

# CITOGENETIKAI ÉS HORMONÁLIS VÁLTOZÁSOK FEJ-NYAKI LAPHÁMRÁKOS BETEGEKBEN: POTENCIÁLIS BIOMARKEREK A FUNKCIÓMEGTARTÓ ONKOLÓGIAI SEBÉSZET SZÁMÁRA

Remenár Éva

Szegedi Tudományegyetem Doktori Iskolája, Szeged

*A fej-nyaki nyálkahártyákról kiinduló laphámrák a magyar férfilakosságot érintő harmadik leggyakoribb daganatos halálok. Ezt a daganatot túlnyomórészt környezeti karcinogén hatások, azon belül is az alkohol és a dohányzás idézi elő. A látszólag azonos szövettanú daganatoknak azonban különböző a kórlefolyásuk, főleg azért, mert nem egyformán reagálnak a kezelésekre. Ebben a munkában olyan potenciális biomarkereket vizsgáltunk, amelyek az ismert környezeti toxikus hatásokra biológiai válaszként jöttek létre, így feltételezzük, hogy nyomonkövetésük révén közelebb juthatunk a klinikai onkológia legfontosabb kérdéseire: a daganatkialakulás folyamatának megértéséhez, a daganat korai felismeréséhez és a daganat biológiai természetétől függően alakított terápiás tero felállításához. A genetikai instabilitásra utaló vizsgált markerek közül a spontán kromoszómaaberrációk megfelelő biomarkernek mutatkoztak a fej-nyaki daganatos fenotípus jelzésére. Ugyanakkor a mutagénszenzitivitás mérésére alkalmazott bleomycin-teszt, az egészséges magyar populáció több mint felében észlelt fokozott mutagénérzékenység miatt, magyar viszonyok között nem jelezte az egyedi daganatkockázatot szemben a nyugat-európai és amerikai tapasztalatokkal. A magyar rák-előfordulási és -halálzási statisztikák ismeretében a teljes populációt érintő fokozott mutagénérzékenység elgondolkodtató eredmény és további kutatást igényel. Hormonvizsgálataink során a krónikus alkoholfogyasztást kísérő hypophysis- és szexszteroidhormonok szérumszintelléréseit észleltük, amelyek közül az emelkedett prolaktinszintnek és az összes és szabad tesztoszteron csökkent szintjének egyaránt rossz prognózist jelző értéke volt. A hormonok és fej-nyaki daganatok közötti kapcsolat további vizsgálatára ösztönöz funkcionáló ösztrogén- és progesteronreceptorok kimutatása fej-nyaki laphámrák szövetekben. Magyar Onkológia 53: 157-164, 2009*

**Kulcsszavak:** fej-nyaki rák epidemiológiája, prognózis, biomarkerek, kromoszómaaberrációk, mutagénérzékenység, hypophysishormonok, szexszteroidhormonok

*Squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN) is the third most common cause of death from cancer among Hungarian males. This cancer is caused in most of the cases by chronic toxic effects of the environment, especially by tobacco smoking and regular alcohol consumption. SCCHNs similar for the first sight, might have different clinical course, mainly because of their different responses to anticancer therapies. In this study, potential biomarkers were examined that were thought to develop as biologic responses to the known environmental toxicities, therefore, their testing is supposed to help answer the most important questions of clinical oncology: understanding tumor development, early detection of cancer and individually tailored therapy planning based on the biological nature of a particular cancer. Elevated rate of spontaneous chromosome aberrations proved to be a reliable marker of the SCCHN phenotype. However, increased mutagen sensitivity by the bleomycin-test, unlike in the US or in Western Europe, was not suitable to detect the individual cancer risk in this country, because of the high mutagen sensitivity of more than half of the healthy Hungarian population examined. In the light of the high cancer incidence and mortality statistics of Hungary, the frequency of elevated mutagen sensitivity even among healthy people is a meaningful finding, and requires further clarification. Our studies on the hormonal status of male SCCHN patients revealed some pathological changes in the sex steroid and pituitary hormone serum levels, which most probably accompanied chronic alcoholic liver disease. The elevated prolactin and decreased total and free testosterone levels predicted poor prognosis of the disease. The importance of the potential relationship between hormones and SCCHN is underscored by our further finding of functioning estrogen and progesterone receptors in SCCHN tissue of our patients. Remenár É. Cytogenetic and hormonal changes in head and neck squamous cell cancer patients: potential biomarkers for functional approaches in surgical oncology. Hungarian Oncology 53: 157-164, 2009*

**Key words:** head and neck cancer, epidemiology, prognosis, biomarkers, chromosome aberrations, mutagen sensitivity, pituitary hormones, sex steroid hormones

Levelezési cím:

Dr. Remenár Éva  
Országos Onkológiai  
Intézet  
1122 Budapest  
Ráth György u. 7-9.  
Telefon:  
(06-1) 224-8600/1543  
Fax: (06-1) 224-8620  
E-mail: reva@oncol.hu

Témavezető:

Dr. Kásler Miklós

## BEVEZETÉS

*Epidemiológia*

A fej-nyaki rák évi 600 000 új eset megjelenésével világszerte a 6. leggyakoribb daganat. Európában évente 70 000 új megbetegedést regisztrálnak, Magyarországon közel 5000 új beteget észlelünk évente a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján. A fej-nyaki rákok kb 90%-a a felső emésztő- és légutak nyálkahártyájáról kiinduló laphámrák. A fej-nyaki laphámrákok, ezen belül különlegesen a száj- és szájgaratdaganatok száma jelentősen megnövekedett a XX. században, elsősorban férfiakban, és a gyakoriság eltolódott a fiatalabb korosztályok felé a népesség azon részében, akik az 1920-as években és azután születtek. Epidemiológiai kutatások ezt a jelenséget elsősorban a XX. század elején tömegessé vált alkohol- és dohányfogyasztásnak tulajdonítják. Az elmúlt évtizedben nem dohányzó, nem alkoholizáló, 20–40 éves fiatal emberekben is egyre gyakrabban észlelik száj- és szájgarattumorkok előfordulását, amelynek hátterében human papillomavírus-fertőzés oki szerepe merült fel. Magyarországon a fej-nyaki rák okozta halálozás az 1980-as években kezdett növekedni, a növekedés azóta is folyamatos. Jelenleg, világszerte, Magyarországon hal meg a legtöbb férfi és nő fej-nyaki rák miatt.

