

Egyetemi Doktori (PhD) Értekezés Tézisei

**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

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. Csak az ajak- és szájüregi (BNO-X. C00-C06) daganatokra vonatkoztatva a mortalitás férfiaknál 13,6, nők esetében 1,9/100000 lakos évente.

A szájüregi rákos megbetegedések előfordulási gyakorisága nagyobb férfiak esetén, hazánkban a férfi:nő arány 6:1. 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 szájüregi tumor. Az átlagos 5 éves túlélés 40% körüli, de ez az érték országonként és betegcsoportonként nagy szórást mutat. 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, mely prekancerózus hám diszplázia talaján alakul ki. A daganatképződés többlépcsős folyamatának legfontosabb momentumai az onkogén aktiváció és a tumor-supresszor gének elvesztése.

A szájüregi laphámrákok kialakulásának bizonyítottan legfontosabb etiológiai tényezői a dohányzás és az alkoholfogyasztás. 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.

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. 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.

3. Anyag és módszer

3.1. 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 újrvizsgálása 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. A daganat szövettani diagnózisát, differenciáltsági fokát a WHO kritériumok alapján állapítottuk meg. 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.

3.2. A humán papillomavírus kimutatása

3.2.1. DNS izolálás

Az archivált paraffin blokkokból 5-5 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.

3.2.2. 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. 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 közölttel pontosan megegyezett. 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.

3.2.3. 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.

3.3. 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.

3.4. 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 $p < 0,05$.

4. Eredmények

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

A diagnózis megállapításakor a 119 laphámrákos beteg alkotta 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 ($p = 0,002$).

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 koefficienszt (-0.423).

Az alkalmazott kezelési mód az esetek 51%-ánál műtéti kezelés volt, melyet további 22,6% esetén kiegészítettünk sugárkezeléssel. A maradék esetekben: önálló sugárterápia 13,2%, kemo- és sugárterápia 2,8%, kemoterápia-műtét-sugárkezelés 3,8%, krioterápia 6,6%. 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.

4.2. Rizikótényezők előfordulása a betegcsoportban, hatásuk a túlélésre

Az anamnézis felvétel időpontjában a 119 laphámrákos beteg 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 gyakoribb (63,9% vs. 44,7%, $p=0,039$) volt a városi populációban.

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

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 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. 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. A HR-HPV pozitivitás nem korrelált sem a tumor stádiumával, szövettani differenciáltságával sem más vizsgált faktoral. Nem sikerült szignifikáns korrelációt kimutatni a HR-HPV infekció és az abuzív szokások között.

A p53, p16^{INK4a} és Rb proteinek expressziója

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

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

4.4. 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 pozitivitás előfordulási gyakorisága 45,7% volt.

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 ($p=0,044$) 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.

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 ($p<0,001$)

5. Megbeszélés

A szájüregi daganat többnyire férfi betegség, a nemzetközi irodalmi adatok szerint a férfi:nő arány 2:1 és 16:1 között változik. Vizsgálatunkban 5,2 : 1 arányt találtunk, ami jól illeszkedik a közép-európai trendbe. A betegek átlagéletkora a diagnózis megállapításakor 57,4 (37-94) év volt, ami valamivel (nem jelentősen) alacsonyabb mint amit más vizsgálatok találtak. 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, míg egyes ázsiai országokban a bucca a leginkább érintett. 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 legelterjedtebb 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. 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. 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.

Az ajak- és szájüregi laphámrákos betegek kezelése szakmai testületek által elfogadott és széles körben alkalmazott „onkoterápiás protokoll” irányelveinek és

ajánlásainak megfelelően történt. 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 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.

Külön figyelmet érdemel a vizsgálati csoportban a 45 évesnél fiatalabb korosztály magas aránya (18,5%), mely nemzetközi viszonylatban is kiemelkedő. 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 és 60%-a fogyasztott rendszeresen alkoholt 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. Hivatalos statisztikák szerint a dohányosok 55 százaléka legalább napi egy csomag cigarettát szívott el, és a 20 éves és idősebb korosztály 11-12 százaléka minősült alkoholistának a vizsgált időszakban. 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, a dohányosoknál a szájfenéken találtuk a legtöbb rosszindulatú elváltozást.

Eset-kontroll vizsgálatok bizonyítják, hogy az alkoholos italok fogyasztása fokozza a daganatok kialakulásának kockázatát. 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, 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 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 eredményéhez, a fokozott dohány- és alkoholfogyasztáshoz csökkent túlélési idő társult, az összefüggés statisztikailag nem volt szignifikáns.

A rossz szájhygiéna és az elhanyagolt, hiányos fogazat megnövelik a szájüregi daganatok kialakulásának kockázatát. 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. Bár a fogazat állapota önmagában csupán gyenge rizikófaktor, az alkoholfogyasztással kombinálva megsokszorozzák egymás hatását. 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. 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.

Összegezőként 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 alkoholista és az erős dohányos, 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 oszló bazális sejtekbe és integrálódott azok genomjába. Potenciálisan fertőző (episzómális/cirkuláris), érintetlen E2 génszekvenciával rendelkező HPV DNS-t csupán a HPV 16 pozitív laphámrák 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. Ez komoly érv a magas rizikójú HPV típusok daganatkeltő hatása mellett orális laphámrák 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. Több korábbi tanulmány is beszámol arról, hogy nem tonsilla eredetű fejnyci laphámrák esetén nem találtak összefüggést a HR-HPV pozitívitas és a klinikai paraméterek (tumor méret, nyirokcsomó érintettség, szövettani differenciáltság) között. 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 fehérjéivel. 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 fehérjét. 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. 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. Nem találtak korrelációt a HR-HPV státusz és a p16^{INK4a} expresszió között indiai bétel eredetű szájüregi rákok esetén.

