

Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas

Baş Boyun Yassı Hücreli Karsinomlarında Tümör Mikroçevresi

Review
Derleme

Görkem Eskiizmir

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Abstract

Recent studies about solid tumors demonstrated that tumor microenvironment has an important role in tumor progression, aggressivity, and metastasis process, in addition to genetic aberrations and molecular alterations of cancer cells. Therefore, the crosstalks between cancerous and noncancerous cells and metabolic changes in tumor microenvironment cause significant detrimental

effects. The purpose of this review is to present the role and effect of noncancerous cells and their crosstalks with cancer cells, metabolic changes in tumor microenvironment, and to discuss the clinical significance of all these factors with respect to the current literature.

Keywords: Carcinoma, squamous cell of head and neck, head and neck neoplasms, tumor microenvironment

Özet

Solid tümörlerin progresyonu, agresivitesi ve metastaz yeteneği kazanması ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser hücrelerindeki genetik bozulmaların ve moleküler değişikliklerin yanı sıra tümör mikroçevresinin de önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Tümör mikroçevresindeki kanser hücrelerinin kanser dışı hücrelerle olan iletişimi ve mikroçevrede yarattıkları metabolik değişiklikler ciddi etkiler yaratmaktadır. Bu derlemenin amacı baş boyun yassı hücreli karsinom-

larının tümör mikroçevresindeki kanser ve kanser dışı hücrelerin aralarındaki iletişim yollarının ve birbirlerine etkilerinin, bu ortamda ortaya çıkan metabolik değişikliklerin etkilerinin sunulması ve tüm bu faktörlerin klinik öneminin güncel literatür ışığında tartışılmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Karsinom, baş boyun yassı hücreli, baş boyun neoplazmları, tümör mikroçevresi

"İnsanlar stratejiyi bilmelidir, stratejiyi öğrenenler yaşar; öğrenemeyenler ise yok olmaya mahkumdur!"

Sun Tzu, Savaş Sanatı.

Giriş

Baş boyun kanserleri, oral kavite, farenks, larenks, paranazal sinüsler ve nazal kavitenin epiteliyal malignitelerini tanımlamaktadır. Baş boyun kanserleri, tüm kanserlerin %6'sını oluşturmaktadır ve sıklık sırasına göre tüm kanserler arasında altıncı sırada yer almaktadır. Her yıl dünyada yaklaşık 650.000 yeni olgu geliştiği ve yaklaşık 350.000 olguda kanser ilişkili ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir (1). Baş boyun kanserlerinde en sık rastlanan histopatolojik tip yassı hücreli karsinomdur ve bilinen başlıca risk faktörleri genetik değişikliklerin yanı sıra çevresel faktörlerden özellikle tütün/sigara tüketimi, alkol kullanımı, kimyasal ve viral ajan maruziyetidir (2). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda oral kavite ve orofarenks yassı hücreli karsinomları ile insan papilloma virüsü (özellikle insan papilloma virüs 16 ve 18) arasındaki ilişki açıkça ortaya konmuştur (3).

kojenlerin aktivasyonunun olduğu birçok genetik mutasyon ve epigenetik değişikliğin rol oynadığı bilinmektedir. Bu bölgede gelişen premalign lezyonların yaklaşık %90'ında telomeraz reaktivasyonu ortaya konmuştur; ki bu enzim özellikle Deoksiribonükleik asitte (DNA) telomerlerin devamlılığı ve hücrenin ölümsüzlük kazanmasında (*Hayflick sınırı*) itibarıyla normal bir hücre maksimum 50-80 kez bölündükten sonra apoptoza uğramaktadır. Ancak, kanser hücrelerinde bu sınır bulunmamaktadır ve bu nedenle "ölümsüz" olarak tanımlanmaktadır (4). Baş boyun yassı hücreli karsinomlarda en sık görülen (%70-80 oranında) genetik değişiklikler arasında 9p21 kaybı yer almaktadır (5). Bunlarla birlikte delesyon, nokta mutasyonu veya promoter hipermetilasyonuna bağlı *p16* inaktivasyonu ve 3p kaybı da karsinogenezde önemli rol oynamaktadır (6). Baş boyun kanserlerinin %50'sinde 17p heterozigozitesinde kayıp ve TP53 nokta mutasyonları da görülebilmektedir (7). Ayrıca, siklinD1 overekspresyonu da agresif tümör karakteristiği ile yakın ilişkili bulunmuştur (8).

