

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) TÉZISEK

**LARYNGEÁLIS ÉS HYPOPHARYNGEÁLIS
DAGANATOK ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE
IMMUNHISZTOKÉMIAI ÉS KOMPARATÍV GENOMIÁLIS
HYBRIDIZÁCIÓS MÓDSZEREKKEL**

DR. JUHÁSZ ATTILA ZOLTÁN

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM,
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA,
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET;
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR,
FÜL-, ORR-, GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA**

DEBRECEN, 2001.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Az extracelluláris matrix komponenseinek szerepe a tumor progresszió során	6
2.2. A tenascin szerkezeti felépítése, funkciója	6
2.3. Daganatok kialakulását és progresszióját kísérő genetikai eltérések és kimutatásuk lehetőségei	7
2.4. A fej-nyaki tumorok kromoszomális eltérései	9
2.5. A fej-nyaki régió tumorainak vizsgálata során CGH-val nyert eredmények	10
3. Célkitűzések	15
4. Anyagok és módszerek	16
4.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok	16
4.1.1. A tenascin expresszió vizsgálatára használt szöveti minták	16
4.1.2. Szöveti metszetek preparálása és immunhisztokémiai reakciók kivitelezése	16
4.1.3. Kettős immunfluoreszcens reakciók	18
4.1.4. Hármás immunfluoreszcens reakciók	19
4.1.5. Immunhisztokémiai kontroll reakciók	19
4.1.6. Immunhisztokémiai jelzések analízise és dokumentációja	20
4.1.7. A klinikai és immunhisztokémiai adatok összehasonlító analízise	20
4.1.8. A fibrin depozíció vizsgálata laryngeális és hypopharyngeális tumorokban	20
4.2. Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)	20
4.2.1. CGH analízis során vizsgált minták	20
4.2.2. DNS preparálás és CGH hibridizáció	21
4.2.3. Digitális képanalízis	22
5. Eredmények	24
5.1. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során elemzett daganatok klinikai adatai	24
5.2. A tenascin eloszlás jellegzetességei gége és hypopharynx daganatokban	25
5.3. A fibrin depozíció sajátosságai gége és hypopharynx daganatokban	28
5.4. CGH-val kimutatható kromoszomális eltérések gége tumorokban	28
5.5. CGH-val kimutatható kromoszomális eltérések hypopharynx tumorokban	34
5.6. A gége és hypopharynx karcinómák kromoszomális eltéréseinek összehasonlítása	36
6. Diskusszió	37
6.1. Eltérő tenascin expresszió gége és hypopharynx daganatokban	37
6.2. Fibrin depozíció laryngeális és hypopharyngeális rákokban	38
6.3. Genetikai eltérések gége és hypopharynx daganatokban	38
7. Összefoglalás	41
8. Irodalomjegyzék	43
9. Közlemények jegyzéke	53
9.1. A tézisekhez felhasznált közlemények	53
9.2. A témában megjelent egyéb közlemények	53
9.3. Az értekezés témájához kapcsolódó absztraktok, előadások, poszterek jegyzéke	54
10. Köszönetnyilvánítás	56
11. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai és kézirata	57

1. Bevezetés

A humán tumorok 2-3%-át a fej-nyaki régió laphám karcinómái jelentik. Évente több mint fél millió új megbetegedést diagnosztizálnak világszerte (1,2). A különböző lokalizációjú fej-nyaki primer tumorok előfordulási gyakorisága eltérő, leggyakoribb a szájüregi (40%) daganatok megjelenése, ezt követi a gége (20%), a garat (20%), illetve a nyálmirigyek és az egyéb anatómiai régiók malignus elváltozása (20%) (3-5).

A fej-nyaki laphám rákok esetében gyakori a recidíva és másodlagos malignus tumor kialakulása. A betegek 5 éves átlagos túlélése az összes daganat típus között az egyik legalacsonyabb, mindazon diagnosztikus és terápiás újdonság ellenére, melyek az utóbbi időben kerültek alkalmazásra a fej-nyaki daganatok esetében (6,7).

A tumorok kiindulási helyét is figyelembe véve, a klinikai lefolyás illetve prognózis tekintetében jellegzetes különbség észlelhető az anatómiailag szerves közelségben lévő szubrégiók tumorai között. A gége rákok kezelését követően a betegek életkilátásai relatíve kedvezőbbek (40-50%-ot is elérhet az 5 éves túlélési arány), mint a hypopharynx daganatos elváltozásai esetén (megközelítőleg 10-15% között van az 5 éves túlélési arány) (8,9).

Hazánkban (ezen belül elsősorban a Kelet-Magyarországi régióban) a fej-nyaki daganatok - közülük is elsősorban a hypopharyngeális kiindulású tumorok - arányszáma évről évre emelkedik. Az elmúlt 25 évben a gége karcinómák okozta halálozási arány 2,5-szeresére nőtt, míg a hypopharynx daganatok esetében 5-szörös emelkedés következett be. Ennek következtében mára a gége és hypopharynx tumorok okozta halálozások az összes daganatos halálozás 10%-áért felelősek. Nem hagyható figyelmen kívül az a tény sem, hogy a betegség incidenciája a női populációban is folyamatosan emelkedik, és kialakulása mindkét nem esetében egyre fiatalabb életkorra tevődik át.

Klinikai megfigyelések szerint fej-nyaki karcinómák esetén a túlélést alapvetően a tumor lokalizációja és TNM stádiuma (különösen a lokális nyirokcsomókban megjelenő áttétek) határozzák meg, a szövettani jellegzetességeket prognosztikai szempontból csekély jelentőségűnek tekintik (10,11).

Hasonlóan más gyakori daganat típusokhoz, a gégészeti tumorok diagnosztikája, illetve a gégészeti betegellátás kapcsán is alapvető fontosságú lenne a daganatok molekuláris karakterizálása (különös tekintettel a primer tumor metasztázisképző hajlamával összefüggésbe hozható markerek identifikálására), hiszen ennek ismeretében nem csak a prognózis megállapítása, de a legjobb kimenetelt biztosító

optimális daganatellenes terápia megtervezése is egzakt alapokra helyeződne. A betegek életminőségének javítására tett jelenlegi erőfeszítések, elsősorban a nagy, csonkoló műtétek (teljes gége exstirpáció a nyak nyirokcsomóinak és egyéb képleteinek eltávolításával) helyett az egyes szervek részleges meghagyásával járó műtéti megoldások (részleges gégeeltávolítás, a hang megőrzésével), illetve alternatív terápiás lehetőségek (radioterápia, kemoterápia) preferálása egzakt alapokra helyezve fogadhatók csak el etikai fenntartások nélkül. A daganat progresszió mértékének és ütemének pontos meghatározása nagy segítséget jelentene azon esetek identifikálásában, melyeknél a daganat elleni küzdelemben mindenképpen szükséges a kiterjesztett csonkoló műtétek végzése, ami a beteg további életminőségének szükségszerű romlását eredményezi (12).

Azt a hipotézist, mely szerint a tumor parenchyma jellegzetességei mellett a stróma celluláris és extracelluláris összetétele is jelentősen befolyásolhatja a malignus tumorok tulajdonságait, számos megfigyelés támasztja alá. A tumor növekedési képességét és invazivitását - legalábbis bizonyos fokig - a transzformált sejtekkel szomszédos tumor matrix összetétele határozza meg (13-15). A daganat progresszió során a sejtek proliferációját és fokozott migrációját - hasonlóan az embrionális fejlődéshez - az extracelluláris matrix különböző makromolekuláit kódoló gének aktivációja, illetve repressziója kíséri (16-20). Ennek következménye, hogy a malignus neoplazmák progresszióját a normál extracelluláris matrix (ECM) összetételének kvalitatív és kvantitatív megváltozása kíséri (21). A kvalitatív változások szintjén jellemző jelenség az epitheliális sejtek migrációjában szerepet játszó fibrin és tenascin megjelenése és felhalmozódása. A tenascin struktúrája és biológiai viselkedése alapján kialakult vélemény, miszerint a tumoros sejtek proliferációjában, migrációjában, inváziójában szerepet játszhat, kísérletes igazolást nyert (22-25), majd számos tumor típus esetén felmerült az igény, hogy a tenascin expresszió mértékét, mint prognosztikus markert értékesítsék (18, 26-33).

A tumor iniciáció és progresszió genetikai hipotézise szerint a tumor egyetlen progenitor sejt klonális expanziójának következménye, ennek ellenére nagyfokú heterogenitás észlelhető egy adott klónból származó populációban is. A kromoszómális elváltozások olyan kritikus gének (onkogének, onko-szuppresszor gének) funkciójának megváltozását vagy elvesztését eredményezhetik, melyek korábban a sejtproliferáció, sejt differenciálódás vagy éppen a genetikai stabilitás szabályozásában játszottak alapvető szerepet. A malignus elváltozások kisebb részében a genetikai instabilitás a nukleotidok szintjére korlátozódik, ami bázis szubsztitúcióban vagy delécióban,

bizonyos esetekben néhány nukleotid inszerciójában nyilvánul meg. A tumorok nagyobb részében az instabilitás kromoszómális szinten figyelhető meg, aminek eredménye kromoszóma szakaszok, vagy teljes kromoszómák elvesztése vagy többlete. Ezeknek az eltéréseknek a felismerése és klinikai paraméterekkel történő korrelációs analízise a tumorok pathogenezisére és prognózisára vonatkozóan alapvető információkat nyújthat, alapjául szolgálva új diagnosztikus és terápiás eljárások kidolgozásának.

Fentiek figyelembevételével indokolt, hogy a fej-nyaki daganatok két anatómiailag közeli lokalizációjú, de eltérő metasztatizisképző hajlamú altípusában tanulmányozzuk a tenascin expressziót és vizsgáljuk szerepét az egyes daganatok progressziójában. A tumor progresszióval együtt járó másodlagos változások megismerése mellett alapvető jelentőségű azoknak a molekuláris genetikai történéseknek a felderítése is, melyek a normál sejtek daganatos átalakulását kísérik.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az extracelluláris matrix komponenseinek szerepe a tumor progresszió során

A szolid tumorok alapvető összetevője a daganatos sejtek mellett a gazdaszervezet sejtjeiből, a vér-, és nyirokerekből, valamint az extracelluláris matrixból szerveződő tumor stróma. A daganatos sejteket övező strómában épp úgy megtalálhatók a normál extracelluláris matrix komponensek (kollagének, elasztin, laminin, fibronectin, proteoglikánok), mint a csak pathológiás folyamatokban észlelhető, úgynevezett átmeneti matrix komponensek (pl. fibrin, tenascin) (32,33). A tumor matrix alapvető szerepet játszik a daganatnövekedés szempontjából szupportív mikrokörnyezet megteremtésében és fenntartásában, a sejtek közötti kommunikáció mediálásában, s jelentős hatást fejt ki a sejtek differenciálódására (34-36).

A daganatos szövetekben a sejt-matrix interakciók változása is jelentős hatással van a tumor progresszióra és invazivitásra (37,38). A tumor matrix döntően *de novo* szintézis eredménye. Egyrészt a daganatos sejtek maguk is képesek bizonyos matrix komponensek termelésére, másrészt a normál kötőszöveti sejteket készítetik megváltozott mennyiségű és összetételű matrix produkciójára (39,40). Az így létrejött stróma kedvező feltételeket teremt a tumor növekedéséhez, illetve a metasztázisok képzéséhez. Mindkét részjelenségben alapvető fontosságú a tumoros érhálózat kialakulása, melyet a daganatos sejtek a különböző érképződést serkentő faktorok termelésével segítenek elő. A neovaszkularizáció folyamatát a környező tumor matrix átépülése kíséri (41-43).

2.2. A tenascin szerkezeti felépítése, funkciója

A tenascin, melyet több kutatócsoport szinte egyidőben írt le, különböző elnevezéssel található meg az irodalomban [glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen (44), myotendinous antigen (45), cytotactin (46)]. A molekula szerkezeti jellegzetessége a hatkarú szerkezet. Minden kar rendelkezik egy aminoterminális ciszteinben gazdag régióval, mely az oligomerizációban tölt be kardinális szerepet, ezt egy epidermális növekedési faktorhoz (epidermal growth factor, EGF) hasonló szerkezetű domén, III-as típusú fibronectinhez hasonló szekvenciák (fibronectin type-III repeat), és fibrinogénhez hasonló felépítésű régió követik a carboxy-terminális vég felé haladva (47,48). Normál felnőtt szövetekben a tenascin csak igen kis mennyiségben detektálható, de bőségesen jelen van embrionális szövetekben, különösen ahol epitheliális-mezenhimális interakció,

illetve sejtmigráció történik (24,49,50). Az elmúlt néhány évben jelentős számú kísérleti adat került közlésre arra vonatkozóan, hogy a tenascin génje felnőttben reexpresszálódhat olyan pathológiás folyamatokban, ahol sejtproliferáció, migráció és extracelluláris matrix átépülés történik, így például a sebgyógyulás, valamint a tumor növekedés helyszínein (32,33,51-54). A lelettel jó összhangban van az a tény, hogy a tenascin számos sejt adhéziót és migrációt moduláló doménnel, illetve extracelluláris matrix molekulakötő régióval (fibronektin, proteoglykán) rendelkezik (25,55). Lehetséges továbbá az is, hogy a tenascin - feltehetően az epidermális növekedési faktorhoz hasonló szerkezeti elemeknek köszönhetően - közvetlenül stimulálja bizonyos tumor sejtek proliferációját (22,23). Ezek alapján jogosan tételezhető fel, hogy a tenascin fokozott intratumorális expressziója kedvezőtlen prognosztikai marker, mely fokozott invazivitásra, metasztatizálási hajlamra utalhat.

Bizonyos neoplazmákban (mellrák, astrocytoma) a tenascin reexpressziója és akkumulációja fokozott tumor progresszióval és proliferációs index-szel párosul (20,32), míg nyálmirigy tumorokban és bizonyos bazaliómákban ez az összefüggés nem figyelhető meg (51,56) Összességében azok a közlések vannak többségben, melyek a tenascin expressziót mint lehetséges prognosztikus faktort interpretálják (18,26-28,30-33).

2.3. Daganatok kialakulását és progresszióját kísérő genetikai eltérések és kimutatásuk lehetőségei

Az elmúlt két évtized molekuláris biológiai kutatásainak eredményeképpen egyértelművé vált, hogy a daganatok kialakulásában, inváziójában és progressziójában alapvető szerepet játszanak azok a kromoszomális eltérések, melyek funkcionális onkogének vagy onko-szuppresszor gének alterációival járnak együtt. Ismertté vált, hogy ezek a genetikai elváltozások nem sporadikusan, hanem meghatározott sorrendben követik egymást.

A daganat sejtekben leírt genetikai elváltozásokat Lengauer és munkatársai négy fő csoportba osztották (57). Az első csoportba azokat az elváltozásokat sorolták, melyek mindössze néhány nukleotidot érintenek. Ezek a mutációk megnyilvánulhatnak néhány nukleotid deléciójában, inszerciójában vagy szubsztitúciójában. A másik csoportba a kromoszómák számbeli eltérésén alapuló alterációk tartoznak, ami teljes kromoszómák elvesztését vagy többletét jelentik. Ilyen jellegű eltérés szinte valamennyi humán tumorban fellelhető és gyakran tumor szuppresszor gén vagy gének

inaktivációjában nyilvánul meg. A harmadik csoportba a kromoszomális transzlokációk tartoznak. Ezek az eltérések klasszikus kromoszómasávozásos technikával viszonylag egyszerűen kimutathatók. A negyedik csoport azokat az elváltozásokat foglalja magában, melyek gének amplifikációjával kapcsolatosak. A standard sávozásos citogenetikai módszerrel ezek az eltérések, mint homogéneen festődő sávok jelennek meg a kromoszómák különböző szakaszain vagy apró DNS darabok formájában tűnnek elő a metafázisos sejtekben. Molekuláris szinten a többszörös kópiában megjelenő amplikonok a sejtek növekedésének szabályozását alapvetően befolyásolják. Az amplikonok 0,5-10 megabázis nagyságrendben tartalmazhatnak DNS-t, kialakulásuk és megjelenésük alapvetően eltér a génduplikációktól, melyek lényegesen nagyobb kromoszomális szakaszok vagy akár teljes kromoszómák aneuploidiájának vagy transzlokációjának az eredményei.

A rekombináns DNS technika alkalmazása előtt a fej-nyaki tumorok kromoszomális eltéréseinek tanulmányozása is a klasszikus kromoszóma sávozásos technika alkalmazására korlátozódott. Ennek a módszernek mind az előnyei, mind a hátrányai közismertek. A standard citogenetikai módszerek metafázisos kromoszómák analízisén alapulnak, amihez elengedhetetlen a sejtek *in vitro* tenyésztése (58,59). Mesterséges körülmények között a szöveti sejteknek csak azon hányada jut mitózisba, mely a sejtpreparálás során a különböző enzimatikus és mechanikai behatásokat túlélte, de a sejtenyésztés során a sejtek genetikai állományában bekövetkező módosulások miatt ezen sejtek esetében sem garantálható, hogy a citogenetikai elemzés során a natív tumorra vonatkozóan kapunk információkat.

A 80-as évek végét követően egyre jelentősebbé váltak azok a molekuláris genetikai technikák, melyek segítségével a kromoszomális szintű genetikai eltérések kimutatása a tumor sejtek *in vitro* tenyésztése nélkül is megvalósítható. Kiemelkedő jelentőségű ezen technikák között a fluoreszcencia *in situ* (FISH) és komparatív genomiális hibridizáció (CGH).

A FISH technika jelentősége elsősorban abban rejlik, hogy centroméra és lókuszt specifikus DNS próbák alkalmazásával a sejtek kromoszomális eltérései interfázisos sejtekben tanulmányozhatók, függetlenül azok proliferatív tulajdonságaitól (60,61).

A CGH módszer elve hasonló a FISH technikához, de további előnye, hogy a tumorsejtek genetikai analízisét a teljes genomra biztosítja.

Annak ellenére, hogy a fej-nyaki daganatok kromoszomális eltéréseit leíró tanulmányok száma igen jelentős, a daganatok kialakulását és progresszióját kísérő molekuláris történések terén ismereteink meglehetősen hiányosak. Hasonlóan más

szolid tumorok kromoszomális alterációihoz, ennek a daganat típusnak a jellegzetes genetikai eltéréseit is klasszikus citogenetikai módszerek alkalmazásával írták le először.

2.4. A fej-nyaki tumorok kromoszomális eltérései

A fej-nyaki daganatokból létrehozott sejttenyészetek citogenetikai vizsgálata során számos klonális eredetű kromoszomális aberrációt találtak, melyek közül a legjellegzetesebb a 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 11q, 13p, 14p, 15p és 18q kromoszóma karok teljes vagy részleges deléciója, továbbá a 9-es, 12-es, 13-as, 18-as és az Y kromoszómák teljes hiánya. Gyakori eltérésnek bizonyult az 1-es, 3-as, 8-as és 15-ös kromoszómák hosszú karjainak többlete és a 11q13 lókuszt amplifikációja is (62-69). Az említett kromoszómákon jellegzetes transzlokációkat, valamint számos kromoszomális szegment-átrendeződést is leírtak (70-72). Ezeknek a vizsgálatoknak az értéke a fej-nyaki daganatok genetikai eltéréseinek megismerésében elvitathatatlan, ugyanakkor figyelembe kell vennünk azokat a hátrányos tényezőket, melyeket a kariotipizálási módszer magában rejt.

