A fej-nyaki daganatok prognosztikai biomarkerei

Doktori tézisek

Dr. Birtalan Ede

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Tamás László Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Móricz Péter Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Dohán Orsolya Ph.D., klinikai főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Farkas Henriette Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Glasz Tibor Ph.D., egyetemi docens
Dr. Orosz Zsuzsanna Ph.D., adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

Több vizsgálat is beszámolt a humán papillomavírus (HPV) jelenlétének növekvő prevalenciájáról fej-nyaki daganatokban. Chaturvedi és munkatársai szignifikánsan emelkedett oropharyngealis daganat incidenciát figyeltek meg 1983 és 2002 között elsősorban a fejlett országok esetén és fiatalabb életkorban. Ezen adatok megerősítik a HPV fertőzés szerepét a szájgarati rákok gyakoriságának emelkedésében, különösen férfiak esetén. A férfi predominancia azzal magyarázható, hogy aktív orogenitális érintkezés során (heteroszeuális kapcsolatot feltételezve) a férfiak nagyobb HPV terhelésnek vannak kitéve, hiszen a fertőzött méhnyak váladék messze több vírusrészecskét tartalmaz, mint a fertőzött hímvessző. Nagy esetszámú vizsgálatok alapján a szájgarati laphámrákok 24,3%-a bizonyult HPV asszociáltnak a HPV DNS és $p16^{INK4}$ kettős teszteléssel. Mindazonáltal továbbra is hiányzott a konszenzus a HPV eredet egyértelmű diagnosztikáját illetően. Jelen vizsgálatban a $p16^{INK4}$ expresszió illetve a HPV DNS és $p16^{INK4}$ kettős tesztelés prediktív szerepét kívántuk összehasonlítani szájgarati tumoros betegek indukciós kemoterápiára adott válaszának vizsgálatán keresztül.

Az immunterápia jelentős fejlődést mutatott az eltelt évtizedben és a daganatellenes kezelések forradalmasításának ígéretét hordozza. Kiemelt érdeklődés kíséri az immunterápiás eszközöket a fej-nyaki daganatok terápiájában is hiszen a betegség patomechanizmusában alapvető az immunrendszer szerepe. Az immun-ellenőrzőpont blokkolók közül az anti-PD-1 monoklonális antitest nivolumab és pembrolizumab nemrégiben nyert FDA engedélyt recidív ill. metasztatikus fej-nyaki laphámrákok kezelésében. Intenzív kutatások ellenére továbbra is hiányoznak a megbízható prognosztikus és prediktív markerek. A tumorsejtek markerei mellett egyre nagyobb figyelem övezi az immun aktiváció mutatóit.
Jelen vizsgálatban a fej-nyaki laphámrákok alcsoportjai közötti esetleges különbséget vizsgáltuk a klinikopatológiai adatok illetve immunonkológiai markerek közötti összefüggések szerint. Az alcsoport kifejezés a HPV státusz illetve az anatómiai lokalizáció szerinti csoportosításra utal. A

megközelítés alapjául a különböző biomarkerek eltérő kifejeződésére utaló egyre szélesebb körű információ szolgált. Másrészről mára széleskörűen elfogadottá vált, hogy a HPV-asszociált és a HPV-negatív fej-nyaki daganatok különböző biológiai entitást képviselnek.

2. Célkitűzések

1. Célunk volt a $p16^{INK4}$ illetve a $p16^{INK4}$/HPV kettős vizsgálat prediktív szerepének összehasonlítása. Ezt a $p16^{INK4}$/HPV státusz alapján elkülönített szájgarati laphámrákban szenvedő betegek indukciós kemoterápiára adott válaszának elemzésén keresztül kívántuk megtenni.

2. Célul tűztük ki a fej-nyaki laphámrákok esetén a PD-1, PD-L1, PD-L2 és CTLA-4 immun-ellenőrzőpont blokkoló fehérjék expressziójának prognosztikai és prediktív markerként való vizsgálatát.