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.

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 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 felülrni, ami fokozott p21^{WAF1/CIP1} expressziót eredményez. 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. Ezt az antagonizmust mások nem észlelték. 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 és p53-dependens útvonalon. A működőképes p21^{WAF1/CIP1} képes gátolni a tumor növekedését még akkor is, ha mutációk vagy deléciók inaktíválják mindkét funkcionális p53 allélt, és a tumor progressziónak 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. 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. A p21^{WAF1/CIP1}-et overexpresszáló szájüregi laphámrákos betegeknél már 18 hónap után szignifikánsan csökkent túlélést észleltünk. 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. Ritkábban észleltünk p21^{WAF1/CIP1} pozitivitást 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, mind más régiókban. Ellenkező eredményekről számoltak be emlő, tüdő, légcső és nyelv 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. Más vizsgálatok szerint a p21^{WAF1/CIP1} és a p53 együtt biztosabb prognózist ad, mint ha a két tényezőt külön-külön vizsgáljuk. 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} pozitivitas 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 tumorok gyorsabban nőnek mint a többiek. Említésre méltó, hogy a p21^{WAF1/CIP1} pozitivitas 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} pozitivitas 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} immunpozitivitas 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.

6. Az eredmények összefoglalása, új megállapítások

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

6.2. 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.

6.3. Elsőként mutattuk ki, hogy 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.

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

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

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

6.7. 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.

6.8. 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.

7. Az eredmények gyakorlati hasznosítása

- 7.1 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.
- 7.2. 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.
- 7.3. 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.
- 7.4. Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeinek, a p21^{WAF1/CIP1} prognosztikai szerepének felhasználását a szájüregi laphámrákos betegeink kezelésének tervezésekor kívánjuk hasznosítani.

8. Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Nemes JA**, Nemes Z, Márton IJ: P21^{WAF1/CIP1} expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2005; 34: 274
IF:1.476
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)
IF:0.973
3. **Nemes JA**, Redl P, Boda R, Márton IJ: Szájüregi laphámrákok az észak-kelet magyarországi régióban I.: Demográfiai jellemzők, kliniko-pathológiai paraméterek, kezelés, recidíva, túlélés. Fogorv Szle (közlése folyamatban)
4. **Nemes JA**, Boda R, Redl P, Márton IJ: Szájüregi laphámrákok az észak-kelet magyarországi régióban II.: Etiológiai tényezők. Fogorv Szle (közlése folyamatban)

Egyéb közlemények:

1. **Nemes J.**, Alberth M.: The Ekman-Westborg and Julin trait. A report of a new case. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod (in press) **IF:0.973**
2. Kovalecz G, Alberth M, **Nemes J**: Luxálódott fiatal maradó fogak ellátása két eset kapcsán. Fogorv Szle 2005; 98: 31
3. Alberth M, Kovalecz G, **Nemes J**, Máth J, Kiss Cs, Márton I: Oral health of long-term childhood cancer survivors. Pediatr Blood Cancer 2004; 43: 88
IF:1.362
4. Alberth M, Török J, **Nemes J**, Kiss Cs, Márton I: Antineoplasztikus terápia okozta zománcszerkezeti rendellenesség. Esetismertetés. Fogorv Szle 2002; 95: 189
5. Alberth M, Gál N, **Nemes J**, Tövískes M, Máth J: 12-14 éves gyermekek „fogászati félelmének és szorongásának” hatása a fogazat állapotának alakulására. Fogorv Szle 2002; 95: 113

6. Alberth M, **Nemes J**, Török J, Makai Á, Máth J: A szülői félelem hatása a gyermek fogazati állapotára. Fogorv Szle 2001; 94: 205
7. Alberth M, **Nemes J**, Török J, Nemes Z jr: Az ADH-szindróma (Attention Deficit Hyperactivity Disorder). Áttekintés gyermekfogorvosok számára. Fogorv Szle 2001; 94: 145
8. Alberth M, Török J, **Nemes J**: A Goltz-szindrómáról egy eset kapcsán. Fogorv Szle 2001; 94: 59
9. Tar I, Nemes É, **Nemes J**, Alberth M, Keszthelyi G: A nyálimmunglobulinok (szekretoros IgA, IgM, IgG) mennyiségének és a cariesprevalencia közötti összefüggés vizsgálata deficienciákban (primer B-sejt). Fogorv Szle 1999; 92: 331
10. Alberth M, **Nemes J**, Radics T, Kiss Cs: Egy amegakaryocytás thrombocytopeniás purpurához társult zománcfejlődési rendellenesség esete. Fogorv Szle 1997; 90: 131
11. Alberth M, **Nemes J**, Szabó Cs, Keszthelyi G: Iskolafogászati kezelést kérő és nem kérő gyermekek fogazati állapota. Fogorv Szle 1996; 89: 315
12. Madléna M, Nagy G, László M, **Nemes J**, Márton S, Keszthelyi G: Cariológiai és parodontológiai szűrővizsgálatok 7, 12 és 14 éves gyermekeknél Debrecenben. II. Parodontológiai status és a kezelés szükségessége. Fogorv Szle 1995; 88: 141
13. Madléna M, Nagy G, **Nemes J**, Keszthelyi G: Cariológiai és parodontológiai szűrővizsgálatok 7, 12 és 14 éves gyermekeknél Debrecenben. I. Cariesprevalencia és a kezelés szükségessége. Fogorv Szle 1994; 87: 159
14. Madléna M, Nagy G, **Nemes J**, Keszthelyi G: Általános iskolások táplálkozási és szájhigiéniés szokásai Debrecenben. Fogorv Szle 1993; 86: 305

Összesített impakt faktor: 4.784