

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés

**Szájüregi laphámrákok vizsgálata az észak-kelet
magyarországi régióban**

Etiológiai tényezők és prognosztikai faktorok

DR. NEMES JUDIT ÁGNES

Témavezető: Dr. Márton Ildikó egyetemi tanár

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Fogorvostudományi Kar

Debrecen

2006

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	
2.1. Epidemiológia	5
2.2. Rizikótényezők	
2.2.1. Dohányzás	6
2.2.2. Alkoholfogyasztás	7
2.2.3. Vírus- és gombafertőzések	9
2.2.4. Táplálkozás	9
2.2.5. Környezeti ártalmak	10
2.2.6. Fogazati tényezők	10
2.2.7. Immunrendszer	11
2.2.8. Genetikai háttér	11
2.3. Rákmegelőző állapotok	12
2.4. A daganatképződés többlépcsős folyamata	13
2.5. A szájüregi laphámrákok prognózisát meghatározó tényezők	
2.5.1. A prognózist befolyásoló hisztopatológiai tényezők	17
2.5.2. Molekuláris markerek prognosztikai jelentősége	20
2.6. A Humán Papillomavírusok	
2.6.1. Általános jellemzők	25
2.6.2. A HPV benignus és malignus folyamatokban	26
2.6.3. A HPV szerepe a laphámrákok patogenezisében	29
3. Célkitűzések	31
4. Anyag és módszer	
4.1. Betegek kiválasztása, klinikai adatok gyűjtése	32
4.2. A Humán Papillomavírus kimutatása	
4.2.1. DNS izolálás	32
4.2.2. PCR amplifikáció	33
4.2.3. A HPV 16 genom fizikai állapotának vizsgálata	33
4.3. Immunhisztokémia	34

4.4. Statisztikai analízis	34
5. Eredmények	
5.1. Az ajak- és szájüregi laphámrákos betegcsoport demográfiai jellemzői, a daganatok klinikopatológiai jellemzői, kezelés, recidíva, túlélés	35
5.1. Rizikótényezők előfordulása a betegcsoportban, hatásuk a túlélésre	36
5.2. A magas rizikójú humán papillomavírusok etiológiai szerepének vizsgálata szájüregi laphámrákokban	37
5.3. A p21 ^{WA1/CIP1} , p53, Ki-67 és cyclin D1 proteinek expressziójának vizsgálata ajak és szájüregi laphámrákok esetén	39
6. Megbeszélés	42
7. Az eredmények összefoglalása, új megállapítások	51
8. Az eredmények gyakorlati hasznosítása	52
9. Irodalomjegyzék	
9.1. A hivatkozott közlemények jegyzéke	53
9.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke	72
10. Táblázatok	73
11. Köszönetnyilvánítás	80
12. Függelék	81

1. Bevezetés

Hazánkban a rosszindulatú daganatos megbetegedések száma évek óta emelkedő tendenciát mutat, és a mortalitási mutatók is igen kedvezőtlenek. A magyarországi daganathalálozási sorrendben az ajak, szájüreg és garat (BNO-X: C00-C14) rosszindulatú daganatai mindkét nemre vonatkoztatva a hatodik helyet foglalják el [189]. Csak az ajak- és szájüregi (BNO-X. C00-C06) daganatokra vonatkoztatva a mortalitás férfiaknál 13,6, nők esetében 1,9/100000 lakos évente [23].

A szájüregi rákos megbetegedések előfordulási gyakorisága nagyobb férfiak esetén, hazánkban a férfi:nő arány 6:1 [23]. A daganat megjelenése általában az élet hatodik, hetedik dekádjára tehető, de több felmérés is utal rá, hogy egyre több a 45 éves kor előtt megjelenő szájüregei tumor [4, 224]. Az átlagos 5 éves túlélés 40% körüli [41], de ez az érték országonként és betegcsoportonként nagy szórást mutat [32, 74, 103]. A túlélést döntően befolyásolja a daganat helye és klinikai stádiuma a felismerés idején, valamint az alkalmazott terápia.

Szövettanilag az ajak- és szájüregi daganatok több mint 90%-a laphámrák [179], mely prekancerózus hám diszplázia talaján alakul ki. A daganatképződés többlépcsős folyamatának legfontosabb momentumai az onkogén aktiváció és a tumor-szupresszor gének elvesztése [64, 123, 162].

A szájüregi laphámrákok kialakulásának bizonyítottan legfontosabb etiológiai tényezői a dohányzás és az alkoholfogyasztás [105, 108]. A daganatos betegek egy csoportjánál azonban kizárható az abuzív szokások rákkeltő hatása. Ez a tény más faktorok (genetikai predispozíció, környezeti ártalmak, táplálkozás, onkogén vírusok) etiológiai szerepére irányítja a figyelmet [104, 107].

A szájüregi laphámrákok rossz kórjóslatú daganatok, különösen, ha előrehaladott stádiumban kerülnek felismerésre. Viszonylag kevés használható prognosztikai tényező áll rendelkezésünkre a betegség lefolyását, kimenetelét illetően. A prognosztikai faktorok minél pontosabb megismerésének jelentősége lehet a daganat agresszivitásának megítélése és az alkalmazandó terápia kiválasztásának szempontjából is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Epidemiológia

A szájüreg és garat rosszindulatú daganatai világszerte komoly problémát jelentenek. Az összesített statisztikák szerint 2000-ben a nyolcadik leggyakoribb daganat típus volt a világon az összes eset 4,7 százalékával [232], míg Európában 2004-ben az incidencia 3,4% volt [21]. Az előfordulási gyakoriság azonban a világ egyes tájain jelentősen eltér egymástól. Míg Japánban az összes malignus tumorok csupán 1-2%-át, addig Indiában közel 50%-át adják [192]. Az eltérő incidencia hátterében etnikai, kulturális és szocio-ökonómiai tényezők állhatnak. Az 1990-es évek elején a morbiditási mutatók Franciaország Bas-Rhin régiójában voltak a legrosszabbak, melyet Bangalore, India követett. Az első régió tradicionális, nagyhírű borvidék, ahol a daganatok kialakulásáért elsősorban az alkoholfogyasztás tehető felelőssé, míg Indiában az igen elterjedt bétel-rágás tekinthető elsődleges etiológiai tényezőnek. Magyarországon belül is megfigyelhetők területi különbségek mind a morbiditás, mind a mortalitás tekintetében. A hagyományosan bortermelő illetve pálinkafőző vidékeken igazolhatóan gyakoribbak az ajak- és szájüregei daganatok [190].

1999-ben mind a férfiak, mind a nők szájüregei rákos mortalitása tekintetében Magyarország az első volt Európában (13,6 illetve 1,9/100.000 lakos rendre) [23]. Még szomorúbb a helyzet, ha a halálozási mutatókat nem a teljes népességre vetítve vizsgáljuk, hanem kiemeljük a 35-64 éves, leginkább veszélyeztetett korosztályt. Ebben a korcsoportban mind a férfiak, mind a nők vezetnek az európai ranglistát, a férfiaknál 51,4, a nőknél 6,18 halálozás jut 100.000 lakosra [143]. Ha a trendeket vizsgáljuk, elmondható, hogy míg a fejlett nyugati országokban az 1990-es évek elejétől kezdve egyenletesen csökken a szájüregei daganatokból eredő halálozás, addig Kelet-Európában és a volt Szovjetunió utódállamaiban drasztikus emelkedést jeleznek a statisztikák. Hazánkban 1984 és 1994 között a halálozási arányszám növekedése férfiak esetén 83,5%, a nők körében 72,3% volt [143].

Általában elmondható, hogy a szájüregei rákos megbetegedések előfordulási gyakorisága nagyobb férfiak esetén. Az európai férfi:nő átlag 5:1, Magyarországon

6:1 [23]. A halálozási arányszám még kedvezőtlenebb a férfiakra nézve, az európai átlag 5,4:1, hazánkban 7,2:1. A daganat megjelenése általában az élet hatodik, hetedik dekádjára tehető, de több felmérés is utal rá, hogy egyre több a 45 éves kor előtt megjelenő szájüregei tumor [4, 224]. A megnövekedett alkoholfogyasztás és a dohányzás egyre korábbi életkorban való elkezdése részben magyarázhatja ezeket az eseteket.

2.2. Rizikótényezők

A szájüreg rosszindulatú daganatainak etiológiája összetett. Eset-kontroll vizsgálatok igazolták világszerte a dohányzás és az alkoholfogyasztás vezető oki szerepét [105, 108]. A rizikó dóziszfüggő, és a két élvezeti szer egymás káros hatását szinergista módon erősíti [31]. A laphámrákok több mint 75%-a a dohányzás és/vagy alkoholfogyasztás talaján alakul ki [144]. Azonban, a nem dohányzó és alkoholt nem fogyasztó populációban is előfordulnak rosszindulatú szájüregei daganatok, ami egyéb oki tényezők szerepére utal. A napsugárzás, elsősorban a káros UVB sugarak rákkeltő hatása bizonyított az ajakrákok etiológiájában [106, 223]. Jelentős számú vizsgálat utal bizonyos vírusok (HPV, HSV, EBV) és gombák (*Candida* spp.) etiológiai szerepére [138, 227]. Egyre több tanulmány foglalkozik a fogazat állapotával, mint rizikótényezővel. Nem zárható ki, hogy a letöredezett fogak, a rosszul illeszkedő pótlások és a fogkő krónikus irritáló hatása, illetve a krónikus fogágybetegség hozzájárul a szájüregei daganatok kialakulásához [255, 258]. A vitaminokban, nyomelemekben és rostban szegény táplálkozás szintén rizikótényezőnek tekinthető [178, 199]. A környezetszennyezés és bizonyos foglalkozási ártalmak (növényvédő szerek, benzingőz, vegyipari alapanyagok) kumulálódva ugyancsak rákkeltő hatásúak [158, 182]. Mindezek mellett, bizonyos belgyógyászati betegségek (diabetes, gastroesophagealis reflux) esetén is nagyobb a szájüregei rákok kockázata [165, 265].

2.2.1. Dohányzás

A dohánytermékek élvezete erős összefüggést mutat a szájüregei laphámrákok kialakulásával. A rizikó fokozódik a naponta elfogyasztott cigaretták és az átdohányzott évek számával [3]. A pipázók és szivarozók kockázata nem különbözik

jelentősen a cigarettázókétól. A dohány nem Európában szokásos módokon történő élvezete, tehát önmagában rágya avagy bétellel és/vagy aréka-dióval kombinálva szintén fokozza a szájüregi rákok kockázatát [107]. A leszokott dohányosok daganatkockázata lényegesen csak 10 év után kezd el csökkenni [16, 70], és a rizikó a korábban elfüstölt dohányárak mennyiségétől függ [3]. Több eset-kontroll vizsgálat eredményét összesítve elmondhatjuk, hogy a rendszeres, mérsékelt dohányzás (<20 szál/nap) megháromszorozza, míg az erős dohányzás (≥20 szál/nap) nyolcszorosára növeli a szájüregi rákok kockázatát [31, 172].

A dohányban több mint 300 karcinogén anyagot sikerült azonosítani. A legfontosabbak a dohány-specifikus nitrózaminok, a policiklikus aromás szénhidrogének és a szabadgyök felszabaduláshoz vezető anyagok [98, 274]. Ahhoz, hogy az aromás szénhidrogének kifejthessék karcinogén hatásukat, reaktív elektrofil intermediereké kell alakulniuk. A benzaminopirénből (BaP) képződött BaP-diol-epoxid (BPDE) a leginkább rákkeltő intermedier létrejöttét tekintve a citokróm p450 (CYP) enzim rendszertől függ. A BPDE preferált adduktja a DNS molekulák guanin nukleotidjainak [163]. A DNS replikáció során az aberráns DNS repair típusosan guanin→timin transzverzióhoz vezet. Ilyen mutációk jellemzik a tüdő daganatok és egyes fej-nyaki tumorok neoplasztikus sejtjeinek p53 génjeit [101]. A BaP továbbá szabad oxigén gyökök felszabadulását valamint a DNS spirál törését és deléciót okozhat.

Más dohány eredetű karcinogének különböző DNS adduktokat eredményezhetnek, így különböző mutációkat hozhatnak létre. Bizonyos dohány-specifikus nitrózaminok guanin→adenin tranzíciót indukálhatnak a DNS-bázis metilálása révén [70] és ez gyakorta észlelhető szájüregi daganatoknál [90].

Szabadgyökös károsodást nem csupán a dohányzás okozhat, de egyéb metabolikus folyamatok is, például az öregedés fiziológias folyamata [24, 90].

2.2.2. Alkohol fogyasztás

Bár a tiszta etil-alkoholt sem in vitro, sem in vivo kísérletekben nem találták rákkeltő hatásúnak [105], más mechanizmusok révén (a szájnyálkahártya permeabilitásának fokozása, lebomlás során karcinogén metabolitok képződése, a dohányzás hatásának potencírozása) bizonyítottan részt vesz a szájüregi daganatok

patogenezisében [285]. Számos eset-kontroll vizsgálat bizonyítja, hogy az alkoholos italok fogyasztása fokozza a daganatok kialakulásának rizikóját [1, 31, 172]. Az ivásról való leszokás után már 3 évvel szignifikánsan csökken a kockázat, de csak 14 év absztinencia után egyezik meg a daganat kialakulásának rizikója a soha nem ivókéval [31]. Az elfogyasztott italok mennyiségével és töménységével arányosan nő a szájüregi rákok kockázata. A „társasági ivók” esetében a daganat kialakulásának kockázata az absztinensekhez képest nagyjából kétszeres [31, 172]. Rendszeres alkoholfogyasztók, nagyivók esetén a napi alkoholbevitel meghaladja az 50 grammot tiszta alkoholra számítva. Náluk a rizikó tízszeres a nem-ivókhoz viszonyítva [31]. Minden alkoholos ital rákkeltő hatását bizonyították, de több mérés szerint is a tömény szeszek a legveszélyesebbek [1, 31, 120, 146]. Ha összesítve vizsgáljuk a dohányzás és az alkoholfogyasztás hatását, elmondhatjuk, hogy egymás hatását szinergista módon fokozzák [70]. Napi 10-20 gramm alkohol és 10 szál cigaretta elfogyasztása, ami hazánkban nem számít megbotránkoztató mértéktelenségnek, a szájüregi rákok kockázatát majdnem ötszörösére növeli. Amennyiben a napi alkoholbevitel 50 grammnál több és a hozzátartozó dohányzás is 20 szál fölötti, akkor a rizikó több mint ötvenszeres a nem ivók/dohányzókhoz viszonyítva [31].

A túlzott alkoholfogyasztás gyakorta társul hiányos táplálkozással. Az alkohol magas kalóriatartalmánál fogva csökkenti az étvágyat, így az elégtelen táplálékbevitelből kifolyólag krónikus vitamin- és ásványianyag hiány alakulhat ki. Több vizsgálat is igazolta ezen tápanyagok daganat megelőző hatását [178, 199].

Az etanol képes stimulálni a sejtek proliferációját továbbá citotoxikus és mutagén is lehet amennyiben metabolizmusa során szuperoxid képződik [152]. Az alkoholos italokban az etil-alkohol mellett jelenlevő egyéb anyagok (pl. nitrózaminok) is daganatindukáló hatásúak lehetnek. Az etanol módosítja a májsejtekben zajló metabolizmust, amivel bizonyos karcinogéneket aktivál [152]. Az alkohol indukálja az egyes prokarcinogének aktiválásának fokozásáért felelős CYP2E1-et amellet, hogy gátolja a DNS repair-t [102, 228]. Az etanol az előbbieken túl képes változásokat indukálni a genom metiláltságában. Hipometiláció révén aktiválhatja, hipermetilációval pedig gátolhatja a génexpressziót [133, 228].

2.2.3. Vírus- és gombafertőzések

Egyes vírusok és gombák összefüggésbe hozhatók az orális laphámrákok kialakulásával [138, 227]. A fej-nyak régióban legbiztosabban tonsilla tumorok esetén bizonyított a humán papillomavírusok daganat-indukáló hatása [150, 249]. A publikált adatok szerint az oropharyngeális laphámrákok 20-90%-ában kimutatható magas rizikójú HPV. Az Epstein-Barr vírus szerepe az onkogenezisben nem orális tumorok esetén már bizonyított, de szájüregi laphámrákok esetén még vitatott [44].

A *Candida albicans* gyakorta detektálható rákmegelőző állapotokban és daganatok esetén, továbbá ismeretes, hogy nitrózaminokat termel, ami igazoltan rákkeltő hatású [138].

Továbbra is vitatott, hogy ezen mikroorganizmusok szerepe primer, tehát az elváltozás oki tényezői, avagy szekunder, opportunista fertőzések csupán.

2.2.4. Táplálkozás

Számos epidemiológiai adat utal arra, hogy a táplálkozás, különösen egyes tápanyagok hiánya összefüggésbe hozható az orális laphámrákok kialakulásával [67, 144]. Friss gyümölcsök, különösen a citrus-félék fogyasztása védő hatású és csökkenti a szájüregi daganatok kialakulásának kockázatát [148, 260]. Az úgynevezett „mediterrán diéta” hatását több tanulmány is vizsgálta és az eredmények szerint a paradicsomos ételek (likopin), az olíva olaj (telítetlen zsírsavak) és a sok friss zöldség (C-vitamin, vas, magnézium) hatékonyan csökkenti a daganatképződés kockázatát [19, 48, 199]. A karotinoidok, az E-vitamin és a folsav protektív hatása is bizonyítottnak tűnik [196].

Több vizsgálat eredménye is alátámasztja a vörös húsok, a húskészítmények és a tojás rizikó-fokozó szerepét [260, 283]. A telített zsírsavak hatása a karcinogenezisre több mechanizmus révén is érvényre juthat: a sejtmembrán lipid komponenseinek alterációja révén megváltozik annak integritása, emelkedik a lipid-peroxidáz szint, megváltoznak a hormonszintek (különösen az ösztrogén) és a tápanyagok metabolizmusa is zavart szenved [283].

Az egyes nem alkoholos italok hatását vizsgálva úgy látszik, hogy a tea és a koffeinmentes kávé nincs hatással a karcinogenezisre, a feketekávé csökkenti [254], a mate-tea növeli a szájüregi rákok kialakulásának kockázatát [83].

Az általános tápláltsági szint is hatással van a szervezet védekező rendszerére. A testtömeg index csökkenésével fokozódik a szájüregi daganatképződés kockázata [137].

2.2.5. Környezeti ártalmak

Epidemiológiai vizsgálatok bizonyítják az egyes ipari ágazatokban és bizonyos munkakörülmények között dolgozók emelkedett daganatkockázatát. Veszélyeztetettek a faipar, a vegyipar, az építőipar, a gépipar és az építőipar bizonyos munkaköreiben dolgozók. Legveszélyesebbek a fa- és fémforgácsolás során keletkező porok, a szerves kemikáliák, a cementpor, a festékek és lakkok, a formaldehid és tüzelőanyagok égéstermékei [158, 166, 204, 259].

Az ajakrákok etiológiájában több tanulmány is igazolta a vidéki életforma, amely az esetek túlnyomó többségében szabad ég alatt végzett mezőgazdasági munkát is jelent, rizikót fokozó szerepét [53, 209]. A napsugárzás, elsősorban a káros UVB sugarak rákkeltő hatása bizonyított az ajakrákok etiológiájában [106, 223]. Egyes növényvédő szerek hatása is fokozhatja a napsugárzás daganatindukáló hatását [182].

2.2.6. Fogazati tényezők

Régi klinikai tapasztalat, hogy a rossz szájhygiéna és az elhanyagolt, hiányos fogazat valamint a szájüregi daganatok között létezik összefüggés. Állandó irritáció hatására létrejött és tartósan fennálló fekélyképződés is vezethet malignus elfajuláshoz [258]. A műfogsorviselés önmagában nem rizikótényező [153], de mint azt eset-kontroll vizsgálatok is igazolják, más rizikófaktorok jelenlétében növelik a szájüregi daganatok kialakulásának kockázatát [156]. A legtöbb epidemiológiai tanulmány igazolja a feltételezést, hogy a rossz szájhygiéna és annak indikátorai (hiányzó fogak száma, fogápolás és fogászati ellenőrzés gyakorisága) önálló, bár nem túl erős, rizikótényezőnek tekinthetők [153, 156, 172]. Bár a fogazat állapota önmagában csupán gyenge rizikófaktor, az alkoholfogyasztással kombinálva megsokszorozzák egymás hatását. Bizonyított, hogy a rossz fogazati státusz esetén, melyhez megváltozott orális mikroflóra társul, fokozott acetaldehid képződés várható a nyálban az etil-alkohol lebomlása során [99, 100]. A fokozott acetaldehid

produkcióért leginkább felelőssé tehető baktériumok a *Streptococcus salivarius*, az α -hemolizáló *Streptococcus*ok, a *Corynebacterium* és a *Stomatococcus* specieszek [99]. Az acetaldehid erősen toxikus vegyület, melynek mutagén és karcinogén hatását állatkísérletekben igazolták [54, 284]. A nyál acetaldehid koncentrációjának szignifikáns emelkedése napi 40 gramm fölötti alkoholfogyasztás esetén várható. Ha a komoly alkoholfogyasztáshoz rossz fogazati státusz is társul, kétszer annyi karcinogén acetaldehid mérhető a nyálban mintha egy jó fogazatú alkoholistát ivott volna ugyanannyit [100].

2.2.7. Immunrendszer

Figyelemre méltó mennyiségű adat utal az immunrendszer szerepére a malignus tumorsejtek és azok prekursorainak eliminálásában. Az alábbi evidenciák támasztják ezt alá: (1) immunszuppresszált betegek esetén magasabb a rosszindulatú daganatok, különösen a vírus eredetű malignómák (pl. a HPV eredetű cervix rákok és az EBV eredetű limfómák) előfordulási gyakorisága, mint az egészséges immunrendszerű populációban [210, 225], (2) bizonyos daganattípusok (pl. melanómák) esetén tumorspecifikus antigéneket és tumorsejt specifikus citotoxikus T limfocitákat sikerült izolálni, (3) a rákmegelőző állapotok jelentős része képes spontán regresszióra, (4) súlyosan immunszuprimált betegek malignus folyamatainak regresszióját észlelték az immunrendszer helyreállítása után (a poszttranszplantációs limfómák spontán regresszióját írták le az immunszuppresszánsok elhagyása után) [219].