Baş boyun yassı hücreli karsinom gelişiminde tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve/veya protoon-



Address for Correspondence/Yazışma Adresi:

Görkem Eskiizmir

E-mail: geskiizmir@hotmail.com

Received Date/Geliş Tarihi: 19.03.2015

Accepted Date/Kabul Tarihi: 23.04.2015

© Copyright 2015 by Official Journal of the Turkish Society of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Available online at

www.turkarchotorhinolaryngol.org

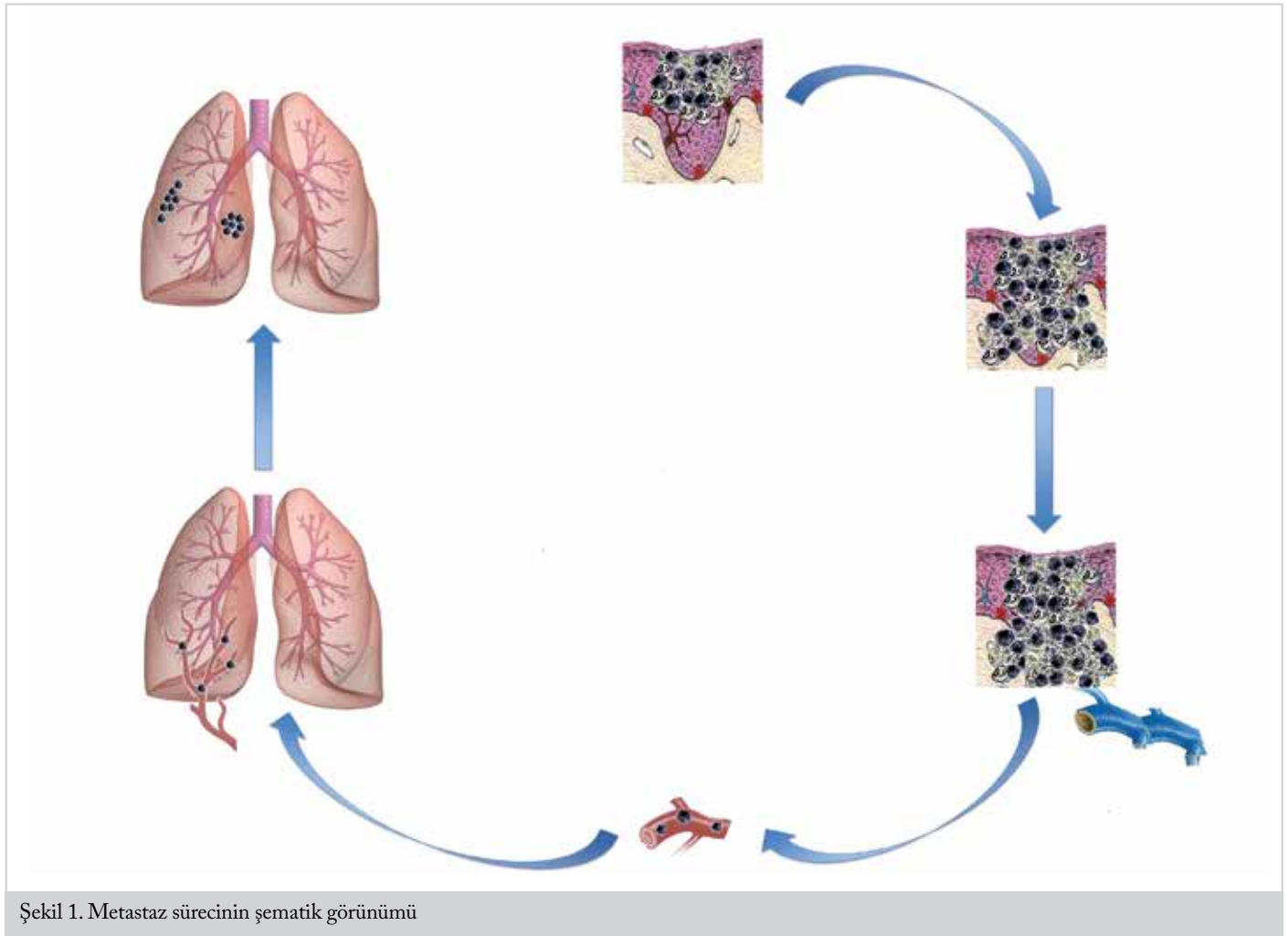
© Telif Hakkı 2015 Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş

Boyun Cerrahisi Derneği Makale metnine

www.turkarchotorhinolaryngol.org web

sayfasından ulaşılabilir.

