

Прогностическое значение биомаркеров при плоскоклеточном раке полости рта. Обзор литературы

А.В. Игнатова¹, А.М. Мудунов², М.Н. Нариманов²

¹Кафедра онкологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России; 125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, 2/1;

²НИИ клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»; 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анастасия Валерьевна Игнатова annasurge@gmail.com

Достижения в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе развития плоскоклеточного рака полости рта (ПРПР), привели к увеличению числа молекул-биомаркеров, которые могут быть использованы для прогнозирования клинического течения данного заболевания, а также для оценки прогноза и выживаемости больных. В клинической практике определение биомаркеров опухолевых клеток ПРПР может иметь огромное значение для прогнозирования и оценки эффекта при лечении таргетными препаратами.

Нами были проанализированы статьи из медицинских журналов, опубликованные в базе PubMed за последние 8 лет. Были обработаны данные исследований 24 молекулярных биомаркеров, которые были разделены на 5 групп, основанных на биологических функциях: 1) маркеры, ответственные за ускорение клеточного цикла и пролиферации; 2) гипоксия-индуцируемые факторы (hypoxia-inducible factors (HIF)); 3) маркеры супрессии и апоптоза опухолевых клеток; 4) маркеры ангиогенеза; 5) маркеры клеточной адгезии и деградации внеклеточного матрикса. Также выполнен обзор исследований, посвященных роли белковых биомаркеров, выявленных с помощью иммуногистохимических исследований, в прогнозировании исхода заболевания.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак полости рта, биомаркер, выживаемость, прогноз, исход, иммуногистохимия, клеточный цикл, гипоксия, апоптоз, ангиогенез, адгезия

Prognostic significance of biomarkers in oral squamous cell carcinoma. Review

A. V. Ignatova¹, A. M. Mudunov², M. N. Narimanov²

¹Department of Oncology, Russian Medical Academy of Post-Graduate Education; Russia, 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia;

²Research Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24, Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia

Advances in understanding of the molecular mechanisms underlying oral squamous cell carcinoma (OSCC) have resulted in an increasing number of molecules-biomarkers that can be used for prediction of behaviour of this disease to achieve the above objective.

We identified and classified 24 molecular biomarkers into five groups based on their biological functions: 1) cell cycle acceleration and proliferation; 2) hypoxia-inducible factors; 3) tumour suppression and apoptosis; 4) angiogenesis; 5) cell adhesion and matrix degradation. We considered articles published in PubMed-indexed journals over the past 8 years and conducted a literature review of studies examining the role of immunohistochemistry-based protein biomarkers in predicting OSCC outcome.

Key words: oral squamous cell carcinoma, biomarker, survival, prognosis, outcome, immunohistochemistry, cell cycle, hypoxia, apoptosis, angiogenesis, adhesion

Плоскоклеточный рак является наиболее распространенной формой рака полости рта, на его долю приходится 95 % всех злокачественных опухолей. Оценка прогноза и выживаемости больных раком полости рта является достаточно сложной задачей [1]. В настоящее время не существует молекулярных маркеров, которые могут быть рутинно использованы в клинической практике.

В основе развития плоскоклеточного рака полости рта (ПРПР) лежит накопление гетерогенных генетических изменений в клетках плоского эпителия. Они приводят к увеличению способности измененных клеток к пролиферации и инвазии [2]. Гетерогенность таких генетических изменений объясняет тот факт, что при

одинаковой клинической стадии и локализации опухоли часто бывают значимые различия между их клиническим исходом и ответом на лечение [3–6].

ПРПР остается одной из самых тяжело контролируемых опухолей из-за своей высокой способности к местной инвазии и диссеминации в лимфатические узлы шеи [4]. Биологические факторы, лежащие в основе локорегионарного и дистанционного метастазирования, до конца не изучены [7]. Клиническое течение заболевания тяжело спрогнозировать, используя только клинические и гистопатологические параметры. В связи с локализацией заболевания обычно назначаемое комплексное лечение ПРПР приводит к снижению качества жизни и более тяжелой психосоциальной адап-

тации, по сравнению с опухолями других локализаций [2, 8]. По этой причине, несмотря на достижения в стратегии лечения, показатель выживаемости пациентов с ПРПР остается довольно низким.

Фенотипические изменения в клетках ПРПР могут иметь стратегическое прогностическое значение, особое внимание в последнее время было сфокусировано на пользе потенциальных биомаркеров в качестве надежных предикторов агрессивного течения заболевания [2]. Также определение биомаркеров может быть особенно полезно для индивидуального подбора пациентам максимально эффективной схемы адъювантной терапии [9].

