

Gége- és hypopharyngealis rákok jellemzése

Tumorméret és vaszkularizáció

Lukits Júlia^{1*}, Döme Balázs^{1,2}, Juhász Attila³, Paku Sándor²,
Tímár József^{1,2}, Répássy Gábor⁴

¹Országos Onkológiai Intézet,

²Semmelweis Egyetem 1.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete, Budapest,

³Debreceni Orvostudományi Egyetem Fül- Orr- Gégészeti Klinikája, Debrecen,

⁴Semmelweis Egyetem Fül- Orr- Gégészeti Klinikája, Budapest

Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a hypopharynxrákos betegek túlélése rövidebb, mint a más lokalizációjú fej-nyaki daganatban szenvedőké. Ebben a munkában 21 laryngopharyngealis rákot vizsgáltunk, hogy a tumor mérete és erezettsége mutat-e összefüggést a biológiai viselkedésbeli eltéréssel. Vizsgálataink szerint a 2. stádiumú laryngealis daganatok volumene szignifikánsan nagyobb, mint a 4. stádiumú hypopharyngealis tumoroké. A továbbiakban megvizsgáltuk a laryngo-pharyngealis daganatok érsűrűségét, érméreteit, illetve a tumorok vaszkuláris endotheliális növekedési faktor expresszióját (VEGF). Vizsgálati eredményeink nem mutattak ki különbséget a kétféle anatómiai lokalizációjú laphámrák erezettségében és VEGF-expressziójában. Ezen adatok alapján valószínűsítjük, hogy a hypopharyngealis rákok fokozottabb agresszivitásáért nem a tumor fokozottabb növekedése vagy beereződése felelős, hanem a tumorsejtek erősebb inazív hajlama. *Magyar Onkológia 44:239-245, 2000.*

A recent survey of head and neck cancer indicated a sharp difference in survival between cancer of the hypopharynx and cancers formed in other head and neck sites. We have analyzed tumor size relative to clinical stage and vascularization as possible causes for such a difference in a series of 21 patients with cancers of the laryngopharynx (11 glottic and 10 hypopharyngeal). We found that the volume of the smallest cancers of the larynx at stage 2 are significantly larger than the volume of the cancers of the hypopharynx at stage 4 ($p < 0.05$). Next, we have determined by immunohistochemistry and morphometry the microvessel density (MVD), microvessel perimeter (MVP) and VEGF expression of laryngo-hypopharyngeal cancers. Analysis of these data indicates that there is no difference in vascularization and VEGF expression between these two tumor types. These data strongly suggest that the invasive- but not the angiogenic phenotype of hypopharyngeal cancer cells could be responsible for the more aggressive biological behavior of this head and neck cancer subtype. *Lukits J, Döme B, Juhász A, Paku S, Tímár J, Répássy G: Characterization of laryngopharyngeal tumors. Tumor size and vascularization. Hungarian Oncology 44:239-245, 2000.*



Közlésre érkezett: 2000. augusztus 10.

Elfogadva: 2000. szeptember 15.

Levél cím: dr. Tímár József,

Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9. Tel: 224-8786, Fax: 224-8706, E-mail: jtimar@oncol.hu

A munkát az ETT valamint a Semmelweis Orvostudományi Egyetem (TJ) támogatták.

* A szerző a Magyar Rák Alapítvány ösztöndíjasa

Bevezetés

A fej-nyaki daganatok előfordulásának gyakorisága messze elmarad más régiók rosszindulatú daganataitól, azonban bizonyos rizikócsoportokban (alkoholisták, dohányosok) a daganatok gyakorisága igen magas. Manapság egyre nagyobb figyelem fordul a fej-nyaki daganatok felé, mert hazánkban mind előfordulásuk, mind az ezen daganatok miatti halálozás az elmúlt 20 év során dinamikusan nőtt (1).

A klinikusok és kutatók érdeklődésének másik magyarázata az, hogy bár szövettanilag ezek a daganatok meglehetősen hasonlítanak egymáshoz (laphámrákok), az egyes anatómiai lokalizációban lévő tumorok biológiai viselkedése jelentősen eltér. A gége- és hypopharynxrákok mintegy természetes modellrendszert képeznek, amelyben a nagyon hasonló szövettani szerkezetű daganatok élesen eltérő biológiai viselkedést mutatnak, így az ún. inváziós fenotípus tanulmányozására kiválóan alkalmasak. A gégerákokkal szemben a hypopharynx-tumorok sokkal agresszívebb viselkedésűek, hajlamosabbak a recidívára, nyirokcsomóáttét-képzésre, aminek magyarázatára nem elegendő anatómiai mikro környezeti különbségeket feltételezni.