*Fej-nyaki laphámrák kórlefolyása és kezelése*

A fej-nyaki laphámrákok általában gyorsan növekszenek és rossz prognózisúak, a medián túlélés kb. 2 év. Az esetek közel 70%-ában a betegség már előrehaladott stádiumú a felfedezés pillanatában a primer tumor kiterjedése és/vagy regionális nyaki áttét miatt. A ritkább, korai, I–II. stádiumú daganatok kezelése általában monoterápia: szervmegtartó műtét vagy sugárkezelés. A szerv- és funkciómegtartásnak az érintett anatómiai régióból (légzés, táplálkozás, beszéd) következően fontos szerepe van. A látszólag gyógyult, korai stádiumú fej-nyaki rákos betegek túlélését rejtve maradt regionális vagy távoli áttétek, ill. második primer tumor kialakulása veszélyezteti. A gyakrabban előforduló, előrehaladott, III–IV. stádiumú fej-nyaki laphámrákok kombinált (műtét, sugár- és kemoterápia) kezelést igényelnek.

Az egyes terápiás módszerek optimális időzítésének és konkrét tartalmának meghatározása jelenleg is klinikai vizsgálatok tárgya. Az azonban nyilvánvaló, hogy a látszólag hasonló szövettanú és anatómiai kiterjedésű daganatok nem egyformán reagálnak a kezelésekre, így a betegek túlélése is eltérő. Ennek magyarázata a tumorkok olyan biológiai jellegzetességeiben rejlik, melyeket még nem ismerünk, ill. nem vizsgálunk rutinszerűen a kezelés előtt. A fej-nyaki laphámrákok biológiai természetét megbízhatóan jelző biomarkerek felismerése lehetővé tenné azt, hogy felesleges kerülő utak nélkül, az adott daganattal szemben leghatásosabb és legkevesebb mellékhatást okozó kezelést alkalmazzuk.

*Környezeti tényezők a fej-nyaki laphámrák kialakulásában*

A fej-nyaki laphámrák közel 80%-ban olyan emberekben fordul elő, akik évtizedek óta dohányoznak, általában rendszeres alkoholfogyasztók, elhanyagolt fogazatúak, és férfiak. Az életmódbeli tényezők miatt e daganatok jellemző kísérő betegségei az alkoholos májbetegség, krónikus légúti betegségek, érbetegségek és alkoholos neuropátia. Az utóbbi években egyre több adat igazolja az alkohol ill. metabolitja, az acetaldehid szerepét számos daganat, köztük elsősorban a fej-nyaki rákok kialakulásában: helyi karcinogén hatás, ill. a májban számos anyagcsere-folyamat megváltozása következtében.

*Citogenetikai biomarkerek a genetikus instabilitás meghatározására fej-nyaki laphámrák esetén*

Régóta ismert, hogy kapcsolat van a kóros kromoszómaváltozások és a daganathajlam között, és az is bizonyítást nyert, hogy spontán kromoszómaaberrációk már azelőtt jelzik a daganat kialakulásának valószínűségét, hogy az valóban detektálható lenne a szervezetben. A spontán aberrációk mellett számos adat szól az ún. indukált (pl. bleomycinnel) kromoszómaaberrációk egyéni daganatérzékenységet jelző szerepe mellett. Mindkét típusú kromoszóma-rendellenességet a periferiás vér limfocitáiból meg lehet határozni.

*Hormonok és hormonreceptorok fej-nyaki rákban*

A hormonfüggő szervek daganatainak esetén alkalmazott hormonterápia sikere, ill. a fej-nyaki rákok nyilvánvaló férfi-dominanciája több klinikust és kutatót is ösztönzött már arra, hogy terápiásan értékesíthető hormonális kapcsolatot keressenek a betegséggel – egyelőre eredménytelenül. Ismert, hogy az alkoholos májbetegséget kóros szexszteroidhormon-eltérések kísérik, e hormoneltérések és a fej-nyaki rák kapcsolatát azonban még sohasem vizsgálták.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. Az Országos Onkológiai Intézet Fej-Nyaksebészeti Osztályának évi átlagosan 300 új, kezeletlen, műtétre kerülő fej-nyaki laphámrákos beteganyagában a szervmegtartó stratégiák fejlesztése, a betegek hatékonyabb kiválasztása szervkímélő, ill. funkcióhelyreállító műtétre.
2. A fej-nyaki laphámrák epidemiológiájából kiindulva olyan potenciális biomarker-jelöltek kutatása, melyek a környezet toxikus hatásainak kitett személyekben biológiai válaszként keletkeznek, ezáltal speciális diagnosztikus és terápiás célpontok lehetnek a szervmegtartó kezelésekre hatékonyságának és hosszú távú eredményeinek javításában:

- a) A genetikai instabilitás markerei
- b) Szérum hypophysis- és szexszteroid-hormonszintek a dominálón férfiakban megjelenő daganatban
- c) Szteroidhormon-receptorok (ER, PgR) az elvileg nem hormonfüggő fej-nyaki laphámrákban

## BETEGEK, MÓDSZEREK

A dolgozatban összefoglalt vizsgálatokban szereplő valamennyi daganatos beteg az Országos Onkológiai Intézet Fej-Nyaksebészeti Osztályán került elsődleges műtétre szövettanilag igazolt szájüreg-, szájgarat-, algarat- vagy gégelaphámrák miatt.

