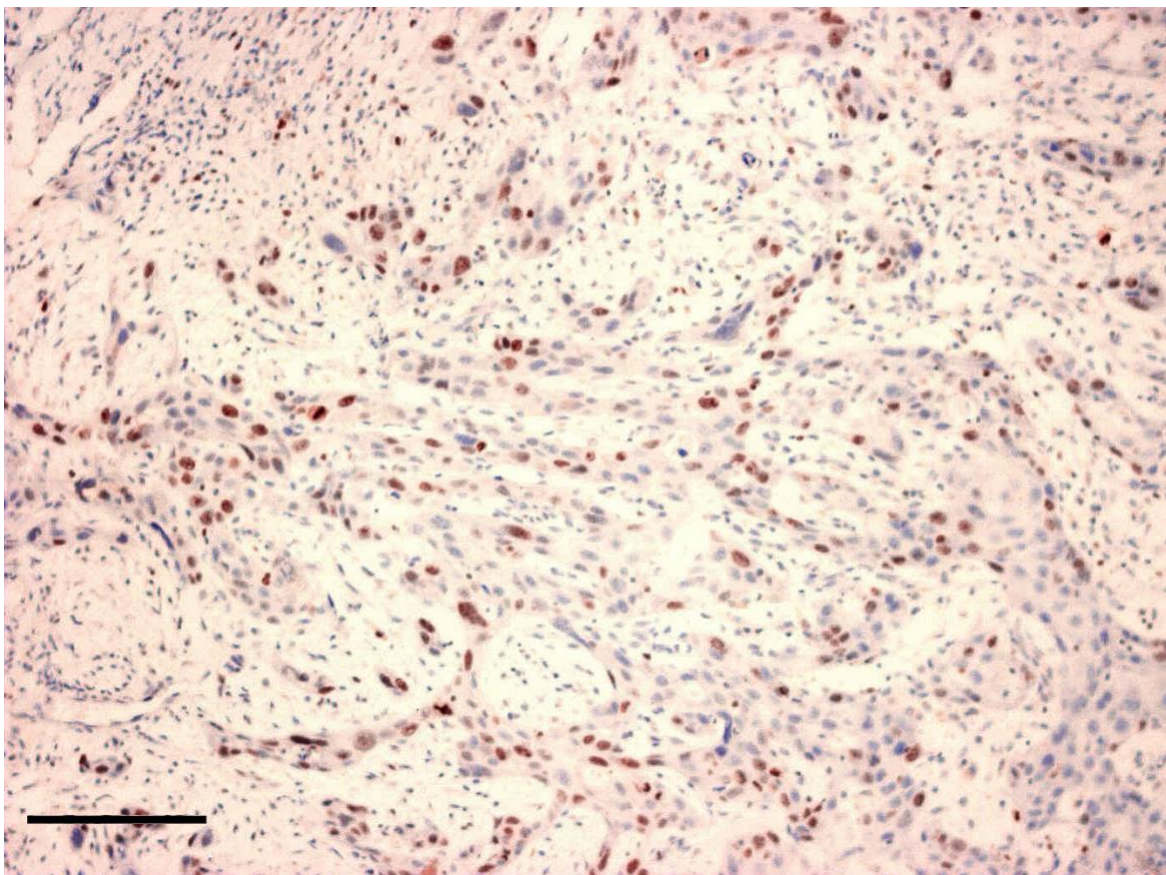
Automatizált rendszert (Leica BOND-III, Leica Biosystems Inc., US) használtunk a p16, anti- p16 antitesttel (Thermo Scientific, 5A8A4 klón, hígítás: 1:3.000, előkezelés: Bond Epitope Retrieval oldat 1/97 °C) történő színezéséhez. Leica BOND-III készülék segítségével ismételt Bond Polymer detektálás történt. Amennyiben a festés elérte a nucleus és a citoplazma legalább 10%-át, az immunfestést p16 pozitívnak tekintettük, egyebekben negatívként értékeltük (Rodrigo és mtsai 2015).

Értékelés:

Az immunhisztokémiai jelöléseket fénymikroszkóp segítségével értékeltük. A p16, Ki67, és p53 értékelésnél a pozitív-negatív festődés, és azok intenzitása alapján értékeltük a különböző eseteket, szemikvantitatív módon, százalékos rendszert alkalmazva (8., 9., 10. ábra).

Az EGFR értékelésnél a H-score rendszer szerint jártunk el, mely a hám-festődés intenzitását és százalékos arányát értékeli. Az intenzitás értéke *0*, ha nem festődött; *1*, ha a normálnál gyengébb volt a festődés; *2*-es kategóriába a normálissal megegyező; a *3*-as kategóriába a normálnál erősebben festődő területek tartoznak (11. ábra).

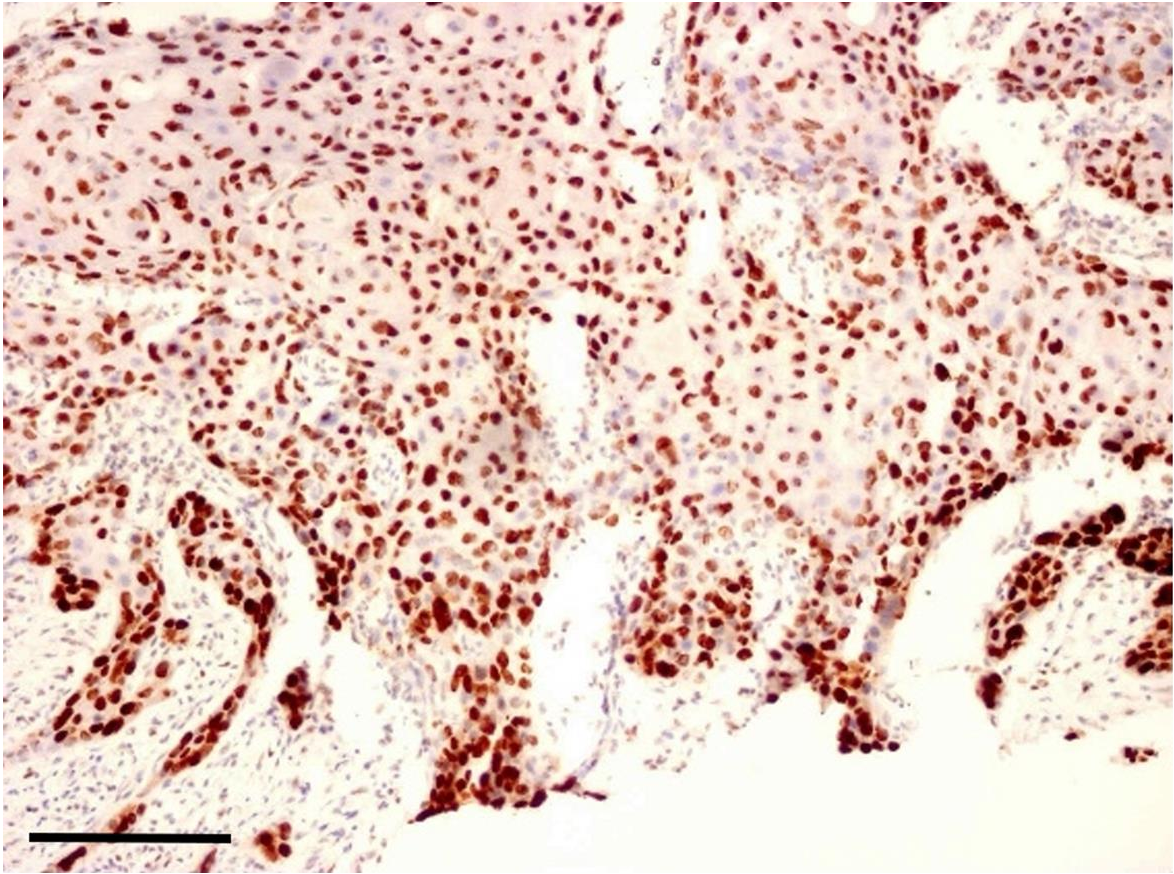
A minták értékelését minden esetben egy ember végezte, azonos módszertan alapján.



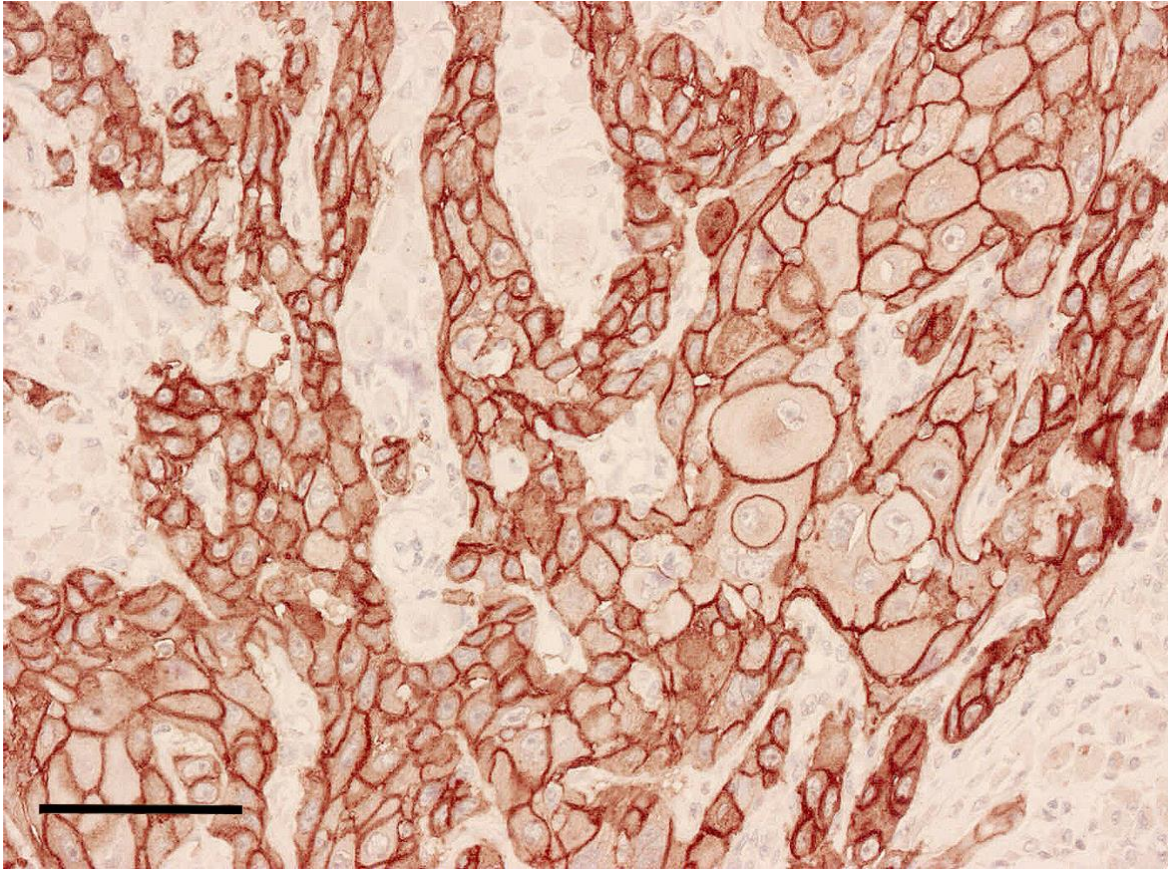
8. ábra: A tumorfészek perifériás sejtjei erős Ki67 magi pozitivitással festődnek (saját beteganyagunkból)



9. ábra: Erős p16 festődés egy szájfenéki daganatból származó mintában (saját beteganyagunkból)



10. ábra: A tumorsejteknek túlnyomó többsége erős p53 pozitívítást mutat egy szájfenéki daganatban (saját beteganyagunkból)



11. ábra: Erős EGFR festődés (saját beteganyagunkból)

4.2.2. HPV fertőzés kimutatása és tipizálása PCR módszerrel

HPV fertőzés kimutatása és tipizálása FFPE mintából Full Spectrum HPV-DNS PCR módszerrel:

A kutatás során a Synlab Budapest Diagnosztikai Központ GenoID Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriuma a kutatás időtartama alatt 100 db FFPE szájüregi rákos mintából HPV kimutatást és tipizálást végzett, az alábbi technológiával. A vizsgálati eredményről kizárólag kutatási célból felhasználható eredményt szolgáltatott, mivel az FFPE minta rutin diagnosztikai felhasználási területen kívül esik.

Az FFPE minták deparaffinálása a folyamat első lépése. Az alábbiakban részletezett módon zajlik a folyamat (SYNLAB - Dr. Benczik anyaga).