Számos fej-nyaki daganat esetében az *in vitro* sejttenyésztési, kromoszóma-preparálási és sávozási kísérletek sikertelennek bizonyultak, így a fenti vizsgálatokkal nyert eredmények reprezentativitása kétséges. A kezdeti vizsgálatok után egyértelművé vált, hogy a létrehozott sejtkultúrákban egymás mellett több klón is megtalálható („poliklonális” kultúrák), így ezek alapján nem lehet eldönteni, hogy mely klón reprezentálja az eredeti daganat malignus sejtjeit. A másik, ennél is jelentősebb kételyt eredményező probléma, hogy az *in vitro* sejtkultúrákban igen gyakoriak azok az indukált változások, melyek a tenyésztési körülmények hatására jönnek létre, s következésképp a kariotipizálással nyert citogenetikai eredmények nem a natív tumorban meglévő genetikai eltéréseket reprezentálják (58,59). Az említett technikai nehézségeket oldotta fel igen hatékonyan a komparatív genomális hibridizációs technika.

A CGH alkalmas a daganatok genetikai elváltozásainak objektív vizsgálatára sejtkultúra létrehozása nélkül (73,74). Minden tumor esetén elvégezhető, tumorsejt mikrodisszekcióval és PCR-val kombinálva néhány száz tumorsejt elegendő a genetikai eltérések kimutatására (75-77).

Jelenleg a CGH-t tekintik a legalkalmasabb módszernek a malignus transzformációt szenvedett sejtek ismert és ismeretlen kromoszomális alterációinak kimutatására (74,78).

2.5. A fej-nyaki régió tumorainak vizsgálata során CGH-val nyert eredmények

A fej-nyaki daganatokon CGH-val nyert eredményeket először 1995-ben közöltek. Az azóta eltelt időszakban publikált adatokat a teljesség igényével foglaljuk össze, saját eredményeink körültekintő értékelése és értelmezése érdekében.

Speicher és munkatársai 13 fej-nyaki karcinómán végeztek CGH analízist, melyek főként garat tumorok voltak, mindössze 1 gége daganat analízisét végezték el (79). Leggyakoribb eltérésként a 3q régió DNS többletét írták le; az esetek mintegy 77%-a mutatta ezt az alterációt, mely 3 tumorban a 3q26-qter régió nagyfokú amplifikációjával társult. A DNS vesztes leggyakrabban a 3-as kromoszóma rövid karján volt észlelhető, ami több esetben a hosszú kar előbb említett többletével együttesen jelentkezett, izokromoszóma jelenlétére utalva (i(3)(q10)). A 3q26-qter régiót érintő eltérés alapján felhívták a figyelmet egy vagy több, erre a lókuszt lokalizálható, a tumor iniciációban jelentős szerepet játszó gén lehetséges szerepére. Kiemelték a *LAZ3* (80) illetve a *BCL-6* (81) gének esetleges jelentőségét. A tumorok közel 50%-át érintő eltérésként írták le az 5p amplifikációját, valamint az 5q és a 19-es kromoszóma szakaszok teljes elvesztését. Jelentősnek ítélték a 11-es kromoszómán látható CGH mintázatot, annak ellenére, hogy ez mindössze néhány tumorra korlátozódott. Ez az eltérés 1-1 tumorban a 11q13-11q22 és a 11q13 szakaszok nagymértékű amplifikációját jelentette, míg 3 másik mintában a fenti régióktól disztálisan elhelyezkedő kromoszóma kar delécióját foglalta magába (11q23-qter). Olyan tumort nem találtak, ahol a két eltérés együttesen jelent volna meg. Az említett 11q13 lókuszon található a sejtciklus szabályozásában jelentős szerepet játszó cyclin D1-et kódoló *CCND1/PRAD1* gén, mely amplifikációját, illetve regulátor fehérjének a fokozott expresszióját már több tanulmányban is kedvezőtlen prognózissal hozták kapcsolatba (82, 83). A szerzők az eltérő kiindulású szolid tumorok CGH analízisét áttekintve megállapították, hogy a különböző szervek daganatai jellegzetes eltéréseket mutattak, és hogy a fej-nyaki tumorok általuk észlelt genetikai elváltozásai a tüdő kis sejtjes karcinómájának jellegzetes eltéréseihez mutatnak hasonlóságot.

Hasonlóan az előző CGH analízishez viszonylag kisszámú tumort vizsgáltak Brzoska és munkatársai, 10 fej-nyaki karcinóma CGH eredményeit közölték (84). Vizsgálati anyagukat döntően recidív tumorok alkották olyan betegekből, akik előzőleg sugárterápiában részesültek; mindössze 3 primer tumor analíziséről számoltak be munkájukban. Az előző közleményben közöltekhöz hasonló eltéréseket találtak, beleértve a 3p karra lokalizálódó DNS vesztesést, illetve a 3q karon észlelhető DNS többletet. 3 esetben ez az alteráció együttesen fordult elő. A 3q karon detektált amplifikáció közös régiója ugyancsak a 3q26-27 volt. Az esetek 30%-ában a 19-es, 22-es, Y kromoszómák teljes, valamint a 11p és 16p részleges delécióját észlelték. Az előzőkkel megegyező gyakorisággal detektáltak amplifikációt a 2q22-24.1, 2q32, 3q13.3, 4q11-27, 7q31.3, 8q23-24 és 13q21-31 régiókban. A szerzők úgy vélik, hogy a 3q kar amplifikációja határolja be azt a területet (3q26-27), mely nagy valószínűséggel a tumor progresszióval kapcsolatba hozható, s ismételten felvetették a *LAZ3* és a *BCL-6* onkogének lehetséges szerepét.

Bockmühl és munkatársai 30 fej-nyaki primer daganatot vizsgáltak, köztük 13 gége és 7 hypopharynx tumort (85). Az analízis hiányossága, hogy a kromoszomális eltéréseket az egyes tumorokban összevontan ún. "szuperkariogram" formájában értékelték. Eredményeiket a korábbi CGH adatokkal összevetve jelentősen nagyobb gyakorisággal észleltek kromoszomális eltéréseket, (e megállapítás mind az eltérések átlagos számára, mind az egyes eltérések előfordulási gyakoriságára érvényes). A leggyakoribb eltérésnek Bockmühl és munkatársai is a 3p hiányát találták, viszont míg az előző szerzők ezt a daganatok 60-70%-ára írták le, addig ebben a tanulmányban a tumorok 97%-ában említik. Hasonlóan gyakrabban észlelték a 3q DNS többletét is (86%). Ezen a kromoszomális szakaszon 23%-ban a 3q24 és a 3q27 sávok nagyfokú amplifikációját detektálták. Nyolc mintában a teljes hosszú karon CGH-val talált DNS többlet a teljes rövid kar elvesztésével társult, izokromoszóma képződésre utalva (86,87). A 3-as kromoszóma jellegzetes 3q26 amplifikációja mellett az esetek több mint 40%-ában DNS többletet detektáltak a 11q13 (66%), 8q (56%), 19q (50%), 17q és 19p (46%) és 22q (43%) kromoszomális szakaszokon. A 3p DNS hiánya mellett jelentős százalékban fordult elő a 9-es kromoszóma rövid karjának elvesztése (73%), ami a tumorok 60%-ában a 9p21 sávra korlátozódott. Erre a sávra lokalizálódik a *p16* tumor szuppresszor gén, melynek szerepe a fej-nyaki daganatokban még napjainkban is ismeretlen (88). További, a tumorok jelentős hányadát érintő DNS veszteséket az 5q (70%), 13q (66%), 18q (63%), a 4p, 4q, 6q, és 21q (60%), valamint a 8p, 11q (54%) és 1p (50%) kromoszóma karon detektáltak. Ezek a deléciók tumor szuppresszor gének érintettségére hívják fel a figyelmet, így például a 13q14 sáv deléciója (a vizsgált tumorok 40%-ában) az *Rb-1* génnel hozható kapcsolatba (89-91). Eredményeik alapján megállapították, hogy a jól differenciált tumorokra a 9-es és a 3-as kromoszóma rövid karjának elvesztése és a 3q többlete

jellemző, összhangban Califano és munkatársainak azon megfigyelésével, mely szerint az említett lókuszon allél vesztes mutatható ki a fej-nyaki daganatok prekursor lézióiban (92). A kevésbé differenciált tumorok esetében lényegesen több genetikai eltérést sikerült kimutatni. A fenti kromoszomális eltéréseken kívül jellegzetes volt az 1pter, 11q13, 19p, 19q és 22q karok DNS többlete, sok esetben amplifikáció szintjén, valamint a 4q, 8p, 11p, 13q, 18q és 21q DNS régiók elvesztése. A szerzők ezen megfigyeléseik alapján a kevésbé differenciált tumorokban megjelenő genetikai eltéréseket a daganatos progresszióval hozták összefüggésbe. A 18q deléció, valamint a 11q13 amplifikáció előrehaladott tumorokban volt észlelhető. Ez a megfigyelés jó összhangban volt azokkal a korábbi közlésekkel, melyek ezen genetikai elváltozások meglétét rossz prognosztikai jelként interpretálták (93-95).

Izokromozóma képződésre utaló CGH eltéréseket a szerzők nemcsak a 3-as, hanem az 5-ös, 8-as, 9-es és 11-es kromoszómákon is találtak. Ezek meglétét korábban más módszerekkel is kimutatták (67). A 3p kar gyakori elvesztésével kapcsolatosan megjegyezték, hogy a 3p14.2 lókuszt tartalmazza az *FHIT* gént, melyen belül megtalálható a FRA3B fragilis pont (96), ami a HPV16 spontán integrációs helye (97). A HPV kóroki szerepe fej-nyaki daganatokban még tisztázatlan, viszont a szerzők felhívták a figyelmet arra, hogy a tüdő karcinómák 40%-ában már leírták az *FHIT* gén hibás transzkripcióját (98). Feltételezték, hogy a fej-nyaki karcinómákban megjelenő gyakori 3p deléció ezen gén alterációjával kapcsolatos, illetőleg a *FHIT* gén hasonló kóroki szerepét is felvetették.

Mindkét gén, hasonlóan a *CCND1* génhez (11q13) a sejtciklus regulációjában vesz részt (99). A három fent említett deléció gyakran együttesen jelent meg, ami a szerzők szerint alapvető jelentőségű volt a tumoros progresszióban (85). Véleményezték, hogy azon megfigyelésük, mely szerint a DNS veszteségek gyakorisága jelentősen meghaladta a DNS többleteket arra utalhat, hogy a tumor képződés során a tumor szuppresszor gének inaktivációja döntő mozzanat.

Ugyanezen szerzők következő publikációjukban, részben az előző közlemény vizsgálati eredményeit, részben 18 újabb minta analízisét ismertették (100). A vizsgált daganatok osztályozásában kiindulási alapnak tekintették, hogy a fej-nyaki karcinómáknál - mindenki által elfogadottan - a leglényegesebb prognosztikai faktor a tumor felfedezésekor észlelhető nyaki metasztázis megléte, vagy hiánya, ezért az elemzett mintákat metasztatizáló (29 tumor) és metasztázist nem adó (19 tumor) csoportokba sorolták. Eredményeik szerint a metasztázist nem képző primer daganatoknál gyakrabban fordultak elő DNS amplifikációra utaló kromoszomális elváltozások, így az 5p (5p15), 6p (6p22) és 7p (7p15) karokra lokalizálódó DNS többlet. Olyan deletált kromoszóma szakaszt, melynek jelentősége az említett csoportba tartozó tumoroknál statisztikai analízissel igazolható lett volna, nem találtak. A metasztatizáló karcinómákban egyes kromoszomális szakaszok (2q, 7q, 10q, 11p, 11q, 14q, 15q és 20p) vesztesét gyakrabban észlelték, míg ezeknél a tumoroknál a DNS többletek elsősorban a 3q, 12, 19q és 20q karokon jelentkeztek. Statisztikai analízissel a metasztatizáló fenotípusra jellegzetes eltéréseket találtak a 10q25-q26 és a 11p13-p14 lókuszon ($p < 0,01$), 95%-os szignifikancia szintet alapul véve a fentiekén kívül a 7q33-36, 10q21, 15q21, 20p11-12 sávok deléciója, illetve a 19q13.1-q13.2 amplifikációja ugyancsak kapcsolatba hozható volt a metasztatizáló képességgel ($0,01 < p < 0,05$). A szerzők véleménye szerint a tumor progressziója során kialakuló metasztatizáló képesség legalább olyan mértékben a megjelenő deléciók - feltételezhetően tumor szuppresszor gén inaktivációknak - függvénye, mint amennyire a gén amplifikációk révén bekövetkező onkogén aktivációk eredménye. A CGH-val egyértelműen kimutatott 11p13-p14 lókuszt tartalmazó amplifikációját az itt található *CD44* génnel (11p13) hozták összefüggésbe. A gén alterációjának szerepét a metasztatizáló képesség kialakításában már korábban is felvetették, pontos funkciója azonban tisztázatlan volt: míg patkány karcinóma sejtvonalakon fokozott expressziója a metasztatizáló képességgel korrelált (101), addig prosztata rák sejtvonalakban metasztázis szuppresszor géneként interpretálták (102). Humán melanoma metasztázisokon végzett vizsgálatok során a *CD44* gén csökkent expressziójáról számoltak be (103).

A későbbiek során a fenti szerzők vizsgálati anyagukat további 2 esettel kiegészítve, illetve a statisztikai elemzést kissé módosítva eredményeiket újra analizálták (104). Előző adataikhoz képest új megfigyelésnek tekinthető, hogy a jól differenciált tumorokra a korábban ismertetett 3p, 9p deléción kívül az 5q deléciót is jellegzetesnek találták. Az alacsonyan differenciált tumor csoportban megerősítést nyert az 1pter, 11q13, 19p, 19q és 22q karokon észlelt amplifikációk, illetve a 4q, 8p, 11p, 13q, 18q és 21q karokon előforduló deléciók gyakoribb megjelenése. Ebben a közleményben a metasztázist nem képező karcinómáknál az 5p amplifikáció, a metasztatizáló tumoroknál pedig a 10q deléció jelentőségét

emelték ki. A szerzők már korábban megfigyelték a 10q kar delécióját metasztatikus tüdő laphám karcinómákban a heterozigótaság elvesztésének analízise során (105). Ezzel az eltéréssel kapcsolatban a 10q24-25 lókuszon található *MXI1* gént prosztata rákoknál, mint tumor szuppresszor gént említették (106), mely a *C-MYC* onkogén negatív regulátorfehérjéjét kódolja (107). Összevetve fenti megfigyeléseiket azzal a ténnyel, hogy a *C-MYC* onkogén amplifikációját már korábban kimutatták fejnyaki laphám karcinómákban, a szerzők felvetették, hogy az *MXI1* gén elvesztésének szerepe lehet a metasztatizáló képesség kialakulásában (108).

1999-ben Stafford és munkacsoportja a fejnyaki daganatoknál megfigyelhető gyakori másodlagos tumor előfordulás és a genetikai eltérések közötti kapcsolatot elemezte CGH-val nyert eredmények alapján (109). Kiindulási alpnak tekintették Slaughter és munkatársainak, még 1953-ban közölt hipotézisét („*field of cancerisation*”), mely szerint a légúti és emésztőtraktust teljes kiterjedésében érik karcinogén expozíciók, melyek következtében valamilyen szervrészt daganatos elváltozása kialakul, de párhuzamosan egyéb területeken is kialakulhatnak előbb prekursor léziók, majd később rosszindulatú daganatok (110). Ez az elmélet összhangban van Fearon és Vogelstein „*többlépcsős karcinogenezis*” modelljével (111). CGH adataik elemzésénél szerzők figyelembe vették Sidransky munkáját is, aki kimutatta, hogy bizonyos másodlagos tumorok a primer tumorról azonos klonális eredetet mutatnak, így feltehetőleg annak mikrometasztázisaiból fejlődtek ki (112). Sidransky és munkatársai modelljüket vese tumorra alkották meg, az X kromoszóma inaktivációs vizsgálatai alapján, mely fejnyaki laphám karcinómák esetén is megerősítést nyert (113). Ezekből kiindulva Stafford és munkatársai 19 primer fejnyaki daganat, illetve a tumor makroszkópos határától 1 illetve 5 cm-re a normál mukózából vett minta CGH analízisét elemezve leírták, hogy a normál mukózában CGH-val genomiális eltérés nem mutatható ki. A tumoros minták analízise során a DNS többletek (5,2/tumor) és veszteségek (5,4/tumor) átlagos előfordulási gyakorisága nem különbözött egymástól lényegesen, a DNS veszteségek azonban a kromoszómák nagyobb szakaszait érintették. A leggyakoribb DNS többletet, összhangban a korábbi megfigyelésekkel, a 3-as kromoszóma hosszú karján találták (57%), míg a 11q amplifikáció 6 esetben fordult elő (31%), ebből 5-ben a 11q13 régióban, az ettől disztális kromoszóma kar deléciójával együtt jelent meg. Viszonylag gyakran találtak amplifikálnak a 8q23-q24.2 (33%), 8q12-13, 9q13-23, 5p11-p13 és 2q31-q32 (26%) régiókat. DNS veszteség leggyakrabban a 3p-n fordult elő (68%), 10 esetben ez a teljes kar elvesztését jelentette. A 11-es kromoszóma hosszú karját érintő DNS veszteséknél (47%) a 11q23-pter régió deléciója minden esetben megfigyelhető volt. Szerzők kiemelték, hogy az 5p DNS többlet (egyres esetekben amplifikáció) kizárólagosan gége tumorok esetében volt detektálható. Ebben a közleményben említik először egyes genetikai eltérések tumor lokalizációval való kapcsolatát. Más összefüggést a CGH eredmények és a daganatok lokalizációja, metasztatizáló képessége, differenciáltsági foka, illetve egyéb klinikai paraméterek között nem tudtak kimutatni. Azt a leletet, hogy a normál mukózában CGH-val eltérés nem mutatható ki úgy értékelték, hogy a módszer alkalmatlan a mikrometasztázisok detektálására. Ennek okait abban látták, hogy egyrészt ezekben a vizsgálati anyagokban a tumor sejtek aránya nagyon alacsony lehetett, mely nem érte el azt a mennyiséget, amit már a CGH-val ki lehet mutatni, mivel a normál sejtek gyakorlatilag „elfedték” a daganatos sejtek genetikai eltéréseit, másrészt, amennyiben a genetikai léziót pontmutáció vagy kiegyensúlyozott transzlokáció okozta, ezeknek a detektálására eleve nem alkalmas a CGH (73). Ma ez az elképzelés a DOP-PCR-al kombinált CGH analízisek esetére már nem egyértelműen tartható fenn (114). Fentiekén túl nem hagyható figyelmen kívül a CGH érzékenysége sem, hiszen az eddigi tapasztalatok szerint 2 megabázis kiterjedésű lézióknak legalább 50-szeres kópiaszámban kell jelen lennie, míg 10 megabázis esetén már 5-szörös kópiaszám változás is detektálható. A korábbi irodalom áttekintésekor megjegyezték, hogy az addig közölt genetikai alterációk fejnyaki tumorokban lokalizációjukat tekintve hasonlóak voltak, azonban előfordulási gyakoriságuk, - mint ahogy a fenti áttekintésből is kiténik - igen jelentős eltérést mutatott az egyes vizsgálati csoportokban. Ezt véleményük szerint okozhatták a CGH kiértékelésének különbözőségei, de megemlítették, hogy a háttérben genetikai különbözőség is állhat, melyet a beteg populáció eltérő földrajzi lokalizációja magyarázhat, mivel hasonló eltérést figyeltek meg emlőtumorok esetében is (115,116).