### *Citogenetikai vizsgálatok*

#### Betegek és kontroll személyek

Az 1996–2004 közötti időszakban összesen 432 fej-nyaki laphámrákos beteg, 62 nem daganatos, alkoholos májbeteg és 1316 egészséges kontroll személy spontán és bleomycinnel indukált kromoszóma-rendellenességeinek vizsgálata történt az Intézet Onkocitogenetikai Osztályán. A daganatos betegek között 218 volt alkalmas arra, hogy illesztett párt találjunk számukra a kontroll személyek között. A daganatos betegek és az alkoholisták valamennyien dohányoztak is. Az egészséges kontrollok között voltak nem dohányzók és dohányzók is, de egyikük sem fogyasztott rendszeresen alkoholt.

#### A kromoszómavizsgálatok módszerei

Perifériás vér limfocita-tenyésztésből kromoszómapreparátumot készítettünk. A spontán fragilitásra első osztódású, a BLM-tesztre 72 órás tenyésztést alkalmaztunk. Az utóbbi esetben a tenyésztés utolsó 5 órájában in vitro bleomycinexpozíció (30 µg/ml) is történt. A konvencionális festések után aneuploidiákat (számbeli aberrációk) és strukturális rendellenességeket (kromatid- és kromoszóma-típusú) különítettünk el. Egyénekenként 100×46 kromoszómát számoltunk le (Gundy 1996). A BLM-teszt értékelésekor csak kromatid-típusú töréseket számoltunk meg Hsu módszere szerint személyenként 100 metafázisban. A kromatid-törések átlaga, a b/c (breaks per cell) hányados alapján a mutagénnel szembeni szenzitivitást  $b/c \geq 1$  értéknél állapítottuk meg.

#### Statisztikai módszerek

A spontán kromoszómaaberrációk értékelése Wilcoxon- és  $\chi^2$ -teszttel történt. A BLM-teszt b/c átlagértékeit Student's *t*-teszttel és Mann-Whitney U-teszttel elemeztük. A mutagénszenzitivitás és a spontán kromoszómaaberrációk közötti összefüggést az esélyhányados (odds ratio: OR) alapján becsültük meg 95%-os konfidenciaintervallummal (CI). Az OR kiszámítása a legalsó és a legfelső kvartilis adatainak összehasonlítása alapján történt. A statisztikai szignifikancia határa  $p < 0,05$  volt. A számításokat a GraphPad InStat (v.3,05, 2000) és a GraphPad Prism (v.3,02, 2000) programokkal végeztük.

### *Hypophysis- és szexszteroid-hormonvizsgálatok*

#### Betegek és kontroll személyek

Az 1994–2004 közötti időszakban fej-nyaki laphámrák miatt operált 289 férfi műtét előtti kivizsgálását kiegészítettük szérum szexszteroid- és hypophyishormon-meghatározással is. A betegek többsége posztoperatív sugárkezelésben is részesült az intézeti multidiszciplináris munkacsoport javaslatától függően. A hormonszintek májbetegekkel és egészséges kontroll személyekkel történő összehasonlító vizsgálatához 130 beteg adatait használtuk fel és összehasonlítottuk "pozitív" kontrollként a tumorosokkal hasonló korú, 54 alkoholos májbeteg férfi, negatív kontrollként pedig 56 egészséges, nem rendszeres alkoholfogyasztó férfi hormonértékeivel. A hormonok prognosztikai szerepének elemzése 289 beteg adatai alapján történt. A medián követési idő, melyet a műtét időpontjától számítottunk, 24 (4–142) hónap volt.

#### A szérum-hormonszint meghatározásának módszerei

A reggeli órákban vett vér szérumában az ösztradiol (E2), progeszteron (PROG), tesztoszteron (TE), dehidroepiandrosteron (DHEA), dehidroepiandrosteron-szulfát (DHAS), szexhormonkötő fehérje (SHBG), follikulusstimuláló hormon (FSH), luteinizáló hormon (LH) és prolaktin (PRL) szintjét határoztunk meg a műtét előtt. A szabad androgén-indexet (FAI) a TE és SHBG hányadosaként, a szabad tesztoszteron (FTE) mennyiségét Vermeulen (1999) képlete alapján számítottuk ki. A hormonszintek meghatározása RIA és IRMA módszerrel történt.

#### Statisztikai módszerek

A daganatos betegek, alkoholos májbetegek és egészséges kontroll személyek hormonszintjei közötti különbséget egyváltozós varianciaanalízissel és a Mann-Whitney U-teszttel vizsgáltuk a BMDP statisztikai programcsomag segítségével. A hormonszintek prognosztikai szerepének megítéléséhez a MedCalc statisztikai programcsomagot használtuk. A túlélés valószínűségét Kaplan-Meier-módszerrel határoztuk meg, a görbék közti különbséget Mantel-Cox szerint elemeztük. A túlélést befolyásoló tényezők multivariációs analízise a Cox-modell szerint történt. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket  $p < 0,05$  esetén.

### *Szteroidhormon-receptorok vizsgálata*

#### Betegek

67 fej-nyaki laphámrákos beteg (56 férfi, 11 nő) primer tumorának műtéti preparátumát használtuk fel a vizsgálatokhoz. Az anyagokat  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -ra fagyasztott állapotban tartottuk a feldolgozásig.

## Szöveti hormonreceptor-meghatározás fej-nyaki laphámrákban

**Immunohisztokémia:** 5 mikron vastagságú fagyasztott metszeteken monoklonális antitestek segítségével immunhisztokémiai reakciót végeztünk ER, ER $\alpha$ , ER $\beta$  és PgR kimutatására.

