

FEJ-NYAKI RÁKOK MIKROKÖRNYEZETÉNEK HATÁSA A PROGRESSZIÓRA

Lukits Júlia

Semmelweis Egyetem, Patológia Tudományok Doktori Iskola, Budapest

Manapság egyre nagyobb figyelem fordul a fej-nyaki daganatok felé, mert Magyarországon mind előfordulásuk, mind az e daganatok miatti halálozás az elmúlt 20 év során dinamikusan nőtt. Munkánk során a különböző anatómiai lokalizációjú fej-nyaki daganatok mikrokörnyezetét vizsgáltuk, mert ennek a komplex rendszernek meghatározó szerepe van a daganatok progressziójában, és mert ez megjelent az új daganatellenes terápiák célpontjaként is. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a hypopharynxrákos betegek túlélése kedvezőtlenebb, mint a más lokalizációjú fej-nyaki daganatban szenvedőké. Megvizsgáltuk, hogy a tumor mérete és erezettsége mutat-e összefüggést a biológiai viselkedésbeli eltéréssel. Eredményeink azt mutatták, hogy a T2 stádiumú laryngealis daganatok volumene szignifikánsan nagyobb, mint a T4 stádiumú hypopharyngealis tumoroké, ugyanakkor erezettségüket és VEGF-expressziójukat illetően nem találtunk különbséget a kétféle lokalizációjú laphámrák esetében, ami arra utal, hogy a hypopharyngealis rákok fokozottabb agresszivitásáért nem a tumor növekedése vagy beereződése felelős, hanem a tumorsejtek erősebb invazív hajlama, amely feltevésünket genomikai vizsgálatok is alátámasztják. Prospektív tanulmány keretében vizsgáltuk az összefüggést a daganat mikrovaszkuláris denzitása és a kezelés sikere között, sugárkezeléssel ellátott helyileg előrehaladott szájgaratrágban szenvedő betegek esetében. Kimutattuk, hogy a sugárkezelés hatására a daganatokban létrejött érdenzitás-csökkenés a kezelésre adott válasz és a túlélés érzékeny prediktora. Az endokrin környezet esetleges szerepét is vizsgáltuk a progresszióban, ezért meghatároztuk a fej-nyaki daganatok szexhormonreceptor-státusát immunhisztokémiai módszerekkel, melyeket mRNS-szintű expresszió analízisével validáltunk. Kimutattuk, hogy az esetek közel felében az ösztrogén- és progeszteronreceptor kifejeződik fej-nyaki daganatokban. A funkcionális hormonreceptor-expresszió – ösztrogén- és progeszteronreceptor együttes megjelenése – szintén gyakori jelenség volt fej-nyaki daganatokban (40,3%), míg a szoliter hormonreceptor-expresszió ritka volt. A szexhormonreceptorok expressziója nem volt összefüggésbe hozható a betegek túlélésével, viszont a laryngo-hypopharyngealis daganatok csoportjában az ER-expresszió rövidebb túléléssel párosult ($p=0,0636$ Mantel-Cox analízissel). Multicentrikus, fázis I/II vizsgálat keretében tanulmányoztuk egy természetes leukocita-interleukin (LI) helyi adagolását követő tumor- és stromalis reakciókat T2-3 stádiumú szájüregi daganatokban. A LI-t négy különböző dózisban adagoltuk. A tumorstroma/daganatsejtfészek arány jelentősen csökkent az immunstimuláns kezelés hatására (fibrózisindukció), aminek hátterében intenzív nekrozisindukció állt. A sejtciklusban lévő sejtek meghatározásával kimutattuk, hogy a LI kezelés hatására dózisfüggően csökken a proliferáló stromális sejtek aránya, míg alacsonyabb dózisok esetében átmeneti fokozódás volt tapasztalható a daganatsejtek vonatkozásában. A LI kezelés jelentősen megnövelte az neutrofilek intraepithelialis denzitását és a klinikailag jól reagáló csoportban a stromálisat is. A CD68+ makrofágok denzitása nem változott a LI kezelést követően a tumorstromában, viszont intraepithelialisan jelentős csökkenést tapasztaltunk. Végül ezekben a tanulmányokban CD34+ ún. immunuszuppresszív mononukleáris sejteket nem találtunk a vizsgált daganatokban. Vizsgálataink megerősítik azt a nézetet, hogy a daganatos stromának, annak valamennyi komponensének jelentős szerepe van a fej-nyaki daganatok progressziójában és ezek terápiás befolyásolása kihathat a daganatok progressziójára. Magyar Onkológia 53: 51–59, 2009

Levelezési cím:

Dr. Lukits Júlia
1021 Budapest
Kuruclesi út 11/c.
E-mail:
jlukits@t-online.hu

Témavezető:

Dr. Tímár József

Kulcsszavak: fej-nyakilaphámrák, mikrovaszkulárisdenzitás, progresszió, hormonreceptorok, immunterápia

In the last 20 years the incidence and mortality of head and neck squamous cell carcinomas showed an increasing rate in Hungary. In our work we examined the microenvironment of head and neck cancers localized in different anatomical regions. Clinical evidence shows that the prognosis of hypopharyngeal tumors is poorer than that of head and neck cancers in other anatomical locations. We investigated if tumor size or vascularity correlates with the biological behavior of these tumors. The results showed that the tumor size of laryngeal cancers in T2 stage were significantly larger than that of hypopharyngeal

cancers in T4 stage. Regarding the vascularity or VEGF expression we did not find any difference between these two tumor types, suggesting that the more aggressive behavior of hypopharyngeal cancers is probably due to the invasive phenotype of this tumor, an assumption supported by genomic examination. In a prospective study we examined the relation between the microvascular density and treatment outcome in irradiated head and neck cancer patients. We demonstrated that the decreased vascularity induced by radiotherapy is a predictive marker of treatment success. We have investigated the role of the endocrine environment in tumor progression, determining the hormone receptor status of head and neck cancers using immunohistochemical and molecular methods. Results showed that ER and PGR are expressed in almost half of the examined tumors, and the presence of functional ER was also frequent in these cases (40.3%), while the solitaire hormone receptor expression was a rare phenomenon. Expression of hormone receptors in all the examined cases did not show any correlation with patient survival but in the laryngeal/hypopharyngeal group ER positivity was associated with a shortened survival ($p=0.0636$). In a multicenter phase I/II clinical trial we examined the tumoral and stromal effects of a natural leukocyte interleukin (LI) in oral squamous cell cancers. LI was administered locally in four different doses. The proportion of tumor cell nests and tumor stroma decreased significantly after LI treatment (induction of fibrosis), which was associated with the induction of necrosis. Morphometric determination of Ki-67+ cells showed a tendency of cycling stromal cells to decrease in response to treatment by the different doses of LI, while lower doses of LI produced a temporary increase in cycling tumor cells. Density of intraepithelial neutrophils was higher after LI treatment, and the stromal density of neutrophils was higher in the responder subgroup. In the tumor stroma macrophage density was similar in the treated and control cases, while a significant decrease of these cells was observed intraepithelially. Finally, we were not able to detect CD3+ immunosuppressive mononuclear cells in these tumors. Our examinations supported the theory that the tumor stroma and its components play an important role in tumor progression, and therapeutic modulation of these components can influence the progression. Lukits J. The effect of the microenvironment of head and neck cancers on tumor progression. Hungarian Oncology 53: 51–59, 2009