3. Továbbá vizsgálni kívántuk, hogy az immun-ellenőrzőpont blokkoló fehérjék expressziója tekintetében van-e különbség a fej-nyaki laphámrák anatómiai lokalizáció illetve $p16^{INK4}$/HPV státusz szerinti alcsoportjai között.

3. Módszerek

Betegek

Kutatásunkba 124, kezelést nem kapott, egymást követően diagnosztizált fej-nyaki laphámrákos beteget vontunk be. Kizártuk a orrgarati és a orr melléküregi elhelyezkedésű daganatokat. Betegeink közül 110 esetben állt rendelkezésre a szövettani blokk. A immun-ellenőrzőpont blokkoló fehérjekkel kapcsolatos vizsgálatban a szájgarati lokalizációt is kizártuk a homogenitás növelése érdekében illetve egy beteg archív tumormintája a korábbi vizsgálatok után már nem állt rendelkezésre, így nem teljesíthette a bevonási kritériumokat. Tehát végül 106 beteg maradt a vizsgálatban, akik a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikán részesültek kezelésben 2012 és 2014 között. Vizsgálatunkat az intézeti etikai bizottság engedélyezte (SE TUKEB 105/2014).

Vizsgálati elrendezés

A p16^{INK4} és a HPV DNS PCR státusz prediktív szerepe

Mindenek előtt p16^{INK4} immunhisztokémiai festést végeztünk a mintákon. A pozitív esetekben vizsgáltuk magas rizikójú HPV DNS jelenlétét valós idejű PCR segítségével. A p16^{INK4} és HPV DNS kettős pozitív eseteket tekintettük HPV pozitívnak. Összesen 32 olyan betegeket találtunk, akik szájgarati rákban szenvedtek és indukciós kemoterápában részesültek. A terápiás választ a RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1) alapján osztályoztuk. Összefüggést kerestünk a p16^{INK4}/HPV státusz és a terápiás válasz (komplett remisszió, részleges remisszió, stabil betegség, progresszív betegség) között.

Immun-ellenőrzőpont blokkoló fehérjék kifejeződése a fej-nyaki laphámrák alcsoportjaiban

A klinikai paraméterek (daganat elhelyezkedése, stádium, grade, nem, dohányás, alkoholfogyasztás, indukciós kemoterápiára adott válasz,

kemoirradiációs kezelésre adott válasz) mellett felhasználtuk az előzőekben leírt p16^{INK4}/HPV státusz meghatározás során nyert információt is a vizsgálathoz. A PD-1 expresszót immunsejteken, míg a PD-L1 és a CTLA-4 kifejeződést immun- és tumorsejteken is vizsgáltuk. Meghatároztuk a PD-L2 expresszió mértékét tumorsejteken. A CD8+ sejtek arányát és a TIL (tumor infiltráló limfocita) beszűrődés mértékét is meghatároztuk. Elsősorban a PD-1, PD-L1, PD-L2 és CTLA-4 expresszió és a TIL denzitás prognosztikus szerepét vizsgáltuk fej-nyaki laphámrákban. Emellett arra is kíváncsiak voltunk, van-e különbség a betegség alcsoportjai között. Alcsoportként az anatómiai besorolást illetve a p16^{INK4}/HPV státuszt határoztuk meg.

Szöveti mikrochip (tissue microarray, TMA) készítés

A Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetében található, formalinban fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) szövettani blokkokat használtuk a vizsgálathoz. Ebből következően minden blokk ugyanolyan intézeti protokoll alapján készült. A TMA blokkok egyenként 50-70 2 mm-es szövethengert tartalmaztak. A nem megfelelő mintavétel elkerülése céljából mintánként 2-3 hengert emeltünk ki. Négy mikrométeres natív metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre helyeztünk a későbbi immunhisztokémiai festések és a PCR-hez használt DNS kinyerése céljából.