Szükséges anyagok:

- xilol
- abszolút etanol
- 70%-os etanol

1. Eppendorf csőbe 4-5 mikrométeres metszeteket készítünk a patológias területről: kisebb szövet esetén 8-10-et, nagyobb esetén 3-4-et (kb.1cm-es darab)
2. az Eppendorfban lévő metszetekre 1ml xilolt öntünk
3. vortexelés
4. 10 perc inkubáció szobahőmérsékleten
5. centrifugálás maximális sebességen (14000 rpm) 5 percig szobahőmérsékleten
6. a felülúszót óvatosan lepipettázzuk
7. az Eppendorfban lévő metszetekre újból 1ml xilolt öntünk
8. vortexelés
9. 10 perc inkubáció szobahőmérsékleten
10. centrifugálás maximális sebességen (14.000 rpm) 5 percig, szobahőmérsékleten
11. a felülúszót óvatosan lepipettázzuk

Ha paraffin még nem oldódott ki teljesen (több, mint 3-4 metszet esetén lehetséges), a xilolos lépést ismétljük meg, legfeljebb még kétszer

12. 1 ml abszolút etanol hozzáadása
13. vortexelés
14. 10 perc inkubáció szobahőmérsékleten
15. centrifugálás maximális sebességen (14000 rpm) 5 percig, szobahőmérsékleten
16. a felülúszót óvatosan lepipettázzuk
17. 1 ml 70%-os etanol hozzáadása
18. vortexelés
19. 10 perc inkubáció szobahőmérsékleten

20. centrifugálás maximális sebességen (14.000 rpm) 5 percig, szobahőmérsékleten

21. a felülúszót óvatosan lepipettázzuk

Ha a xilol még nem oldódott ki teljesen, az etanolos lépést meg kell ismételni.

Fontos, hogy az utolsó lépésnél alaposan leszívjuk a mintáról az etanolt.

22. szárítás szobahőmérsékleten kb. 10 percig, (nem szabad teljesen kiszárítani) az Eppendorf csövet fejfelé lefelé téve, figyelni kell, hogy mikor párolog el a csepp

Az FFPE mintákból, a patológiás területről lemetezett minták deparaffinálását követően, a DNS preparálás automatizált, paramagnetikus módszerű, szilika bázisú DNS preparálási eljárással történik. Humán, kontroll PCR vizsgálattal ellenőrizzük, hogy amplifikálható minőségű-e a DNS preparátum, és van-e a mintában kellő mennyiségű humán sejt. A vizsgálat során a mintába, a preparálás során, internal control DNS-t viszünk be, amit a módszer a vizsgálat során amplifikál majd detektál.

A HPV kimutatása és tipizálása microplate formátumban kivitelezhető, HPV-DNS amplifikáción és típus specifikus próbákkal történő hibridizáción alapuló módszer. A teszt 48 különböző HPV típus kvalitatív kimutatására szolgál, cervikális, anogenitális mintából, hámkaparákból, szövetből, ELISA formátumú detektálást alkalmazva. Öt alacsony kockázatú (low risk): 6, 11, 42, 43, 44, és 14-féle magas kockázatú (high risk): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 HPV típus kimutatására alkalmas, csoportos formában. A rendszer további 29 egyéb, az említett csoportokba nem besorolt HPV típust is detektál (NA-HPV, nem besorolt kockázati csoport)

A HPV tipizálási eljárás ELISA formátumban kivitelezhető, egy csőben végrehajtott, egyenként detektált, HPV-DNS amplifikáción és típus-specifikus próbákkal történő hibridizáción alapuló rendszer. A teszt 16 különböző HPV típus kvalitatív, önálló kimutatására szolgál. Két alacsony (low risk): 6, 11, és 14 magas kockázatú (high risk): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ez csak 12 HPV kimutatására alkalmas (Jeney és mtsai 2007).

4.2.3. Statisztikai elemzések:

A statisztikai elemzésekhez az *IBM SPSS Statistics 27* programot használtuk. A kategoriális változók páronkénti függetlenségvizsgálatára *Fisher-féle egzakt tesztet* használtunk. 2 csoport összehasonlítására normál eloszlás esetén *t-próbát*, nem normál eloszlás esetén *Mann-Whitney U* tesztet alkalmaztunk. Keresztábrás elemzéseknél *Pearson féle khi-négyzet próbával* dolgoztunk. A regresszió-analízist *Cox regresszió*, és binomiális logisztikus regresszió alkalmazásával végeztük el. A lineáris változókat a *Box-Tidwell* módszerrel értékeltük. A többszörös összehasonlításból eredő hibalehetőségek kiküszöbölésére a *Bonferroni* módszert használtuk.

Kaplan Meier (Log rank tesztel) és Cox regresszióval vizsgáltuk a teljes és a progressziómentes túlélést. Az univariációs regresszió-analízisnél a változók az alábbi klinikopatológiai paraméterek voltak: nem, életkor, tumorlokalizáció, dohányzás, alkoholfogyasztás, recidíva, tumorstádium, tumorméret, nyirokcsomó-érintettség, kemoterápia, sugárterápia, valamint az immunhisztokémiai markerek: p16, p53, Ki67, EGFR.

Az univariációs regresszió-analízis során kapott, szignifikáns eredmények kerültek további elemzésre (a sugárterápia és a kemoterápia kivételével) a multivariációs regressziós modell analízisben. A sugár- és kemoterápia, mint változó, azért került kizárásra, mert a dolgozat nem terjed ki a radiokemoterápia során használt készítményekre, dózisokra, ezért a tisztánlátás érdekében nem vontuk bele a további vizsgálatokba.

Az immunhisztokémiai markerek vizsgálatokor kiválasztott küszöbértékek a 25 és 50 percentilis értékek voltak.

Szignifikanciaszintnek a 0,05-ös értéket vettük.

5. Eredmények

A mintánkban (n=88) a férfi/nő arány 69,3%/30,7% volt (6. táblázat). A vizsgálati csoportban a férfi/nő arány 71,1%/28,9%, a kontrollcsoportban pedig 68%/32%.

6. táblázat: Nemek szerinti megoszlás a teljes beteganyagban

összesen	nő	férfi
88 fő	27 fő	61 fő

5.1. Klinikopatológiai paraméterek a teljes beteganyagban (7. táblázat)

A 7. táblázat alapján látható, hogy a két korcsoportot összevetve, a tumorstádium esetén találtunk szignifikáns összefüggést.

7. táblázat: A beteganyag részletes karakterisztikája

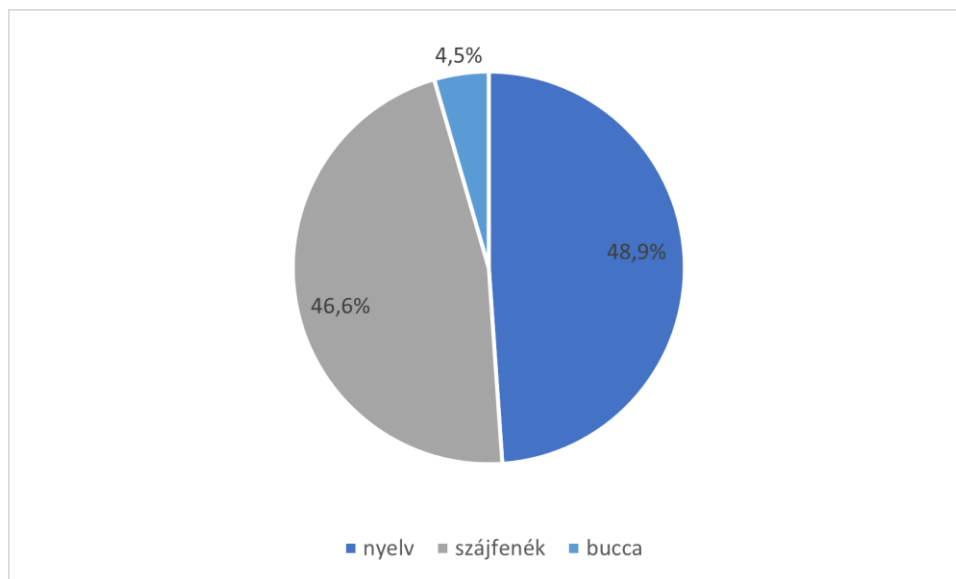
Paraméterek		≤50 év n (%)	>50 év n (%)	összesen n=88	p érték
nem	férfi	27 (71,1%)	34 (68%)	61 (69,3%)	p=0,758 <i>Pearson χ^2</i>
	nő	11 (28,9%)	16 (32%)	27 (30,7%)	
életkor (év)	median	43.5	60		
	minimum	22	51		
	maximum	50	85		
tumorlokalizáció	nyelv	22 (57,9%)	21 (42%)	43 (48,9%)	p=0,266 <i>Fisher's exact</i>
	szájfenék	14 (36,8%)	27 (54%)	41 (46,6%)	
	bucca	2 (5,3%)	2 (4%)	4 (4,5%)	
dohányzás	dohányzó	27 (71,1%)	38 (79,2%)	65 (75,6%)	p=0,384 <i>Pearson χ^2</i>
	nemdohányzó	11 (28,9%)	10 (20,8%) 2 ismeretlen	21 (24,4%) 2 ismeretlen	
alkoholfogyasztás	ivók	12 (31,6%)	18 (38,3%)	30 (35,3%)	p=0,519 <i>Pearson χ^2</i>
	nemivók*	26 (68,4%)	29 (61,7%) 3 ismeretlen	55 (64,7%) 3 ismeretlen	
recidíva	igen	20 (52,6%)	20 (40%)	40 (45,5%)	p=0,238 <i>Pearson χ^2</i>
	nem	18 (47,4%)	30 (60%)	48 (54,5%)	
stage	I-II	15 (39,5%)	31 (62,0%)	46 (52,3%)	p=0,036 <i>Pearson χ^2</i>
	III-IV	23 (60,5%)	19 (38%)	42 (47,7%)	
T	T1	26 (68,4%)	33 (66%)	59 (67%)	p=0,811 <i>Pearson χ^2</i>
	T2-3-4a	12 (31,6%)	17 (34%)	29 (33%)	
N	N0	17 (44,7%)	32 (64%)	49 (55,7%)	p=0,072 <i>Pearson χ^2</i>
	N1-N2	21 (55,3%)	18 (36%)	39 (44,3%)	
kemoterápia	igen	10 (27%)	12 (24%)	22 (25,3%)	p=0,748 <i>Pearson χ^2</i>
	nem	27 (73%) 1 ismeretlen	38 (76%)	65 (74,7%) 1 ismeretlen	
radioterápia	igen	21 (55,3%)	23 (46%)	44 (50%)	p=0,389 <i>Pearson χ^2</i>
	nem	17 (44,7%)	27 (54%)	44 (50%)	
végkimenetel	elhunyt	19 (50%)	26 (52%)	45 (51,1%)	p=0,853 <i>Pearson χ^2</i>

* A csoportba azok a betegek kerültek besorolásra, akik vagy absztinensek vagy csak alkalmanként fogyasztanak alkoholt. Az egyszeri alkoholmennyiség nem haladja meg a 250 ml 11%-13%-os bort vagy a 4%-6%-os sört.

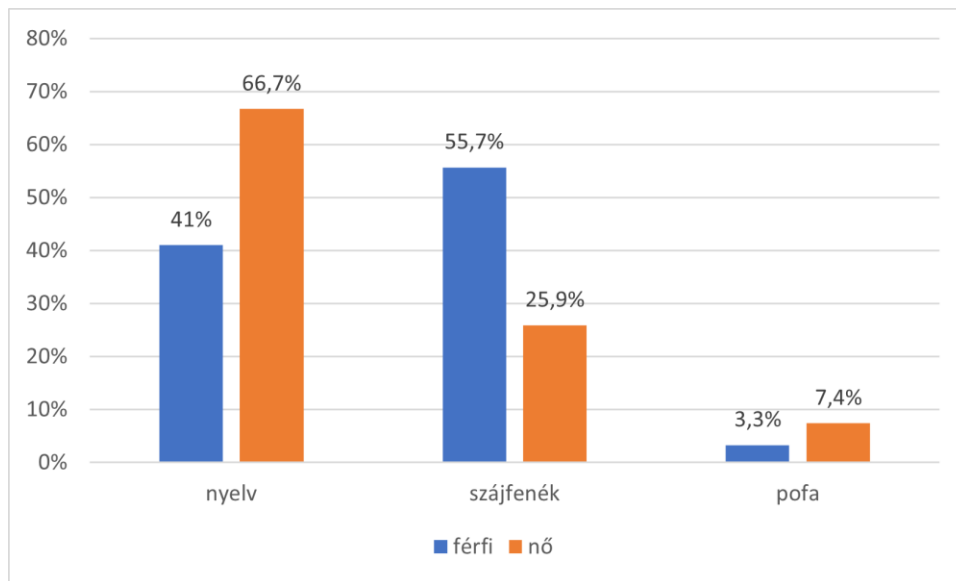
A férfiak 44,3%-a, a nők 40,7%-a 50 év alatti, 6 beteg pedig fiatalabb volt harmincévesnél, mikor szájüregi daganatot diagnosztizáltak náluk. A legfiatalabb beteg 22 éves, a legidősebb beteg 85 éves volt.

A daganatok **lokalizációját** tekintve, a mintánk közel fele-fele arányban nyelv és szájfenék daganatokból állt. 48,9%-ban nyelv, 46,6%-ban szájfenéki, 4,5%-ban buccalis elhelyezkedésűek voltak a tumorok (12. ábra).

A **nemek** szerinti eloszlást nézve nyelvdaganat a nők 66,7%-ánál, a férfiak 41%-ánál, a szájfenéki daganat a nők 25,9%-ánál, a férfiak 55,7%-ánál, buccalis daganat a nők 7,4%-ánál, a férfiak 3,3%-ánál fordult elő. A nőknél inkább a nyelvdaganatok, míg a férfiaknál a szájfenéki elhelyezkedésű daganatok a gyakoribbak, a különbség szignifikáns (Fisher exact, $p=0,025$) (13. ábra). A nem és a túlélés (Kaplan-Meier, Log rank $p=0,379$), a nem és a recidíva (Kaplan-Meier, Log rank $p=0,299$) között nincs szignifikáns különbség.