**Polimeráz láncreakció (PCR):** A fagyasztva homogenizált tumormintákból Tri Reagent<sup>TM</sup> segítségével teljes RNS-t izoláltunk. A vizsgált génre (ER $\alpha$ , ER $\beta$  és PgR) specifikus primerek segítségével PCR reakciót végeztünk; a PCR-termékek validálása szekvenálással történt.

### Statisztikai módszerek

Az adatokat  $\chi^2$ - ill. ANOVA módszerrel elemeztük, a betegek túlélési valószínűségét Kaplan-Meier-módszerrel vizsgáltuk, a görbéket Mantel-Cox szerint elemeztük. Szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük.

## EREDMÉNYEK

### Citogenetikai vizsgálat

#### Citogenetikai leletek

a teljes vizsgált populációban

A teljes vizsgált populáció citogenetikai eredményei az 1. táblázatban láthatóak. Viszonylag magas volt a dohányosok aránya a kontrollok között. Minden alkoholisták és az illesztett vizsgálatokhoz kiválasztott fej-nyaki rákos beteg dohányos volt. A spontán kromoszómaaberrációk száma emelkedett dohányosokban a nem dohányzókhöz képest, és további szignifikáns

emelkedés észlelhető fej-nyaki rákosokban. A BLM által indukált b/c érték nem különbözött a dohányos és nem dohányos kontrollok között, viszont szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét esetben, mint a tumorosokban.

Spontán kromoszómaaberrációk és BLM-indukált b/c arány illesztett kontroll vizsgálatokhoz válogatott fej-nyaki rákos betegekben, alkoholistákban és a kiválasztott kontroll személyekben

Az alkohol mutagén hatásának fontossága miatt, a daganatos betegekben észlelt elváltozások pontosabb értékelése érdekében bevezettük a nem tumoros alkoholistákhoz álló, "pozitív" kontroll csoportot. A három csoport citogenetikai jellegzetességei a 2. táblázatban láthatóak. A spontán kromoszómaaberrációk gyakorisága szignifikánsan különbözött mind a daganatos, mind az alkoholisták csoportban az illesztett kontrolloktól. Nem volt különbség viszont az alkoholisták és a daganatos csoportok között, mindkettőben emelkedett volt az aberráns sejtek aránya. A BLM-indukált b/c értékek szintén magasabbak voltak mind az alkoholistákban, mind a tumoros betegekben a kontrollokhoz képest, de nem különböztek szignifikánsan egymástól. A mutagenérzékeny személyek aránya mind a kontrollok (>50%), mind a betegek között magas, az alkoholistákban és a tumorosokban azonos mértékű: 60,1%.

### Citogenetikai markerek a primer tumor elhelyezkedése szerint

A kromoszómaaberrációk száma szignifikánsan magasabb volt mindegyik primertumor-lokalizáció esetén, legmagasabb a hypopharynx-tumorok között.

1. táblázat. Fej-nyaki laphámrákos betegek, illetve dohányzó és nem dohányzó kontroll személyek összehasonlító citogenetikai vizsgálata

Vizsgált csoportok	A személyek száma	Vizsgált sejtek száma	Aberráns sejtek		b/c (átlag $\pm$ SD)
	n	n	n	%	
Összes kontroll	1376	137600	2324	1,69	1,04 $\pm$ 0,47
Nem dohányzó	813	81300	1281	1,58	1,06 $\pm$ 0,49
Dohányzó	563	56300	1043	1,86 <sup>a</sup>	1,02 $\pm$ 0,45
Fej-nyaki rákos betegek	432	43200	1118	2,61 <sup>a,b</sup>	1,15 $\pm$ 0,48 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>szignifikáns a nem dohányzókhöz képest ( $p \leq 0,05$ ); <sup>b</sup>szignifikáns a dohányzókhöz képest ( $p \leq 0,05$ )

2. táblázat. Fej-nyaki laphámrákos betegek, nem tumoros alkoholos májbeteg és illesztett kontroll személyek összehasonlító citogenetikai vizsgálata

Citogenetikai végpontok	Illesztett kontroll: HNSCC (n=218)	Illesztett kontroll: ALC (n=62)	HNSCC (n=218)	ALC (n=62)	p-érték
AC % (átlag $\pm$ SE)	1,98 $\pm$ 0,12	2,08 $\pm$ 0,22	2,82 $\pm$ 0,15	2,76 $\pm$ 0,24	<0,05
b/c (átlag $\pm$ SD)	0,97 $\pm$ 0,46	0,95 $\pm$ 0,41	1,06 $\pm$ 0,49	1,3 $\pm$ 0,67	<0,05
Szenzitív személyek (b/c $\geq$ 1)	52,5%	49,2%	60,1%	60,1%	NS

AC: aberráns sejt; ALC: alkoholos májbeteg; HNSCC: fej-nyaki rák

Ezzel szemben a mutagénszenzitívást jelző b/c értékek a szájüregi daganatok között voltak legmagasabbak, míg a gégetumorosoké megegyezett a kontrollokkal.

#### Hypophysis- and szexszteroid-hormonszintek vizsgálata

Fej-nyaki laphámrákos, alkoholos májbeteg és egészséges kontroll személyek hormonszintjének összehasonlítása

A vizsgálatba 130 fej-nyaki laphámrákos, 54 alkoholos májbeteg és 56 egészséges kontroll férfit vontunk be. Tekintettel arra, hogy a betegek >80%-a férfi, továbbá, hogy nőkben a hormonértékeket számos egyéb faktor befolyásolja (menopauzális státus, hormonális ciklusok), ebből a tájékozódó vizsgálatból a nőket kihagytuk.