Immunhisztokémia és kiértékelés

Immunhisztokémiai festést végeztünk a II. sz. Patológiai Intézetben. A festést követően metszeteinket digitalizáltuk Pannoramic Scan eszköz (3DHISTECH, Magyarország) segítségével. Három független vizsgáló végezte a kiértékelést Pannoramic Viewer program (3DHISTECH) használatával. A vizsgálók közötti eltérés esetén minden résztvevő bevonásával újraértékelést végeztük a konszenzus elérése céljából.

p16^{INK4} festés

BenchMark XT IHC/ISH (Roche, Germany) semi-automata eszközt használtunk a p16^{INK4} festéshez XT UltraView DAB v3 kittel. A festési

protokoll szerint jártunk el. Röviden, a metszeteket 72 °C -on inkubáltuk 4 percig. Három alkalommal használtunk EZ Prep Solution-t (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) a paraffin eltávolításához. Sejt kondícionáló, pH 8 oldatot (Ventana Medical Systems) alkalmaztunk a hő indukált antigén feltrás során 95 °C-on 30 percig, amit 100 °C-ra való melegítés követett 4 percig. Az endogén peroxidázok blokkolása 1 csepp UV INHIBITOR (Ventana) segítségével történt 37 °C-on, 6 percig. A primer $p16^{INK4}$-antitest (Clone CINtec E6H4, Ventana) 37 °C-on, 32 perces inkubációs idővel használtuk 1:100-as hígításban. Ezt követően UV HRP UNIV MULT másodlagos antitestet (Ventana) használtunk 37 °C-on 8 percig. A peroxidáz aktivitást diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (Ventana) vizualizáltuk. Hematoxillin II magfestést alkalmaztunk (Ventana). MIndegyik mosási lépést a hígított Reaction Buffer Concentrate (Ventana) segítségével végeztünk. Tumorsejt fészkenként 200 sejtet vizsgált 2-2 független megfigyelő. A festődés intenzitása nem játszott szerepet. Szinte kivétel nélkül nagyon erős intenzitást észleltünk a $p16^{INK4}$-pozitív esetekben.

PD-L1 festés

A PD-L1, PD-1, PD-L2, CTLA-4 és CD-8 festését végeztük a fentiekhez hasonlóan. Röviden, depereffinálást és antigén feltárást követően követően minden metszetet primer antitestekkel inkubáltunk 42°C-on 32 percig. Egyedül a PD-L1 jelölés igényelt 10 perccel hosszabb antigén feltárást illetve 2 órás primer antitest inkubációs időt. A másodlagos antitesttel való detektálás szobahőmérsékleten, 60 percig történt az ultraView™ Universal DAB Detection Kit (Ventana Benchmark Ultra, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA) protokollja szerint. Minden festési ciklus adekvát pozitív kontrollt tartalmazott. A metszetek hematoxillin hátteérfetést kaptak, ezt követően vízzel lemostuk, dehidráltuk és fedtük. A primer antitest mennyiségének megelőző manuális meghatározását követően a festési eljárás auomata (Ventana Benchmark Ultra, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA) segítségével történt.

A PD-L1 értékelési kategóriák meghatározása tumorsejteken ($PD\text{-}L1^{TC}$) a legfrissebb gut-off értékek alapján történt. A $PD\text{-}L1^{TC}$ kategóriák a következők voltak: 0: nincs festődés, 1: 0-1%, 2: 1-5%, 3: 6-10%, 4: 11-25%, 5: 26-100%. Az egynél nagyobb értéket vettük pozitívnak.

Immunsejteken (PD-L1^{IC}) a következő csoportosítást alkalmaztuk: 0: nincs festődés, 1: <1%, 2: 1-5%, 3: >5%. Az nullánál nagyobb értéket vettük pozitívnak.

PD-L2 festés

A PD-L2, PD-1, CTLA-4 és CD-8 festés a fentiek szerint történt.