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, microvascular density, progression, hormone receptors, immunotherapy

BEVEZETÉS

A fej-nyaki régió laphámrákjai a progresszió szempontjából egyedülálló viselkedést mutatnak. A klinikai lefolyás azt mutatja, hogy ezek a daganatok nem az általános trendet követik, a metasztáziskaszád eltérő. A limfatikus disszemináció, a lokális recidíva, valamint a neoangiogenezis a fej-nyaki daganatok progressziójának legfőbb jellemzői. A legtöbb daganattípusban a mikrovaszkuláris denzitás (MVD) nem csak tápanyag- és oxigénforrást jelent a tumornak, hanem a hematogén áttétképzés egyik kulcseleme. Fej-nyaki laphámrákok esetében viszont az MVD leginkább a daganatok tápanyag- és oxigénellátását biztosítja, és ritkán vesz részt a hematogén áttétképzésben. Az utóbbi időben számos közlemény foglalkozik a VEGF (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor) expressziójának klinikai és biológiai jelentőségével ebben a daganattípusban, ezen belül is leginkább az angiogenikus fenotípussal. Érdekes módon, függetlenül az érdenzitástól, a VEGF-expresszió fokozódása a rossz prognózis markere fej-nyaki daganatokban, azonban ennek a mechanizmusa még nem tisztázott. Az endokrin környezet szintén fontos tényező a tumorprogresszióban olyan daganatok esetén, amelyek szexhormonreceptorokat expresszálnak, mint például az emlő- (9), prosztata- (18) vagy endometriumrák (16). Szexhormonreceptorok expresszióját megfigyelték már vaszkuláris endotheliumban (25), gégeben (15) és a tüdő epitheliumban is (17). A hormonfüggő proteinek

jelenléte a normális humán gégeszövetben valamint a gégedaganatokban alátámasztja azt a hipotézist, hogy a karcinogenezishez hormonális mechanizmusok is hozzájárulhatnak (2, 14, 22).

Az immunterápia, mely immuneffektor mechanizmusok révén pusztítja a daganatsejteket, a daganatok kezelésének specifikus formája. A fej-nyaki laphámrákokat eddig nem tartották immunterápiás célpontnak, de úttörő kutatások azt mutatták, hogy ennek a daganattípusnak az immunterápiás kezelése jó eredményeket produkál. A fej-nyaki daganatokat immunszuppresszív daganatnak tartják, bár az orális, nasopharyngealis és laryngealis nyálkahártyában normális körülmények között is számos infiltráló sejttípus kimutatható (B- és T-sejtek, antigénprezentáló dendritikus sejtek, makrofágok), ezek denzitása pedig időnként igen szembeötlő. A fej-nyaki daganatok immunszuppresszív jellegének klinikai szignifikanciája megmutatkozik a gyorsan kialakuló recidívák megjelenésében, a rövid tünetmentes periódusban, alacsony túlélési rátában.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A különböző anatómiai lokalizációjú és egyben eltérő progressziós képességű fej-nyaki daganatok erezettségének vizsgálata
2. A fej-nyaki daganatokban a sugárterápia hatására létrejött vaszkularizációs hatások tisztázása
3. Szexhormonreceptorok expressziójának vizsgálata fej-nyaki rákokban

4. Leukocita-interleukint tartalmazó citokinkeverék (LI) helyi adagolását követő stromális reakciók analízise fej-nyaki daganatokban

ANYAG ÉS MÓDSZER

Beteganyag

Vizsgálatainkat 216 fej-nyaki daganatos beteg műtétilag eltávolított anyagán végeztük. A daganatok szövettani diagnózisa minden esetben laphámrák volt. A daganatok anatómiai lokalizációja a következő volt: szájüreg (tonsilla, garatívek, szájgarat) 65 eset (30,09%), hypopharyngealis 21 eset (9,72%), glotticus 43 eset (19,9%), nyelv-, nyelvgyök 51 eset (23,61%), lágyszájpad 24 eset (11,11%), ajak 12 eset (5,55%). A TNM stádiumbeosztás szerinti megoszlás: T1 11 eset (5,16%); T2 114 eset (53,52%); T3 65 eset (30,51%) és T4 23 eset (10,79%). Nyirokcsomóáttétellel a betegek 35,21%-a rendelkezett (75 beteg), 64,78%-ban nem volt kimutatható nyirokcsomó-érintettség (138 beteg), távoli (szervi) áttétet egy esetben tapasztaltunk. A betegek életkora 41–84 év között volt.

Az érdenítés vizsgálatát archivált tumorszöveteken végeztük, melyeket a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gége Klinikájáról kaptunk. Az érdenítés és a sugárterápia összefüggését, valamint a hormonreceptorok expresszióját az Országos Onkológiai Intézetben kezelt betegek műtétilag eltávolított daganatain végeztük. A leukocita-interleukin kezelés hatásának vizsgálatát az alábbi klinikákról származó betegek anyagain végeztük: Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gége Klinikája; SE Fogászati és Szájsebészeti Klinikája, a Fővárosi Uzsoki utcai Kórház Fül-Orr-Gége és Fejnyaksebészeti Osztálya, Győri Városi Kórház (Petz Aladár) Fül-Orr-Gége Osztálya, valamint az Országos Onkológia Intézet Fejnyaksebészeti Osztálya. A tanulmányok elvégzéséhez rendelkezünk a szükséges etikai engedéllyel.