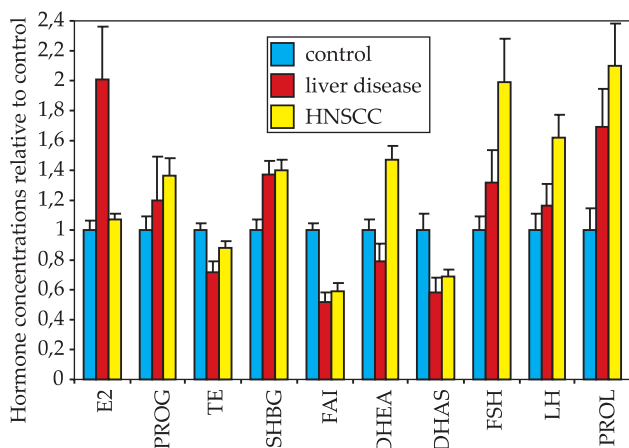
A citogenetikai vizsgálathoz hasonlóan alkoholos májbetegeket "pozitív" kontroll csoportját is vizsgáltuk, annak megítélésére, hogy az észlelt hormonális elváltozások mennyire tulajdoníthatóak a daganatos állapot-

nak, ill. a kísérő alkoholos májbetegségnek. A vizsgált csoportok átlagéletkora szerint nem volt szignifikáns különbség ( $p=0,20$ ). A szérumszint-GGT-érték szignifikánsan magasabb volt mind az alkoholisták (12,5-szeres emelkedés), mind a tumorosok (3,1-szeres emelkedés) között a kontrollokhoz képest. A progeszteronon kívül valamennyi vizsgált hormon értékei eltértek a kontrolltól (1. ábra). Magasabb SHBG- és PRL-értékek, valamint csökkent TE-, DHAS-szint és FAI a tumoros és a májbeteg csoportban egyaránt jelen volt, kórosabb értékekkel a májbeteg csoportban. Az E2-szint csak a májbetegeknél volt emelkedett ( $p=0,0037$ ), az FSH ( $p=0,0055$ ) és LH ( $p=0,0003$ ) szintje viszont csak a tumoros csoportban mutatott szignifikáns mértékben magasabb értékeket.

A hormonszintek közötti különbségek a kontroll személyek értékeihez képest (ANOVA): E2,  $p<0,0001$ ; PROG,  $p=0,2852$ ; TE,  $p=0,0155$ ; SHBG,  $p=0,0232$ ; FAI,  $p<0,0001$ ; DHEA,  $p=0,0006$ ; DHAS,  $p=0,0089$ ; FSH,  $p=0,0375$ ; LH,  $p=0,0112$ ; PRL,  $p=0,0308$ .

#### A hormonális eltérések prognosztikai szerepe fej-nyaki laphámrákban

A betegek klinikai paraméterei és a túlélés adatai megfeleltek a fej-nyaki rákra általában jellemző körlefo-lyásnak, ezért a vizsgált betegcsoportot jellemzőnek tekintettük a betegség kimenetelére, és alkalmasnak arra, hogy vele összefüggésben új prognosztikai paramé-terek értékét vizsgáljuk. A 3. táblázatban foglaltuk össze a hormonszintek és a túlélés között talált kapcsolatot. Egyik hormon esetében sem észleltünk kapcsolatot az életkor, a primer tumor helye vagy stádiuma és a kóros értékek alakulása között. Azoknak a betegeknek azonban, akik tumorstádiumuk szerint jobb prognózisra számíhattak (N0, St. I–II), szignifikánsan rosszabb volt a túlélésük abban az esetben, ha hypophysishormon-szintjeik (FSH, LH, PRL) magasak voltak (4. táblázat, 2.



1. ábra. Fej-nyaki rákos betegek, alkoholos májbetegek és egészséges kontroll személyek hormonszintjei

3. táblázat. A túléléssel szignifikáns összefüggést mutató kóros hormonszintek

Hormon	Szérumszint	Betegszám	Medián túlélés (hónap)	p-érték	Hazard ratio	95% CI
TE	≤10,4 nmol/l	67	18	0,02	1,46	1,05–2,28
	>10,4 nmol/l	218	34			
FTE	≤6 ng/dl	98	18	0,0015	1,67	1,24–2,51
	>6 ng/dl	143	39			
DHAS	<133 µg/dl	112	25	0,04	1,36	1,06–1,92
	≥133 µg/dl	163	39			
FSH	<8,5 mIU/ml	183	34	0,022	0,71	0,49–0,94
	≥8,5 mIU/ml	104	24			
LH	<7,5 mIU/ml	259	33	0,0083	0,55	0,26–0,81
	≥7,5 mIU/ml	27	16			
PRL	<250 mIU/L	224	35	0,0043	0,62	0,38–0,83
	>250 mIU/L	61	19			

TE: tesztoszteron; FTE: szabad tesztoszteron; DHAS: dehidroepiandroszteron; FSH: follikuluszstimuláló hormon; LH: luteinizáló hormon; PRL: prolaktin

## Szteroidhormon-receptorok (ER, PgR) vizsgálata

Szteroidhormon-receptorok nem tumoros  
száj- és gégegyálkahártyában

Paraffinba ágyazott anyagon nem sikerült kimutatni receptort. Fixálatlan, fagyasztott szövetben immunhisztokémiai módszerrel 10 nem daganatos szájüreg-, ill. gégegyálkahártyát vizsgáltunk meg immunhisztokémiával. ER $\alpha$  fehérjét a normális laphámsejtekben, ER $\beta$ -t pedig a mirigyhámsejtek citoplazmájában találtunk. A nem daganatos nyálkahártyában ER $\alpha$ , ER $\beta$  és PgR jelenlétét mRNS-szinten is igazolni tudtuk a vizsgált 10 anyagból 7 esetben.