12. ábra: Tumorlokalizáció



13. ábra: Lokalizáció a nemek szerinti eloszlásban

A szájüregi daganatok **klasszikus etiológiai faktorait** vizsgálva, a **férfiak** és a **nők** dohányzási és alkoholfogyasztási szokásai között **szignifikáns** különbséget találtunk. A férfiak 83,1%-a, míg a nők 59,3%-a dohányzik (Pearson $\chi^2=5,681$, $df=1$, $p=0,017$). Statisztikai elemzésünk szerint, jóval több férfi fogyaszt alkoholt, mint nő, vagyis a férfiak 44,1%-a, a nők 15,4%-a alkoholizál (Pearson $\chi^2=6,502$, $df=1$, $p=0,011$) (8. táblázat).

8. táblázat: A káros szokások és a nemek keresztábrázata

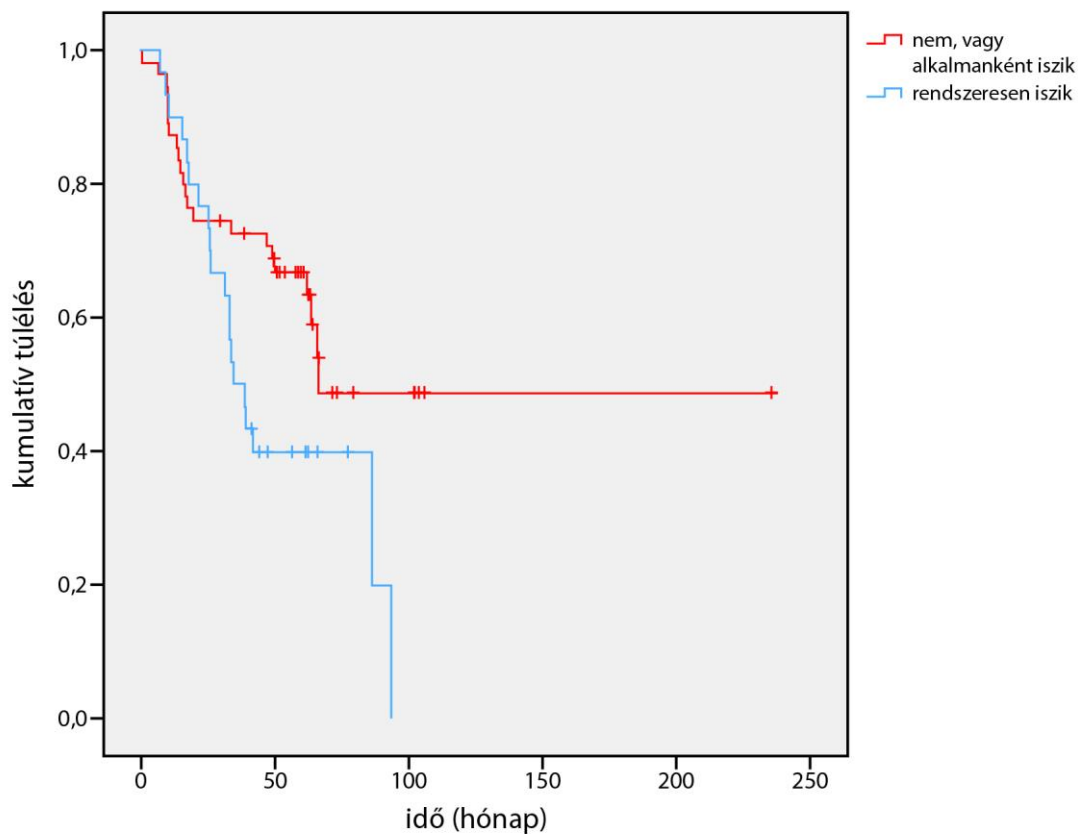
		férfi	nő
káros szokások	dohányzik	49 83,10%	16 59,30%
	nem dohányzik	10 16,90%	11 40,70%
	alkoholizál	26 44,10%	4 15,40%
	absztinens vagy alkalmanként	33 55,90%	22 84,60%

A káros szokásokat tovább elemezve elmondhatjuk, hogy a szájfenei daganatlokalisáció gyakoribbnak tűnik a dohányosok körében, az eredmény szignifikanciaközeli (Fisher exact, $p=0,057$) (9. táblázat). A daganatok elhelyezkedése és az alkoholfogyasztás között nem igazolódott szignifikáns összefüggés (Fisher exact, $p=0,351$)

9. táblázat: A káros szokások és a daganatlokalisációk kapcsolata

káros szokás		dohányzik	nem dohányzik
lokalisáció	nyelv	28 39,40%	15 71,40%
	szájfenek	38 53,50%	6 28,60%
	pofa	5 7,00%	0 0,00%

Az alkoholfogyasztást vizsgálva a rendszeresen alkoholizálók esetében rosszabb a túlélés (Kaplan Meier, Log rank, $p=0,027$) (14. ábra). A dohányzás esetében nincs szignifikáns különbség (Kaplan Meier, Log rank, $p=0,515$).



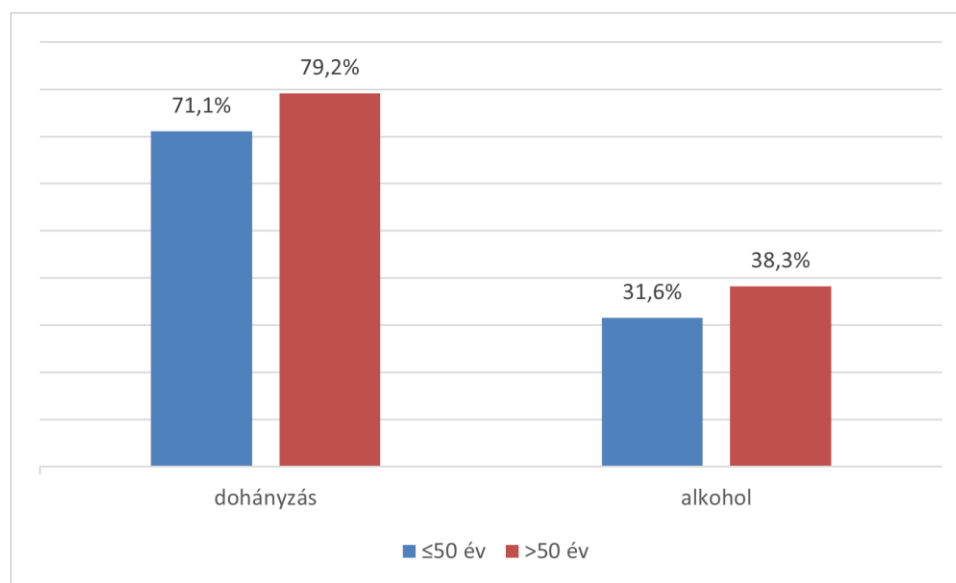
14. ábra: Alkoholfogyasztás és a teljes túlélés kapcsolata

Sem az alkoholfogyasztás, sem a dohányzás esetén nem hozott a relapszusig eltelt idő szignifikáns különbséget (Kaplan-Meier, Log rank, dohányzás $p=0,268$; alkoholfogyasztás $p=0,693$)

A relapszus kockázata a sublingualis daganatoknál alacsonyabb, mint bucca tumoroknál. Recidíva a nyelvtumorok 53,5%-ában (23/43), a szájfenéki daganatok 34,1%-ában (14/41), a bucca daganatok 75%-ában (3/4) jelentkezik ($p=0,097$, Fisher's exact).

5.2. Klinikopatológiai paraméterek a fiatal (50 év alatti) és az 50 év feletti korcsoportokban

Számos közleményben leírják, hogy a fiatalabb generációnál kevésbé meghatározó etiológiai faktornak számítanak a különböző káros szokások (dohányzás, alkoholfogyasztás) (Llewellyn és mtsai 2001). Vizsgálataink alapján, az **életkor** tekintetében a vizsgálati és kontroll betegcsoportunk **káros szokásai** között azonban nem találtunk összefüggést. Nincs szignifikáns különbség az 50 évesnél fiatalabb vizsgálati csoport és az 50 évesnél idősebb (kontroll) betegcsoport káros szokásai között. A fiatalok 71,1%-a (27/38) dohányzik, míg az idősek 79,2%-a (38/48), a különbség nem szignifikáns (Pearson $\chi^2=0,757$, $df=1$, $p=0,384$). Az alkoholfogyasztást vizsgálva a fiatalok 31,6%-a (12/38), a kontrollcsoport 38,3%-a (18/47) iszik rendszeresen (Pearson $\chi^2=0,415$, $df=1$, $p=0,519$). Úgy tűnik tehát, hogy a vizsgált beteganyagban a fiatal generáció éppen annyira hódol a káros szenvedélyeknek, mint az idősebb (15. ábra).



15. ábra: Alkoholfogyasztási és dohányzási szokások a két betegcsoportban

A binomiális, logisztikus regresszió számos tényezőt (p16, p53, Ki67, EGFR, dohányzás, alkoholfogyasztás, recidíva, nem) vesz figyelembe a fiatal és idős betegcsoport összehasonlításakor. A logisztikus regressziós modell szignifikáns, $\chi^2(9)=52,653$, $p<0,001$, 61.8% (Nagelkerke R2). Kilenc változóból a p16 és a Ki67 mutat szignifikáns összefüggést (10. táblázat). A p16 a fiatal, vizsgálati betegcsoportban, Ki67 pedig az idős, kontrollcsoportban mutat emelkedést.

10. táblázat: A binomiális logisztikus regresszió eredménye az 50 év alatti és az 50 év feletti betegcsoportot összevetve

	<i>Hazard Ratio</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>P értékek</i>
p16	1,079	1,043-1,117	0,000
p53	0,997	0,975-1,021	0,829
Ki67	0,936	0,896-0,977	0,002
EGFR	0,994	0,981-1,008	0,383
dohányzás ref: nemdohányzó	1,559	0,315-7,722	0,586
alkohol ref: nemivók	0,962	0,243-3,806	0,956
recidíva ref: nem	3,262	0,827-12,867	0,091
nem ref: nő	2,102	0,487-9,238	0,325
stage ref: stage I, II	1,809	0,501-6,532	0,365

5.3. Túlélési elemzések

Progressziómentes túlélés

A Log rank teszttel megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a vizsgálati és kontrollcsoport relapszusig eltelt idejében. Nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 1,146$, $p=0,284$).

Cox regressziós analízissel az alábbi megfigyeléseket tettük:

Univariációs Cox regresszió (11. táblázat)

Szignifikáns különbséget találtunk a **kemoterápiában** és a **sugárterápiában** részesült betegeknél. A relapszus kockázata nagyobb azoknál a betegeknél, akik kemoterápiát vagy sugárterápiát kaptak. Ennek az eredménynek a legkézenfekvőbb magyarázata az, hogy ezeket a kezeléseket eleve a rosszabb prognózisú betegek kapják.

A magas **EGFR expresszió** esetén rosszabb a prognózis. Szignifikánsan nagyobb a relapszus kockázata, ha a H score érték 90 feletti az EGFR expressziónál.

Multivariációs Cox regresszió (12. táblázat)

A multivariációs elemzés során azt találtuk, hogy a **recidíva** kockázata nagyobb az 50 évesnél fiatalabb betegcsoportban, mint az 50 évesnél idősebb csoportban. Szignifikáns különbséget találtunk továbbá a **p16** és **EGFR expresszió**nál. Alacsonyabb a relapszus kockázata, ha a p16 60% feletti értéket mutat. Magasabb a relapszus kockázata, ha az EGFR expressziónál 90 feletti a H score érték.