2.2.8. Genetikai hátér

Bizonyos gének csírasejteken bekövetkező mutációja növeli egyes daganatfélék kialakulásának kockázatát az érintett családokon belül [127, 149]. Növekszik azon tumor típusok száma melyek háttérében kimutatták a génmutációt. Jó példa erre a retinoblasztóma (Rb) és a p16 gének károsodása, melyek hereditár retinoblasztómát illetve familiáris melanómát okoznak. Relatívén kevés a szájüregi laphámrákok családi halmozódásáról szóló tanulmány, ráadásul az adatok interpretálása nehézkes az adatok limitált mennyisége és a tisztázatlan változók miatt [15, 42, 253]. Mindazonáltal, epidemiológiai adatok azt jelzik, hogy nem minden

egyén egyformán fogékony a dohányzással összefüggő rákok kialakulására. Csupán a dohányosok töredék százalékánál alakul ki daganat. Az egyéni fogékonyság egy fontos tényezője a genetikai polimorfizmus, ami elősegíti a karcinogének metabolizmusát a leginkább genotoxikus állapotukba [110]. Ezek közül a polimorfizmusok közül leginkább a citokróm p450 (CYP) enzimcsalád keltette fel a kutatók érdeklődését. Ebbe a családba 65 különböző gén tartozik, de csak néhányat vizsgáltak behatóbban [177]. A glutation-S-transzferáz (GST) enzimrendszer a gazdaszervezetet védi, megköti a dohány-metabolitokat, növeli vízdékonyságukat és elősegíti kiválasztódásukat. Számos vizsgálat utal rá, hogy bizonyos, mindkét enzimrendszert érintő polimorfizmusok igen veszélyesek lehetnek [125]. Például az együtt megjelenő GSTM1 null allélek és CYP1A1 polimorfizmusok fokozott tüdőrák kockázatot jelentenek [11, 217].

A DNS repair kapacitás egy másik daganatkockázati tényező. Igazolt DNS repair-deficienciák a Bloom szindróma, a Fanconi anémia, a xeroderma pigmentosum és az ataxia-teleangiectasia. Annak ellenére, hogy ezekben a betegségekben a betegek élettartama rövidebb, gyakoribbak náluk a rosszindulatú daganatok, ideértve a fej-nyak régiót is [93, 157]. A malignus folyamatok kialakulása fiatalabb életkorra tehető és minden egyéb etiológiai faktor kizárható.

2.3. Rákmegelőző állapotok

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) definíciója szerint a premalignus lézió „morfológiailag módosult szövet, ahol a daganat kialakulása valószínűbb, mint a környező egészséges területeken” [282]. A nyálkahártya malignus folyamatai hámdiszplázia talaján alakulnak ki. A diszpláziát a hám különböző abnormális elváltozásai jellemzik, megnövekedett mag/citoplazma arány, mitózis ráta emelkedése, celluláris polimorfizmus. A szájüregben két állapot tekinthető legbiztosabban prekancerózissnak, ezek a leukoplákia és az eritroplákia. Epidemiológiai adatok igazolják, hogy ezeknek az elváltozásoknak egy része néhány hónap vagy év alatt laphámrákká alakulhat. A leukoplákia klinikai definíció szerint makroszkóposan fehér, letörölhetetlen keratotikus plakk a nyálkahártyán. Szövettani értelemben a valódi leukoplákiát hámdiszplázia jellemzi a hiperkeratózis, parakeratózis és akantózis mellett. Egyes megfigyelések szerint a valódi leukoplákiák

30%-a rosszindulatú daganattá alakul. Eritroplákiának a nyálkahártya vörös, bársonyos felületű más diagnosztikai csoportba nem sorolható elváltozásait nevezzük. Bár jóval ritkábbak mint a fehér léziók, malignus elfajulásuk gyakoribb.

A mai napig nincs konszenzus arról, hogy az immunológiai eredetű lichen planus rákmegelőző állapot-e vagy nem. Több tanulmány közöl azonban olyan szájüregi karcinómás eseteket, ahol korábban lichen planust diagnosztizáltak [10, 234].

Az alábbi elváltozásoknál felmerül a malignizálódás fokozott kockázata, bár a kockázat jóval kisebb mint a fent említett esetekben: szájüregi lupus erythematosus, leukokeratosis nicotinic palati, cornu cutaneum, keratoacanthoma, cheilitis actinica chronica, szubmukózus fibrózis, diszplasztikus festékes anyajegyek és krónikus fekélyek.

2.4. A daganatképződés többlépcsős folyamata

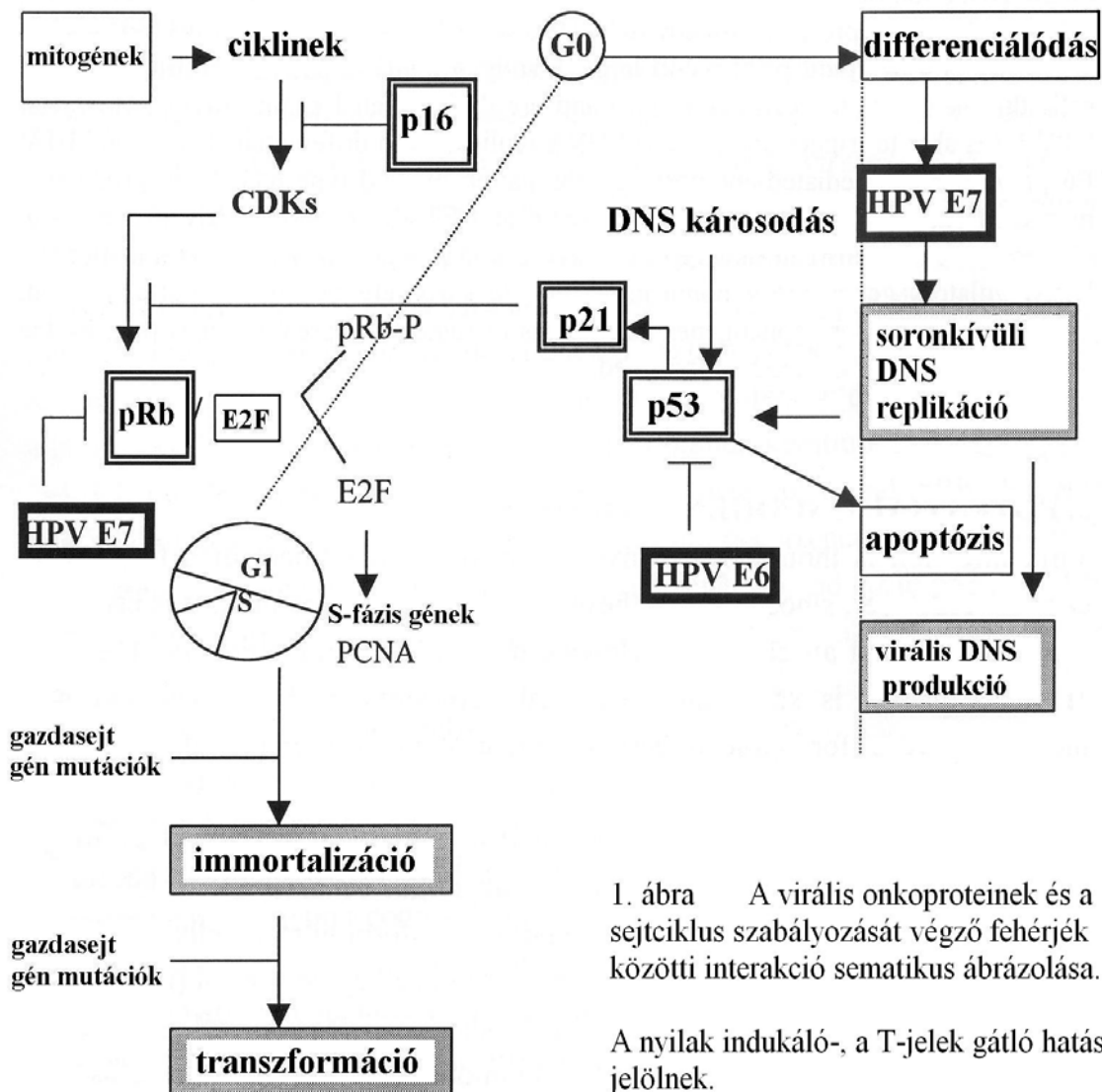
A humán karcinogenezis olyan többlépcsős folyamat, melynek során a genetikai elváltozások halmozódva vezetnek a klinikailag evidens betegséghez. Epidemiológiai adatok arra utalnak, hogy a rák elsősorban az időskorúak betegsége, amit alátámaszt a daganatképződés modellje is. Mindazonáltal, bizonyos daganatok esetén két incidenciacsúcsot észlelhetünk, egyet egy relatíve fiatalabb életkorban. Ennek magyarázata a tumor szuppresszor gének örökletes mutációja miatti megnövekedett egyéni fogékonyság. Ilyen esetekben a többlépcsős karcinogenezis egyik lépése már a születéskor jelen van. Epidemiológiai adatok jelzik, hogy a leggyakoribb humán tumorok öt-hét genetikai változás után lépnek fel [215]. Ezeknek a változásoknak csak egy része azonosított, de jelen tudásunk szerint az egyes sejttípusokban mindig más és más génproduktumok funkciója szenved zavart. Azonban, bizonyos kulcs-molekulák melyek a proliferációs öregedésben érintettek (pl. a sejtciklus G1 fázisban való leállításhoz vezető p53 és pRb útvonalon érintett molekulák) funkcionális „knock out”-ja gyakran felismerhető többféle, különböző sejttípusból eredő daganat esetén [287]. A p53 gén mutációi és a pRb útvonal leállítása homozigóta deléción vagy a p16 gén transzkripcionális inaktiválása révén gyakorta észlelt a fej-nyak régió laphámrákjainál [90, 212, 221].

In vitro vizsgálatok kimutatták, hogy az emberi sejtek többségének limitált a proliferációs kapacitása. Azonban, bizonyos körülmények között néhány sejt „halhatatlanná” válhat, miáltal a proliferációs kapacitás normális korlátai csaknem teljesen eltűnnek. Eddig két fő élettartam-barriert azonosítottak, melyek megvédik a normál sejteket az immortalizálódástól. A halhatatlanná válás során ezt a két korlátot kell átlépni. Az első barrier (M1 nyugvó stádium) átlépéséhez a sejtek inaktiválják, típusuktól függően, egyik vagy mindkét tumor szuppresszor génjüket (pRB, p53) [229, 287]. Bár ezeknek a sejteknek megnő az élettartamuk, nem válnak halhatatlanná és a többségük el fogja érni a második barriert (M2 krízis). Csupán azok a sejtek menekülnek meg a krízistől és lesznek halhatatlanok melyek genetikailag is módosulnak. Az esetek többségében a halhatatlan sejtekben (re)aktiválódik a telomeráz aktivitás [286]. A telomerek a kromoszómák végei, melyek a hátramaradó DNS szál terminális replikációs problémája miatt minden replikációs lépésnél egyre rövidebbek lesznek. A telomeráz olyan enzim, ami képes ellensúlyozni ezt a jelenséget azáltal, hogy megnyújtja a kromoszómák terminális szekvenciáit. A normál sejtek csupán kis hányada mutat telomeráz aktivitást: az ivarsejtek és az őssejtek. Feltételezik, hogy a kritikusan rövid telomerek vezetnek a sejtek előregedéséhez. A humán szomatikus sejtek többsége nem mutat telomeráz aktivitást, és egy bizonyos számú oszlás után a sejt előregszik a kritikusan lerövidült telomerek miatt. Szemben a normál szomatikus sejtekkel, a daganatsejtek gyakorta mutatnak telomeráz aktivitást [193]. Humán tumorokban - a fej-nyak régióban is – észlelték mind a 3q régióon belüli amplifikációt (itt a telomeráz RNS komponensét kódoló gének helyezkednek el), mind a 3p régióban a heterozigótaság elvesztését (itt feltehetően az enzim inhibitorai helyezkednek el) [95, 240, 242].

In vitro vizsgálatok kimutatták, hogy a tumor sejtvonalak nem mindegyike halhatatlan, némelyek egy bizonyos tenyésztési periódus után előregedtek. Az a tény, hogy a telomeráz pozitív sejtek aránya magasabb a metasztatikus és rekurrens tumorokban, mint a primer daganatokban és a prekancerózus állapotokban arra utal, hogy a telomeráz re(aktiválódása) a karcinogenezis egy viszonylag késői eseménye [57].

Bár nem evidens a kettős életkori csúcs az orális laphámrákok megjelenésében, mint ahogy az örökölten fogékony gének esetén észlelték, de

világszerte megnövekedett incidenciát és mortalitást tapasztalhatunk már egy relatíve fiatalabb életkori csoportnál is [4, 224]. Ezt az előfordulási szaporulatot nehéz lenne egészében a fogékony gének rovására írni. A káros szenvedélyek (dohányzás, alkoholfogyasztás) magas prevalenciája a fiatalok körében magyarázhatja az esetek egy részét. Alternatív mechanizmus, a releváns gének „knock out”-ja magyarázhatja a fennmaradó eseteket. Bizonyos onkogén vírusok képesek hatástalanítani a kulcsfontosságú géntermékeket, általában a szuppresszor fehérjéket [26, 229]. Bizonyos populációkban az onkogén vírusok emelkedett prevalenciája magyarázhatja a szájüregi karcinómák korai megjelenését, különösen, ha egyéb rizikótényezők is jelen vannak.



1. ábra A virális onkoproteinek és a sejtciklus szabályozását végző fehérjék közötti interakció sematikus ábrázolása.

A nyilak indukáló-, a T-jelek gátló hatást jelölnek.

A gazdasejt fehérjéi, amik bizonyos tumor szuppresszor gének termékei (pl. pRb, p16, p21, p53) kulcsszerepet játszanak a sejtproliferáció, a differenciálódás és az apoptózis szabályozásában valamint a genom stabilitásában [77, 151]. A pRb a sejtciklus progresszióját szabályozza azon képességénél fogva, hogy amikor alulfoszforylált megköti az E2F-et, amivel meggátolja a DNS replikációját. Az E2F egy transzkripciós faktor-család, az S-fázis gének expresszióját indukálják. A pRb foszforyláltságát a ciklin: ciklin-dependens kináz (CDK) komplexek szabályozzák [231]. A hiperfoszforylált pRb nem tudja az E2F-et megkötni és a sejtciklus eljut az S-fázisba. A p53 a DNS károsodását követően aktiválódik és több gén expresszióját is indukálja, többek között a p21-et. A p21 egy univerzális CDK inhibitor, mely megakadályozza a pRb foszforylálódását, így a sejtciklust leállítja a G1-fázisban [58, 92, 294]. Ezzel feltehetőleg lehetővé teszi a DNS repair-t mielőtt a sejt újra az S-fázisba érne.

Kis méretű DNS vírusok egy vagy két fehérjét kódolnak melyek ugyanazokat a gazda tumor szuppresszor fehérjéket aktiválják. Az adenovírus E1B és a HPV E6 a p53-ra hat, míg az adenovírus E1A és a HPV E7 a pRb-hez kötődik. Normális esetben, azon sejtek többsége, melyek elhagyják a sejtciklust (G0) differenciáltak és nem képesek osztódni. Azonban, a HPV E7 képes triggerelni a soron kívüli replikációt differenciált sejtekben is, a HPV E6 pedig a vad típusú p53 gátlása révén kiküszöböli a p53-mediált apoptózist. A vírus ezután termeli onkoproteinjeit (E6, E7). Ha a virális onkoproteinek nem megfelelően fejeződnek ki az őssejtekben, akkor ezek a sejtek számtalan cikluson mehetnek át, melyek végeredménye a gazda regulátor génjeinek mutációja és a genom instabilitása lehet [302]. In vitro vizsgálatok alapján, ilyenkor a sejtek halhatatlanok lesznek és a protoonkogének aktivációja és/vagy további tumor szuppresszor gének kiesése révén transzformálódnak.

2.5. A szájüregi laphámrákok prognózisát meghatározó tényezők

Az ajak és a szájüreg rosszindulatú daganatainak prognózisa igen kedvezőtlen, annak ellenére, hogy a mind a diagnosztikai mind a terápiás lehetőségek komoly fejlődésen mentek át az elmúlt évtizedekben. A beteg kilátásait leginkább a daganat klinikopatológiai tulajdonságai befolyásolják. Az ezek alapján meghatározott klinikai stádium előrehaladtával fokozatosan csökkennek a beteg túlélési esélyei. Annak ellenére, hogy az esetek többségében a klasszikus, klinikopatológiai paraméterek viszonylag biztos alapot adnak a prognózishoz, egyes esetekben mégsem megbízhatóak. Közismert, hogy teljesen azonos klinikai paraméterekkel rendelkező, azonos szöveti differenciáltságú tumorok másként viselkedhetnek, eltérően reagálhatnak ugyanarra a kezelésre. A daganatképződés mechanizmusának egyre részletesebb megismerése bizonyos molekuláris markerek vizsgálatában rejlő prognosztikai lehetőségekre irányítja a figyelmet.

2.5.1. A prognózist befolyásoló hisztopatológiai tényezők

A daganat helye

Régi klinikai megfigyelés az, hogy minél hátrébb, mélyebben helyezkedik el a daganat a szájüregben, annál rosszabbak a túlélési esélyek [46, 112]. Ezt az összefüggést több tényező magyarázhatja. Egyrészt a daganat metasztatizáló képessége (a nyelv és retromoláris régió daganatainak közel 60%-a, míg az alveoláris gingiva tumorainak kevesebb mint 7%-a ad regionális nyirokcsomó áttétet [278], másrészt a daganat stádiuma a felismerés idején. Kisebb mértékben meghatározó a szöveti differenciáltság, az invazív tumor front, a perineurális terjedés és a műtéti elérhetőség. A daganat helye és a prognózis közötti összefüggést egyesek szignifikánsnak találták [30], mások nem [50].

A tumor mérete

A primér tumor mérete meghatározza mind a kezelés módját, mind annak kimenetelét. A sebészi reszekció során tumormentes műtéti szélek elérése a cél és ennek kivitelezhetőségét nagyban befolyásolja a daganat kiterjedése. A radioterápia

során alkalmazandó sugárdózist is a daganat mérete alapján állítják be [13]. A tumor mérete szignifikáns összefüggést mutat a lokális recidíva, a regionális nyirokcsomó metasztázis előfordulásával és a prognózissal [43, 205]. Egyre inkább elfogadott, hogy nem csupán a daganat lapszerinti kiterjedése, átmérője fontos tényező, hanem a mélysége, vastagsága is [86, 183, 198, 206]. Több vizsgálat is célozta, az úgynevezett „kritikus vastagság” megállapítását, és arra az álláspontra jutottak, hogy ez a daganat helyének függvényében 1,5 és 6 mm között változik [171, 266]. A kritikus érték fölötti daganatok szignifikánsan többször adnak nyirokcsomó áttétet és a prognózisuk is rosszabb [183].

Szöveti differenciáltság

A daganatok differenciáltság szerinti beosztása (grading) a keratinizáció, a celluláris és nukleáris pleomorfizmus és a mitotikus aktivitás szubjektív értékelése alapján történik. Ezek alapján a WHO [281] három kategória megkülönböztetését javasolja: jól (grade I), közepesen (grade II) és rosszul differenciált (grade III) tumorok. Számos vizsgálat önálló és erős prognosztikai faktornak tartja a szöveti differenciáltságot [72, 121, 145, 245], de egyre több olyan jelentés érkezik, ahol nem találtak szignifikáns összefüggést a prognózis és a szöveti grádus között [118, 183, 206, 246]. Ennek legfőbb oka az lehet, hogy a kategóriák nem elég diszkriminatívak és az orális laphámrákok túlnyomó többsége szövettanilag a közepesen differenciált csoportba tartozik.

Limfovaszkuláris terjedés

A limfovaszkuláris terjedés jelenléte és mértéke értékes adat a tumor metasztatizáló képességének értékelésében. Woolgar és mtsai vizsgálatai szerint a limfovaszkuláris invázió szignifikáns összefüggést mutat a daganat helyével, méretével, a nyirokcsomó metasztázissal, a recidívával és a túléléssel [278, 279].

Perineurális terjedés

Több, különböző szerző is kimutatta, ahogy a perineurális terjedés összefüggést mutat a tumor helyével, méretével, a nyirokcsomó áttétekkel és a

túléléssel [63, 279]. Egyes vizsgálatok szerint az összefüggés a recidívával és a távoli metasztázisokkal is kimutatható [211].

Csont- illetve bőr érintettség

A TNM osztályozás szerint a maxilla és a mandibula érintettsége (kortikális penetráció) esetén a daganat T4 kategóriába és IVA stádiumba tartozik, melyhez igen rossz prognózis társul. A csontérintettség meghatározza a terápia típusát és radikalitását, de nem biztos, hogy alátámasztja a IVA stádiumba való besorolást [6, 117]. Az alveoláris gingiva tumorai esetén a leggyakoribb a csontérintettség, de a nyirokcsomó áttét rizikója viszonylag alacsony, így ezeknek a T4N0 tumoroknak jobb a prognózisa, mint az egyéb IVA stádiumú daganatoknak [278, 280].

A tumor bőrbe terjedése, akár direkt, akár limfogén úton igen rossz prognózisra utal [40].

Regionális nyirokcsomó státusz

Szájüregi laphámrákok esetén számos tanulmány igazolja, hogy a nyirokcsomó státusz független és erős prognosztikai tényező [7, 238]. A nyirokcsomók vizsgálata során rögzítendő a metasztázis megléte avagy hiánya, a pozitív nyirokcsomók száma és oldalisága, a metasztatikus konglomerátum mérete és a nyirokcsomók tokjának állapota azaz az úgynevezett „extrakapszuláris” terjedés. Több munkacsoport véleménye szerint az extrakapszuláris terjedés az egyik legfontosabb prognosztikai faktor a szövettani paraméterek közül [89, 176]. A távoli áttétek megjelenése és az extrakapszuláris terjedés közötti összefüggés szignifikáns [176, 200].