Módszerek

Immunhisztokémia. A különböző anatómiai lokalizációjú fej-nyaki daganatok éreztségének vizsgálatát archivált tumorszöveteken végeztük, kettős immunhisztokémiai jelöléssel: CD31 és laminin elleni antitestekkel. Az érnövekedési faktor expresszióját VEGF elleni antitesttel vizsgáltuk. A sugárterápia hatását a szájüregi daganatok éreztségére paraffinba ágyazott daganatokon vizsgáltuk CD34 elleni antitestet alkalmazva. Fej-nyaki laphámrákok hormonreceptor-expresszióját frissen fagyasztott daganatok metszetein mutattuk ki ER α (ösztrogénreceptor- α), ER β (ösztrogénreceptor- β) és PGR (progeszteronreceptor) elleni monospecifikus antitestekkel. A neoadjuváns leukocita-interleukin kezelés hatásának vizsgálata alkalmával az alábbi antitestekkel végeztünk immunhisztokémiai jelöléseket: CD68 (makrofágok jelölésére), CD34 (hemopoetikus

őssejtek kimutatására), CD1a (dendritikus sejtekre), anti-mieloperoxidáz (neutrofil sejtekre), CD3 (T-sejtekre), CD20 (B-sejtekre), Ki-67 (proliferáló sejtekre), CD25 (interleukin-2-receptor kimutatására). Minden esetben izotípus-kontroll mintát is készítettünk.

Hisztokémia. A fej-nyaki daganatok epitheliális komponensének valamint a stroma mennyiségének arányát két módszer segítségével határoztuk meg: először a metszeteket Mallory-trichrom festéssel jelöltük, második módszerként pedig pan-citokeratin antitesttel (A1A3-CK19), ezután morfometriai program segítségével elemeztük.

Morfometria. A fej-nyaki daganatok érdenítésének meghatározását Cue-2 morfometriai program segítségével végeztük, mintánként öt 20x nagyítású látótérben, a nemzetközi konszenzusnak megfelelően a legerezettebb „hot spot” területeket kiválasztva (26).

A neoadjuváns leukocita-interleukin hatásának vizsgálata alkalmával, a tumorstroma/daganatsejtfészek arány meghatározásához az Image Pro Analysis morfometriai szoftvert használtuk.

Immuncitokémia, immunfluoreszcencia. A nukleáris és citoplazmatikus hormonreceptor-expressziót – fagyasztott fej-nyaki laphámrák- valamint normális gégeszöveteken – Spot Junior CCD kamerával ellátott NIKON-Eclipse-E600 epifluoreszcens mikroszkóppal, képelemző szoftver felhasználásával vizsgáltuk.

RT-PCR / nested-PCR. A fagyasztva homogenizált tumormintákból RNS-t izoláltunk. Reverz transzkripciónál random primer-oligo dT keveréket használtunk. A reverz transzkripció megtörténtét β -aktin primerekkel végzett PCR reakcióval ellenőriztük. A lehetséges DNS-szennyezés kimutatására minden mintából cDNS templát mellett az izolált RNS-t, mint templátot használtuk. Non-templát kontrollként DEPC-kezelt víz szolgált.

ER α , ER β valamint PGR kimutatásához nested-PCR technikát alkalmaztunk. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen választottuk szét, majd a detektálást ethidium-bromid festést követően Gel-Doc 2000 rendszerrel végeztük. Minden receptortípus esetén random módon kiválasztott minták nested-PCR termékeit a gélből visszaizoláltuk, és bázissorrendjét meghatároztuk.

A neoadjuváns leukocita-interleukinnel kezelt fej-nyaki daganatok kezelési protokollja. Ez a tanulmány két önálló vizsgálat keretében zajlott. Mindkét vizsgálatban a leukocita-interleukin (LI) alkalmazása előtt a betegek egységes terápiában részesültek, mely cyclophosphamid, indomethacin és multivitamin adagolásából állt. Az első vizsgálatban a beteget három különböző dózissal LI-vel kezeltük (alacsony, közepes, magas). Alacsony dózissal kezelt betegeknek két héten át, heti három alkalommal peritumorálisan injektáltuk a 400 NE IL-2

equivalens egységet (összesen 2400 NE), a közepes dózissal kezelt betegeknek két héten át, heti három alkalommal injektáltunk peritumorálisan 800 NE LI-t (összesen 4800 NE), a magas dózissal kezelt betegeknek pedig két héten keresztül, heti öt alkalommal injektáltuk peritumorálisan a 800 NE LI-t (összesen 8000 NE). Minden adag leukocita-interleukin injekcióját a tapintható, vagy látható tumortömeg külső kerületében, intradermálisan végeztük.

A második vizsgálatban a LI adagolása a következő volt: a napi adag felét (400 NE IL-2) peritumorálisan injektálva; a napi adag másik felét (400 NE IL-2) perilimfatikusan injektálva, 3 héten keresztül, heti 5 alkalommal adagoltuk addig, amíg elértük a 12000 NE kumulatív dózist. Az LI-injekciót intradermálisan adagoltuk a tumor látható és tapintható kerületének megfelelően; a perilimfatikus adagolás a tumor ipsilaterális oldalán lévő hátsó submandibularis régió juguláris limfatikus láncába történt.

Mindkét vizsgálatban a daganatok (valamint reziduális daganatok) műtéti eltávolítását a leukocita-interleukin adagolását követően a 21. és 28. nap között végezték el; a lokoregionális posztoperatív sugárterápiát a műtéti heg gyógyulása után kezdték.

Statistikai feldolgozás. Statistikai elemzéshez chi-négyzet próbát, t-tesztet, ANOVA-t, valamint Kaplan-Meier-analízist használtunk.