11. táblázat: Progressziómentes túlélés-univariációs Cox regresszió

	<i>Progressziómentes túlélés (PFS)</i>		
	<i>univar.Cox reg.</i>		
	<i>Hazard Ratio</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>p érték</i>
nem ref: nő	0,713	0,376-1,354	0,301
életkor ref: 50 év felett	1,401	0,753-2,605	0,287
tumorlokalizáció ref: nyelv			
bucca	2,026	0,607-6,762	0,251
szájfenék	0,580	0,298-1,129	0,109
dohányzás ref: nemdohányzó	0,684	0,347-1,345	0,271
alkohol ref: nemivók	1,141	0,593-2,195	0,694
stage ref: stage I,II	1,466	0,787-2,729	0,228
T ref: T1	1,206	0,630-2,311	0,572
N ref: N0	1,531	0,823-2,848	0,179
kemoterápia ref: nem kapott	4,688	2,472-8,891	<0,001
radioterápia ref: nem kapott	5,294	2,509-11,170	<0,001
p16 ref: <60%			
p16 (60%<)	0,722	0,385-1,351	0,308
p53 ref: <50%			
p53 (50%<)	0,823	0,441-1,534	0,539
Ki67 ref: <30%			
Ki67 (30%<)	0,707	0,380-1,315	0,274
EGFR ref: <90 H score			
EGFR (H score 90-300)	2,307	1,127-4,725	0,022

12. táblázat: Progressziómentes túlélés - multivariációs Cox regresszió

	<i>Progressziómentes túlélés (PFS)</i>		
	<i>multivar.Cox reg.</i>		
	<i>Hazard Ratio</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>p érték</i>
életkor ref: 50 felett	2,772	1,068-7,194	0,036
dohányzó ref: nemdohányzó	0,672	0,316-1,432	0,303
alkohol ref: nemivók	1,154	0,547-2,321	0,687
Ki67 ref:<30%	0,603	0,283-1,287	0,191
p53 ref:<50%	0,732	0,375-1,428	0,360
p16 ref: <60%	0,271	0,108-0,681	0,005
EGFR ref:<90 H score	3,141	1,465-6,734	0,003
T ref: T1	1,431	0,707-2,894	0,319
N ref: N0	1,792	0,911-3,525	0,091

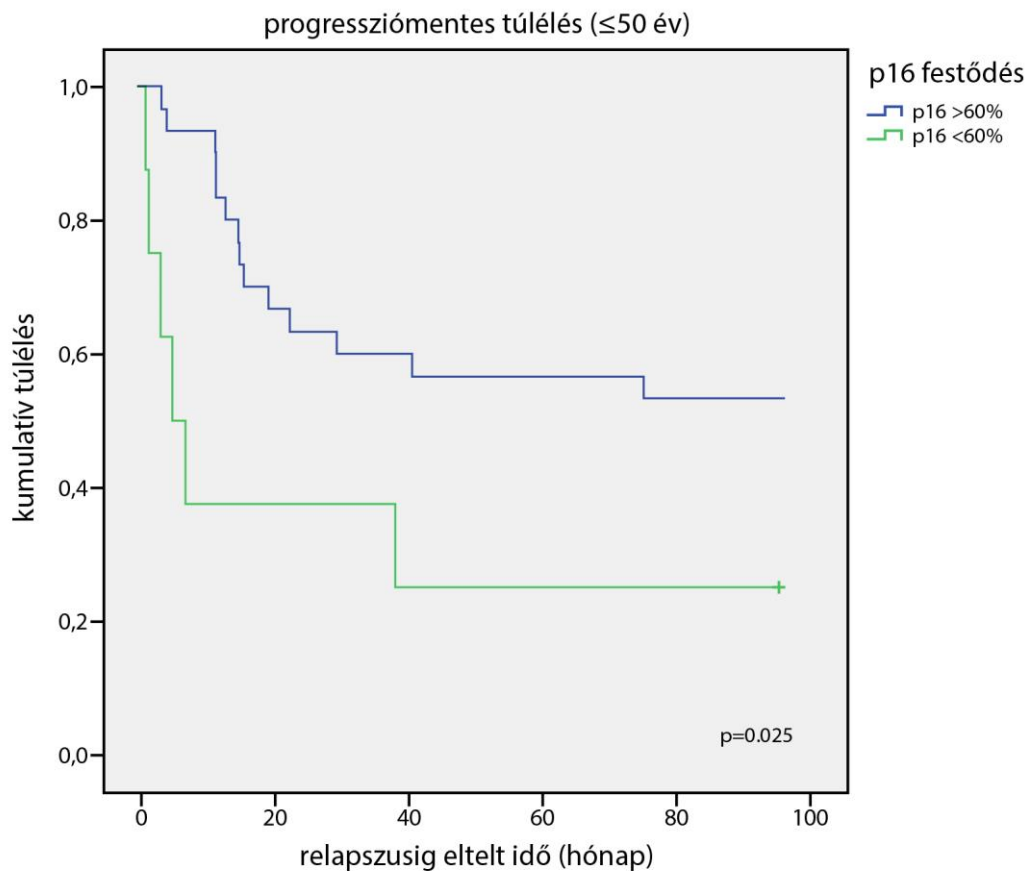
A *subgroup elemzések* során azt találtuk, hogy a fiatal betegcsoportban a progressziómentes túlélés rosszabb N₁, N₂ **nyirokcsomó érintettség** esetén, mint N₀ nyirokcsomó érintettség esetén (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 5,427$, $p=0,020$).

A fiatal betegcsoportban a 60% feletti **p16 expresszió** esetén szignifikánsan kedvezőbb a prognózis, jobb a progressziómentes túlélés (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 5,057$, $p=0,025$) (16. ábra).

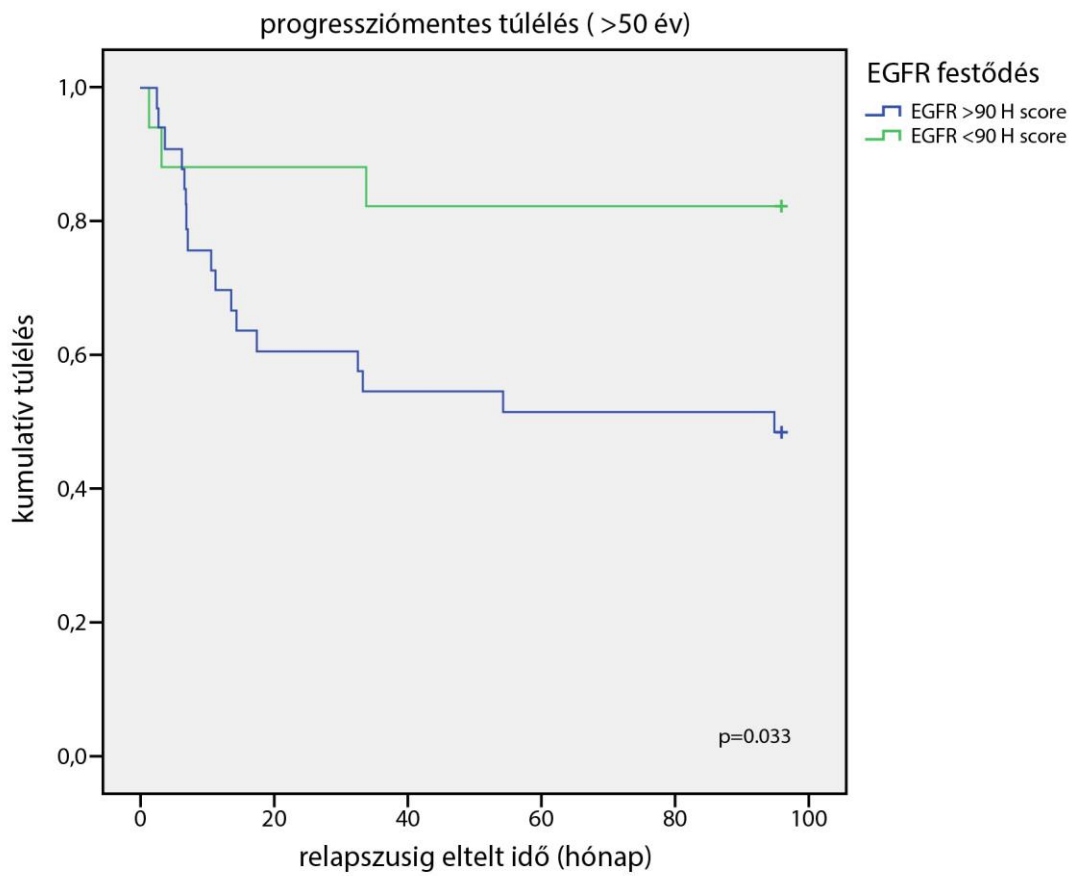
Az 50 évesnél idősebb betegcsoportot elemezve azt találtuk, hogy szignifikánsan rosszabb a túlélés ha az **EGFR expresszió** 90 feletti H score értéket mutat (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 4,532$, $p=0,033$), és rosszabb a túlélés a rendszeresen **alkoholizálóknál** (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 3,869$, $p=0,049$) (17. ábra).

Kemoterápia és **sugárterápia** esetén az 50 évesnél fiatalabb és az 50 évesnél idősebb betegcsoportnál is szignifikánsan rosszabb a túlélés (kemoterápia <50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 13,222$, $p=0,000$; ≥ 50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 13,935$, $p=0,000$; sugárterápia <50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 7,749$, $p=0,005$; ≥ 50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 16,089$, $p=0,000$).

A vizsgált beteganyagban nem volt összefüggésbe hozható a progressziómentes túlélés a beteg nemével, a dohányzási szokásokkal, a tumor méretével, a tumor stádiumával, a p53, Ki67 expresszióval.



16. ábra: A fiataloknál kisebb a relapszus kockázata, ha a p16 expresszió 60% feletti



17. ábra: A relapszus kockázata nagyobb az időseknél, ha az EGFR festődés 90 feletti H score értéket mutat

Teljes túlélés

A Log rank teszttel megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a vizsgálati és kontrollcsoport teljes túlélési idejében. Nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 0,309$, $p = 0,578$).

Univariációs Cox regresszió (13. táblázat)

Az **alkohol**t rendszeresen fogyasztók túlélése rosszabb, mint azoké akik egyáltalán nem, vagy csak alkalmanként isznak.

A **tumorstádium** a túléléssel szintén szignifikáns összefüggést mutat. A III-IV stádiumú daganatos betegek túlélése szignifikánsan rosszabb, mint az I-II stádiummal diagnosztizált betegeké.

A **nyirokcsomó-érintettség** szintén szignifikánsan befolyásolja a túlélést. Az N₁ és N₂ nyirokcsomó-státuszú tumoroknál rosszabb túléléssel számolhatunk, mint az N₀ tumoroknál.

Szignifikánsan rosszabb túlélésről számolhatunk be azoknál a betegeknél, akik **kemoterápiát** kaptak. Ennek az eredménynek a logikus magyarázata az, hogy ezeket a kezeléseket eleve a rosszabb prognózisú betegek kapták.

Multivariációs Cox regresszió (14. táblázat)

Multivariációs elemzésnél a **nyirokcsomó-érintettség** mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel. Az N₁ és N₂ daganatoknál rosszabb a túlélés, mint az N₀ daganatoknál.

13. táblázat: Teljes túlélés - univariációs Cox regresszió

	<i>Teljes túlélés (OS)</i> <i>univar.Cox reg.</i>		
	<i>Hazard Ratio</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>p érték</i>
nem ref: nő	1,348	0,691-2,627	0,381
életkor ref: 50 felett	0,816	0,448-1,483	0,504
tumorlokalizáció ref: nyelv			
bucca	1,401	0,326-6,027	0,650
szájfenék	1,145	0,628-2,087	0,659
dohányzás ref: nemdohányzók	1,277	0,611-2,670	0,516
alkohol ref: nemivók	1,974	1,070-3,640	0,029
recidíva	1,773	0,983-3,199	0,057
stage ref: stage I,II	2,305	1,257-4,227	0,007
T ref: T1	1,760	0,975-3,178	0,061
N ref: N0	2,238	1,235-4,054	0,008
keмотerápia ref: nem kapott	2,792	1,507-5,170	<0,001
radioterápia ref: nem kapott	1,461	0,808-2,642	0,210
p16 ref: <60%			
p16 (60%<)	0,793	0,436-1,442	0,447
p53 ref: <50%			
p53 (50%<)	0,763	0,420-1,385	0,374
Ki67 ref: <30%			
Ki67 (30%<)	1,017	0,562-1,838	0,957
EGFR ref:<90 H score			
EGFR (H score 90-300)	0,940	0,518-1,708	0,840

14. táblázat: Teljes túlélés - multivariációs Cox regresszió

	<i>Teljes túlélés (OS)</i> <i>multivar. Cox reg.</i>		
	<i>Hazard Ratio</i>	<i>95% C.I.</i>	<i>p érték</i>
életkor ref: 50 felett	0,899	0,353-2,291	0,824
dohányzás ref: nemdohányzók	1,212	0,529-2,775	0,650
alkohol ref: nemivők	1,867	0,932-3,743	0,078
Ki67 ref:<30%	0,824	0,373-1,819	0,632
p53 ref:<50%	0,684	0,357-1,311	0,253
p16 ref: <60%	0,715	0,303-1,684	0,442
EGFR ref:<90 H score	0,929	0,489-1,764	0,822
T ref: T1	1,626	0,852-3,101	0,140
N ref: N0	2,363	1,219-4,582	0,011

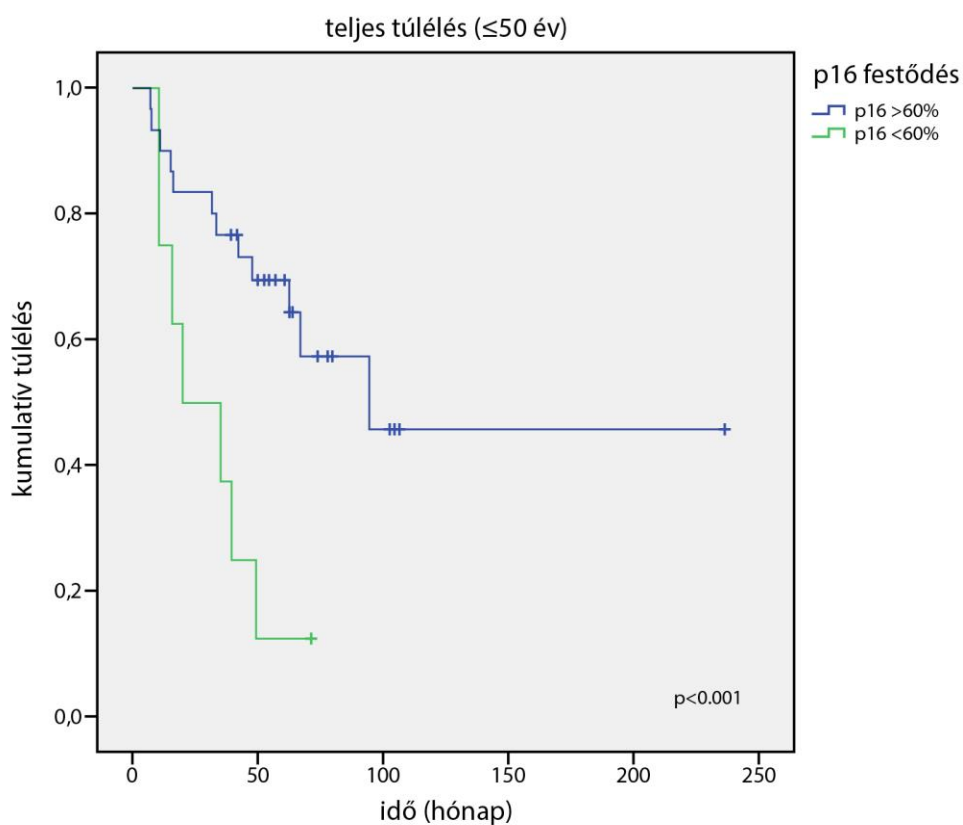
A *subgroup elemzéseknél* azt találtuk, hogy az 50 évesnél fiatalabb csoportban a **recidíva** megléte erősen rontja a túlélési esélyeket. A különbség erősen szignifikanciaközeli (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 3,510$, $p=0,061$).

