

**Wstęp:** Wysoka agresywność raka języka i dna jamy ustnej jest spowodowana przede wszystkim dużą zdolnością do tworzenia przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, a także tendencją do powstawania wznów miejscowych. To właśnie te dwa czynniki są odpowiedzialne za fakt, iż rokowanie u większości chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej pozostaje niepomyślne.

**Cel pracy:** Celem niniejszej pracy była analiza 32 przypadków raka płaskonabłonkowego języka i dna jamy ustnej oraz próba zestawienia wyników badań immunohistochemicznych dla MMP9 oraz eIF4E z danymi klinicznymi – zdolnością do tworzenia przerzutów oraz standardowymi technikami histologicznej oceny guza.

**Materiał i metody:** Przedmiotem badań była tkanka nowotworowa pochodząca od 29 chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, w tym w 16 przypadkach części wolnej języka, w 4 nasady języka oraz w 9 dna jamy ustnej, którzy zostali poddani leczeniu chirurgicznemu. W barwieniu immunohistochemicznym zastosowano technikę *avidin-biotin method*. W celu oceny statystycznej zastosowano testy Fishera-Freemana-Haltona.

**Wyniki:** Porównując obecność histologicznie potwierdzonych przerzutów do węzłów chłonnych szyi, wykazano istotne statystycznie zależności zarówno pomiędzy liczbą wybarwionych komórek dla MMP-9 ( $p=0,0306$ ), jak i intensywnością wybarwienia ( $p=0,0415$ ). Intensywność wybarwienia dla eIF4E nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ( $p=0,8924$ ). Analiza zależności występowania wznów miejscowych z ekspresją MMP-9 oraz eIF4E wyrażoną liczbą wybarwionych komórek oraz intensywnością wybarwienia nie wykazała związku istotnego statystycznie (MMP-9 liczba komórek wybarwionych  $p=0,5757$ ; intensywność wybarwienia  $p=0,4320$ ; eIF4E intensywność wybarwienia  $p=0,5600$ ).

#### Wnioski:

1. MMP-9 wydaje się mieć istotny wpływ na przerzutowanie do regionalnych węzłów chłonnych.
2. Ze względu na wysoką czułość, immunohistochemiczna ocena stopnia ekspresji 4E w obrębie guza zdaje się mieć ograniczoną przydatność. Niemniej jednak technika ta wydaje się być obiecująca w ocenie histopatologicznie czystych marginesów chirurgicznych.

**Słowa kluczowe:** rak jamy ustnej, rak płaskonabłonkowy, badania immunohistochemiczne MMP-9, eIF4E.

## Ocena przydatności badania ekspresji MMP-9 oraz eIF4E w raku płaskonabłonkowym języka i dna jamy ustnej

*The role of the expression of MMP-9 and eIF4E in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth*

Paweł Golusiński<sup>1</sup>, Wojciech Golusiński<sup>2</sup>, Elżbieta Waśniewska<sup>3</sup>, Jan Olofsson<sup>4</sup>, Przemysław Majewski<sup>5</sup>, Andrzej Kluk<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Medycznej, Zakład Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup>Oddział Chirurgii Głowy i Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>4</sup>Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

<sup>5</sup>Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

### Wstęp

Około połowa wszystkich nowotworów głowy i szyi to nowotwory jamy ustnej. Spośród 615 tys. zarejestrowanych na świecie nowych przypadków nowotworów złośliwych regionu głowy i szyi w 2000 r. 300 tys. stanowiły pierwotne raki płaskonabłonkowe jamy ustnej. Niezwykle złośliwy charakter raka płaskonabłonkowego jamy ustnej sprawia, iż nowotwór ten w samych tylko Stanach Zjednoczonych zabija co godzinę jednego pacjenta, co stawia go wśród wszystkich nowotworów złośliwych na 6. miejscu [1].

Tak wysoka agresywność raka języka i dna jamy ustnej jest spowodowana przede wszystkim dużą zdolnością do tworzenia przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, a także tendencją do powstawania wznów miejscowych. Właśnie te dwa czynniki są odpowiedzialne za fakt, że rokowanie u większości chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej pozostaje niepomyślne [2].