DOI: 10.5152/tao.2015.1065



Şekil 1. Metastaz sürecinin şematik görünümü

Kanserde, karsinogenezden başlayarak uzak metastaza kadar devam eden süreçte kanser hücrelerinin aşması gereken önemli basamaklar bulunmaktadır (Şekil 1). Bunların başlıcaları sırasıyla:

- (i) Lokal tümör proliferasyonu ve infiltrasyonu,
- (ii) Tümör hücrelerinin lenfatik/kan dolaşım sistemine ulaşması (intravazasyon),
- (iii) Tümör hücrelerinin metastaz yaptığı uzak organda dolaşımından çıkarak dokuya çıkması (ekstravazasyon),
- (iv) Metastaz gelişen organda proliferasyon ve progresyon.

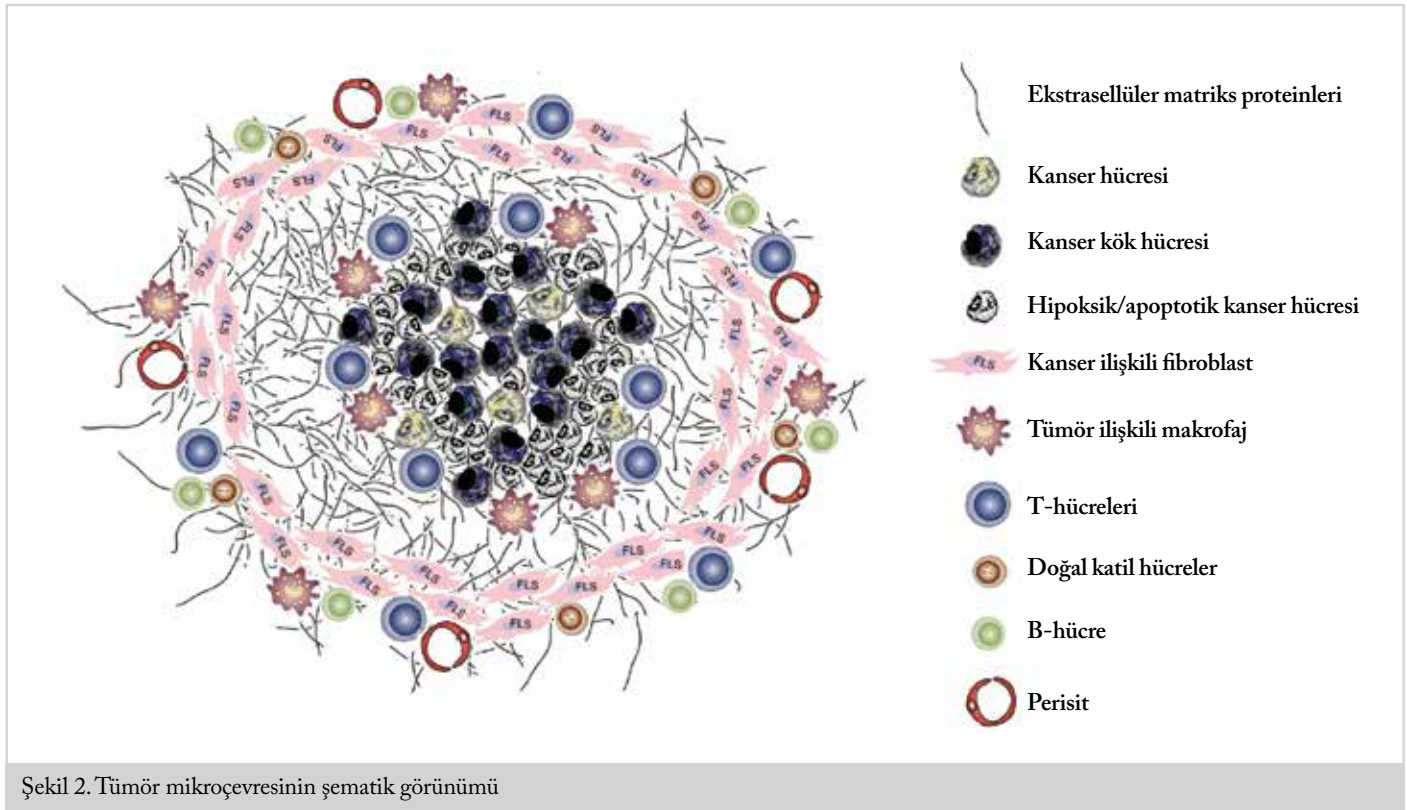
Kanser hücrelerinin yukarıda bahsedilen zorlu süreci başarıyla tamamlayabilmesi için bazı özel yetenekler kazanmış olması gerekmektedir (9):