A PD-L2 kiértékelés korábban leírt módon történt. A festődő tumorsejtek százalék szerinti pontszámának (0: nincs festődé, 1: <10%, 2: 10-50%, 3: >50%) és intenztás pontszámának (0: nincs festődés, 1: gyyenge, 2: közepes, 3: erős) összegét vettük. Pozitívnak vettük a 4-nél nagyobb értékeket.

PD-1 festés

A PD-1 immunsejteken való festődését a következő módon értekeltük: 0: <1%, 1: 1-5%, 2: >5%. Az 1 és 2 értéket tekintettük pozitívnak.

CTLA-4 festés

A CTLA-4 jelölődést mind immun- (CTLA-4^{IC}) mind tumorsejteken (CTLA-4^{TC}) vizsgáltuk. A meglehetősen kevés irodalmi adat miatt 10%-os lépcsőkben értékeltük ki a festődési arányt a következőképpen: 0: nincs festődés, 1: 1-10%, 2: 11-20%, stb. A pozitivitást a medián értéket meghaladó érték esetén határoztuk meg, a korábban leírtak szerint. A medián pontszám a CTLA-4^{TC} esetén 0 volt, így >1% festődést tekintettünk pozitívnak. CTLA-4^{IC} esetében hasonló módszerekkel >40%-os értéket vettünk pozitívnak.

CD-8 festődés

A CD8 festődést a korábban leírtaknak megfelelően értékeltük ki: 0: <1%, 1: 1-5%, 2: 6-20%, 3: >20%. Magas festődési arány >20% esetén véleményeztünk.

Magas rizikójú HPV DNS valós idejű polimeráz láncreakció

Humán DNS-t izoláltunk az FFPE metszetekről azokban az esetekben, ahol p16^{INK4}-immuhiszokémiai pozitivitást találtunk. Ehhez QIAmp DNA FFPE

Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) eszközt használtunk a gyártói protokoll szerint. A DNS detektálást CONFIDENCE™ HPV teszt (NEUMANN Diagnostics, Magyarország) segítségével végeztük HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 genotipizálással kombinálva. A megfelelő mennyiségű nukleinsav meglétét fluorometriás méréssl ellenőriztük Qubit™ Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eszköz és Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) segítségével a gyártó szerinti módon. A CONFIDENCE™ HPV teszt egy TaqMan®-alapú L1 régió specifikus multiplex valós idejű PCR esszé a virális DNS meghatározására. A tesz HPV 16 és 18-at külön ill. egyéb altípusokat ún. poolozott technikával vizsgál. A magas rizikójú HPV jelenléte esetén a genotipizálás külön reakcióként a specifikus primer segítségével történt QuantStudio™ 6 Flex platform (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével 384-well-es eszközzel.

Tumor infiltráló limfocita (TIL) arány

A TIL-ek arányát hematoxylin and eosin (HE) egész metszeteken határozta meg egy tapasztalt patológus (HJ). Röviden, a TIL érték azon alapult, hogy a teljes stromális területnek hány százalékát foglalták el a mononukleáris infiltráló sejtek. A következő kategóriák születtek: alacsony: 0-33%, közepes: 34-66%, magas: 67-100%.

Statisztikai analízis

Statistical kiértékelést végeztünk IBM SPSS Statistics for Mac verzió 20.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) segítségével. Pearson-féle khi-négyzet próbát és Fisher egzakt tesztet használtunk a diszkrét változók értékelésére. A túlélést Kaplan-Meier becsléssel és Log-Rank teszttel vizsgáltuk, melyet univariáns és multivariáns analízissel egészítettünk ki. Minden teszt kétoldalú volt, a p értéket mindenhol <0.05-nek határoztuk meg. A következő változókat vizsgáltuk: nem, tumor lokalizáció, HPV státusz, TNM státusz, dohányzás, alkohol fogyasztás illetve a fenti markerek expressziója. Betegségspecifikus túléléssel számoltunk, mely a diagnózistól az utolsó vizitig vagy a halálozásig eltelt időt jeelntette.