Rozwój nowotworu oraz tendencja do tworzenia przerzutów wymagają złożonego procesu interakcji pomiędzy komórką nowotworową a otaczającą ją strukturą, tzw. macierzą pozakomórkową (ang. *extra cellular matrix*). Macierz pozakomórkowa odgrywa istotną rolę w kontroli proliferacji komórek, jej różnicowania, wchodzenia w proces apoptozy, jak również zapewnia odżywanie komórek proliferującego nowotworu. Degradacja ECM jest niewątpliwie jednym z kluczowych zjawisk odpowiedzialnych za inwazję nowotworu i jego potencjał metastatyczny [3].

Wśród enzymów odpowiedzialnych za degradację macierzy pozakomórkowej, najważniejszą rolę odgrywają metaloproteiny (MMPs). Jest to rodzina cynkozależnych endopeptydaz, które mają zdolność degradacji większości komponentów ECM [4].

Metaloproteinaza 9 (MMP-9) stanowi obok metaloproteiny 2 jeden z lepiej zbadanych czynników, którego wysoka ekspresja jest związana z wyso-

**Introduction:** The high invasiveness of the squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth is caused by its ability to metastasize to the local lymph nodes and high local recurrence rate. These two factors are responsible for the poor prognosis.

**Aim of the study:** The objective of this study was to analyze twenty nine cases of squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth and comparison the results of immunohistochemical stainings for MMP9 and eIF4E with the clinical data concerning metastases and the standard pathological techniques of tumor evaluation.

**Material and methods:** The material comprised of formalin fixed, paraffin embedded tumor tissue of 29 oral cancer patients who underwent radical, primary surgery.

Sixteen tumors were extracted from the free part of the tongue, four from the base of the tongue and nine from the floor of the mouth. The immunohistochemical stainings were performed with a use of avidin-biotin method. The Fisher-Freeman-Halton test was used for statistical analysis.

**Results:** Statistically significant associations were found between the number of stained cells ( $p=0.0306$ ) and the staining intensity ( $p=0.0415$ ) for MMP-9 and the metastases to the local lymph nodes. The staining intensity for eIF4E did not reach the level of statistical significance ( $p=0.8924$ ). The analysis comparing local recurrence with MMP-9 and eIF4E expression, demonstrated as the number of stained cells and the staining intensity, did not reveal statistically significant associations (MMP-9: number of stained cells  $p=0.5757$ , staining intensity:  $p=0.4320$ ; eIF4E staining intensity:  $p=0.5600$ ).

#### Conclusions:

1. The expression of MMP-9 appears to be associated with the formation of metastases to the lymph nodes.
2. It seems that immunohistochemical evaluation of the 4E expression in the primary tumor region is of no use because of high sensitivity. However, this technique may be useful for the evaluation of "pathologically clean" surgical margins.

**Key words:** oral cancer, SCC, immunohistochemical staining MMP-9, eIF4E.

kim potencjałem metastatycznym, a także niepomyślnym rokowaniem w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi [3, 4].

Eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E) ma zdolność specyficznego wiązania do tzw. *kapów* mRNA na pierwszym etapie rekrutacji mRNA oraz zdolność utworzenia wtórnej struktury w regionie 5'UTR mRNA. Tak zwane *słabe* RNA, jak np. bFGF, mają długie fragmenty 5'UTR i charakteryzują się wysokim potencjałem formowania stabilnych, wtórnych struktur przestrzennych. Przy niskich poziomach eIF4E, słabe mRNA ulegają translacji w sposób ograniczony. Wysoki poziom eIF4E implikuje natomiast niekontrolowany wzrost komórek, charakterystyczny dla nowotworów [5, 6].

Niskie wskaźniki skuteczności leczenia w rakach płaskonabłonkowych języka i dna jamy ustnej są związane głównie z bardzo częstym występowaniem wznów miejscowych, czego przyczyną w dużej mierze jest niewystarczająco szeroki zabieg operacyjny. Tylko możliwość wykrywania procesu nowotworowego przy użyciu odpowiednich markerów na poziomie molekularnym pozwoliłaby na zmniejszenie wysokich wskaźników wznów miejscowych, a co za tym idzie – na indywidualną modyfikację terapii w zależności od ryzyka powstawania wznowy. Potencjalne użycie eIF4E jako markera prognostycznego jest obecnie szeroko dyskutowane.

Celem niniejszej pracy była analiza 29 przypadków raka płaskonabłonkowego języka i dna jamy ustnej oraz próba zestawienia wyników badań immunohistochemicznych dla MMP-9 oraz eIF4E z danymi klinicznymi – zdolnością do tworzenia przerzutów oraz standardowymi technikami histologicznej oceny guza.