Távoli metasztázisok

Egyes mérések szerint a szájüregi laphámrákok 5-25%-a ad távoli áttétet [29]. A távoli metasztázisok leggyakrabban a tüdőt, a mediasztinális nyirokcsomókat, a májat és a csontokat érintik [134, 298]. Az áttét diagnosztizálásától számítva, a betegek kevesebb mint 10%-a dicsekedhet 2 éves túléléssel, az átlagos csupán 6 hónap [29].

Lokális és regionális recidíva

Igazi recidíva esetén, a terápia után daganatsejtek maradnak a primer daganat helyén, és ezekből fejlődik ki az elváltozás. Ez megkülönböztetendő az új (metachron) primer daganattól. Az igazi recidíva általában hamarabb alakul ki, mint a metachron elváltozás és prognózisa is igen rossz [278].

A nyaki relapszus a szájüregi laphámrákokból eredő elhalálozás leggyakoribb oka [185, 235, 278]. Az okkult metasztázis növekedhet az eredeti oldalon, de jelentkezhet a nyak ellenkező oldalán is. Egyes jelentések szerint a nyaki műtéten átesett tumoros betegek 15-50%-ánál jelentkezik rekurrens betegség. Ezeknek a rekurrens nyaki metasztázisoknak a gyógyhajlama igen rossz, átlagos túlélésük csupán néhány hónap [176, 235].

2.5.2. Molekuláris markerek prognosztikai jelentősége

A tumor növekedésére, sejtproliferációra utaló markerek

EGF-R (c-erb 1-4, Her-2/neu): Az EGF-R (epithelial growth factor receptor) transzmembrán receptor, ami képes megkötni az EGF, TGF α és egyéb szabályozó fehérjéket. Intracelluláris szignál aktiváló szerepe van a target fehérjék tirozin foszforilálása révén. Az EGF-R expresszió korrelációt mutat a tumor stádiumával és a prognózissal [97, 244, 288].

Ciklinek: A négy különböző ciklin (A, B, D, E) a sejtciklus szabályozásában játszik fontos szerepet. Heterodimer komplexet alkotnak a ciklin-dependens kinázokkal (CDK) melyek a ciklineket foszforilálással aktiválják, defoszforilálással deaktiválják. A ciklinek aktivációja serkenti a sejtciklust és fokozza a replikációt. A CDK-ok szabályozása szintén foszforilációval történik, melyet a CDK inhibitorok végeznek. Több vizsgálat is szignifikáns összefüggést talált a fokozott ciklin D1 expresszió és a rossz prognózis között [49, 154], míg mások ezt nem tudták alátámasztani [236].

PCNA: A PCNA (proliferating cell nuclear antigen) egy „non-hisztin” nukleáris fehérje, mely a késői G1 illetve S fázisban jelenik meg és a proliferáló sejteket jellemzi. Prognosztikus szerepe vitatható [201].

Ki-67 (MIB1): A Ki-67 olyan monoklonális antitest, mely egy a G1, S és G2 fázisokban expresszálandó proteinhez kötődik. Osztódó szövetekben expressziója emelkedett. Fokozott expressziója egyes szerzők szerint utal a prognózisra [82, 293], mások ezt nem igazolták [14, 202, 243].

AgNOR: A nukleólusz organizáló régiói (NOR) olyan DNS hurkok, melyek a riboszómális RNS transzkripcióját végzik. Ezek a fehérjék ezüstözéssel jelölhetők és a sejt proliferációjára utalnak. Szájüregi laphámrákok esetén szinte minden vizsgálat szignifikáns összefüggést talált az AgNOR kimutathatósága és a prognózis között [201, 203, 292].

Skp2: Az skp2 (S-phase kinase-interacting protein 2) a G1 fázis számos szabályozójának (pl. p27 CDK inhibitor) degradációjában érintett. Elnyomja a ciklin aktiváció gátlását, ezáltal serkenti a proliferációt. Az skp2 fokozott expressziója csökkent p27 szinttel társul és rossz prognózisra utal [233].

Bcl2: A bcl2 anti-apoptotikus protein, melyet a p53 szabályoz. Annak a szabályozó rendszernek a része, mely a sejtciklust és az apoptózis beindítását kontrollálja. Használhatósága a kimenetel megítélésében vitatott [155, 243, 268, 270].

HSP27 és 70: A hő sokk proteinek (HSP) a p53 gén mutációjával állnak összefüggésben. A HSP27-et kimutatták normális nyálkahártyából és kisebb tumorokból. Szerepe a karcinogenezisben tisztázatlan, annak ellenére, hogy fokozott expressziója rossz prognózisra utal [167]. A HSP70-et emelkedett mennyiségekben mutatták ki szájüregi laphámrákokból. Kölcsönhatásban áll a bcl2-vel és úgy látszik, hogy elősegíti annak proliferáció fokozó hatását. Prognosztikus szerepe nem igazolható [76].

Telomeráz: A telomeráz RNS-függő DNS polimeráz, ami kivédi a telomerek rövidülését. A kritikusan megrövidült telomerek beindítják az apoptózist a p53 és pRb aktiválása révén. A fokozott telomeráz aktivitás a tumorsejtek egyik jellemzője, de a prognózis megítélésében nem igazán használható [131], bár a daganat eltávolításakor a tumormentes széleken észlelt telomeráz pozitivitás jó prognózisra utal [62].

A tumor szuppresszió és a tumor elleni védekezés markerei

Retinoblasztóma fehérje (pRb): A pRb a retinoblasztóma gén terméke és a G1 ellenőrzőpont egyik kulcsa. A pRb defoszforiláció révén aktiválódik és a CDK-ok révén gátolja a ciklin D aktivációját, így a sejtciklust a G1 fázisban leállítja. A pRb expresszió elvesztése rossz prognózisra utal [191, 241].

Ciklin dependens kináz inhibitorok (CDKI): Két nagy CDKI családot ismerünk, a p21 családot (p21^{WAF1/CIP1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) és az INK4 családot (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}). A p16 a cdk4-hez és a cdk6-hoz kötődve gátolja a pRb foszforilációját. Ez aktiválja a pRb-t, így leállítja a sejtciklust. A p21 szabályozása a p53 révén történik, míg a p27-é p53-tól függetlenül. A p21 prognosztikai értéke ellentmondásos. Egyes szerzők nem észleltek összefüggést a p21 expresszió és a túlélés között [85], mások kedvező jelnek vélték [290]. A vizsgálatok többsége szerint a p21 overexpressziója (p53-mal vagy anélkül) rossz prognózisra utal [61, 296]. Nem találtak szignifikáns összefüggést a p16 expresszió és a prognózis között [84, 297].

p53: A p53 a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó faktor, mely egyrészt leállítja a ciklust a G1 fázisban a p21 gén aktiválása révén, másrészt beindítja az apoptózist a bizonyos kofaktorokat (Bax, GADD45) kódoló gének bekapcsolása révén. Az utóbbi a PCNA-hoz kötődve a ciklin D kofaktora, így meggátolja a G1–S tranzíciót. Továbbá, a p53 aktiválja az IGF-BP3-at kódoló gént, ami blokkol egy inzulinszerű növekedési faktort és ezzel elősegíti az apoptózist. A p53 termelődése az MDM-2 által szabályozott negatív feed back révén történik. Bár a p53 overexpresszió általában a tumor progressziójára utal, a vizsgálatok többsége szerint a p53 expressziója önmagában nem szignifikáns prognosztikai tényező szájüregi laphámrákok esetén [236, 243, 268, 270]. Más faktorokkal együtt (pl. csökkent pRb vagy fokozott p21) általában rossz kimenetelt jelez [241, 296].

Bax: A Bax a p53 kofaktora az apoptózis beindításában. Alacsony Bax expresszió esetén rosszabb prognózisra számíthatunk [291, 293].

Fas/FasL: A Fas és ligandja az apoptózis fontos mediátora. A Fas antigén egy sejtfelszíni fehérje, ami az apoptózist a Fas ligand (FasL) megkötése révén triggereli. A FasL overexpresszióját, míg a Fas downregulációját észlelték szájüregi

laphámrákrok esetén. Nem sikerült Fas receptorokat detektálni rosszul differenciált tumorokban, ami az apoptózis aktiválásának hiányát jelzi. Egyes vizsgálatok szerint a Fas pozitivitás jó prognózist jelez [175].

Dendritikus sejtek (DC): A dendritikus sejtek antigén prezentáló sejtek, melyek képesek a T-sejt interakciókat közvetíteni és erős anti-tumor választ generálni. Megkülönböztetünk intratumorális és peritumorális DC-eket. Az intratumorális DC-ek az S100 sejtfelszíni markert prezentálják, míg a peritumorális DC-ek p55-öt expresszálnak. Az S100 pozitív DC-ek magas száma erős korrelációt mutat a jó prognózissal [214, 261].

ζ-láncok: A zéta-láncok a daganat elleni védekezésben érintett T-sejt receptorok részei. A ζ-láncok expressziójának hiánya a tumort infiltráló T- limfocitákban rossz prognózisra utal [213, 214].

Az angiogenezist jelölő markerek

VEGF/VEGF-R: A VEGF (vascular endothelial growth factor) multifunkcionális citokin ami az angiogenezist mediálja és az endothel sejtek túlélésében játszik szerepet azáltal, hogy fokozza a bcl2 expresszióját. A bcl2 és maga a VEGF szabályozza a pro-angiogenikus citokin, az IL-8 expresszióját. Fokozott VEGF expresszió esetén gyakoribb a recidíva és rövidebb a túlélés [5, 236, 264].

NOS2 (nitric oxide synthase type II): A nitrogén oxidot tartják felelősnek a daganatokban zajló fokozott angiogeneziséért. Úgy találták, hogy a tumorszövetben mért NOS2 enzim mennyisége korrelációt mutat a nyirokcsomó metasztázisok előfordulásával [25].

PD-ECGF: A PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) vérlemezke eredetű angiogenikus citokin. A vizsgálatok szerint szájüregi laphámrákrok esetén a PD-ECGF összefüggésben áll a kapillárisűrűséggel. Fokozott expressziója rossz prognózisra utal [262].

Tumor inváziót és a metasztatizáló képességet jelző faktorok

Mátrix metallo-proteinázok (MMP): Az MMP-ok cink metalloenzimek, melyek az extracelluláris mátrix (ECM) remodellálásában vesznek részt, képesek annak bontására, ezáltal tehetővé teszik a direkt daganatterjedést, az áttétképződést. Két MMP csoport ismert, az egyik az extracelluláris térbe szekretálódik, a másik csoport tagjai transzmembrán molekulák melyek a sejtfelszínen helyezkednek el. Aktiválódásuk propeptidek hasítása révén történik. Szájüregi laphámrákok esetén a MMP-ok expressziója korrelációt mutat a tumor stádiumával. Az MMP-9 pozitivitás rossz prognózist jelez [51, 111, 141].

Katepszinek: A katepszinek lizoszómális proteázok, melyek fokozzák a tumor inváziót és metasztatizációt az ECM degradációja révén [75].

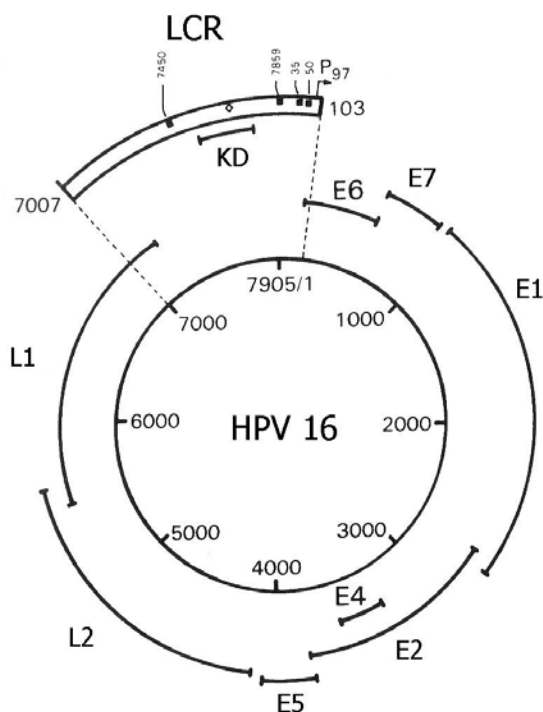
Integrinek: Az integrinek heterodimer transzmembrán adhéziós fehérjék, melyek a sejtek közötti valamint a sejt és a matrix közötti kölcsönhatásokat közvetítik. Az integrinek szerepe a daganatképződésben nem teljesen tisztázott, de a MMP-okkal kölcsönhatásban elősegítik a daganat invázióját [256, 257].

Kadherineket, katenineket: A kadherineket (E és P) adhéziós membrán proteinek, melyek komplexet alkotnak intracelluláris kötő fehérjékkel, mint a β - és γ -katenin. Ezeknek a molekuláknak az expressziója fordítottan arányos a tumor differenciáltságával. Mind a kateninek, mind a kadherineket expressziójának csökkenése rossz prognózist utal [55, 66, 174, 263].

2.5. A Humán Papillomavírusok

2.5.1. Általános jellemzők

A humán papillomavírusok, melyek úgynevezett epiteliotróp vírusok, a Papovaviridae családba tartoznak. Több mint 100 típust azonosítottak napjainkig. Affinitásuk alapján két nagy csoportba oszthatók, a kután és a mukozális csoportba. Az első esetben inkább a bőr, a másodikban inkább a nyálkahártyák infekcióját okozzák. Az alapján, hogy csupán jóindulatú elváltozásokat hoznak-e létre vagy képesek rákmegelőző állapotokat esetleg malignus elváltozásokat indukálni, beszélhetünk alacsony rizikójú (low risk, LR) és magas rizikójú (high risk, HR) papillomavírusokról. Ezt a beosztást az a tény is alátámasztja, hogy a HR-HPV típusok képesek immortalizálni a humán keratinocitákat és E6 és E7 onkoproteinjeik képesek inaktiválni a gazdasejtben a p53 és a pRb-t, ezáltal deregulálni a sejtciklus kontrollját. Ez lehetővé teszi szekunder kromoszóma aberrációk kialakulását [301]. Az alacsony rizikójú HPV-k onkoproteinjeinek nem elégséges a kötődése a tumorszuppresszorokhoz, ezáltal nem képesek a sejtciklus szabályozását befolyásolni.



2. ábra A HPV16 gén-térképe
(Sheffner M et al. 1994)

A HPV kicsi, borítékkal nem rendelkező DNS vírus. Genomja egy zárt, cirkuláris, kettős DNS szál, melyet 7200-8000 bázispár alkot. A Papillomavírus genomja három régióra osztható: (1) a nem kódoló, replikációt, transzkripciót szabályozó rész (long control region, LCR), (2) korai régió (E), mely a replikációhoz szükséges szabályozófehérjék többségét kódolja és ez a régió tartalmazza az E6 és E7 onkoproteineket kódoló szakaszokat is, (3) késői régió (L), mely két kapszidfehérjét kódol [301].

A humán papillomavírusok leginkább konzervatív régiói az L1 és E1, ezért a HPV típusok detektálására használt PCR technikák leginkább ezekből a régiókból választott konszenzus primereket használnak.

2.5.2. A HPV benignus és malignus folyamatokban

A szájüregi léziók tartalmazhatnak kután és mukozális (anogenitális) HPV típusokat [33, 170, 207]. A humán papillomavírusok többsége benignus elváltozásokat okoz, melyek képesek spontán regresszióra. Jó példák erre az orális papillómák és a genitális kondilómák. A jóindulatú laphám papillómák, a közönséges szemölcs vagy a condyloma acuminatum esetén a leggyakrabban kimutatott típusok a HPV 6 és 11. Orális laphámrákokból a HPV 16 és 18 típusokat sikerült azonosítani. Mind az alacsony, mind a magas rizikójú típusokat kimutatták már a szájüreg prekancerózus állapotaiból (pl. leukoplákia). Vannak olyan HPV típusok (HPV 13, 32), melyeket eddig csak a szájnyálkahártyából sikerült kimutatni. Immunszuppresszált betegeknél olyan HPV típusok is megjelenhetnek (HPV 72, 73) melyek egészséges egyedekre nem jellemzőek [269].

A humán laphámrákok 10%-a hozható összefüggésbe onkogén HPV típusokkal [18]. Ezeknek a daganatoknak a többsége az anogenitális régió hámból ered. Kiterjedt irodalom támasztja alá bizonyos HPV típusok (16, 18, 31, 33 és 58) szerepét a méhnyak, a végbél és a külső nemi szervek rákmegelőző és malignus elváltozásaiban [104]. Kevesebbet tudunk a humán papillomavírusoknak a felső aerodigestív traktus laphámrákjainak kialakulásában játszott szerepéről. Az onkogén HPV típusok jóval gyakoribbak a fiatalabb, szexuálisan aktív populációban. Az anogenitális-orális transzmisszió valószínűleg gyakoribb, mint a genito-anogenitális út, mivel a vírusok átvitele egyik nyálkahártyáról a másikra nem csak szexuális kapcsolat révén lehetséges [226]. Bár a fertőző HPV egy idő után valószínűleg eltűnik a megfertőzött nyálkahártyáról, de a virális genom perzisztálhat a hámban repetitív infekció vagy a gazdasejt genomjába történő beépülés révén [115, 272]. Ez utóbbi eseményt szükségesnek vélik a HPV onkogének perzisztálásához és transzformáló képességének megőrzéséhez, bár a HPV gazdasejtbe történő integrálódásának szükségessége a gazdasejt malignizálásához még nem bizonyított minden kétséget kizáróan [132].

Először Syrjänen 1983-as vizsgálati eredményei utaltak a humán papillomavírusok oki szerepére az orális laphámrákok etiológiájában [248]. Az azóta publikált adatok szerint a felső aero-digestív traktus laphámrákjainak 20-90 százalékából sikerült HPV 16-ot kimutatni. A fej-nyak régióban a két legfontosabb magas rizikójú HPV típus a HPV 16 és 18, melyek előfordulási gyakorisága messze meghaladja az összes többiét [8, 169, 237]. Érdekes módon, az alacsony rizikójú HPV 6-ot és 11-et is sikerült kimutatni néhány orális és laryngeális karcinómából [34, 65, 159]. A HPV típusok prevalenciája erősen függ a tumor helyétől, típusától, a vizsgált esetek számától és a kimutatás céljából alkalmazott technikától. Miller és Johnstone 2001-es meta-analízise [169] 94 jelentés alapján, 4680 esetet vizsgálva úgy találta, hogy a HPV különböző típusainak előfordulása egészséges szájnyálkahártyában 10%, verrukózus karcinómáknál 29,5%, míg klasszikus orális laphámrákok esetén 46,5%. Snijders és társai [237] a fej-nyaki régió laphámrákjait vizsgálva az esetek 32 százalékánál észleltek HPV pozitivitást, mely a lokalizáció függvényében változott. A tonsilla karcinómák 70%-a, míg a hypopharynx daganatainak 10%-a volt HPV pozitív. Kreimer és munkacsoportjának 2005-ös szisztematikus analízise [136], mely 60 közlemény alapján 5046 fej-nyaki laphámrákos esetet elemezve készült, a humán papillomavírust az esetek 25,9 százalékánál észlelte. A HPV prevalencia szignifikánsan gyakoribb volt oropharyngeális karcinómák esetén (35,6%), mint orális vagy laryngeális laphámrákoknál (23,5% és 24,0%). A HPV pozitív oropharyngeális esetek 86,7%-ából HPV 16-ot sikerült kimutatni, ez a szájüregi eseteknél 68,2%, míg a laryngeális daganatoknál 69,2%. Hazai beteganyagon Szentirmay és munkatársai 136 fej-nyaki laphámrákot vizsgálva a szájüregi- és oropharyngeális estek 48,5 százalékából, a larynx daganatainak 35,7 százalékából tudtak HPV-t kimutatni [251]. Régióinkban Major és munkatársai a fej-nyaki laphámrákok 48,1 százalékánál észleltek HPV DNS pozitivitást [159].

Számos eset-kontroll vizsgálat is készült a HPV rizikó fokozó szerepének vizsgálata céljából fej-nyaki karcinómák esetén. Ezek közül a legnagyobb Herrero és társai (2003) által 9 országban 1670 (1415 orális, 255 oropharyngeális) karcinómás betegen és 1732 egészséges kontrollon végzett felmérés volt [96]. Szövetteni mintavétel alapján a szájüregi laphámrákok 3,9 százalékából, míg az oropharyngeális karcinómák 18,3 százalékából sikerült HPV DNS-t kimutatniuk. HPV 16-ot találtak a

HPV DNS pozitív betegek 94,7 százalékánál. A kimutatható HPV 16 L1 ellenes antitestek fokozott szájüregi (OR 1,5) és oropharyngeális (OR 3,5) laphámrák kockázatot jeleztek. Magas HPV 16 E6/E7 ellenes antitest titer volt kimutatható a kontrollok 1,6 százalékánál, szemben az orális tumoroknál mért 4,6 és az oropharyngeális laphámrákoknál észlelt 11,9 százalékkal (OR 2,9 és 9,4). E6/E7 ellenes antitesteket sikerült kimutatni a HPV pozitív oropharynx/tonsilla karcinómák 65 százalékánál, míg ez az arány HPV pozitív szájüregi laphámrákok esetén csupán 13 százalék.

Az oropharyngeális tumoroknál gyakrabban észlelték HPV pozitivitást, mint orális és laryngeális karcinómák esetén. Az oropharynxból kimutatott HPV pozitív esetek túlnyomó többsége tonsilla eredetű [2, 80, 276]. A tonsilla karcinómák több mint 50 százalékából sikerült magas rizikójú HPV-t kimutatni, ami a legmagasabb arány az extragenitális lokalizációkat tekintve [249]. Mindmáig nem teljesen tisztázott, hogy miért fogékonyabbak a tonsillák HPV eredetű malignus transzformációra, mint a környező szövetek. Több tényező együttesen magyarázhatja ezt a jelenséget. (1) A tonsillák –a méhnyakhoz hasonlóan- könnyen elérhetők a fertőző ágens számára. (2) A külső és belső szervek közötti határterületként, endodermális eredetű laphámjuk fogékonyabb a metapláziás elváltozásokra [276]. (3) A tonsillákon található mély betüremkedések (crypták) megnövelik a hámfelszínt és könnyebb elérhetőséget biztosítanak a kórokozók számára a bazális sejtek irányába [69, 73, 81]. (4) Valószínű, hogy a tonsilláris hámszövetek különlegesen érzékenyek az onkogén vírusok transzformáló hatására [69, 81, 276]. A magas rizikójú HPV DNS kimutatása a tumorszövetből nem egyenlő az etiológiai tényező igazolásával, a HPV pozitív és negatív fenotípus között. A fej-nyaki régió bizonyos laphámrákjai esetén sikerült típusos, jól elkülönülő HPV-függő alcsoportokat leírni, jellegzetes immunhisztokémiai fenotípussal. Ily módon önálló entitásnak tekinthetők a verrukózus és a bazaloid morfológiájú karcinómák. Esetükben szignifikánsan gyakoribb a HR-HPV pozitívitas, mint a „klasszikus” laphámrákoknál [60, 69, 126, 220, 251, 276]. A konvencionális

laphámrákknál, ha sikerül a vírust kimutatni, akkor általában alacsony a kópiaszám és az E6/E7 kimutatása gyakorta lehetetlen [68, 169, 247].