1. Hücre ölümüne (apoptoz) direnç gösterebilmek,
2. Ölümsüzlüğe sahip olarak defalarca çoğalabilmek,
3. Bağışıklık sisteminin yokedicili/yıkıcı etkilerinden saklanabilmek,
4. Bağışıklık sistemindeki hücreleri kendi lehine kullanabilmek,
5. Büyüme baskılayıcı sitokin/metabolitlere karşı hücrenin hassasiyetini kaybetmesi,
6. Hücre içi enerji kullanım sistemi ve metabolizmasında değişiklik yaratabilmek,
7. Genomda instabil mutasyonlara yol açabilmek,

8. Epitelyal-mezenkimal değişim yeteneği kazanabilmek,
9. Doku invazyon yeteneği kazanabilmek ve bunu gerçekleştirebilmek için çevredeki hücreleri (enflamatuar hücreler, fibroblastlar, vs.) kendi lehine kullanabilmek,
10. Tümör tetikleyici enflamasyonu artırabilmek,
11. Lenfanjiyogenez ve/veya anjiyogenezini tetiklemek/artırabilmek,
12. Lenfatik ve/veya hematojenik metastaz yapabilmek,
13. Mezenkimal-epitelyal değişim yeteneği kazanabilmek,
14. Uzak organda çoğalarak kolonize olabilmek.

5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, 2009' da, kanser hücreleri ile tümör mikroçevresinde yer alan hücreler arasındaki iletişimin kanser progresyonundaki etkisi vurgulanmıştır (10). Hanahan ve Weinberg (11) kanserin temel oluşum mekanizmalarını sundukları makalede, karsinogenez, tümör büyümesi, progresyon ve metastaz süreçleri için kanser hücrelerinin gereksinim duyduğu yeteneklerin/davranışların gelişmesinde veya etkisinin artmasında tümör mikroçevresinin rolünü belirtmişlerdir.

Bu derlemenin temel hedefi, baş boyun yassı hücreli karsinomlarında tümör mikroçevresinin karsinogenez ve kanser hücre biyolojisi, tümör progresyonu, metastaz süreci, tedavi direnci ve



Şekil 2. Tümör mikroçevresinin şematik görünümü

prognostik rolü ve öneminin güncel araştırma ve kanıtlar çerçevesinde sunulmasıdır.

