

OCT4 esiintyminen kurkunpään dysplasiassa, sekä karsinoomassa

Antti Mäkilä
Syventävien opintojen tutkielma
Lääketieteellinen tiedekunta
Turun yliopisto
4/2023
Ohjaajana Sami Ventelä

Turun yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

MÄKILÄ, ANTTI: OCT4 esiintyminen kurkunpään dysplasiassa, sekä karsinoomassa

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 21 s.

Korva-, nenä- ja kurkkutaudit

Huhtikuu 2023

Pään ja kaulan alueen syövät muodostavat maailman kuudenneksi yleisimmän syöpäryhmän. Yli 90 % pään ja kaulan alueiden syövästä on levyepiteelikarsinomia (HNSCC). Viiden vuoden eloonjäämisprosentti HNSCC:ssä on 55. Diagnostiikka perustuu syövästä otettavan koepalan histopatologisiin tutkimuksiin. HNSCC:n hoitoon vaikuttavat muun muassa kasvaimen TNM-luokitus, kliiniset- sekä kuvantamistutkimukset. HNSCC luokitellaan usein myös syövän anatomisen sijaintinsa mukaan.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia OCT4:n roolia kurkunpään 1) dysplasiassa, 2) dysplasiassa, joka kehittyi karsinoomaksi sekä 3) kurkunpään karsinoomassa. OCT4 on transkriptiotekijä, joka säätelee solun erilaistumisen ja uudistumisen kannalta tärkeiden geenien ilmentymistä. OCT4:n yhtenä tehtävänä on myös ylläpitää solujen erilaistumiskykyä. Lisäksi OCT4 on mukana signaalivälityksen säätelyssä sekä solujen epigeneettisessä säätelyssä.

Tässä työssä tutkittavien potilaiden ryhmä valittiin tunnistamalla TYKS:n potilasrekisteristä ne potilaat, joilla on vuosina 2005–2015 todettu histologisessa näytteessä kurkunpäässä dysplasia-
tasoinen muutos. Edellä mainittujen potilaiden tunnistamisen jälkeen tutkittavat kudospätkät tilattiin AURIA-biopankista. Näiden potilaiden kudospätkille tehtiin OCT4 immunohistokemialliset värjäykset. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään miten OCT4 positiivisuus vaikutti kurkunpään dysplasian tai karsinooman aggressiivisuuteen. Tilastollista merkitsevyyttä analysoitiin käyttämällä χ^2 -testiä ja Kaplan-Meier eloonjäämisanalyysiä.

Potilaiden immunohistokemiallisista näytteistä vertailtiin OCT4 positiivisuutta edellä mainittujen 1), 2) ja 3) ryhmien välillä. Näissä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Tilastollista eroa ei ollut myöskään OCT4-positiivisuuden ja kuolleisuuden välillä. Kaplan-Meier analyysissä huomattiin, että potilailla, joilla on edeltävä, histologisesti todettu dysplasia on alhaisin kuolleisuus verrattuna dysplasiapotilaisiin tai potilaisiin, jotka ovat saaneet karsinoomadiagnoosin ilman edeltävää dysplasiaa. Nämä potilaat ovat olleet oletettavasti erikoissairaanhoidon seurannassa, joka näyttäisi löytävän dysplasian pohjalta kehittyvät pahanlaatuiset kasvaimet aikaisessa vaiheessa, jolloin syövän hoito on myös tehokkainta. OCT4 ei tämän tutkimuksen perusteella toimi ennusteellisena biomarkkerina kurkunpään dysplasiassa tai kurkunpään levyepiteelikarsinoomassa.

Avainsanat: HNSCC, Dysplasia, OCT4

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	2
2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	4
2.1 Pään ja kaulan alueen syövät	4
2.1.1. Jaottelu anatomisesti ja histologisesti	4
2.1.2. HNSCC:n syntymekanismi solutasolla	5
2.1.3. Riskitekijät.....	6
2.1.4. Hoitovaihtoehdot	7
2.1.5. Biomarkkerit HNSCC:n ennusteessa.....	8
3. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	9
4. TULOKSET	11
5. POHDINTA	17
LÄHDELUETTELO	20

1. JOHDANTO

Pään ja kaulan alueen syöpä on maailman kuudenneksi yleisin syöpä. Uusista tapauksista 90 % on levyepiteelisyöpiä, joista käytetään lyhennettä HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma). Maailmanlaajuisesti vuosittain todetaan 890 000 uutta HNSCC tapausta ja yli 430 000 potilasta kuolee HNSCC:hen vuosittain (Routila ym. 2022, Johnson ym. 2020). HNSCC:t ovat ryhmä kliinisesti heterogeenisiä ja osittain aggressiivisesti käyttäytyviä syöpiä. Potilaiden ennusteeseen negatiivisesti vaikuttavat HNSCC:n herkkä metastasoituminen kaulan imusolmukkeisiin, paikallinen uusiutumistaipumus sekä käyttökelpoisten biomarkkereiden vähäinen määrä taudin etenemisen arvioinnissa.

HNSCC diagnoosi perustuu biopsiaan, josta saadaan kasvaimen histologinen luokitus. Kurkunpään alueella biopsia vaatii tavallisesti nukutustoimenpiteen, joka mahdollistaa näkökontrollissa tehtävän kudoksen näytteen ottamisen kurkunpään muutoksesta. Kasvaimen histologisen luokituksen ja levinneisyyden selvittämiseksi tehdään usein myös kuvantamistutkimuksia. Näitä ovat pään ja kaulan alueen tietokonetomografiakuvaus (CT), magneettikuvaus (MRI) ja levinneisyyden arvioimiseksi tehtävä PET-tietokonetomografia (PET-CT). Rintakehän kuvantaminen CT:llä on paikallisen levinneisyyden selvittämiseksi usein myös tarpeellista. Erotusdiagnostiikkaa dysplastisen muutoksen ja HNSCC:n välillä vaikeuttaa se, että dysplastista muutosta ja HNSCC:tä on usein kliinisesti mahdotonta erottaa toisistaan. Usein muutoksen pahanlaatuisuuden poissulku vaatiikin diagnostista laryngomikroskopiaa, jossa muutoksen histologia varmistetaan nukutuksessa tehtävässä biopsiassa (Johnson ym. 2020).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää OCT4:n ilmentymistä sekä merkitystä kurkunpään dysplasiassa sekä HNSCC:ssä. OCT4 on transkriptiotekijä, joka säätelee solujen erilaistumisen ja uudistumisen kannalta tärkeiden geenien ilmentymistä (Patel ym. 2022). Yhtenä OCT4:n tehtävänä on myös ylläpitää solujen monikykyisyyttä, eli pluripotentiutta, estämällä solujen erilaistumista (Patel ym. 2022, Mishra ym. 2020). OCT4:llä on aikaisemmissa tutkimuksissa osoitettu olevan merkitystä myös HNSCC:n aggressiivisuuden sekä hoitovasteen säätelyssä (Mishra ym. 2020, Routila ym. 2022). Routilan tutkimus osoitti, että OCT4 positiivisuus HNSCC:ssä oli yhteydessä suurentuneeseen kuolleisuuteen, silloin kun hoitolinjana oli pelkkä sädehoito. Kuitenkin HNSCC

potilaat, joiden hoidossa käytettiin sädehoidon rinnalla cisplatiinia (kemosädehoito), OCT4:stä aiheutunut säderesistenttiys sekä lisääntynyt syöpäkuolleisuus saatiin kumottua. Mielenkiintoista Rutilan työssä oli myös suuri OCT4 ilmentymisen vaihtelu HNSCC potilaiden välillä sekä se, että anatomisesti voimakkain OCT4-ekspressio esiintyi kurkunpäässä.