A túlélés szignifikánsan jobb mindkét csoportban, ha a daganat **stádiuma** I-II-es és nem III-IV stádiumú (<50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 4,144$, $p=0,042$; ≥ 50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 5,835$, $p=0,016$).

Az 50 évesnél fiatalabb csoportban, hasonlóan a progressziómentes túléléshez, a teljes túlélés tekintetében is jobbak a túlélési mutatók, ha a **p16 expresszió** 60%-nál magasabb értéket mutat (Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 8,128$, $p=0,004$) (18. ábra).

Mindkét betegcsoportban a túlélés szignifikánsan rosszabb **kemoterápia** esetén (<50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 5,758$, $p=0,016$; ≥ 50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 6,399$, $p=0,011$), és az **N₁-N₂ tumoroknál** is (<50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 4,516$, $p=0,034$; ≥ 50 Kaplan-Meier, $\chi^2(1) = 4,402$, $p=0,036$).

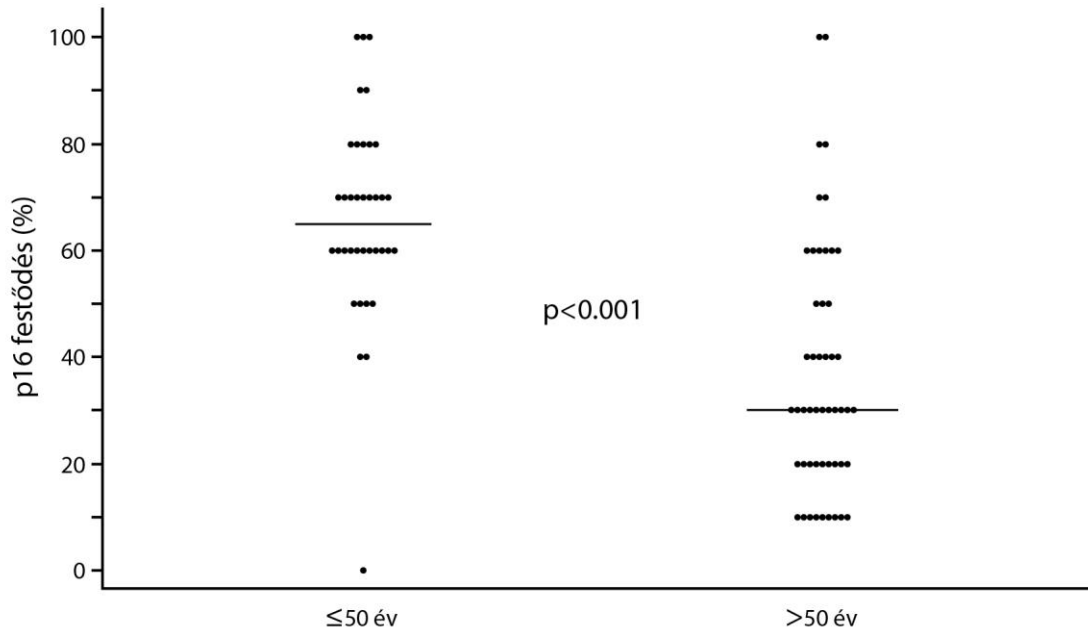
A subgroup elemzésnél nem mutatkozott szignifikáns összefüggés a betegek neme, a tumor mérete, az alkoholfogyasztási és dohányzási szokások, a radioterápia, a p53, EGFR és Ki67 expresszió között.



18. ábra: Subgroup elemzés eredménye: A fiataloknál, ha a p16 expresszió 60%-nál nagyobb, jobbak a túlélési esélyek

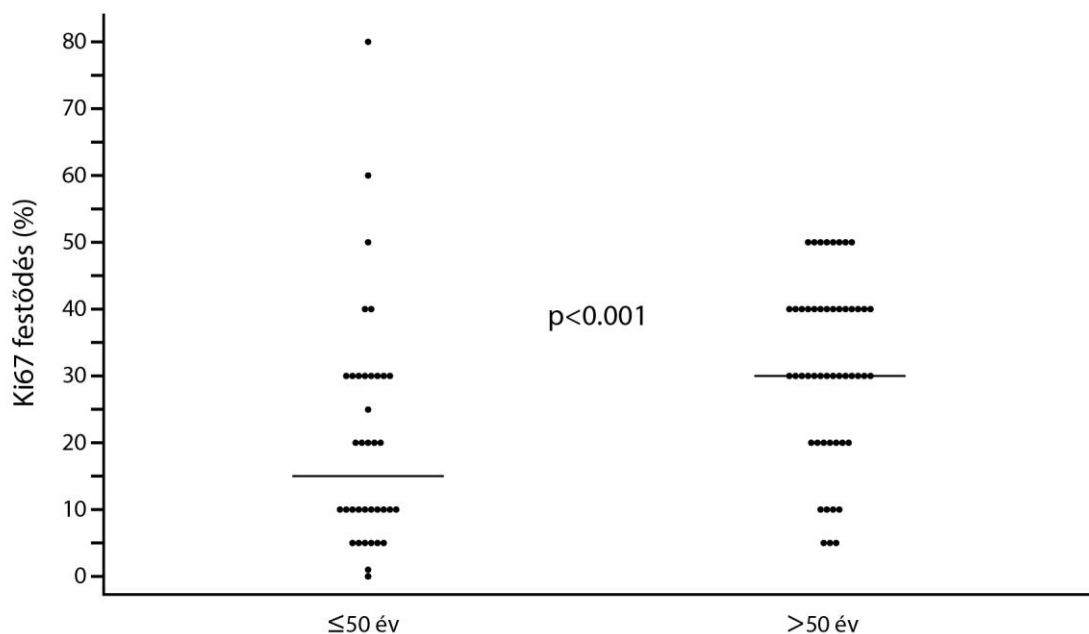
5.4. Immunhisztokémiai markerekkel összefüggő eredmények

A p16 tumorszuppresszor gén expresszió nagyobb értékeket mutat az 50 évesnél fiatalabb betegekénél. Az eredmény szignifikáns $p < 0,001$, Mann-Whitney (19. ábra).

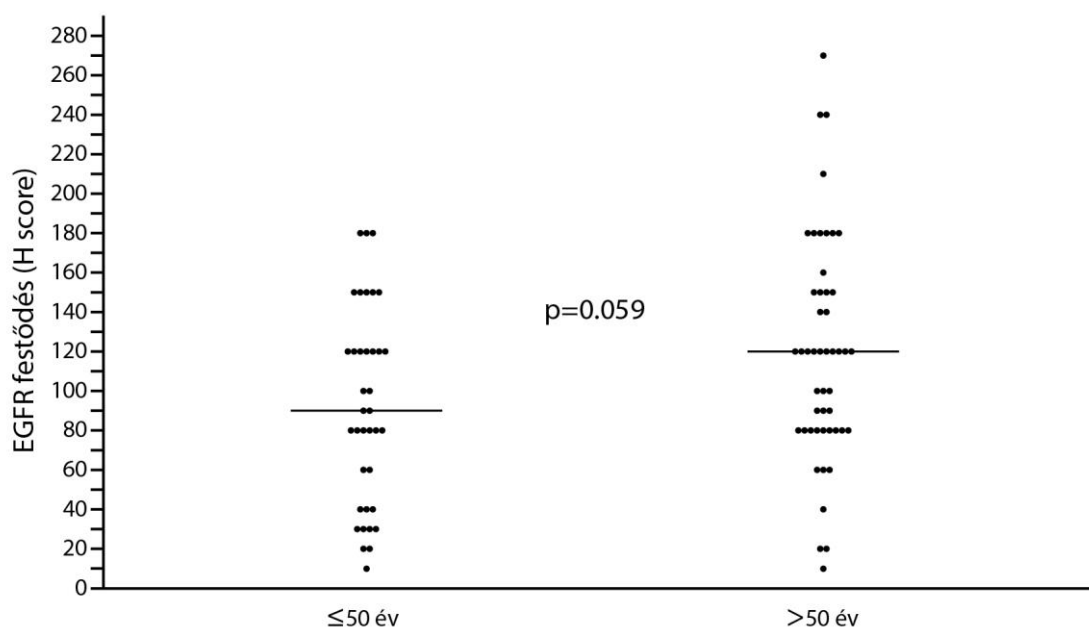


19. ábra: A p16 jelenléte a vizsgálati és kontrollcsoportban. A p16 jelenléte magasabb a vizsgálati csoportban ≤ 50 év p16 mean=65,79 (min:0, max:100), Q2/medián=65, Q1%25th percentilis=60, Q3/75th percentilis=80; > 50 év p16 mean=37 (min:10, max:100), Q2/medián=30, Q1/25th percentilis= 20, Q3/75th percentilis=52,5

Ki67 és EGFR magasabb értékeket mutat az 50 évesnél idősebb kontrollcsoportban. A különbség szignifikáns a Ki67 esetében, és erősen szignifikanciaközeli az EGFR esetében (Ki67: $p < 0,001$, EGFR: $p = 0,059$, Mann-Whitney) (20., 21. ábra).



20. ábra: Ki67 expresszió a két csoportban. A Ki67 festődése magasabb értékeket mutat az 50 évesnél idősebb betegeknél ≤ 50 év Ki67 mean=20,16 (min:0, max:80), Q2/medián=15, Q1/25th percentilis=8,75, Q3/75th percentilis=30; > 50 év Ki67 mean=31,5, (min:5, max:50), Q2/medián=30, Q1/25th percentilis=20, Q3/75th percentilis=40



21. ábra: Magasabb EGFR értékeket látunk a kontrollcsoportban a vizsgálati csoport értékeihez képest ≤50 év EGFR mean=92,11 (min:10, max:180), Q2/medián=90, Q1/25th percentilis=40, Q3/75th percentilis=120; >50 év EGFR mean=108,25 (min:10, max:240), Q2/medián=90, Q1/25th percentilis=80, Q3/75th percentilis=150

A p53 expresszió és a két, életkori csoport összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns különbséget (p=0,364, Mann-Whitney).

5.5. Full Spectrum HPV-DNS analízis eredménye:

A full spectrum HPV-DNS PCR egy esetben mutatott ki vírus DNS-t az 50 évesnél idősebb kontrollcsoportban, egy magas rizikójú HPV 56 törzset azonosítottunk. Az 50 évesnél fiatalabb vizsgálati csoportban 42 negatív eredményt kaptunk. Az egyetlen HPV pozitív esetet az egyéb statisztikai elemzésekből kizártuk.

6. Megbeszélés

A szájüregi daganatok nagy részének kialakulásáért egyértelműen a rendszeres dohányzás és a túlzott alkoholfogyasztás tehető felelőssé. Azonban a szakirodalom a fiatalok körében jelentkező daganatoknál, ezeket a klasszikus etiológiai faktorokat nem tartja a betegség meghatározó okának. Tény, hogy ahhoz, hogy egy malignus folyamat kialakuljon a szájüregben 10-20 évnyi, masszív dohányzásra, alkoholfogyasztásra van szükség (Garavello 2007, Shiboksi 2005). Ilyen hosszú expozíciós idő például saját vizsgálati csoportunk legfiatalabb, 22 éves betegénél biztosan nem állhatott fenn. Saját beteganyagunk elemzése során azt tapasztaltuk, hogy nincs szignifikáns különbség a fiatal és az idős szájüregi daganatos betegek alkoholfogyasztási és dohányzási szokásait illetően. Csupán a nemek szerinti eloszlásban találtunk különbséget. Emellett azt is elmondhatjuk, hogy a fiatal-idős csoport összehasonlításakor nagyon szembetűnő, hogy összességében magas a dohányosok száma. A saját kiértékelésünk alapján erre a (magyarországi) beteganyagra nem vonatkoztathatók a nemzetközi irodalomban olvasottak, miszerint a fiatalok kevésbé hódolnak a káros szenvedélyeknek, mint az idős betegtársaik. A beteganyag nemek szerinti eloszlását tekintve a férfi dominancia volt a meghatározó, azonban a legfiatalabb szájüregi daganatos beteg mégis nőbeteg volt (22 éves). A lokalizációt a nemi eloszlással összevetve, azt mondhatjuk, hogy a nyelv daganatok a nőket, a szájfenéki daganatok a férfiakat sújtják inkább. A leggyakoribb lokalizációk a nyelv és szájfenéki daganatok voltak. A daganatlokalizációt az életkorral összevetve, nem állíthatjuk, hogy bizonyos korcsoportokban egyes lokalizációk gyakrabban fordulnak elő, utalva akár ezzel a szexuális aktivitásra vagy a szokásokra. *Tamás és mtsai* írtak le a génexpressziók (Ki67 és EGFR) és lokalizációk között kapcsolatot. A szájüregben volt a legmagasabb az EGFR expresszió, és a legalacsonyabb a glotticus régióban. Saját eredményünk azért nem hozhatott összefüggést a lokalizáció és génexpresszió között, mivel szigorúan orális tumorok kerültek vizsgálatra (Szentkúti és mtsai 2015, Tamás és mtsai 2011).