A verrukózus karcinóma a jól differenciált laphámrák egy változata. Legjellemzőbb előfordulási helye a szájüreg, de észlelték már a légcsőben, az orrüregben, a nyelőcsőben és az anogenitális traktusban is. Általában nagyobb, papilláris növedék, ami lassan involválja a környező struktúrákat. Szövetteni szempontból a tumor egésze jól differenciált sejtekből épül fel [17]. A bazaloid tumorokat szövettanilag kicsi, összetömörült sejtek hiperkromatikus maggal és gyér citoplazmával, fokozott mitotikus aktivitás valamint az elszarusodás csaknem teljes hiánya jellemzi [271]. Hasonló morfológia jellemzi a HPV pozitív anogenitális karcinómákat is [45, 47, 142, 218]. Ezzel ellentétben a HPV negatív fej-nyaki tumorok többsége különböző fokban differenciált konvencionális elszarusodó laphámrák. Az önálló bazaloid morfológiához HPV pozitív laphámrákok esetén önálló immunhisztokémiai profil is társul, ami eltér a konvencionális elszarusodó laphámrákokra jellemzőtől. HPV eredetű bazaloid karcinómák esetén jellegzetes a fokozott p16 expresszió, a magas Ki-67 index és a csökkent vagy hiányzó p53 reaktivitás [60, 150]. Klasszikus elszarusodó szájüregi/oropharyngeális laphámrákok esetén a vizsgálok többségének nem sikerült önálló, csupán a HPV pozitív esetekre jellemző fenotípust elkülöníteni [8, 140].

2.5.3. A HPV szerepe a laphámrákok patogenezisében

In vitro vizsgálatok bizonyítják, hogy a magas rizikójú HPV 16 és 18 humán hámsejteket képesek immortalizálni. Továbbá, a virális genom ezért felelős E6/E7 régióit is sikerült azonosítani [173]. Önmagában az E6/E7 gének transzfekeciója képes immortalizációt indukálni, és cervix karcinóma sejtvonalakon az E6/E7 gének szelektív blokkolásával sikerült a sejtek növekedését leállítani, a malignus folyamatot blokkolni.

Bár az E6/E7 gének expressziója elengedhetetlen feltétele a HR-HPV indukálta immortalizálódásnak, csupán ez az esemény nem elegendő hozzá [300], szükséges még a gazdasejt génjeinek módosítása is [37]. Ez a tény magyarázatot adhat arra, hogy az eredetileg HR-HPV-vel transzfekektált vagy infektált nagyszámú sejt közül miért csak egy töredék válik halhatatlanná. Annak ellenére, hogy a fertőzött sejtek

túlnyomó többsége folyamatosan expresszál virális onkoproteineket, a malignus transzformáció ritka esemény.

Néhány HPV által immortalizált sejtvonal malignus fenotípust vehet fel prolongált tenyésztés során, de ugyanez megtörténhet kémiai karcinogének, γ -sugárzás vagy aktivált onkogének hatására. Úgy tűnik, a virális onkogének expressziója különböző az immortalizált és a malignus sejtek esetén. „In situ” hibridizációs vizsgálatok a karcinogenezis minden stádiumában az E6/E7 fokozott kifejeződését észlelték.

Bizonyos, hogy legalább három fontos folyamat játszódik le a HPV indukálta malignizálódás során. (1) A vírusnak perzisztálnia kell a fertőzött sejt(ek)ben, mivel hosszabb idő telik el a vírusfertőzés és a daganat megjelenése között. Valószínű, hogy az immunrendszer elégtelen működésének (képtelen eliminálni a HPV-fertőzött sejteket) is szerepe lehet a folyamatban. (2) Az E6/E7 onkogének áthelyeződnek az epitélium rétegein belül. Az onkogén expresszió, ami általában felületesen, a hám differenciálódó rétegében jelentkezik kezdetben, előrehaladott lézióknál bazális irányba, a proliferációs zónába helyeződik át. Ennek az áthelyeződésnek a pontos mechanizmusa nem ismert, de genetikai instabilitást indukálhat és a mutációk felhalmozódását a bazális réteg osztódó sejtjeiben. Ha az E6/E7 expresszió csak a differenciálódó sejtekben történik, nem valószínű, hogy ez malignus transzformációhoz vezet, mivel ezek a sejtek rövid időn belül beérnek, majd elpusztulnak. (3) Specifikus onkogén mutációk jelennek meg a gazdasejtben az E6/7 indukálta genetikai instabilitás következtében.

3. Célkitűzések

1. Ajak- és szájüregi laphámrákos betegcsoportunkban a kor- és nem szerinti megoszlás, a daganatok klinikopatológiai paramétereinek, a kezelés, a recidíva és a túlélés adatainak vizsgálata statisztikai módszerekkel. Összefüggések keresése az epidemiológiai és klinikai adatok valamint a prognózis között.

2. Ugyanebben a betegcsoportban a rizikótényezők (dohányzás, alkoholfogyasztás, fogazat állapota, lakóhely) előfordulásának, a betegség kimenetelére gyakorolt hatásának vizsgálata statisztikai módszerekkel.

3. A magas rizikójú humán papillomavírusok előfordulásának vizsgálata szájüregi laphámrákokban archivált szövettani minták alapján polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel. A p53, pRb és p16^{INK4A} sejtciklus szabályozó fehérjék expressziójának tanulmányozása immunhisztokémiai módszerekkel. Összefüggések keresése az immunfenotípus és a klinikai paraméterek között HR-HPV pozitív és –negatív esetekben statisztikai módszerekkel

4. A p21^{WAF1/CIP1} regulátor fehérje, a p53, Ki-67 és cyclin D1 expressziójának vizsgálata archivált ajak- és szájüregi laphámrák mintákban immunhisztokémiai módszerekkel. Statisztikai összefüggések keresése a p21^{WAF1/CIP1} expressziós profil, a klinikopatológiai paraméterek, a p53 regulátor fehérje és a Ki-67 és cyclin D1 proliferációs markerek megjelenése között.

4. Anyag és módszer

4.1. A betegek kiválasztása, klinikai adatok gyűjtése

A Debreceni Orvostudományi Egyetem (DOTE) Stomatológiai Klinikájának Szájsebészeti Osztályán 1996. május 1. és 1999. április 30. között újonnan diagnosztizált ajak- és szájüregi laphámrákos (BNO-X. C00-C06) esetek közül véletlenszerűen olyan pácienseket választottunk ki, akik hiánytalan dokumentációval rendelkeztek és szövetminta blokkjuk fellelhető volt a DOTE Pathológiai Intézet szövettani archívumában. Az eredeti szövettani diagnózis megerősítése az archivált anyagok újvizsgálása alapján történt.

A kiválasztott betegek túlélési idejét az Anyakönyvi Hivatal adatszolgáltatása révén állapítottuk meg, klinikai adataikat a betegdokumentáció alapján gyűjtöttük össze. Vizsgáltuk a betegek nemét és korát, rögzítettük a tumor helyét, méretét, a regionális nyirokcsomó érintettségét illetve távoli metasztázis meglétét avagy hiányát. A TNM klasszifikáció az UICC kritériumok alapján történt [239]. A daganat szövettani diagnózisát, differenciáltsági fokát a WHO kritériumok alapján állapítottuk meg [281]. Vizsgáltuk a daganat klinikai stádiumát, az alkalmazott terápiát, az esetleges recidívát és a túlélési időt.

A rizikótényezők közül vizsgáltuk a dohányzást, az alkoholfogyasztást. Különbséget tettünk a soha nem dohányzó/ivó, a leszokott- és a jelenleg is dohányzó/ivó páciensek között. Rögzítettük a fogyasztott alkohol fajtáját, mennyiségét és a fogyasztás gyakoriságát. Vizsgáltuk a dohányzás módját és a naponta fogyasztott mennyiséget. Elemeztük az adatokat a beteg lakhelye szerint (város, kistelepülés) és a fogazat állapota alapján: fogatlan; szubtotális foghiány; hiányos, pótolatlan; elhanyagolt (parodontotikus, szuvas) illetve gondozott fogazat.

4.2. A humán papillomavírus kimutatása

4.2.1. DNS izolálás

Az archivált paraffin blokkokból 5-5 darab 10 µm vastagságú metszetet készítettünk, melyeket 2 mL-es mikrocentrifuga csövekbe helyeztünk és xylene, abszolút és 95%-os etanol sorozattal viasztalanítottunk. Ezután szárítás és egy

éjszakán át, 56°C-on történő proteináz K (25 µg/mL) emésztés történt 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA-Na és 0.5% Tween 20 oldatban. Ezután a proteáz inaktiválása 95°C-on 10 perc alatt történt. A keletkezett DNS oldatot –80°C-on tároltuk. Az eljárás során fokozott gondossággal jártunk el, hogy a PCR termékek átvitelét megelőzzük. Minden blokkhoz új mikrotóm pengét használtunk.

4.2.2. PCR amplifikáció

Minden mintacsoport tartalmazott proteináz K tartalmú negatív kontrollt és HPV 16 pozitív cervix karcinómából származó pozitív kontroll DNS-t. Degenerált MY09/MY11 primer szettet használtunk a 450 bázispárnyi PCR termék előállításához [160]. Az amplifikációs keverék 50 µL-enként 1 µL templát DNS oldatot, 1x PCR Taq polimeráz puffert (Stratagene, La Jolla CA, USA), 2,5 U Taq DNS polimerázt (Stratagene, La Jolla CA, USA), 200-200 µM dNTP-t, 25 pmol MY09 és MY11 primert valamint 1,5 mM MgCl₂-ot tartalmazott. A 40 amplifikációs ciklust Biometra T1 thermocycler készülékkel (Biometra, Göttingen, Németország) az alábbiak szerint végeztük: ciklusonként 1 perc 94°C, 1 perc 56°C és 1 perc 72°C. A kezdő denaturációs lépés 5 perc 95°C-on, a végső extenziós lépés 6 perc volt 72°C-on. A PCR reakciótermék 0,5 µL-éből új, hasonló összetételű amplifikációs keveréket készítettünk, de most 25-25 pmol MY11 és HR-HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52 és 58) specifikus primereket adtunk hozzá és a fenti séma szerint 23 termociklust végeztünk. A típus-specifikus primerek oligonukleotid szekvenciája a szakirodalomban közölten pontosan megegyezett [113]. Az amplifikációt követően a reakciótermékeket 3%-os agaróz gélen felfuttattuk, és az elektroforézis eredményét etidium-bromid festéssel láthatóvá tettük. A két egymást követő semi-nested PCR amplifikáció által előállított amplimerek ~340 bp méretűek voltak, ha a megfelelő HPV genom detektálható volt a mintában.

4.2.3. A HPV 16 genom fizikai állapotának vizsgálata

A HPV 16 pozitív minták 2 µL-nyi DNS-éből és az E2 génszakaszra (ez változik meg ha a vírus beépül a gazdasejt genomjába) specifikus primer pár 100-100 pmol-jából elkészítettük a fent ismertetett amplifikációs keveréket és 40 termociklusnak vetettük alá a korábbi séma szerint. A teljes, fertőzőképes, episzómális HPV genom

amplimerjei 351 bp méretűek, melyeket a már ismertetett módon, agaróz gélelektroforézissel detektáltunk.

4.3. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat 4 µm vastagságú szövettani metszeteken, kereskedelmi forgalomban kapható monoklonális antitestekkel végeztük. Ezek anti-p16^{INK4A} (6H12 klón), anti-Rb (IF8 klón), anti-p21^{WAF1/CIP1} (4D10 klón) és anti-cyclin D1 (P2D11F11 klón) a Novocastra cégtől (Newcastle upon Tyne, UK), anti-p53 (DO-7 klón) a DAKO cégtől (Glostrup, Dánia) és anti-Ki67 (B56 klón) a BD PharMingen cégtől (San Diego CA, USA). Az immunhisztokémiai festést DAKO LSAB2 alkalikus foszfatáz rendszerrel végeztük a gyártó előírásai alapján. Azaz, a viasztalanított metszeteket mikrohullámon hevítettük 2x5 percig 10 mM-os Na-citrát oldatban (pH 6.0). Blokkoló szérummal történő 20 perces inkubálás után, a metszeteket az említett antitestekkel 1 órán át, szobahőmérsékleten az alábbi hígításokban inkubáltuk: anti-p16^{INK4A}, anti-cyclin D1 és anti-Ki67 1:50, anti-p53 és anti-Rb 1:100, anti-p21^{WAF1/CIP1} 1:40. A további inkubáció streptavidin-biotin rendszerrel, majd a festés New Fuchsin kromogén szubsztrát oldattal történt. Minden esetben alkalmaztunk pozitív és negatív kontrollt. Magfestődés és a tumorsejtek több mint 10 %-ának pozitivitása esetén tekintettük a mintát pozitívnak.

4.4. Statisztikai analízis

Az adatok feldolgozása SPSS.11 for Windows statisztikai programcsomag (SPSS Inc., Chicago IL, USA) segítségével történt. A kategorikus adatok elemzését χ^2 -, a folyamatos változók analízisét t-teszttel végeztük. A változók közötti korrelációt Spearman-féle korrelációs koefficienssel számoltuk. A túlélési görbéket a Kaplan-Meier módszerrel generáltuk és log-rank teszttel hasonlítottuk össze. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

5. Eredmények

5.1. A betegcsoport demográfiai jellemzői, a laphámrákok klinikopatológiai jellemzői, kezelés, recidíva és túlélés

A 119 laphámrákos beteg kliniko-pathológiai paramétereit az I. táblázat összesíti. A diagnózis megállapításakor a vizsgálati csoportban a férfi nő arány 5,2:1, az átlagéletkor 57,4 év volt. A lokalizációt vizsgálva 33 szájfenéki (27,7%), 32 ajak (26,9%), 27 nyelv (22,7%), 9 palatum (7,6%), 8 gingiva (6,7%), 6 retromoláris (5%) és 4 egyéb szájüreg (3,4%) daganatot azonosítottunk. Az ajaktumoros betegek átlagéletkora 66,4 év, ami 10-13 évvel magasabb, mint a többi betegcsoporté (a különbség szignifikáns, $p < 0,001$).

A daganatok méretét vizsgálva a kedvezőbb csoportba (T1, T2) az esetek 70,6%-a, a T3, T4 csoportokba az esetek 29,4%-a tartozott. Regionális nyirokcsomó érintettséget a betegek 28,4%-ánál, távoli metasztázist csupán 4 esetben (3,4%) észleltünk. A II. táblázat szemlélteti a daganat helye és stádiuma között talált összefüggéseket. Az ajakrákos esetek 65,6%-a klinikailag az I. stádiumba tartozott, a nyelv tumorainál 25,9%, a szájfenéki daganatoknál 24,2% tartozott ebbe a kedvezőbb prognózisú csoportba (a különbség statisztikailag szignifikáns, $p < 0,001$). Ha klinikai stádiumok függvényében vizsgáljuk az egyes betegcsoportok átlagéletkorát, megállapíthatjuk, hogy az I., II. és III. stádiumban lévő betegek a diagnózis időpontjában életkor szempontjából homogén betegcsoportot alkotnak. A IV. stádiumban lévő betegek 10,6 évvel fiatalabbak mint az I. stádiumba tartozók ($p = 0,002$). (I. táblázat)

Szövetteni differenciáltság alapján a laphámrákok 43,0%-a jól, 48,6%-uk közepesen, 8,4% rosszul differenciált volt. A differenciáltság foka nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést sem a klinikai mutatókkal, sem a túléléssel, bár a jól differenciált tumorok valamivel jobb túlélési mutatókat produkáltak (43% vs. 30%).

A teljes túlélési arány 2 év után 55,5%, 5 év után 38,7%. Az 5 éves túlélést szignifikánsan befolyásoló paraméterek: a daganat mérete, a regionális nyirokcsomó

áttét illetve a klinikai stádium. Ez utóbbi esetén a legerősebb az összefüggés, itt mértük a legmagasabb Spearman korrelációs koefficiens (-0.423).

Az alkalmazott kezelési módokat az III. táblázat részletezi. Az esetek 20,7%-ánál észleltük a daganat recidíváját. A recidívák megoszlása egyenletes a korai illetve előrehaladott stádiumokban (21,2% vs. 20%). A recidíva oki tényezőit vizsgálva egyedül a daganat szövettani differenciáltságával találtunk szignifikáns összefüggést ($p=0,025$). A rosszul differenciált (grade III) tumorok 50%-ánál találtuk recidívát szemben a jól (grade I) ill. közepesen differenciált (grade II) eseteknél észlelt 14 illetőleg 17%-kal. Az esetleges recidíva nem befolyásolta a betegség prognózisát.

5.2. Rizikótényezők előfordulása a betegcsoportban, hatásuk a túlélésre

A felmérésben résztvevő laphámrákos betegek vizsgált rizikófaktorait az I. táblázat, a dohányzás és alkoholfogyasztás összefüggéseit a többi vizsgálati paraméterrel a VI. táblázat összesíti. Az anamnézis felvétel időpontjában a betegek 65,5%-a dohányzott, erős dohányosnak (≥ 20 szál/nap) minősült 41,2%. Szignifikánsan több férfi dohányzott, mint nő (71% vs. 36,8%, $p=0,004$). Ha a dohányzók kor szerinti megoszlását vizsgáljuk, a ≥ 65 éves betegek csoportjában 38,3%, a ≤ 45 évesek között 86,4% a dohányos. Az előrehaladott klinikai stádiumokban (III-IV.) szignifikánsan magasabb volt a dohányzók aránya (83,3% vs. 52,4%, $p=0,044$). A dohányzás és az alkoholfogyasztás közötti összefüggés szignifikáns ($p<0,001$).

A betegcsoport 75,6 százaléka több-kevesebb rendszerességgel fogyasztott alkoholt, 41,2% naponta legalább 50 gramm tiszta alkohollal egyenértékű szeszt fogyasztott. A férfiak csupán 19 százaléka, a nők 52,6 százaléka vallotta magát absztinensnek ($p=0,002$). Az alkoholfogyasztás és a tumor helye között szignifikáns összefüggést találtunk ($p=0,033$).

A fogazati státusz szignifikáns összefüggést mutatott a beteg korával ($p<0,001$), a dohányzással ($p<0,001$) és az alkoholfogyasztással ($p=0,005$). A fogatlan betegek többségére jellemző volt az idősebb (≥ 65 év) kor, az absztinencia és a dohányzástól való tartózkodás.

A betegek 60,5 százaléka városban lakott, 39,5%-uk kistelepülésen. Nem találtunk különbséget a két csoport jellemzői között, kivéve, hogy az alkoholfogyasztással kombinált dohányzás szignifikánsan ($p=0,039$) gyakoribb (63,9% vs. 44,7%) volt a városi populációban ($p=0,039$).

5.3. A magas rizikójú humán papillomavírusok etiológiai szerepének vizsgálata szájüregi laphámrákokban

Az V. táblázat összegezi a vizsgálatban résztvevők klinikai és habituális jellemzőit. A diagnózis felállításakor a HR-HPV pozitív betegek 0,9 évvel voltak fiatalabbak, mint a HPV-negatívak, a különbség statisztikailag nem szignifikáns ($p=0,72$).