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

Gége- és hypopharyngealis daganatok érezettségének vizsgálata

Vizsgálataink során 21 esetet elemeztünk, melyből 11 gégerák volt, 10 pedig a hypopharynxra lokalizálódott; minden eset szövettani diagnózisa laphámrák volt. Megállapítottuk, hogy a hypopharynx-tumorok között a T4 stádiumúak gyakorisága sokkal nagyobb, így felmerült, hogy a malignusabb viselkedés a T4 stádiumnak és így az egyre nagyobb méretű tumoroknak köszönhető. A daganatok volumenének meghatározása azonban ezt a feltevést nem erősítette meg, mivel a gégerákok még az alacsony T2 stádiumban is szignifikánsan nagyobb méretűek voltak, mint a T4 stádiumban lévő hypopharynx-tumorok. A következőkben megvizsgáltuk, hogy a kisebb tumorméretet hypopharyngealis daganatok esetében okozhatja-e a tumor-indukált angiogenetikus képesség csökkentése. Ehhez immunhisztokémiai kettősjelölés módszerével – CD31 és laminin elleni antitestet használva – jelöltük a tumorok körüli ereket, majd morfometriai analízissel meghatároztuk az erek sűrűségét és területét. Először a két tumorféleség összevont adatait hasonlítottuk össze, ahol nem voltunk tekintettel a tumorok méretére, illetve T stádiumára, s ebben az esetben a két csoport átlagos érdenzitása azonosnak bizonyult (glotticus

daganatokban 211 ± 40 N/mm², hypopharyngealis daganatokban 205 ± 20 N/mm²). A továbbiakban annak kizárására, hogy túlságosan eltérő méretű tumorokat hasonlítsunk össze, a legkisebb (T2) glotticus és a legnagyobb (T4) hypopharyngealis tumorcsoportot is összehasonlítottuk, de szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk, bár a T4 stádiumú hypopharyngealis tumorok érdenzitása alacsonyabb volt a T2 stádiumú glotticus tumorokénál (178 ± 20 N/mm² vs. 232 ± 70 N/mm²). Hasonlóan nem volt eltérés az átlagos érkerületben sem (gégerákoknál $96 \pm 9,9$ N/mm², hypopharynxrákoknál pedig $88,4 \pm 7,3$ N/mm²). Mérési adataink alapján megállapítható, hogy a glotticus illetve hypopharyngealis tumorok angiogenezist indukáló képessége azonos. A hypopharyngealis rákok esetében összehasonlítottuk a T4 stádiumú nem metasztatikus ill. nyirokcsomóáttétet képező tumorok érdenzitását is, azonban szignifikáns eltérést itt sem tapasztaltunk. 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. Megállapítottuk, hogy a kétféle tumorban gyakorlatilag azonos gyakorisággal fordul elő VEGF+ daganatsejt (40% a laryngealis régióban, 41,66% a hypopharyngealis régióban), és ez nem mutat összefüggést a tumorok stádiumával. Bár a larynx és hypopharynx daganatainak eltérő biológiai viselkedése régóta ismert, igen kevés összehasonlító tanulmány kísérelte meg feltárni ennek biológiai alapjait. Eltérő malignitású daganatok esetében elsőként mindig a proliferáció illetve a tumorméret összehasonlítása történik meg. 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. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy nem áll fenn kapcsolat a kétféle tumor angiogenetikus képessége és progressziós-invazív készsége között. 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 viszonylag lassúbb növekedésű de invazívabb hypopharynx-tumorok esetében.

Sugárkezelés hatására létrejött érdenzítés-változások jelentőségének vizsgálata

Ebben a vizsgálatban 35 szájgaratdaganatos beteg vett részt, mindenkinek szövettanilag igazolt planocellularis carcinómája volt. Huszonegy tumor (60%) a III., tizen-

négy pedig (40%) a IV. stádiumba tartozott. Az anatómiai lokalizáció az alábbi volt: 68,57% tonsilla és garatívek (24 eset), 20% nyelvgyöki régió (7 eset), 8,57% lágyszájpad (3 eset) és 2,82% garatfal (1 eset). TNM klasszifikáció: T1 stádiumban 4 eset (11,42%), T2 stádiumban 14 eset (40%), T3 stádiumban 11 eset (31,42%) és T4 stádiumban 6 eset (17,14%) volt. A sugárkezelés befejezése után 8 héttel 14 betegnél (40%) komplett, 10 betegnél (28,6%) részleges remissziót, 4 betegnél (11,4%) változatlan állapotot és 7 betegnél (20%) progressziót észleltünk. A medián követési idő 59 (24–67) hónap volt. 5 évnél 4 (11,5%) beteg volt életben, hárman tünetmentesen, egy beteg pedig izolált lokális recidívával. A becslés medián teljes túlélés 13 hónap (95% CI: 8,1–17,9), a progressziómentes idő 6 hónap volt (95% CI: 4–8). A medián mikrovaszkuláris denzitás a kezelés előtt $1,09 \times 10^4/\text{mm}^2$ (SEM: $0,13 \times 10^4/\text{mm}^2$) volt, mely 20 Gy leadását követően $0,825 \times 10^4/\text{mm}^2$ (SEM: $0,1 \times 10^4/\text{mm}^2$) értékre csökkent, és ami megközelítette a statisztikailag szignifikáns szintet ($p=0,052$). A terápiás válasz azoknál a betegeknél, akiknél a 20 Gy leadását követően mért MVD alacsony volt, szignifikánsan jobbnak bizonyult ($p=0,04$), mint azoknál, akiknél magas MVD-értéket találtunk. Az alacsony posztirradiációs MVD és kedvezőbb progressziómentes túlélés között statisztikai trendet találtunk ($p=0,053$), míg a teljes túlélés szignifikánsan jobbnak bizonyult ($p=0,012$) ebben az esetben.

A daganatok növekedésének elengedhetetlen feltétele érellátásuk (3, 4). A daganatok gyors fejlődésével párhuzamosan az elmaradó érújdonképződés miatt mintegy „felhígulva” az MVD csökkenhet, de a daganat angiogenetikus fenotípusa is megváltozhat, és ez is a vaszkularitás változásához vezethet. Továbbá, a különböző kezelésekre hatására is jelentősen változhat a daganatok érellátása. Ezeknek a hatásoknak prognosztikai, vagy prediktív jelentősége is lehet. Egyes szerzők nem találtak összefüggést az MVD, a terápiás válasz és a túlélés között (1, 5–7, 29). Mások kimutatták, hogy a magas MVD kedvezőbb válaszaránytal és túléléssel jár (5, 8, 20), megint mások ennek pont az ellenkezőjét találták (19). A besugárzás erekre gyakorolt és anti-angiogén hatását már számos kísérleti modellben vizsgálták (10, 23, 24, 27). Vizsgálatunkban mi is a besugárzás vaszkularitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk klinikai körülmények között. Eredményeinket támogatja Kourkourakis korábbi megfigyelése, mely szerint azon daganatok prognózisa rosszabb, melyek a kezelése során megőrzik angiogenetikus potenciáljukat (13). Eredményeink jelentősége abban rejlik, hogy klinikai körülmények között, prospektív tanulmány keretében tudtuk alátámasztani, hogy a besugárzás endothelsejtek elleni hatásának komoly szerepe lehet a daganatellenes sugárhatás létrejöttében fej-nyaki daganatok esetében. További fontos eredmény, hogy a kezelés korai szakaszában kimutatható, hogy melyek azok a daganatok, melyek nem reagálnak kellőképpen a besugárzásra, így ezekben az esetekben nagyobb sikerrel kezegethető, aktívabb kezelési formát lehet választani és ezzel a

terápiás eredmények javíthatóak. Ennek bizonyítására további, nagyobb beteganyagot felölelő vizsgálatok elvégzésére van szükség.