A már fentebb részletesen ismertett közlemények eredményeit is figyelembe véve 2000-ben jelent meg Bockmühl és munkatársainak 2 közleménye, melyben 113 primer daganat CGH analízisének eredményeit ismertették a betegek túlélési adatainak függvényében, egy olyan program segítségével, mely lehetővé tette a genom minden egyes lókuszára nézve az izolált statisztikai analízist (117,118). Az „*International system for human cytogenetic nomenclature*” (ISCN) sáv nomenklatúrából indultak ki, és a CGH szempontjából nem értékelhető sávok - centroméra, heterokromatikus régiók, szatelliták, szex kromoszómák - kizárása után 303 sáv individuális statisztikai analízisét végezték el Kaplan-Meier analízis alkalmazásával. A klinikai paraméterek közül a tumor kiindulási helyét, méretét (pT), nyirokcsomó metasztázis meglétét (pN), hisztopathológiai differenciáltsági fokát és stádiumát vették figyelembe. A követési adatok közül a betegség-mentes és a betegség-specifikus túlélést figyelték, átlagosan 44 hónap (40-48 hónap) nyomon követési idővel. A túlélések és a klasszikus klinikai paraméterek statisztikai analízise során megállapították, hogy szignifikáns hatása a túlélésre a nyirokcsomó metasztázis

hiányának vagy meglétének, illetve a tumor kiindulási helyét illetően a gége vagy pharyngeális lokalizációnak volt: a metasztázis megléte, illetve a pharyngeális lokalizáció rossz prognózist képviseltek. A pT-k közül érthető módon a pT1 karcinómák prognózisa volt a legjobb. A pT3 daganatok azonban kedvezőbb prognózisúnak mutatkoztak, mint a pT2 tumorok, mely első megközelítésben mindenképpen meglepő. Az adatok elemzése kapcsán kiderült, hogy a vizsgálatban szereplő pT2-es tumorok döntő többsége az alapvetően rosszabb prognózisú pharynx eredetű karcinómák közül került ki, míg a pT3 rákoknál a jobb indulatú gége daganatok voltak többségben. A legrosszabb prognózist a pT4 tumoroknál észlelték. Az említett eltérések közül a 3q21-29 és a 11q13 amplifikáció és a 8p21-22 deléció a nyirokcsomó metasztázisképzéshez képest is magasabb szintű korrelációt mutatott a tumor recidívával és a halálozással. Kiemelték, hogy ellentétben azzal a korábbi feltételezéssel, mely szerint a DNS vesztesékeknek van jelentősebb szerepük a daganatos progresszió során, nagy számú vizsgálati mintán statisztikai elemzéssel nyert eredményeik azt mutatják, hogy a DNS többletek és regionális gén amplifikációk nagyobb prognosztikai jelentőséggel bírnak. Az előzőekben említett három (3q21-29, 11q13 amplifikáció és 8p21-22 deléció), egymástól független prognosztikai jelentőséggel bíró genetikai elváltozás elemzésekor megállapították, hogy mivel ezek az eltérések a metasztatizáló képességgel is kapcsolatba hozhatók, megfontolandó volna ezen kromoszomális alterációk meglétének vagy hiányának kimutatása a rutinszerű betegellátás során is.

Bergamo és munkatársai elsősorban primer szájüregi és ajak tumorok CGH analízisét végezték el, és a genetikai eltéréseket 4 éves beteg követési idő eseményeivel összevetve elemezték (119). A leggyakrabban észlelt DNS többleteket a 3q (48%), 8q (42%) és 7p (32%) kromoszomális szakaszokon detektálták, de jelentős számban fordult elő az 1q21-43, 2q24-37, 6p22-25 és 18q12-23 (26%) DNS többlete is. Érdekes módon deléció a 3p és 22q karokon, mindössze 2-2 tumorban figyeltek meg. Ezeket az eltéréseket a betegek kórtörténetével összevetve megállapították, hogy azok a betegek, akiket a nyomon követési időszak alatt betegségük miatt elveszítettek, döntő többségükben hordozták az 1-es és a 2-es kromoszómákon észlelt amplifikációkat, így ezeket az eltéréseket kedvezőtlen prognosztikai faktorként értékelték. Az amplifikált szakaszokon lokalizálódó gének között megemlítték a 3q26.3-pter régióban a korábban már tárgyalt *LAZ3* és *BCL-6* géneken kívül a *PIK3CA* és *EVL1* onkogéneket is. A 8q amplifikációval kapcsolatosan a 8q24 sávon található *C-MYC* és *PTV1* géneket említették, valamint a 8q12-re lokalizálódó *PLAG1* gént, melynek aktivációját bizonyították nyálmirigy pleiomorph adenómában (120). A 7p12-14 régióból az ezen a kromoszomális szakaszon lokalizálódó növekedési faktor receptorok (*EGFR*), illetve faktor-kötő fehérjék (*IGFBP1* és *IGFBP3*) génjeit emelték ki. A 18q amplifikációkkal kapcsolatosan a 18q2.3 régióban található laphám karcinóma antigént (*SCCA1*, squamous cell carcinoma antigen) tartották fontosnak, melynek transzkriptuma a vérben is detektálható tumor marker, továbbá felvetették annak a lehetőségét, hogy ez a fej-nyaki daganatok meglétének monitorozására is alkalmas lehet (121). A 6p karon észlelt DNS többletek - melyek közös átfedő régiója a 6p23-pter volt - jelentőségét abban látták, hogy a *DEK* protoonkogén ezen a lókuszon található, mely feltételezhetően lókuszt specifikus DNS-kötő fehérje, transzkripciót szabályozó és szignál transzdukciós szerepkörrel (122).

Welkoborsky és munkatársai 10 metasztázist nem adó, 10 metasztázist képző, ezen belül 12 oropharyngeális és 8 hypopharyngeális kiindulású primer daganat és metasztázisaik CGH analízisét valósították meg (123). A metasztázist nem képező tumorokban amplifikációkat észleltek a 10q (80%), 5p (70%), 3q és 20q (60%), valamint a 8q (50%) és 7p (30%) karokon. DNS veszteséket az 5q, 9p és 14q karokon detektáltak 2-2 tumorban (20%), lényegesen kisebb frekvenciával, mint azt korábban már mások leírták. A nyirokcsomó metasztázist képező tumoroknál DNS többletek jelentősebb frekvenciával az 5p, 15q, 22q (60%), 3q, 11q13 (50%), 20p és 21q (40%) karokon fordultak elő. DNS vesztesékek eléggé sporadikus régiókban fordultak elő, lényegesen kisebb gyakorisággal, mint azt korábban leírták. A leggyakoribbnak talált amplifikáció 18q-n is mindössze az esetek 30%-ában volt jelen. CGH eredményeik alapján a metasztázist nem képező és metasztatizáló daganatok között a következő különbségeket találták: az 1p és 7p amplifikáció a metasztázist nem képező tumorokra, míg az 1q, 11q és 22q amplifikáció, valamint a 18q deléció kizárólagosan a metasztázist adó daganatokra jellegzetes. A 8q, 10q, 20q amplifikáció főként N0, a 15q amplifikáció pedig inkább N+ karcinómákban volt kimutatható, de nem kizárólagos előfordulással. A primer daganatok és a metasztázisok eredményeinek összehasonlítása a következő eredményeket adta: a metasztázisok leggyakrabban a 11q, 15q (70%) és az 1p és 3q (60%) amplifikációkat hordozták. Ezekon kívül DNS többleteket detektáltak az esetek legalább 30%-ában a 19q, 20p (50%), 5p, 10q, 17p (40%), 8q és 18q (30%) kromoszóma szakaszokon. A DNS vesztesékek hasonló gyakorisággal csak a 3p és 11p karokon fordultak elő. A 11p és 17p amplifikációkat csak a metasztázisokban sikerült kimutatni, s az 1p, 8q, 11q, 18q és 19p amplifikációk is inkább a metasztázisokra voltak jellemzőek. A 21q és 22q kromoszomális szakaszok DNS többlete viszont csak a primer tumorban volt jelen. A primer daganatok és a hozzájuk tartozó metasztázisok a következő közös eltéréseket hordozták: 22q (60%), 5p, 11q, 15q (40%), 3q, 10q, 20p, 21q (30%), 19p, 17q (20%) és 8q, 9q, 14q, 18q (10%) DNS többletet, valamint 3p,

5q, 11p (20%) és 13q, 18q, 19q (10%) DNS veszteség. Összességében megállapították, hogy a metasztázist képző tumorerkek több, CGH-val detektálható genetikai eltérést hordoznak. A szerzők kiemelték továbbá, hogy a 11q13 és 22q amplifikáció és 18q deléción csak metasztázist képző tumorerkekben, míg a 7p amplifikáció csak metasztázist nem adó daganatokban volt kimutatható. A 11q13 amplifikációt a *CCD1* génnel hozzák kapcsolatba. A 18q21 a *DCC* feltételezett tumor szuppresszor gént és a *DPC4* gént tartalmazza, mely utóbbi transzkriptje a TGF- β -szerű szignalizációs útvonal eleme (124,125). A 22q-val kapcsolatban a 14-3-3 fehérje génje került említésre, mely a tirozin- és triptofán-hidroxiláz proteinkináz-dependens aktivátora, és foszfoszerin tartalmú fehérjékhez kötődve mediálja a szignál transzdukciót (126).

Bár nem műtéti anyagot vizsgáltak Singh és munkatársai, mégis figyelemre méltó CGH eredményük (127). Öt fej-nyaki laphám karcinómából származó sejtvonal CGH karakterizálását követően a sejteket besugarzták, és meghatározták sugárérzékenységet. Három sejtvonal sugárérzékenynek, míg kettő sugárrezisztensnek bizonyult. A 3q amplifikáció minden sejtvonalban megfigyelhető volt. Míg az 5p és 14q amplifikáció valamint 3p, 4, 8p és 9p deléción minték típusú sejtvonalban viszonylag gyakori volt, addig a 7p és 17q amplifikáció és az 5q, 7q és 18q deléciók kizárólag a sugárérzékeny sejtvonalakban fordultak elő. A sugárérzékeny sejtvonalak összességükben több genetikai alterációt hordoztak a sugárrezisztensekhez képest. Ezt az összefüggést azzal magyarázták a szerzők, hogy sugárérzékeny sejtekből a repair mechanizmusok sérült volta teszi lehetővé a genetikai alterációk nagyobb számban való megjelenését, és ezeknek a mechanizmusoknak az elégtelen működése felelős azért, hogy a sugárzás által létrehozott genomális sérülések kijavítása nem hatékony, így ez hamarabb vezet a sejtek pusztulásához. Ugyanakkor a szerzők is elismerték, hogy a korlátozott mintaszám nem teszi lehetővé egyértelmű következtetések levonását, és szükségesnek tartják a sebészi úton nyert minták analízisét és klinikai adatokra alapozott elemzését.

Amint a fenti részletes irodalmi áttekintés is bizonyítja, a növekvő számú tanulmány ellenére a fej-nyaki tumorerkek eltérő anatómiai lokalizációjú daganatainak részletes molekuláris analízise továbbra is hiányosnak tekinthető. Indokoltak tehát azok a megközelítések, melyek az egyes anatómiailag közel elhelyezkedő, de eltérő progresszióval jellemezhető tumorerkek karakterisztikumait kívánják feltárni.

3. Célkitűzések

Munkánk során célunk volt:

- a tenascin termelésének és szöveti eloszlásának jellemzése gége és hypopharyngeális kiindulású karcinómák esetén immunhisztokémiai módszerek segítségével, annak eldöntésére törekedve, hogy kimutatható-e különbség az expresszióban és a szöveti eloszlás mintázatában az eltérő kiindulású, de azonos klinikai stádiumú daganatokban;
- a tumorok stádiumával, metasztatizáló képességével összefüggésben a tenascin eloszlás jellegzetességeinek leírása;
- a követési adatok összevetése alapján a tenascin produkció prognosztikai jelentőségének elemzése a különböző stádiumú gége és hypopharynx rákok esetén;
- a gége és hypopharyngeális daganatok genetikai eltéréseinek feltérképezése a komparatív genomiális hybridizáció módszerének alkalmazásával;
- a CGH eredmények és a klinikai adatok összehasonlítása alapján a daganat progresszióval, illetve metasztatizálási képességgel összefüggő genomiális alterációk azonosítása.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok

4.1.1. A tenascin expresszió vizsgálatára használt szöveti minták

A vizsgálatban szereplő tumoros minták (n=58) sebészi úton kerültek eltávolításra, a DEOEC Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikán. A daganatok kiindulási helyét tekintve 31 gége és 27 hypopharynx eredetű műtéti anyagot analizáltunk. Minden beteg esetén preoperatív biopsziával igazolt diagnózis állt rendelkezésre, melyet a DEOEC Pathológiai Intézetében állapítottak meg. A vizsgált anyagok a tumorszövetből, illetve a tumor-normál szövethatárról kerültek kimetszésre. A betegek klinikai adatai, egészségügyi dokumentációja fenti intézetekben érhetőek el. A mintákat 8 csoportba soroltuk a tumor kiindulása és TNM-stádiuma alapján (1. táblázat).

4.1.2. Szöveti metszetek preparálása és immunhisztokémiai reakciók kivitelezése

A szövetmintákat Tissue Tek OCT Compound-ba (Miles; Ekhart, IN) ágyazva folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd további feldolgozásig $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Kettős és hármas immunfluoreszcens jelzésekhez, 5-7 μm vastag metszeteket készítettünk minicryostatban (Leica CM1850, Leica Microsystems Nusslock GmbH, Germany), alumínium fóliába csomagoltuk és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Közvetlenül felhasználás előtt a metszeteket szobahőmérsékletre melegítettük. A metszeteket acetonnal fixáltuk (10 perc). A nem specifikus IgG-kötődés blokkolására 5%-os normál humán szérumot alkalmaztunk (15 perc). Az immunfluoreszcens reakciókat szobahőmérsékleten végeztük. Valamennyi antitest hígítására és a nem kötődött antitestek eltávolítására standard PBS-t (0,135M NaCl, 22mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5mM KH_2PO_4 , pH:7,00) alkalmaztunk. Az immunreagensek jellemzőit a 2. táblázat mutatja.

1. táblázat

A tenascin eloszlás karakterizálása során vizsgált minták klinikai, hisztológiai és immunhisztológiai adatai

Eset	Név	Nem/ Kor	Lokalizáció	TNM	Hisztol- ógiai grading	Tumor recidíva (hó)	Túlélés (hó)	Tumormentes túlélés (hó)	Domináns tenascin mintázat		
									A	B	C
1.	BC	M/68	Larynx	T1N0M0	I	40				*	
2.	FH	M/57	Larynx	T1N0M0	II			33		*	
3.	JB	M/42	Larynx	T2N0M0	II			37		*	
4.	IK	M/56	Larynx	T2N0M0	II			32		*	
5.	IS	M/62	Larynx	T2N0M0	I			30		*	
6.	GR	M/56	Larynx	T2N0M0	I			24		*	
7.	SF	M/54	Larynx	T2N2M0	II	20 +	30				*
8.	JL	M/60	Larynx	T3N0M0	II			25		*	
9.	AF	M/58	Larynx	T3N0M0	III			25		*	
10.	IS	M/60	Larynx	T3N0M0	I			24		*	
11.	JJ	M/52	Larynx	T3N0M0	II			24		*	
12.	TK	M/57	Larynx	T3N0M0	II-III			37		*	
13.	TT	M/65	Larynx	T3N0M0	II			34		*	
14.	JP	M/55	Larynx	T3N0M0	I			33		*	
15.	IE	M/70	Larynx	T3N0M0	III			26		*	
16.	JC	M/42	Larynx	T3N0M0	I			25		*	
17.	BK	M/59	Larynx	T3N0M0	II	34				*	
18.	LD	M/42	Larynx	T3N0M0	II			39		*	
19.	SE	M/40	Larynx	T3N1M0	II			27			*
20.	KS	F /41	Larynx	T3N1M0	II			38		*	
21.	IJ	M/58	Larynx	T3N2M0	I			29			*
22.	JS	M/64	Larynx	T4N0M0	II			25		*	
23.	AS	M/53	Larynx	T4N0M0	I-II			28		*	
24.	OK	F /53	Larynx	T4N0M0	II			24			*
25.	ZP	M/56	Larynx	T4N0M0	III			30		*	
26.	SK	M/60	Larynx	T4N0M0	I	9 +	14				*
27.	TM	M/50	Larynx	T4N0M0	I	14 +	20				*
28.	SR	M/59	Larynx	T4N0M0	II	12 +	22				*
29.	PA	M/64	Larynx	T4N0M0	II-III	18				*	
30.	TB	M/52	Larynx	T4N1M0	II	9 +	11				*
31.	SK	M/51	Larynx	T4N2M0	I	8 +	13				*
32.	LH	M/53	Hypopharynx	T1N0M0	II			32		*	
33.	LT	M/50	Hypopharynx	T1N1M0	II			26		*	
34.	IJ	M/47	Hypopharynx	T1N2M0	III	14 +	21				*
35.	MV	M/48	Hypopharynx	T2N0M0	II			29		*	
36.	SD	M/40	Hypopharynx	T2N1M0	II			26		*	
37.	ZD	M/53	Hypopharynx	T2N2M0	II	19				*	
38.	BR	M/44	Hypopharynx	T2N3M0	II-III	8 +	15				*
39.	IB	M/63	Hypopharynx	T3N0M0	I	12 +	18				*
40.	CK	M/55	Hypopharynx	T3N0M0	I	18				*	
41.	TS	M/52	Hypopharynx	T3N1M0	I-II	6 +	9				*
42.	MS	M/63	Hypopharynx	T3N1M0	III			25		*	
43.	SM	M/45	Hypopharynx	T3N1M0	II	4 +	10				*
44.	IV	M/48	Hypopharynx	T3N2M0	II			24			*
45.	AK	M/50	Hypopharynx	T3N2M0	I-II	16					*
46.	JD	M/46	Hypopharynx	T4N0M0	III			26		*	
47.	GF	M/50	Hypopharynx	T4N0M0	II	16				*	
48.	LB	M/42	Hypopharynx	T4N0M0	II	8 +	14				*
49.	RK	M/58	Hypopharynx	T4N0M0	II-III	2					*
50.	ZL	M/51	Hypopharynx	T4N1M0	II			29			*
51.	BF	M/49	Hypopharynx	T4N1M0	I-II			30		*	
52.	MK	F /43	Hypopharynx	T4N1M0	II	15					*
53.	MP	M/44	Hypopharynx	T4N1M0	II	9 +	13				*
54.	GZ	M/52	Hypopharynx	T4N2M0	II			25			*
55.	LR	M/49	Hypopharynx	T4N2M0	I	12					*
56.	MN	M/50	Hypopharynx	T4N2M0	II-III	9 +	15				*
57.	DK	M/51	Hypopharynx	T4N3M0	III	17					*
58.	AR	M/60	Hypopharynx	T4N3M0	I	3 +	8				*

A: Tenascin a tumor inváziós zóna határán

(Halálkozás: +)

B: Tumor sejt szigetek a bőséges tenascin festődést mutató kötőszövetbe ágyazva

C: Intratumorális tenascin depozíció, a tumoros erekkel kapcsolatosan

2. táblázat

A felhasznált primer immunreagensek

Megnevezés	Forrás	Specifitás	Reaktivitás
Anti-cytokeratin (poliklonális, nyúl)	DAKO Co., Carpinteria,CA	humán keratin, 56 és 64 kD méret	Epitheliális sejtek
Anti-tenascin (monoklonális, egér)	DAKO Co., Carpinteria,CA	humán tenascin, tenascint termelő sejtek	Extracelluláris matrix
CD-34 (monoklonális, egér)	Becton-Dickinson, Mountain View,CA	humán progenitor sejt transzmembrán glycoprotein, 105-től 120 kD méretig	Haemopoetikus progenitor sejtek és kapilláris endothel sejtek
Ki-67 (monoklonális, egér)	Immunotech S.A., Marseilles, France	osztódáskor detektálható 345 és 395 kD méretű nukleáris antigének	G1, S, G2 és M fázisban lévő sejtek

4.1.3. Kettős immunfluoreszcens reakciók

Kettős immunfluoreszcens jelzést alkalmazva párhuzamosan detektáltuk az alábbi szöveti komponenseket:

- a./ **tenascint** és **cytokeratint** (utóbbi epitheliális sejtmarker fehérje),
- b./ **cytokeratint** és **proliferáló sejteket** (utóbbit Ki-67 monoklonális antitesttel, mely osztódó sejtek magantigénjét ismeri fel).