Tässä retrospektiivisessä tutkimuksessa tutkittiin histologisesti varmennettuja dysplasia-asteisia muutoksia kurkunpään alueella potilailla, joilla dysplasia ei seuranta-aikana muuntunut karsinoomaksi. Vertasimme näiden potilaiden kudoksenäytteitä potilaskohorttiin, jossa potilailla oli seuranta-aikana dysplasian lisäksi karsinoomatasoinen muutos. Lisäksi omana potilasryhmänä olivat potilaat, joilla karsinoomadiagnoosia oli edeltänyt pään ja kaulan alueen dysplasiamuutos. Potilaiden kudoksenäytteille tehtiin OCT4 immunohistokemialliset värjäykset (IHC). OCT4 IHC:n voimakkuutta arvioitiin laskemalla OCT4 positiiviset solut patologin varmistaman dysplasia tai HNSCC muutoksesta. Tämän jälkeen tutkitun alueen negatiiviset ja positiivisesti värjäytyneet solut laskettiin ja mikäli yli 10 % soluista oli positiivisia, tulkittiin näyte positiiviseksi. Lopuksi OCT4 IHC tulokset yhdistettiin potilaiden seurantatietoihin. Värjäys- ja kliinisten seurantatietojen tulokset analysoitiin käyttämällä SPSS datankäsittelyohjelmaa. Ryhmien välisiä eroja tarkastellessa tilastollista merkitsevyyttä mitattiin Chi-Squaren analyysillä sekä Kaplan-Meier kuvaajilla.

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia OCT4:n ilmentymistä dysplasiassa ja HNSCC:ssä. Tarkemmin värjäytyvyyttä tutkittiin dysplasiaa sairastavilla potilailla, joilla dysplasia ei seuranta-aikana kehittynyt karsinoomaksi. Lisäksi OCT4 värjäytyvyyttä verrattiin potilaisiin, joilla dysplasia oli kehittynyt karsinoomaksi. Laajemmin tämän työn tarkoituksena oli tutkia voisiko OCT4 IHC värjäystä käyttää ennustamaan dysplasia-tasoinen kurkunpään muutoksen kehittymistä pahanlaatuiseksi. Kliinisessä työssä tämän tyyppisen aggressiivisuutta ennustavan biomarkkerin löytäminen olisi tärkeää, sillä kurkunpään alueella oleva dysplasia muutos vaatii tiivistä seurantaa, joka kuormittaa niin potilasta, kuin terveydenhuoltojärjestelmääkin.

2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Pään ja kaulan alueen syövät

2.1.1. Jaottelu anatomisesti ja histologisesti

HNSCC voidaan jakaa anatomisen sijaintinsa mukaan eri kategorioihin: suuontelon ja huulen alueen syöpä, laryngeaalinen syöpä, nasofaryngeaalinen syöpä, orofaryngeaalinen syöpä ja hypofaryngeaalinen syöpä. Tässä työssä keskityttiin limakalvomuutoksiin, jotka sijaitsevat kurkunpään alueella.

HNSCC saa alkunsa levyepiteelistä. Eteneminen HNSCC:hen alkaa epiteelin paksuuntumisesta, eli hyperplasiasta. Tämän jälkeen epiteeliin ilmaantuu dysplasia-tasoista muutosta, jota luonnehtii paksuuntunut epiteeli, tuma- ja solukoon vaihtelu, tyvikerroksen häiriöt ja kasvanut mitoottinen aktiivisuus. Tämän jälkeen muutos etenee in situ karsinoomaksi, jossa on jo karsinoomalle tyypillistä solukkoa, mutta ei invaasiota epiteelin tyvikalvon läpi. Kun epiteelin alaisten rakenteiden invaasiota tapahtuu, luokitellaan muutos levyepiteelikarsinoomaksi (Johnson ym. 2020).

Yleisenä kliinisenä HNSCC syövän levinneisyyttä kuvaavana luokituksena käytetään TNM-luokitusta. Tässä luokituksessa arvioidaan primaarikasvaimen kokoa (T) asteikolla 0–4; T0 = primaarikasvainta ei todettavissa, T1 = kasvaimen koko suurimmillaan 2 cm tai vähemmän ja invaasiosyvyys 5 mm tai vähemmän, T2 = kasvaimen koko suurimmillaan alle 2 cm ja invaasio yli 5 mm mutta alle 10 mm tai tuumorin koko suurimmillaan yli 2 cm, mutta alle 4 cm ja invaasio alle 10 mm ja T3 = kasvaimen koko suurimmillaan yli 4 cm tai invaasio yli 10 mm. T4 jakautuu edelleen a ja b luokkaan, joissa luokittelu tapahtuu invaasion mukaan. Lisäksi arvioidaan etäpesäkkeiden lukumäärää paikallisissa imusolmukkeissa (N). Näitä arvioidaan asteikolla 0–3. N0 = paikallisia imusolmuke-etäpesäkkeitä ei ole todettavissa, N1 = etäpesäke yksittäisessä samanpuoleisessa imusolmukkeessa, suurimmillaan 3 cm tai vähemmän eikä kasvua imusolmukkeen ulkopuolelle, N2 = etäpesäke yksittäisessä samanpuoleisessa imusolmukkeessa, kooltaan yli 3 cm mutta suurimmillaan ei yli 6 cm eikä kasvua imusolmukkeen ulkopuolelle; tai etäpesäkkeitä useammassa samanpuoleisissa imusolmukkeissa, suurimmillaan ei yli 6 cm eikä kasvua imusolmukkeen ulkopuolelle; tai etäpesäke molemminpuolisissa tai vastakkaisissa imusolmukkeissa, joista mikään ei suurimmillaan yli 6 cm eikä kasvua imusolmukkeen ulkopuolelle, N3 = etäpesäke yksittäisessä tai useassa imusolmukkeessa ja

kasvua imusolmukkeen ulkopuolelle. Luokituksessa arvioidaan myös kaukana sijaitsevia etäpesäkkeitä (M) asteikolla 0–1. M0 = ei merkkejä kaukana sijaitsevista etäpesäkkeistä, M1 = merkkejä kaukana sijaitsevista etäpesäkkeistä (Suusyöpä: Käypä Hoito-suositus, 2019).

2.1.2. HNSCC:n syntymekanismi solutasolla

Levyepiteelikarsinooman kehittymisen edellytys on häiriö solujen kasvussa, jakautumisessa ja solujen perimän korjaamista ylläpitävissä geeneissä (Laiho 2022). HNSCC:ssä tapahtuvia keskeisiä geenimutaatioita ovat CDKN2A:n ja TP53:n inaktivaatio. Nämä ovat kasvaimen syntyä jarruttavia geenejä. Onkogeenisien mutaatioiden syntyessä näiden geenien koodaamien proteiinien (p16 ja p53) määrä vähenee kudoksessa.

Yleisesti HNSCC:n ajatellaan syntyvän yksilön omista kantasoluista. Juuri näissä kantasoluissa edellä mainitut onkogeeniset mutaatiot mahdollistavat normaalin kantasolun muuttumisen pahanlaatuiseksi syövän kantasoluksi (cancer stem cell). Aikaisemman kirjallisuuden sekä kantasoluhypoteesin mukaisesti syövän kantasolujen syntymisen taustalla ajatellaan usein olevan myös virus tai karsinogeenialtistus (Johnson ym. 2020). Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu erityisesti kantasolumarkkerin OCT4:n olevan koholla HNSCC:ssä (Johnson ym. 2020; Routila ym. 2022), joka lisää kiinnostusta sekä tarvetta selvittää tarkemmin OCT4:n roolia myös pään- ja kaulan alueen dysplasioissa.