Szteroidhormon-receptorok  
fej-nyaki laphámrákban

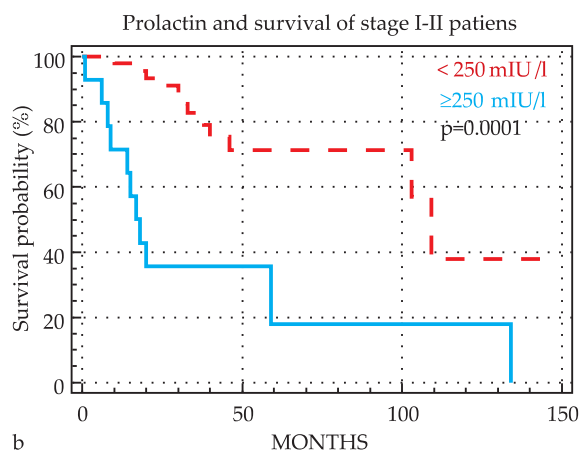
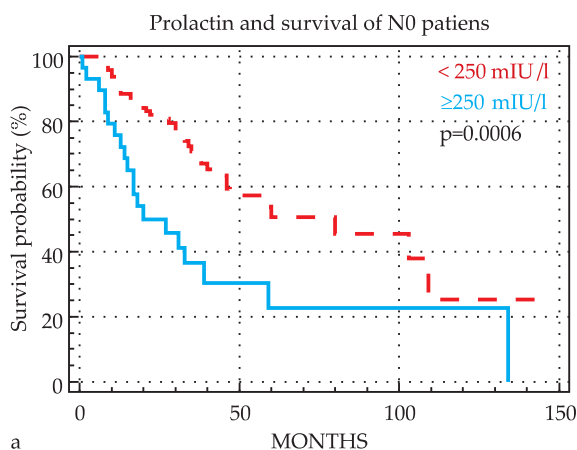
ER $\alpha$ , ER $\beta$  és PgR kimutatására fagyasztva tárolt fixálatlan tumorszöveten először immunhisztokémiai módszerrel kerestük a receptorokat, majd pozitív immunhisztokémiai reakció esetén PCR technikát alkalmaztunk a receptor jelenlétének mRNS-szinten történő igazolására. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredményeit az 5. táblázatban foglaltuk össze. Gyakori volt az ER $\alpha$  sejtmagban észlelhető pozitívítása, bár kevésbé gyakran a citoplazmában is láttunk

ábra). Az egyébként is rossz prognózisú betegek (N+, St. III–IV) túlélése pedig még rosszabb volt, ha TE- vagy DHAS-szintjük a normális érték alatt volt (4. táblázat, 3. ábra). Multivariációs analízis alapján a teljes betegcsoportban a T és N státus bizonyult független prognosztikai tényezőnek, a PRL-érték közel szignifikáns volt ( $p=0,07$ ). Az N0 alcsoportban viszont a PRL független prognosztikai tényezőként jelent meg ( $p=0,0013$ ), míg az N+ alcsoportban a TE bizonyult független prognosztikai tényezőnek ( $p=0,0053$ ).

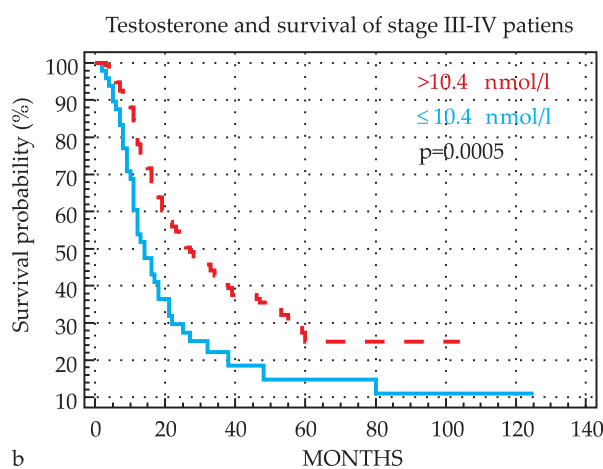
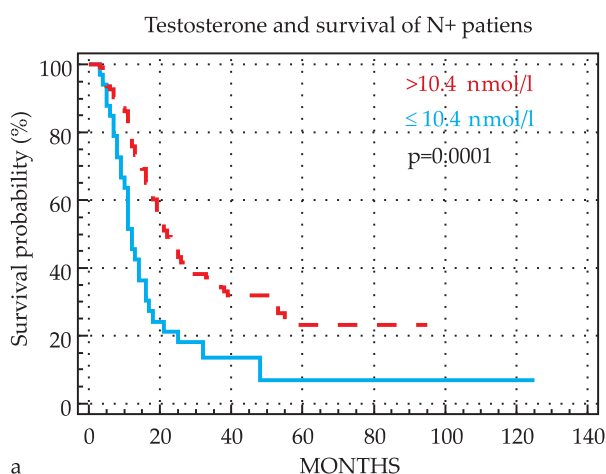
4. táblázat. A túlélés és a hormoneltérések összefüggései

Hormon	N0 (n=130)	N+ (n=159)	St. I-II (n=63)	St. III-IV (n=226)
TE	NS	$p=0,0001$	NS	$p=0,0005$
FTE	NS	$p=0,0037$	NS	NS
DHAS	NS	$p=0,03$	$p=0,018$	NS
FSH	$p=0,047$	NS	NS	$p=0,03$
LH	$p=0,0024$	NS	$p=0,0046$	NS
PRL	$p=0,0006$	NS	$p=0,0001$	NS

TE: tesztoszteron; FTE: szabad tesztoszteron; DHAS: dehidroepiandroszteron; FSH: follikulusstimuláló hormon; LH: luteinizáló hormon; PRL: prolaktin; NS: nem szignifikáns



2. ábra. A betegek túlélése és a prolaktinszint összefüggése az N0 (a) illetve a St. I–II (b) csoportban



3. ábra. A betegek túlélése és a tesztoszteronszint összefüggése az N+ (a) illetve a St. III–IV (b) csoportban