A gégerákok prognosztikus faktorait széles körben tanulmányozzák. A proliferációs markerek közül a bcl2 (2) nem mutatott összefüggést a daganatok prognózisával, ugyanakkor az EGF-receptor expressziója (3), a DNS-ploidia illetve az S-fázis-arány (4,5) egyértelműen kapcsolódott a romló prognózishoz. Újabb adatok azt mutatják, hogy a mesopharynx daganatai esetében a fokozott bcl2-expresszió a sugár-érzékenység kialakulásával, míg emelkedett bax- és c-myc-szint a sugárérzékenységgel függ össze (6). Ellentmondásos a helyzet a p53-expresszió és -mutáció vonatkozásában, miután egyes szerzők szerint nincsen összefüggés a p53 szintje és a prognózis között (7), míg mások szerint a nyaki nyirokcsomóáttétek kialakulása és a p53-pozitivitás között kapcsolat mutatható ki (5, 8).

A tumor-indukált angiogenezis (TIA) a daganatos növekedés alapfeltétele, amikor a tumor-szövet nagysága meghaladja az erekből származó tápanyagok és oxigén diffúziós távolságát (9). Másrészt, a daganatok ereződése megteremti a feltételt a vaszkuláris terjedésnek is (9). Számos rosszindulatú daganatféleség esetében a TIA mértéke szoros korrelációt mutat a daganatok prognózisával (emlő-, prosztata-, gyomorrákok), azonban mások esetében ilyen összefüggés nem mutatható ki (9). Gégerákok esetében a TIA megindítását több, a laphámráksejtek által termelt növekedési faktor indítja el, ezek között a VEGF (10), az IL-8 (11) és a bFGF (12) szerepe tűnik meghatározónak. Gégerákok esetében a tumor körüli érsűrűségnek prognosztikai jelentősége van a tünetmentes túlélés (13) és a regionális nyirokcsomókba történő áttétképzés (14, 15) előrelépésének szempontjából.

Jelen vizsgálatunkban a két, szövettanilag gyakorlatilag azonos jellegű, de biológiailag éle-

sen, eltérően viselkedő glotticus és hypopharyngealis rák stádium szerinti nagyságát és érsűrűségét hasonlítottuk össze.

Beteganyag és módszerek

Beteganyag

Tanulmányunkban 21 beteg archivált tumormintáját vizsgáltuk. A betegek legfontosabb klinikai adatait az 1. táblázat tartalmazza.

A G1,2,5 esetekben a tumor a hangszalag szabad széléről eredt és subglotticus terjedést mutatott. A G9 esetben a tumor a pajzsporcot is áttörte és a praelaryngealis izomba is beteretjedt, míg a G11 jelű daganat igen korai tumor volt. A G3,4,8 jelű esetekben a tumorok supraglotticusak voltak, melyek az epiglottis laryngealis felszínéről indultak ki, míg a G6,7 jelű daganatok előrehaladott gégerákok voltak, melyek supraglotticus terjedést mutattak. Ezek a tumorok a praeepiglotticus térbe terjedtek és a G3,8 jelű esetben meggátolta a gége mozgását is.

A H jelű esetekben a tumorok hypopharyngealisak voltak melyek a recessus pyriformisból származtak. A H9,10 jelű esetek korai stádiumú daganatok voltak, a H2,3 tumorok a recessus laterális faláról eredtek és a hypopharynx felé terjedtek. A H1,4,5,6,7,8 esetekben a tumorok az egész recessust befogták és a hypopharynx laterális falát is érintették. A tumorok kezelése kombinált sebészi és lokális sugárterápiából állt.

1. táblázat.
Klinikai adatok

Sorszám	Localizáció	Hisztologia	TNM	Stage	Progresszió	Túlélés (hónap)
1	G	SCCC	T2N0M0	S2		69
2	G	SCCC	T2N0M0	S2		66
3	SG	SCCC	T2N0M0	S2		65
4	SG	SCCC	T2N0M0	S2		73
5	G	SCCC	T2N0M0	S2		51
6	G	SCCC	T2N0M0	S2		61
7	G	SCCC	T3N2M0	S4		51
8	SG	SCCC	T3N0M0	S3		50
9	G	SCCC	T3N0M0	S3	Lokális invázió	49
10	G	SCCC	T4N0M0	S4		Exit (6)
11	G	SCCC	T1N0M0	S1		8
1	H	SCCC	T3N2M0	S4		51
2	H	SCCC	T3N0M0	S3	Lokális recidíva	Exit (9)
3	H	SCCC	T4N2M0	S4	Lokális recidíva	Exit (53)
4	H	SCCC	T3N0M0	S3	Lokális recidíva	Exit (8)
5	H	SCCC	T4N3M0	S4	Lokális recidíva	Exit (12)
6	H	SCCC	T4N3M1	S4	Tüdő	Exit (3)
7	H	SCCC	T4N3M0	S4	Lokális recidíva	75
8	H	SCCC	T3N0M0	S3	Oesophagus	8
9	H	SCCC	T1N2M0	S4	Lokális recidíva	Exit (9)
10	H	SCCC	T1N0M0	S1		9