HR-HPV típusok előfordulása orális laphámrákokban

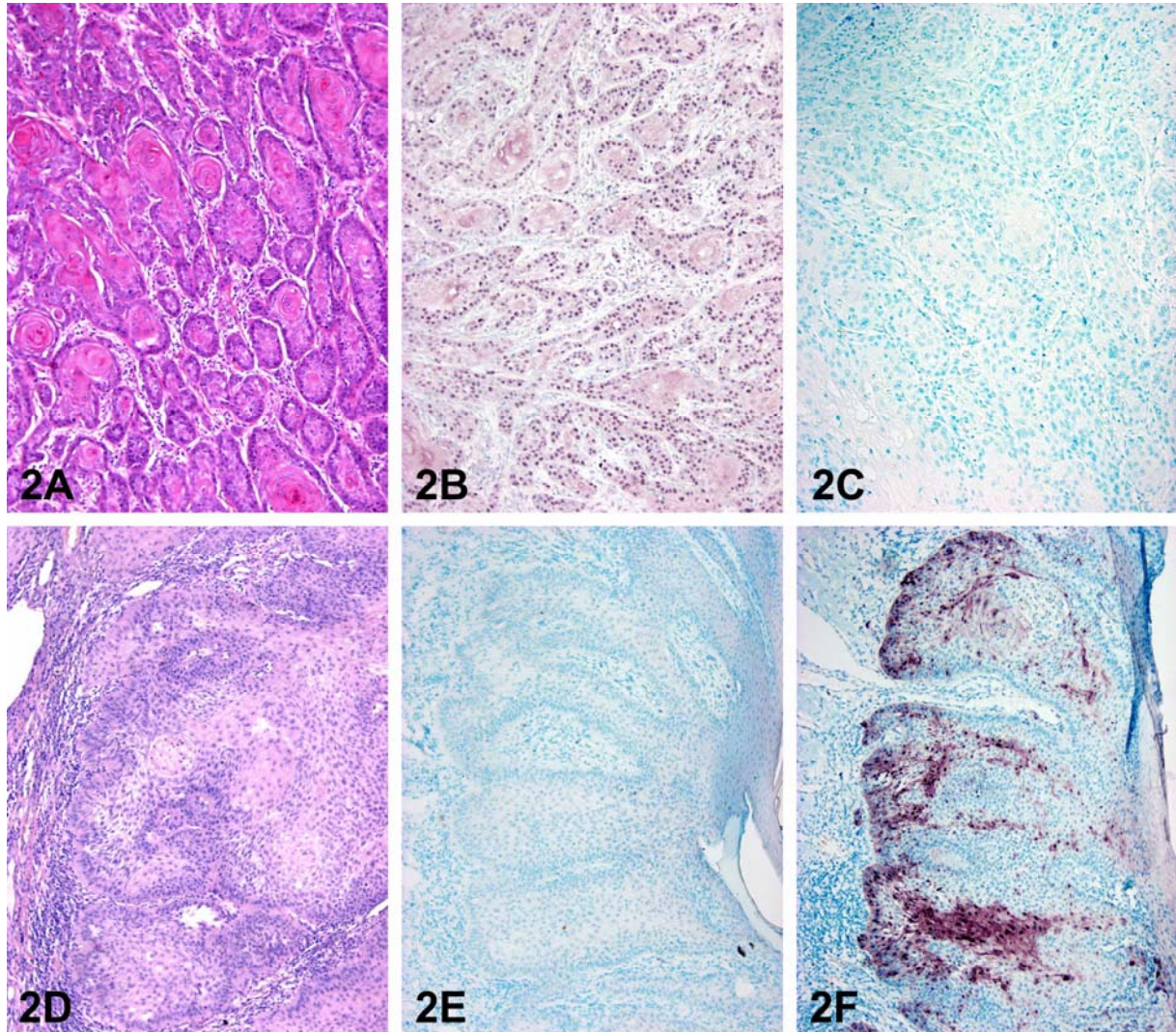
HR-HPV DNS-t a szövettani minták 42%-ából sikerült kimutatni. A HR-HPV pozitív tumorok 82%-a tartalmazott HPV16-ot, de egyéb magas rizikójú típusokat is sikerült kimutatni a pozitív esetek 30 százalékánál. Kettős HR-HPV infekciót észleltünk a pozitív esetek 12%-a esetében (VI. táblázat). A HPV16 pozitív esetek csupán 7%-a hordozta a tesztelt HPV E2 génszakasz 351 bázispárnyi szekvenciáját, ami az episzómális, reprodukcióképes, potenciálisan infektív vírus genomot jelzi. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a HR-HPV infekció és a daganat kiindulási helye között (VI. táblázat). A HR-HPV pozitivitás nem korrelált sem a tumor stádiumával, szövettani differenciáltságával sem más vizsgált faktórral (V. és VII. táblázat). Nem sikerült szignifikáns korrelációt kimutatni a HR-HPV infekció és az abuzív szokások között (VIII. táblázat).

A p53, p16^{INK4a} és Rb proteinek expressziója (3. ábra)

P53 pozitivitást a HR-HPV pozitív esetek 61%-ánál, a negatív esetek 54%-ánál észleltünk. A változó intenzitású p53 expresszió jellegzetesen a sejtmagra lokalizálódott.

A p16^{INK4a} expressziót vizsgálva, diffúz magfestődést észleltünk enyhe

citoplazma pozitívással a HR-HPV pozitív esetek 13%-ánál (4/31), a HR-HPV negatív esetek 20%-ánál (9/45). 26/32 (81%) HR-HPV pozitív és 37/44 (84%) HR-HPV negatív szájüregi laphámrák specimen mutatott nukleáris Rb expressziót.



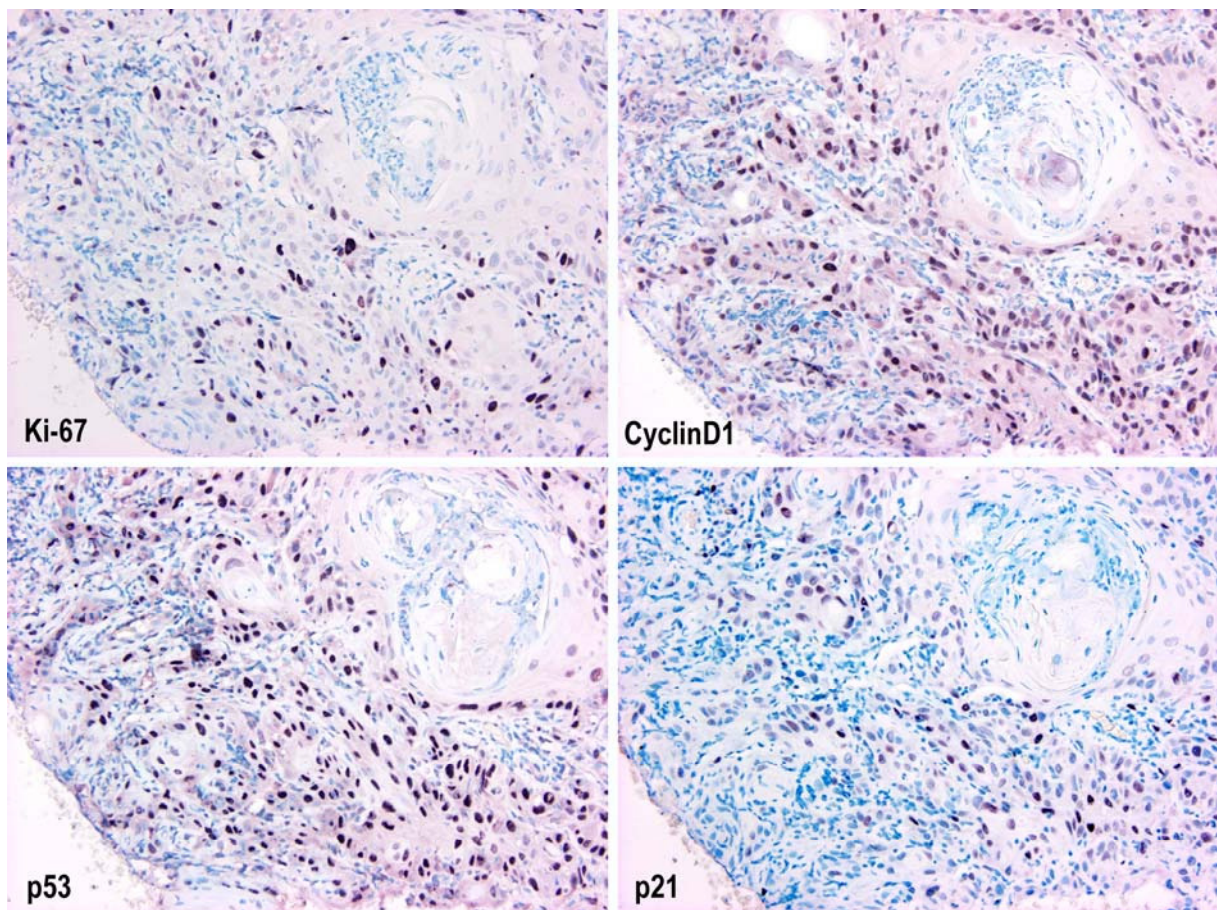
3.ábra HPV 16 pozitív (2A-C) és negatív (2D-F) szájüregi laphámrák szövettani képe. (2A) hematoxin-eozin festésű HPV 16 pozitív és (2D) negatív karcinóma. (2B) erős és (2E) hiányzó nukleáris p53 expresszió valamint (2C) hiányzó és (2F) erős citoplazmikus és nukleáris p16 expresszió immunhisztokémiai kimutatása.

A p53, a p16^{INK4a} és a Rb proteinek expressziója, a HR-HPV státusz és az alkoholfogyasztás/dohányzás közötti összefüggések közül csak a p53 expresszió és a dohányzás mutatott szignifikáns korrelációt ($p=0,042$). Nem találtunk szignifikáns különbséget a HR-HPV pozitív és negatív fenotípus között (VII. és VIII. táblázat)

5.4. A p21^{WAF1/CIP1}, p53, Ki-67 és cyclin D1 proteinek expressziójának vizsgálata szájüregi laphámrákok esetén

P21^{WAF1/CIP1} magfestődést a laphámrák minták 61,3%-ánál észleltünk. Az legtöbb megfestett sejtmag a szuprabazális régióban, kevesebb a hám felső rétegében, legkevesebb a bazális régióban volt megfigyelhető.

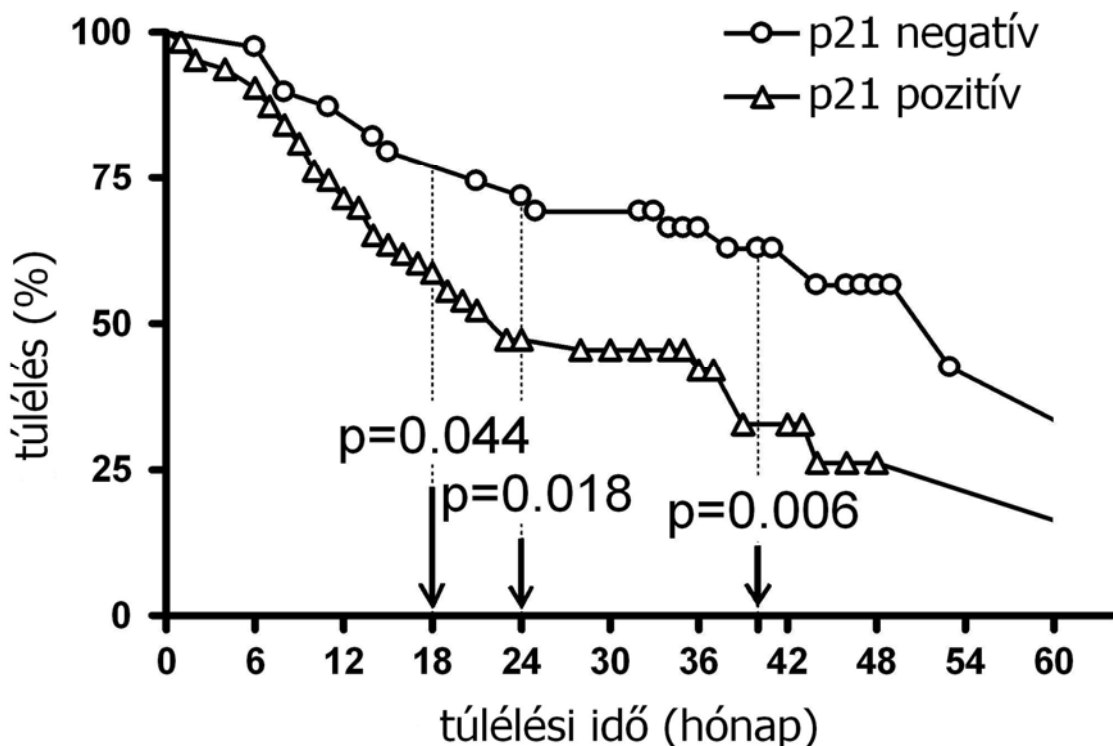
P53 expressziót az esetek 60,0%-ánál észleltünk. A Ki-67 (MIB1) proliferációs antigén 76,5% esetében volt detektálható. A cyclin D1 pozitívitas előfordulási gyakorisága 45,7% volt (4. ábra).



4. ábra Ki-67, cyclin D1, p53 és p21 immunhisztokémiai kimutatása szájüregi laphámrák mintából. Streptavidin-biotin-peroxidáz reakció (x200 nagyítás)

A p21^{WAF1/CIP1} expresszió és a klinikopatológiai paraméterek

A p21^{WAF1/CIP1} expresszió és a klinikopatológiai paraméterek közötti összefüggéseket laphámrákos betegeink esetében az IX. táblázat összesíti. Szignifikáns összefüggést találtunk a p21^{WAF1/CIP1} expresszió és a nagyobb tumor méret (T3 és T4 tumorok, $p=0,005$), a regionális nyirokcsomó metasztázis ($p=0,002$), az előrehaladott klinikai stádium (III. és IV. stádium, $p<0,001$), és a nyelvi ill. a retromoláris daganat lokalizáció között ($p=0,002$). Továbbá, a p21^{WAF1/CIP1} immunpozitív esetek túlélése sokkal rövidebb, mint a negatív eseteké és ez különbség már a diagnosztizálást követő 18 hónap után statisztikailag szignifikáns ($p=0,044$, 5. ábra) és a különbség, valamint a szignifikancia mértéke az idő függvényében nő. Nem találtunk szignifikáns korrelációt a kor, a nem, az alkoholfogyasztás és dohányzás, a fogazat állapota és a szövettani differenciáltság valamint a p21^{WAF1/CIP1} expresszió között szájüregi laphámrákos betegeinknél.



5. ábra

A szájüregi laphámrákos betegek túlélési görbéi a p21^{WAF1/CIP1} expresszió függvényében

A p21^{WAF1/CIP1}, p53, Ki-67 és cyclin D1 koexpressziója szájüregi laphámrákokban

A p21^{WAF1/CIP1} protein expressziója szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a Ki-67 ($p=0,010$) és a cyclin D1 ($p<0,001$) expresszióval. A p21^{WAF1/CIP1} és a p53 expressziója között nem észleltünk összefüggést. A vizsgált proteinek egyike sem mutatott szignifikáns összefüggést a p53 pozitivitással. Amint az várható volt, a Ki-67 expresszió szoros korrelációban állt a cyclin D1 immunpozitivitással ($p<0,001$, X. táblázat)

6. Megbeszélés

A szájüregi daganat többnyire férfi betegség, a nemzetközi irodalmi adatok szerint a férfi:nő arány 2:1 [252] és 16:1 [38] között változik. Vizsgálatunkban 5,2 : 1 arányt találtunk, ami jól illeszkedik a közép-európai trendbe [23]. A betegek átlagéletkora a diagnózis megállapításakor 57,4 (37-94) év volt, ami valamivel (nem jelentősen) alacsonyabb mint amit más vizsgálatok találtak [28, 32, 35, 789]. Ezt némiképp magyarázhatja a fiatalabb (45 év alatti) betegcsoport magasabb, 18,5%-os aránya.

A vizsgált betegcsoportban leggyakrabban szájfenéki- és ajaktumorokkal talákoztunk. Nyugati országokban a nyelv daganatai a leggyakoribbak [78, 252], míg egyes ázsiai országokban a bucca a leginkább érintett [38]. Ezek a különbségek, részben, az eltérő etiológiai tényezőkkel magyarázhatók. Míg Európában az alkoholfogyasztás és dohányzás a két legfontosabb rizikófaktor, addig Ázsiában a dohány és a bétel rágása a leelterjedtebb káros szenvedély.

Az ajak- és szájüregi laphámrákos betegek prognózisát több tényező is befolyásolja. A vizsgált betegek között nem volt hatással a túlélésre a beteg neme és kora. Bár az ajakrákok túlélése több mint 20%-kal jobb mint a nyelv és a szájfenéki daganatoké, a tumor helye nem volt szignifikáns hatással az 5 éves túlélésre. A daganatok szövettani differenciáltsága, más vizsgálatokhoz hasonlóan, nem befolyásolta a prognózist [184]. Vizsgálatunk során összefüggést találtunk az 5 éves teljes túlélés és a tumor mérete, a regionális nyirokcsomó érintettség, a klinikai stádium valamint az alkalmazott terápia között. A daganat mérete és a nyirokcsomó metasztázis megléte önmagában is szignifikáns tényező, de együttesen még biztosabb kórjósító adat ($p < 0,001$). Minél előrehaladottabb a klinikai stádium, annál kisebb az 5 éves túlélés (68,3% vs. 11,1%). Betegcsoportunkban a 5 éves túlélés 38,7% volt, melyhez hasonló tapasztalt számos más vizsgálat [36, 38]. Ez az érték nem csupán a betegség-specifikus túlélést jelöli, hanem tartalmazza az egyéb okokból bekövetkezett, tehát egyéb betegségek, balesetek, öngyilkosság, természetes halál miatti elhalálozásokat is. Fejlett nyugati és skandináv országokból azonban érkeztek jóval kedvezőbb túlélési statisztikák is [12, 32, 208].

Az ajak- és szájüregi laphámrákos betegek kezelése szakmai testületek által elfogadott és széles körben alkalmazott „onkoterápiás protokoll” irányelveinek és ajánlásainak megfelelően történt [124]. A kezelést meghatározó tényezők a primer tumor lokalizációja, kiterjedése, a nyaki áttét nagysága és elhelyezkedése, távoli metasztázisok valamint a beteg általános állapota voltak. Önálló sebészi megoldást kezdeti stádiumban (I., II.) lévő betegeknél alkalmaztunk, ahol a daganat T1, T2 méretű volt, regionális nyirokcsomó áttét nélkül. Az előrehaladott stádiumokban (III., IV.) a daganat reszekcióját és a nyaki disszekciót kiegészítettük posztoperatív (adjuváns) sugárterápiával. Bizonyos esetekben, mikor műtét előtt a tumor megkisebbitése (down staging) volt kívánatos preoperatív (neoadjuváns) sugárkezelést alkalmaztunk. A beteg általános állapota miatt inoperábilis vagy a tumor kiterjedése okán irrezekábilis daganatok esetén definitív (primer) sugárkezelést alkalmaztunk, melyet reziduális tumor esetén kiegészítettünk kemoterápiával. A túlélés szempontjából meghatározó volt a választott terápia. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan [38] a csak sebészileg kezelt betegek 5 éves túlélési aránya szignifikánsan magasabb volt (57,5%) mint az egyéb terápiában (is) részesült pácienseké (26,9% $p < 0,001$).

Vizsgálatunkban, a laphámrákos betegek 5 éves túlélési rátája a klinikai stádium súlyosságával állt a legszorosabb összefüggésben. Sajnálatos módon az esetek 41%-a előrehaladott stádiumban (a daganat átmérője ≥ 4 cm és/vagy regionális nyirokcsomó érintettség) került felismerésre. Az első tünetek jelentkezése után gyakran hónapok is eltelnek mire a beteget panaszai szakorvoshoz kényszerítik. Józan vélekedés szerint, ha a beteg a tünetek jelentkezése után közvetlenül fordul orvoshoz, sikerül korai stádiumban felismerni a daganatot. Erre több vizsgálat is rácáfol, nem találtak szignifikáns összefüggést a tünetek megjelenésétől a diagnosztizálásig eltelt idő, a klinikai stádium és a túlélés között [164, 277].

Külön figyelmet érdemel a vizsgálati csoportban a 45 évesnél fiatalabb korosztály magas aránya (18,5%), mely nemzetközi viszonylatban is kiemelkedő [4, 103, 224]. Ebben a populációban találtuk a szájfenéki tumorok 35 %-át ($p = 0,001$) és szignifikánsan több IV. stádiumú daganatot észleltünk ($p = 0,023$). Ezek a daganatok nem méretükben, mint inkább metasztatizáló képességükben különböznek az idősebb korosztály tumoraitól ($p = 0,028$). Szöveti differenciáltságuk is rosszabb, több

a recidíva és rövidebb a túlélési idői is, bár ezek a különbségek statisztikailag nem szignifikánsak.

A vizsgálatban részt vevő szájüregi laphámrákos betegek 71,4 százalékának anamnézisében szerepelt dohányzás, míg 79 százalékuknál találtunk alkoholfogyasztást. A felnőtt magyar lakosság 35%-a dohányzott [187] és 60%-a fogyasztott rendszeresen alkoholt [135] a 1990-es évek végén. A betegek 27,2 százaléka amellet, hogy legalább napi egy csomag cigarettát elszívott, még a saját maga által bevallott (!) szeszfogyasztás alapján is alkoholistának volt minősíthető. Ezek az önkárosító magatartásformák egész Magyarországon elterjedtek és arányuk nemzetközi viszonylatban is kiemelkedő [130]. Hivatalos statisztikák szerint a dohányosok 55 százaléka legalább napi egy csomag cigarettát szívott el [187], és a 20 éves és idősebb korosztály 11-12 százaléka minősült alkoholistának a vizsgált időszakban [135]. Ismeretes, hogy a dohányzás intenzitásával együtt emelkedik a szájüregi rákok kialakulásának kockázata. Bár a daganat lokalizációja és a dohányzás közötti összefüggést nem találtuk szignifikánsnak, elmondható, hogy más vizsgálatokhoz hasonlóan [119, 161], a dohányosoknál a szájfenéken találtuk a legtöbb rosszindulatú elváltozást.

Eset-kontroll vizsgálatok bizonyítják, hogy az alkoholos italok fogyasztása fokozza a daganatok kialakulásának kockázatát [1, 31, 172]. Az elfogyasztott italok mennyiségével és töménységével arányosan fokozódik a rizikó. Vizsgálati csoportunk 34,5 százaléka vallotta magát alkalmankénti, úgynevezett „társasági” alkoholfogyasztónak, 41,1% minősült „nagyivónak”. Régióinkban az égetett szeszesitalok élvezete, mely több mérés szerint is a legveszélyesebb [120, 146], jóval elterjedtebb, mint az alacsonyabb alkoholtartalmú sörök vagy borok fogyasztása. Betegeink közel háromnegyede tömény italokat fogyaszt, leggyakrabban sörrel kiegészítve. Sajnos a túlzásba vitt ivás és dohányzás sokkal jellemzőbb a fiatalabb korosztályokra, a 45 év alatti korosztályban szignifikánsan elterjedtebbek az abuzív szokások, mint az idősebbek között.

Egyes felmérések [27] úgy találták, hogy a dohányzás és alkoholfogyasztás nem csupán a szájüregi rákok kialakulásával mutat összefüggést, de a rossz prognózissal is. Bár vizsgálati csoportunkban, hasonlóan Gorsky és mtsai [88]

eredményéhez, a fokozott dohány- és alkoholfogyasztáshoz csökkent túlélési idő társult, az összefüggés statisztikailag nem volt szignifikáns.

A rossz szájhigiéncia és az elhanyagolt, hiányos fogazat megnövelik a szájüregi daganatok kialakulásának kockázatát [153, 156, 172]. Beteganyagunkban csupán a páciensek 12,6 százaléka rendelkezett gondozottnak nevezhető fogazattal. Nem találtunk szignifikáns korrelációt a tumor helye és a fogazat állapota között, de éppúgy, mint Lockhart és mtsai mi is a szájfenéki daganatok esetén találtuk a legtöbb fogatlant [156]. Bár a fogazat állapota önmagában csupán gyenge rizikófaktor, az alkoholfogyasztással kombinálva megsokszorozzák egymás hatását [99, 100]. Beteganyagunkban a rossz fogazatú és rendszeren sokat ivók aránya 37% volt.