Гены клеточной супрессии, онкогены, маркеры клеточной пролиферации и ангиогенеза, молекулы клеточной адгезии были исследованы в качестве инструмента для оценки прогноза пациентов с ПРПР [2].

Определение биомаркеров с помощью иммуногистохимических методов позволяет выявить пациентов с ПРПР, находящихся в группе высокого риска. Главная цель нашей статьи — выделить наиболее прогностически значимые маркеры, по которым можно судить о течении и прогнозе ПРПР, и впоследствии использовать в клинической практике в качестве параметра для определения чувствительности опухоли к таргетным препаратам.

В данном обзоре были использованы данные ретроспективных исследований, целью которых была оценка зависимости параметров выживаемости и прогноза от наличия определенных маркеров (по данным иммуногистохимического исследования) при первичных опухолях полости рта. В использованных исследованиях хирургическое лечение предшествовало химиотерапии и/или лучевой терапии, учитывались следующие локализации (согласно МКБ-10): C00, C02–C06, C06.1 и C06.2 [3, 10]. Данные исследований *in vitro* не были включены в обзор.

Были обработаны данные исследований 24 молекулярных биомаркеров, которые были разделены на 5 групп, основанных на биологических функциях: 1) маркеры, ответственные за ускорение клеточного цикла и пролиферации; 2) гипоксия-индуцируемые факторы (hypoxia-inducible factors — HIF); 3) маркеры супрессии и апоптоза опухолевых клеток; 4) маркеры ангиогенеза; 5) маркеры клеточной адгезии и деградации внеклеточного матрикса. Биомаркеры супрессии клеточного цикла и пролиферации имели наиболее противоречивые прогностические выводы. Наиболее распространенными оказались исследования по изучению маркеров супрессии и апоптоза опухолевых клеток. Изучению роли молекулярных биомаркеров гипоксии и ангиогенеза были посвящены только несколько недавних исследований. Исследования биомаркеров клеточной адгезии и деградации внеклеточного матрикса показали, что эта группа имеет большой потенциал для оценки прогностических параметров.

Маркеры клеточного цикла и пролиферации

К данной группе были отнесены следующие 6 маркеров: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), циклин D1, Ki-67, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) и серин/треонин-киназа 1 (AKT1) [11, 12], β -тубулин III. Рассмотрим наиболее изученные из них — EGFR, циклин D1, Ki-67, β -тубулин III.

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor — EGFR) — ErbB-трансмембранный рецептор, связывающий внеклеточные лиганды из группы эпидермальных факторов роста [13, 14]. Относится к семейству рецепторов ErbB, в частности к подсемейству тирозинкиназных (обладающих внутренней тирозинкиназной активностью) рецепторов: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) и HER4 (ErbB-4).

Активации EGFR может повысить злокачественный потенциал эпителиальных клеток [15]. В 4 исследованиях избыточная экспрессия EGFR коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с ПРПР [16–19], но подобные результаты не были подтверждены в 2 других работах [20, 21]. В одном исследовании была выявлена статистически значимая связь между комбинированной экспрессией EGFR, p53, и циклина D1 и неблагоприятным прогнозом общей выживаемости (ОВ) у пациентов с ПРПР [14].

Циклин D1 — белок из семейства циклинов, специфически регулирующий фазовый переход G1/S-фаза в клеточном цикле [3] (T. Motokura, D.J. Lew et al.) [22]. Мутации, амплификация и избыточная экспрессия гена циклина D1, ускоряющая прогрессию клеточного цикла и деление клеток, часто наблюдаются при ПРПР [23]. Изолированная экспрессия циклина D1 не связана с прогрессированием заболевания. M. Shiraki et al. [14] и R. Jayasurya et al. [24] показали, что комплексная экспрессия циклина D1 в сочетании с гиперэкспрессией EGFR и p53/p16 в значительной степени ассоциированы с неблагоприятным прогнозом у пациентов с ПРПР.

Ki-67. Экспрессия белка Ki-67 четко связана с пролиферацией клеток [25]. H. Myoung et al. [8], проанализировав данные 113 пациентов с ПРПР, выявили связь гиперэкспрессии Ki-67 с ухудшением ОВ и прогноза [8, 18, 19]. Однако J.I. Lee et al. [26] не выявили связи между экспрессией Ki-67 и влиянием на ОВ.