Kuten aikaisemmin mainittiin, syövän syntymisen edellytyksenä on kudoksen muuntuminen esisyöpäasteiseksi, eli dysplastiseksi. Dysplasian tyyppiä mikrokooppisesti kurkunpään alueella on paksuuntunut epiteeli, tuma- ja solukoon vaihtelu, tyvikerroksen häiriöt ja kasvanut mitoottinen aktiivisuus. Näitä dysplasian mikrokooppisia ominaisuuksia sekä eri asteita tarkastellaan muutoksesta otetusta näytepalasta. International Academy of Pathology (IAP) suositusten mukaan dysplasia jaetaan 3 asteeseen ja in situ karsinoomaan. WHO ohjeistuksen mukaan dysplasiat suositellaan jaettavan kahteen eri luokkaan: low-grade dysplasia, jossa epiteelin alkolmannes on atyyppinen ja high-grade dysplasiaan, jossa atypiaa esiintyy epiteelissä muuallakin kuin alkolmanneksessa. High-grade dysplasia sisältää myös in situ karsinooman (Aho ym. 2021). Dysplasian kehittymisen jälkeen osassa soluissa sekä dysplasioissa tapahtuu lisävaurioita ja solun

kasvun säätely pettää. Tämä saa aikaan dysplastisen kudoksen kehittymisen pahanlaatuisiksi syöpäkasvaimiksi. Yleisesti myös invasoiva eli tunkeutuva kasvutapa on liitetty pelkästään syöpäkasvaimeen eikä dysplastiseen kudokseen. Epäselvää on kuitenkin mitkä molekyylibiologiset ilmiöt säätelevät dysplasian muuttumista karsinoomaksi ja miten esimerkiksi syöpäkantatasolugeenit, OCT4 mukaan lukien, ilmentyvät eri dysplasian asteissa.

2.1.3. HNSCC:n Riskitekijät

Klassisesti HNSCC:n kehittyminen on yhdistetty runsaaseen tupakointiin ja alkoholin käyttöön, mutta näihin riskitekijöihin liittyvät tapaukset ovat maailmanlaajuisesti laskussa. Tällä hetkellä n. 70 % HNSCC-tapauksista on kliinisesti yhdistetty alkoholin käyttöön ja tupakointiin (Cramer ym. 2019). Samaan aikaan kuitenkin HPV-tartuntaan (human papillomavirus) yhdistetyt HNSCC-tapaukset ovat nousussa. Näin on etenkin Pohjois-Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa. HPV-positiivisten ja HPV-negatiivisten tapausten välillä on kliinisiä eroja. Suurin osa HPV-positiivisista HNSCC syöivistä esiintyvät suunielun alueella. HPV-tyypeistä varsinkin serotyyppi 16 on yhdistetty suurentuneeseen riskiin sairastua pään ja kaulan alueen syöpään. HPV-positiivisuus HNSCC syöivissä ennustaa pienempää kuolleisuutta ja isompaa syövän uusiutumiseriskiä verrattuna HPV-negatiivisiin HNSCC syöpiin. Paremmasta ennusteesta huolimatta HPV-positiiviset potilaat eivät nykyisten tutkimusten mukaan hyödy syöpähoitojen keventämisestä (Cramer ym. 2019, Mylly ym. 2022).

HPV-positiivisten tapausten suhteen epidemiologiset tutkimukset näyttäisivät HPV-rokotuksen vähentävän oraalisen HPV-infektion ilmentymistä 88–93 % (Cramer ym. 2019). Rokotusohjelmien muuttumisen myötä HPV-rokotteiden käyttö väestössä lisääntyy. Tällä hetkellä FDA on laajentanut HPV-rokotteet koskemaan alle 45-vuotiaita miehiä ja naisia. Myös Suomessa THL on lisännyt HPV-rokotteen kansalliseen rokotusohjelmaan, eli kaikki lapset, joilla ei ole vasta-aiheita, saavat 10–12 vuoden iässä HPV-rokotteen maksutta. Tämä tulee tulevaisuudessa todennäköisesti merkittävästi vähentämään HPV-positiivisen pään ja kaulan alueen syöpien ilmaantumista.

2.1.4. Hoitovaihtoehdot

HNSCC syövän hoitovaihtoehtoja ovat joko kirurgia, sädehoito, kemosädehoito tai edellä mainittujen hoitojen yhdistelmät. Sädehoitoa käytetään yli 50 %:ssa HNSCC-tapauksista. Lisäksi edenneessä HNSCC:ssä käytetään kemoterapiaa, yleisimmin sisplatiini, sädehoidon yhteydessä. Sisplatiinin kombinoiminen HNSCC potilaiden syöpähoitoon on tutkimusten mukaan parantanut hoitotuloksia (Lacas ym. 2021). Sisplatiinin käyttö ei kuitenkaan ole ongelmattonta, johtuen tämän lääkkeen munuais- ja sisäkorvatoksisuudesta (Lacas ym. 2021). Lisäksi HNSCC potilaskäyttöön on saatu myös uusia biologisia lääkkeitä, joista yhtenä esimerkkinä on anti-EGFR hoito, cetuximabi, joka on IgG1-monoklonaalinen vasta-aine. Todellinen kliininen haaste on kuitenkin diagnostisten menetelmien puute, joiden avulla pystyttäisiin esimerkiksi tunnistamaan ne HNSCC potilaat, jotka hyötyisivät kiistattomasti cetuximabista, vaikka tiedossamme on, että EGFR-ilmentyminen on patologistesti kohonnut jopa 80-90 %:ssa HNSCC:stä (Johnson ym. 2020). Yhteenvetona voidaan kuitenkin todeta, että viime vuosikymmenten aikana tapahtunut kehitys onkologiassa (mm. sisplatiinin ja cetuximab:n käyttö, checkpoint inhibiittorit ja sädehoito) on vähentänyt HNSCC potilaiden kuolleisuutta. Viiden vuoden HNSCC:n eloonjäämisprosentti oli vuosina 1992–1996 55 %, kun taas TYKS alueen viiden vuoden HNSCC:n eloonjäämisprosentti oli vuosina 2005-2015 69 % (Baxi ym. 2014, Mylly ym. 2022).

Kirurginen hoito on edelleen päähoitomuoto ei-edenneissä (eli paikallisissa) larynxin tai hypofarynxin syövässä. Varsinkin varhain löydettyihin syöpiin kohdistetut vähemmän invasiiviset kirurgiset hoitomuodot ovat vähentäneet kuolleisuutta. Uusia kirurgisia hoitomuotoja ovat mm. TORS (transoral robotic surgery) ja TLM (transoral laser microsurgery). HNSCC:lla on taipumusta paikalliseen metastasointiin. Tämän vuoksi historiallisesti on usein suositeltu myös kaulan alueen imusolmukkeiden poistamista potilailta, joilla metastasointia ei ole havaittu.

HNSCC:n etenevän luonteen vuoksi syövän varhainen diagnosointi tuottaa parempia hoitotuloksia eloonjäämisen ja kuratiivisen hoidon suhteen. Lisähaaste HNSCC:n hoidossa on usein syövän anatominen sijainti, joka tekee kirurgisesta hoidosta usein haasteellista varsinkin edenneissä tapauksissa, joissa kasvaimen koko on suurentunut ja anatominen rajautuvuus hämärtynyt invasiivisen kasvutavan vuoksi. Lisäksi terveydenhuollossa oman haasteensa luo myös pään- ja kaulan alueen limakalvojen dysplasia-tasoisten muutosten seuranta, sillä on epäselvää mitkä

dysplasiat johtavat aikanaan karsinooman eli HNSCC:n syntymiseen ja mitkä dysplasiat eivät kehity koskaan syöväksi. Kurkunpään limakalvojen dysplasia-muutosten seuranta on potilaiden ja terveydenhuollon kannalta erityisen haasteellista, koska käytännössä em. muutosten biopsointi sekä histopatologinen varmistus vaativat käytännössä nukutuksessa tehtävän kurkunpään suoran tähystyksen. Epäselvää on myös se, miten usein ja millä kliinisillä kriteereillä kurkunpään dysplasia muutoksia tulisi seurata poliklinikalla ja miten usein näistä muutoksista tulisi ottaa uudet biopsia näytteet.