#### Materiał i metody

Przedmiotem badań była tkanka nowotworowa pochodząca od 29 chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, którzy zostali poddani leczeniu chirurgicznemu. W 16 przypadkach był to rak części wolnej języka, w 4 nasady języka, a w 9 dna jamy ustnej. Wiek chorych wahał się 28–77 lat i średnio wynosił 64 lata. W badanej grupie chorych dominowali mężczyźni (72%), kobiety stanowiły 28%.

Chorzy byli leczeni w Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu).

Wszelkie dane dotyczące stopnia zróżnicowania histologicznego (G), klasyfikacji TNM oraz stopnia klinicznego zaawansowania nowotworu zostały szczegółowo przeanalizowane. Nowotwory zostały sklasyfikowane wg standardów UICC.

Materiał tkankowy bezpośrednio po wykonaniu zabiegu operacyjnego był utrwalany w buforowanej 0,1 M buforem fosforanowym o  $pH=7,4$  4-procentowej formalinie, uzyskiwanej z paraformaldehydu. Po 4 godz. wycinki były płukane buforem i wodą, a następnie zatapiane w parafinie o niskim punkcie topliwości. Skrawki parafinowe po wybarwieniu hematoksyliną i eozyną służyły do ustalenia rozpoznania histopatologicznego, były także oceniane pod kątem przydatności do badań immunohistochemicznych z użyciem odpowiednich przeciwciał monoklonalnych przeciwko antygenom komórek proliferujących.

W barwieniu immunohistochemicznym zastosowano technikę *avidin-biotin method*, w której wykorzystuje się peroksydazę jako enzym obturacyjny, natomiast dwuaminobenzydynę jako chromogen. Użyte zostały następujące przeciwciała – eIF4E (N-19) sc6967 200  $\mu g/ml$  (Santa Cruz), **Sec Ab til 4E** – *ployclonal rabbit anti goat IgG* Z0454 (DAKO), **Anti-MMP-9** (626-644) (Ab-9), Human (Mouse) 100  $\mu g/ml$  (Calbiochem).

Wybarwienie komórek nowotworowych dla MMP-9 i eIF4E oceniano dwukierunkowo – ilościowo przez ocenę liczby wybarwionych komórek, jak również jakościowo przez określenie intensywności wybarwienia.

Do oceny liczby wybarwionych komórek nowotworowych zaadaptowano 5-stopniową skalę: 0 – poniżej 1% komórek nowotworowych pozytywnie

nych, 1+ – 1–9% komórek nowotworowych pozytywnych, 2+ – 10–49% komórek nowotworowych pozytywnych, 3+ – 50–100% komórek nowotworowych pozytywnych. Do oceny jakościowej stopnia wybarwienia zastosowano natomiast skalę 3-stopniową: + wybarwienie nieznaczne, ++ wybarwienie średnie, +++ wybarwienie intensywne. Do właściwego określenia wybarwienia oceniano każdorazowo co najmniej 500 komórek.

Do oceny statystycznej zastosowano test Fishera-Freemana-Haltona.

## Wyniki

W badanym materiale zdecydowanie przeważały guzy T4-20 i kolejno T3-5 oraz T2-3. Przerzuty do węzłów chłonnych potwierdzone histologicznie stwierdzono N1-13 i N2-3. W żadnym przypadku nie stwierdzono przerzutów odległych. W ocenie histopatologicznej znaczącą większość stanowiły raki o średnim (G2-18) oraz wysokim (G1-9) stopniu zróżnicowania histologicznego. Do kategorii G3, raków o najniższym stopniu zróżnicowania, zakwalifikowano tylko jeden przypadek. Występowanie wznowy miejscowej po zabiegu chirurgicznym stwierdzono w 9 przypadkach.

W tab. 1. przedstawiono wyniki analizy barwienia immunohistochemicznego dla MMP-9. U 19 chorych stwierdzono wybarwienie cytoplazmatyczne w ponad połowie komórek nowotworowych. W większości przypadków (23) stopień wybarwienia określono jako średnio intensywny (++)

W tab. 2. przedstawiono charakterystykę analizy barwień immunohistochemicznych dla eIF4E. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie 28 przypadków zakwalifikowano do grupy 3+, a więc ponad 50% komórek nowotworowych uległo wybarwieniu. W zasadzie w większości przypadków odsetek wybarwionych komórek sięgał blisko 100%. Większość komórek nowotworowych wybarwiła się w sposób średnio intensywny (++)

Poziomy ekspresji MMP-9 oraz eIF4E wyrażone przez liczbę wybarwionych komórek oraz intensywność wybarwienia zestawiono z danymi dotyczącymi wielkości guza T, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych N oraz występowaniem wznów miejscowych.