G = glotticus; SG = supraglotticus; H = hypopharyngealis
SCCC = laphámrák

Tumor-indukált angiogenezis mérése (16)

A sebészileg eltávolított daganatokat hagyományos paraffinos beágyazással dolgoztuk fel. A szövettani diagnózis felállítása után metszeteket készítettünk, melyeket Superfrost tárgylemezre vettünk fel és 37 °C-on inkubáltuk. A deparaffinálás xylol/alkohollal történt. Az endogén peroxidáz-aktivitás gátlása 10% metanolban oldott H₂O₂-vel történt. Az antigénfeltárást 1,5% proteáz K (Sigma) emésztéssel (15 perc) végeztük. A nonspecifikus kötőhelyek blokkolását 3% BSA/PBS oldattal végeztük 30 percig. Az erek azonosítására kettős immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk mely az endothelsejteket és az erek bazális membránját jelölte. Első lépésként anti-humán CD31 egér monoklonális IgG-vel (Dako, 1:40 hígítás, 1 óra, 37°C) jelöltük a metszeteket. A lekötődött egér IgG-t kecske anti-egér IgG-biotin konjugátummal (1:100, 1 óra, 37°C) jelöltük, és a komplexet Streptavidin-peroxidáz komplexszel növeltük (1:100, 15 perc, 37°C). A peroxidáz enzim előhívására DAB barna kromogént használtunk. A következőkben az erek falában lévő bazális membránt nyúl anti-laminin savóval jelöltük (DAKO, 1:50, 1 óra 37°C). Ekkor a nyúl IgG kimutatására kecske anti-nyúl IgG-biotin konjugátumot alkalmaztunk (1 óra, 37°C), végül a nyúl komplexet Streptavidin-alkalikus foszfatáz konjugátummal mutattuk ki (1:100, 45 perc). Ezt az enzimet FAST BLUE kromogénnel kékre hívtuk elő. A negatív kontrollokhoz vagy

mindkét primer savót vagy csak egy-egy primer savót hagyunk ki a lépésekből, ezek a metszetek nem adtak színreakciót. A metszeteket glicerinszelatin oldattal fedtük le.

Az érdenzitást mintánként öt 20x nagyítású látótérben CUE 2 morfometriai programmal (Olympus) mértük, melynek során az érsűrűség mellett az erek kerületét is meghatároztuk.

A VEGF kimutatására az előkezelt metszeteket poliklonális (kecske) anti-humán VEGF antitesttel jelöltük (R&D), majd megfelelő biotinált anti-kecske savóval és Streptavidin-peroxidázzal hívtuk elő.

Eredmények

A teljes-szerv metszetekben jól megfigyelhető volt az előrehaladott laryngealis rák, mint a G7 számú, supra-laryngealis és intra-laryngealis terjedése (1a. ábra), valamint a hypopharynx-tumor recessus piriformis-eredete, mint a H6 (1b. ábra).

Vizsgálatainkat 21 tumoron végeztük (1. táblázat), melyek szövettani diagnózisa valamennyi esetben laphámrák volt (dedifferenciált vagy ritka formák nem kerültek a csoportba). Tizenegy tumor gégerák volt (2.a,c ábra), míg 10 eset a hypopharynxra lokalizálódott (2.b,d ábra); a stádiumbeosztást a UICC protokoll alapján végeztük el. A betegek között a férfiak domináltak. A gégerákok többségét T2 stádiumban diagnosztizálták (6/11) s a többi eset T3 és T4 volt, ahol fatális kimenetel csak a T4 stádiumú esetben következett be. Megdöbbentő volt látni ugyanakkor, hogy a hypopharynx-tumorokat elsősorban T4 stádiumban diagnosztizálták (6/10) s a betegek többsége a vizsgálati periódus végére meghalt (1. táblázat).