Ядерный антиген пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen — PCNA). PCNA хорошо известен как белковый маркер клеточного цикла, который играет важную роль в метаболизме нуклеиновых кислот, принимает участие в процессе репликации и репарации [27]. В нескольких недавних исследованиях экспрессия PCNA не была значительно ассоциирована с выживаемостью пациентов с ПРПР [8, 12, 28].

β -тубулин III. Клинические исследования показали важную роль гиперэкспрессии β -тубулина III в ре-

зистентности опухоли к препаратам таксанового ряда. Определение и регуляция уровней экспрессии β -тубулина III в опухолях может быть прогностическим фактором ответа опухоли на терапию таксанами [29].

Маркеры супрессии и апоптоза опухолевых клеток

К данной группе отнесены 6 видов маркеров: p53/p63, p21/p27, семейство белков Bcl-2 [30–32], сурвивин (survivin), ERCC1 и pRb [24, 33, 34]. Рассмотрим наиболее изученные из них.

p53 (белок p53) — транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно, ген *TP53* является антионкогеном [35, 36]. Мутации гена *TP53* обнаруживаются в клетках около 50 % злокачественных опухолей. По данным исследований, гиперэкспрессия p53 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при ПРП [37–39], но в 2 исследованиях имеются противоположные данные [40, 41].

p21/p27, семейство белков Bcl-2, p63 участвуют в регуляции апоптоза. Однако достоверная связь между их гиперэкспрессией и влиянием на прогноз и выживаемость при ПРП не доказана [5, 31, 32, 38–43].

Сурвивин — ингибитор апоптоза опухолевых и эмбриональных клеток, который практически отсутствует во всех дифференцированных клетках взрослого организма, однако активно экспрессируется при большинстве опухолей головы и шеи [44]. L. Lo Muzio et al. [45] считают, что гиперэкспрессия сурвивина является маркером агрессивного течения заболевания и инвазивного характера роста ПРП.

ERCC1. Фермент ERCC1 относится к группе ферментов, участвующих в эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов (nucleotide excision repair — NER). Гиперэкспрессия ERCC1 достоверно ассоциируется с пониженной чувствительностью опухоли к препаратам платины и плохим прогнозом [46, 47].

Биомаркеры гипоксии

Наиболее изучены 2 фактора: HIF-1 α и рецептор эритропоэтина (EPOR), также к этой группе относятся GLUT-1 [6, 48–50] и карбоангидраза IX (CA IX) [6, 15, 28, 51–53].

HIF-1 α . Ключевым фактором, вовлеченным в адаптивную реакцию опухоли на клеточную гипоксию, является белок HIF-1 α [54], который накапливается в клетке и в комплексе с HIF-1 β воздействует на гипоксия-реакционные элементы, содержащиеся в генах, продукты которых опосредуют ангиогенез, метаболизм глюкозы, клеточную пролиферацию, выживаемость, миграцию и инвазию клеток [55]. По некоторым данным, диффузная гиперэкспрессия HIF-1 α ассоциируется с хорошим прогнозом у пациентов с ПРП [48], однако в других исследованиях описываются противоположные эффекты [56, 57].

Эритропоэтин (EPOR) — гормон, который регулирует образование эритроцитов. EPOR вырабатывается в почках в ответ на гипоксию, его биологические эффекты регулируются посредством взаимодействия со специфическим трансмембранным рецептором EPOR и HIF-1 α [58]. Известно, что EPOR экспрессируются клетками опухолей ПРП [58]. J.L. Roh et al. доказали, что гиперэкспрессия EPOR ассоциирована со значительно более неблагоприятным прогнозом у пациентов с плоскоклеточным раком языка [59].

Маркеры ангиогенеза

Выделены прогностически значимые биомаркеры ангиогенеза: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и эндоглин (CD105) [60, 61], Ephs-рецепторы [62–65]. Большинство исследований посвящено VEGF.

Фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF) — сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования ангиогенеза и имеющий свойство ингибировать апоптоз эндотелиоцитов [66]. Солидные злокачественные опухоли не могут вырасти крупнее некоторого ограниченного размера, не получив адекватного кровоснабжения; опухоли же, способные экспрессировать VEGF, имеют возможность расти и метастазировать. В одних исследованиях не доказано влияние экспрессии VEGF на прогноз при ПРП [12], однако в других были противоположные результаты [64, 67–69]. В 2 работах было установлено, что у пациентов с VEGF-положительными опухолями выживаемость была значительно хуже. По данным метаанализа P.A. Kyzas et al. [66], у пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи (у 71 % пациентов диагностирован ПРП) гиперэкспрессия VEGF была статистически значимо ассоциирована с ухудшением ОВ [64, 67, 68].