Kombinált tenascin és cytokeratin jelzésre a szöveti metszeteket egérben termelt humán-tenascinra specifikus monoklonális antitesttel (Dako; Carpinteria, CA, 1:200-as hígítás) inkubáltuk (1 óra), majd nyúlban termelt humán-pancytokeratin elleni immunszérumot (Dako; Glostrup, Denmark) alkalmaztunk (1:100-as hígításban, 1 óra). A tenascin ellenes antitestek kötődését biotinált anti-egér-IgG hozzáadását követően (Vector Laboratories; Burlingame, CA, 1:250-es hígítás, 30 perc) Texas Red streptavidinnel (Amersham; Little Chalfont, UK, és 1:40-es hígítás, 45 perc) tettük láthatóvá. A cytokeratin ellenes antitestek detektálását FITC-el jelzett kecske anti-nyúl-IgG (Sigma; St. Louis, MO, 1:40-es hígítás 45 perc) alkalmazásával valósítottuk meg.

A cytokeratin és az osztódó sejtek párhuzamos detektálása során a tenascin ellenes antitestet Ki-67 monoklonális antitesttel (Dako; Glostrup, Denmark)

helyettesítettük 1:100-as hígításban, 30 perces inkubálást alkalmazva. A reakció további kivitelezése a fent leírtakkal azonos módon zajlott.

4.1.4. Hármás immunfluoreszcens reakciók

Hármás immunhisztokémiai reakcióval az alábbi komponenseket mutattuk ki, a reakciókat párhuzamosan, illetve egymást követően, egy szöveti metszeten végezve:

- a./ **tenascint, cytokeratint és CD-34-et** (utóbbi az endotheliális sejtek markere),
- b./ **cytokeratint, CD-34-et és osztódó sejteket** (Ki-67 monoklonális antitesttel).

A tenascin, cytokeratin és CD-34 detektálására a metszeteket 1:200-as hígítású, egérben termelt anti-humán-tenascin és 1:100-as hígítású nyúlban termelt anti-humán-pancytokeratin antitest, illetve immunszérum keverékével inkubáltuk 1 órán át. Ezt követően a tenascin megjelenítésére 1:250-es hígítású biotinált egér-specifikus IgG-t alkalmaztunk (30 perc), majd 1:80-as hígítású AMCA-avidinnel (Vector Laboratories; Burlingame, CA, 45 perc) reagáltattuk. A cytokeratint FITC-el konjugált nyúl-specifikus IgG-vel (1:40-es hígítás, 30 perc) vizualizáltuk. A CD-34 ellenes reakció kivitelezése előtt, a CD-34 ellenes monoklonális antitest nem specifikus kötődésének megelőzésére 30 percre normál egér-szérumban inkubáltuk a metszetet (1:200-as hígítás), majd 1:2-es hígítású phycoerythrinrel konjugált anti-CD-34 antitestet (Becton Dickinson; Mountain View, CA) alkalmaztunk (45 perc).

A cytokeratin, Ki-67 és CD-34 detektálása során az egyetlen különbség az anti-humán tenascin reagens Ki-67 monoklonális antitesttel (DAKO; Glostrup, Denmark) történő helyettesítése volt, 1:100-as hígításban.

4.1.5. Immunhisztokémiai kontroll reakciók

A kettős és hármás immunfluoreszcens jelölések specificitásának ellenőrzése érdekében, az aspecifikus keresztreakciók lehetőségének kizárására, az összes alkalmazott antitest esetében elvégeztük a következő reakciókat:

- a primer antitesteket a velük nem reagáló másodlagos antitestekkel reagáltattuk;
- a primer antitesteket reagáltattuk az összes másodlagos antitesttel;
- a primer antitesteket azonos hígítású normál nyúl- és egérszérummal helyettesítve a reakciókat elvégeztük az összes másodlagos antitest alkalmazásával is.

4.1.6. Immunhisztokémiai jelzések analízise és dokumentációja

A szöveti metszeteket a reakciók kivitelezése után PBS-glycerol 1:1 arányú keverékével fedtük le. Az immunreakciók értékelésére FITC, Texas Red/phycoerythrin és AMCA jelzésekre szelektív gerjesztési és emissziós filterekkel ellátott Axioplan fluoreszcens mikroszkópot (Zeiss; Oberkochen, Germany) alkalmaztunk. A digitális felvételek feldolgozása és rögzítése ISIS 3 software (Metasystems Inc. Altlussheim, Germany) segítségével történt. Tárolásuk CD-lemezeken történt. A színes mikroszkópos felvételek dokumentálására Digital Palette CI3000S (Polaroid Co., Cambridge, MA) filmet használtunk.

4.1.7. A klinikai és immunhisztokémiai adatok összehasonlító analízise

A klinikai és a tenascin eloszlásra vonatkozó immunhisztokémiai adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze a TNM stádium beosztás függvényében. A táblázatban feltüntettük továbbá a recidíva és halálozási adatokat is. A tenascin eloszlás részletes elemzésének adatait a 3. és 4. táblázat segítségével mutatjuk be. A statisztikai analízis során F-próbát alkalmaztunk.

4.1.8. A fibrin depozíció vizsgálata laryngeális és hypopharyngeális tumorokban

A fent részletezett tumorminták egy részében elvégeztük a fibrin depozíció vizsgálatát is immunhisztokémiai módszerekkel. A reakciók kivitelezése a fentiekkel analóg módon zajlott, anti-fibrinogén/fibrin, anti-fibrin, valamint a FXIIIa-pozitív fagocitáló makrofágok elleni KiM7 antitestek használatával. Mivel ezen vizsgálatokról dr. Bárdos Helga, " A tumor matrix átépülése a tumor progresszió és metasztázis képződés során" című Egyetemi Doktori (Ph.D.) Téziseiben részletesen beszámolt, jelen munkánk csak a releváns eredmények rövid összefoglalását tartalmazza a megfelelő fejezetekben.

4.2. Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)

4.2.1. CGH analízis során vizsgált minták

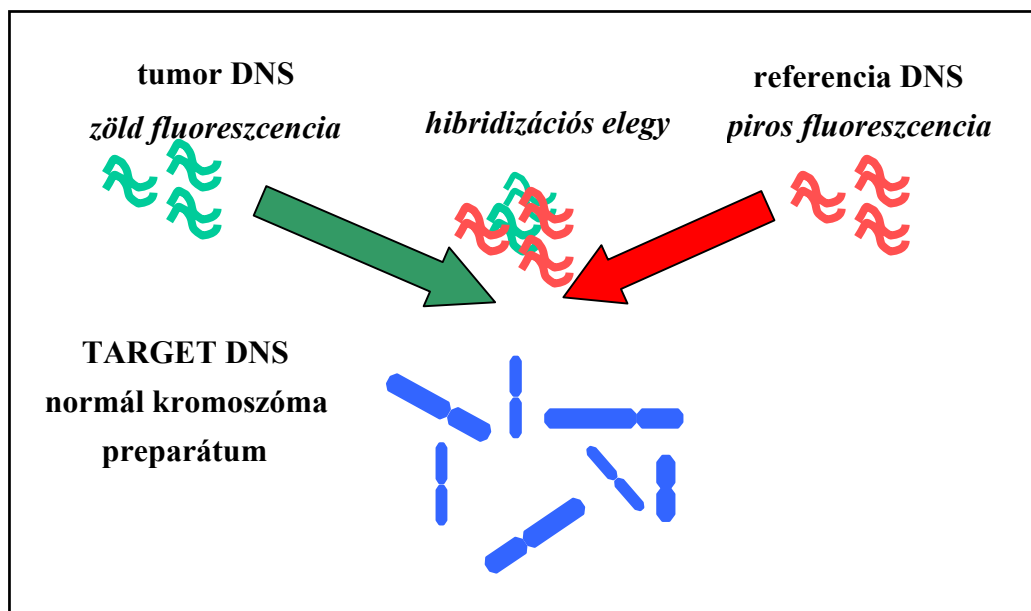
CGH-val 23 fej-nyaki tumort analizáltunk. A feldolgozott minták a DEOEC Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, valamint a SOTE Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-

Nyaksebészeti Klinika műtéti anyagából származtak. 14 minta gégéből kiinduló primer tumorból származott, míg 9 esetben hypopharyngeális eredetű daganatból nyertünk vizsgálati anyagot. Hasonlóan korábbi vizsgálatunkhoz előzetesen preoperatív biopsziával pathológiailag igazolt diagnózis állt rendelkezésre a laphám karcinóma jelenlétéről. A minták kimetszése olyan módon történt, hogy a lehetőségekhez képest a nem tumoros sejtek „kontaminációja” minimális legyen. A betegek klinikai adatait tartalmazó egészségügyi dokumentáció a fenti intézetekben érhető el. A daganatok csoportosítása a kiindulási hely, a TNM stádium figyelembevételével történt (5. táblázat). Fenti vizsgálatok a DEOEC Etikai Bizottságának jóváhagyásával valósultak meg.

4.2.2. DNS preparálás és CGH hibridizáció

A tumor mintákat a sebészi kimetszést követően $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A DNS extrakcióhoz 6 és 30 μm vastagságú metszeteket készítettünk. A 6 μm -es metszetek hagyományos haematoxylin-eosin festéssel kerültek morfológiai feldolgozásra. Azon minták 30 μm -es párja került CGH-hoz felhasználásra, melyekben legalább 70% volt a tumorsejtek aránya.

A DNS hibridizációt Kallioniemi és munkatársai által leírt módon végeztük, kisebb módosításokkal (73,74,128). A módszer elvét röviden az 1. ábra szemlélteti.



1.ábra A komparatív genomiális hibridizáció sémás ábrája

Tumor és normál (egészséges egyén perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből) DNS-t fenol:kloroform:izo-amilalkohol (PCI, 26:25:1) oldattal extraháltunk proteináz-K

kezelést követően, standard protokoll alapján (128). A DNS minták koncentrációját fluorimetriás módszerrel határoztuk meg. A tumor és normál DNS-t nick-transzlációval, direkt jelzett d-UTP-vel megjelöltük a gyártó (Vysis Inc. Downers Grove, IL USA) protokollja alapján. A tumor DNS jelzése zölden fluoreszkáló SpectrumGreen-12-dUTP-vel, a normál DNS jelzése pedig vörösen fluoreszkáló SpectrumRed-5-dUTP-vel történt. A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy a jelzett DNS fragmentumok hossza 300 és 2000 bázispár között legyen.

A 200-200 ng jelzett tumor és normál DNS-t, valamint 20 µg jelöletlen humán Cot-1 DNS-t (GIBCO) tartalmazó DNS keveréket 1 térfogat 0,3 M nátrium-acetáttal (pH: 5,3) és 100% hideg etanollal kicsaptuk. A DNS-t levegőn megszárítottuk és 10 µl hibridizációs oldatban (50% formamid, 10% dextrán-szulfát, és 2 X SSC (1 X SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citrát, pH: 7,0)) feloldottuk. A hibridizációs elegyet 73 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd 37 °C-on 30 percig állni hagytuk (preannealing lépés). A normál humán kromoszómákat tartalmazó CGH lemezeket (Vysis Inc.) 73 °C-on 3-5 percig denaturáltuk, majd emelkedő koncentrációjú etanol sorban (70%, 85%, 100%) dehidráltuk. A hibridizációs elegyet tárgylemezre cseppentettük és légmentesen lezártuk. A hibridizáció 37 °C-on 72 órán át nedves kamrában történt. A hibridizációs lemezekről a nem hibridizálódott DNS-t az alábbiak szerint távolítottuk el: a lemezeket három egymást követő lépésben hibridizációs mosófolyadékban (50% formamid, 2 X SSC, pH: 7,0), majd kétszer 2 X SSC-ben (pH: 7,0, 45 °C), ezt követően egyszer 2 X SSC-ben és kétszer PN pufferben (0,1 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄, Nonidet P40, pH: 8,0, szobahőmérséklet, 10 perc) mostuk, majd a lemezeket ultratiszta vízben leöblítettük és levegőn megszárítottuk. A preparátumokat anti-fade oldatban (Vysis Inc.) oldott 0,15 µg/ml 4,6-diamino-2-fenilindollal (DAPI) festettük. Kísérleti szériánként egy negatív (különböző jelzésű normál-normál DNS) és egy pozitív kontroll (SpectrumGreen-dUTP-jelzett citogenetikailag részletesen jellemzett MPE-600 emlőtumor sejtvonala) preparátumot használtunk a CGH eredmények validitásának ellenőrzésére.

4.2.3. Digitális képanalízis

A CGH hibridizáció értékelésére Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkóphoz (Carl Zeiss, Jena, Németország) kapcsolt számítógép-vezérelt kvantitatív képfeldolgozó rendszert alkalmaztunk (ISIS, Metasystem GmbH, Altlußheim, Németország). A fluoreszcens képek rögzítése (mintánként 8-10 metafázis) monokróm CCD kamerával

történt (Compulog, IMAC-CCD-230, 8 bit felbontás, Metasystem GmbH). Minden metafázisról 3 fekete-fehér fluoreszcens képet rögzítettünk. A kék fluoreszcencia a kromoszómák azonosítására szolgált (DAPI festés), a zöld fluoreszcencia a hibridizálódott tumor DNS-től, míg a piros fluoreszcencia a hibridizálódott normál DNS-től származott. Automatikus háttérkorrekciót követően megszerkesztettük a kromoszómák kariogramját a DAPI festés alapján. A kromoszomális eltérések meghatározása a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitás hányadosok aránya alapján történt a kromoszóma preparátumokon, automatikusan minden metafázisra vonatkoztatva. Az egyes metafázisokra vonatkozó kromoszóma profilokat átlagolva az adott tumorra jellemző átlag eltérések térképét kaptuk meg. DNS többletként definiáltuk azokat az eltéréseket, melyeknél a zöld/vörös fluoreszcencia intenzitás arány meghaladta az 1,15-öt. DNS vesztésként határoztuk meg azokat az alterációkat, melyeknél ez az arány 0,85 alatti értéknek adódott. Ezeket az ún. diagnosztikai háttér értékeket normál-normál hibridizációk átlagértékeiből határoztuk meg. Tekintettel arra, hogy a Cot-1 DNS hatékonyan blokkolja a kromoszómák centroméra közeli heterokromatin régióit, ezeket a kromoszomális szakaszokat a CGH analízis során nem értékeltük.

5. Eredmények

5.1. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során elemzett daganatok klinikai adatai

Vizsgálati anyagunkban a gége tumor miatt kezelt betegek átlagos életkora 55 év, míg a hypopharynx daganatos betegek esetén ez 50 év volt. Ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($F=0,1$). A daganat eltávolítása után az átlagos követési idő sem különbözött statisztikailag szignifikáns módon a két csoportban ($F=3,8$). A hypopharynx karcinómával sújtott betegcsoportot a gége tumorra kezelt betegcsoportéhoz viszonyítva jelentősen fokozott metasztázálási hajlam, gyakoribb és korábban jelentkező recidív tumor képződés és ezek következtében emelkedett daganatos halálozás jellemezte. A tumormentes túlélés a hypopharynx karcinómás betegcsoport esetén szignifikánsan rövidebb ($F=4,55$) volt a gége tumoros betegcsoportéhoz képest (3. táblázat).

3. táblázat

A klinikai követés adatai

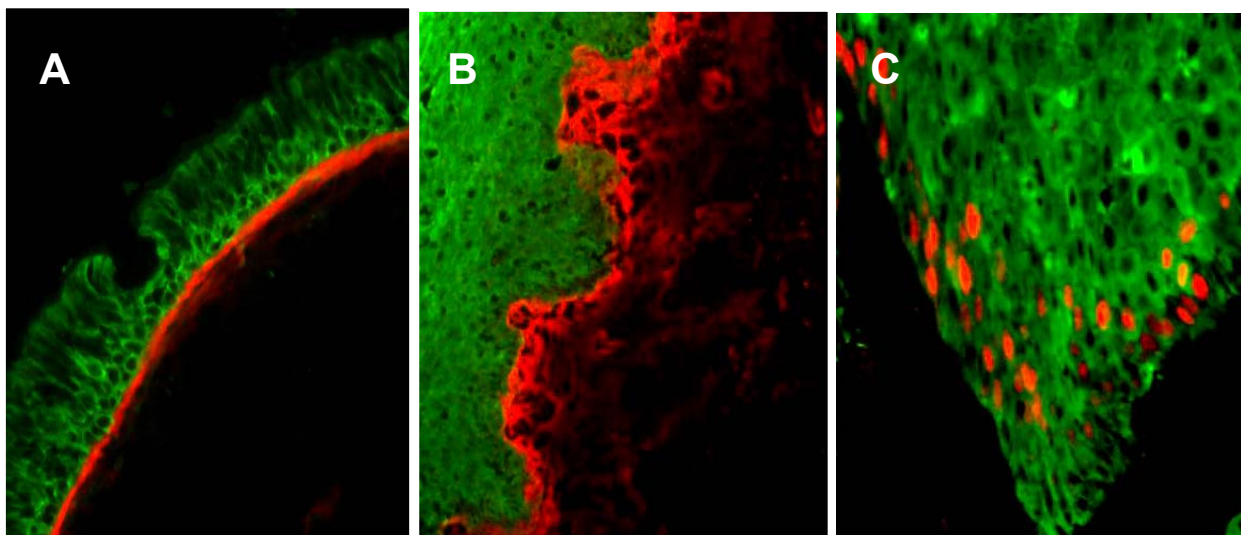
	Laryngeális tumorok	Hypopharyngeális tumorok
Átlagos követési idő (hónap)	31,5 (24-41)	25,7 (24-32)
Átlagos tumormentes túlélés (hónap)	29,5 (24-39)	27,2 (24-32)
Átlagos tumor recidíva (hónap)	18,2 (8-40)	11,0 (2-19)

A sebészi beavatkozáskor észlelt nyaki nyirokcsomó metasztázisok előfordulási aránya, a műtét után észlelt recidívák arányával egyetemben, jelentősen magasabb volt a hypopharynx daganatos csoportban (4. táblázat). A tanulmányozott betegcsoportban összesen 15 daganatos halálozást regisztráltunk a követési időszak alatt, melynek megoszlása az alábbiak szerint alakult: gége tumorra összefüggő halálozást 6 beteg, hypopharynx daganat miatti halálozást 9 beteg esetében regisztráltunk.

5.2. A tenascin eloszlás jellegzetességei gége és hypopharynx daganatokban

Az összes vizsgált metszetben sikerült kimutatni a tenascin jelenlétét, de mind az intenzitásban, mind az eloszlásban jelentős különbségeket figyeltünk meg. A tenascin jelölést valamennyi mintában cytokeratin festéssel kombináltuk, mely az epitheliális sejteket jelölte, így a tenascin és az epitheliális/tumoros sejtek viszonya jól megfigyelhető volt. Mind a gége, mind a hypopharynx szövettanilag normál, nem-tumoros részében a tenascin szinte kizárólag a felszíni epithélium bazális membránjával kapcsolatos volt kimutatható (2A ábra). Sem a kötőszövetben, sem az erek falában nem volt tenascin jelölődés, és az epitheliális sejtek is negatívnak bizonyultak.