Miután a hypopharynx-tumorok között a T4 stádiumúak gyakorisága sokkal nagyobb volt, felmerült, hogy a malignusabb viselkedés a T4 stádiumnak és így az egyre nagyobb tumornak köszönhető. A daganatok volumenének meghatározása azonban ezt a feltevést nem erősítette meg, mivel a gégerákok még az alacsony (T2) stádiumban is szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a T4 stádiumban lévő hypopharynx-tumorok (3. ábra).

2. táblázat.
Laryngeális és
hypopharyngeális
rákok érsűrűsége

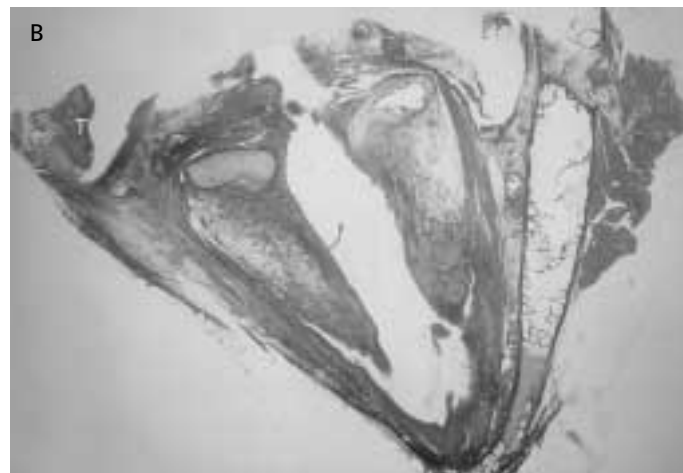
Lokalizáció	Glottis (n=11)	Hypo- pharynx (n=10)	S2-Glottis (n=6)	S4-Hypo- pharynx (n=6)
MVD (n/mm2 átlag ± S.E.M.)	211 ± 40	205 ± 20	232 ± 70	178 ± 20
MVP (µm, átlag ± S.E.M.)			96,7 ± 9,9	88,4 ± 7,3

MVD= átlagos peritumorális érdenzitás
MVP= átlagos érkerület
S= klinikai stádium

1. ábra. Gége- és hypopharynx rákok teljes szervmetszeti
1.a. ábra. Glottikus tumor (G7) szervmetszetének képe. T= Tumor



1.b. ábra. Hypopharynx tumor (H4) szervmetszetének képe. T= Tumor



A következőkben megvizsgáltuk, hogy a kisebb tumorméretet hypopharyngealis tumorok esetében okozhatja-e a tumor-indukált angiogenetikai képesség csökkenése. Az immunhisztokémiai kettős jelölés módszere (CD31 és laminin érmarkerrek együttes alkalmazása) nagy biztonsággal azonosította a tumorok körüli ereket (4.a,b ábra). A morfometriai analízis során a peritumorális érdenzitást és az erek területét határoztuk meg (2. táblázat). Először a két tumorfőleség összevont adatait hasonlítottuk össze, ahol nem voltunk tekintettel a tumorok méretére illetve T stádiumára s ebben az esetben a két csoport átlagos érdenzitása (MVD) azonosnak bizonyult. A továbbiakban annak kizárására, hogy túlságosan eltérő méretű tumorokat hasonlítunk össze, a legkisebb (T2) glotticus és a legnagyobb (T4) hypopharyngealis tumor csoportot is összehasonlítottuk, de szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk, bár a T4 hypopharyngealis tumorok érdenzitása alacsonyabb volt a T2 glottikus tumorokénál (2. táblázat). Hasonlóan nem volt eltérés az átlagos érkerületben (MVP) sem. Mérési adataink alapján megállapítható, hogy a glotticus illetve hypopharyngealis tumorok angiogenezist in-

dukáló képessége azonos. A hypopharyngealis rákok esetében összehasonlítottuk a T4 stádiumú nem-metasztatikus és nyirokcsomói áttétet képező tumorok érdenzitását is, azonban szignifikáns eltérést itt sem tapasztaltunk.