Tümör Mikroçevresine Genel Bakış

Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin yanı sıra birçok farklı hücre ve biyokimyasal yapının bir arada olduğu ve bunların sürekli olarak birbirleriyle iletişim ve etkileşim halinde olduğu interaktif, organize ve dinamik bir ortamdır (12). Bu alanda yer alan başlıca yapılar: parenkim, stroma, büyüme faktörleri, lenfokin ve sitokinler, enflamatuar ve matriks metalloproteinaz enzimleridir (Şekil 2). Kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri parenkimde yer alırken, malign olmayan hücreler (enflamatuar hücreler, kanser ilişkili fibroblastlar, anjiyojenik vasküler hücreler ve bazen adipositler) ve ekstrasellüler matriks ise stromayı oluşturmaktadır. Enflamatuar hücreler, kanser hücrelerine mitojenik büyüme faktörleri sağlamakta, anjiyogenezi tetiklemekte, kanser hücrelerinin hücre ölümüne direnç göstermesinde, bağışıklık sisteminden kaçmasında, invazyon/metastaz yeteneği kazanmasında önemli rol oynamaktadır (13). Kanser ilişkili fibroblastlar da, hücre metabolizmasının yeniden düzenlenmesinde etkili olmaktadır. Ekstrasellüler matriks tüm hücrelerin yer aldığı 3-boyutlu bir kalıp rolü gören dinamik bir yapıdır ve bünyesinde birçok farklı protein, glikoprotein, proteoglikan ve farklı biyokimyasal özelliklere sahip polisakarit bulunmaktadır; ki bunların başlıcaları: kollajen, fibrin, fibronektin, proteoglikan ve hyaluronandır (14).

Baş Boyun Yassı Hücreli Karsinom Tümör Mikroçevresinde Enflamatuar Hücrelerin Etkisi

Kanser gelişimi ve enflamasyon arasındaki ilişki ile ilgili ilk hipotez Rudolf Virchow tarafından ortaya atılmıştır (15). Kanser

hücreleri mikroçevrelerinde yarattıkları kronik enflamasyon ile yaşamlarını ve büyümelerini güvence altına alırlar. Enflamasyon patolojik yapıların uzaklaştırılmasında ve kanser hücrelerinin yok edilmesinde yararlı bir etki yaratıyor gibi düşünülse de; organize olmayan ve kanser hücreleri tarafından yönetilen enflamatuar yanıt, tümör gelişimine ve kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminin yıkıcı etkilerinden kaçabilmesine fırsat yaratmaktadır. Baş boyun kanserlerinde yapılan araştırmalar, lokal, bölgesel ve sistemik enflamatuar yanıtın disfonksiyone olduğunu açıkça ortaya koymuştur (16, 17).

Tümör mikroçevresinde rol oynayan başlıca enflamatuar hücreler: T lenfositler, doğal katil hücreler ve tümör ilişkili makrofajlardır. Bu hücrelerin solid tümör mikroçevresinde dağılımı heterojenite göstermektedir; granulositler, mast hücreleri ve makrofajlar tümör çevresinde, doğal katil hücreler stromada ve T-lenfositler ise mikroçevre marjinde ve lenf nodlarında yer alır (18). T-lenfositler, sitotoksik CD8+ T-lenfositler ve CD4+ T-lenfositler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. CD4+ T-lenfositler, farklı davranış ve özellikler sergileyen T_{helper} hücreler ve T_{regulator} hücreler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sitotoksik CD8+ T-lenfositleri antitümör yanıtta başrolü oynamaktadır ve tümör hücrelerinin hatırlanarak yok edilmesinde aktif rol oynarlar ve bu nedenle tümör mikroçevresinde bulunmaları sıklıkla iyi prognozu işaret etmektedir (19). Bunun yanı sıra, T_{helper} hücreler de CD8+ T-lenfositlere yardımcı ve antitümör etkisini artırıcı rol oynamaktadır. Ancak T_{regulator} hücreler, immüno-supresif etkileri ve sitotoksik CD8+ T-lenfositlerin işlevlerini inhibe ettikleri için de tümör progresyonunda etkili olmaktadır. Birçok solid tümörlü olguda olduğu gibi baş boyun kanserli olgularda da, sirküle olan ve tümör infiltre eden

T-lenfositlerde işlevsel bozukluklar olduğu gösterilmiştir (18, 20). Ayrıca, baş boyun kanseri olguları ile sağlıklı kişilerden alınan kan örnekleri karşılaştırıldığında $T_{regulator}$ hücre sayısının belirgin oranda yüksek olduğu saptanmıştır (21, 22). Hanakawa ve ark. (23) dil kanserlerinde $T_{regulator}$ hücre sayısını inceledikleri bir çalışmada, yüksek $T_{regulator}$ hücre sayısının kötü prognostik faktör olduğu sonucuna varmıştır.