A tumorrecidíva ugyanakkor az alacsonyabb átlagéletkornál gyakrabban jelentkezik, amely utal arra, hogy maga az életkor prediszponáló tényezőként viselkedik (Garavello és mtsai 2007).

Ennek ténye maga után vonja a fiatal generáció szorosabb utánkövetésének szükségességét. Mindemellett elmondható, hogy a fiatalok alacsonyabb stádiumú daganattal kerülnek diagnosztizálásra, ami jelentősen javítja a túlélési esélyeket, hiszen az I vagy II stádiumú daganatok mellett szignifikánsabb jobb túlélés tapasztalható.

A gének expresszióját vizsgálva, azt láttuk, hogy a p16 gén expresszációja a fiatal generációnál fordul elő gyakrabban. A p16, mint marker, előrejelezheti a HPV jelenlétét a daganatban, mivel a retinoblasztóma fehérje gátlása révén következményesen kialakul a tumorszuppresszor p16 gén expresszációja (Brauswetter és mtsai 2017), a HPV jelenléte pedig maga után vonná a jobb prognózist (Vánkos és mtsai 2015). A jelenleg érvényben lévő ajánlás szerint, a szűrést p16 immunhisztokémiával kell kezdeni, majd pozitív eredmény esetén PCR, illetve ISH módszerrel megerősíteni azt (Adelstein és mtsai 2008; Gillison és mtsai 2015, Mensch és mtsai 2018). Saját beteganyagunkban, a jelenleg legszenzitívebb, Full Spectrum HPV DNS PCR módszerrel, számos p16 pozitívitás mellett mindösszesen egy esetben tudtunk HPV-t kimutatni (a kontroll betegcsoportban). Mindezek háttérében az állhat, hogy a saját beteganyagunk a daganatok lokalizációját tekintve, szigorúan az orális elhelyezkedésű daganatokra volt leszűkítve. A nem-oropharyngeális rákokban (mint a saját vizsgált eseteink) a HPV érintettség ötször kisebb gyakoriságú, mint az oropharyngeálisokban (Pytynia és mtsai 2014). Ma már tudjuk, hogy a vírus szerepe jóval nagyobb az oropharyngeális rákok kialakulásában, mint az orálisokban (Castellsagué és mtsai 2016, Kabeya és mtsai 2012, Liang és mtsai 2008, Ragin és mtsai 2007).

Saját beteganyagunkon végzett vizsgálataink is alátámasztják, hogy a szájüregi carcinomák lokalizációs megkülönböztetése éppen ezért rendkívül hangsúlyos.

Tudjuk, hogy a high-risk HPV-k okozta cervicalis, anogenitális carcinomák és a p16-pozitívitás között jól definiált és sokszorososan megerősített kapcsolat van. Ugyanakkor a

p16-pozitivitás önmagában nem feltétlenül bizonyíték egy daganat HPV-vel való érintettségére. Erős p16-pozitivitás jellemzi pl. a tripla-negatív emlőrákokat, nyelöcsőrákokat, vagy az osteosarcomákat is, HPV etiológiai háttér nélkül (Moolmuang és mtsai 2011, Wang és mtsai 2016, Bu és mtsai 2014).

Másrésről saját eredményünk is rámutat arra, hogy a p16, mint marker, mégis megosztó szerepet tölt be a vírus azonosításában. *Smith és mtsai* is leírták, hogy az antitest titer kimutatása nem mindig megbízható (Smith és mtsai 2004). Alacsony a specificitása, emelkedett értéket mutathat alacsony kockázatú fertőzés esetén, illetve előfordulhat az ellenkezője, hogy nem emelkedett a p16 szint magas rizikójú HPV fertőzés esetén (Thompson és mtsai 2001).

A HPV tipizálása során egy high risk HPV 56 típust azonosítottunk. A tipizáláshoz használt teszt 48 különböző HPV típus kimutatására szolgál csoportos formában: 5 alacsony, 14 magas kockázatú és 29 nem besorolt kockázatú HPV típusra; valamint 16 különböző HPV kvalitatív, önálló meghatározására is alkalmas. A HPV pozitív betegünkről elmondható, hogy közel 60 éves, erős dohányos, és rendszeres alkoholfogyasztó, tehát egyéb szinergista hatás is állhat a lehetséges vírus okozta carcinogenezis mellett. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a saját beteganyagunk vizsgálata során nem igazolható, hogy a fiatalkori, szájüregi daganatok növekvő tendenciájának háttérében fő etiológiai tényezőként, egyértelműen a HPV fertőzés áll.

A p16 expresszió és a daganatos betegség lefolyásának prognózisa, illetve ezek összefüggése, az egyes daganatoknál más és más. A kissejtes tüdőráknál, a melanománál, a nasopharyngeális, a hepatocelluláris, a kolorektális karcinómáknál, a nyelöcső laphámráknál, és az osteosarcománál a p16 expresszió csökkenése jár rosszabb prognózissal, míg a prosztatata daganatoknál, ovárium karcinómáknál, és a neuroblastománál az expresszió növekedése mutat kedvezőtlenebb kórjóslatot (Gröbe és mtsai 2013, Weinberger és mtsai 2004, Xu és mtsai 2013, Wang és mtsai 2016, Bu és mtsai 2014, Ko és mtsai 2008, Mihic-Probst és mtsai 2006, Takita és mtsai 1997, Halvorsen és mtsai 2000). Ezekben a tumorokban sem szerepel etiológiai tényezőként a HPV.

A fokozott p16 expresszió mellett szignifikánsan jobb túlélési időt írtak le *Harris és mtsai*, míg *Miller és mtsai* egy 2019-es cikkben – részben hasonlóan a saját vizsgálati eredményeinkhez nem találtak összefüggést a túlélés és a p16 génexpresszió között (Harris és mtsai 2011, Miller és mtsai 2019). Azt viszont egyértelműen mondhatjuk, hogy a p16 szignifikánsan magasabb értékeket mutat a fiatal csoportban. Továbbá sokkal alacsonyabb a kockázata a relapszusnak a fiatal betegcsoportban, ha a p16 érték 60% feletti értéket mutat.

A szájúregi daganatok közel 90%-ánál fokozott EGFR expresszió látható, ami rossz prognózist von maga után (Costa és mtsai 2018, Kumar és mtsai 2008, Szabó és mtsai 2011).

Egy japán munkacsoport eredményei szerint a magas EGFR és p-EGFR expresszió korrelációt mutat a tumorinvázióval, azonban a magas génexpresszió nem mutatott összefüggést a tumor stádiummal - ez azonos a saját eredményünkkel - a nyirokcsomó érintettségével és a metasztázissal sem (Hiraishi és mtsai 2006).

Saját beteganyagunkon igazolódott, hogy fokozott EGFR expresszió az idősebb kontrollcsoportban fordul elő nagyobb számban, és a fokozott expresszió (90 feletti H score) összefüggésbe hozható a progressziómentes túléléssel. Számos tanulmány írja, hogy a magasabb Ki67 pozitív arány kedvezőtlenebb prognózist von maga után, ugyanakkor mi sem a Ki67, sem a p53 géneknél nem találtunk ezzel szignifikáns összefüggést (Sittel és mtsai 1999, Xie és mtsai 2016).

7. Következtetések

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az életkor bizonyos szempontok alapján prognosztikai jelentőséggel bír. Elmondhatjuk, hogy sokak véleményével szemben, a klasszikus etiológiai faktorok egyáltalán nem elhanyagolandók a fiatalkori, orális daganatok kialakulásában. A vizsgálati, fiatal betegcsoport (≤ 50 év) káros szokásai eléggé hasonlítanak az idősebb betegcsoport (>50 év) jól megszokott, dohányzási és alkoholfogyasztási szokásaihoz. Az általunk vizsgált esetek alapján, a sokat emlegetett HPV vírus pedig nem játszik szerepet a fiatal korban kialakult szájüregi tumoroknál. Sokkal nagyobb jelentőséget kell tulajdonítani azonban a génprofil-eltérések vizsgálatának, nemcsak a fiataloknál, hanem az időseknél egyaránt. A fiatal életkorban jelentkező, orális daganatos betegeknek célszerű vizsgálni a p16 pozitivitást, és figyelembe venni, hogy a klasszikus dohányzás, alkoholfogyasztás közül, mely káros szokások játszhatnak szerepet még etiológiai faktorként, illetve lehet szinergista szerepük a carcinogenezisben, és a prognózis kimenetelében. A p16 pozitívitas maga után vonhatná a HPV jelenlétét is, ahogy ez dogmává erősödött a cervixcarcinomákkal kapcsolatban, de beteganyagunkon igazoltuk, hogy szájüregi daganatoknál ez nem így van. Ennek magyarázata, hogy vizsgálatunkba kizárólag orális lokalizációjú daganatokat vontunk be. Annak ellenére, hogy a daganatok HPV negatívak, 60% feletti p16 pozitívitas esetén jobb a túlélés a fiataloknál, ugyanis ezekben az esetekben - saját eredményeink szerint - kisebb a relapszus kockázata. A teljes túlélés szintén jobbnak mutatkozik a fiataloknál, ha a p16 expresszió 60% feletti.

Nem lehet figyelmen kívül hagyni az idős betegcsoportra vonatkozó tényeket, miszerint a Ki67 gén expressziós értékei szignifikánsan magasabbak 50 év felett, mint 50 év alatt. Az EGFR expressziós értékei szintén magasabbak az idős, 50 feletti csoportban a fiatal betegekhez képest, közel szignifikáns eredményt hozva. A teljes túlélést egyértelműen negatívan befolyásolja az időseknél, ha az EGFR expresszió 90 feletti H score értéket mutat.

A fent leírtak alapján egyértelmű, hogy fontos a beteg életkora, a génprofil ismerete és a két, meghatározó etiológiai faktor (alkohol, dohányzás) figyelembevétele is. Eredményeink alapján egyértelműen elmondhatjuk azt is, hogy a tumor stádiuma, a nyirokcsomó-

érintettség és alkoholfogyasztás szignifikánsan befolyásolják a teljes túlélést. A progressziómentes túléléssel pedig az EGFR expresszió hozható összefüggésbe. Az életkori csoportosításban az 50 évesnél fiatalabbnál a p16, az 50 évesnél idősebbeknél az EGFR expresszió mértéke a meghatározó jelentőségű. Ezen ismeretekkel kiszűrhetőek a fiatal rizikóbeteg, és kialakítható egy szorosabb utánkövetés, személyre szabottabb staging-menetrend.

Kutatómunkánk alapján, az alábbi új megállapításokat tehetjük:

1. Az életkor tekintetében meghatározóak a génprofil eltérések: A p16 génexpresszió a fiatal életkorban szignifikánsan magasabb expressziós értékeket mutat, mint az idős, 50 év feletti betegcsoportban.
2. Az 50 év feletti tumoros betegek génprofiljában a Ki67 expresszió szignifikánsan magasabb értékekkel fordul elő, mint a fiatalok génprofiljában.
3. A hagyományos etiológiai faktorok közül az alkoholfogyasztás befolyásolja döntően a progressziómentes túlélést (>50 év), és a teljes túlélést.
4. Az EGFR 90 H score feletti expressziós értéke negatívan befolyásolja a progressziómentes túlélést.
5. Az 50 évesnél fiatalabb betegcsoportban -HPV negativitás esetén- a progressziómentes és a teljes túlélés is jobb, ha a p16 60% feletti expressziós értékeket mutat.
6. Az 50 évesnél idősebb betegcsoportban szignifikánsan rosszabb a progressziómentes túlélés, ha az EGFR expresszió 90 feletti H score.

Kutatómunkánk alapján az alábbi megállapítások függenek össze az irodalomban olvasottakkal:

1. A tisztán orális elhelyezkedésű daganatoknál nem meghatározó a humán papillómavírus etiológiai szerepe.
2. Az életkor prognosztikai jelentőséggel bír.
3. Az EGFR negatív prediktív szerepet tölt be.

8. Összefoglalás

Hazánk a fiatalkori szájüregi daganatok tekintetében a halálozási statisztikák élmezőnyében foglal helyet. Figyelembe véve azt, hogy a fiatal életkorban diagnosztizált tumorokra a korai recidíva és az agresszívebb viselkedés jellemző, szükséges olyan prognosztikai markereket keresnünk, melyekkel kiszűrhetjük ezeket a fiatal rizikóbetegeket.

Vizsgálati eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a fiatalkori szájüregi daganatok sokat vitatott etiológiai hátterében döntően a különböző génexpressziós eltérések állnak. Saját kutatásunk szigorúan orális lokalizációjú daganatokat elemzett, így a HPV vírus jelenléte ennek következtében elenyésző mértékben igazolódott.