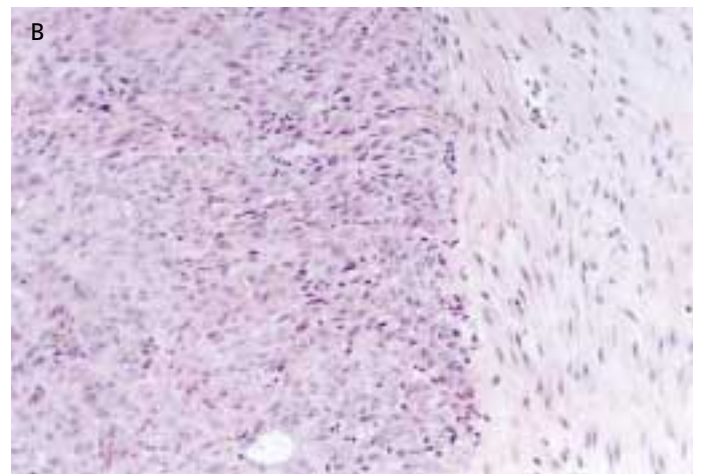
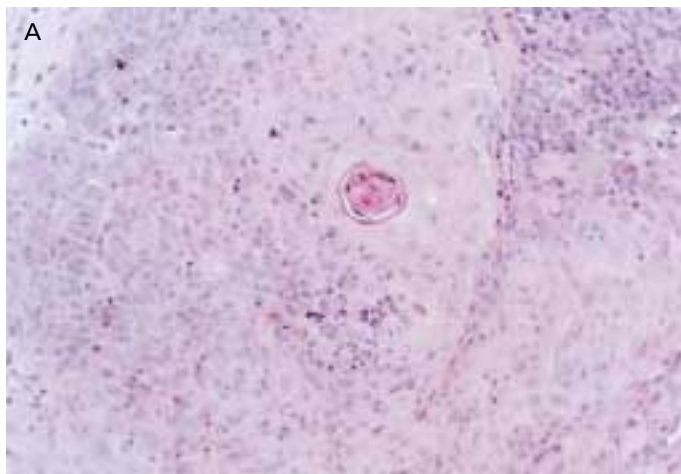
3. táblázat.
VEGF protein expressziója
gégerákokban.
(Immunhisztokémiai
analízis)

Laringealis carcinóma	VEGF+ (tumor sejt)	Hypopharyngealis carcinóma	VEGF+ (tumor sejt)
1	-	1	+
2	-	2	+
3	+	3	-
4	-	4	-
5	+	5	-
6	-	6	+
7	-	7	-
8	-	8	-
9	+	9	-
10	+	10	+
		11	-
		12	+
N=10	4	N=12	5
VEGF+ tumor = a tumorsejtek > 10%-a pozitív reakciót mutat			

2. ábra. Gége- és hypopharynxrákok szövettana.

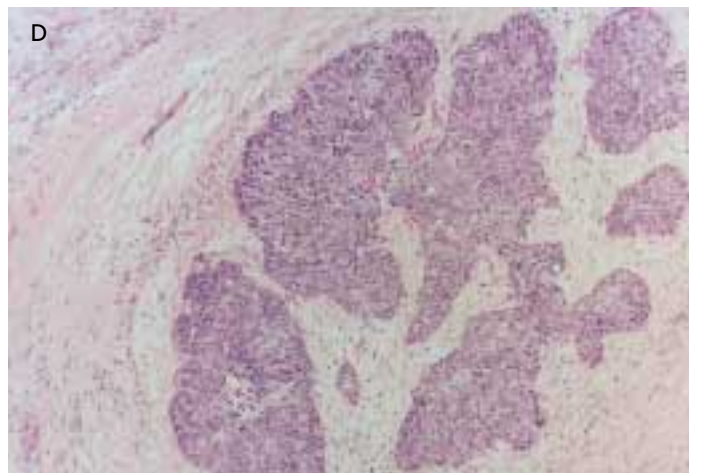
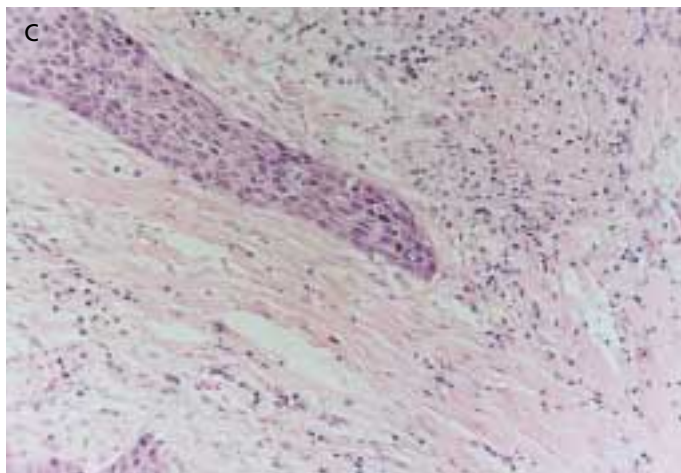
2.a. ábra. Glotticus laphámrák szövettani képe, HE festés.