2.1.5 Biomarkkerit HNSCC:n diagnostiikassa sekä hoidonohjauksessa

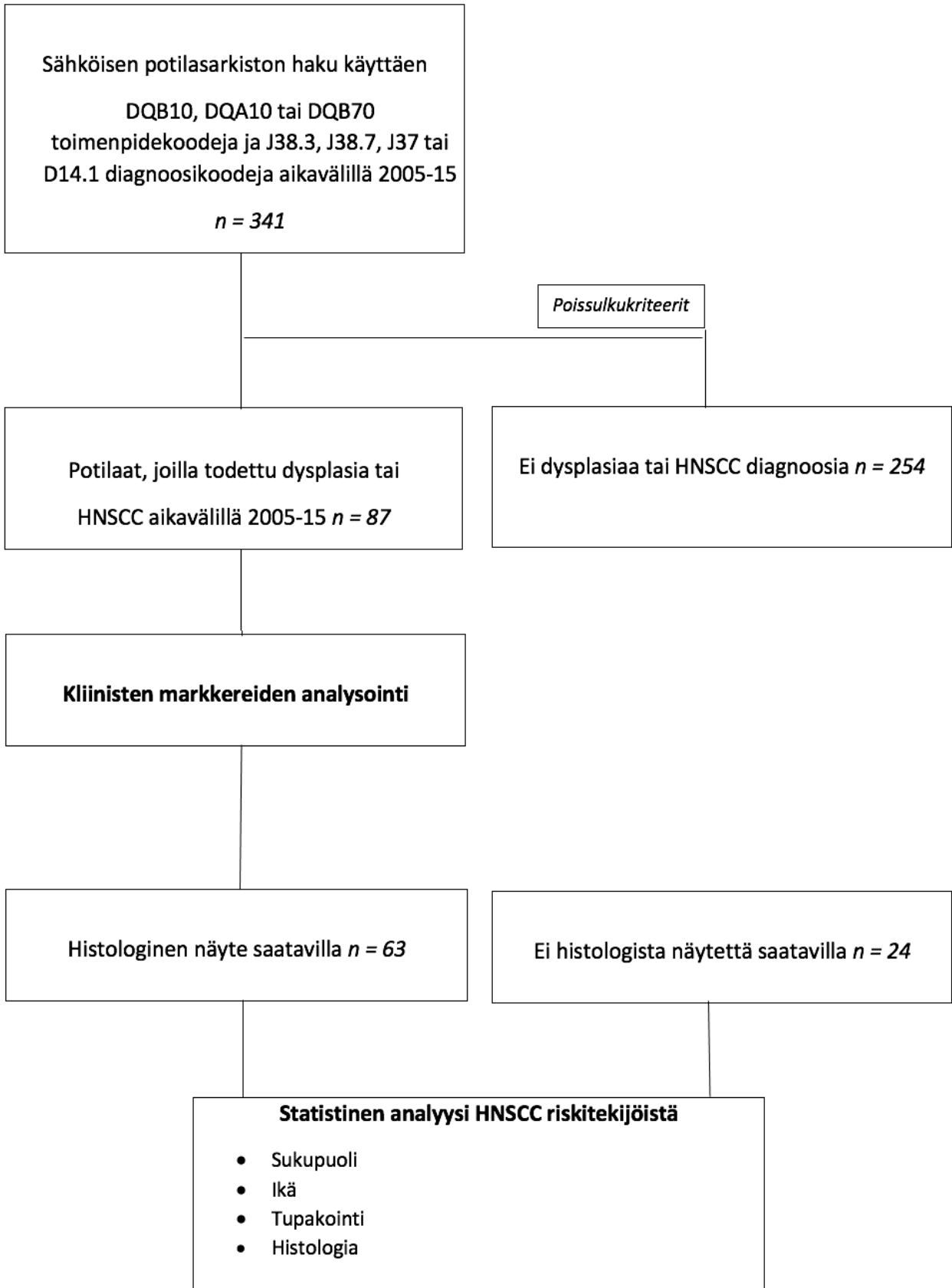
Tällä hetkellä biomarkkerit, jotka ovat kliinisessä käytössä HNSCC:n diagnostiikassa sekä hoidonohjauksessa ovat p16 ja PD-L1 (programmed cell death ligand 1). PD-L1:n korkea esiintyminen kudoksessa on yhdistetty positiiviseen vasteeseen anti-PD-L1 hoidossa (Ferris ym. 2016). Lisääntyneitä PD-L1 esiintyvyyttä on havaittu n. 50–60 %:ssa HNSCC-tapauksista. Kudoksenäytteestä voidaan laskea PD-L1 positiivisten solujen suhde, jonka perusteella määritetään, onko näyte negatiivinen vai positiivinen. Anti-PD-L1 hoidosta on kliinisten tutkimusten perusteella positiivista näyttöä erityisesti PD-L1 positiivisissa HNSCC:issa (Concha-Benavente ym. 2016).

OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) toimii kantasolugeenien säätelijänä alkion kantasoluissa (Mishra ym. 2020). Lisäksi OCT4:llä on osoitettu olevan merkittävä rooli tuumorigeneesin aikana monissa eri syöväissä HNSCC mukaan lukien (Villodre ym. 2016, Routila ym. 2022). HNSCC:ssä OCT4 positiivisuus on yhdistetty suurentuneeseen kuolleisuuteen, silloin kun hoitolinjana oli pelkkä sädehoito. (Routila ym. 2022) Routilan tutkimuksessa oli myös mukana potilaita, joilla tuumorin anatominen sijainti oli kurkunpäässä. Routilan tutkimuksessa huomattiin, että OCT4 positiivisuus oli kurkunpään alueella sijaitsevassa kasvaimessa yleisempää kuin muualla pään tai kaulan alueella. Kliinisestä käytöstä kuitenkin puuttuu biomarkkeri, jota voitaisiin käyttää ennustamaan dysplasia-tasaisen muutoksen käyttäytymistä tai muuntumista esimerkiksi HNSCC-kasvaimeksi.

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

Tämän tutkimuksen aineisto koottiin Turun Yliopistollisen keskussairaalan alueelta Auria-biopankille suostumuksen antaneista potilaista, joille oli vuosina 2005-2015 tehty kurkunpään tähystys, jonka yhteydessä kurkunpäästä oli otettu myös kudospnäyte. Seurantajakso loppui 2020. Toimenpidekoodeina käytettiin hakua tehdessä DQB10, DQA10 tai DQB70. Tämän jälkeen aineistosta poistettiin patologi lausuntojen perusteella ne potilaat, joilla ei biopsiassa esiintynyt kurkunpään alueella dysplasiaa tai levyepiteelikarsinoomaa. Edellä mainitut hakukriteerit täyttäviä potilaita oli yhteensä 87 (kaavio 1). Nämä potilaat muodostivat tutkimuksen kliinisen kohortin. Tämän kohortin perusteella haettiin potilaiden PAD-näytteet, jotka patologi vielä verifioi. Kliinisestä kohortista 11 tutkittavalla ei ollut kudospnäytettä jäljellä analysoitavaksi. Tutkittavista 57:ltä potilaalta oli saatavilla dysplasiaa sisältävä näyteblokki, joista tehtiin OCT4 värjäykset. Lisäksi 19:sta karsinoomaa sairastavasta potilaasta oli saatavilla näytteet, joille tehtiin myös OCT4 värjäykset. OCT4 positiivisuutta arvioitiin näytteistä laskemalla patologin varmistamasta edustavasta histologisesta alueesta (dysplasia, HNSCC) OCT4 positiivisten solujen esiintyvyys. OCT4 ekspressio jaoteltiin IHC värjäyksen voimakkuuden mukaan: (0) negatiivinen, (1) heikko positiivinen, (2) vahva positiivinen.

Tutkittavat jaettiin kliinisten tietojen perusteella kolmeen eri ryhmään. Yhden ryhmän muodostivat potilaat, joilla havaittiin dysplasiaa, mutta dysplasia ei kehittynyt levyepiteelikarsinoomaksi seurannan aikana. Toinen ryhmä muodostettiin potilaista, joille kehittyi dysplasian jälkeen seurannassa levyepiteelikarsinooma. Kolmas ryhmä koostui potilaista, joilla histopatologisissa näytteissä havaittiin levyepiteelikarsinoomaa, mutta joilla ei edeltävästi ollut todennettua pään tai kaulan alueen dysplasiaa. Potilaiden kudospnäytteet tilattiin Auria-biopankista, jonka jälkeen näytteille tehtiin immunohistokemialliset värjäykset OCT4 vasta-aineella. Tämän jälkeen näytteet skannattiin sähköiseen muotoon, jonka jälkeen patologi merkitsi digitaalisiin näytteisiin dysplasiaa ja karsinoomaa sisältävät alueet. OCT4 näytteistä tutkimme dysplasian ja karsinooman alueella olevien solujen tumavärjäytyvyyttä, eli solujen OCT4 positiivisuutta. Lisäksi arvioimme OCT4:n sytoplasmista positiivisuutta. Tilastollisina analyysinä tässä työssä käytettiin Chi-Square analyysiä. Lisäksi potilaiden selviytymistä tarkasteltiin tilastollisesti käyttäen Kaplan-Meier analyysiä.