A fiatal, vizsgálati betegcsoport klasszikus, kóroki tényezőktől való feltételezett függetlensége is megdőlt, hiszen saját vizsgálataink azt mutatják, hogy a két korcsoport káros szokásai megközelítőleg hasonlóak. A fiatal korosztálynál egyáltalán nem elhanyagolható az alkoholfogyasztás. Sőt, eredményeink is alátámasztják, hogy egyértelműen meghatározó szerepet játszik a daganatos túlélés tekintetében, hogy valaki fogyaszt-e rendszeresen alkoholt.

A genetikai hátteret elemezve, a p16 génexpresszió szignifikáns összefüggést mutatott a fiatal életkorral. A p16 expresszió ugyanis magasabb értékeket mutatott a fiataloknál, mint az időseknél. Eredményeink szerint, a fiatal vizsgálati csoportban, a 60% feletti p16 értékhez csökkenő kiújulási hajlam társult, és szignifikánsan jobb a teljes túlélés is, HPV jelenléte nélkül. A Ki67 és az EGFR magasabb értéket mutatott az idősebb generációnál. 90 H score feletti EGFR expresszió negatív prognosztikai faktornak bizonyult, szignifikánsan nagyobb a relapszus kockázata, valamint 50 évesnél idősebb betegeknél szignifikánsan rontja a teljes túlélést is.

Véleményünk szerint a genetikai eltérések és az életkor közötti összefüggések nagyobb hangsúlyt kell, hogy kapjanak, ez a terület további kutatásokat igényel. Saját eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a fiatal daganatos betegek prognózisa jobb HPV negatív tumorok esetén is, ha a p16 expresszió 60 % feletti.

9. Summary

Hungary is at the forefront of mortality statistics in terms of oral tumors among young people. Taking into consideration that tumors diagnosed in young people are typical for early recurrence and more aggressive behaviour we need to find markers that can help us filter out these young patients at risk.

Based on the results of the current study it can be said that differences in various gene expression are behind the much disputed aetiology of young age oral cancer. The current study only strictly included oral cancer, thus the presence of HPV could only be detected in a very low number of cases. It also seems that the supposed independence of this younger study group of patients from classic risk factors could not be proven as it was found that the risk factors of patients in the two age groups are mostly similar. With young age groups alcohol consumption is not negligible.

It is also a clearly determining factor in terms of survival whether the patient regularly consumes alcohol or not. Analysing the genetic background the expression of p16 showed a clear correlation with young age. P16 expression showed higher values in young people than in older. Based on our results in our young focus group p16 values above 60% mean decreasing recurring tendencies and without the presence of HPV chances for survival are significantly higher. Ki67 and EGFR showed higher values in the older patient group. EGFR expression above 90 H score proved to be a negative prognostic factor, risk of relapse is significantly higher.

In our opinion correlations between genetic variations and age should have more focus and this subject requires further research. Based on our own results we conclude that the prognosis for young cancer patients are better even in case of HPV negative tumors if p16 expression is above 60%.

10. Irodalomjegyzék

Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, Westra W, Psyrri A, Kast WM, Koutsky LA, Giuliano A, Krosnick S, Trotti A, Schuller DE, Forastiere A, Ullmann CD. (2008) 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. DOI: 10.1002/hed.21269

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 363:24-35. doi:10.1056/NEJMoa0912217

Bachar G, Hod R, Goldstein DP, Irish JC, Gullane PJ, Brown D, Gilbert RW, Hadar T, Feinmesser R, Shpitzer T. (2011) Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors. *Oral Oncol*, 47:45-50. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.11.003

Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. (2003) Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res*,9:6469-6475.

Belobrov S, Cornall AM, Young RJ, Koo K, Angel C, Wiesenfeld D, Rischin D, Garland SM, McCullough M. (2018) The role of human papillomavirus in p16-positive oral cancers. *J Oral Pathol Med*, 47:18-24. <https://doi.org/10.1111/jop.12649>

Bharti AH, Chotaliya K, Marfatia YS. (2013) An update on oral human papillomavirus infection. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*, 34:77-82. doi:10.4103/0253-7184.120533

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48:3282-3287.

Boonpoapichart S, Punyavong P, Jenwitheesuk K, Surakunprapha P, Winaikosol K. (2021) Significant Prognostic Factors Influencing the Survival Difference of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 9:3889. doi: 10.1097/GOX.0000000000003889

Boyd NM, Reade PC. (1988) Mechanism of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol*, 17:193-201.

Brauswetter D, Birtalan E, Danos K, Kocsis A, Krenacs T, Timar J, Mihalyi R, Horcsik D, Polony G, Tamas L, Petak I. (2017) p16^{INK4} expression is of prognostic and predictive value in oropharyngeal cancers independent of human papillomavirus status: a Hungarian study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 274:1959-1965. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4412-8>

Bu J, Li H, Liu LH, Ouyang YR, Guo HB, Li XY, Xiao T. (2014) p16INK4 overexpression and survival in osteosarcoma patients: a meta- analysis. *Int J Clin Exp Pathol*, 7:6091-6096.

Burd EM. (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, 16:1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.

Byers RM. (1975) Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age. *Am J Surg*, 130:475-478.

Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R, Gaudio RM, Spadari F, Carinci F. (2017) HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol*, 10:209-220.

Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, Clavero O, Alòs L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimerà N, Lloveras B, León X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Iljazovic E, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Félix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, López-Revilla R, Mandys V, González ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, de Sanjosé S, Xavier Bosch F; ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group. (2016) HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Nat Cancer Inst*, 108:403 DOI:10.1093/jnci/djv403

Chakrobarty B, Roy JG, Majumdar S, Uppala D. (2014) Relationship among tobacco habits, human papilloma virus (HPV) infection, p53 polymorphism/mutation and the risk of oral squamous) cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*, 18:211-216. doi:10.4103/0973-029X.140752

Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. (2013) Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 31:4550-4559. doi:10.1200/JCO.2013.50.3870

Choi S, Myers JN. (2008) Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res*, 87:14-32. doi:10.1177/154405910808700104

Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F; WHO International Agency for Research on Cancer. (2005) Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*, 6:204. doi:10.1016/s1470-2045(05)70086-3

Combes JD, Franceschi S. (2014) Role of human papillomavirus in non-oro-pharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol*, 50:370-379. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.11.004

Costa V, Kowalski LP, Coutinho-Camillo CM, Begnami MD, Calsavara VF, Neves JI, Kaminagakura E. (2018) EGFR amplification and expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. *Int. J. Oral Maxillofacial Surg*, 47:817-823. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.01.002>

Dolens EDS, Dourado MR, Almangush A, Salo TA, Gurgel Rocha CA, da Silva SD, Brennan PA, Coletta RD. (2021) The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 11:784924. doi: 10.3389/fonc.2021.784924.

Doorbar J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110:525-541. doi:10.1042/CS20050369

Döbrössy L. (2005) Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*, 24:9-17. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5044-4>

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 356:1944-1956. doi:10.1056/NEJMoa065497

ECIS: European Cancer Information System <http://ecis.jrc.ec.europa.eu>

Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, Simard EP, Boscoe FP, Henley SJ, Jemal A, Cho H, Anderson RN, Kohler BA, Ehemann CR, Ward EM. (2014) Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975–2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on

survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*. 120:1290–1314.

ESPAD report 2019 http://www.espad.org/sites/espad.org/files/2020.3878_EN_04.pdf

Eurobarometer <https://europa.eu/eurobarometer>

Eurostat <https://ec.europa.eu/eurostat>

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. (2008) 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. doi:10.1093/jnci/djn011

Favia G, Kanduc D, Lo Muzio L, Lucchese A, Serpico R. (2004) Possible association between HPV16 E7 protein level and cytokeratin 19. *Int J Cancer*, 111:795-797. doi:10.1002/ijc.20343

Ferreira AK, Carvalho SH, Granville-Garcia AF, Sarmiento DJ, Agripino GG, Abreu MH, Melo MC, Caldas AD Jr, Godoy GP. (2021) Survival and prognostic factors in patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 26:387-e392. doi: 10.4317/medoral.24242.

Garavello W, Spreafico R, Giani RM. (2007) Oral tongue cancer in young patients: A matched analysis. *Oral Oncol* 43:894-897. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.10.013>

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. (2015) Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, 33:3235-3242. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6995>

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92:709-20. doi: 10.1093/jnci/92.9.709.

Glick M, Johnson NW. (2011) Oral and oropharyngeal cancer: what are the next steps?. *J Am Dent Assoc*,142:892-894. doi:10.14219/jada.archive.2011.0280

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory <https://gco.iarc.fr/>

Grigolato R, Accorona R, Lombardo G, Corrocher G, Garagiola U, Massari F, Nicoli S, Rossi S, Calabrese L. (2021) Oral cancer in non-smoker non-drinker patients. Could comparative pet oncology help to understand risk factors and pathogenesis? *Crit Rev Oncol Hematol*. 166:103458. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103458.

Gröbe A, Hanken H, Kluwe L, Schöllchen M, Tribius S, Pohlenz P, Clauditz T, Grob T, Simon R, Sauter G, Heiland M, Blessmann M. (2013) Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 42:676-681. <https://doi.org/10.1111/jop.12086>

Halvorsen OJ, Høstmark J, Haukaas S, Høisaeter PA, Akslen LA (2000) Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized prostate carcinoma. *Cancer* 88:416-24.

Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. (2011) Association of p16 (INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck*, 11:1622-1627. <https://doi.org/10.1002/hed.21650>

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, 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. *J Natl Cancer Inst*, 99:777-789. doi:10.1093/jnci/djk179

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 MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. (2003) Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 95:1772-1783. doi:10.1093/jnci/djg107

Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. (2006) Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol. Oncol. Res*, 12:87–91. <https://doi.org/10.1007/BF02893450>

Ho A, Dowdy SF. (2002) Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, 12:47-52. doi:10.1016/s0959-437x(01)00263-5

IARC Working Group. (1995) IARC Monographs on the Evaluation of C Risk to Carcinogenic Risk to Humans: Humanpapillomaviruses. Lyon, France: International Research, on Cancer 64

Ito K, Tsukuda M, Kawabe R, Nakagawa C, Matsushita K, Kubota A, Furukawa M, Kameda Y, Ito T. (2000) Benign and malignant oncocytoma of the salivary glands with an immunohistochemical evaluation of Ki-67. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 62:338-341. doi:10.1159/000027766

Jeney C, Takács T, Sebe A, Schaff Z. (2007) Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods*, 140:32-42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.10.013>

Kabeya M, Furuta R, Kawabata K, Takahashi S, Ishikawa Y. (2012) Prevalence of human papillomavirus in mobile tongue cancer with particular reference to young patients. *Cancer Sci*, 103:161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02149.x>

Kashima HK, Kutcher M, Kesis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. (1990) Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 99:55-61. doi:10.1177/000348949009900110

Kato K, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Nakaya H, Hase T, Yamamoto E. (2008) Predictive Value of Measuring p53 Labeling Index at the Invasive Front of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res*, 14:57–61. <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9022-3>

Khode SR, Dwivedi RC, Rhys-Evans P, Kazi R. (2014) Exploring the link between human papilloma virus and oral and oropharyngeal cancers. *J Cancer Res Ther*, 10:492-498. doi:10.4103/0973-1482.138213

Kim SJ, Joh JW, Song S, Park CK, Park J, Kim DH (2008) Promoter hypermethylation of the p16 gene is associated with poor prognosis in recurrent early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:2260-7. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0236>

Koelbl O, Rosenwald A, Haberl M, Müller J, Reuther J, Flentje M. (2001) p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49:147-154. doi:10.1016/s0360-3016(00)01356-0

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. (1995) Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*,375:506-510. doi:10.1038/375506a0

Kopper L, Tímár J, Becságh P, Nagy Zs. Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 2. Semmelweis Kiadó, Budapest 2011: 138-140.

Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. (2010) Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*, 37:386-391. doi:10.1097/OLQ.0b013e3181c94a3b

Krenács T, Stelkovic É, Molnár B, Kopper L. (2006) Proteomika a daganatkutatásban: biomarkerek diagnosztikai és klinikai validálása szöveti multiblokk (“tissue microarray”) módszerrel: *Orvosképzés*, 3:210-222.

Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, Taylor JM, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Bauer JA, Bradford CR, Carey TE. (2008) EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal. *J Clin Oncol*, 26:3128-137.

Kumaraswamy KL, Vidhya M. (2011) Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther*, 7:120-127. doi:10.4103/0973-1482.82915

Lewis A, King R, Levine A, Maghami E. (2015) The new face of head and neck cancer: the HPV epidemic *Oncology*, 29: 616-626.