2.b. ábra. Glotticus laphámrák stromális határa. HE festés. Nincs lokális invázióra utaló jel, a határ éles.

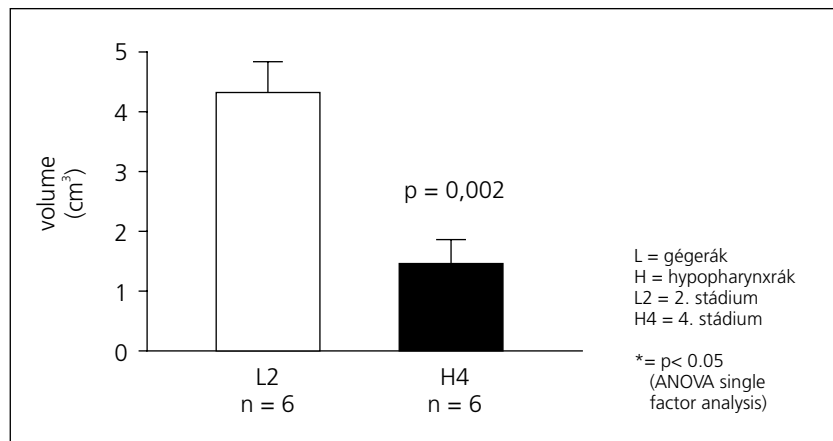


2.c. ábra. Hypopharyngealis laphámrák lokális inváziója. HE festés.

2.d. ábra. Hypopharyngealis laphámrák-szigetek a felszíntől távoli mély kötőszövetben. HE festés.



3. ábra. Gége- és hypopharynxrákok térfogatának összehasonlítása.



Végezetül arra voltunk kíváncsiak, vajon a legfontosabb érnövekedési faktor expressziójában van-e eltérés a kétféle tumor között. Ebből a célból a szövettani metszetekben a humán VEGF-et mutattuk ki immunhisztokémiai eljárással (4.c,d ábra). Megállapítottuk, hogy a kétféle tumorban gyakorlatilag azonos gyakorisággal for-

dul elő VEGF⁺ daganat és ez nem mutat összefüggést a tumorok stádiumával sem (3. táblázat).