Молекулы клеточной адгезии и деградации внеклеточного матрикса

К ним относятся матричные металлопротеиназы (MMP), CD44, катенины (catenins) и верзикан (versican).

Металлопротеиназы (metalloproteinases — MMP) представляют семейство протеаз, которые обычно экспрессируются инвазивными опухолями и окружающей их стромой [70]. Имеются противоречивые данные о связи между экспрессией MMP-2, MMP-9 и выживаемостью [16, 26, 71–74]. Также в некоторых исследованиях (J. C. de Vicente et al., M. Luukka et al.) у пациентов с метастазами ПРП в лимфатических узлах описана значимая корреляция между экспрессией MMP-7, MMP-13 и MMP-14 и снижением выживаемости [4, 70, 73, 75, 76].

Потеря опухолевыми клетками способности к адгезии может играть важную роль в процессе опухолевой инвазии и диссеминации [74]. Однако в немногочисленных недавних исследованиях, посвященных

влиянию экспрессии *CD44*, *катенинов*, *верзикана*, результаты достаточно противоречивы [7, 12, 72, 74, 77–84]. В настоящее время механизмы клеточной адгезии и ее влияние на прогностические факторы активно изучаются [85].

Заключение

В последние несколько лет был достигнут значительный прогресс в определении и понимании прогностической роли биомаркеров, которые могут быть предикторами агрессивного течения ПРПР. Система классификации TNM не отражает индивидуальные биологические особенности опухолевых клеток и, следовательно, не может в точности определять прогноз

заболевания. Определение панели наиболее показательных биомаркеров ПРПР в момент постановки диагноза позволит выделить группу пациентов, которым потребуется более агрессивное лечение. Возможность индивидуального определения набора биомаркеров при ПРПР делает возможным использование таргетной терапии. В настоящее время появились таргетные препараты, «мишенями» которых являются наиболее распространенные биомаркеры при ПРПР – EGFR, VEGFR и др. [86]. Терапевтические подходы, такие как использование некоторых молекулярных ингибиторов, направленных против конкретных биомаркеров, наряду с адъювантной лучевой терапией и/или химиотерапией могут иметь большие перспективы [3, 9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Tilakaratne W.M., Nissanka-Jayasuriya E.H. Value of HIF-1 α as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2011;11(2):145–7. doi: 10.1586/erm.11.2.
2. Massano J., Regateiro F.S., Januario G., Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1):67–76.
3. Oliveira L.R., Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:298–307. doi: 10.1016/j.ijom.2010.12.003.
4. de Vicente J.C., Lequerica-Fernández P., Santamaria J., Fresno M.F. Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis. *J Oral Pathol Med* 2007;36:415–24.
5. Fillies T., Woltering M., Brandt B. et al. Cell cycle regulating proteins p21 and p27 in prognostic of oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 2007;17:355–9.
6. Hoogsteen I.J., Marres H.A., Bussink J. et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. A review. *Head Neck* 2007;29(6):591–604.
7. Munoz-Guerra M.F., Marazuela E.G., Fernandez-Contreras M.E., Gamallo C. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indicator of poor prognosis. *Cancer* 2005;103:960–9.
8. Myoung H., Kim M.J., Lee J.H. et al. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:1005–10.
9. Riley R.D., Sauerbrei W., Altman D.G. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. *Br J Cancer* 2009;100:1219–29. doi: 10.1038/sj.bjc.6604999.
10. ICD-10. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th revision. World Health Organisation: Geneva, 1997.
11. Barnett S.F., Bilodeau M.T., Lindsley C.W. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation. *Curr Top Med Chem* 2005;5(2):109–25.
12. Lim J., Kim J.H., Paeng J.Y. et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1199–205.
13. Amo Y., Masuzawa M., Hamada Y., Katsuoka K. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients. *Br J Dermatol* 2004;150(1):160–1.
14. Shiraki M., Odajima T., Ikeda T. et al. Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognostic in curatively resected oral cancer. *Mod Pathol* 2005;18:1482–9.
15. LaCasse E.C., Mahoney D.J., Cheung H.H. et al. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008;27(48):6252–75.
16. Agra I.M., Carvalho A.L., Pinto C.A. et al. Biological markers and prognostic in recurrent oral cancer after salvage surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:743–9. doi: 10.1001/archotol.134.7.743.
17. Laimer K., Spizzo G., Gastl G. et al. High EGFR expression predicts poor prognostic in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol* 2007;43:193–8.
18. Silva S.D., Perez D.E., Alves F.A. et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol* 2008;44:484–90.
19. Silva S.D., Cunha I.W., Nishimoto I.N. et al. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2009;45:e134–e139.
20. Diniz-Freitas M., Garcia-Caballero T., Antunez-Lopez J. et al. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2007;13(3):285–90.
21. Smid E.J., Stoter T.R., Bloemena E. et al. The importance of immunohistochemical expression of EGFR in squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:1323–9.
22. Santamaria D., Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* 2006;11:1164–88.
23. Yu Z., Weinberger P.M., Haffty B.G. et al. Cyclin d1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1160–6.
24. Jayasurya R., Sathyan K.M., Lakshminarayanan K. et al. Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18(8):1056–66.
25. Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A. et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription

- in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006;206(3):624–35.
26. Lee J.I., Jin B.H., Kim M.A. et al. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107(5):678–84. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.12.047.
27. Naryzhny S.N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3789–808.
28. Kim S.J., Shin H.J., Jung K.Y. et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Jpn J Clin Oncol* 2007;37(11):812–9.
29. Koh Y., Kim T.M., Jeon Y.K. et al. Class III β -tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2009;20(8):1414–9. doi: 10.1093/annonc/mdp002.
30. Camisasca D.R., Honorato J., Bernardo V. et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009;45(3):225–33. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.021.
31. de Vicente J.C., Olay S., Lequerica-Fernandez P. et al. Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006;35(3):140–5.
32. Kato K., Kawashiri S., Yoshizawa K. et al. Apoptosis-associated markers and clinical outcome in human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2008;37:364–71.
33. Soni S., Kaur J., Kumar A. et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology* 2005;68:314–25.
34. Tashiro E., Tsuchiya A., Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 2007;98:629–35.
35. Chari N.S., Pinaire N.L., Thorpe L. et al. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. *Apoptosis* 2009;14(4):336–47.
36. Lane D.P., Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990 Jan;4(1):1–8.
37. de Oliveira L.R., Ribeiro-Silva A., Zucoloto S. Prognostic impact of p53 and p63 immunoreexpression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007;36(4):191–7.
38. Oliveira L.R., Ribeiro-Silva A., Zucoloto S. Prognostic significance of p53 and p63 immunolocalisation in primary and matched lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Histochem* 2007;109(5):388–96.
39. Oliveira L.R., Ribeiro-Silva A., Costa J.P. et al. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(5):685–95.
40. Lo Muzio L., Santarelli A., Caltabiano R. et al. p63 overexpression associates with poor prognostic in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36(2):187–94.
41. Lo Muzio L., Campisi G., Farina A. et al. Effect of p63 expression on survival in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2007;25:464–9.
42. Nemes J.A., Nemes Z., Marton I.J. p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognostic in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005;34(5):274–9.
43. Zhang M., Zhang P., Zhang C. et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009;38:307–13.
44. Lippert B.M., Knauer S.K., Fetz V. et al. Dynamic survivin in head and neck cancer: molecular mechanism and therapeutic potential. *Int J Cancer* 2007;121(6):1169–74.
45. Lo Muzio L., Farina A., Rubini C. et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 2005;225:27–33.
46. Jun H.J., Ahn M.J., Kim H.S. et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer* 2008;99(1):167–72. doi: 10.1038/sj.bjc.6604464.
47. Chiu T.J., Chen C.H., Chien C.Y. et al. High ERCC1 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance and poor outcome in unresectable squamous cell carcinoma of head and neck in a betel-chewing area. *J Transl Med* 2011 Mar 23;9:31. doi: 10.1186/1479-5876-9-31.
48. Fillies T., Werkmeister R., van Diest P.J. et al. HIF1- α overexpression indicates a good prognostic in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005;5:84.
49. Jonathan R.A., Wijffels K.I., Peeters W. et al. The prognostic value of endogenous hypoxia-related markers for head and neck squamous cell carcinomas treated with ARCON. *Radiother Oncol* 2006;79(3):288–97.
50. Kunkel M., Moergel M., Stockinger M. et al. Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognostic in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 2007;43:796–803.
51. Choi S.W., Kim J.Y., Park J.Y. et al. Expression of carbonic anhydrase IX is associated with postoperative recurrence and poor prognostic in surgically treated oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2008;39(9):1317–22.
52. Janssen K.L., Haustermans K.M., Balm A.J., Begg A.C. Hypoxia in head and neck cancer: how much, how important? *Head Neck* 2005;27:622–38.
53. Sakata K., Someya M., Nagakura H. et al. Brachytherapy for oral tongue cancer: an analysis of treatment results with various biological markers. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:402–7.
54. Brennan P.A., Mackenzie N., Quintero M. Hypoxia-inducible factor 1 α in oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2005;34(7):385–9.
55. van de Pol S.M., Doornaert P.A., de Bree R. et al. The significance of anemia in squamous cell head and neck cancer treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Oral Oncol* 2006;42:131–8.
56. Lin P.Y., Yu C.H., Wang J.T. et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α is significantly associated with the progression and prognostic of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2008;37:18–25.
57. Liu S.Y., Chang L.C., Pan L.F. et al. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008;44:277–85.
58. Arcasoy M.O., Amin K., Chou S.C. et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clin Cancer Res* 2005;11:20–7.
59. Roh J.L., Cho K.J., Kwon G.Y. et al. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2009;45:63–8.
60. Chuang H.C., Su C.Y., Huang H.Y. et al. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope* 2006;116:1175–9.
61. Marioni G., Marino F., Giacomelli L. et al. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2006;126:633–9.
62. Campbell T.N., Robbins S.M. The Eph receptor/ephrin system: an emerging player in the invasion game. *Curr Issues Mol Biol* 2008;10:(1–2)61–6.
63. Pasquale E.B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behavior. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(6):462–75.
64. Shao Z., Zhang W.F., Chen X.M., Shang Z.J. Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: correlation with the angiogenesis and clinical outcome. *Oral Oncol* 2008;44:1110–7.
65. Wimmer-Kleikamp S.H., Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 2005;57(6):421–31.
66. Kyzas P.A., Cunha I.W., Ioannidis J.P. Prognostic significance