Az ajak laphámrákjai esetén felmerült a vidéki életforma, amely az esetek túlnyomó többségében szabad ég alatt végzett mezőgazdasági munkát jelent, rizikót fokozó szerepe [52, 209]. Mivel Hajdú-Bihar és Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében, ahonnan a betegeink származnak, a kistelepüléseken a mai napig jellemző nemcsak a főfoglalkozásként végzett, de a háztáji földművelés és az állattartás is, megpróbáltunk különbséget tenni a vidéki és a városi betegek között. Sem az ajakrákok előfordulási gyakoriságában, sem más kliniko-pathológiai paraméterben nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között, azaz régióinkban az életforma (lakóhely) nem tekinthető önálló kockázati tényezőnek. Ez arra utal, hogy a hagyományos, vidéki életforma eltűnőben van, a mezőgazdaság gépesítésével az emberek egyre kevesebbet dolgoznak a szabad levegőn.

Összegezeként elmondhatjuk, hogy bár a dohányzás és az alkoholfogyasztás nem kizárólagos kockázati tényezők az ajak- és szájüregi rákok kialakulásában, de régióinkban mindenképp a legnagyobb jelentőségűek. Aggasztó, hogy a 45 év alatti populációban szignifikánsan több az alkoholisták és az erős dohányosok, mint az idősebbek között. Ezeknek a rizikótényezőknek az elterjedtsége részben magyarázhatja az orális laphámrákok magas arányát ebben a korosztályban, de az öröklött illetve környezeti, táplálkozási, fogazati és egyéb hatások révén szerzett génekárosodásokat sem hagyhatjuk figyelmen kívül.

Felmerül a kérdés, hogy vajon milyen tényezők tehetők felelőssé azokért a rosszindulatú laphám daganatokért, melyeknél az alkohol és a dohányzás kóroki szerepe kizárható. Számos tanulmány utal a humán papillomavírusok etiológiai szerepére.

A vizsgálatunkban résztvevő laphámrákos betegek átlagéletkora jóval magasabb volt mint a szexuálisan aktív korosztályé. Bár az igen nagymértékű dohányzás és alkoholfogyasztás bizonyos orális hedonista magatartásra utal, semmi okunk feltételezni, hogy betegeink intenzívebb és szabadosabb szexuális életet élnek minthogy az koruk és szocio-ökonómiai státuszuk, melyre a fogazati ellátottságukból következtethetünk, alapján feltételezhető. Valószínű, hogy az orális tumorokban a nagyon gyakran kimutatható HR-HPV DNS hosszú idővel a tumor megjelenése előtt került az oszító bazális sejtekbe és integrálódott azok genomjába. Potenciálisan fertőző (episzómális/cirkuláris), érintetlen E2 génszekvenciával rendelkező HPV DNS-t csupán a HPV 16 pozitív laphámrákok 7 százalékából sikerült kimutatni. Magas rizikójú HPV-t az esetek 42%-ánál detektáltunk, 12% többszörös infekciót mutatott. Ez a gyakoriság nagyjából megegyezik a korábbi laphámrák vizsgálatok eredményével, és magasabb mint amit egészséges szájnyálkahártyán illetve rákmegelőző állapotok esetén mértek [20 és annak referenciái]. Ez komoly érv a magas rizikójú HPV típusok daganatkeltő hatása mellett orális laphámrákok esetén. Azonban, vizsgálati csoportunkban statisztikai módszerekkel nem sikerült semmilyen szignifikáns különbséget kimutatni a vizsgált változók tekintetében a HR-HPV pozitív és a HR-HPV negatív betegek között

Korábbi vizsgálatok szintén inkonzisztens összefüggésekről számolnak be a vírusfertőzést és az egyéb daganatindukáló hatásokat (dohány, alkohol, bétel) tekintve [78]. Több korábbi tanulmány is beszámol arról, hogy nem tonsilla eredetű fej-nyaki laphámrákok esetén nem találtak összefüggést a HR-HPV pozitivitás és a klinikai paraméterek (tumor méret, nyirokcsomó érintettség, szövettani differenciáltság) között [8, 9, 216]. Betegcsoportunkban a dohányzás és az alkoholfogyasztás prevalenciája nagyon magas volt, mind a HR-HPV pozitív mind a negatív csoportban, de a HR-HPV nem volt szignifikánsan gyakoribb azoknál a betegeknél, akik nem voltak kitéve a két fent említett mutagén hatásnak.

A malignus transzformáció során a HPV E6/E7 proteinjei kölcsönhatásba

lépnek a sejt antionkogén fehérjével. Az E6 a p53-at, míg az E7 a Rb fehérjét képes megkötni, elősegíteni degradációjukat, így módosítani a sejtek működésének normális kontrollját. A p53 és Rb ellenőrzőpontok átugrása szükséges minden malignus tumor kialakulásához és így a fejlődő daganattól nem várható ennek a korai onkogén mechanizmusnak a megváltoztatása a fejlődés következő stádiumaiban, ha a HPV onkogénjei a tumorfejlődés korai szakaszában hatástalanították ezeket a regulátor fehérjéket. A vizsgált laphámrák mintákban nem találtunk összefüggést a magas rizikójú HPV infekció és a p53, p16^{INK4a} és Rb fehérjék kifejeződése között. Más vizsgálatok sem találtak összefüggést a p53 overexpresszió és a HR-HPV DNS jelenléte között szájüregi laphámrákok esetén [140, 197]. A p16^{INK4a} kifejeződése és az onkogén HPV infekció közötti összefüggésről több tanulmány is beszámol, bár ezt többnyire oropharyngeális/tonsilla karcinómák esetén vagy a ritka verrukózus karcinómáknál észlelték [71, 91, 150, 220, 275]. Nem találtak korrelációt a HR-HPV státusz és a p16^{INK4a} expresszió között indiai bétel eredetű szájüregi rákok esetén [94].

Bár experimentális körülmények között in vitro és anogenitális karcinómák esetén in vivo is bizonyították, hogy a HR-HPV infekció, változásokat eredményez a p53, Rb és p16^{INK4a} expressziójában, adataink arra utalnak, hogy nyilvánvaló molekuláris különbségek vannak az anogenitális és a szájüregi laphámrákok között. Vagyis, a szájüregi laphámrákokból PCR módszerrel kimutatott HR-HPV jelenléte nem egyenlő a potens E6/E7 aktivitással, azaz a fertőzés direkt, oki szerepével a karcinogenezis folyamatában [22, 275].

Összegezve, adataink arra utalnak, hogy a magas rizikójú HPV DNS jelenléte az orális laphámrákok többségében egészségtelen életmódra vagy genetikai instabilitásra utal, nem valószínű, hogy a HPV-függő anogenitális rákoknál észlelt specifikus, független és erős daganatindukáló hatása lenne. A hazai népesség életmódja mellett a magas rizikójú humán papillomavírus infekció nem tekinthető önálló kockázati tényezőnek a szájüregi laphámrákok etiológiájában.

A szájüregi laphámrákok vizsgálata során, hasonlóan másokhoz [109, 139, 180, 267, 290] nem találtunk összefüggést a p21^{WAF1/CIP1} expresszió és a p53 akkumuláció között. Ismert, hogy a vad-típusú p53 képes a WAF1/CIP1 gén

transzkripcióját felülírni, ami fokozott p21^{WAF1/CIP1} expressziót eredményez [59]. Ezt a megfigyelést támasztják alá azok a nem szájüregi rákokon végzett vizsgálatok, melyek inverz korrelációt észleltek a p21^{WAF1/CIP1} és a p53 expresszió között [147, 181, 194]. Ezt az antagonizmust mások nem észlelték [79, 273, 289]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a p21^{WAF1/CIP1} fiziológias kontrollja a p53 révén, irreleváns a „közönséges” szájüregi laphámrákok immunfenotípusa szempontjából, mivel a tumor progressziójához a legfontosabb antionkogének individuális inaktiválására van szükség.

A p21^{WAF1/CIP1} expresszió szabályozása történhet p53-independens [168, 230] és p53-dependens útvonalon [56, 58]. A működőképes p21^{WAF1/CIP1} képes gátolni a tumor növekedését még akkor is, ha mutációk vagy deléciók inaktiválják mindkét funkcionális p53 allélt, és a tumor progresszióinak kedvez a funkcionális p21^{WAF1/CIP1} expresszió elvesztése. Vizsgálatunkban a p53 pozitív tumorok 60,3 százaléka overexpresszálta a p21^{WAF1/CIP1} antigént, ami alig különbözött a teljes mintában mérttől (61,3%). Feltételezhető, hogy a maradék tumorok immunonegatívak voltak egyéb utakon lejátszódó antionkogén inaktiváció révén [39, 222]. Eredményeink alátámasztják azt a megállapítást, hogy mind p53-dependens, mind p53-independens mechanizmusok szabályozzák a p21^{WAF1/CIP1} expresszióját szájüregi laphámrákok esetén, és az aktív p53 protein kiiktatása sem tudja teljesen megszüntetni a funkcionális p21^{WAF1/CIP1} antiproliferációs aktivitását.

Mintáinkban a p21^{WAF1/CIP1} overexpresszió szignifikáns összefüggést mutatott a tumor méretével ($p=0,005$), a regionális nyirokcsomó érintettséggel ($p=0,002$), a klinikai stádiummal ($p<0,001$), és a tumor helyével ($p=0,002$). A p53 esetén, hasonlóan más vizsgálatokhoz, nem találtunk ilyen összefüggéseket [87, 122, 128]. A p21^{WAF1/CIP1}-et overexpresszáló szájüregi laphámrákos betegeknél már 18 hónap után szignifikánsan csökkent túlélést észleltünk (5. ábra). A vizsgált betegek 27,4%-a ajakrákos volt, ami általában alacsonyabb klinikai stádiumú és szövettani grádusú diagnosztizáláskor, így jobb prognózisú, mint a szájüregben jelentkező daganatok. Továbbá, a napsugárzás-indukálta DNS károsodás fontosabb az ajakrákok genézisében, mint a mutagén hatású dohányzás és alkoholfogyasztás [188]. Ritkábban észleltünk p21^{WAF1/CIP1} pozitívítást ajakrákoknál, mint egyéb lokalizációk esetében, ami az ajakrákos esetek alacsonyabb daganat stádiumának tulajdonítható.

Azonban, sem a kimenetel, sem a p53 vagy a proliferációs markerek expressziója nem különbözött szignifikánsan az azonos p21^{WAF1/CIP1} státuszú egyéb esetektől. Ez a véletlenszerű fizikai és kémiai mutagének hasonló hatását jelezheti a malignus epiteliális őssejtek evolúciójára.

A megállapítást, hogy laphámrákok esetén az emelkedett p21^{WAF1/CIP1} expresszió szignifikáns összefüggést mutat a rosszabb prognózissal, korábbi vizsgálatok is alátámasztják mind a szájüregben [61], mind más régiókban [181, 186, 299]. Ellenkező eredményekről számoltak be emlő [116], tüdő [129], légcső [114] és nyelv [290] laphámrákok esetén. Ezek az ellentmondó eredmények az jelzik, hogy a p21^{WAF1/CIP1} expresszió és a prognózis közötti összefüggés komplex, tumor-típus függő és valószínűleg függ az etiológiai tényezőktől is. Néhány tanulmány megállapítása szerint, a kombinált p53/p21^{WAF1/CIP1} expresszió csökkent túlélési időre utalhat, míg a p21^{WAF1/CIP1} vagy a p53 önmagában nem szignifikáns prognosztikai változó [295]. Más vizsgálatok szerint a p21^{WAF1/CIP1} és a p53 együtt biztosabb prognózist ad, mint ha a két tényezőt külön-külön vizsgáljuk [290]. A mi megfigyelésünk szerint, bár a p53+/p21+ immunhisztokémiai fenotípus szignifikánsan (p=0,046) rosszabb prognózisra utal mint a p53-/p21- vagy p53+/p21- fenotípus, de a p21^{WAF1/CIP1} immunpozitivitás önmagában erősebb prognosztikai faktor (p=0,018).

Vizsgálatunkban szignifikáns korrelációt találtunk a p21^{WAF1/CIP1} és a Ki-67 (p=0,010) illetve a cyclin D1 (p<0.001) expressziója között orális laphámrákok esetén, azonban a p21^{WAF1/CIP1} pozitivitás és a szövettani differenciáltság közötti összefüggés nem volt szignifikáns. Ez a megfigyelés arra utal, hogy míg a p21^{WAF1/CIP1} inaktivációja a tumor differenciálódásának későbbi stádiumába tolódott, addig a p53-at muszáj a tumor progresszió korai lépései során semlegesíteni, egyébként a daganat nem tudna növekedni. A genom olyan mutációi melyek inaktív p53 és p21^{WAF1/CIP1} proteinek termelődéséhez vezetnek magasabb mutagenézis frekvenciára és genomiális instabilitásra utalnak, ami révén az ilyen tumorer gyorsabban nőnek mint a többiek. Említésre méltó, hogy a p21^{WAF1/CIP1} pozitivitás szignifikánsan gyakoribb volt előrehaladott (T≥3, N≥1) klinikai stádiumokban (p<0.001), ami alátámasztja a korábbi feltételezést és összeegyeztethető a szövettani grádussal való összefüggés hiányával. Azonban, a p21^{WAF1/CIP1} pozitivitás a tumor agresszivitásának

és a kedvezőtlen prognózisnak a jele minden esetben.

Összegezve, a p21^{WAF1/CIP1} overexpresszió független a sejtciklus szabályozásában legfontosabb szerepet játszó p53 regulátor protein expressziójától. Azonban, a p21^{WAF1/CIP1} immunpozitivitás fokozott sejtproliferációra és nagyobb, metasztatizáló tumorokra utal. Eredményeink azt jelzik, hogy az immunhisztokémiai módszerekkel detektálható p21^{WAF1/CIP1} fehérje expresszió prognosztikus értékű a szájüregi laphámrákok patológiai vizsgálata során.

7. Az eredmények összefoglalása, új megállapítások

7.1. Retrospektív klinikai vizsgálat során először mértünk fel egy nagy létszámú ajak- és szájüregi laphámrákos populációt Észak-kelet Magyarországon.

7.2. Szignifikáns korrelációt találtunk a daganat mérete, a regionális nyirokcsomó áttét illetve a klinikai stádium és a túlélési idő között. A klinikai stádium a legerősebb prognosztikai faktor, az egyre magasabb stádiumokhoz, egyre rövidebb túlélés társul.

7.3. Elsőként mutattuk ki, hogy Észak-kelet Magyarországon a 45 évesnél fiatalabb korosztálynál, ahol a nemzetközi trendnél magasabb a szájüregi daganatok prevalenciája, szignifikánsan több az előrehaladott klinikai stádiumú, metasztatizáló daganat, rövidebb a túlélés.

7.4. Az ajak- és szájüregi rákok kialakulásában, régiókban a dohányzás és az alkoholfogyasztás a legnagyobb jelentőségű kockázati tényező. Előfordulásuk szignifikánsan gyakoribb a 45 év alatti korosztályban.

7.5. Elsőként állapítottuk meg, hogy Észak-kelet Magyarországon az életforma (lakóhely) nem tekinthető önálló kockázati tényezőnek az ajak- és szájüregi laphámrákok etiológiájában.

7.6. Elsőként mértük fel az észak-kelet magyarországi régióban a magas rizikójú HPV típusok előfordulási gyakoriságát szájüregi laphámrákokban.

7.7. Hazai beteganyag alapján elsőként állapítottuk meg, hogy a magas rizikójú HPV DNS jelenléte az orális laphámrákok többségében egészségtelen életmódra vagy genetikai instabilitásra utal, nem tekinthető specifikus, független és erős kockázati tényezőnek.

7.8. Elsők között igazoltuk, hogy ajak- és szájüregi laphámrákok esetén az immunhisztokémiai módszerekkel detektálható p21^{WAF1/CIP1} fehérje expresszió prognosztikus értékű. A p21^{WAF1/CIP1} immunpozitivitás fokozott sejtproliferációra, nagyobb és metasztatizáló tumorokra, ezáltal rosszabb prognózisra utal.

8. Az eredmények gyakorlati hasznosítása

- 8.1. Az ajak- és szájüregi laphámrákos betegeken végzett epidemiológiai vizsgálatok eredményeit jövőbeli eset-kontroll vizsgálatok tervezésekor kívánjuk felhasználni, melyek során egyes rizikótényezők kockázati erősségét (odds ratio) kívánjuk felmérni.
- 8.2. A vizsgálati eredményekből kiviláglik, hogy beteganyagunkban igen magas az előrehaladott stádiumú daganatok aránya. Ez a tény a szűrővizsgálatok, a korai felismerés fontosságára hívja fel a figyelmet. Kiemelt figyelmet érdemel a fiatal felnőttek csoportja.
- 8.3. Az elsődleges kockázati tényezők magas prevalenciája daganatos betegeinknél az egészségnevelés fontosságát hangsúlyozza. Prevenációs tevékenységünk során már gyermekkorban kiemelten kell kezelni az egészséges életmódra nevelést, felnőtteknél a rossz szokásokról való leszoktatást kell munkánkkal elősegíteni.
- 8.4. Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeinek, a p21^{WAF1/CIP1} prognosztikai szerepének felhasználását a szájüregi laphámrákos betegeink kezelésének tervezésekor kívánjuk hasznosítani.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1. A hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Altieri A, Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Dal Maso L, Talamini R, et al. Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol* 2004; 40: 904-9.
2. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Conrad C, Klein W, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle controll. *Cancer Res* 1998; 58: 5-13.
3. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in Doubs region of France. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1995; 31B: 301-9.
4. Annertz K, Anderson H, Biorklund A, Moller T, Kantola S, Mork L, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002; 101: 95-9.
5. Arora S, Kaur J, Sharma C, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Stromelysin 3, Ets-1 and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2272-84.
6. Ash CS, Nason RW, Abdoh AA, Cohen MA. Prognostic implications of mandibular invasion in oral cancer. *Head Neck* 2000; 22: 794-8.
7. Baatenburg, de Jong RJ, Hermans J, Molenaar J, et al. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2001; 23: 718-24.
8. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000; 20: 1301-5.
9. Baez A, Almodovar JI, Cantor A, Celestin F, Cruz-Cruz L, Fonseca S, et al. High frequency of HPV16-associated head and neck squamous cell carcinoma in the Puerto Rican population. *Head Neck* 2004; 26: 778-84.
10. Barnard NA, Scully C, Evenson JW, Cunningham S, Porter SR. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 421-4.
11. Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ Health Perspect* 1996; 104S: 569-77.
12. Barzan L, Talamini R, Franchin G, Vaccher E, Politi D, Minatel E, et al. Changes in presentation and survival of head and neck carcinomas in Northeastern Italy, 1975-1998. *Cancer* 2002; 95: 540-2.
13. Bentzen SM, Johansen LV, Overgaard J. Clinical radiobiology of squamous carcinoma of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20: 1197-206.

14. Bettendorf O, Herrmann G. Prognostic relevance of Ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64: 200-5.
15. Bhaskar BP, Smith RG, Baughman RA. Oral squamous cell carcinoma in identical twins: Report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46: 1096-8.
16. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 3282-7.
17. Bohmfalk C, Zallen RD. Verrucous carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg* 1982; 54: 15-20.
18. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
19. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, Talamini R, Francheschi S, Negri E, La Cecchia C. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1091-4.
20. Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoi E, Danassi-Afentaki D, et al. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000; 13: 644-53.
21. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-8.
22. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 998-1006.
23. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002 38: 99-166.
24. Breimer LH. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog* 1990; 3: 188-97.
25. Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD. Type II nitric oxide synthase (NOS2) expression correlates with lymph node status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 129-34.
26. Bryan TM, Reddel RR. SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncol* 1994; 5: 331-57.
27. Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1994; 30B: 323-8.
28. Busquets JM, Garcia HA, Trinidad-Pinedo J, Naez A. Clinicopathologic characteristics of head and neck squamous cell carcinoma in Puerto Ricans. *P R Health Sci J* 2003; 22: 259-64.
29. Calhoun KH, Fulmer P, Weiss R. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 1994; 104: 1199-205.
30. Carinci F, Pelucchi S, Farina A, Bonsetti G, Mastrandrea M, Calearo C. Site-dependent survival in cancer of the oral cavity. *J Craniofac Surg* 1997; 8: 399-403.
31. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004; 108: 741-9.

32. Chandu A, Adams G, Smith ACH. Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 514-20.
33. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 305-17.
34. Chang KC, Su IJ, Tsai ST, Shieh DB, Jin YT. Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in Taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. *Oncology* 2002; 63: 362-9.
35. Charabi B, Tørring H, Kirkegaard J, Hansen HS. Oral cancer – results of treatment in the Copenhagen University Hospital. *Acta Otolaryngol Suppl* 2000; 543: 246-7.
36. Charabi S, Balle V, Charabi B, Berthelsen A, Thomsen J. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: the results of the surgical and non-surgical therapeutic modalities in a consecutive series of 156 patients treated in Copenhagen county. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997; 529: 226-8.
37. Chen TM, Pecoraro G, Defendi V. Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Res* 1993; 53: 1167-71.
38. Chen YK, Huang HC, Lin LM, Lin CC. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol* 1999; 35: 173-9.
39. Cheng J, Huang H, Pak J, Shapiro E, Sun TT, Cordon-Cardo C, et al. Allelic loss of p53 gene is associated with genesis and maintenance, but not invasion, of mouse carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Res* 2003; 63: 179-85.
40. Cole RD, McGuirt WF. Prognostic significance of skin involvement for mucosal tumors of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 1246-8.
41. Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H, et al. EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol* 2003; 14: 128-49.
42. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 157-60.
43. Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL, Cummings G. Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* 1984; 54: 2995-3001.
44. Cruz I, van der Brule AJC, Brink AATP, Snijders PJF, Walboomers JMM, van der Waal I, Meijer CJLM. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000; 86: 356-61.
45. Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, et al. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papillomavirus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 755-61.
46. Daniele E, Rodolico V, Leonardi V, Tralongo V. Prognosis in lower lip squamous cell carcinoma: Assessment of tumor factors. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 319-24.
47. Daroca PJ, Dhurandhar HN. Basaloid carcinoma of uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 1980; 4: 235-9.
48. De Stefani E, Oreggia F, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Ronco A, Mendilaharsu M. Tomatoes, tomato-rich foods, lycopene and cancer of the upper aerodigestive tract: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol* 2000; 36: 47-53.