W porównaniu cechy T z liczbą komórek wybarwionych oraz intensywnością wybarwienia dla MMP-9 i eIF4E nie uzyskano istotnych zależności (odpowiednio  $p=0,7511$  i  $p=0,7603$  dla MMP-9 oraz  $p=0,2589$  dla stopnia wybarwienia eIF4E).

Porównując obecność histologicznie potwierdzonych przerzutów do węzłów chłonnych szyi, wykazano istotne statystycznie zależności zarówno pomiędzy liczbą wybarwionych komórek dla MMP-9 ( $p=0,0306$ ), jak i intensywnością wybarwienia ( $p=0,0415$ ). Intensywność wybarwienia dla eIF4E nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ( $p=0,8924$ ). Analiza zależności występowania wznów miejscowych z ekspresją MMP-9 oraz eIF4E wyrażoną liczbą wybarwionych komórek oraz intensywnością wybarwienia nie wykazała związku istotnego statystycznie (MMP-9 liczba komórek wybarwionych  $p=0,5757$ , intensywność wybarwienia  $p=0,4320$ ; eIF4E intensywność wybarwienia  $p=0,5600$ ).

**Tabela 1.** Liczba komórek wybarwionych oraz intensywność wybarwienia dla MMP-9

**Table 1.** The number of the cells stained and the staining intensity for the MMP-9

Liczba wybarwionych komórek	Liczba przypadków	Intensywność wybarwienia	Liczba przypadków
0	0	0	0
1+	1	+	2
2+	8	++	23
3+	19	+++	3

**Tabela 2.** Liczba komórek wybarwionych oraz intensywność wybarwienia dla eIF4E

**Table 2.** The number of the cells stained and the staining intensity for the eIF4E

Liczba wybarwionych komórek	Liczba przypadków	Intensywność wybarwienia	Liczba przypadków
0	0	0	0
1+	0	+	8
2+	0	++	18
3+	28	+++	2

## Dyskusja

Metaloproteiny są rodziną enzymów proteolitycznych zaangażowanych w degradację komponentów macierzy pozakomórkowej. Proces ten odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworu na poszczególnych etapach, takich jak naciekanie, angiogeneza czy wreszcie tworzenie przerzutów. W piśmiennictwie istnieje wiele prac opisujących ekspresję metaloprotein i ich wpływ na progresję raka płaskonabłonkowego. Wysokie wartości ekspresji MMPs są opisywane stosunkowo często w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi. Często wykazuje się istotne korelacje pomiędzy poziomem ekspresji, wyrażonym poprzez stopień wybarwienia w barwieniach immunohistochemicznych, a obecnością przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych [4].

Niektórzy autorzy krytykują immunohistochemiczne badanie ekspresji białka, wskazując na jego ograniczoną przydatność w ocenie aktywności enzymatycznej MMP-9, stosując jako metodę badawczą zymografię. Jednakże wg Ikebe i wsp. [7] istnieje istotna zależność pomiędzy stopniem wybarwienia a aktywnością enzymatyczną mierzoną za pomocą zymografii.

Pozytywne wybarwienie ponad 50% komórek rakowych w naszym materiale odnotowano w 68%, co daje wynik wyższy niż opublikowany przez Riedela i wsp. [8], lecz niższy niż osiągnięty przez Kuraharę i wsp. [9].

Przerzuty do szyjnych węzłów chłonnych występują w ok. 50% przypadków nowotworów głowy i szyi i w sposób istotny wpływają na rokowanie [10]. W naszym materiale przerzuty do węzłów chłonnych szyjnych, określonych

jako N1 i N0 stwierdzono w 49% przypadków. Istnieje wiele doniesień, wskazujących na istotną zależność pomiędzy obecnością histologicznie potwierdzonych przerzutów do węzłów chłonnych szyi a liczbą wybarwionych komórek i stopniem ich wybarwienia [3, 11]. W badanym przez nas materiale wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy potwierdzonymi histopatologicznie przerzutami do węzłów a liczbą wybarwionych komórek ( $p=0,0415$ ) oraz stopniem wybarwienia ( $p=0,0306$ ) dla MMP-9. Nie wykazano istotnego związku pomiędzy nadekspresją MMP-9 i występowaniem wznów miejscowych. W literaturze jest stosunkowo niewiele doniesień, które porównują te parametry. O-Charoenrat i wsp. [12] również nie wykazali istotnej zależności.