Hormonreceptorok expressziója fej-nyaki daganatokban

A vizsgálatban résztvevő betegek száma 67 volt, életkoruk 42 és 86 év között változott, a férfiak és nők aránya 56/11 volt. A daganatok szövettani diagnózisa minden esetben laphámrák volt, a többség stádiuma grade II (36/67; 53,8%), TNM osztályozás szerint T1: 1,5% (1/67), T2: 29,8% (20/67), T3: 50,7% (34/67), T4: 17,9% (12/67), metasztatizis nélküli forma (N0M0): 64,2%. Az esetek majdnem felében a daganatok lokalizációja a laryngealis régióban volt (32/67; 47,8%), egyharmad esetében a szájüregben (24/67; 35,8%), a többi pedig a hypopharynxban volt (11/67; 16,4%). Az elemzés megkönnyítése végett az eseteket két csoportra osztottuk, a szájüregi lokalizációjú illetve a laryngealis/hypopharyngealis régióban elhelyezkedő daganatok csoportjára.

Fej-nyaki laphámrákok valamint normális gégeszövet esetében is az immunhisztokémiai jelölés gyakori magi pozitivitást mutatott ER α esetében, de kismértékben citoplazmatikus pozitívítás is látható volt. Az ER β főleg a citoplazmában volt látható, de néhány esetben magi pozitivitást is észleltünk. A PGR körülbelül egyenlő arányban volt kimutatható a sejtmagban és a citoplazmában. A tumor körüli stromában nem volt pozitív reakció egyik hormonreceptor esetében sem. A fagyasztott daganatszövetekből izolált mRNS nested-PCR vizsgálatával igazoltuk, hogy a daganatok autentikus ER α -t expresszáltak, esetenként a receptor $\delta 3$ splice variánsa is megjelent. Az ER β -nak két izoformáját sikerült azonosítani nPCR segítségével, a wt (vad típus) és $\delta 5$ splice variánsát, míg a PGR autentikus formáját találtuk. Eredményeinket a PCR-termékek szekvenálásával igazoltuk. A továbbiakban vizsgáltuk két humán fej-nyaki daganatsejtvonal (PE/CA-PJ15 és -PJ41) hormonreceptor-expresszióját, ahol azt találtuk, hogy ER α expresszálódik mindkét sejtvonalon, anélkül, hogy ER β és PGR kifejeződne, míg a PJ15 sejtvonal expresszálta az ER α $\delta 3$ splice variánsát is.

Vizsgált fej-nyaki daganatos eseteink felében találtunk ER- és PGR-expressziót (28/67 eset, 41,8%). Az ER-expresszió szájüregi daganatokban gyakoribb volt, mint a gége-hypopharynx régióban (58,3% versus 46,5%), a PGR-expresszió viszont körülbelül azonos mértékű volt az említett két régióban. A szoliter hormonreceptor-expresszió eléggé ritka jelenségnek bizonyult, a laryngealis-hypopharyngealis régióban keletkezett daganatok kis hányadát jellemezte (6/43). A PGR-expressziót az ösztrogén-aktivitás szabályozza, ezért az ER és PGR együttes expresszióját a funkcionális ER-expresszió molekuláris jelének tekintjük (9). Ennek a feltételezésnek megfelelően, a funkcionális ER-expresszió eléggé gyakori jelenség volt mind a szájüregi, mind a laryngealis-hypopharyngealis régió-

ban, tehát független volt a daganatok anatómiai lokalizációjától (27/67 eset; 40,3%). Sem az ER, sem a PGR expressziója nem befolyásolta jelentősen a betegek túlélését: átlagban 36 hónap túlélési ráta volt jellemző a betegek 55–70%-ában. Továbbá, a funkcionális ösztrogénreceptor-expresszió sem befolyásolta a túlélési időt. Mivel a szájüregi daganatos betegek száma ebben a vizsgálatban elég alacsony volt (35,8%), itt eléggé egyenlőtlen volt a receptor-pozitív és -negatív betegek aránya, ezért a laryngealis-hypopharyngealis régió daganatos betegeinek csoportját elemeztük. Kaplan-Meier-analízissel megállapítottuk, hogy ebben a régióban az ER-expresszió (ER α és ER β egyaránt) rövidebb túlélést eredményezett, összehasonlítva az ER-negatív esetekkel ($p < 0,0636$). Másrészt, a PGR expressziója önmagában nem befolyásolta a laryngealis-hypopharyngealis régió daganatos betegeinek túlélését. Összehasonlítva az ER+ és ER- eseteket (a laryngealis-hypopharyngealis régióban) megállapítottuk, hogy a T3 és grade 3 csoportban magas az ER-pozitivitás, míg az N stádium nem volt meghatározó az ER-pozitivitást illetően.

A szexhormonok szerepe fej-nyaki daganatokban hosszú idő óta vitatott téma. Számos kutatócsoport figyelt fel arra a tényre, hogy „hormon-independens” szövetekben hormonreceptorok expresszálódnak (12), és próbáltak választ találni arra, hogy miért férfiakban gyakoribb a fej-nyaki daganat, milyen hormonális mechanizmusok játszhatnak szerepet a carcinogenezisben, és melyek azok a mechanizmusok, amelyek nőknél „védelmet” biztosítanak a daganatok kialakulása ellen (11). Próbáltunk választ keresni arra a kérdésre, hogy mi lehet a jelentősége a funkcionális ösztrogénreceptor jelenlétének fej-nyaki daganatokban. Ez a típusú daganat leggyakrabban alkoholista férfi páciensekben alakul ki, akiknél alkoholos májkárosodás komplikációival együtt jellemző kísérő betegség. A májfunkció romlása együtt jár a metabolikus folyamatok károsodásával, így természetesen a szexhormonok metabolizmusának károsodásával is (tesztoszteron és ösztrogén) (21, 28). Nagyszámú fej-nyaki daganatos beteg széles körű vizsgálata, melyben összehasonlításra került alkoholista betegcsoport valamint kontroll – nem alkoholista – betegcsoport, azt mutatta, hogy ezeknek a betegeknek emelkedett az FSH- és LH-szintjük, az alkoholista betegcsoportban pedig emelkedett ösztrogén- és csökkent tesztoszteronszint található (21, 28). Ugyanebben a betegcsoportban az emelkedett FSH-szint csökkent tesztoszteronszinttel együttesen csökkent túlélési aránnyal párosult (28). A laryngealis-hypopharyngealis régió daganatos betegeinek túlélése, akiknél ösztrogénreceptor-pozitivitást mutattunk ki, rövidebb volt, mint az ösztrogénreceptor-negatív betegeké, bár a különbség nem volt statisztikailag elég erős ($p = 0,0636$). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ER-expresszió vagy ösztrogén által aktivált ER progressziót fokozó faktorként működhet. Mindenképpen további vizsgálatok szükségesek, nagyobb számú páciens bevonásával, az eddigi adatok igazolására, valamint arra is, hogy megállapítsuk, hogy az ER