49. de Vincente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, Lopez-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 2002; 38: 301-8.
50. de Vincente JC, Recio OR, Pendas SL, Lopez-Arranz JS. Oral squamous cell carcinoma of the mandibular region: A survival study. *Head Neck* 2001; 23: 536-43.
51. de Vincente JS, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernandez-Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41: 283-93.
52. de Visscher JGAM, Schaapveld M, Otter R, Visser O, van der Waal I. Epidemiology of cancer of the lip in the Netherlands. *Oral Oncol* 1998; 34: 421-6.
53. de Visscher JGAM, van der Waal I. Etiology of cancer of the lower lip: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27: 199-203.
54. Dellarco VL. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat Res* 1988; 195: 1-20.
55. Diniz-Freitas M, Garcia.Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42: 190-200.
56. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; 76: 1013-23.
57. Edington KG, Loughran OP, Berry IJ, Parkinson EK. Cellular immortalita: a late even in the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck associated with p53 alteration and a high frequency of allele loss. *Mol Carcinog* 1995; 13: 254-65.
58. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-74.
59. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
60. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity in young patients. A distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1463-70.
61. Erber R, Klein W, Andl T, Enders C, Born AI, Conradt C, et al. Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 1997; 74: 383-9.
62. Fabricius EM, Gurr U, Wildner GP. Telomerase activity levels in the surgical margin and tumour distant tissue of the squamous cell carcinoma of the head-and-neck. *Anal Cell Pathol* 2002; 24: 25-39.
63. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 637-40.
64. Field JK, Spandidos DA. Expression of oncogenes in human tumors with special reference to the head and neck region. *J Oral Pathol* 1987; 16: 97-107.

65. Fife KH, Fan L, Fritsch, et al. Association of human papillomavirus type 11 DNA with squamous cell carcinoma of the tongue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 1404-8.
66. Fillies T, Buerger H, Gaertner C, August C, Brandt B, Joos U, et al. Catenin expression in T1/2 carcinomas of the floor of the mouth. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 907-11.
67. Franceschi S, Bidoli E, Baron AE, Barra S, Talamini R, Serrainao D, et al. Nutrition and cancer of the oral cavity and pharynx in North-East Italy. *Int J Cancer* 1991; 47: 20-5.
68. Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 567-75.
69. Franceschi S, Munoz N, Snijders PJ. How strong and how wide is the link between HPV and oropharyngeal cancer? *Lancet* 2000; 356: 871-2.
70. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and oesophagus in Northern Italy. *Cancer Res* 1990; 50: 6502-7.
71. Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16INK4a immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1291-7.
72. Frierson HF, Cooper PH. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Hum Pathol* 1986; 17: 346-54.
73. Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet* 1999; 354: 1442-3.
74. Funk GF, Hynds Karnell L, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment and outcome of oral cavity cancer: a national cancer database report. *Head Neck* 2002; 24: 165-80.
75. Gandour-Edwards R, Trock B, Donald PJ. Predictive value of cathepsin-D for cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1999; 21: 718-22.
76. Gandour-Edwards R, Trock BJ, Gumerlock P, Donald PJ. Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 610-5.
77. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2003; 39: 222-31.
78. Gervasio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J* 2001; 12: 57-61.
79. Giannoudis A, Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer* 2000; 89: 1300-7.
80. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.

81. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 191-9.
82. Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36: 252-60.
83. Goldenberg D. Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 646-9.
84. Gonzales-Moles MA, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Martinez AB, Morales-Garcia P, Gonzales-Moles S. P16 expression in squamous carcinomas of the tongue. *Onkologie* 2002; 25: 433-6.
85. Gonzales-Moles MA, Ruiz-Avila I, Martinez JA, Gil-Montoya JA, Esteban F, Gonzales-Moles S, et al. p21 WAF1/CIP1 protein and tongue cancer prognosis. *Anticancer Res* 2004; 24: 3225-31.
86. Gonzalez-Moles MA, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Gonzalez-Moles S. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 394-7.
87. Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez-Fernandez J, Sanchez-Fernandez E, Rodriguez-Achilla A, Ruiz-Avila I, et al. P53 protein expression in oral squamous cell carcinoma. Survival analysis. *Anticancer Res* 2001; 21: 2889-94.
88. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: A case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 546-52.
89. Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, et al. Extent of extracapsular spread. A critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 2003; 97: 1464-70.
90. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
91. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003; 107: 394-400.
92. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
93. Heim S, Johansson B, Mertens F. Constitutional chromosome instability and cancer risk. *Mutat Res* 1989; 221: 29-51.
94. Heinzl PA, Balaram P, Bernard HU. Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers. *Int J Cancer* 1996; 68: 420-3.
95. Hermsen MA, Joenje H, Arwert F, Welters MJ, Braakhuis BJ, Bagnay M, et al. Centromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15: 1-9.
96. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1772-83.

97. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, et al. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer* 2005; 41: 453-60.
98. Hoffman D, Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV. Tobacco-specific N-nitrosamines and areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 1994; 41: 1-52.
99. Homann N, Tillonen J, Meurman J, Rintamäki H, Lindqvist C, Jousimies-Somer H, et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 57-9.
100. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol* 2001; 37: 153-8.
101. Horsfall MJ, Gordon AJ, Burns PA, Zielenska M, van der Vliet GM, Glickman BW. Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ Mol Mutagen* 1990; 15: 107-22.
102. Hsu TC, Furlong C. The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res* 1991; 11: 1995-8.
103. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasatok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 84-8.
104. IARC Working Group. Alcohol drinking. In: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 44. Lyon. IARCPress, 1988.
105. IARC Working Group. Human Papillomaviruses. In: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64. Lyon. IARCPress, 1995.
106. IARC Working Group. Solar and ultraviolet radiation. In: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 55. Lyon. IARCPress, 1992.
107. IARC Working Group. Tobacco habits other than smoking; betel-quid and areca-nut chewing; and some related nitrosamines. In: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 37. Lyon. IARCPress, 1985.
108. IARC Working Group. Tobacco smoking. In: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 38. Lyon. IARCPress, 1986.
109. Ibrahim SO, Lillehaug JR, Vasstrand EN. Mutations of the cell cycle regulatory genes p16INK4A and p21WAF1 and the metastasis-inducing gene S100A4 are infrequent and unrelated to p53 tumor suppressor gene status and data on survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23: 4593-600
110. Idle JR. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat Res* 1991; 247: 259-66.

111. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 315-23.
112. Ildstad ST, Bigelow ME, Remensnyder JP. Squamous cell carcinoma of the tongue: a comparison of the anterior two-thirds with its base. *Am J Surg* 1983; 146: 456-61.
113. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 901-5.
114. Jeannon JP, Soames J, Lunec J, Awwad S, Ashton V, Wilson JA. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1) and p53 tumor suppressor gene in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol* 2000; 25: 23-7.
115. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1654-8.
116. Jiang M, Shao ZM, Wu J, Lu JS, Yu LM, Yuan JD, et al. p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int J Cancer* 1997; 74: 529-34.
117. Jones AS, England J, Hamilton J. Mandibular invasion in patients with oral and oropharyngeal squamous carcinoma. *Clin Otolaryngol* 1997; 22: 239-45.
118. Jones AS. Prognosis in mouth cancer: tumour factors. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1994; 30B: 8-15.
119. Jovanovic A, Schulten EAJM, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I: Tobacco and alcohol related to the anatomic site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 459-62.
120. Kabat GC, Wynder EL. Type of alcoholic beverage and oral cancer. *Int J Cancer* 1989; 43: 190-4.
121. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1599-605.
122. Kapranos N, Stathopoulos GP, Manolopoulos L, Kokka E, Papadimitriou C, Bibas A, et al. p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res* 2001; 21: 521-8.
123. Kashiwazaki H, Tonoki H, Tada M, Chiba I, Shindoh M, Totsuka Y, et al. High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene* 1997; 15: 2667-74.
124. Kásler M (ed.). *Az onkoterápia irányelvei. B+V (medical&technical) Lap- és Könyvkiadó Kft. 2001. pp. 41-58.*
125. Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effect on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992; 98: 87-94.
126. Kleist B, Bankau A, Lorenz G, Jäger B, Poetsch M. Different risk factors in basaloid and common squamous head and neck cancer. *Laryngoscope* 2004; 114: 1063-8.
127. Knudson AG. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. *Cancer Res* 1989; 63: 1888-91.

128. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, et al. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 468-74.
129. Komiya T, Hosono Y, Hirashima T, Masuda N, Yasumitsu T, Nakagawa K, et al. p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1831-5.
130. Kopp M, Csoboth Cs. Önkárosító magatartásformák a magyar népesség körében. *Magy Onkol* 2001; 45: 139-42.
131. Koscielny S, Eggeling F, Dahse R, Fiedler W. The influence of reactivation of the telomerase in tumour tissue on the prognosis of squamous cell carcinomas in the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 538-42.
132. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003; 107: 401-6.
133. Kouros M, Monch W, Reiffer FJ, Dehnen W. The influence of various factors on the methylation of DNA by the oesophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. I. The importance of alcohol. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1081-4.
134. Kowalski LP, Carvalho AL, Priante AVM, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41: 534-41.
135. Központi Statisztikai Hivatal. A KSH jelenti 2001/2. Központi Statisztikai Hivatal, Budapest 2001; 18-22.
136. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467-75.
137. Kreimer AR, Randi G, Herrero R, Castellsague X, Vecchia CL, Franceschi S. Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: Analysis from the IARC multinational case-control study. *Int J Cancer* 2005 Dec 5 [Epub ahead of print]
138. Krogh P, Hald B, Holmstrup P. Possible mycological aetiology of oral mucosal carcinoma: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in the production of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1543-8.
139. Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Sato S, Nikai H. Expression of p53 and p21CIP1/WAF1 proteins in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 1999; 6: 539-45.
140. Kumar RV, Kadkol SS, Daniel R, Shenoy AM, Shah KV. Human papillomavirus, p53 and Cyclin D1 expression in oropharyngeal carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 539-43.
141. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPs, MTMMP and TIMP in squamous cell carcinoma of the oral cavity: Correlation with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999; 21: 627-38.

142. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. Basaloid and warty carcinomas of the vulva: distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 133-45.
143. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in cancer mortality in Europe. *Oral Oncol* 2004; 40: 433-9.
144. La Vecchia C, Taviani A, Francheschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997; 33: 302-12.
145. Langdon JD, Harvey PW, Rapidis AD, Patel MF, Johnson NW. Oral cancer: the behaviour and response to treatment of 194 cases. *J Maxillofac Surg* 1997; 5: 221-37.
146. Leclerc A, Brugere J, Luce D, Point D, Guenel P. Type of alcoholic beverage and cancer of the upper respiratory and digestive tract. *Eur J Cancer* 1987; 23: 529-34.
147. Lele SM, Pou AM, Ventura K, Gatalica Z, Payne D. Molecular events in the progression of recurrent respiratory papillomatosis to carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1184-8.
148. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S, Monnier P. Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 1998; 77: 705-9.
149. Li FP. Molecular epidemiology of familial cancers. *Br J Cancer* 1993; 68: 217-9.
150. Li W, Thompson CH, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, et al. The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck* 2004; 26: 1-9.
151. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994; 54: 6078-82.
152. Lieber CS. Herman Award Lecture, 1993: A personal perspective on alcohol, nutrition and the liver. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 430-42.
153. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikollajczak A, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 25-33.
154. Liu CJ, Chang KW, Chao SY, Kwan PC, Chang SM, Yen RY, et al. The molecular markers for prognostic evaluation of areca-associated buccal squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 327-34.
155. Lo Muzio L, Falaschini S, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Campisi G, et al. Bcl-2 as prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Res* 2005 15: 249-55.
156. Lockhart PB, Norris CM jr, Pulliam C. Dental factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 1998; 34: 133-9.
157. Lustig JP, Lugassy G, Neder A, Sigler E. Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia – report of a case and review of the literature. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1995; 31B: 68-72.
158. Maier H, Dietz A, Dewelke U, Heller WD. Occupational exposure to hazardous substances and risk of cancer in the area of the mouth cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. A case-control study. *Laryngorhinootologie* 1991; 70: 93-8.

159. Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czeglédy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *J Clin Pathol* 2005; 58: 51-5.
160. Manos MM, et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 45: 644-9.
161. Mashberg A, Meyers H. Anatomical site and size of 222 early asymptomatic oral squamous cell carcinomas: a continuing prospective study of oral cancer II. *Cancer* 1976; 37: 2149-215.
162. Matsuda H, Konishi N, Hiasa Y, Hayashi I, Tsuzuki T, Tao M, et al. Alterations of p16/CDKN2, p53 and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 232-8.
163. McCleod MC, Zachary K. Involvement of the exocyclic amino group of deoxyguanosine in DNA-catalysed carcinogen detoxification. *Carcinogenesis* 1985; 6: 147-9.
164. McGurk M, Chan C, Jones J, O'regan E, Sherriff M. Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2005; 43: 281-4.
165. Mercante G, Bacciu A, Ferri T, Bacciu S. Gastroesophageal reflux as a possible co-promoting factor in the development of the squamous-cell carcinoma of the oral cavity, of the larynx and of the pharynx. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 2003; 57: 113-7.
166. Merletti F, Boffetta P, Ferro G, Pisani P, Terracini B. Occupation and cancer of the oral cavity or oropharynx in Turin, Italy. *Scand J Work Environ Health* 1991; 17: 248-54.
167. Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Yoshioka N, Yoshihama Y, Kishimoto K, et al. Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2002; 9: 341-4.
168. Michieli P, Chetid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54: 3391-5.
169. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 622-35.
170. Miller CS, White DK, Lexington K. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol* 1996; 82: 57-68.
171. Mohit-Tabatabai MA, Sobel HJ, Rush BF, Mashberg A. Relation of thickness of floor of mouth stage I and II cancers to regional metastasis. *Am J Surg* 1986; 152: 351-3.
172. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapidra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V: Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000; 36: 170-4.
173. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel RM. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63: 4417-21.
174. Munoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernandez-Contreras ME, Gamallo C. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity : an indicator of poor prognosis. *Cancer* 2005; 103: 960-9.

175. Muraki Y, Tateishi A, Seta C, Fukuda J, Haneji T, Oya R, et al. Fas antigen expression and outcome of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29: 360-5.
176. Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous carcinoma of the tongue. *Cancer* 2001; 92: 3030-6.
177. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, et al. The p450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 1-14.
178. Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, et al. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2000; 86: 122-7.
179. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Soquot JE. *Oral and Maxillofacial Pathology*. W.B. Saunders, Philadelphia 1995; 295-304.
180. Ng IO, Lam KY, Ng M, Regezi JA. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas--correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol* 1999; 35: 63-9.
181. Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Growth pattern and expressions of cell cycle regulator proteins p53 and p21WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 1828-35.
182. Nordby KC, Andersen A, Kristensen P. Incidence of lip cancer in the male Norwegian agricultural population. *Cancer Causes Control* 2004; 15: 619-26.
183. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fischer C, Archer D, Eccles S, et al. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early tongue cancer. *Oral Oncol* 2003; 39: 386-90.
184. Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *Oral Maxillofac Surg* 1996; 54: 949-54.
185. Olsen KD, Caruso M, Foote RL. Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120: 1370-4.
186. Omar EA, Behloul H, Chevalier S, Aprikian AG. Relationship of p21(WAF-I) protein expression with prognosis in advanced prostate cancer treated by androgen ablation. *Prostate* 2001; 49: 191-9.
187. Országos Dohányfüstmentes Egyesület, Magyar Gallup Intézet. Dohányzás a magyar lakosság körében 1995-2000-2004. <http://www.gallup.hu/Gallup/release/dohany2000.htm>
188. Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer* 2000; 88: 82-6.
189. Ottó SZ, Kásler M. Rákmortalitás és -incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében. *Magy Onkol* 2002; 46: 111-7.
190. Páldi A, Nádor G, Vincze I, Zsámbokiné Bakacs M, Rajcsányi Á, Pintér A. Az ajak, szájüreg és garat rosszindulatú daganatos betegsége miatti halálozás valamint a morbiditás területi különbségei Magyarországon. *Magy Onkol* 2001; 45: 106-14.
191. Pande P, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, et al. Prognostic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 491-9.

192. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J, Powell J. Estimate of worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-41.
193. Parkinson EK, Newbold RF, Keith WN. The genetic basis of human keratinocyte immortalization in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation *Eur J Cancer* 1997; 33: 727-34.
194. Pasz-Walczak G, Kordek R, Faflik M. P21 (WAF1) expression in colorectal cancer: correlation with P53 and cyclin D1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 683-9.
195. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997; 79: 595-604.
196. Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S, et al. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 1677-81.
197. Penhallow J, Steingrimsdottir H, Elamin F, Warnakulasuriya S, Farzaneh F, Johnson N, et al. p53 alterations and HPV infections are common in oral SCC: p53 gene mutations correlate with the absence of HPV 16 - E6 DNA. *Int J Oncol* 1998; 12: 59-68.
198. Pentenero M, Gandolfo S, Carrozzo M. Importance of tumor thickness and depth of invasion in nodal involvement and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. *Head Neck* 2005; 27: 1080-91.
199. Petridou E, Zavras AI, Lefatzis D, Dessypris N, Laskaris G, Dokianakis G, et al. The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2981-8.
200. Petruzzelli G. Patterns for neck recurrences. *Oral Oncol* 2005; 1: 37A
201. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol* 2004, 15: 1319-29.
202. Piffkó J, Bánkfalvi A, Öfner D, Bryne M, Rasch D, Joos U, et al. Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75: 1543-6.
203. Piffkó J, Bánkfalvi A, Öfner D, Kusch F, Bocker W, Joos U, et al. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1996; 429: 229-34.
204. Pintos J, Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP. Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aero-digestive tract: a case-control study. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 936-40.
205. Platz H, Fries R, Hudec M, Tjoa AM, Wagner RR. The prognostic relevance of various factors at the time of first admission of the patient. *J Maxillofac Surg* 1983; 11: 3-12.
206. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma – a comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimenco score and pathologic features. *Head Neck* 2002; 24: 513-20.
207. Praetorius F. HPV-associated diseases of oral mucosa. *Clin Dermatol* 1997; 15: 399-413.

208. Pugliano FA, Piccirillo JF, Zequeira MR, Fredrickson JM, Perez CA, Simpson JR. Clinical-severity staging system for oral cavity cancer: five-year survival rates. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 120: 38-45.
209. Pukkala E, Söderholm A-L, Lindqvist C. Cancers of the lip and oropharynx in different social and occupational groups in Finland. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1994; 30B, 209-15.
210. Purtilo DT, Klein G. Introduction to Epstein-Barr virus and lymphoproliferative diseases in immunodeficient individuals. *Cancer Res* 1981; 41: 4209.
211. Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 423-31.
212. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3630-3.
213. Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 5344-7.
214. Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 2136-47.
215. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993; 7: 139-46.
216. Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3187-92.
217. Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I, Brockmoller J, Likhachev A, Poznariski K, et al. High benzo(a)pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 Msp1/Msp1-GSTM1*0/*0 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 109-18.
218. Ryan DP, Mayer RJ. Anal carcinoma: histology, staging, epidemiology, treatment. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 345-52.
219. Ryu HJ, Hahn JS, Kim YS, Park K, Yang WI, Lee JD. Complete resolution of posttransplant lymphoproliferative disorder (diffuse large B-cell lymphoma) with reduction of immunosuppressive therapy. *Yonsei Med J* 2004; 45: 527-32.
220. Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 226-32.
221. Sakai E, Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 1992; 7: 927-33.
222. Sanz-Ortega J, Valor C, Saez MC, Ortega L, Sierra E, Poch J, et al. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13 allelic deletions accumulate in the dysplastic spectrum of laryngeal carcinogenesis and precede malignant transformation. *Histol Histopathol* 2003; 18: 1053-7.

223. Sarasin A: The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res* 1999; 428: 5-10.
224. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 268-74.
225. Schneider V, Kay S, Lee HM. Immunosuppression as a high risk factor in the development of condyloma acuminata and squamous neoplasia of the cervix. *Acta Cytol* 1983; 27: 220-4.
226. Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from a hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. Review. *Oral Oncol* 2002; 38: 227-34.
227. Scully C. Viruses and oral squamous carcinoma. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1992; 28B: 57-59.
228. Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol* 1998; 14: 67-95.
229. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196: 33-40.
230. Sheikh MS, Garcia M, Zhan Q, Liu Y, Fornace AJ, Jr. Cell cycle-independent regulation of p21Waf1/Cip1 and retinoblastoma protein during okadaic acid-induced apoptosis is coupled with induction of Bax protein in human breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1599-607.
231. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-7.
232. Shibuya K, Mathers CD, Bischi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002; 2: 37.
233. Shintani S, Li C, Mihara M, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Skp2 and Jab1 expression are associated with inverse expression of p27(KIP1) and poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oncology* 2003; 65: 355-62.
234. Sigurgeirsson R, Lindelof B. Lichen planus and malignancy. An epidemiological study of 2071 patients and a review of the literature. *Arch Dermatol* 1991; 127: 1684-8.
235. Slootweg PJ, Hordijk GJ, Koole R. Autopsy findings in patients with head and neck squamous cell cancer and their therapeutic relevance. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996; 32B: 413-5.
236. Smith BD, Smith GL, Carter D, DiGiovanna MP, Kasowitz KM, Sasaki CT, et al. Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arc Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 780-5.
237. Snijders PJ, Scholes AG, Hart CA, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA, et al. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 1996; 66: 464-9.
238. Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AAM. Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol* 1982; 7: 185-92.
239. Sobin LH, Wittekind CH. Head and neck tumours. In: International Union Against Cancer (Union Internationale Contre Cancer): TNM classification of malignant tumours. Wiley-Liss, New York, 1997; 20-24.
240. Soder AI, Hoare SF, Muire S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification and increased gene dosage of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 1997; 14: 1013-21.

241. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of Rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology* 2005; 68: 314-25.
242. Speicher MR, Howe C, Crotty P, Du Manoir S, Costa J, Ward DC. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1010-3.
243. Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Lohrs U. prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 436: 102-8.
244. Storkel S, Reichert T, Reiffen KA, Wagner W. EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas – a valuable tool in estimating the patient’s prognosis. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1993; 29B: 273-7.
245. Suba Zs, Szabó Gy, Tóth-Bagi Z. A próbakimetszés szöveti képe és a prognózis összefüggései szájüregi laphámrákos esetekben. *Fogorv Szle* 1993; 86: 297-303.
246. Sudbo J, Bryne M, Johannessen AC, Kildal W, Danielsen HE, Reith A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *J Pathol* 2001; 194: 303-10.
247. Sugerma PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997; 3: 130-47.
248. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418-24.
249. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 449-55.
250. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32S: S59-S66.
251. Szentirmay Z, Pólus K, Tamás L, Szentkúti G, Kurcsics J, Csernák E, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: Molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer Met Rev* 2005; 24: 19-34.
252. Tarvainen L, Suuronen R, Lindquist C, Malila N. Is the incidence of oral and pharyngeal cancer increasing in Finland? An epidemiological study of 17383 cases in 1953-1999. *Oral Diseases* 2004; 10: 167-72.
253. Tashiro H, Abe K, Tanioka H. Familial occurrence of cancer of the mouth: Report of cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1986; 44: 322-3.
254. Tavani A, Bertuzzi M, Talamini R, Gallus S, Parpinel M, Franceschi S, et al. Coffee and tea intake and risk of oral, pharyngeal and oesophageal cancer. *Oral Oncol* 2003; 39: 695-700.
255. Tezal M, Grossi SG, Genco RJ. Is periodontitis associated with oral neoplasms? *J Periodontol* 2005; 76: 406-10.
256. Thomas GJ, Jones J, Speight PM. Integrins and oral cancer. *Oral Oncol* 1997; 33: 381-8.
257. Thomas GJ, Jones J, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999; 35: 227-33.

258. Thumfart W, Weidenbecher M, Waller G, Pesch H. Chronic mechanical trauma in the aetiology of oro-pharyngeal carcinoma. *J Maxillofac Surg* 1978; 6: 217-21.
259. Tisch M, Enderle G, Zoller J, Maier H. Cancer of the oral cavity in machine workers. *Laryngorhinootologie* 1996; 75: 759-63.
260. Toporcov TN, Antunes JLF, Tavares MR. Fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncol* 2004; 40: 925-31.
261. Tsai ST, Jin YT, Tsai WC, Wang St, Lin YC, Chang MT, et al. S100A2, a potential marker for early recurrence in early-stage oral cancer. *Oral Oncol* 2005; 41: 349-57.
262. Tsuzuki H, Sunaga H, Ito T, Narita N, Sugimoto C, Fujieda S. Reliability of platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for oral and oropharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131: 1071-8.
263. Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, Shinya T, Zsuhako W, Tamura Y, et al. Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005 Nov 7 [Epub ahead of print]
264. Uehara M, Samo K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40: 321-5.
265. Ujpál M, Matos O, Bíbok Gy, Somogyi A, Szabó Gy, Suba Zs. Diabetes and oral tumors in Hungary. *Diabetes Care* 2004; 27: 770-4.
266. Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ, Visscher DW, Maddox WA. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg* 1987; 154: 411-4.
267. van Oijen MGCT, Tilanus MGJ, Medema RH, Slootweg PJ. Expression of p21(Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 367-75.
268. Veneroni S, Silvestrini R, Costa A, Salvatori P, Faranda A, Molinari R. Biological indicators of survival in patients treated by surgery for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Oral Oncol* 1997; 33: 408-13.
269. Völter C, He YK, Delius H, Royburman A, Greenspan JS, Greenspan D, et al. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer* 1996; 66: 453-6.
270. Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol* 2003; 82: 34-50.
271. Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH. Basaloid squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Hum Pathol* 1986; 17: 1158-66.
272. Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003: 35-40.
273. Warnakulasuriya KAAS, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 376-81.
274. Weineberg Ab, Corvese D. Oxygen radicals potentiate the genetic toxicity of tobacco-specific nitrosamines. *Clin Genet* 1993; 43: 88-91.

275. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21: 1510-7.
276. Wilczynski SP, Bryan TY, Lin YX, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998; 152: 145-56.
277. Wildt J, Bundgaard T, Bentzen SM. Delay in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol* 1995; 20: 21-5.
278. Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999; 35: 257-65.
279. Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995; 17: 463-72.
280. Woolgar JA. Detailed topography of cervical lymph-node metastases from oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26: 3-9.
281. World Health Organisation. International Classification of Diseases for Oncology. WHO, Geneva, Switzerland, 1988.
282. World Health Organization. Histological definition of precancerous lesions, workshop. WHO, Geneva Switzerland, 1972.
283. Woutersen RA, Appel MJ, van Garderen-Hoetmer A, Wijnands MVW. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat Res* 1999; 443: 111-27.
284. Woutersen RA, Appelman LM, van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. *Toxicology* 1986; 41: 213-31.
285. Wright AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer – a review. *Oral Oncol* 1998; 34: 441-7.
286. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3088-92.
287. Wynford-Thomas D. Proliferative lifespan checkpoints: cell type specificity and influence on tumour biology *Eur J Cancer Oral Oncol* 1997; 33: 716-26.
288. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, et al. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin cancer Res* 1997; 3: 3-9.
289. Xie HL, Su Q, He XS, Liang XQ, Zhou JG, Song Y, et al. Expression of p21(WAF1) and p53 and polymorphism of p21(WAF1) gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1125-31.
290. Xie X, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1 expression in tongue squamous cell carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 897-902.
291. Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2 and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 1999; 86: 913-20.

292. Xie X, Clausen OP, Sudbo J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997; 79: 2200-8.
293. Xie X, De Angelis P, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 502-9.
294. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-4.
295. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 593-600.
296. Yen-Ping Kuo M, Huang JS, Kok SH, Kuo YS, Chiang CP. Prognostic role of p21WAF1 expression in areca quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 16-22.
297. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002; 55: 58-60.
298. Zbären P, Lehmann W. Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113: 762-4.
299. Zlotta AR, Noel JC, Fayt I, Drowart A, van Vooren JP, Huygen K, et al. Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol* 1999; 161: 792-8.
300. zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 427-47.
301. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-78.
302. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 690-8.

9.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. Nemes JA, Nemes Z, Márton IJ: p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2005; 34: 274-9.
2. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ: Expression of p16INK4A, p53 and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod (in press)
3. Dr. Nemes Judit, Dr. Redl Pál, Dr. Boda Róbert, Dr. Márton Ildikó: Szájüregi laphámrákok az észak-kelet magyarországi régióban I.: Demográfiai jellemzők, kliniko-pathológiai paraméterek, kezelés, recidíva, túlélés. Fogorv Szle (közlésre benyújtva)
4. Dr. Nemes Judit, Dr. Boda Róbert, Dr. Redl Pál, Dr. Márton Ildikó: Szájüregi laphámrákok az észak-kelet magyarországi régióban II.: Etiológiai tényezők. Fogorv Szle (közlésre benyújtva)

I. Táblázat

A klinikopathológiai paraméterek és rizikófaktorok valamint az 5 éves teljes túlélés összefüggései a vizsgált szájúregi laphámrákos betegcsoportban

Változó	Esetszám	Átlagéletkor (év)	5 éves teljes túlélés (%)	p-érték#
Nem				NS
férfi	100	56,66	38 (38,0)	
nő	19	61,05	8 (42,1)	
Kor				NS
≥65 év	34	-	9 (26,5)	
<65 év	85	-	37 (43,5)	
Tumor méret				p<0,001
T1, T2	84	T1 58,50	40 (47,6)	
T3, T4	35	T4 48,60*	6 (17,1)	
Nyirokcsomó metasztázis				p<0,001
Negatív	85	58,40	40 (47,1)	
Pozitív	34	57,08	6 (17,6)	
Klinikai stádium				p<0,001
I.	41	59,24	28 (68,3)	
II.	29	59,79	9 (31,0)	
III.	31	57,68	7 (22,6)	
IV.	18	48,61*	2 (11,1)	
Szöveti differenciáltság				NS
Grade I (jó)	51	59,22	22 (43,1)	
Grade II (közepes)	58	56,75	21 (36,2)	
Grade III (gyenge)	10	51,70	3 (30,0)	
Tumor helye				NS
Ajak	32	66,41*	18 (56,3)	
Nyelv	27	53,96	9 (33,3)	
Szájfenék	33	53,85	11 (33,3)	
Gingiva	8	51,75	1 (12,5)	
Retromoláris régió	6	52,67	4 (66,7)	
Palatum	9	56,89	2 (22,2)	
Egyéb	4	56,25	1 (25,0)	
Dohányzás				NS
Soha	34	64,53	14 (41,2)	
Leszokott	7	60,86	3 (42,9)	
< 20 szál/nap	29	58,28	14 (48,3)	
≥ 20 szál/nap	49	51,35*	15 (30,6)	
Alkoholfogyasztás				NS
Soha	25	63,36	11 (44,0)	
Leszokott	4	57,00	2 (50,0)	
Alkalmanként	41	58,17	17 (41,5)	
Rendszeresen	49	53,65*	16 (32,6)	
Fogazat állapota				NS
Fogatlan	30	64,80*	9 (30,0)	
Szubtotális foghiány	13	63,69	4 (30,8)	
Hiányos, pótolatlan	40	53,78	16 (40,0)	
Gondozott	15	52,73	8 (53,3)	
Elhanyagolt	21	52,95	9 (42,9)	
Lakóhely				NS
Város	72	57,72	27 (37,5)	
Falu	47	56,81	19 (40,4)	

NS = nem szignifikáns, *szignifikáns eltérés

II. Táblázat

Laphámrákos betegek 5 éves teljes túlélési adatai (%) a tumor helyének és a klinikai stádium függvényében

Lokalizáció	Teljes túlélés (%)				Összes
	St. I.	St. II	St. III.	St. IV	
Ajak	14/21 (66,7)	4/9 (44,4)	0/1 (0)	0/1 (0)	18/32 (56,3)
Nyelv	4/7 (57,1)	2/4 (50,0)	2/11 (18,2)	1/5 (20,0)	9/25 (33,3)
Szájfenék	6/8 (75,0)	2/12(16,7)	3/12 (25,0)	0/1 (0)	11/33(33,3)
Gingiva	-	0/1 (0)	0/2 (0)	1/5 (20,0)	1/8 (12,5)
Retromoláris régió	3/3 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	4/6 (66,7)
Palatum	1/2 (50,0)	0/1 (0)	1/3 (33,3)	0/3 (0)	2/9 (22,2)
Egyéb	-	0/1 (0)	1/1 (100)	0/2 (0)	1/4 (25,0)
Összes (%)	28/41 (68,3)	9/29 (31,0)	7/31 (22,6)	2/18 (11,1)	119 (100)

28/87
(32,2)

III. Táblázat

Az alkalmazott terápia

Terápia	Esetszám (%)	Korai (I.-II.) stádium (%)	Előrehaladott (III.-IV.)stádium (%)	Recidíva (%)	5 éves teljes túlélés (%)
Műtét	54 (51,0)	47 (87,0)	7 (13,0)	11 (20,4)	31 (57,4)
Műtét + sugárterápia	24 (22,6)	5 (20,8)	19 (79,2)	6 (25,0)	5 (20,8)
Sugárterápia	14 (13,2)	5 (35,7)	9 (64,3)	1 (7,1)	3 (21,4)
Kemoterápia + sugárterápia	3 (2,8)	1 (1,5)	2 (5,0)	0	0
Kemoterápia + műtét + sugárterápia	4 (3,8)	1 (1,5)	3 (7,5)	1 (25,0)	4 (100,0)
Kryoterápia	7 (6,6)	7 (100,0)	0	3 (42,8)	2 (28,6)
Összesen:	106 (100,0)	66 (62,3)	40 (37,7)	22 (20,7)	45 (42,5)

IV. Táblázat

A kliniko-pathológiai paraméterek megoszlása a dohányzás és alkoholfogyasztás függvényében (%)

	<i>dohányzás</i>		<i>p-érték[#]</i>	<i>alkoholfogyasztás</i>		<i>p-érték[#]</i>
	<i>igen</i>	<i>nem</i>		<i>igen</i>	<i>nem</i>	
Nem			0,004			0,002
Férfi	71 (91,0)	29 (70,7)		81 (90,0)	19 (65,5)	
Nő	7 (9,0)	12(29,3)		9 (10,0)	10 (34,5)	
Kor			<0,001			0,026
≥65 év	13 (16,7)	21 (51,2)		21 (23,3)	13 (44,8)	
<65 év	65 (83,3)	20 (48,8)		69 (76,7)	16 (55,2)	
Tumor helye			NS			0,033
Ajak	17 (21,8)	15 (36,6)		25 (27,8)	7 (24,2)	
Nyelv	16 (20,5)	11 (26,8)		22 (24,4)	5 (17,2)	
Szájfenék	23 (29,5)	10 (24,4)		21 (23,3)	12 (41,4)	
Gingiva	6 (7,7)	2 (4,9)		8 (8,9)	-	
Retromoláris	6 (7,7)	-		6 (6,7)	-	
Palatum	6 (7,7)	3 (7,3)		4 (4,4)	5 (17,2)	
Egyéb	4 (5,1)	-		4 (4,4)	-	
Tu. differenciáltság			NS			NS
Grade I (jó)	29 (37,2)	21 (51,2)		34 (37,8)	16 (55,2)	
Grade II (közepes)	42 (53,8)	17 (41,5)		48 (53,3)	11 (37,9)	
Grade III (gyenge)	7 (9,0)	3 (7,3)		8 (8,9)	2 (6,9)	
Klinikai stádium			0,044			NS
I.	22 (28,2)	20 (48,8)		33 (36,7)	9 (31,0)	
II.	22 (28,2)	6 (14,6)		21 (23,3)	7 (24,2)	
III.	19 (24,4)	12 (29,3)		21 (23,3)	10 (34,5)	
IV.	15 (19,2)	3 (7,3)		15 (16,7)	3 (10,3)	
Fogazat állapota			<0,001			0,005
Fogatlan	11 (14,1)	19 (46,3)		16 (17,8)	14 (48,3)	
Szubtotális hiány	5 (6,4)	8 (19,5)		11 (12,2)	2 (6,9)	
Hiányos, pótlás ø	33 (42,3)	7 (17,1)		37 (41,1)	3 (10,3)	
Gondozott	12 (15,4)	3 (7,3)		11 (12,2)	4 (13,8)	
Elhanyagolt	17 (21,8)	4 (9,8)		15 (16,7)	6 (20,7)	
Lakhely			NS			NS
Város	51 (65,4)	21 (51,2)		56 (62,2)	16 (55,2)	
Kistelepülés	27 (34,6)	20 (48,8)		34 (37,8)	13 (44,8)	
5 éves teljes túlélés			NS			NS
Él	29 (37,2)	17 (41,5)		33 (36,7)	13 (44,8)	
Meghalt	49 (62,8)	24 (58,5)		57 (63,3)	16 (55,2)	

#NS = nem szignifikáns

V. táblázat

HR-HPV pozitív és negatív laphámrákos betegek klinikopatológiai paramétereit

<i>Változó</i>	<i>HR-HPV pozitív</i>	<i>HR-HPV negatív</i>	<i>Szignifikancia*</i>
Nem			0,201
Nő	3 (9,1%)	9 (19,6%)	
Férfi	30 (90,9%)	37 (80,4%)	
Kor			0.243
≥ 65 év	5 (15,2%)	12 (26,1%)	
< 65 év	28 (84,8%)	34 (73,9%)	
Dohányzás			0,778
Igen	26 (78,8%)	35 (76,1%)	
Nem	7 (21,2%)	11 (23,9%)	
Alkoholfogyasztás			0,301
Igen	27 (81,8%)	33 (71,7%)	
Nem	6 (18,2%)	13 (28,3%)	
Fogazati státusz			0,301
Fogatlan vagy ≤5 fog	6 (22,2%)	16 (40,0%)	
Hiányos	14 (51,9%)	17 (42,5%)	
Kezeletlen, elhanyagolt	7 (25,9%)	7 (17,5%)	
Tumor méret			0,598
T1, T2	22(66,7%)	28 (60,9%)	
T3, T4	11(33,3%)	18 (39,1%)	
Nyirokcsomó metasztázis			0,372
N0	19 (57,6%)	31 (67,4%)	
N1-3	14 (42,4%)	15 (32,6%)	
Klinikai stádium			0,119
I.	8 (24,2%)	7 (15,2%)	
II.	7 (21,2%)	16 (34,8%)	
III.	8 (24,2%)	17 (37,0%)	
IV.	10 (30,4%)	6 (13,0%)	
Szövetteni differenciáltság			0,195
Grade I (jó)	9 (27,3%)	21 (45,7%)	
Grade II (közepes)	21 (63,6%)	20 (43,5%)	
Grade III (rossz)	3 (9,1%)	5 (10,8%)	
2 éves kimenetel			0,732
Él	14 (45,1%)	24 (52,2%)	
Meghalt	17 (54,9%)	22 (47,8%)	

VI. táblázat

HR-HPV prevalencia és típus a tumor helyének függvényében

Tumor helye	HR-HPV negatív	HR-HPV pozitív	HR-HPV pozitív	
			Egyszeres (HPV16)	Kettős
Nyelv	17 (40,0%)	9 (27,3%)	7 (5)	2
Szájfenék	17 (40,0%)	20 (60,6%)	18 (15)	2
Gingiva	3 (6,5%)	3 (9,1%)	3 (3)	-
Retromoláris régió	6 (13,0%)	-	-	-
Palatum	2 (4,3%)	1 (3,0%)	1 (0)	-
Egyéb	1 (2,2%)	-	-	-
Összesen 79 minta	46 (58%)	33 (42%)	29 (23)	4

VII. táblázat

Összefüggés a p53/p16/Rb immunhisztokémiai fenotípus és a HR-HPV fertőzés között

Fenotípus	HR-HPV pozitív	HR-HPV negatív	szignifikancia*
p53 pozitív	20/33 (60,6%)	25/46 (54,3%)	0,580
p53 negatív	13/33 (39,4%)	21/46 (45,7%)	
p16 pozitív	4/31 (12,9%)	9/45 (20,0%)	0,419
p16 negatív	27/31 (87,1%)	36/45 (80,0%)	
Rb pozitív	26/32 (81,3%)	37/44 (84,1%)	0,745
Rb negatív	6/32 (18,7%)	7/44 (15,9%)	

VIII. táblázat

A karcinogén szokások, a HR-HPV infekció és a sejtciklus fehérjék közötti korreláció

	dohány +alkohol	HR-HPV	p53	p16	Rb
dohány+alkohol	1,000				
HR-HPV	0,015	1,000			
p53	-0,196*	0,062	1,000		
p16	0,107	-0,093	-0,166	1,000	
Rb	-0,045	-0,037	-0,128	0,013	1,000

*p=0,042

IX. táblázatA klinikopatológiai paraméterek és a p21^{WAF1/CIP1} expresszió összefüggései

Változó	Esetszám	p21 pozitivitás	szignifikancia[#]
Kor			0,378
≥65 év	31	17 (54,8%)	
<65 év	75	48 (64,0%)	
Nem			0,807
Férfi	92	56 (60,9%)	
Nő	14	9 (64,3%)	
Dohányzás			0,116
Igen	74	49 (66,2%)	
Nem	32	16 (50,0%)	
Alkoholfogyasztás			0,536
Igen	76	48 (63,2%)	
Nem	30	17 (56,7%)	
Fogazati státusz			0,098
Fogatlan	24	13 (54,2%)	
Szubtotális foghiány	9	3 (33,3%)	
Hiányos, pótolatlan	29	19 (65,5%)	
Gonдозott	12	4 (33,3%)	
Elhanyagolt, gonдозatlan	16	12 (75,0%)	
Tumor méret			0,005
T1, T2	77	41 (53,2%)	
T3, T4	29	24 (82,8%)	
Nyirokcsomó metasztázis			0,002
N0	78	41 (52,6%)	
N1-3	28	24 (85,7%)	
Klinikai stádium			<0,001
I.	36	12 (33,3%)	
II.	30	19 (63,3%)	
III.	25	21 (84,0%)	
IV.	15	13 (86,7%)	
Szövetteni differenciáltság			0,800
Grade I (jó)	45	26 (57,8%)	
Grade II (közepes)	52	33 (63,5%)	
Grade III (rossz)	9	6 (66,7%)	
Tumor helye			0,002
Ajak	29	9 (31,0%)	
Nyelv	26	21 (80,8%)	
Szájfenék	35	23 (65,7%)	
Gingiva	6	4 (66,7%)	
Retromoláris régió	6	5 (83,3%)	
Palatum	3	3 (100,0%)	
egyéb	1	0	
2 éves kimenetel			0,018
Él	61	32 (52,5%)	
Mehalt	41	31 (75,6%)	

#P-érték vs. p21 negatív esetek

X. táblázatA p21^{WAF1/CIP1} és p53/Ki-67/cyclin D1 expresszió közötti összefüggés

	<i>p21 pozitív</i>	<i>p21 negatív</i>	<i>Összesen</i>
P53 pozitív	38 (36,2%)	25 (23,8%)	63 (60,0%)
P53 negatív	27 (25,7%)	15 (14,3%)	42 (40,0%)
Összesen	65 (61,9%)	40 (38,1%)	105 (100%)
			<i>p=0,682</i>
Ki-67 pozitív	55 (53,9%)	23 (22,6%)	78 (76,5%)
Ki-67 negatív	10 (9,8%)	14 (13,7%)	24 (23,5)
Összesen	65 (63,7%)	37 (36,3%)	102 (100%)
			<i>p=0,010</i>
Cyclin D1 pozitív	43 (40,9%)	5 (4,8%)	48 (45,7%)
Cyclin D1 negatív	22 (21,0%)	35 (33,3%)	57 (54,3%)
Összesen	65 (61,9%)	40 (38,1%)	105 (100%)
			<i>p<0,001</i>

11. Köszönetnyilvánítás

Dolgozatom nem jöhetett volna létre témavezetőm dr. Márton Ildikó bátorítása, ösztökélése és segítsége nélkül. Elsősorban őt illeti köszönet.

Köszönöm első témavezetőm Hunyadi János professzor úr munkám elindításához nyújtott segítségét.

Köszönöm társszerzőim munkáját, ötleteit, munkatársaim megértő türelmét.

Egónak, Manócskának külön...