4. Eredmények

P16^{INK4}-expresszió és mags rizikújú HPV DNs státusz

A p16^{INK4} immunhisztokémiát 110 beteg esetén értékeltük ki. A 110 tumorminta közül összesen 19 esetben észleltünk pozitivitást (17,3%). A legmagasabb arányban a szájgarati lokalizációban figyeltünk meg p16^{INK4}-pozitivitást (38,1%), míg egyéb lokalizációk sokkal alacsonyabb arányt mutattak (gége: 4.8%, algarat: 4.2%) vagy nem mutattak p16^{INK4}-pozitivitást (szájüreg: 0%).
A 19 esetből 9 tumor tartalmazott HPV DNS-t (HPV-pozitív esetek). HPV 16 jelenléte 8 esetben igazolódott, míg 1 esetben HPV 33-at találtunk. Mindegyik HPV pozitív daganat a szájgaratban helyezkedett el. Ennek megfelelően tehát a szájgarat esetén 9/42, vagyis 21,4% volt a HPV-asszociált rákok aránya. Így vizsgálatunkban 56,3% volt a p16^{INK4}-expresszó specificitása HPV szempontjából.

P16^{INK4}/HPV DNS státusz és az indukciós kemoterápiára adott válasz

A 110 beteg közül 32 esetben történt indukciós kemoterápia. TPF (docetaxel plusz ciszplatin plusz 5-fluorouracil) 30 esetben, míg PF (ciszplatin plusz 5-fluorouracil) két esetben volt a választás. A p16^{INK4}-poziív betegek jobb terápiás választ mutattak, mint a p16^{INK4}-negatív csoport (Fisher egzakt teszt: p = 0,025). Szignifikáns különbséget találtunk a HPV státusz szerint is (Fisher egzakt teszt: p = 0,009).

A TIL arány szerepe

Mintáink magas TIL arányt mutattak; az esetek 27,3%-ában alacsony, 21,5%-ban közepes és 51,5%-ban magas TIL arányt figyeltünk meg. Érdekes módon a PD-L1^{IC} pozitivitás összefüggést mutatott a magasabb TIL aránnyal az összes mintát egybevéve (khi-négyzet: p=0.016), míg az anatómiai régiókat külön értékelve ez az összefüggés csak az algaratban volt megfigyelhető (Fisher egzakt teszt: p=0,006). A TIL pontszám

pozitívan korrelált továbbá a CTLA-4^{IC} expresszióval (khi-négyzet: p=0,013). Anantómiai régiókat külön nézve ismét csak az algarat mutatott összefüggést (Fisher egzakt teszt: p=0,028). Szájgarati daganatok esetén a TIL arány nem korrelált a HPV státusszal (Fisher egzakt teszt: 0,474). Nem találtunk összefüggést a TIL és a túlélés illetve az egyéb paraméterek között.

CD8 expresszió

A magas CD8 kifejeződés összefüggést mutatott a PD-L1 tumorsejteken való megjelenésével (khi-négyzet: p=0,001) és a PD-L1^{IC} pozitivitás is korrelált a CD8 státusszal (khi-négyzet: p=0,023). Egy mintában sem hiányzott a CD8+ sejtek infitrációja.

PD-L1 expresszió immunsejteken (PD-L1^{IC})

HPV-negatív tumorok esetében a PD-L1^{IC} pozitivitás jobb betegségspecifikus túléléssel társult (HR=0,502; CI95%, 0,273-0,923; p=0,027). Gége lokalizáció esetén a ugyanezt figyeltük meg (HR=0,222; CI95%, 0,062-0,795; p=0,021). Az életkor, lokalizáció és státusz szerint kontrollált multivariáns analízis során a PD-L1^{IC} státusz nem bizonyult önálló prognosztikai faktornak. Ezen kívül a PD-L1^{IC} pozitivitás korreleált a CTLA-4^{IC} pozitivitással (khi-négyzet: p=0,049) és a TIL aránnyal a fentiek szerint.