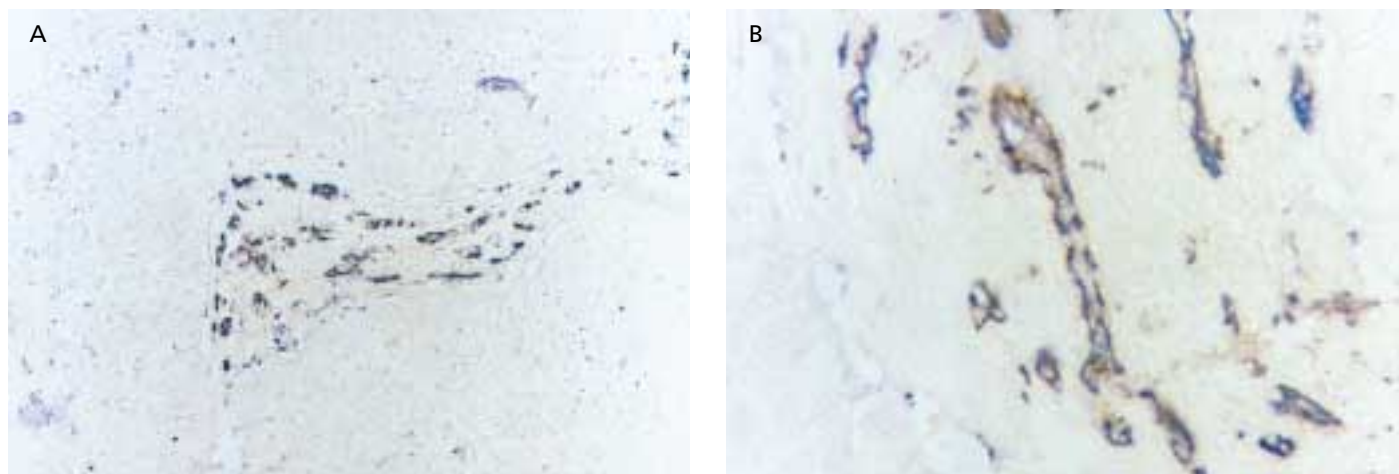
Megbeszélés

Számos markert vizsgáltak korábban a gégerákok esetében, melyek a sejtproliferációval, illetve annak szabályozásával állnak kapcsolatban. Gégerákokban a tumorprogresszió a proliferációs markerek (Ki-67, MIB-1, PCNA) expressziójával mutatott összefüggést (2,7). A különböző onkogének és onkoszuppresszor gének közül csak az EGF-receptor expressziójának szintje mutatott összefüggést a gégerákok progressziójával (17,18), a p53- és az mdm2-expresszió nem (7). Bár a larynx és hypopharynx daganatainak sarkosan eltérő biológiai viselkedése régóta ismert, igen kevés összehasonlító tanulmány kísérte meg feltárni ennek biológiai alapjait. Eltérő malignitású daganatok esetében elsőként mindig a proliferáció illetve a tumorméret összehasonlítása történik meg. Vizsgálataink arra az eredményre jutottak, hogy a hypopharyngealis tumorok még a T4 stá-

4. ábra. Immunhisztokémia.

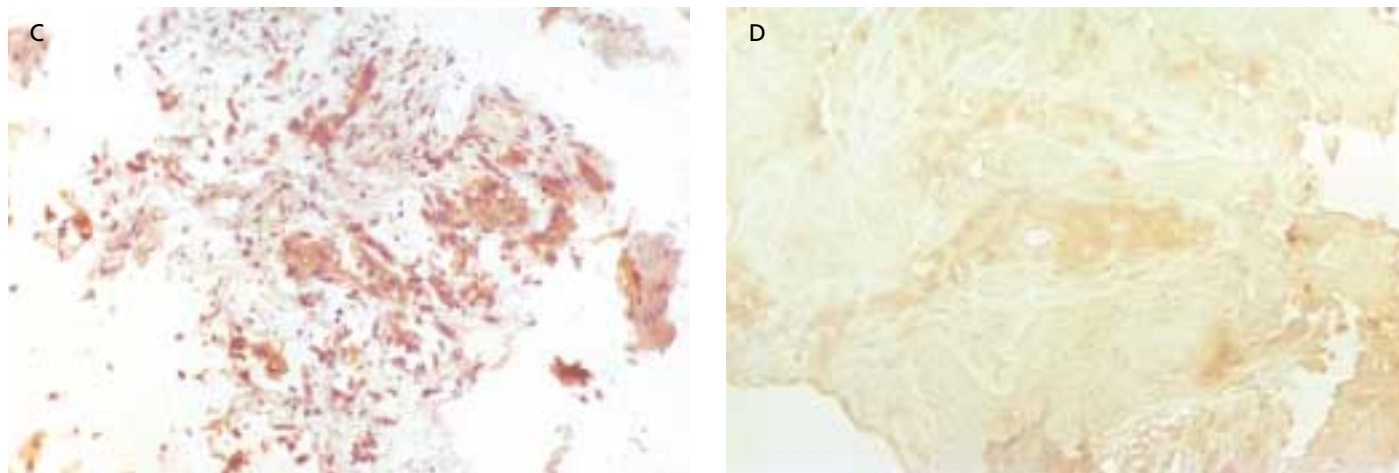
4.a. ábra. Peritumorális érhalózat immunhisztokémiai kimutatása gégerákban. Az ereket CD31 és laminin kettősjelöléssel (barna és lila szín) mutattuk ki (lásd Beteganyag és Módszerek).

4.b. ábra. Peritumorális erek nagy nagyítású képe. Figyelemre méltó a változó érnagyság.



4.c. ábra. VEGF⁺ tumorsejtek (barna reakció) gégerák biopsziás mintájában. A stromában lévő nem-daganatos sejtek nem mutatnak reakciót.

4.d. ábra. VEGF gégerák metszete. A tumorsejt-fészkek közötti stróma enyhén barnára festődött az ott jelenlévő minimális mennyiségű VEGF jeleként.



diumban is szignifikánsan kisebbek, mint a sokkal alacsonyabb stádiumban (T2) lévő glotticus tumorok. Ez arra utal, hogy a kétféle lokalizációban lévő hasonló szövettani szerkezetű daganatfésülés élesen eltérő biológiai viselkedését nem lehet a hypopharyngealis tumorok fokozottabb növekedésével magyarázni. Tulajdonképpen ennek éppen az ellenkezőjét lehet feltételezni; a lassabb növekedést. Ennek hátterében számos tényező tételvezhető fel, ezek között a csökkent proliferáló képesség illetve a csökkent angiogenetikus képesség szerepelhetnek, azonban ezekre nézve nem állnak még rendelkezésünkre irodalmi adatok.