Hepatosellüler, meme ve akciğer kanserleri gibi birçok solid tümör mikroçevresinde sitotoksik CD8+ T-lenfosit/ $T_{regulator}$ hücre oranının yüksek olmasının iyi prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (24). Watanebe ve ark. (25) 87 oral kavite kanseri olgusunun tümör spesimenlerinde yaptıkları çalışmada, stromal-sitotoksik CD8+ T-lenfosit sayısının düşük olmasını ve stromal $T_{regulator}$ hücre sayısının yüksek olmasını düşük sağkalımla ilişkili bulmuşlar; ancak total $T_{regulator}$ hücre sayısının etkisi olmadığını belirlemiştir. Bunun yanısıra, en kötü prognozun "sitotoksik CD8+ T-lenfosit/ $T_{regulator}$ " hücre oranı düşük olan grupta olduğu ortaya konmuş ve bu oranın tek başına bağımsız bir prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır. Ancak, orofarenks kanserinde yapılan çalışmalar diğer baş boyun kanserlerinden farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Orofarenks kanserlerinde, sitotoksik CD8+ T-lenfosit düzeyinin yüksek olmasının olumlu prognostik faktör olduğu belirlense de, $T_{regulator}$ hücrelerin yüksekliğinin etkisi tartışmalıdır (26).

Tümör ilişkili makrofajlar (TİM), tümör mikroçevresinde ekstrasellüler matriks yıkımı ve yeniden yapılanmasında, tümör hücre motilitesinde ve anjiyogenezin tetiklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu hücreler proenflamatuar (M1) ve supresif (M2) TİM olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. M1 TİM'ler ürettikleri proenflamatuar sitokinler (IL-12, -23, interferon, vs.) sayesinde antitümöral etki göstermektedir. Ancak, M2 TİM'ler M1 TİM'lerin antitümöral etkisini baskılar, anjiyogenez tetikler ve ürettikleri supresif sitokinler (IL-10, tümör büyüme faktörü-beta, vs.) ile tümör progresyonuna yol açar. Tümör ilişkili makrofajlar özellikle hipoksik ve nekrotik ortamlara sahip solid tümörlerde kümelenmektedir ve bu nedenle baş boyun kanserlerinde sıklıkla saptanmaktadır. Bu konuda yapılmış olan bir meta-analizde, baş boyun kanserlerinde TİM'in yüksek düzeyde olmasının genel sağkalımın düşük olmasına yol açtığı yönünde ciddi kanıtlar sunulmuştur (27).

Doğal katil hücreler, kanser hücrelerinin saptanması ve yok edilmesinde rol almaktadır. Ancak, tümör mikroçevresi stromasında yerleşmiş olsalar da, nadiren kanser hücreleriyle temas halindedirler. Kolorektal, akciğer, renal, mide kanseri gibi birçok solid tümörde iyi prognozu işaret etmektedir (12). Ancak, baş boyun kanseri olgularında doğal katil hücre sayısında belirgin azalma olduğu ortaya konmuştur (28).

Baş Boyun Yassı Hücreli Karsinom Tümör Mikroçevresinde Kanser İlişkili Fibroblastların Etkisi

Normal sağlıklı bir insanda bulunan fibroblastlar, ekstrasellüler matriksin önemli parçalarını (tip IV kollajen, laminin, sitokinler, vs) üreterek buldukları dokunun mimarisinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Solunum sistemi boyunca özellikle

stromada yaygın olarak yer almaktadırlar. Doku hasarı ile birlikte ortaya çıkan parakrin sinyallerle aktive olan fibroblastlar, miyofibroblastlara değişim gösterirler ve böylelikle yara kontraksiyonunda, fibröz ve enflamatuar yanıtın düzenlenmesinde rol oynarlar. Bu işlemlerin gerçekleşmesi için α -düz kas aktini eksprese eder ve ekstrasellüler matriks parçalarını üretirler. Bunun yanı sıra, doku onarımı için hücre olarak çoğalan fibroblastlar yara iyileşmesinin sonlanması ile birlikte apoptoza uğrarlar.