Liang XH, Lewis J, Foote R, Smith D, Kademani D. (2008) Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. *J Oral Maxillofacial Surg*, 66:1875-1880. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2008.04.009>

Liggett WH Jr, Sidransky D. (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*, 16:1197-1206. doi:10.1200/JCO.1998.16.3.1197

Lindel K, Helmke B, Simon C, Weber KJ, Debus J, de Villiers EM. (2009) Cutaneous human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Invest*, 27:781-787. doi:10.1080/07357900802653456

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasurya KA. (2001) Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people-a comprehensive literature review. *Oral Oncol*, 34:401-418. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(00\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(00)00135-4)

Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. (1985) Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol*, 84:417-420. doi:10.1111/1523-1747.ep12265517

Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. (2015) The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 51:423-430. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.02.092

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 11:781-789. doi:10.1016/S1470-2045(10)70017-70026

Mensch K, Szarka K, Mensch H, Dobai A, Magyar Z, Pacurar M, Vartolomei AC, Manuc D, Dobó Nagy C. (2018) PCR technique assisting the early diagnosis of human papillomavirus a retrospective clinical study. *Revista de Chimie*, 69:2781-2787. <https://doi.org/10.37358/rc.18.10.6624>

Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, Dummer R (2006) p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. *Int J Cancer*, 118:2262-8 <https://doi.org/10.1002/ijc.21608>Ko E, Kim Y,

Miller C, Shay A, Tajudeen B, Sen N, Fidler M, Stenson K, Gattuso P, Al-Khudari S. (2019) Clinical features and outcomes in young adults with oral tongue cancer. *Am J Otolaryngol*, 40:93-96. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2018.09.022>

Miyauchi S, Kim SS, Pang J, Gold KA, Gutkind JS, Califano JA, Mell LK, Cohen EEW, Sharabi AB. (2019) Immune Modulation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and the Tumor Microenvironment by Conventional Therapeutics. *Clin Cancer Res*, 25:4211-4223. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0871

Moolmuang B, Tainsky MA. (2011) CREG₁ enhances p16(INK_{4a}) –induced cellular senescence. *Cell Cycle*, 10:518-530. <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14756>

Muraro E, Fanetti G, Lupato V, Giacomarra V, Steffan A, Gobitti C, Vaccher E, Franchin G. (2021) Cetuximab in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: Biological mechanisms involved in efficacy, toxicity and resistance. *Crit Rev Oncol Hematol*, 164:103424. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103424

Németh Zs, Turi K, Léhner Gy, Veres DS, Csurgay K. (2013) The prognostic role of age in oral cancer. A clinical study. *Magy Onkol*, 57:166-172.

O'Regan EM, Toner ME, Smyth PC, Finn SP, Timon C, Cahill S, Flavin R, O'Leary JJ, Sheils O. (2006) Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients. *Head Neck*, 28:330-338. doi:10.1002/hed.20354

Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. (2017) Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology*, 49:166-171. doi:10.1016/j.pathol.2016.11.006

Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM (2014) Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 50:380-386. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.12.019>

Ragin CC, Taioli E. (2007) 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. <https://doi.org/10.1002/ijc.22851>

Ramshankar V, Soundara VT, Shyamsundar V, Ramani P, Krishnamurthy A. (2014) Risk stratification of early stage oral tongue cancers based on HPV status and p16 immunoexpression. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15:8351-8359. doi:10.7314/apjcp.2014.15.19.8351

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. (2012) Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*, 130:1715-1725. doi:10.1002/ijc.27316

Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP. (2007) Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*, 120:1731-1738. doi:10.1002/ijc.22355

Rodrigo JP, Hermesen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, García-Velasco F, Snijders PJ, Heideman DA, García-Pedrero JM. (2015) Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypolaryngeal squamous cell carcinoma in northern Spain. *Cancer Epidemiol*, 39:37-41. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.11.003>

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 366:704-707. doi:10.1038/366704a0

Shaw RJ, Hobkirk AJ, Nikolaidis G, Woolgar JA, Triantafyllou A, Brown JS, Liloglou T, Risk JM. (2013) Molecular staging of surgical margins in oral squamous cell carcinoma using promoter methylation of p16(INK4A), cytoglobin, E-cadherin, and TMEFF2. *Ann Surg Oncol*, 20:2796-2802. doi:10.1245/s10434-012-2713-8

Shiboksi CH, Schmidt BL, Jordan RCK. (2005) Tongue and tonsil carcinoma. Increasing trends in the U.S. population ages 20-24 years. *Cancer*, 103:1843-1849. <https://doi.org/10.1002/cncr.20998>

Shope RE, Hurst EW. (1933) Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *J Exp Med*. 58:607-624. doi:10.1084/jem.58.5.607

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. (1999) Prognostic significance of Ki67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*, 35:583-589. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(99\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(99)00041-X)

Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Wang D, Turek LP, Haugen TH. (2004) HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 12:45-56. <https://doi.org/10.1080/10647440400009896>

Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. (1983) Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg.* 147-53. doi: 10.1016/0007-117x(83)90060-4.

Syrjänen S. (2003) Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol*,192:123-128. doi:10.1007/s00430-002-0173-7

Syrjänen S. (2007) Human papilloma viruses in head and neck carcinomas. *N Engl J Med*, 356:993-995.

Szabó B, Nelhubel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely C, Peták I, Lotz G, Hegedus Z, Hegedus B, Füle T, Döme B, Tímár 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 Oncol* 47:487-496. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.20>

Szentirmay Z, Pólus K, Tamás L, Szentkúti G, Kurcsics J, Csernák E, Tóth E, Kásler M. (2005) Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer Metastasis Rev*, 24:19-34. doi:10.1007/s10555-005-5045-3

Szentkúti G, Dános K, Brauswetter D, Kiszner G, Krenács T, Csákó L, Répássy G, Tamás L. (2015) Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res*, 21:643–650. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9869-4>

Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J (1997) Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res* 57:907-12. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/57/5/907>

Tamás L, Szentkúti G, Eros M, Dános K, Brauswetter D, Szende B, Zsákovics I, Krenács T. (2011) Differential Biomarker Expression in Head and Neck Cancer Correlates with Anatomical Localization. *Pathol. Oncol. Res.*, 17:721–727. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9376-9>

Tatiana Natasha Toporcov, Ariana Znaor, Zuo-Feng Zhang, Guo-Pei Yu, Deborah M Winn, Qingyi Wei, Marta Vilensky, Thomas Vaughan, Peter Thomson, Renato Talamini, Neonila Szeszenia-Dabrowska, Erich M Sturgis, Elaine Smith, Oxana Shangina, Stephen M Schwartz, Stimson Schantz, Peter Rudnai, Lorenzo Richiardi, Heribert Ramroth, Mark P Purdue, Andrew F Olshan, José Eluf-Neto, Joshua Muscat, Raquel Ajub Moyses, Hal Morgenstern, Ana Menezes, Michael McClean, Keitaro Matsuo, Dana Mates, Tatiana V Macfarlane, Jolanta Lissowska, Fabio Levi, Philip Lazarus, Carlo La Vecchia, Pagona Lagiou, Sergio Koifman, Kristina Kjaerheim, Karl Kelsey, Ivana Holcatova, Rolando Herrero, Claire Healy, Richard B Hayes, Silvia Franceschi, Leticia Fernandez, Eleonora Fabianova, Alexander W Daudt, Otávio Alberto Curioni, Luigino Dal Maso, Maria Paula Curado, David I Conway, Chu Chen, Xavier Castellsague, Cristina Canova, Gabriella Cadoni, Paul Brennan, Stefania Boccia, José Leopoldo Ferreira Antunes, Wolfgang Ahrens, Antonio Agudo, Paolo Boffetta, Mia Hashibe, Yuan-Chin Amy Lee, Victor Wünsch Filho (2015) Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium, *International Journal of Epidemiology*, 44:169–185, <https://doi.org/10.1093/ije/dyu255>

Thompson IOC, van der Bijl P, van Wyk CW, van Eyk AD. (2001) A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch Oral Biol*, 46:1091-1098. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(01\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(01)00082-6)

Túri K, Barabás P, Csurgay K, Léhner GY, Lórinicz A, Németh Z. (2013) An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a Central-Eastern European population. *Pathology and Oncology Research*, 19:353-363. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9628-y>

Vánkos JB, Piurkó V, Suba Zs, Németh Zs, Tímár J, Kenessey I. (2015) The prognostic role of expression of p16 tumor suppressor gene in Hungarian patients with oral squamous cell carcinoma. *Magyar Onkol*, 59:352-359

Voelkel-Johnson C, Voeks DJ, Greenberg NM, Barrios R, Maggouta F, Kurtz DT, Schwartz DA, Keller GM, Papenbrock T, Clawson GA, Norris JS. (2000) Genomic instability-based transgenic models of prostate cancer. *Carcinogenesis*, 21:1623-1627.

Wang L, Li J, Yu X, Zhang Z, Pang L, Li S, Hou J, Li F. (2016) Prognostic significance of overexpressed p16(INK4A) in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Biomark Med*, 10:537-546. <https://doi.org/10.2217/bmm-2015-0057>

Wang Z, Sturgis EM, Zhang Y, Huang Z, Zhou Q, Wei Q, Li G. (2011) Combined p53-related genetic variant together with HPV infection increase oral cancer risk. *Int J Cancer*, 131:251-258. <https://doi.org/10.1002/ijc.27335>

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, Rimm DL, Psyrri A. (2004) Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*, 10:5684-5691. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0448>

Wyganowska-Świątkowska M, Jankun J. (2015) Plasminogen activation system in oral cancer: Relevance in prognosis and therapy (Review). *Int J Oncol*, 47:16-24. [doi:10.3892/ijo.2015.3021](https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3021)

Xie S, Liu Y, Qiao X, Hua RX, Wang K, Shan XF, Cai ZG. (2016) What is the prognostic significance of ki67 positivity in oral squamous cell carcinoma? *J Cancer*, 7:758-767.

Xu L, Cai J, Yang Q, Ding H, Wu L, Li T, Wang Z. (2013) Prognostic significance of several biomarkers in epithelial ovarian cancer: a meta analysis of published studies. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139:1257-1277. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1435-z>

zur Hausen H. (1983) Papovaviruses and human tumors. *Haematol Blood Transfus.* 28:289-92. doi: 10.1007/978-3-642-68761-7_55

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Csurgay K, Zalatnai A, Benczik M, Csomó BK, Horváth F, Lőrincz Á, Komlós G, Németh Z (2021) A Study Of Prognostic Factors in Young Patients with Non-HPV Oral Cancer in Central Europe. Pathology and Oncology Research 27:1609991 <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1609991>

Komlos G, **Csurgay K**, Horváth F, Pelyhe L, Németh Z (2021) Periodontitis as a risk for oral cancer: a case-control study. BMC Oral Health 21:640 <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01998-y>

Németh Zs, Turi K, Léhner Gy, Veres DS, **Csurgay K** (2013) The prognostic role of age in oral cancer. A clinical study. Magyar Onkológia 57:166-172.

Túri K, Barabás P, **Csurgay K**, Léhner GY, Lőrincz A, Németh Z (2013) An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a Central-Eastern European population. Pathology and Oncology Research 19:353-363. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9628-y>

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

Kaposvári I, Körmöczi K, **Csurgay K**, Horváth F, Ashourion AH, Buglyó A, Turai AR, Joób-Fancsaly Á (2021) Delayed-onset infections after lower third molar surgery: a Hungarian case-control study. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology 132:641-647 doi: 10.1016/j.oooo.2021.04.052

Vuity D, Bogdán S, **Csurgay K**, Sápi Z, Németh Zs (2013) Malignant Fibrous Histiocytoma/Undifferentiated High-Grade Pleomorphic Sarcoma of the Maxillary Sinus: Report of a case and review of the literature. Pathology and Oncology Research 19:605-609 doi: 10.1007/s12253-013-9640-2

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki a témavezetőmnek, Dr. Németh Zsolt egyetemi docens Úrnak, hogy segített a tudományos munkám kidolgozásában, a kutatási terv megírásában, és végigkísérte a dolgozatom elkészítését. Motivált, és tanácsokkal látott el a tudományos munka egész ideje alatt. Humorával, segítőkészségével visszatérített a feladatomhoz, ha a nehézségek magukkal ragadtak.

Köszönöm munkahelyi vezetőmnek, Dr. Joób-Fancsaly Árpád egyetemi docens Úrnak, hogy tanácsaival segített céljaim elérésében. Sokszor, sok helyzetben nemcsak főnökömnek, hanem barátomnak is nevezhettem.

Köszönöm Dr. Zalatnai Attila egyetemi docens Úrnak, hogy elvégezte az immunhisztokémiai vizsgálatokat, és kiértékelte azok eredményeit, szabadidejét sem kímélve.

Köszönöm Dr. Benczik Mártának a HPV-DNS PCR vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Hálás vagyok Dr. Horváth Ferencnek, aki az eredmények statisztikai kiértékelését végezte. Türelemmel válaszolt a véget nem érő kérdéseimre.

Köszönettel tartozom, barátomnak és egyben kollégámnak Dr. Komlós Györgynek a sok támogatásért és segítségért.

Köszönöm Dr. Lőrincz Ádámnak, akivel első műtéteimet végeztem el rezidens orvosként. Hálás vagyok, hogy végigkísérte minden első mozdulatomat, most pedig a publikációm angol fordítását bízhattam Rá.

Hálás vagyok Szedlákné Beatrixnak, hogy fáradságot nem kímélve segített a kórlapok rendszerezésében.

Köszönöm az Arc-Állcsont-Szájsebészeti és Fogászati Klinika valamennyi dolgozójának, hogy segítségemre voltak.

Köszönet illeti a Családomat, akik mindvégig támogattak és mellettem álltak. Kislányom Édesapjának, aki nagy türelemmel állt Hozzám az olykor nehezebb időszakokban.

Külön köszönet illeti Édesanyámat, aki egész életemben a legfőbb támaszom volt. Legőszintébb hálával tartozom Neki, hogy ilyen csodálatos Nagymamája a Kislányomnak, és mindig vigyázott rá, míg én dolgoztam azon, hogy mihamarabb elkészüljek a publikációimmal és a dolgozatommal.