A normál hám és a proliferatív tumoros epithélium határán kifejezett strómális tenascin jelölést figyeltünk meg az epithélium alatt (2B ábra). A sávszerű, folytonos bazális membránt tenascinban gazdag zóna váltotta fel a szubepitheliális kötőszövetben. Ilyen típusú eloszlást korai stádiumú (T1-2N0) laryngeális tumor mintákban és igen korai (T1N0) hypopharynx daganatokban figyeltünk meg. [Ezt a tenascin eloszlást "A" típusként jelöltük a táblázatokban.]

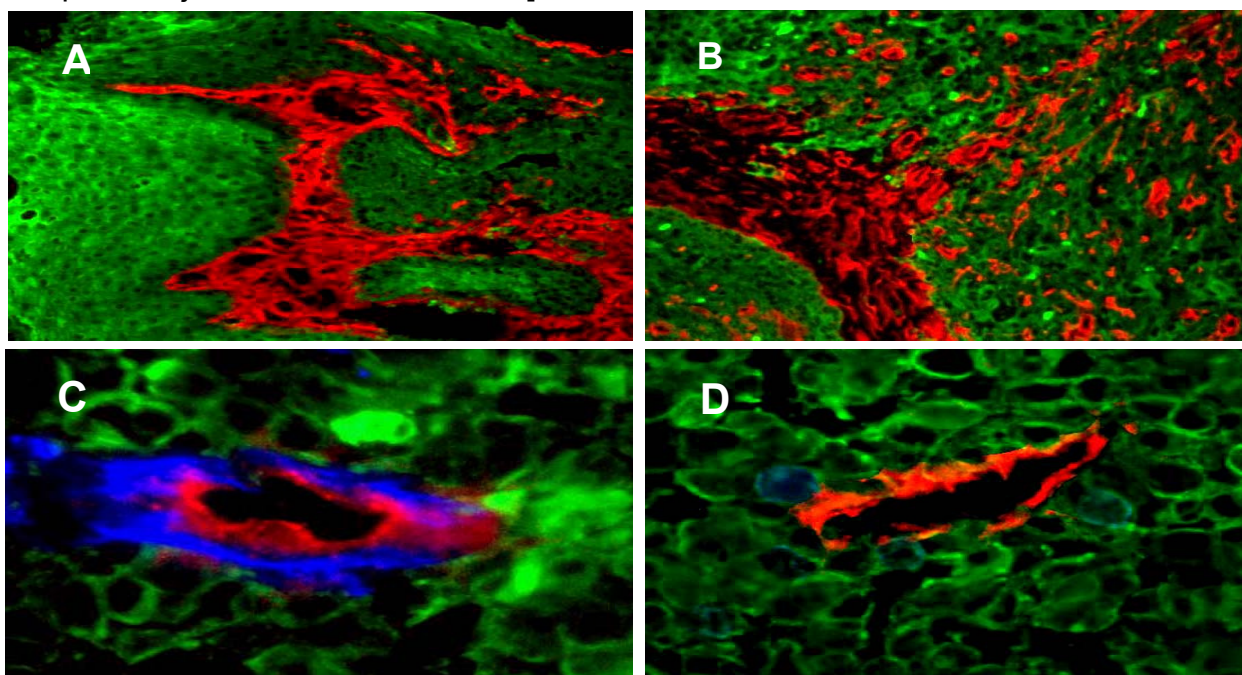


2. ábra

A. Kettős immunfluoreszcens reakció a gége tumormentes részén a tenascin (Texas Red) és a cytokeratin (FITC) kimutatására. A tenascin a bazális membrán mentén látható. (350x) **B.** Tenascin és cytokeratin kimutatása a tumoros és ép epithélium határán tumoros gégéből származó metszeten. Jól érzékelhető a tenascin mennyiségének növekedése. (350x) **C.** Kettős immunfluoreszcens reakció a cytokeratin (FITC) és osztódó sejtek magjának kimutatására (Ki-67), gégetumorban. Számos osztásban lévő sejt detektálható az inváziós front területén. (700x)

A tumor progresszió későbbi szakaszaiban a strómával szoros kontaktusban számos osztódó sejtet tudtunk kimutatni Ki-67 jelzéssel (2C ábra), valamint kifejezetten fokozott tenascin produkciót találtunk a daganat és normál szövet határán. A cytokeratin pozitív sejtek területén nem volt tenascin jelölés megfigyelhető (3A ábra). Ilyen mintázatot főként T2-T3 stádiumú gége tumorokban, és ritkábban T2 stádiumú hypopharynx daganatokban észleltünk. [A táblázatokban ezt az eloszlási mintázatot "B" típusként jeleztük.]

A tumoros progresszió előrehaladott stádiumaiban a daganattal határos stróma területeken észlelhető tenascin akkumuláción kívül finom trabekulákban, és gyűrűszerű, 5-20 μm -es átmérőjű struktúrákban is megjelent a tenascin (3B ábra). A preparátumokban intenzív strómális tenascin jelölődés volt észlelhető, a malignus sejtfészkek, -szigetek a kötőszövet strómális elemeivel nagyfokban összekeveredtek, de maguk a tumorsejtek nem rendelkeztek tenascin immunreaktivitással. Az osztódó sejtek nem csupán a tumor perifériás területein, hanem a tumor fészkeken belül is kimutathatók voltak. Ilyen tenascin eloszlást csak igen előrehaladott, metasztatizáló gége (T4) és hypopharynx (T3-T4) tumorokban láttunk. [Ezt a tenascin megjelenést "C" típusként jelöltük a táblázatokban.]



3. ábra

A. Kettős immunfluoreszcens reakció előrehaladott stádiumú gégetumoros mintán a tenascin (Texas Red) és a cytokeratin (FITC) kimutatására. Kifejezetten fokozott a tenascin depozíció az inváziós front területén. (350x) **B.** Kettős immunfluoreszcens reakció tenascin (Texas Red) és cytokeratin (FITC) kimutatására, hypopharynx karcinómában. Az inváziós front területén kívül is detektálható tenascin, finom trabekuláris szerkezetben, gyűrűszerű struktúrákban. (350x) **C.** Hármás immunfluoreszcens reakció tenascin (AMCA), cytokeratin (FITC) és CD-34 (phycoerythrin) kimutatására, hypopharyngeális daganatban. Jól látható az érfal környezetében detektálható tenascin lerakódás. (1400x) **D.** Hármás immunfluoreszcens reakció Ki-67 (AMCA), cytokeratin (FITC) és CD-34 (phycoerythrin) kimutatására, hypopharyngeális daganatban. Az érfal közvetlen szomszédságában számos (Ki-67 pozitívítást mutató) osztódó sejtmag észlelhető. (1400x)

4. táblázat

A. Tenascin mintázat metasztatizáló, recidívát illetve tumoros halált okozó tumorokban

	Laryngeális minták			Hypopharyngeális minták		
	A	B	C	A	B	C
Domináns tenascin eloszlás						
Metasztázis képzés	0/6	1/6	5/6	0/19	5/19	14/19
Recidíva	0/9	3/9	6/9	0/17	3/17	14/17
Tumoros halálozás	0/6	0/6	6/6	0/9	0/9	9/9
Metasztázisok aránya		6/31			19/27	
Recidívák aránya		9/31			17/27	
Tumoros halálozások		6/31			9/27	

(A feltüntetett tenascin eloszlást mutató minták száma/ az összes metasztázist, recidívát, tumoros halálozást okozó tumorok száma)

B. Tenascin eloszlás a T stádiumok függvényében

	Laryngeális minták			Hypopharyngeális minták		
	A	B	C	A	B	C
Domináns tenascin mintázat						
T1	1/2	1/2	0/2	1/3	1/3	1/3
T2	1/5	3/5	1/5	0/4	3/4	1/4
T3	0/14	12/14	2/14	0/7	2/7	5/7
T4	0/10	4/10	6/10	0/13	3/13	10/13

(A domináns mintázatot mutató minták száma/ összes megfelelő T stádiumú minták száma)

C. A metasztatizálás, recidíva képzés és tumoros halálozás relatív gyakorisága a tenascin mintázat függvényében

	Laryngeális minták			Hypopharyngeális minták		
	A	B	C	A	B	C
Domináns tenascin mintázat						
Metasztatizálás	0/2	1/20	5/9	0/1	5/9	14/17
Recidíva	0/2	3/20	6/9	0/1	3/9	14/17
Tumoros halálozás	0/2	0/20	6/9	0/1	0/9	9/17

(Metasztatizáló/recidívát/halálozást okozó tumorok száma/ a feltüntetett mintázatot mutató tumorok összes száma)

A cytokeratin, tenascin és CD-34 együttes kimutatására alkalmazott hármas immunfluoreszcens reakció segítségével egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a

gyűrűszerű struktúrák, melyek intenzív TN jelölést mutattak, CD-34 pozitív endotheliális sejteket vesznek körül (3C ábra). A cytokeratin, Ki-67 és CD-34 együttes kimutatására alkalmazott hármas immunfluoreszcens jelöléssel igazolható volt, hogy az ereket nagyszámú proliferáló sejt övezte (3D ábra). Ez a megfigyelés csak a tumor progresszió végső szakaszaire volt jellemző, döntően hypopharynx tumorokban jelentkezett és szoros korrelációt mutatott a metasztatizáló képességgel, korai recidívával és a daganatos halálozással (4. táblázat). Azon betegek mintáiban, akiket a követés alatt elvesztettünk a tumoros folyamat következtében, szinte kizárólag ilyen tenascin eloszlást észleltünk. Hasonló tenascin eloszlást gége tumorokban csak igen előrehaladott esetekben figyeltünk meg.

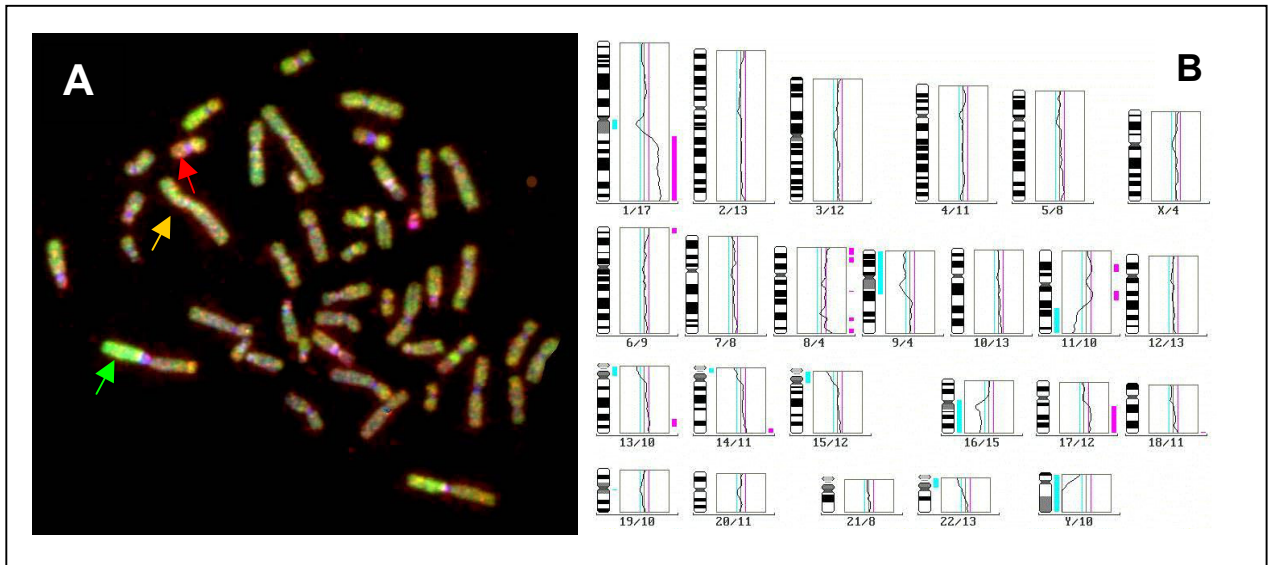
5.3. A fibrin depozíció sajátosságai gége és hypopharynx daganatokban

25 laryngeális és 9 hypopharyngeális daganatból származó preparátumon történt meg a fibrin depozíció kimutatása. Minden általunk vizsgált metszetben észlelhető volt a fibrin depozíció, döntően a tumorsejtfészkek közötti és körüli kötőszövetes alapállomány területén akkumulálódva. 4 hypopharyngeális és 4 laryngeális mintában a fibrin intratumorálisan, ér-asszociált formában volt kimutatható. A fibrin depozíció területén nagy számban kerültek kimutatásra a KiM7 antitest használatával a Faktor XIII A-pozitív, fagocitáló makrofágok.

5.4. CGH-val kimutatható kromoszomális eltérések gége tumorokban

Molekuláris genetikai vizsgálataink célja az eltérő prognózisú gége és hypopharynx tumorok kromoszomális eltéréseinek feltérképezése és ezen eltérések összehasonlítása volt.

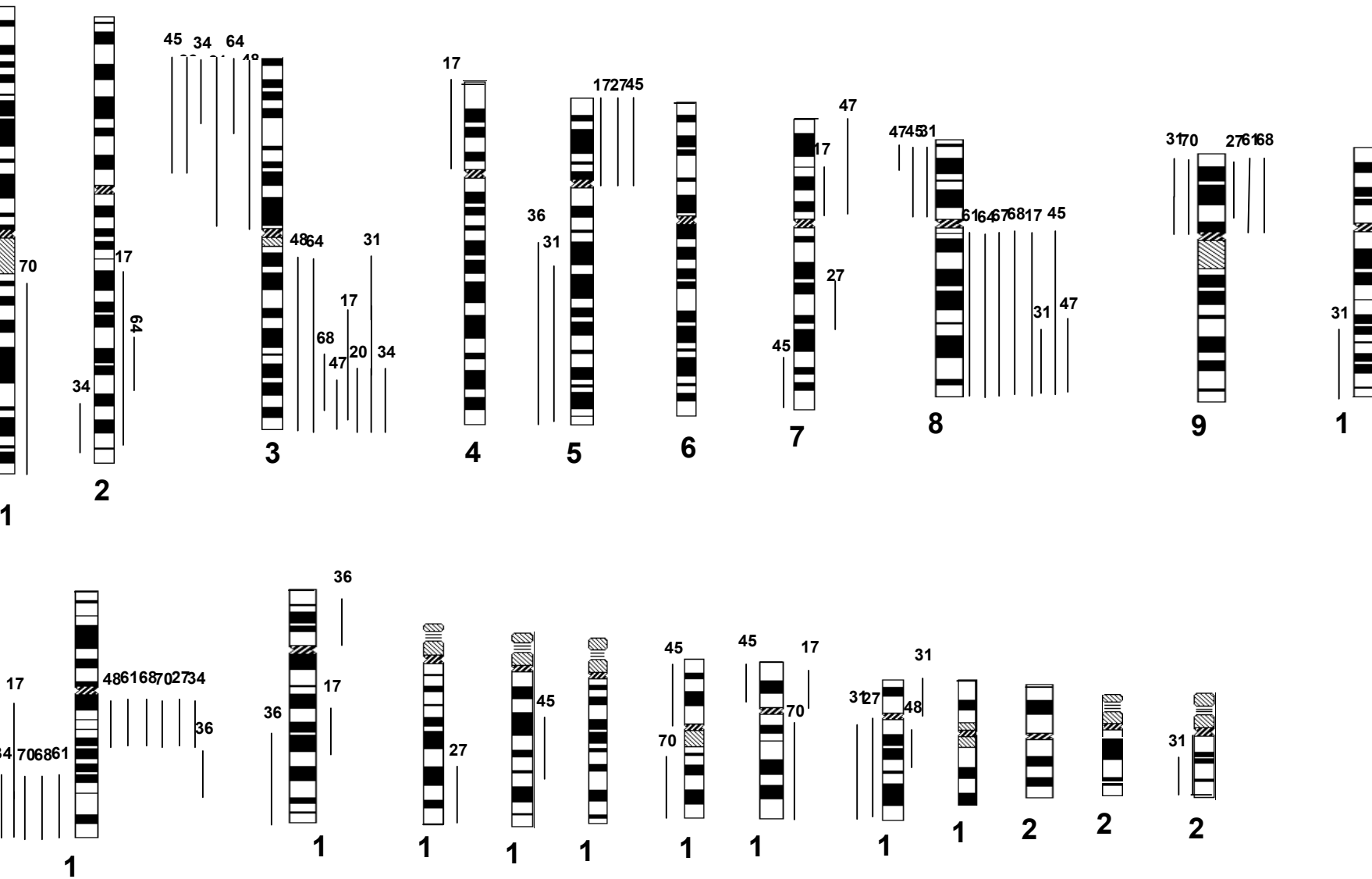
A hisztopathológiai és klinikai adatok összesítését, valamint az eltérések kromoszomális lokalizációját az 5. táblázat tartalmazza. A CGH-val analizált mintákban a gégetumorok 14%-a adott metasztázist, a hypopharynx daganatok ennél lényegesen agresszívabbnak bizonyultak, 66%-ban metasztatizáltak. Kísérleteink során összesen 14 gége tumort analizáltunk. Egy reprezentatív CGH mikroszkópos felvételét és analizisének eredményét mutatja be a 4. ábra.



4. ábra

A: Fej-nyaki tumor CGH eredményének mikroszkópos felvétele. A zöld színben feltűnő kromoszóma régiók a tumorban relatív DNS többlettel rendelkező szekvenciákat reprezentálják (a zöld nyíl egy DNS többletet mutató kromoszómakart jelöl); a vörös szakaszok a tumorban DNS vesztést mutató lókusztokat reprezentálják (a piros nyíl egy ilyen kromoszóma karra mutat). Az eltérést nem mutató kromoszómák a piros és zöld színek keveredése miatt narancssárga színben tűnnek fel (narancssárga nyíl). **B:** CGH profil. A kromoszóma ideogramok mellett a zöld és a vörös fluoreszcencia arányának átlagát ábrázoltuk a kromoszóma hosszának függvényében, a középső függőleges vonal az 1:1 zöld/vörös aránynak felel meg. Azokon a szekvenciákon, ahol a relatív DNS többlet/vesztés mértéke meghaladta a küszöbértéket (a középső függőleges vonaltól jobbra/balra eső, azzal párhuzamos vonalak) DNS kópiaszám változásról beszélünk, amit az adott szakaszok mellett megjelenő színes vonalak jeleznek (piros vonal DNS vesztés, zöld vonal DNS többlet). A kromoszóma profilok alatt az első szám az adott kromoszómát, a második az átlagolt kromoszómák számát jelenti.

A módszerrel a tumor genomban észlelhető relatív DNS hiányokat (deléciókat) és DNS többleteket (bizonyos esetekben DNS amplifikációkat) térképeztük fel kromoszomális szinten. Az eredményeket az 5. ábrán összegeztük. A sávozott kromoszómák jobb oldalán a tumor genomban CGH-val kimutatott DNS többleteket, míg a bal oldalon a hiányokat tüntettük fel.



5. ábra: CGH-val detektált kromoszomális eltérések gége tumorokban. A kromoszómák jobb oldalán a DNS többletek, bal oldalán a DNS veszteségek vannak feltüntetve. Az egyes eltéréseket megjelenítő vonalakhoz rendelve a tumorok azonosító számát is feltüntettük.

A vonalak feletti számok az adott tumor sorszámát jelzik. A CGH-val leggyakrabban észlelt genetikai eltéréseket a 6. táblázat foglalja össze.