Kanser karakteristik olarak "iyileşmeyen yara" olarak tanımlanmaktadır, ki bu süreç özellikle kanser ilişkili fibroblastlar (KİF) üzerinden devam etmektedir. Tümör mikroçevresi stromasında yer alan KİF'ler kritik bir öneme sahiptir; özellikle karsinogenez tümör progresyonu ve metastazda oldukça etkilidir (29, 30). Rosenthal ve ark. (31) baş boyun kanseri tümör stromalarından alınan örneklerde yaptıkları KİF aktivite çalışmasında, tümörün invaziv karakter kazanmasına yardımcı olan ve ekstrasellüler matriksin yeniden modellenmesinde etkili olan birçok proteaz enzimin (Membran tip 1-matriks metalloproteinaz (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, ürokinaz, vs.) üretiminde KİF'lerin önemli rolü olduğunu ortaya koymuşlardır. Kanser ilişkili fibroblastlar, normal fibroblastlarda gerçekleşen genetik değişiklikler, epitel hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişe uğraması, endotel hücrelerinin endotelyal-mezenkimal geçişe uğraması sonucunda oluşabilir veya direkt olarak mezenkimal kök hücrelerden köken alır (32). Bu hücreler, myofibroblastik geçişe uğrayarak yoğun ultrastrüktürel α -düz kas aktin birikimi ile karakterize bir fenotipe sahiptir. Bunun yanı sıra, hücre adezyonu ve yüzey sinyalizasyonunda önemli olan integrin α 6 overekspresyonu da saptanmaktadır (17).

Kanser ilişkili fibroblastlar, pankreas, mide ve meme kanseri gibi birçok solid epitelyal tümör hacminin %50-70'ini oluşturmaktadır (33). Baş boyun kanserleri için karakteristik olan dezmozplastik yanıtın (yoğun kollajen depolanması ve stromal dezmozplazi) gelişmesinde KİF'lerin önemli rolü bulunmaktadır. Kawashiri ve ark. (34) oral kavite kanseri olgularında yaptıkları bir klinikopatolojik çalışmada, dezmozplazinin agresif tümörlerde belirgin olduğunu ve tümör stromasında miyofibroblast proliferasyonunun tümör invazyonu ve metastazına yardımcı olduğunu göstermiştir. Bunun yanısıra, α -düz kas aktin pozitif grupta hastalığa bağlı sağkalımın da istatistiksel olarak daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Tümör Mikroçevresinde Hipoksi

Tümör mikroçevresinde, parenkimdeki kanser hücreleri ile stromal hücreler arasındaki etkileşime bağlı olarak ortamda birçok metabolik değişiklik gelişmektedir (Tablo 1). Bu değişiklikler arasında en önemlisi hipoksidir (35). Hipoksi ($pO_2 < 10-15$ mmHg) bir dokunun gereksinimi olan ve bu dokuya sağlanabilen oksijen düzeyleri arasındaki dengesizliğe bağlı olarak ortaya çıkan oksijen düzeyindeki yetersizliği tanımlamaktadır. Oksijen düzeyindeki bu dengesizlik temel olarak vasküler veya pulmoner hastalık kaynaklı ortaya çıkabilmektedir ve üç tipi bulunmaktadır (35-37).

- (i) Kronik hipoksi (difüzyon sınırlamalı hipoksi): Uzun süreli düşük oksijen difüzyonuna bağlı düşük oksijen basıncı (yaklaşık %2-3) bulunmasıdır. Normal sağlıklı

hücreler kronik hipoksiye karşı direnç gösteremese de, kanser hücreleri sahip oldukları metabolik değişiklikler ve adaptasyon yetenekleri ile bu ortamlarda yaşamaya devam edebilirler.

- (ii) Akut hipoksi (perfüzyon sınırlamalı hipoksi): Ani gelişen geçici/kalıcı kan akışı azalmasına bağlı oksijen basıncının azalmasıdır.
- (iii) Reperfüzyonla birlikte hipoksi: Akut hipoksi sonrasında akışın sağlanması ile birlikte tekrar oksijenizasyonun gelişmesidir. Ancak bu durumda fizyolojik bir oksijen düzeyi sağlansa da, sıklıkla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak “reoksijenizasyon hasarı” gelişir. Tümör mikroçevresinde hipoksi sonrasında gelişen reperfüzyonla birlikte ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri kromozomal kırıklara, gen amplifikasyonlarına ve kontrolsüz DNA çoğalmalarına yol açabilmektedir.