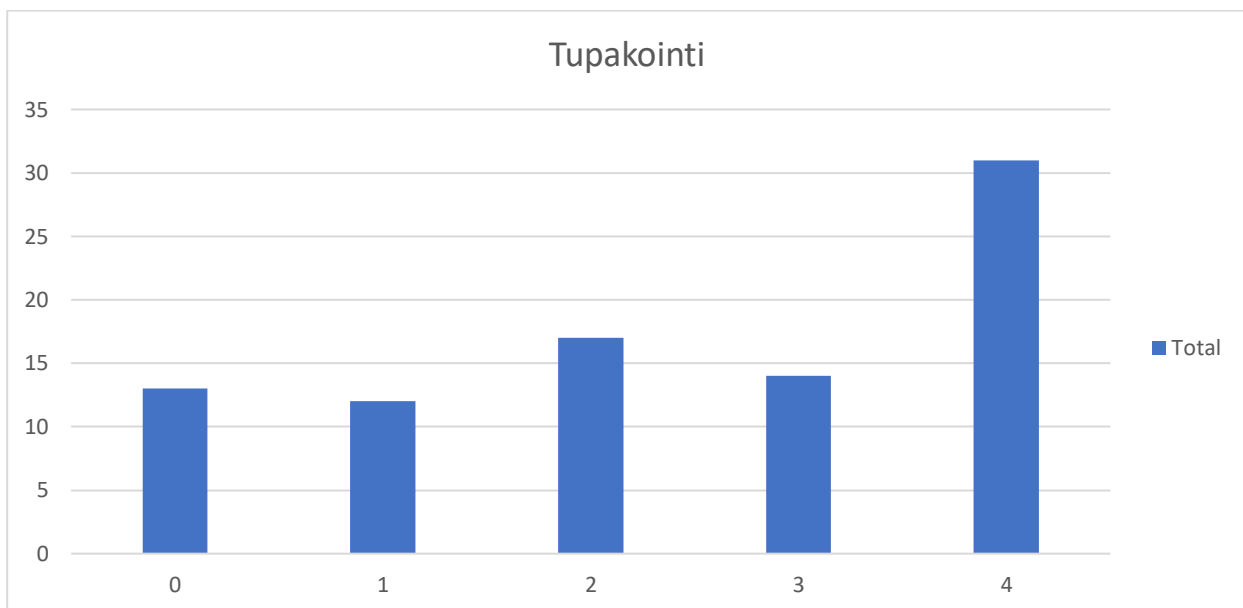


Kaavio 1. Eksklusio ja inklusiokriteerit ja tutkittavien ryhmän muodostaminen aineistosta

4. TULOKSET

Kliinisestä kohortista (n = 87) 81 % (n = 71) oli miehiä ja 19 % (n = 16) naisia. Seuranta-aikana 54 %:lla (n = 47/87) esiintyi biopsioissa pelkkää dysplasiaa ja 20 %:lla (n = 17/87) tutkittavista dysplasia kehittyi seuranta-aikana HNSCC:ksi. 26 %:lla (n = 23/87) tutkittavista ei dysplasiolla ja karsinoomalla ollut ajallista yhteyttä, vaan molemmat havaittiin joko samassa biopsiassa, tai ensin löydettiin karsinooma ja tämän jälkeen seurannan aikana otetuissa kurkunpään kudoksenäytteissä esiintyi dysplasiaa.

Tupakointia riskitekijänä arvioitiin asteikolla 0–4. (0) alle 10 askivuotta, (1) 10–20 askivuotta (2) 20–30 askivuotta, (3) 30–40 askivuotta ja (4) yli 40 askivuotta. Tulokset koko tutkittavien aineistossa oli seuraavat: (0) 15 %; (1) 13 %; (2) 20 %; (3) 16 %; (4) 36 %. Alle 10 askivuotta tupakoineita oli siis 15 % (13/87) ja pitempiaikaista tupakointia oli 85 %:lla (74/87) (taulukko 1). Tupakoivista 41 % ei ollut seurannassa diagnoosin ja hoidon aloituksen jälkeen lopettanut tupakointia. Alkoholien käyttöä arvioitiin asteikolla kyllä tai ei. Alkoholien käytti säännöllisesti 23 % tutkittavista. 21 % potilaista ei käyttänyt säännöllisesti alkoholia. Lopuista tutkittavista ei kyseistä tietoa ollut saatavilla.

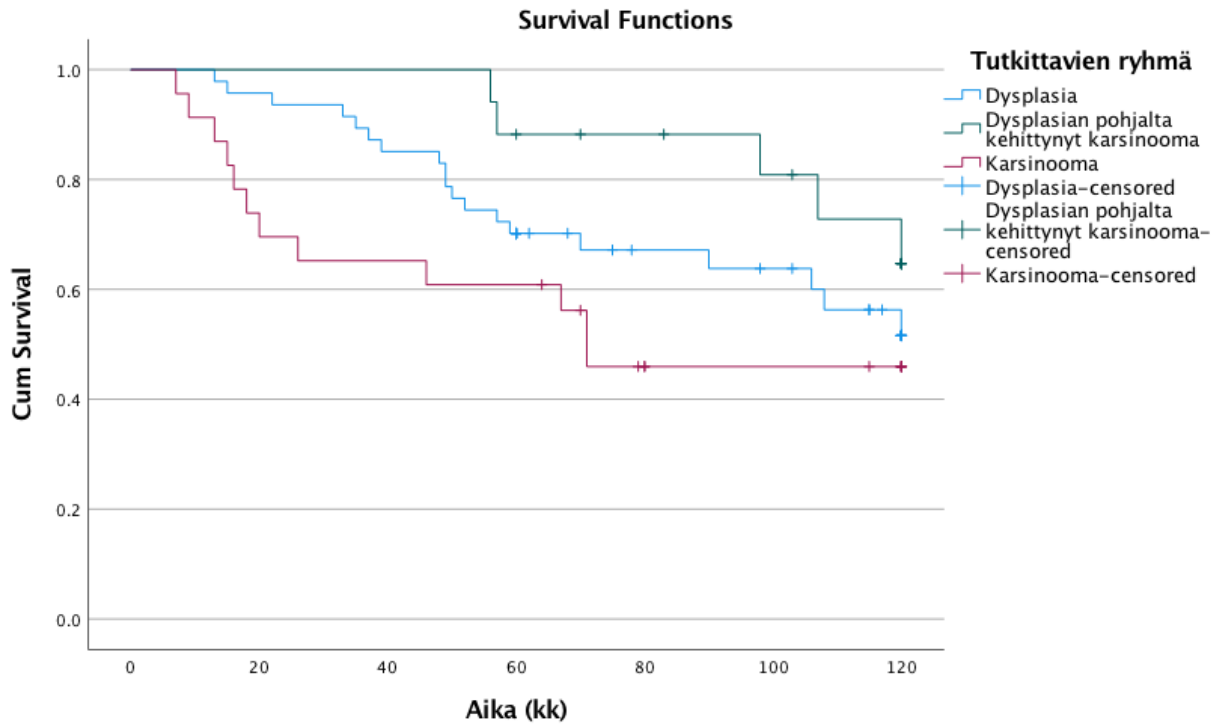


Taulukko 1. Tupakointi. (0 = <10 askivuotta (av); 1 = 10-20 av; 2 = 20-30 av; 3 = 30-40 av; 4 = >40 av).