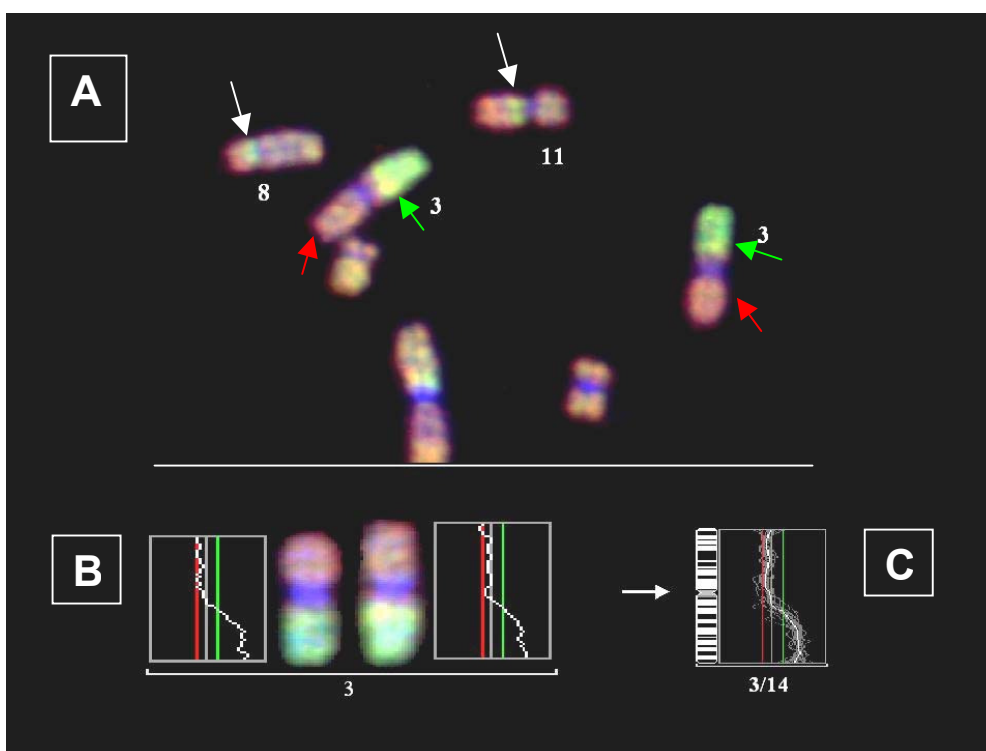
6. táblázat

A CGH-val az egyes kromoszóma karokon észlelt gyakoribb genomiális alterációk előfordulási gyakorisága laryngeális és hypopharyngeális karcinómák esetén

Aberráció típusa	Kromoszóma Kar	Laryngeális tumorok száma/össz.	Frekvencia	Hypopharyngeális tumorok száma/össz.	Frekvencia
DNS többlet	2q	2/14	14%	0/9	0%
	3q	8/14	57%	7/9	77%
	5p	3/14	21%	1/9	11%
	7q	1/14	7%	2/9	22%
	8q	8/14	57%	0/9	0%
	9p	3/14	21%	0/9	0%
	11q	7/14	50%	3/9	33%
	12p	1/14	7%	2/9	22%
DNS hiány	1p	0/14	0%	2/9	22%
	2q	1/14	7%	2/9	22%
	3p	6/14	43%	6/9	66%
	4p	1/14	7%	1/9	11%
	7q	1/14	7%	2/9	22%
	8p	3/14	21%	0/9	0%
	9p	2/14	14%	3/9	33%
	11q	6/14	43%	1/9	11%
	18q	2/14	14%	3/9	33%

A CGH eltérések kromoszomális lokalizációját az 5. táblázat mutatja. A kromoszomális alterációk átlagos száma 5,36-nak adódott, ami tumoronként változó számban jelentkezett az 1-10 eltérés/tumor tartományban. A kromoszomális szakaszokon kimutatható DNS többlet gyakoribb volt, mint azok hiánya. A DNS többletek átlagos száma tumoronként 3,07 (tartomány: 1-7), a DNS vesztések átlagos száma 2,14 (tartomány 0-7) volt. A 6-os, 15-ös, 19-es, 20-as és 21-es kromoszómák kivételével valamennyi kromoszómán detektáltunk eltéréseket, azonban jelentősen

eltérő frekvenciával. A leggyakoribb a 3-as és 8-as kromoszóma hosszú karját érintő DNS többlet volt (8 eset), mindkét kromoszomális kar alterációja 57%-os gyakorisággal fordult elő. A 3q kar amplifikációja a rövid kar teljes hiányával társult 2 esetben (14%). Az egyik ilyen hibridizáció eredményét szemlélteti a 6. ábra. A 8-as kromoszómára vonatkozóan ilyen CGH-profil csak egy tumornál volt megfigyelhető (7%).



6. ábra

Gége tumorok jellegzetes CGH hibridizációja. **A.** A 8-as és 11-es kromoszómákon (fehér nyíl) a zölden fluoreszkáló sáv lokális amplifikációra, míg a 3-as kromoszóma hosszúkarjának zöld fluoreszcenciája a teljes karra kiterjedő DNS többletre (zöld nyíl), a piros jelölődése a rövidkart érintő DNS hiányra (piros nyíl) utal. **B.** A 3-as kromoszóma CGH hibridizációja a homológ kromoszómák azonos festődését mutatja, a kromoszómák mellett jobb ill. bal oldalon a zöld-piros fluoreszcencia intenzitás arányok láthatók. **C.** A sávozott 3-as kromoszóma mellett az átlagolt kromoszóma profil van feltüntetve, alatta a kromoszóma azonosító száma, mellette az átlagolt kromoszómák száma látható.

A második leggyakoribb eltérés a 11-es kromoszóma hosszú karjára lokalizálódó DNS többlet volt (50%), a legkisebb közös eltérés ezen a karon a 11q13 lókuszt regionális amplifikációja volt. Ezen esetek kétharmadában a DNS többlet a 11q14-qtér deléciójával társult. DNS többletet figyeltünk meg továbbá három tumorban az 5p és 9p (21%), valamint 2 tumorban (14%) a 2q és 7p karokon. Az 1q, 7q, 12p, 12q, 13q, 14q, 17p, 17q, 18p, 18q karok DNS többleteit csak 1-1 tumor esetén (7%) sikerült detektálnunk.

A 3-as kromoszóma rövid és a 11-es kromoszóma hosszú karján észleltünk a leggyakrabban deléciókat (6-6 eset, 43%). Az utóbbi esetben a legkisebb közös régió a 11q23-11qter sávokat érintette. A 8-as kromoszóma rövid karján 3 esetben (21%) találtunk DNS vesztést. Hasonló eltérés mutatkozott az 5q, 9p és 18q (2 eset, 14%) szakaszon, míg a 2q, 4p, 7q, 10q, 12q, 16p, 16q, 17p és a 22q kromoszóma karokon 1-1 tumorban detektáltunk deléciókat.

5.5. CGH-val kimutatható kromoszomális eltérések hypopharynx tumorokban

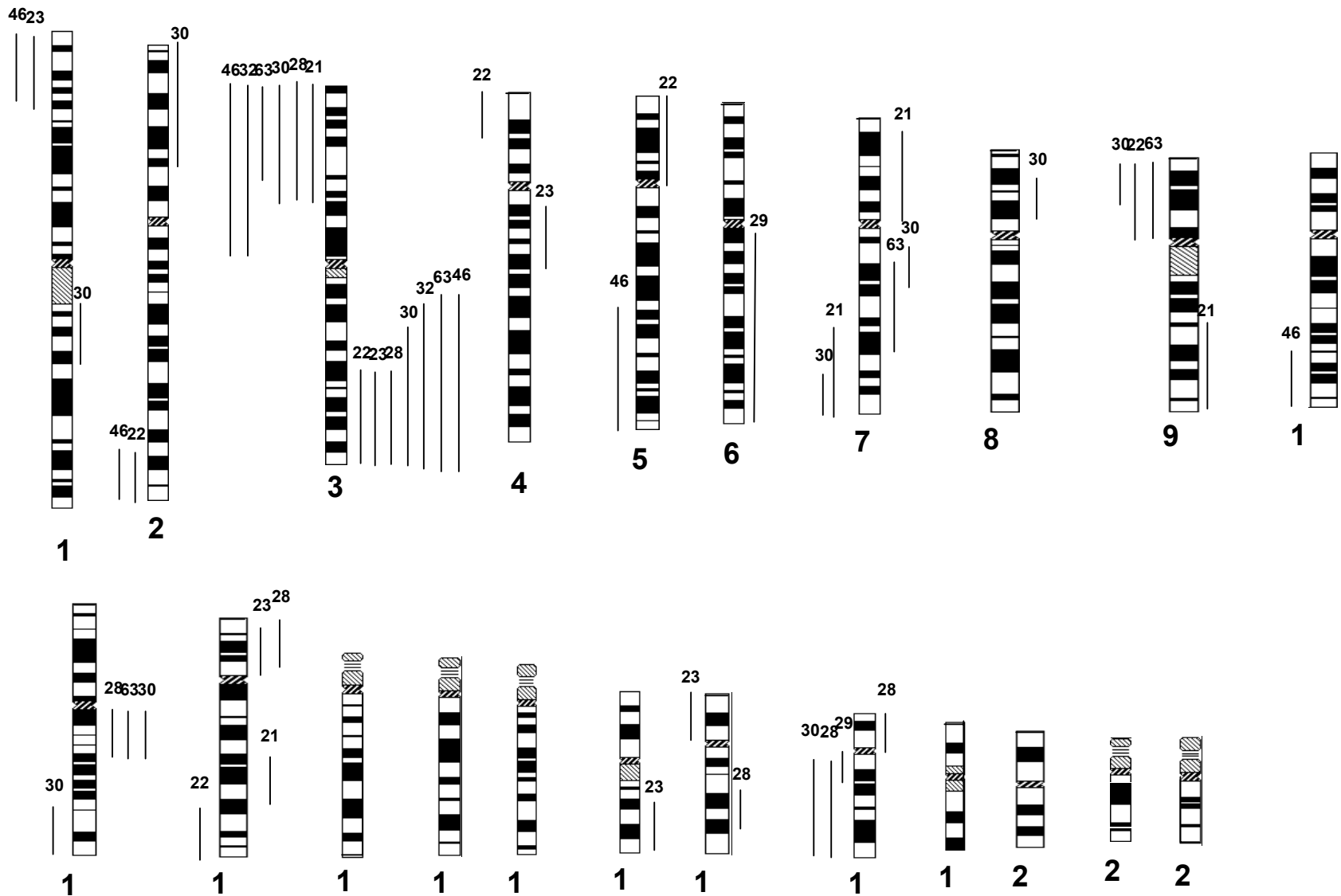
CGH-val összesen 9 hypopharynx tumort analizáltunk, melyek közül 6 adott metasztázist (66%). Az eredményeket a 7. ábra, valamint az 5. táblázat mutatja. Valamennyi, ebbe a csoportba tartozó tumorban észleltünk genetikai eltérést legalább egy kromoszomális régióban. A sávozott kromoszómák jobb oldalán a tumor genomában CGH-val kimutatott DNS többleteket, míg a bal oldalon a DNS hiányokat tüntettük fel. A DNS alterációkat a kromoszómák jobb és bal oldalán látható vonalak, az adott tumor sorszámát a felettük feltüntetett számok jelzik.

A genetikai eltérések átlagos száma 5,55 volt tumoronként (2-11 alteráció per tumor). A DNS szakaszok amplifikációja ebben a tumor csoportban is gyakoribb volt. A DNS többletek átlagos száma 2,88-nak adódott (tartomány:1-6), míg a DNS vesztések átlagos száma 2,66 (tartomány: 1-5) volt. A 13-as, 14-es, 15-ös, 19-es, 20-as, 21-es és 22-es kromoszómák kivételével a többi kromoszómán különböző frekvenciával eltéréseket találtunk.

A leggyakoribb a 3-as kromoszóma hosszú karjára lokalizálható DNS többlet volt, ez 7 esetben fordult elő (77%). A 3-as kromoszóma teljes hosszú karjára kiterjedő eltérés 2 tumorban (22%) volt megfigyelhető, 1 mintában (11%) ez teljes rövid kar delécióval társult, izokromoszóma képződésre utalva. A második leggyakoribb DNS többlet a 11-es kromoszóma rövid karjára lokalizálódott (3 tumor, 33%), ami mindhárom esetben a 11q13 sávot érintette, mindössze egy tumornál társult a disztális kromoszómarészlet (11q14-qter) deléciójával. A 7q és 12p karokat érintő DNS többleteket 2-2 tumorban (22%) figyeltük meg. Az 1q, 2p, 4q, 5p, 6q, 7p, 8p, 9q, 12q, 16q, 17q és 18p karok DNS többlete még ritkább volt, ezeket az eltéréseket egy-egy tumorban (11%) észleltük.

A leggyakrabban DNS vesztéssel érintett kromoszómaszakasz a 3-as kromoszóma rövid karja volt, hat esetben (66%). Lényegesen ritkábban, észleltünk a 9p és a 18q karokon fellépő DNS vesztéseket (3-3 eset, 33%), míg az 1p, 2q és 7q

karakon hasonló eltérést 2-2 tumorban (22%) észleltünk. A 4p, 5q, 10q, 11q, 12q és 17p karokon mindössze 1-1 (11%) esetben tudtunk kromoszomális vesztséget kimutatni.



7. ábra: CGH-val detektált kromoszomális eltérések hypopharynx tumorokban. A kromoszómák jobb oldalán a DNS többletek, bal oldalán a DNS veszteségek vannak feltüntetve. Az egyes eltéréseket megjelenítő vonalakhoz rendelve a tumorok azonosítói.

5.6. A gége és hypopharynx karcinómák kromoszomális eltéréseinek összehasonlítása

Összehasonlítva a két tumor típus vizsgálata során CGH-val észlelt kromoszomális eltéréseket, mind hasonlóságokat, mind pedig lényeges eltéréseket is észleltünk. A két eltérő lokalizációjú tumorban a tumoronkénti átlagos genomiális eltérések száma megközelítőleg azonos volt. A kromoszóma szakaszokat érintő alterációk részletes elemzése során megállapítottuk, hogy mindkét tumor típus esetén a leggyakoribb eltérés a 3-as kromoszóma hosszú karjának DNS többlete volt. Míg gégerákokban ez a tumorok 57%-át érintette, addig a hypopharynx daganatok 77%-ában fordult elő.

A 11-es kromoszóma hosszú karján észlelhető amplifikáció a gége karcinómák 50%-ában, a hypopharynx tumorok 33%-ában fordult elő. Ugyanezen kromoszóma hosszú karjának disztális hiánya szintén a laryngeális tumorokra volt jellemző; míg ezt az eltérést ebben a daganat típusban az esetek 43%-ában mutattuk ki, addig hypopharynx rákok közül ez a deléció mindössze egy tumorban jelentkezett. Csak gége tumorokban figyeltük meg a 8p kar vesztését (21%), ilyen elváltozást a másik daganat típusban nem tudtunk detektálni. A nagyobb mértékű amplifikációkat illetően kiemeljük a 11q13 lókuszt DNS többletét, mely a gégetumorok 50%-ában és a hypopharyngeális tumorok 33%-ában jelentkezett.

Olyan kromoszomális alteráció, mely csak a hypopharynx tumorokban volt jelen, de a gége daganatokban nem volt kimutatható, az 1-es kromoszóma rövid karjának delécióját foglalta magába. Más, az előzőekben nem említett genetikai aberrációk, melyek a hypopharynx eredetű tumorokban gyakrabban fordultak elő, mint a gégetumorokban az alábbiak voltak: 7q és 12p DNS többlete, valamint a 2q, 4p, 7q és a 18q karok DNS hiánya (6. táblázat).

A legjelentősebb különbséget a laryngeális karcinómák esetén a 8-as kromoszóma hosszú karján észlelt DNS többlet jelentette, mely több mint a tumorok 50%-ában jelen volt, de egyetlen hypopharyngeális rák esetén sem észleltük (5. táblázat).

6. *Diszkusszió*

6.1. *Eltérő tenascin expresszió gége és hypopharynx daganatokban*

Megfigyeléseink szerint a sebészi minták hisztológiailag tumormentes részében a tenascin csupán a felszíni epithélium bazálmembránja mentén detektálható. Ezen megfigyelés összhangban van azon korábbi leírásokkal, melyek a tenascint a különböző ektodermális és endodermális eredetű hámok bazális membránjával kapcsolatban írták le (24,32,33,49,50,129-131). A tenascin a bazálmembránokban feltehetően a sejtek leválása kapcsán játszik szerepet (132,133).

Gégerákokban, párhuzamosan az epithélium neoplasztikus váltoásaival, a tenascin mennyisége fokozatosan növekedett. Bár a tumor progresszió késői fázisaiban a tenascin az érfalakban is megjelent, ezt megelőzően csak a tumor és ép szövet interfázisban volt detektálható. A hypopharynx eredetű daganatokban a tenascin lerakódás már a tumor progresszió igen korai stádiumaitól megfigyelhető volt mind a véregek fala körül, mind a tumor matrixban. A tenascin felhalmozódását elsősorban a kapillárisok és kiserek környezetében figyelhettük meg, ami a tenascin expresszió és akkumuláció a neovaszkularizációban betöltött szerepére utal. Ezzel párhuzamosan egyre több és több proliferáló tumor sejt jelent meg az erek és az intenzív strómális tenascin depozíció környezetében. Ezen változások jó egyezésben vannak a tumor invazivitásával (T stádium), nodális (N stádium) és távoli metasztázisképző hajlamával (M stádium), általában azon klinikai megfigyelésekkel, melyek a hypopharynx rákok esetén kedvezőtlen prognózisról számolnak be (8,117,134).

Az irodalomban korlátozott számú azoknak a közleményeknek a száma, melyek a tenascin expresszió és tumor angiogenezis összefüggéséről számolnak be. Ezek a megfigyelések bizonyos magasan differenciált lymphomákra (43), emlőtumorokra (136), asztrocytomákra (32) vonatkoznak, függetlenül a tenascin expresszió és angiogenezis kapcsolatától és a daganat differenciáltsági fokától. Vizsgálataink során hypopharynx rákok esetében, függetlenül a tumorok TNM stádiumtól, számos tenascinnal körülvett érment detektáltunk. Ezzel szemben, gégerákokban ez a tenascin megjelenés az erek körül csak a daganatos progresszió késői időszakában jelentkezett.

Eredményeink arra utalnak, hogy a neovaszkularizáció és a sejt proliferáció sokkal intenzívebb - gyakorlatilag a tumor progresszió minden stádiumában - a hypopharynx tumorokban, mint a gégerákokban. Megalapozottnak látszik az a

feltételezés, hogy az ér-asszociált tenascin depozíció a tumorokban az angiogenetikus kaszkád stimulációjával függ össze, de nem világos, hogy ez a tenascin akkumuláció csupán kísérőjelensége az érképződésnek, vagy - több-kevesebb mértékben - oka annak.

A tenascint szintetizáló sejtek egyelőre azonosíthatatlanok mind gége, mind hypopharynx tumorokban, a tenascin és a fibroblastok, valamint az endotheliális sejtek in vivo interakciója igen valószínűnek látszik (22). Egyes megfigyelések arra utalnak, hogy az astrocytoma daganatos sejtjei tenascin termelésre képesek; ehhez hasonló jelenséget egyéb tumoroknál eddig még nem írtak le (135-138).