Jelen vizsgálataink a kisszámú eset alapján is felvetik azt, hogy a sokkal invazívabb hypopharyngealis rákok ugyanolyan angiogenetikus képességgel rendelkeznek, mint a glotticus tumorok, tehát ez a tényező nem tehető felelőssé metasztatikus fenotípusukért. Érdekes azonban ebből a szempontból, hogy a sokkal nagyobb glotticus és a kicsi hypopharynx-tumorok esetében az érdenzítás azonosnak bizonyult, ami arra utalhat, hogy a nagyobb glotticus tumorokban talán még aktívabb az angiogenezis. Vizsgálataink során összehasonlítottuk a nyirokcsomókba áttétet képező és azt nem adó T4 stádiumú hypopharynx-tumorok angiogenetikus sajátosságait is, mivel irodalmi adatok alapján fej-nyaki rákokban kapcsolat mutatható ki a regionális nyirokcsomó-áttétek kialakulása és az angiogenezis között (14,15). Ezeket a megfigyeléseinket tovább erősítették azok az adataink, hogy a két tumorban azonos gyakorisággal fordulnak elő a fő angiogenezist indukáló faktort (VEGF) termelő daganatok és ez a sajátosság nem függ a tumorok aktuális stádiumától.

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy nem áll fenn kapcsolat a kétféle tumor angiogenetikus képessége és progressziós-invazív készsége között, tehát a tumorok invazív-metasztatikus fenotípusa felelős a fokozott malignitáért. Vizsgálataink arra is felhívják a figyelmet, hogy bizonyos daganattípusok esetében a proliferációs sajátosságok nem hozhatók összefüggésbe az invazív/metasztatikus sajátosságokkal, mivel a hypopharynx-tumorokban az invazív/metasztatikus képesség a gégerákokhoz képest jóval kisebb tumorméret mellett már megjelenik. Ennek fényében valószínűleg át kell gondolni az alkalmazandó terápiás stratégiát, amely hatékony gégerákok esetében, de sokkal kevésbé sikeres a lassabb növekedésű de invazívabb hypopharynx-tumorok esetében.

Irodalom

1. Beatrice F, Cammarota R, Giordano C, et al. Angiogenesis: prognostic significance in laryngeal cancer. *Anticancer Res* 18:4737-4740, 1998
2. Csuka O, Remenár É, Koronczay K, et al. Predictive value of p53, bcl2 and bax in the radiotherapy of head and neck cancer. *Pathol Oncol Res* 3:204-210, 1997
3. Dellocono FR, Spiro J, Eisma R, et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors by head and neck squamous carcinoma tumor and vascular endothelial cells. *Am J Surg* 174:540-544, 1997
4. Denhart BC, Guidi AJ, Tognazzi K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Lab Invest* 77:659-664, 1997
5. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Canc Inst* 90:587-596, 1998
6. Kraxner H, Tamás L, Járay B, et al. Search for prognostic factors in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:145-149, 1997
7. Lingen MW, Polverini PJ, Bouck NP. Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 58:5551-5558, 1998
8. Lydiatt WM, Schantz SP. Biological staging of neck cancer and its role in developing effective treatment strategies. *Cancer Metast Rev* 15:11-25, 1996
9. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 74:1253-1257, 1996
10. Murray JD, Carlson GW, McLaughlin K, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Am J Surg* 174:523-526, 1997
11. Papadimitrakopoulou VA, Shin DM, Hong WK. Molecular and cellular biomarkers for field cancerization and multistep process in head and neck tumorigenesis. *Cancer Metast Rev* 15:53-76, 1996
12. Piffkó J, Bánkfalvy Á, Öfner D, et al. Proliferative (MIB1, mdm2) versus anti-proliferative (p53) markers in head and neck cancer. An immunohistochemical study. *Pathol Oncol Res* 2:37-42, 1996
13. Remenár É. Mai lehetőségek a fej-nyak tumorok kezelésében, a megelőzés, szűrés jelentősége. *Háziiorvosi Továbbképző Szemle* 1:13-17, 1996
14. Russo A, Bazan V, Gebbia N, et al. Flow cytometric DNA analysis and lysosomal cathepsin B and L in locally advanced laryngeal cancer. Relationship with clinicopathologic parameters and prognostic significance. *Cancer* 76:1757-1764, 1995
15. Spafford MF, Koeppel J, Pan Z, et al. Correlation of tumor markers p53, bcl2, CD34, CD44H, CD44v6 and ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:627-632, 1996
16. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32A:2474-2484, 1996
17. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, et al. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:503-510, 1995
18. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med* 49:407-424, 1998