PD-L1 expresszió tumorsejteen (PD-L1^{TC}) nem függött össze a túléléssel

A PD-L1^{TC} és a PD-1 státusz kifejezetten erős korrelációt mutatott minden beteget vizsgálva (khi-négyzet: p<0,001) és lokalizációnként a szájgaratban (Fisher egzakt teszt: p<0,001) és a gégében (Fisher egzakt teszt: p=0,006) is, míg az algaratban ez nem volt megfigyelhető (Fisher egzakt teszt: p=0,074). A negatív HPV státusz összefüggést mutatott a PD-L1^{TC} expresszó hiányával szájgaratban (Fisher egzakt teszt: p=0,019).

PD-1 expresszió

A fentebb említett összefüggéseken kívül a PD-1 státusz nem korrelált az anatómiai régióval (khi-négyzet: p=0,239), a HPV státusszal (khi-négyzet: p=0,601) vagy egyéb más paraméterrrel sem.

PD-L2 expresszió

A PD-L2 tumorsejteken való kifejeződését vizsgálva negatív összefüggést találtunk a PD-1 expresszióval (khi-négyzet: p=0,027). Semmilyen egyéb klinikopatológiai mutatóval nem találtunk korrelációt.

CTLA-4 expression on immune cells (CTLA-4^{IC}) and tumor cells (CTLA-4^{TC})

A TIL arány pozitívan korrelált a CTLA-4^{IC} exresszióval és a PD-L1^{IC} pozitivitással fentiek szerint.
A fej-nyaki laphámrákos betegek egy csoportjában enyhe citoplazmatikus CTLA-4 pozitivitást találtunk a tumorsejteken. Semmilyen egyéb klinikopatológiai mutatóval nem találtunk korrelációt.

Anatómiai localizáció és túlélés

A gége laphámrákja jobb betegségspecifikus túlélést mutatott a garati tumorokhoz viszonyítva (HR=0.306; CI95%, 0,152-0,616; p=0,001; Log Rank p<0,001). Ugyanakkor ez az összefüggés nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét, ha csak a lokoregionálisan előrehaladott daganattal rendelkező betegeket (III-IVB klinikai stádium) vizsgáltuk (Log Rank p=0,057).

5. Következtetések

A p16^{INK4} immunhisztokémia és a p16^{INK4}/HPV PCR kettős tesztelés indukciós kemoterápiára vonatkozó prediktív szerepe szájgarati daganatokban:

1. A p16^{INK4} státusz immunhisztokémiai meghatározása precíz és költséghatékony prediktív markernek tekinthető a szájgarati laphámrákok indukciós kemo-terápiára adott válaszának várható megítélésében.
2. A p16^{INK4} státuszt a p16^{INK4}/HPV DNS PCR kettős teszteléssel összehasonlítva a p16^{INK4} státusz egyedül is hasonlóan pontos mutatónak bizonyult a klinikai válasz szempontjából.

A immun-ellenőrzőpont blokkoló fehérjék expressziója a fej-nyaki daganatok alcsoportjaiban:

3. A PD-L1 immunsejt pozitivitás jobb prognózissal társult HPV-negatív fej-nyaki daganatokban.
4. A PD-L1IC expresszió kedvező prognosztikai mutatónak bizonyult gége lokalizációjú laphámrák esetén.
5. A PD-L2 expresszió nem mutatott összefüggést a vizsgált paraméterekkel, viszont negatív korrelációt találtunk a PD-1 státusszal.
6. A fej-nyaki laphámrákok egy csoportjában CTLA-4 expressziót találtunk tumorsejteken, azonban ez nem állt összefüggésben a vizsgált változókkal.
7. Nem találtunk érdemi különbséget a vizsgált paraméterek és a fej-nyaki laphámrák anatómiai alrégiói között.
8. Ezzel szemben a HPV státusz egyértelmű csoportalkotó tulajdonságnak bizonyult a szájgarati laphámrákok immunaktivitása szempontjából.
9. Az algarati lokalizáció immunaktivitás szempontjából betöltött, esetlegesen eltérő szerepének vizsgálatára további kutatások szükségesek.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Birtalan E**, Danos K, Gurbi B, Brauswetter, Halasz J, Kalocsane Piurko V, Acs P, Antal B, Mihalyi R, Pato A, Fent Z, Polony G, Timar J, Tamas L. (2017) Expression of PD-L1 on immune cells shows better prognosis in laryngeal, oropharygeal and hypopharyngeal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol,* doi:10.1097/PAI.0000000000000590. *(IF:1.634)*
2. Brauswetter D, **Birtalan E**, Danos K, Kocsis A, Krenacs T, Timar J, Mihalyi R, Horcsik D, Polony G, Tamas L, Petak I (2017). p16^{INK4} expression is of prognostic and predictive value in oropharyngeal cancers independent of human papillomavirus status: a Hungarian study. *Eur Arch Otorhinolaryngol,* 274: 1959-1965. *(IF: 1,660)*