Podwyższone poziomy ekspresji protoonkogenu eIF4E stwierdza się we wszystkich rakach płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi, natomiast nie występują one w zmianach łagodnych. Badania mające na celu określenie poziomu eIF4E w komórkach nabłonka zmienionych zapalnie nie wykazały istotnego wzrostu ekspresji [13]. Sprawia to, że eIF4E jest uznany za użyteczny marker służący do oceny tkanki guza.

W materiale przedstawionym przez autorów w niniejszej pracy stwierdzono nadekspresję eIF4E w 100% przypadków (28 na 28), uzyskując wynik podobny do większości autorów [14]. We wszystkich przypadkach liczbę wybarwionych komórek oceniono na 3+, a więc ponad 50% komórek uległo wybarwieniu. Intensywność wybarwienia w większości przypadków określono jako średnio intensywne (2+).

Istnieje wiele prac wskazujących na istotne korelacje pomiędzy poziomami ekspresji eIF4E w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi a parametrami warunkującymi progresję nowotworu, takimi jak przerzuty do węzłów chłonnych [15]. W niniejszej pracy zależność pomiędzy poziomem ekspresji eIF4E a obecnością przerzutów do węzłów szyi nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ( $p=0,8924$ ). Nie wykazano również zależności pomiędzy poziomem ekspresji a występowaniem wznów ( $p=0,5670$ ). Wielu autorów wykazuje pozytywne korelacje dotyczące wznów miejscowych z oceną stopnia ekspresji w obrębie marginesów chirurgicznych [14, 16, 17]. Fakt, iż 100% komórek nowotworowych ulega wybarwieniu dla eIF4E sprawia, że znalazł on zastosowanie jako marker służący do oceny marginesów chirurgicznych określonych w rutynowym badaniu histopatologicznym jako onkologicznie czyste.

## Wnioski

1. Rutynowe badanie histologiczne powinno być uzupełnione dodatkowymi technikami oceniającymi biologię komórki nowotworowej w raku języka i dna jamy ustnej.
2. MMP-9 wydaje się mieć istotny wpływ na przerzutowanie do regionalnych węzłów chłonnych.
3. Ze względu na wysoką czułość immunohistochemiczną ocena stopnia ekspresji 4E w obrębie guza zdaje się mieć ograniczoną przydatność. Niemniej jednak technika ta wydaje się obiecująca w ocenie histopatologicznie czystych marginesów chirurgicznych.

## Piśmiennictwo

1. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 878-87.
2. Myoung H, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, Lim CY, Hong SP. Expression of membrane type I-matrix metalloproteinase in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2002; 185: 201-9.
3. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000; 36: 207-13.
4. Werner JA, Rathcke IO, Mandic R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 275-82.
5. McKendrick L, Pain VM, Morley SJ. Translation initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 31-5.
6. Bonneau AM, Sonenberg N. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* 198; 262: 11134-9.
7. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, Shirasuna K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 315-23.
8. Riedel F, Götte K, Schwalb J, Bergler W, Hörmann K. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2000; 31: 895-904.
9. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999; 21: 627-38.
10. Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999; 104: 678-84.
11. Miyajima Y, Nakano R, Morimatsu M. Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104 (9 Pt 1): 678-84.
12. O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 813-20.
13. Chandy B, Abreo F, Nassar R, Stucker FJ, Nathan CA. Expression of the proto-oncogene eIF4E in inflammation of the oral cavity. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126: 290-5.
14. Nathan CO, Franklin S, Abreo F, Nassar R, De Benedetti A. Analysis of surgical margins with the molecular marker eIF4E: a prognostic factor in patients with head and neck cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2909-14.
15. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004; 23: 3189-99.
16. Nathan CO, Amirghahri N, Rice C, Abreo FW, Shi R, Stucker FJ. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Laryngoscope* 2002; 112: 2129-40.
17. Nathan CO, Liu L, Li BD, Abreo FW, Nandy I, De Benedetti A. Detection of the proto-oncogene eIF4E in surgical margins may predict recurrence in head and neck cancer. *Oncogene* 1997; 15: 579-84.

## Adres do korespondencji

lek. **Paweł Golusiński**

Katedra Biotechnologii Medycznej  
Zakład Immunologii Nowotworów  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego  
ul. Garbary 15  
61-866 Poznań  
e-mail: pawel.golusinski@interia.pl