Sukupuoli	N = 87	%
Mies	71	82
Nainen	16	18
Ikä		
≤65	73	83
>65	14	17
Tupakointi		
Yli 10 askivuotta	74	85
Alle 10 askivuotta	13	15

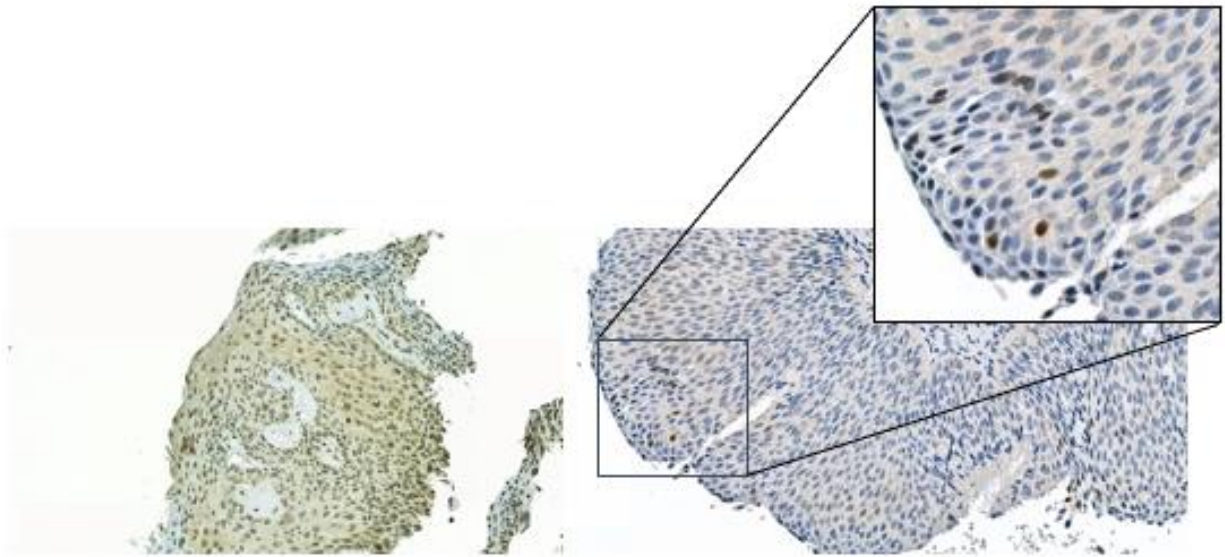
Taulukko 2. Tutkimusaineiston kliiniset muuttujat (sukupuoli, ikä ja tupakointi). Lukumäärät ja prosenttiosuudet.

Seuraavaksi tarkasteltiin kymmenen vuoden selviytymistä eri tutkimusryhmissä. Tutkimusaineisto jaettiin aikaisemman kaltaisesti kolmeen ryhmään. Ryhmän (1) muodosti potilaat, joilla oli diagnosoitu pelkkä dysplasia, joka ei seurannassa edennyt karsinoomaksi ($n = 47/87$). Ryhmässä (2) dysplasian diagnosoinnin jälkeen potilaille kehittyi karsinooma ($n = 17/87$) ja ryhmässä (3) potilailla oli karsinooma, jota ei ajallisesti edeltänyt todettu kurkunpään dysplasia ($n = 23/87$). Tilastollisesti merkitsevää eroa viisivuotisselviytymisessä eri ryhmien välillä ei todettu ($p = 0.121$). Käyrien trendien mukaan (kuvaaja 1) karsinoomapotilaiden selviytyminen (ryhmä 3) oli kuitenkin huonointa. Korkein selviytyminen oli ryhmässä, jossa karsinooma on kehittynyt dysplasian pohjalta (ryhmä 2). Pelkkää dysplasiaa sairastavien käyrä sijoittui näiden väliin.



Kuvaaja 1. Kaplan-Meier kuvaaja, jossa tutkittavien ryhmä muuttujana. Seuranta-aika 10 vuotta.

OCT4 värjäyksissä (kuva 1 ja 2) solujen tumapositiivisuus arvioitiin negatiiviseksi (0), heikosti positiiviseksi (1) tai vahvasti positiiviseksi (2). Pelkästään dysplasiaa sairastavien ryhmässä OCT4 värjäysten keskiarvot olivat (0) 60 %; (1) 24 %; (2) 16 %. Suurin osa soluista jäi siis negatiiviseksi OCT4 värjäykselle. OCT4 värjäytyvydessä ei ollut eroja, kun vertailu tehtiin high grade ja low grade dysplasioiden välillä. Analysoimme myös dysplasia solujen sytoplasman OCT4 positiivisuutta. 76 %:ssa dysplasia näytteistä OCT4 oli positiivinen sytoplasmassa ja 24 %:ssa dysplasia näytteissä solujen sytoplasma oli OCT4-negatiivinen. Valtaosassa värjäyksiä sytoplasma siis oli positiivisesti värjäytynyt.



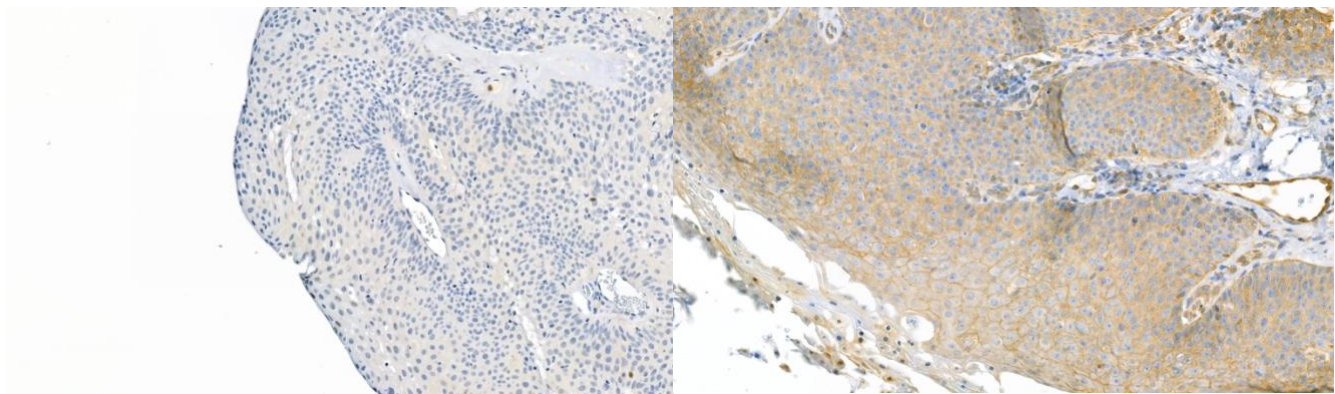
Kuva 1. Vasemmalla karsinomanäyte, jossa pääosin positiivisesti värjäytyviä OCT4-soluja. Näissä soluissa tuma värjäytyy ruskeaksi. Kyseisessä näytteessä myös sytoplasma värjäytyy pääosin positiivisesti. Oikealla dysplasiaa sisältävässä näytteessä OCT4 värjäyksen jälkeen solut pääosin negatiivisia (tumat sinisiä). Myös sytoplasma kyseisessä näytteessä värjäyksen jälkeen jää negatiiviseksi. Oikealla yläkulmassa suurennettu alue, jossa näkyy yksittäisiä positiivisesti värjäytyneitä soluja.

Kurkunpään levyepiteelikarsinoomaa sairastaneiden potilaiden ryhmästä OCT4 värjäykset tehtiin sekä dysplasia- että karsinomanäytteille. Solujen OCT4 positiivisuus arvioitiin samoin kriteerein kuin dysplasia analyyseissä, jotka on kuvattu edellisessä kappaleessa. Tässä potilaskohortissa dysplasia näytteistä OCT4 värjäytyvyyden keskiarvot olivat: negatiivisia (0) oli 62 %, heikkoja positiivisia (1) oli 23 % ja vahvasti positiivisesti (2) värjäytyi 15 %. Sytoplasma oli OCT4 positiivinen 21 näytteessä ja negatiivinen kahdeksassa. Vastaavat tulokset karsinomanäytteistä oli (0) = 67 %; (1) = 24 %; (2) = 9 %. Sytoplasma oli OCT4 positiivinen 68 %:ssa näytteitä ja negatiivinen 32 %:ssa.