A disszertációtól független közlemények

1. Acs B, Madaras L, Tokes AM, Kovacs AK, Kovacs E, Ozsvari-Vidakovich M, Karaszi A, **Birtalan E**, Dank M, Szasz AM, Kulka J. (2017) PD-1, PD-L1 and CTLA-4 in pregnancy-related - and in early-onset breast cancer: A comparative study. *Breast,* 35: 69-77. *(IF: 2.801)*
2. **Birtalan E**, Dános K, Tamás L. (2016) Immunológiai megfontolások a humán papillomavírus asszociált fej-nyaki daganatok megelőzésében és kezelésében. áttekintő közlemény *Otorhinolaryngologia Hungarica,* 62: 54–x. *(IF: 0)*
3. Danos K, Brauswetter D, **Birtalan E**, Pato A, Bencsik G, Krenacs T, Petak I, Tamas L. (2016) The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol,* 24: 476-481. *(IF: 1,634)*

4. Brauswetter D, Danos K, Gurbi B, Felegyhazi EF, **Birtalan E**, Meggyeshazi N, Krenacs T, Tamas L, Petak I. (2016) Copy number gain of PIK3CA and MET is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 468, 579-587. *(IF: 2,848)*
5. Dános K, **Birtalan E**, Brauswetter D, Tamás L. (2015) A humán (emberi) papillomavírus (HPV) szerepe a szájgarat daganatainak kialakulásában, kórisméjében és kezelésében. áttekintő közlemény *Nőgyógyászati Onkológia,* 20,: 8-11. *(IF: 0)*
6. Szentkúti G, Brauswetter D, Dános K, **Birtalan E**, Tamás L. (2014) A fej-nyaki daganatok magas incidenciájának és mortalitásának okai hazánkban. *Otorhinolaryngologia Hungarica,* 60: 77-80. *(IF: 0)*
7. Kovacs A, Olah A, Lux A, Matyas C, Nemeth BT, Kellermayer D, Ruppert M, Torok M, Szabo L, Meltzer A, Assabiny A, **Birtalan E**, Merkely B, Radovits T. (2015) Strain and strain rate by speckle-tracking echocardiography correlate with pressure-volume loop-derived contractility indices in a rat model of athlete's heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology,* 308: 743-748. *(IF: 3.348)*
8. Matyas C, Nemeth BT, Olah A, Hidi L, **Birtalan E**, Kellermayer D, Ruppert M, Korkmaz-Icoz S, Kokeny G, Horvath EM, Szabo G, Merkely B, Radovits T. (2015) The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology,* 14:145. *(IF: 4.752)*
9. Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, **Birtalan E**, Kellermayer D, Ruppert M, Merkely G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2014) Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *International journal of cardiology,* 182: 258-266. *(IF: 6.189)*
10. Radovits T, Olah A, Lux A, Nemeth BT, Hidi L, **Birtalan E**, Kellermayer D, Matyas Cs, Szabo G, Merkely B. (2013) Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* 305: 124-134. *(IF: 3.348)*