- of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2005;11:1434–40.
67. Arora S., Kaur J., Sharma C. et al. Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:2272–84.
68. Chien C.Y., Su C.Y., Hwang C.F. et al. High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *J Surg Oncol* 2006;94:413–7.
69. Shang Z.J., Li Z.B., Li J.R. VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35(6):533–8.
70. de Vicente J.C., Fresno M.F., Villalain L. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41(3):283–93.
71. Kim S.H., Cho N.H., Kim K. et al. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol* 2006;93(4):330–7.
72. Kosunen A., Pirinen R., Ropponen K. et al. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43(1):51–9.
73. Luukka M., Vihinen P., Kronqvist P. et al. Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognostic in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28(3):225–34.
74. Lyons A.J., Jones J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:671–9.
75. Bouchet B.P., Caron de Fromentel C., Puisieux A., Galmarini C.M. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;58:190–207.
76. Curran D., Giralt J., Harari P.M. et al. Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:2152–5.
77. Garcia-Montesinos-Perea B., Val-Bernal J.F., Saiz-Bustillo R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10(5):454–61.
78. Georgolios A., Batistatou A., Charalabopoulos A. et al. The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol* 2006;28(2):94–8.
79. Gonzalez-Moles M.A., Gil-Montoya J.A., Ruiz-Avila I. et al. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p16INK4a and CD44s in tongue cancer. *Oncol Rep* 2007;18(2):389–96.
80. Lo Muzio L., Campisi G., Farina A. et al. P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 2005;5:63.
81. Maeda G., Chiba T., Okazaki M. et al. Expression of SIP1 in oral squamous cell carcinomas: implications for E-cadherin expression and tumor progression. *Int J Oncol* 2005;27:1535–41.
82. Pukkila M., Kosunen A., Ropponen K. et al. High stromal versican expression predicts unfavourable outcome in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2007;60:267–72.
83. Rahmani M., Wong B.W., Ang L. et al. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84(1):77–92.
84. Ueda G., Sunakawa H., Nakamori K. et al. Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:356–61.
85. Kyzas P.A., Denaxa-Kyza D., Ioannidis J.P. Almost all articles on cancer prognostic markers report statistically significant results. *Eur J Cancer* 2007;43(17):2559–79.
86. Dorsey K., Agulnik M. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Drugs* 2013;73(4):315–25.