szerepe ugyanaz-e szájüregi daganatok esetén, mint laryngealis-hypopharyngealis daganatok esetén. Munkacsoportunk vizsgálata viszonylag kisszámú betegen történt, így az ER+ és ER- betegek számának egyenlőtlensége miatt pontos következtetéseket nem vonhatunk le. Továbbá az ER gyakori expressziója, főleg ha PGR-expresszióval együtt történik, azt sugallja, hogy antiösztrogén terápia, ER- vagy aromatazinhibitorok alkalmazása fej-nyaki daganatok esetén egy újabb terápiás lehetőség lenne ezeknek a pácienseknek.

Leukocita-interleukin kezelés hatása szájüregi daganatok mikrokörnyezetére

Az első vizsgálatban 54 beteg vett részt, 27 beteg alkotta a kontroll csoportot, 27 beteg pedig leukocita-interleukin (LI) kezelésben részesült. A daganatok anatómiai lokalizációja többségben a nyelv területén volt (22/54; 40,74%), ezt követte a lágyszájpad (14/54; 25,92%) és a nyelvgyök területe (9/54; 16,66%), majd ajak (6/54; 11,11%), retromoláris régió (2/54; 3,70%) valamint a szájgarat régiója (1/54; 1,85%). TNM stádiumbeosztásuk az alábbi volt: T1 2 eset (3,77%), T2 42 eset (79,24%), T3 9 eset (16,38%); N0M0 13 beteg (24,52%), N(1-2-3)M0 40 beteg (75,47%).

A leukocita-interleukin kezelést követően megvizsgáltuk a daganatokban előforduló nekrozis mértékét, valamint a proliferáló sejtek mennyiségét a Ki-67 marker segítségével. A különböző nekrozistípusok jelenléte vagy hiánya egyforma mértékben volt jelen mind a kezelt, mind a kontroll csoportokban. A daganatok morfológiai analízise kimutatta, hogy a Ki-67-pozitív tumorsejtek gyakorisága jelentősen növekedett a LI-vel kezelt csoportokban az alacsonyabb dózisok alkalmazásánál ($p < 0,05$). Másrészt a ciklusban lévő stromasejtek mennyisége csökkent a növekvő LI-dózissal. A mononukleáris infiltrátumot a daganat két komponensében vizsgáltuk, a daganatsejtfészkekben és a daganat stromális részében. Konvencionális H&E-festéssel nem volt különbség a kezelt és kontroll csoport mononukleáris infiltrátumában, mindkét csoportban nagyfokú heterogenitás volt észlelhető; egyes daganatokban sűrű leukocita-infiltrátum, másokban plazmocita-predominancia, vagy a limfoid sejtek többsége volt látható. Az intraepitheliális makrofágok sűrűsége hasonló volt a stromában lévőkéhez. A kontroll csoport intraepitheliális makrofágdenzitása viszonylag magasnak bizonyult, de ugyanilyen mértékű makrofág-infiltráció volt észlelhető némely LI-kezelt daganat esetében is. CD34+ sejtet nem találtunk a daganatszövetek között.

A második vizsgálatban a magas LI-dózissal kezelt csoport esetei (19 kezelt és 20 kontroll daganat) nem különböztek sem szövettanilag, sem a keratinizáció mértékében. A daganatok anatómiai lokalizációja a következő volt: lágyszájpad 10 eset (25,64%), nyelv 20 eset (51,28%), ajak, szájgarat, bucca, gingiva 9 eset (23,07%).

TNM stádiumbeosztásuk: T1 1 eset (2,70%), T2 32 eset (86,48%), T3 4 eset (10,81%); N0M0 34 eset (91,89%). A kezelt 19 eset műtéti anyagából 2 esetben nem sikerült daganatsejtfészket kimutatni a szövettani metszeten, így ezeket a betegeket komplett válaszadóknak minősítették. Másik két esetben képpalkotó eljárással 50%-os tumortérfogat-csökkenést észleltek, így ezeket részleges válaszadóknak minősítették. Négy esetben a képpalkotó eljárások 30%-os tumorvolumen-csökkenést jeleztek; ezek az esetek gyenge válaszádnak feleltek meg. Együttesen az objektív válasz a LI-kezelt csoportban 8/19, azaz 42,1% volt. Vizsgálatainkban a két csoportot (válaszadók és rezisztensek) külön is elemeztük. A LI nem változtatta meg a ciklusban lévő daganatsejtek arányát függetlenül attól, hogy a klinikailag válaszadó vagy a rezisztens betegcsoportot vizsgáltuk. A makrofágdenzitás vizsgálatával kimutattuk, hogy a LI kezelést követően a rezponder csoportban jelentősen csökkent mind a stromális, mind az intraepithelialis CD68+ sejtek mennyisége ($p < 0,01$, $p < 0,002$). Fokozott neutrofil-infiltráció a kezelt csoportban főleg azoknál volt észlelhető, akiknél multifokális mikroszkopikus nekrozis is jelen volt. A LI-kezelés szignifikánsan növelte a stromális neutrofil-denzitást, de csak a klinikailag jól reagáló betegcsoportban, viszont mindkét csoportban szignifikánsan fokozta az intraepithelialis inváziójukat. A magas eozinofil-infiltráció a kezelt esetekben kétszer gyakoribb volt, mint a kontroll esetekben (47% versus 25%). A LI-kezelés megváltoztatta a tumor-stroma arányt, pontosabban a tumorsejtfészkek arányának jelentős csökkenését indukálta a daganatszövetben ($p = 0,005$). A periepithelialis kollagenózis mértéke hasonló volt a kezelt és a kontroll csoportokban, míg az interstitialis intraepithelialis fibrózis szignifikánsan gyakoribb volt a kezelt csoportban. A kezelt csoportban 17 esetből 12-ben csökkent a daganatsejtfészkek mennyisége (70%), míg a kontroll csoportban a 20 esetből kettőben (10%) tapasztaltuk a kollagénrostok mennyiségének növekedését. A kontroll csoportban az esetek 40%-ában (8/20) egyáltalán nem fordult elő fibrózis. A válaszadók és a rezisztensek csoportjában a stromális fibrózis mértéke egyformán fokozódott a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$).