Dysplasia	n = 57	%
<i>Positiivinen</i>	33	58
<i>Negatiivinen</i>	24	42
Karsinooma	n = 20	%
<i>Positiivinen</i>	15	75
<i>Negatiivinen</i>	5	25

Taulukko 3. Näytekohortin potilaiden määrät ja positiivisuus dysplasia- ja karsinoomanäytteissä.

Tuloksia analysoitaessa vertailut tehtiin OCT4-negatiivisten ja OCT4-positiivisten välillä (kuva 1 ja 2). Näyte tulkittiin OCT4-negatiiviseksi, mikäli vähemmän kuin 10 % soluista oli positiivisia. Näyte tulkittiin OCT4-positiiviseksi, mikäli yli 10 % soluista oli joko heikosti tai vahvasti OCT4-positiivisia. Pelkkää dysplasiaa sairastavien ryhmässä 53 %:lla (n = 17/32) tumavärjäys oli positiivinen. Vastaavasti dysplasian pohjalta kehittyneiden karsinoomien ryhmässä 73 %:lla (n = 11/15) tumavärjäys oli positiivinen. Karsinoomaryhmässä 63 %:lla (n = 10/16) tumavärjäys oli positiivinen. OCT4 värjäysten tumapositiivisuudella ei ollut ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa (p = 0.611).



Kuva 2. Vasemmalla normaalia kudosta, jossa OCT4 värjäys jää pääosin negatiiviseksi. Myös sytoplasma jää negatiiviseksi. Oikealla dysplasianäyte, jossa tumavärjäytyvyys jää negatiiviseksi, mutta sytoplasma värjäytyy vahvasti positiivisesti (ruskeaksi).

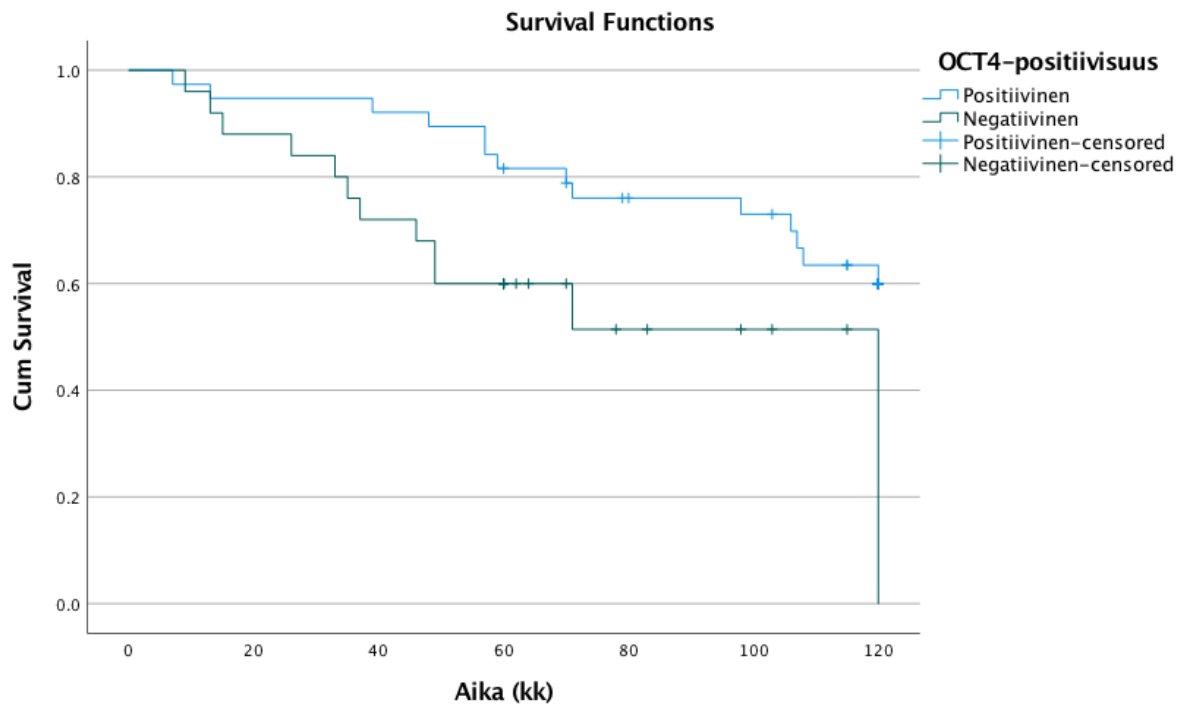
Seuraavaksi OCT4-värjäyksen positiivisuutta verrattiin päätetapahtumaan Chi-Square analyysillä. Analyysissa kuolemaa seuranta-aikana pidettiin päätetapahtumana. Analyysit tehtiin dysplasia- ja karsinomanäytteistä. OCT4 positiivisten tutkittavien joukossa oli 16 päätetapahtumaa ja OCT4 negatiivisten joukossa 11 päätetapahtumaa. Näiden ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ($p = 0.843$). Sama vertailu tehtiin seuraavaksi myös karsinomanäytteistä. Näytteitä oli 19 ja näistä 14 oli positiivista ja viisi negatiivista. Positiivisten joukossa oli tutkimusaikana kuusi päätetapahtumaa ja negatiivisten joukossa yksi. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ($p = 0.363$).

Tupakointia ja OCT4 positiivisuutta verrattiin myös aineistossa. OCT4 positiivisessa ryhmässä yli 10 askivuotta tupakoineita oli 84 %. Vastaavasti OCT4 negatiivisessa ryhmässä tämä luku oli 84 %. Ero ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p = 0.982$). Tupakoinnin vaikutusta verrattiin myös kuolleisuuteen. Ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p = 0.663$).

Dysplasia	n = 57	%
<i>Positiivinen</i>	33	58
<i>Negatiivinen</i>	24	42
Karsinoma	n = 20	%
<i>Positiivinen</i>	15	75
<i>Negatiivinen</i>	5	25

Taulukko 3. Näytekohortin potilaiden määrät ja positiivisuus dysplasia- ja karsinomanäytteissä.

Lopuksi tutkimme OCT4 värjäytyvyyden korrelaatiota kymmenen vuoden selviytymiseen. OCT4 positiivisten ja negatiivisten ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa Kaplan-Meier analyysissä ($p = 0.026$). Alla olevasta kuvaajasta (kuvaaja 2) nähdään kuitenkin, että OCT4 positiivisilla potilailla kuolleisuuskäyrä laskee hitaammin, kuin OCT4 negatiivisilla.



Kuvaaja 2. Kaplan-Meier taulukko OCT4-positiivisuus muuttujana. Seuranta-aika kuvaajassa 10 vuotta.

5. POHDINTA

HNSCC:ssa OCT4 biomarkkerin tiedetään ilmentyvän enemmän kuin terveessä populaatiossa (Johnson ym. 2020). Tässä tutkimuksessa OCT4 positiivisuutta verrattiin kurkunpään dysplasia- ja karsinoomapotilaiden välillä. Tämän tutkimuksen tulosten mukaan em. potilasryhmien välillä ei esiintynyt tilastollisesti merkitsevää eroa OCT4 ilmaantuvuudessa. Näin ollen voidaan olettaa OCT4 positiivisuuden lisääntyvän jo dysplasia-asteisen muutoksen syntyessä.

Tämän tutkimuskohortin potilaista suurin osa oli miehiä (82 %), yli 65-vuotiaita (83 %) ja runsaan tupakkataustan (85 %) omaavia henkilöitä. Tämä sopii aikaisempaan tutkimustietoon HNSCC:n riskitekijöistä. Tupakoinnilla ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää yhteyttä kuolleisuuteen.

tai OCT4 positiivisuuteen. Tässä tutkimusaineistossa alle 10 askivuotta tupakoineita henkilöitä oli vain 13. Voidaankin ajatella OCT4 solussa aktivoitumisen olevan monen eri tekijän summa, eikä pelkkä tupakoiminen näyttäisi aktivoivan OCT4:n ilmentymistä soluissa.