5. táblázat. Szexhormonreceptorok fej-nyaki laphámrákban

	n	ER $\alpha$ (%)	ER $\beta$ (%)	ER* (%)	PgR* (%)	FHR (%)
HNSCC	67	28 (41,8%)	19 (28,4%)	34 (50,7%)	33 (49,3)	27 (40,3%)
Szájúreg	24	12 (50,0%)	8 (33,3%)	14 (58,3%)	12 (50,0%)	9 (37,5%)
Gége/hypopharynx	43	16 (37,2%)	11 (25,6%)	20 (46,5%)	21 (48,8%)	18 (41,9%)

HNSCC: fej-nyaki laphámrák, \*receptorpozitivitás immunhisztokémiával és PCR-rel; FHR: funkcionális hormonreceptor (ER $\alpha$ - és ER $\beta$ -pozitivitás PgR-pozitivitással)

jelölődést. ER $\beta$  főleg a tumorsejtek citoplazmájában, PgR mind a magban, mind a citoplazmában mutatkozott. A tumorszövet stromasejtjeiben nem észleltünk szexhormonreceptorra utaló jelölődést. A PCR-analízis az ER és PgR jelenlétét megerősítette. Az ER-expresszió gyakoribb volt szájüregi daganatokban, mint a gégeben (58,3% vs. 46,5%), a PgR megjelenése hasonló volt a két lokalizációban. Az ER $\alpha$  mindegyik lokalizációban gyakoribb volt, mint az ER $\beta$ . ER és PgR koexpresszióját, amely funkcionáló ER-ra utal, 27/67 (40,3%) esetben találtunk (5. táblázat).

#### A szexhormonreceptor-pozitivitás prognosztikai értéke fej-nyaki laphámrákban

A szexszteroid-hormonstátus szempontjából nem látott különbség a teljes betegcsoportban a túlélést illetően. A gége-hypopharynx alcsoportban azonban, ha nem is szignifikáns, de jelzett különbséget észleltünk: az ER-pozitív esetek túlélési valószínűsége rosszabb volt ( $p=0,0636$ ).

## ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Nem daganatos alkoholisták pozitív kontrollként történő alkalmazása fontos, eddig nem vizsgált információkkal szolgált mind a citogenetikai, mind a hormonális kóros elváltozások fej-nyaki daganatra utaló biomarkerként való értékelésében.
2. Fej-nyaki daganatos betegekben a genetikai instabilitás kifejeződik a szignifikánsan emelkedett spontán kromoszómaaberrációk arányában ( $p<0,05$ ), de alkoholistákban is észlelhető ( $p<0,05$ ) az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Gyakoribb volt az aberráns sejtek megjelenése az egészséges dohányosokban is a nem dohányzókhöz képest. Mindezek alapján a spontán kromoszómaaberrációk gyakorisága megfelelő biomarkernek mutatkozott jelen vizsgálatunkban a daganatos fenotípus jelzésére (fej-nyaki tumoros betegek) és a daganat kialakulásának kockázatára (alkoholistákban és dohányosokban). Ez a módszer ígéretes lehetőséget kínál a fej-nyaki rák megelőzésére és korai felismerésére a veszélyeztetett populációban, ami a jelenleginél gyakoribb szervmegtartó műtétek elvégzését teheti lehetővé azáltal, hogy nő a korai stádiumban felfedezett daganatok száma.
3. Fej-nyaki rákos betegekben ( $b/c=1,06\pm 0,49$ ), és még inkább alkoholistákban ( $b/c=1,3\pm 0,67$ ) fokozott mu-
4. A fej-nyaki rákos betegek többségében találtunk kóros hypophysis- (FSH, LH, PRL), szexszteroidhormon- (TE) és SHBG-szérumszinteket. Legtöbb esetben ezek az elváltozások kimutathatók voltak krónikus alkoholos májbetegekben is. E hormonok prognosztikai szerepe hangsúlyozza a kísérő májbetegség fontosságát, és aktív kezelésének szükségességét a daganatok sebészi kezelésével párhuzamosan.
5. Az emelkedett PRL-érték független rizikótényező ( $p=0,0013$ ) a túlélés szempontjából a betegek N0 stádiumú alcsoportjában. Ez fontos információ a sebész számára a posztoperatív adjuváns kezelések meghatározása, a túl- vagy alulkezelés elkerülése szempontjából.
6. Magas FSH- és LH-szérumszint a fej-nyaki rákra jellemző eltérés volt beteganyagunkban alkoholistákkal és egészséges kontrollokkal történt összehasonlítás alapján. A magas FSH- ( $p=0,022$ ) és LH- ( $p=0,0083$ ) szérumszint rossz prognózist jelzett.
7. Az alacsony TE-szérumszintnek szignifikáns prognosztikai jelentősége van ( $p=0,0005$ ) még rosszabb prognózis előrejelzésében az előrehaladott stádiumú (St. III, St. IV) fej-nyaki daganatos betegekben. A legtöbb ilyen daganat esetén csonkító műtetre van szükség, és általában még így is rossz a betegek életkilá-

tása, ezért érdemes mérlegelni a funkciómegőrzés nem sebészi módszereit, indukciós kemoterápia vagy kemoradioterápia formájában.