Az első vizsgálatból, melyben 27 szájüregi daganatos beteget kezelték az immunmodulátor hatású leukocita-interleukinnal, kiderült, hogy a szájüregi laphámrákok immunogén daganatok, a LI-kezelés a limfocita-infiltráció fokozódását okozta a daganatokban. Hasonlóan más tumortípusokhoz, a mononukleáris infiltrátum összetétele jelentős egyedi variabilitást mutatott a különböző betegektől származó mintákon, ami arra utal, hogy meg kell határozni pontosan, hogy a mononukleáris infiltrátum mely komponensei (T-sejtek, dendritikus sejtek, makrofágok) játszanak fontos szerepet a betegség prognózisában vagy a terápiás válasz kialakulásában. A vizsgálat egyik legérdekesebb eredménye az volt, hogy az alacsony dóziszú LI-kezelés nagyszámú nyugvó daganatsejtet léptetett vissza a sejt-

ciklus körfolyamatába. Ez az eredmény felhasználható a páciensek terápiájának kialakításakor, hiszen a szájüregi daganatok terápiájának egyik fő problémája az, hogy a daganatsejtek többsége nyugvó állapotban van, a kemo- és sugárterápia pedig elsősorban a sejtciklusban lévő sejtekre hat, így a nyugvó sejtek a terápiára rezisztensek lehetnek. A munkacsoportunk által végzett fázis II vizsgálatban, melyben a betegek magas dóziszú LI-kezelést kaptak, jelentős változásokat tapasztaltunk a mononukleáris sejtes infiltráció, tumor-stroma arány és objektív válasz tekintetében. Ezekben az esetekben a mononukleáris sejtek összetételének olyan változását tapasztaltuk, mely akut gyulladásos reakcióra utalt, ezt a folyamatot pedig nagymértékben a neutrofil sejtek mediálták, kisebb mértékben az eozinofilek és makrofágok. A daganatsejtfészkek multifokális nekrozisának és a sejtfészkeken belüli kötőszövet mennyiségének jelentős növekedését észleltük a kezelt csoportban, a kontroll csoporthoz képest. Ezeket a változásokat a gazdaszervezet tumorelles immunválasza következményeként értékelhetjük. A LI hatására létrejött antitumor hatás ezekben az esetekben különböző mértékű, és nem minden páciens esetében vezet objektív klinikai válasz megjelenéséhez. A LI-vel kezelt szájüregi daganatok esetén még nem teljesen tisztázott, hogy a keverékben lévő specifikus mediátorok között melyek azok, amelyek elősegítik a tumorelles immunválasz megjelenését. Az intraepithelialis neutrofil sejtek mennyiségének növekedése párhuzamosan a mikroszkopikus nekrozisok megjelenésével arra utal, hogy a nonspecifikus antitumor mechanizmusok aktiválása rendkívül fontos abban, hogy klinikopatológiailag detektálható tumordestrukciónak jöjjön létre. Az eredmények azt mutatják, hogy a kezelt csoport homogén módon reagált a LI-kezelésre, de a daganatellenes hatások rendkívül heterogének voltak. Mindkét vizsgálat eredményeit figyelembe véve azt láthatjuk, hogy a neoadjuváns LI immunterápia szájüregi daganatok esetében klinikailag jó eredménnyel végződő terápiát jelentene.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A különböző lokalizációjú fej-nyaki daganatok vaszkularizáltsága nem kritikus tényező a gége- és algaratdaganatok progressziójában mutatkozó különbségek tekintetében.
2. Az alacsony dóziszú sugárkezelés (20 Gy) hatására létrejött érdenzítés-csökkenés szignifikáns összefüggést mutatott a kedvezőbb terápiás válasszal és túléléssel.
3. A vizsgált fej-nyaki daganatok felében találtunk ösztrogén- és progesteronreceptor-expressziót (34/67 és 33/67 esetben). Míg az ER-expresszió gyakoribb volt szájüregi daganatokban a glotticus/hypopharyngealis régióhoz hasonlítva, a PGR-expresszió körülbelül azonos mértékű volt a két régióban. A funkcionális ER-expresszió is gyakori

jelenségnek bizonyult fej-nyaki daganatokban. Az ösztrogénreceptor kifejeződése a gégerákok esetében negatív prognosztikus tényezőnek tűnik.

4. A szájüregi laphámrákok, melyek patológiailag meglehetősen homogének, a tumort infiltráló sejtek denzitása és összetétele szempontjából igen heterogének.
5. A Ki-67 antigént expresszáló daganatsejtek mennyisége növekedett leukocita-interleukin kezelés után, de érdekes módon a magas dózissal kezelt esetekben ez a növekedés nem volt észlelhető. Ez a hatás fontos lehet a terápia eredményességének szempontjából, hiszen minél magasabb a ciklusban lévő daganatsejtek aránya, annál hatékonyabb lehet a kemo- vagy sugárterápia.
6. A LI-kezelés hatására 42,1%-ban észleltünk objektív választ, amit a patológiai vizsgálat illetve a tumor/stroma arány meghatározása érzékenyebben mutatott, mint a képalkotó eljárás. Megállapíthatjuk, hogy a kezelt csoport daganatstromája viszonylag egységesen reagált a kezelésre, de a létrejött daganatellenes effektusok eltérőek voltak, melynek oka valószínűleg a daganatok különböző érzékenysége a LI-kezelésre.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni Dr. Tímár József professzor Úrnak, aki bizalommal felvett kutató munkacsapatába, képzésemhez és kutatómunkámhoz minden feltételt biztosított, valamint éveken át támogatta és irányította munkámat.

Köszönetet mondok az Országos Onkológiai Intézet vezetőjének, Dr. Kásler Miklósnak, hogy hozzájárult ahhoz, hogy kutató tevékenységemet ebben az intézményben folytathassam.