Selviytymistä tarkastellessa huomattiin, että potilailla joilla karsinooma oli kehittynyt dysplasian pohjalta oli parhain viisivuotiselossaoloennuste, joka oli yllättävää. Oletettavasti nämä potilaat ovat erikoissairaanhoidon säännöllisissä seurannoissa dysplasian löytymisen jälkeen, ja tarvittaessa näiltä potilailta on otettu myös uusia biopsioita kurkunpään epäilyttävistä muutoksista. Tämä seuranta näyttäisi onnistuneen hyvin ja tämän potilasryhmän kurkunpään karsinoomat on saatu diagnosoitua jo taudin varhaisessa vaiheessa. Tässä ryhmässä olleista 17:sta potilaasta vain viisi menehtyi kymmenen vuoden seurannan aikana, joka tarkoittaa, että 71 % potilaista oli vielä elossa seurannan lopussa. Vastaavasti karsinoomadiagnoosin ilman edeltävää dysplasiaa saaneiden ryhmässä oli 23 potilasta, joista 10 vuoden seurannassa 12 oli menehtynyt. Tämän ryhmän potilaista 48 % potilaista oli elossa seuranta-ajan loppuessa, mikä on huomattavasti huonompi selviytymisaste kuin erikoissairaanhoidon seurannassa olleessa ryhmässä. Näiden lukujen perusteella erikoissairaanhoidon aktiivinen seuranta näyttää löytävän pahanlaatuiset kasvaimet nopeasti ja hoitavan ne tehokkaasti.

OCT4 positiivisuudella ei tämän tutkimuksen perusteella ollut vaikutusta kuolleisuuteen. Tämä tukee aikaisempaa tutkimusnäyttöä, jonka mukaan OCT4 positiivisuus ei itsenäisesti ole prognostinen biomarkkeri (Routila ym. 2022). Kasvaimen käyttäytymisen taustalla voidaan ajatella olevan monta tekijää, joiden summana potilaan ennuste myös määräytyy.

Tulevaisuudessa HNSCC näyttäisi lisääntyvän varsinkin kehittyneissä maissa (Cramer ym. 2019). Kuitenkin toivoa herättävästi nähdään, että kuolleisuus pienenee HNSCC:ssä ja elämänlaatu paranee hoitojen tehokkuuden kasvaessa. Lisäksi uusien täsmähoitojen kehittyessä syöpähoidot mahdollisesti muuttuvat paremmin siedetyiksi. HNSCC:n sekä dysplasioiden tulevaisuuden haasteena on kuitenkin edelleen diagnostiikan sekä syöpähoitojen kohdentaminen yksilöllisesti ja kustannustehokkaasti. Kliinisessä käytössä toimivilla biomarkkereilla olisi erittäin merkittävä hyöty tässä yksilöllisessä syövän hoidon suunnittelussa sekä dysplasian ja kasvainmuutosten aggressiivisuuden ennustamisessa. Useissa syöväissä, esimerkiksi rintasyövässä, on jo olemassa yksittäisiä biomarkkereita, esim. HER2, jonka esiintyminen kudoksessa ohjaa rintasyöpäpotilaiden

syövänhoitoa. Tämän tapaisen biomarkkerin löytyminen HNSCC:ssä olisi myös tärkeää sekä toivottavaa tulevaisuudessa.

Tämän tutkimuksen perusteella OCT4 ei näyttäisi toimivan itsenäisenä ennusteellisena biomarkkerina kurkunpään dysplasiassa tai levyepiteelikarsinoomassa. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että OCT4 IHC värjäystä voitaisiin käyttää HNSCC:ssä hoitolinjan valinnassa. OCT4 positiivisuudella on osoitettu olevan yhteys huonompaan hoitovasteeseen potilailla, jotka ovat saaneet pelkän sädehoidon (Routila ym. 2022). Tässä tutkimuksessa ei selvitetty, vaikuttaako OCT4 ilmentyminen kurkunpään dysplasian tai syövän hoitovasteeseen. Ilmeinen tulevaisuuden tutkimusaihe olisikin selvittää esimerkiksi, vaikuttaako OCT4 ilmentyminen kurkunpään syövässä säde- tai kemosädehoitovasteeseen.

VIITTEET

Aho Heikki: Luokitusperusteita, International Academy of Pathology, Suomen osasto, laadunvarmistustyöryhmä, luku 5.2 Bronkusepiteelin, kurkunpään ja suun epiteelin dysplasia. 2021

Argiris A, Li S, Savvides P, Ohr JP, Gilbert J, Levine MA, Chakravarti A, Haigentz M Jr, Saba NF, Ikpeazu CV, Schneider CJ, Pinto HA, Forastiere AA, Burtneess B. Phase III Randomized Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2019 Dec 1;37(34):3266-3274

Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer*. 2014 May 15;120(10):1507-13.

Cramer JD, Burtneess B, Le QT, Ferris RL. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Nov;16(11):669-683.

Suusyöpä. Käypä Hoito-suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseuran Apollonian asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2019. Saatavilla internetissä: www.käypähoito.fi

E.S. Villodre, F.C. Kipper, M.B. Pereira, G. Lenz, Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis, *Cancer Treat. Rev*, 51, 2016

Fakhry C, Krapcho M, Eisele DW, D'Souza G. Head and neck squamous cell cancers in the United States are rare and the risk now is higher among white individuals compared with black individuals. *Cancer*. 2018 May 15;124(10):2125-2133.

Fernando Concha-Benavente, Raghvendra M. Srivastava, Sumita Trivedi, Yu Lei, Uma Chandran, Raja R. Seethala, Gordon J. Freeman, Robert L. Ferris. Identification of the cell-intrinsic and -extrinsic pathways downstream of EGFR and IFN γ that induce PD-L1 expression in head and neck cancer. *Cancer Res*. 76, 1031–1043 (2016)

Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1856-1867.

Johnson, D.E., Burtneess, B., Leemans, C.R. *et al*. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 6, 92 (2020).

Mishra S, Tiwari V, Arora A, Gupta S, Anand N, Husain N. Increased Expression of Oct4, Nanog and CD24 Predicts Poor Response to Chemo-Radiotherapy and Unfavourable Prognosis in Locally Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020 Sep 1;21(9):2539-2547.

Mylly M, Nissi L, Huusko T, Routila J, Vaittinen S, Irjala H, Leivo I, Ventelä S. Epidemiological Study of p16 Incidence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma 2005–2015 in a Representative Northern European Population. *Cancers*. 2022; 14(22):5717.

Lacas B, Carmel A, Landais C, Wong SJ, Licitra L, Tobias JS, Burtneess B, Ghi MG, Cohen EEW, Grau C, Wolf G, Hitt R, Corvò R, Budach V, Kumar S, Laskar SG, Mazon JJ, Zhong LP, Dobrowsky W, Ghadjar P, Fallai C, Zakotnik B, Sharma A, Bensadoun RJ, Ruo Redda MG, Racadot S, Fountzilas G, Brizel D, Rovea P, Argiris A, Nagy ZT, Lee JW, Fortpied C, Harris J, Bourhis J, Aupérin A, Blanchard P, Pignon JP; MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 107 randomized trials and 19,805 patients, on behalf of MACH-NC Group. *Radiother Oncol*. 2021 Mar;156:281-293.

Laiho Marikka. Miten syöpä syntyy. *Duodecim* 2002;118(17):1751-1758

Lanuti M, Liu G, Goodwin JM, Zhai R, Fuchs BC, Asomaning K, Su L, Nishioka NS, Tanabe KK, Christiani DC. A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome. *Clin Cancer Res*. 2008 May 15;14(10):3216-22

Laura Q.M, Chow, M.D. Head and Neck Cancer *N Engl J Med* 2020, 382:60-72.

Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:49-70.

Patel I, Parchem RJ. Regulation of Oct4 in stem cells and neural crest cells. *Birth Defects Res*. 2022 Oct 1;114(16):983-1002.

Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J; MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009 Jul;92(1):4-14.

Routila J, Qiao X, Weltner J, Rantala JK, Carpén T, Hagström J, Mäkitie A, Leivo I, Ruuskanen M, Söderlund J, Rintala M, Hietanen S, Irjala H, Minn H, Westermarck J, Ventelä S. Cisplatin overcomes radiotherapy resistance in OCT4-expressing head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2022 Apr;127:105772.