8. Gyakori ER-expresszió, különösen PgR-expresszióval együtt, funkcionáló szteroidhormon-receptorokra utal fej-nyaki laphámrák-szövetben, amelyek a jövőben terápiás célpontul is szolgálhatnak. Ez esetben elméletileg a célzott terápiák széles választéka jön szóba, hogy adjuváns kezelésként biztosítsa a sebészi beavatkozások eredményének tartós sikerét.
9. Eredményeink közül a spontán és BLM-indukált kromoszómaaberrációk kombinált értékelése, a PRL- és a TE-szérumszint meghatározása és a funkcionális ER kimutatása látszik leginkább alkalmasnak arra, hogy a fej-nyaki laphámrák diagnosztikai és/vagy prognosztikai biomarkerévé fejlődjön. Ehhez az szükséges, hogy prospektív klinikai vizsgálatokba beépítve alkalmazzák és értékeljék a fenti markerek szerepét. Ilyen biomarkerek a jövőben várhatóan segítségére lesznek a sebészek az optimális primer és posztoperatív kezelés megtervezésében, a biztonságos szerv- és funkciómegtartó kezelések elvégzésében.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kásler Miklós professzor úrnak, az Országos Onkológiai Intézet főigazgatójának munkám szakmai irányításáért és folyamatos támogatásáért az elmúlt 15 évben. Ő volt téziseim témavezetője. Köszönöm Dr. Czigler Jenő professzor úrnak, hogy a Szegedi Tudományegyetem Doktori Iskolája, "Klinikai és Kísérletes Kutatás a Helyreállító és Szervmegtartó Sebészetben" PhD program vezetőjeként elfogadta jelentkezésemet a programba, és hasznos tanácsaival sokat segített munkámban. Köszönöm Dr. Gundy Sarolta tanárnő intenzív tudományos támogatását a kromoszóma vizsgálatok irányításában, és hasznos tanácsait az eredmények értékelésével kapcsolatban, továbbá munkatársai, Székely Gábor biológus, Vass Nadja és Kiss Krisztina segítségét a kromoszómakárosodások értékelésének emberfeletti munkájában. Köszönettel tartozom Dr. Tímár József professzor úrnak tudományos munkám folyamatos támogatásáért, és munkatársainak, Dr. Rásó Erzsébet és Dr. Lukits Júlia tanárnőknek a hormonreceptor-vizsgálatban végzett együttműködésért. Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Számel Irén tanárnőnek, Dr. Vincze Borbála tanárnőnek és Dr. Budai Barna tanár úrnak tudományos és technikai együttműködésükért és hasznos tanácsaikért a hormonokkal kapcsolatos vizsgálatokban. Külön köszönöm Dr. Ladányi Andrea tanárnőnek az évek óta rendszeres, hasznos tudományos konzultációkat, és azt a stílusbeli és nyelvi segítséget, amelyet a jelen dolgozat megírásához nyújtott. Hálásan köszönöm kollégáimnak, az Országos Onkológiai Intézet Fej-Nyaksebészeti Osztálya orvosainak, nővéreinek, mütősnőinek közreműködését, akikkel együtt kezeltük a dolgozatban szereplő betegeket,

és akik munkájukkal sok éve segítették tudományos tevékenységemet. Köszönöm Gaudi István matematikus úrnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségét. Köszönöm Sós Juditnak a kézirat gondos szerkesztését, és Horváth Anikónak, Komáromy Sándor és Kónya Miklós uraknak az évek óta folyamatos, és a jelen munka összeállításához és prezentálásához is nyújtott széleskörű, gondos közreműködést.

## A TÉZISEK TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Remenár É, Számel I, Budai B, Vincze B, Gaudi I, Gundy S, Kásler M. Increase of hypophyseal hormone levels in male head and neck cancer patients. *Pathol Oncol Res* 13:341–344, 2007
2. Lukits J, Remenár É, Rásó E, Ladányi A, Kásler M, Tímár J. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen and progesterone receptors in head and neck cancer. *Int J Oncol* 30:155–160, 2007
3. Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Mutagen sensitivity of patients with cancer at different sites of the head and neck. *Mutagenesis* 20:381–385, 2005
4. Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis* 18:59–63, 2003
5. Remenár É, Számel I, Budai B, Orosz Zs, Gaudi I, Kásler M, Gundy S. Szex szteroid- és hypophysishormon-szintek prognosztikus jelentősége fej-nyaki laphámrákban. *Magyar Onkológia* 47:155–159, 2003
6. Remenár É, Számel I, Budai B, Gaudi I, Kásler M, Gundy S. Szex szteroid- és hypophysishormonok valamint a májfunkció összehasonlító vizsgálata egészséges, alkoholisták és fej-nyaki laphámrákos férfiakban. *Magyar Onkológia* 46:329–332, 2002
7. Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Expozíció vagy rákhajlam? Fej-nyaki laphámrákos betegek citogenetikai szűrése. *Magyar Onkológia* 45:152–157, 2001
8. Budai B, Remenár É, Orosz Zs, Számel I, Kralovánszky J, Kásler M. Szteroidhormon-receptorok vizsgálata fej-nyak laphámrákban szenvedő betegeken. *Orvosi Hetilap* 12: 723–727, 1997
9. Remenár É, Számel I, Budai B, Kásler M. „Why men?” Hormones and hormone receptors in male head and neck cancer patients. In: *Advances in Laryngology in Europe*. Eds. Kleinsasser O, Glanz H, Olofsson J. Elsevier Publ. 1997, pp. 137–140

## A TÉZISEK TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. Remenár É, Vincze B, Számel I, Ladányi A, Tímár J, Kásler M. Circulating hormone levels and prognosis in head and neck cancer. *ECCO14, Barcelona*, 2007
2. Remenár É, Katz N, Számel I, Budai B, Orosz Zs, Gundy S. A mutagén szenzitivitás és hormonális eltérések vizsgálata fej-nyak laphámrákos betegeken. *MOT Dunántúli szekció V. Vándorgyűlés*, Pécs, 1998
3. Székely G, Remenár É, Kelecsényi Zs, Gundy S. A bleomycin-teszt használhatósága a fej-nyaki laphámrák prevenciójában. *Magyar Onkológusok Társasága 24. Kongresszusa, Budapest*, 2001. *Magyar Onkológia* 45(Suppl):200, 2001
4. Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Mutagen sensitivity of patients with head and neck cancer of different anatomical regions. *34<sup>th</sup> Annual Meeting of EEMS, Maastricht*, 2004, p 95, Abstr. PW3019
5. Koltai P, Székely G, Remenár R, Gundy S. Role of biological- and various social- and life-style risk factors in the causation of head and neck cancer in a Hungarian study population. *EACR meeting, Párizs*, 2005