Köszönöm Prof. Dr. Szende Bélának és Prof. Dr. Kopper Lászlónak, akik intézetvezetőként, és Prof. Dr. Jeney Andrásnak, hogy programvezetőként lehetővé tették tudományos tevékenységemet a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében.

Külön köszönettel tartozom Dr. Rásó Erzsébetnek, aki fáradságot nem ismervé segített a molekuláris biológia minden nehézségének leküzdésében, Dr. Lövey Józsefnek, akivel hosszú ideig együtt dolgoztunk, Dr. Ladányi Andreának a disszertációm elkészítéséhez nyújtott értékes tanácsokért, Prof. Dr. Répássy Gábornak, aki mindvégig támogatta munkámat, és Dr. Remenár Éva főorvos asszonynak, akivel együtt dolgozhattam a fej-nyaki daganatos betegek hormonvizsgálatán.

Ezenkívül köszönöm az Országos Onkológiai Intézet Tumor Progressziós Osztálya és a SE I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet dolgozóinak, hogy segítették a munkámat.

Végül szeretném megköszönni férjemnek és családomnak, hogy éveken át bíztak bennem, megteremtet-

ték a képzésemhez és tudományos tevékenységemhez szükséges háttérrel, támogattak és segítettek minden felmerült akadály esetében.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- Lukits J, Tímár J, Juhász A, et al. Progression difference between cancers of the larynx and hypopharynx is not due to tumor size and vascularization. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125:18–22, 2001
- Tímár J, Forster-Horváth C, Lukits J, et al. The effect of leukocyte interleukin injection (Multikine) treatment on the peritumoral and intratumoral subpopulation of mononuclear cells and on tumor epithelia: a possible new approach to augmenting sensitivity to radiation therapy and chemotherapy in oral cancer – a multicenter phase I/II clinical trial. *Laryngoscope* 113:2206–2217, 2003
- Tímár J, Ladányi A, Forster-Horváth C, Lukits J, et al. Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral CD4/CD8 ratio and tumor microenvironment: a multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol* 23:3421–3432, 2005
- Lövey J, Lukits J, Remenár E, et al. Antiangiogenic effects of radiotherapy but not initial microvessel density predict survival in inoperable oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 182:149–156, 2006
- Lukits J, Remenár É, Rásó E, et al. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen and progesterone receptors in head and neck cancer. *Int J Oncol* 30:155–160, 2007

IRODALOM

1. Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:724–729, 1995
2. Ferguson BJ, Hudson WR, McCarty KS, Jr. Sex steroid receptor distribution in the human larynx and laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113:1311–1315, 1987
3. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16):15–18, 2002
4. Fox SB. Tumor angiogenesis and prognosis. *Histopathology* 3:294–301, 1997
5. Gasparini G, Weidner N, Maluta S, et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 55:739–744, 1993
6. Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 19:276–280, 1997
7. Hegde PU, Brenski AC, Caldarelli DD, et al. Tumor angiogenesis and p53 mutations: prognosis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:80–85, 1998
8. Ito Y, Kamijo T, Yokose T, et al. Microvessel density predicts the radiosensitivity of metastatic head and neck squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes. *Int J Oncol* 19:1127–1132, 2001
9. Jensen EV, Jordan C. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9:1890–1899, 2003
10. Kardamakias D, Hadjimichael C, Ginopoulos P, Papaioannou S. Effects of paclitaxel in combination with ionizing radiation on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. A radiological study. *Strahlenther Onkol* 180:152–156, 2004
11. Kleemann D, Kunkel S, Bellin T. Estrogen feedback tests in women with laryngeal carcinomas. *Laryngorhinootologie* 75:88–90, 1996
12. Kolar Z, Kod'ousek R, Ehrman J Jr, et al. Expression of estrogen receptors and estrogen-induced proteins in tumors of „hormone non-dependent tissues“. *Cesk Patol* 30:12–15, 1994
13. Kourkourakis MI, Giatromanolaki A, Fountzilias G, et al. Angiogenesis, thymidine phosphorylase and resistance of squamous

- cell head and neck cancer to cytotoxic and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 6:381–389, 2000
14. Maiorano E, Botticella MA, Marzullo A, Resta L. Expression of ER-D5 and EGFR in laryngeal carcinoma and malignant epithelium. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:95–99, 1997
 15. Marsigliante S, Muscella A, Storelli L, Storelli C. Human larynx expresses isoforms of the oestrogen receptor. *Cancer Lett* 99:191–196, 1996
 16. Mohler JL, Gregory CW, Ford III OH. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10:440–448, 2004
 17. Omoto Y, Kobayashi Y, Nishida K. Expression, function and clinical implication of the estrogen receptor beta in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285:340–347, 2001
 18. Pearce ST, Jordan VC. The biological significance of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50:3–22, 2004
 19. Pignataro L, Carboni N, Midolo V, et al. Clinical relevance of microvessel density in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 92:666–670, 2001
 20. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, et al. Apoptosis, angiogenesis and proliferation: a trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer. *Oral Oncol* 37:165–171, 2001
 21. Remenár É, Számel I, Buda B, et al. „Why men?” Hormones and hormone receptors in male head and neck cancer patients. In: *Advances in Laryngology in Europe*. Eds: Klainsasser O, Glanz H, Olofsson J. Elsevier, 1997, pp. 137–140
 22. Resta L, Marsigliante S, Leo G, et al. Molecular biopathology of metaplastic, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:39–42, 1997
 23. Schultze-Mosgau S, Grabenbauer GG, Wehrhan F, et al. Histomorphological structural changes of head and neck blood vessels after pre- or postoperative radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 178:299–306, 2002
 24. Schultze-Mosgau S, Rodel F, Keilholz L, et al. Vascularization of free myocutaneous gracilis flaps in replacement transplantation after preoperative radiotherapy. An experimental study. *Strahlenther Onkol* 176:498–505, 2000
 25. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94:727–733, 1996
 26. Vermeulen PB, Gasparini C, Fox SB. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 38:1564–1579, 2002
 27. Wehrhan F, Grabenbauer GG, Rodel F, et al. Exogenous modulation of TGF-beta(1) influences TGF-betaR-III-associated vascularization during wound healing in irradiated tissue. *Strahlenther Onkol* 180:526–553, 2004
 28. Yoo HJ, Sepkovic DW, Bradlow HL, et al. Estrogen metabolism as a risk factor for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 124:241–247, 2001
 29. Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, et al. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 17:312–318, 1995