6.2. Fibrin depozíció laryngeális és hypopharyngeális rákokban

Az általunk vizsgált mintákban a tenascin és fibrin depozíció jelentős fokú korrelációt mutatott. A tumormentes szöveti részekben a fibrin nem volt kimutatható, míg bőségesen jelen volt a tumor inváziós front területén, utalva az extracelluláris alvadási kaszkád lokális aktivációjára. A tumoros progresszió előrehaladott stádiumában lévő tumorokban - a tenascinhoz hasonlóan - intratumorális, ér-asszociált formában került kimutatásra a fibrin. Az átmeneti fibringél-matrix szerepe - feltételezhetően - egy olyan mikrokörnyezet megteremtésében rejlik, mely a tumorsejtek antigenitásának elfedésével, valamint a stróma- és érképződés facilitálásával elősegíti a tumorsejtek túlélését, invázióját a gazdaszervezetbe. Vizsgálataink szerint az intratumorális fibrinhálózat stabilizálásában a tumor-asszociált, FXIIIa-pozitív makrofágok játszanak alapvető szerepet.

6.3. Genetikai eltérések gége és hypopharynx daganatokban

Tanulmányunk az első olyan közlemény, mely a fej-nyaki karcinómák két anatómiailag közeli lokalizációjú daganat típusának összehasonlító CGH analízisét tartalmazza. Eredményeink sok tekintetben konzisztensek a korábban primer fej-nyaki daganatokra közölt CGH adatokkal (84,85,100,104,117,123); ugyanakkor olyan kromoszomális eltéréseket is azonosítottunk, melyek feltehetően csak a gége vagy csak a hypopharynx eredetű tumorokra jellemzőek.

A leggyakoribb kromoszomális alteráció mindkét primer tumor típusban a 3-as kromoszóma hosszú karjának DNS többlete és rövid karjának DNS vesztese volt, bár előfordulásuk a két tumor típusban különbözött, a hypopharyngeális daganatokban mindkét elváltozás frekvenciájában jelent meg. Az eddigi közleményeket áttekintve

megállapítható, hogy a 3-as kromoszóma elváltozásainak előfordulási gyakorisága széles határok között mozog (3q amplifikáció: 10-97%, 3p deléció: 48-87%). Mindez azzal magyarázható, hogy egyrészt nem zárható ki a CGH eredmények kutatócsoportonként eltérő interpretálása, de ebben szerepet játszhat a betegcsoportok különböző földrajzi lokalizációjának hatása is (109), mely egyrészt eltérő genetikai hátteret, másrészt a környezeti karcinogének expozíciójában rejlő különbségeket jelentheti az egyes betegcsoportokra vonatkozóan (5,109). A 3q amplifikációját a rosszabb prognózisú tumorokban figyelték meg gyakrabban, míg a rövid kar prognosztikai szerepét eddig nem bizonyították (104). Hasonló megfigyelések állnak rendelkezésre neuroblastoma, vese karcinóma, hólyag tumor és tüdőrák vonatkozásában (139-142). A 3p kar vesztésének jelentőségét az ide lokalizálható *FHIT* (3p14.2) és *RASSF* (3p21.3) tumor szuppresszor gének inaktivációjában látják (96,143). A heterozigótaság elvesztésének analízise során kapott eredmények alapján más szuppresszor gének jelenlétét is felvetik ezen a lókuszon (144).

Gége-tumorokra jellemző DNS többletet az 5p, 9p és 11q13 kromoszóma szakaszokon találtunk. A 11q kar disztális szakaszának hiánya is gyakoribb volt ebben a tumor típusban. A 11q13 lókuszon számos onkogén lokalizálódik, köztük a cyclin D1 génje (*CCND1/PRAD1*). A cyclin D1 jelentős szerepet játszik a sejtek daganatos elfajulásában, elősegítve a sejtek belépését a sejtciklus oszlási fázisába. Számos tumor típus esetén ez az elváltozás a daganatok rosszabb prognózisát jelentette, ugyanakkor fej-nyaki tumorokban szerepe, a gyakori előfordulás ellenére, még napjainkban sem tisztázott. Szájüregi daganatokban cáfolták kedvezőtlen prognosztikai jelentőségét, hasonlóan a mi megfigyeléseinkhez (145). Míg a 9p kar DNS többletét és a 8p kar delécióját csak gége tumorokban mutattuk ki, addig a 9p és 18q karok hiányát főként hypopharyngeális daganatokban észleltük. A 18q kar delécióját többen is rosszabb prognózissal társították korábban, megegyezően jelen észlelésünkkel (117,146).

Figyelemre méltó genetikai eltérést találtunk a 8-as kromoszóma hosszú karján. Ezt az eltérést a gége tumorok több, mint felében észleltük, ugyanakkor a hypopharynx karcinómák egyikében sem fordult elő. Eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy ezt az alterációt - a fej-nyaki daganatokat CGH-val analizálva - már többen leírták, de egyetlen közleményben sem történt utalás arra vonatkozóan, hogy az eltérés a gégetumorokra karakterisztikus lenne (84,85,100,109,117,118,119,123). Ennek oka, hogy a szerzők a fej-nyaki daganatokat egy közös entitásként analizálták, a különböző lokalizációjú tumorokhoz társuló eltérő prognózis ellenére. A 8-as kromoszóma genetikai eltérései jelentős százalékban a

8q23-qtér lókuszra koncentráltak. Az irodalomban fellelhető, lokalizáció szempontjából el nem különített tumorok elemzésekor előfordulási gyakorisága Bockmühl közleményében 56% (85), Stafford adatai szerint 31% (109), Bergamo CGH adatai szerint 42% volt (119). Míg az első két szerző ezt közepes gyakoriságú eltérésnek értékelte, különösebb jelentőséget nem tulajdonítottak neki, az utóbbi szerzőnél a második leggyakoribb DNS többlet volt. Diskussziójában Bergamo és mtsai az itt előforduló *MYC*, *PTV1* és *PLAG1* onkogének szerepét feltételezik. A leginkább jelentős megfigyelés ezen régió tekintetében Welkoborsky nevéhez fűződik (123). Welkoborsky és mtsai nem metasztatizáló tumorokban 50%-os gyakorisággal figyelték meg, míg metasztázist adó karcinómákban csupán 10%-ban tudták kimutatni. Ezek a megfigyelések teljes összhangban vannak eredményeinkkel. Magyarázat a fenti jelenségre egyelőre nincs, azonban felhívta a figyelmet a 8q amplifikációnak a tumor progressziója során észlelhető esetleges kedvező hatására. A *C-MYC* amplifikációját számos daganat típusban, így fej-nyaki karcinómák esetén is rossz prognózissal, fokozott metasztázis képzéssel hozták kapcsolatba, ugyanakkor kiderült, hogy bizonyos körülmények között a gén alterációja a daganatos sejtek apoptózisát segítheti elő, mely kedvezőbb prognózist eredményez (147,148,149). CGH eredményeink az utóbbi hipotézist támasztják alá, de további célzott vizsgálatok szükségességére is felhívják a figyelmet.

7. Összefoglalás

A fej-nyaki daganatok előfordulási gyakorisága az elmúlt évtizedekben fokozatosan nőtt, így mára az összes daganatos megbetegedések jelentékeny hányadát teszik ki e régió tumorai. A fej-nyaki karcinómás betegek prognózisa az összes daganat típus között az egyik legkedvezőtlenebb, mindazon diagnosztikus és terápiás újdonság ellenére, melyek az utóbbi időben kerültek alkalmazásra ezen daganatok esetében. A klinikai lefolyás illetve prognózis tekintetében jellegzetes különbség észlelhető az anatómiailag szerves közelségben lévő szubrégiók tumorai között. Jól ismert a hypopharyngeális rákok igen rossz prognózisa, mely különösen szembetűnő a gége tumorokkal összehasonlítva.

A malignus daganatok növekedési képességét és invazivitását a transzformált sejtekkel szomszédos tumor matrix nagyfokban befolyásolja. Munkánk egy részében a tumoros extracelluláris matrix egyik jellegzetes összetevőjének, a tenascinnek az eloszlását vizsgáltuk a fej-nyaki régió két anatómiailag közeli lokalizációjú, de eltérő metasztázisképző hajlamú altípusában: a gége és hypopharynx daganatokban. Vizsgálataink másik része a tumor progresszióval együtt járó másodlagos változások megismerése mellett azoknak a molekuláris genetikai eltéréseknek a felderítését célozta, melyek a daganatos sejteket jellemezték a fenti két szubrégió daganataiban.

A tenascin kimutatását kettős és hármas immunfluoreszcens reakciók segítségével végeztük. A tenascin mellett a preparátumokban kimutatásra kerültek az epitheliális és endotheliális eredetű sejtek, valamint a proliferáló sejtek. A jellemző genetikai eltérések kimutatására CGH analízist végeztünk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során megfigyeltük, hogy a tenascin eloszlás fokozatosan változik a gége és hypopharynx karcinómákban a tumor progressziójával párhuzamosan. Megállapítottuk, hogy a tenascin expresszió üteme és mintázata a kétféle lokalizációjú tumorban jelentősen különbözik, és szoros korrelációt mutat a primer tumor metasztatizáló képességével, recidíva hajlamával. Sikerült bizonyítanunk a tenascin expresszió és neovaszkularizáció kapcsolatát a daganatok növekedése során, a tenascin ér-asszociált megjelenésének kimutatásával. Fentiek alapján igazoltuk a tenascin szerepét a tumor progresszió, neovaszkularizáció és metasztatizálás folyamatában, valamint bebizonyosodott, hogy a tenascin expresszió paraméterei kiváló prognosztikai faktorként használhatók fel az egyes fej-nyaki tumorok klinikai viselkedésének előrejelzésében.

A genetikai eltérések kimutatása során, kísérleteink kezdeti szakaszában a CGH módszert sikeresen adaptáltuk a kétféle kiindulású tumor mintáinak vizsgálatára.

A gége és hypopharynx daganatokat jellemző hasonló genetikai eltéréseken túl jól karakterizálható különbségeket is feltártunk az egyes kromoszóma szakaszokat érintő genomiális eltérések vonatkozásában. Ezek közül legjelentősebb a gége tumorokban 57%-os előfordulási gyakorisággal észlelt 8-as kromoszóma hosszú kar DNS többlet volt, melyet egyetlen hypopharyngeális daganatban sem észleltünk. A mindkét daganat típusban nagy gyakorisággal észlelt 3q kar DNS többlet, 3p kar DNS hiány, valamint 11q13 sáv amplifikáció is jelentősen eltérő frekvenciával került észlelésre a két alcsoportban. Ezeknek a genetikai különbségeknek is jelentős szerepük lehet a gége és hypopharynx rákok merőben eltérő klinikai viselkedésében. E miatt indokoltnak tartjuk a daganat lokalizációjának függvényében értékelni az egyes genomiális eltéréseket, melyek - fenti eredményeink alapján - hasznosak lehetnek az adott tumor prognózisának becslésekor.

Vizsgálati eredményeink megerősítik a korábban az irodalomban már leírt, a gége és hypopharyngeális daganatokhoz rendelhető eltérő prognosztikai sajátosságokat, másrészt új adatokat szolgáltatnak a tumor progresszióval összefüggő tenascin expresszióban bekövetkező változásokról és genetikai eltérésekről.

8. Irodalomjegyzék

1. Szyfter K, Szmeja Z, Szyfter W, Hemminki K, Banaszewski J, Jaskula-Sztul R, Louhelainen J (1999): Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. *Mutat. Res.* 445:259-274.
2. Papadimitrakopoulou VA (2000): Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. *Curr. Opin. Oncol.* 12:240-245.
3. Cann CI, Fried MP, Rothman KJ (1985): Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. *Otolaryngol. Clin.* 18:1-22.
4. Boring CC, Quires TS, Tong T (1993): Cancer statistics. *CA. Cancer. J. Clin.* 51:7-22.
5. Tsukuda M: Comparison in strategies for advanced head and neck squamous cell carcinomas between Japan and western countries. *Gan To Kagaku Ryoho.* 26:54-60.
6. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1997): Cancer statistics. *Cancer J. Clin.* 47:5-27.
7. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1997): Head and Neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 328:184-194.
8. Kramp B, Sievert U (1989): Prognostic factors in laryngeal cancer. *Arch. Geschwulstforsch.* 59:183-189.
9. Leon X, Quer M, Orus C, del-Prado-Venegas M, Lopez M (2000): Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head-Neck.* 22: 680-686.
10. Cerezo L, Millan I, Torre A, Aragon G, Otero J (1992): Prognostic factors for survival and tumor control in cervical lymph node metastases from head and neck cancer. *Cancer.* 69:1224-1234.
11. Del-Valle-Zapico A, Fernandez FF, Suarez AR, Angulo CM, Quintela JR (1998): Prognostic value of histopathologic parameters and DNA flow cytometry in squamous cell carcinoma of the pyriform sinus. *Laryngoscope.* 108:269-272.
12. Dejonckere PH (1998): Functional swallowing therapy after treatment for head and neck cancer: can outcome be predicted? *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord).* 119: 239-243.
13. Répássy G, Czigner J, Ribári O, Lapis K (1988): The barrier-like role of activated connective tissue against the spread of supraglottic laryngeal carcinoma. *Arch. Otorhinolaryngol.* 246:151-154.
14. Nicolson GL (1993): Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metast. Rev.* 12:325-343.
15. Papadimitrakopoulou VA, Shin DM, Hong WK (1996): Molecular and cellular biomarkers for field of cancerisation and multistep process in head and neck tumorigenesis. *Cancer Metast. Rev.* 15:43-76.
16. Ádány R, Heimer R, Caterson B, Sorrell JM, Iozzo RU (1990): Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma.

- Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. *J. Biol. Chem.* 265:11389-11396.
17. Heine UI, Munoz EF, Flander KC, Roberts AB, Sporn MB (1990): Colocalisation of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development.* 109:29-36.
 18. Howeedy AA, Virtanen I, Laitinen L, Gould NS, Koukoulis GK, Gould VE (1990): Differential distribution of tenascin in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. *Lab. Invest.* 63:798-806.
 19. Chuong CM, Chen HM (1991): Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin(cytotactin) during wound healing. *Am. J. Pathol.* 138:427-440.
 20. Mackie EJ (1994): Tenascin in connective tissue development and pathogenesis. *Pers. Dev. Neurobiol.* 2:125-132.
 21. Ádány R, ed. (1995): *Tumor Matrix Biology*. Boca Raton: CRC Press.
 22. Lightner VA, Erickson HP (1990): Binding of hexabranchion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. *J. Cell Sci.* 95:263-277.
 23. Chiquet-Ehrismann R (1991): Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:800-840.
 24. Ádány R, Toida M, Takami T (1993): Arborizing tenascin network under the rapidly proliferating epithelium of epulis. *J. Histochem. Cytochem.* 41:1717-1718.
 25. Wehrle-Haller B, Chiquet M (1993): Dual function of tenascin: simultaneous promotion of neurite growth and inhibition of glial migration. *J. Cell Sci.* 106:597-610.
 26. Vollmer G, Siegal GP, Chiquet-Ehrismann R, Lightner VA, Arnholdt H, Knuppen R (1990): Tenascin expression in the human endometrium and in endometrial adenocarcinomas. *Lab. Invest.* 62:725-730.
 27. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Botti C, Castellani P, Risso AM, Zardi L (1991): Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *Int. J. Cancer.* 47:811-816.
 28. Oyama F, Hirohashi S, Shimoshato Y, Titani K, Sekiguchi K (1991): Qualitative and quantitative changes of human tenascin expression in transformed lung fibroblast and lung tumor tissue: comparison with fibronectin. *Cancer Res.* 51:4876-4881.
 29. Pilch H, Schaffer U, Schlenger K, Lautz A, Tanner B, Hockel M, Knapstein PG (1999): Expression of tenascin in human cervical cancer - association of tenascin expression with clinicopathological parameters. *Gynecol. Oncol.* 73:415-421.
 30. Borsi L, Carnemolla B, Nicolo G, Spina B, Tanara G, Zardi L (1992): Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int. J. Cancer.* 52:688-692.
 31. Hasegawa T, Seki K, Yang P, Hirose T, Hizawa K, Wada T, Wakabayashi J (1995): Differentiation and proliferative activity in benign and malignant cartilage tumors of bone. *Hum. Pathol.* 26:838-45.

32. Zagzag D, Friedlander DR, Miller DC, Dosik J, Cangiarella J, Kostianousky M, Cohen H, Gumet M, Greco MA (1995): Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res.* 55:907-914.
33. Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S (1996): Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res.* 56:182-189.
34. Tan SS, Crossin KL, Hoffman S, Edelman GM (1987): Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7977-7981.
35. Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000): Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 80:1267-1290.
36. Davie JR, Spencer VA (2000): Signal transduction pathways and the modification of chromatin structure. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 65:299-340.
37. Hofmann UB, Westphal JR, Van-Muijen GN, Ruitter DJ (2000): Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 115:337-344.
38. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH (2000): The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol. Med. Today.* 6:324-329.
39. Johansson N, Ahonen M, Kahari VM (2000): Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:5-15.
40. Kelly T, Borset M, Abe E, Gaddy-Kurten D, Sanderson RD (2000): Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma.* 37:273-281.
41. Klein-Soyer C, Ceraline J, Orvain C, de-la-Salle C, Bergerat JP, Cazenave JP (1997): Angiogenesis inhibitor SR 25989 upregulates thrombospondin-1 expression in human vascular endothelial cells and foreskin fibroblasts. *Biol. Cell.* 89:295-307.
42. Taooka Y, Chen J, Yednock T, Sheppard D (1999): The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J. Cell. Biol.* 145:413-420.
43. Vacca A, Ribatti D, Fanelli M, Costantino F, Nico B, Di-Stefano R, Serio G, Dammacco F (1996): Expression of tenascin is related to histologic malignancy and angiogenesis in b-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk. Lymphoma.* 22:473-481.
44. Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD (1983): Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 43:2796-2805.
45. Chiquet M, Fambrough DM (1984): Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfid-linked subunits. *J. Cell Biol.* 98:1937-1946.
46. Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM (1985): Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:8075-8079.
47. Engel J (1989): EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett.* 251:1-7.

48. Erickson HP (1993): Tenascin-C, tenascin-R, tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:869-876.
49. Weinacker A, Ferrando R, Elliott M, Hogg J, Balmes J, Sheppard D (1995): Distribution of integrins alpha v beta 6 and alpha 9 beta 1 and their known ligands, fibronectin and tenascin, in human airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12:547-56.
50. Yokosaki Y, Monis H, Chen J, Sheppard D (1996): Differential effects of the integrins alpha9beta1, alphavbeta3, and alphavbeta6 on cell proliferative responses to tenascin. Roles of the beta subunit extracellular and cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 271:24144-24150.
51. Karja V, Syrjanen K, Syrjanen S (1995): Collagen IV and tenascin immunoreactivity as prognostic determinant in benign and malignant salivary gland tumours. *Acta Otolaryngol. (Stockh).* 115:569-75.
52. Kuhn C, Mason RJ (1995). Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 147:1759-1769.
53. Lohi J, Tani T, Laitinen L, Kangas L (1995): Tenascin and fibronectin isoforms in human renal cell carcinomas, renal carcinoma cell lines xenografts in nude mice. *Int. J. Cancer.* 63:442-449.
54. Ramos DM, Chen BL, Boylen K, Stern M, Kramer RH, Sheppard D, Nishimura SL, Greenspan D, Zardi L, Pytela R (1997): Stromal fibroblasts influence oral squamous-cell carcinoma cell interactions with tenascin-C. *Int. J. Cancer.* 72:369-76.
55. Lochter A, Vaugham L, Kaplony A, Rochiantz A, Schachner M, Faissner A (1991): J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* 113:1159-1171.
56. Anbazhagan R, Sakakura T, Gusterson BA (1990): The distribution of immunoreactive tenascin in the epithelial-mesenchymal junction areas of benign and malignant squamous epithelia. *Virchows Arch. B Cell Path.* 59:59-63.
57. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 396:643-649.
58. Terasaki T, Shimosato Y, Nakajama T, Tsumuraya M, Mosinaga S, Hirohashi S, Yamoguchi K, Kato Y, Ichinose H, Hagatsn T (1986): Changes in cell characteristics due to culture conditions in cell lines from human small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 16:203-212.
59. James LA (1999): Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J. Pathol.* 187:385-395.
60. Luke S, Shepelsky M (1998): FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell. Vis.* 5:49-53.
61. Mandelli F, Petti MC, Lo-Coco F (1998): Therapy of acute myeloid leukemia: towards a patient-oriented, risk-adapted approach. *Haematologica.* 83:1015-1023.
62. Somer KD, Cartwright SL, Schechter GL (1990): Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene.* 5:915-920.
63. Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S Boiocchi M (1993): Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancer. *Cancer Res.* 53:5775-5779.

64. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P (2000): Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer*. 28:145-152.
65. El Naggar A, Lee MS, Wang G, Luna MA, Goepfert H, Batsakis JG (1993): Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of the short arm of chromosome 3 in primary head and neck squamous carcinoma. *Cancer (Phila)*. 72:881-886.
66. Rao PH, Sreekantaiah C, Schantz SP, Chaganti RSK (1994): Cytogenetic analysis of 11 squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet Cytogenet*. 77:60-64.
67. Mertens F, Johansson B, Mitelman F (1994): Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer*. 10:221-230.
68. Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F (1997): Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res*. 57:2765-2780.
69. Jin C, Jin Y, Wennenberg J, Akervall J, Grenthe B, Mandahl N, Heim S, Mitelman F, Mertens F (1997): Clonal chromosomal aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa. *Mutat. Res*. 374:63-72.
70. Patridge M, Emilion G, Langdon JD (1996): LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*. 73:366-371.
71. Shao X, Tandon R, Samara G, Kanki H, Yano H, Close LG, Parsons, Sato T (1998): Mutational analysis of the *PTEN* gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 77:684-688.
72. El-Naggar AK, Coombes MM, Batsakis JG, Hohg WK, Goepfert H, Kagan J (1998): Localisation of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene*. 16:2983-2987.
73. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (Washington DC)*, 258: 818-821, 1992.
74. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998): DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am. J. Pathol*. 152: 1107-1123.
75. Hovey RM, Chu L, Balázs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM (1998): Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res*. 58: 3555-3560.
76. Wallrapp C, Muller-Pillasch F, Micha A, Wenger C, Geng M, Solinas-Toldo S, Lichter P, Frohme M, Hoheisel JD, Adler G, Gress TM (1999): Strategies for the detection of disease genes in pancreatic cancer. *Ann. NY. Acad. Sci*. 88:122-146.
77. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van-Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van-Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation. *Mol. Pathol*. 52:243-251.
78. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramedy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H,

- Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y (1999): DNA copy number losses in human neoplasms. *Am. J. Pathol.* 155:683-694.
79. Speicher MR, Howe C, Crotty P, du-Manoir S, Costa J, Ward DC (1995): Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 55: 1010-1013.
 80. Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C(1993): LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat. Genet.* 5:66-70.
 81. Ye BH, Lista F, Lo CF, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla FR (1993): Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science (Washington DC).* 262:747-750.
 82. Williams ME, Gaffey MJ, Weiss LM, Wilczynski SP, Schuurin E, Levine PA (1993): Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol. Head and Neck Surg.* 119:1238-1243.
 83. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG (1994): PRAD-1(CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma). *Cancer.* 74:152-158.
 84. Brzoska PM, Levin NA, Fu KK, Kaplan MJ, Singer MI, Gray JW, Christman MF (1995): Frequent novel DNA copy number increase in squamous cell head and neck tumors. *Cancer Res.* 55:3055-3059.
 85. Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I (1996): Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 56:5325-5329.
 86. Blasius S, Brinkschmidt C, Poremba C, Terpe HJ, Halm H, Schlee J, Ritter J, Wortler K, Bocker W, Dockhorn-Dworniczak B (1998): Metastatic retroperitoneal paraganglioma in a 16-year-old girl. Case report, molecular pathological and cytogenetic findings. *Pathol. Res. Pract.* 194:439-444.
 87. Gribble SM, Roberts I, Grace C, Andrews KM, Green AR, Nacheva EP (2000): Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. *Cancer. Genet. Cytogenet.* 118:1-8.
 88. Reed AL, Califano J, Caurns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D (1996): High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 56:3630-3633.
 89. Juge-Morineau N, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R (1997): The retinoblastoma susceptibility gene *RB-1* in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma.* 24:229-237.
 90. Kennerknecht I, Barbi G, Greher J (1994): Diagnosis of retinoblastoma in a presymptomatic stage after detection of interstitial chromosomal deletion 13q. *Ophthalmic-Genet.* 15:19-24.
 91. Juge-Morineau N. Harousseau JL, Amiot M, Bataille R (1997): The retinoblastoma susceptibility gene *RB-1* in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma.* 24:229-237.

92. Califano J, Koch W, Sidransky D, Westra WH (2000): Inverted sinonasal papilloma : a molecular genetic appraisal of its putative status as a precursor to squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 156:333-337.
93. Tada K, Oka M, Tangoku A, Hayashi H, Oga A, Sasaki K (2000): Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. *Cancer.* 88:268-273.
94. Soder AI, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Conradt C, Bosch FX (1995): Distinct nonrandom patterns of chromosomal aberrations in the progression of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 55:5030-5037.
95. Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zätterstöm UK, Kjellén E, Mertens F, Willén R, Mandahl N, Heim S, Mitelman F (1995): Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer (Phila.)* 76:853-859.
96. Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM (1998): The role of the *FHIT/FRA3B* locus in cancer. *Annu. Rev. Genet.* 32:7-31.
97. Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI, Glover TW (1996): *FRA3B* extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum. Mol. Genet.* 5:187-195.
98. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Torielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM (1996): The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell.* 85:17-26.
99. Schneeberger C, Eder S, Swoboda H, Ullrich R, Zeillinger R (1998): A differential PCR system for the determination of *CCND1* (cyclin D1) gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral. Oncol.* 34:257-260.
100. Bockmühl U, Petersen S, Schmidt I, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I (1997): Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res.* 57:5213-5216.
101. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P (1991): A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell.* 65:13-24.
102. Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT (1997): CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.* 57:846-849.
103. Simon JC, Heider KH, Dietrich A, Wuttig C, Schopf E, Adolf GR, Ponta H, Herrlich P (1996): Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur. J. Cancer.* 32:1394-1400.
104. Bockmühl U, Wolf G, Schmidt I, Schwendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I (1998): Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head-Neck.* 20:145-151.
105. Petersen S, Petersen I, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M (1997): Deletions on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and metastatic phenotype. *Clin. Cancer. Res.* 77:270-276.
106. Eagle LR, Yin X, Brothman AR, Williams BJ, Atkin NB, Prochownik EV (1995): Mutation of the *MXII* gene in prostate cancer. *Nat. Genet.* 9:249-255.

107. Wechsler DS, Shelly CA, Petroff CA, Dang CV (1997): *MX11*, a putative tumor suppressor gene, suppresses growth of human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 57:4905-4912.
108. Field JK (1996): Genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.* 16:2421-2432.
109. Stafford ND, Ashman JNE, MacDonald AW, Ell SR, Monson JRT, Greenman J (1999): Genetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma and surrounding mucosa. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125:1341-1348.
110. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953): „Filed cancerisation” in oral stratified squamous epithelium. *Cancer.* 6:963-968.
111. Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61:759-767.
112. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B (1992): Clonal origin of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 326:737-740.
113. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D (1996): Multiple head and neck tumors: evidence for clonal origin. *Cancer Res.* 56:2484-2487.
114. Heller A, Chudoba I, Bleck C, Senger G, Claussen U, Liehr T (2000): Microdissection based comparative genomic hybridization analysis (micro-CGH) of secondary acute myelogenous leukemias. *Int. J. Oncol.* 16:461-468.
115. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J et al. (1994): Detection and mapping of amplified DNA-sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2156-2160.
116. Courjai F, Theillet C (1997): Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *Cancer Res.* 57:4368-4377.
117. Bockmühl U, Schlüns K, Küchler I, Petersen S, Petersen I (2000): Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. *Am. J. Pathol.* 157:369-375.
118. Bockmühl U, Küchler I, Petersen I (2000): Verbesserte Prognose-einschätzung bei Kopf-Hals-Karzinomen durch neue genetische Marker. *HNO.* 48:451-456.
119. Bergamo NA, Rogatto SR, Poli-Frederico RC, Reis PP, Kowalski LP, Zielenska M, Squire JA (2000): Comparative genomic hybridization analysis detects frequent over-representation of DNA sequences at 3q, 7p, and 8q in head and neck carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 119:48-55.
120. Kas K, Voz ML, Roijer E, Astrom AK, Meyen E, Stenman G, Van den Ven WJM (1997): Promotor swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nature Genet.* 15:170-174.
121. Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, kato H (1991): Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181:51-58.
122. Fu GK, Grosveld G, Markovitz DM (1997): DEK, an autoantigen involved in a chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia, binds to the HIV-2 enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:1811-1815.

123. Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Riazimand HS, Jacob R, Mann WJ, Hinni ML (2000): Patterns of chromosomal aberrations in metastasing and nonmetastasizing squamous cell carcinomas of the oropharynx and hypopharynx. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 109:401-410.
124. Carey TE, Frank CJ, Raval JR, Jones JW, McClatchey KD, Beals TF, Worsham MJ, Van-Dyke DL (1997): Identifying genetic changes associated with tumor progression in squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 529:229-232.
125. Frank CJ, McClatchey KD, Devaney KO, Carey TE (1997): Evidence that loss of chromosome 18q is associated with tumor progression. *Cancer Res.* 57:824-827.
126. Muratake T, Hayashi S, Ichikawa T, Kumanshi T, Ichimura Y, Kuwano R, Isobe T, Wang Y, Minoshima S, Shimizu N, Takahashi Y (1996): Structural organization and chromosomal assignment of the human 14-3-3-beta chain gene (*YWHAH*). *Genomics.* 36:63-69.
127. Singh B, Kim S-H, Carew JF, Yu I, Shaha AR, Wolden S, Boyle J, Shah JP, Rao PH (2000): Genome-wide screening for radiation response factors in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 110:1251-1256.
128. Sambrook J, Fritsch PE, Maniatis T (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
129. Chiquet-Ehrismann R (1995): Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia.* 51:853-862.
130. Asem EK, Stingley-Salazar SR, Robinson JP, Turek JJ (2000): Identification of some components of basal lamina of avian ovarian follicle. *Poult. Sci.* 79:589-601.
131. Giese A, Loo MA, Rief MD, Tran N, Berens ME (1995): Substrates for astrocytoma. Invasion. *Neurosurgery.* 37:294-301.
132. Hauptmann S, Zardi L, Siri A, Camemolla B, Borsi L, Castellucci M, Klosterhalfen B, Harhung P, Weis J, Stocker G (1995): Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Lab. Invest.* 73:172-182.
133. Riedl SE, Faissner A, Schlag P, Herbay A, Koretz K, Möller P (1992): Altered content and distribution of tenascin in colitis, colon adenoma, and colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 103:400-406.
134. Barra S, Barzan L, Maione A, et al (1994): Blood transfusion and other prognostic variables in the survival of patients with the cancer of the head and neck. *Laryngoscope.* 104:95-98.
135. Jallo G, Friedlander DR, Kelly PJ, Wisoff JH, Grumet M, Zagzag D (1997): Tenascin-C expression in the cyst wall and fluid of human brain tumors correlates with angiogenesis. *Neurosurgery.* 41:1052-1059.
136. Tokes AM, Hortovanyi E, Kulka J, Jackel M, Kerényi T, Kadar A (1999): Tenascin expression and angiogenesis in breast cancers. *Pathol. Res. Pract.* 195:821-828.
137. Ramadori G, Schwogler S, Veit T, Rieder H, Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Meyer-zum-Buschenfelde KH (1991): Tenascin gene expression in rat liver and in rat liver cells. *Virchows. Arch. B. Cell Pathol.* 60:145-153.
138. Webersinke G, Bauer H, Amberger A, Zach O, Bauer HC (1992): Comparison of gene expression of extracellular matrix molecules in brain microvascular endothelial cells and astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189:877-884.

139. Alimov A, Kost-Alimova M, Liu J, Li C, Bergerheim U, Imreh S, Klein G, Zabarovsky ER (2000): Combined LOH/CGH analysis proves the existence of interstitial 3p deletions in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 19:1392-1399.
140. Breen CJ, O'Meara A, McDermott M, Mullarkey M, Stallings RL (2000): Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 120:44-49.
141. El-Rifai W, Kamel D, Larramendy ML, Shoman S, Gad Y, Baithun S, El-Awady M, Eissa S, Khaled H, Soloneski S, Sheaff M, Knuutila S (2000): DNA copy number changes in Schistosoma-associated and non-Schistosoma-associated bladder cancer. *Am. J. Pathol.* 156:871-878.
142. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD (2000.): High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res.* 60:1949-1960.
143. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP (2001): Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A(*RASSF1A*), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res.* 61:3105-3109.
144. Gotte K, Hadaczek P, Coy JF, Wirtz HW, Riedel F, Neubauer J, Hormann K (2000): Fhit expression is absent or reduced in a subset of primary head and neck cancer. *Anticancer Res.* 20:1057-1060.
145. Fortin A, Guerry M, Guerry R, Talbot M, Parise O, Schwaab G, Bosq J, Bourhis J, Salvatori P, Janot F, Busson P (1997): Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence. *Clin. Cancer. Res.* 3:1609-1614.
146. Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, Grenman R, Carey TE (2000): Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 60:3397-3403.
147. Smith DR, Goh HS (1996): Overexpression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma is associated with a reduced mortality that is abrogated by point mutation of the p53 tumor suppressor gene. *Clin. Cancer Res.* 2:1049-1053.
148. Frederick MJ, Holton PR, Hudson M, Wang M, Clayman GL (1999): Expression of apoptosis-related genes in human head and neck squamous cell carcinomas undergoing p53-mediated programmed cell death. *Clin. Cancer Res.* 5:361-369.
149. Barr LF, Campbell SE, Diette GB, Gabrielson EW, Kim S, Shim H, Dang CV (2000): c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 60:143-149.

9. Közlemények jegyzéke

9.1. A tézisekhez felhasznált közlemények

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R (2000): Characteristic Distribution Patterns of Tenascin in Laryngeal and Hypopharyngeal Cancers. *The Laryngoscope*. 110:84-92.

IF:1,266

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R (1998): Fibrin Deposition in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx and Hypopharynx. *Thrombosis Haemostasis*. 80:767-772.

IF:3,726

Juhász A, Balázs M, Sziklay I, Répássy G, Ádány R: Characteristic Genetic Alterations and Their Prognostic Significance in Laryngeal and Hypopharyngeal Carcinomas Revealed by CGH. (*Közlésre elküldve*)

9.2. A témában megjelent egyéb közlemények:

Lukits J, Tímár J, **Juhász A**, Döme B, Paku S, Répássy G (2001): Progression difference between cancers of the larynx and hypopharynx is not due to tumor size and vascularization. *Otolaryngology, Head and Neck Surgery*. 125:18-22.

IF: 0,893

Répássy G, Forster-Horváth Cs, **Juhász A**, Ádány R, Tamássy A, Tímár J (1998): Expression of Invasion Markers CD44v6/v3, NM23 and MMP2 in Laryngeal and Hypopharyngeal Carcinoma. *Pathology Oncology Research*. 4:14-21.

Lukits J, Döme B, **Juhász A**, Paku S, Tímár J, Répássy G (2000): Gége- és hypopharyngealis rákok jellemzése – Tumorméret és vaszkularizáció. *Magyar Onkológia*. 44:239-245.

Répássy G, Hirschberg A, Jókay I, Tóth L, Rezek Ö, **Juhász A** (2000): Supracricoid horisontális laryngectomy. *Fül-, Orr-, Gégegyógyászat*. XLVI:91-98.

Répássy G, Hirschberg A, Rezek Ö, Kisely M, Tóth Á, **Juhász A** (2000): Supracricoid laterális gégereseccio a sinus piriformis rák kezelésére. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat. XLVI:155-162.

Répássy G, Tamás L, Forster-Horváth Cs, **Juhász A**, Tímár J (2001): A metasztatikus fenotípus jellemzése gége és hypopharynx tumorokban az NDP kináz A/NM-23H1/NME1 expresszió alapján. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat. XLVII:4-7.

9.3. Az értekezés témájához kapcsolódó absztraktok, előadások, poszterek jegyzéke:

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R (1997): Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. Thrombosis Haemostasis Suppl: 353. (abstract)

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R (1997): A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazivitású laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. Magyar Onkológia. 41:246. (absztrakt)

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R (1997): Fibrin depozíció laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. Magyar Onkológia. 41:246. (absztrakt)

Juhász A, Répássy G: A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazivitású laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének Szakcsoporthülése, Budapest, 1997. Április 9. (előadás)

Juhász A: A tenascin eloszlás sajátosságai gége és hypopharynx tumorok esetén. DOTE, PhD Konferencia 1997/1998., 1998. Március 30.-Április 03. (előadás)

Juhász A, Bárdos Helga, Répássy Gábor, Ádány Róza: A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazivitású gége és hypopharynx tumorokban. (Absztrakt:E131) A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének 35. Kongresszusa, Pécs, 1998. Június 17-20. (előadás)

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R: Fibrin deposition and tenascin expression in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx.

17th International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brasil, 1998. August 23-28. (előadás)

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R: Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. XVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Florence, Italy, 1997. June 6-12. (poszter)

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R: A tenascin eloszlás sajátosságai különböző invazivitású laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. A Magyar Onkológusok Társaságának XXII. nemzeti kongresszusa, Budapest, 1997. november 10-12. (poszter)

Bárdos H, **Juhász A**, Répássy G, Ádány R: Fibrin depozíció laryngeális és hypopharyngeális tumorokban. A Magyar Onkológusok Társaságának XXII. nemzeti kongresszusa, Budapest, 1998. November 10-12. (poszter)

Juhász A: Gége és garat tumorok genetikai sajátosságainak vizsgálata komparatív genomiális hybridizációval. A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének jubileumi, 36. Nemzeti kongresszusa, Hévíz, 2000. Október 24-28. (poszter)

10. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Ádány Róza professzornőnek, hogy témavezetőként lehetővé tette Ph.D. tanulmányaimat és kutatásaimat. Külön köszönöm a kísérletek megtervezéséhez, kivitelezéséhez és értékelésükhöz nyújtott segítségét.

Nagyon köszönöm Dr. Balázs Margit tanárnőnek a genetikai vizsgálatok kivitelezéséhez, értelmezéséhez nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Dr. Répássy Gábor professzor urat, akinek segítségével elsajátítottam a fül-, orr-, gégeészet alapismereteit, és figyelmemet az onkológiai kutatásokra irányította.

Köszönöm Dr. Sziklai István professzor úr segítségét, melyet a PhD tanulmányaim és kutatásaim folytatásához kaptam.

Köszönettel tartozom a Megelőző Orvostani Intézet és a Fül-, Orr-, Gégeészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika minden dolgozójának, akik segítségükkel hozzájárultak munkám elkészítéséhez.

Végezetül köszönetet mondok családomnak, akik megértő türelemmel támogattak kutatásaim végzésében.

**10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények
különlenyomatai és kézírata**