Baş Boyun Yassı Hücreli Karsinom Tümör Mikroçevresinde Hipoksi: Mekanizma, Etkiler, Tanı Yöntemleri ve Klinik Önemi

Meme, beyin, serviks, prostat, rektum ve baş boyun kanseri gibi birçok solid tümör mikroçevresinde çevredeki sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında belirgin düzeyde hipoksi olduğu ortaya konmuştur (38). Lokal ileri tümörlerin yaklaşık %50-60'ının mikroçevresinde heterojenik olarak dağılmış şekilde ve değişik düzeylerde hipoksik alanlar bulunduğu gösterilmiştir (35). Solid tümörlerin mikroçevresinde gelişen hipokside rol oynayan temel mekanizmalar:

- (i) Kanser hücrelerinin mikrodamarlara uzaklığı (>70 mikron) nedeniyle gelişen difüzyon sınırlamalı hipoksi.
- (ii) Tümör mikrodamarlanmasındaki fonksiyonel ve yapısal (amorf ve kaotik damarlanma sistemi) bozuklukların sonucunda gelişen perfüzyon sınırlamalı hipoksi.
- (iii) Hastanın genel durumu, kansere bağlı gelişen kaşeksi ve tedavilerin sonucunda ortaya çıkan anemiye bağlı gelişen doku oksijenizasyonundaki yetersizlikler.

Tümör mikroçevresindeki hipoksinin kanser hücrelerinde genetik instabilite ve gen ekspresyonunda bozulmaya yol açtığı, tümörün invazyon yeteneği geliştirmesinde ve agresif karakter kazanmasında, radyo/kemoterapi tedavi direncinde ve metastaz gelişmesinde önemli rol oynadığı ortaya konmuştur; ki bunların tamamı olumsuz prognostik faktörlerdir (39-41). Bu nedenle, tümör mikroçevresindeki hipoksi varlığı ve düzeyinin saptanması giderek önem kazanmaktadır. Maalesef, günümüzde tümör mikroçevresindeki hipoksi düzeyinin belirlenmesi için “*altın standart*” bir teknik bulunmamaktadır; kullanılan başlıca teknikler aşağıda sunulmuştur (36, 42, 43):

- (i) Elektrofizyolojik ölçüm teknikleri: Direkt ve invazif olarak tümör mikroçevresinden polarografik pO_2 elektrodları ile yapılmaktadır. Bu teknik sayesinde tümör mikroçevresinden direkt ölçüm yapılabilmesi en önemli avantajıdır. Ancak, hipoksinin tümör mikroçevresinde heterojenite göstermesi ve bazı bölgelere ulaşım zorluğu önemli sınırlamalardır.
- (ii) Ekzojen hipoksi belirteçleri: İndirekt ve invazif bir tekniktir. Selektif olarak hipoksik hücrelere bağlanan

nitroaromatik belirteçlerin (pimo-, miso-, eta-nidazol) biyopsi yapılmasından 24-48 saat öncesinde intravenöz uygulanması ile tümör mikroçevresindeki hipoksik hücrelerin işaretlenmesi yapılmaktadır.

- (iii) Radyolojik incelemeler: Direkt ve noninvazif olarak dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme, kan ve doku oksijen düzeyi spesifik manyetik rezonans görüntüleme teknikleri ile yapılmaktadır. Bu teknikler arasında özellikle dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar yaygın olarak bulunmaktadır. Dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme, tümör mikroçevresine kan akımını, vasküler hacmi ve damarların permeabilitesini yüksek rezolüsyonlu olarak görüntüleyebilmektedir.
- (iv) Nükleer tıp incelemeleri: Direkt ve noninvazif olarak özellikle hipoksiye spesifik radyotraserlerle (^{18}F -MISO, ^{18}F -FAZA, ^{18}F -HX4, ^{18}F -EF5, vs.) birlikte pozitron emisyon tomografi tabanlı görüntüleme yöntemleri ile yapılmaktadır. Hipoksi saptanması için en sık kullanılan radyotraser ^{18}F -MISO'dur. Bu radyotraserle yapılan çalışmalarda hipoksi ölçümü ile ilgili umut verici sonuçlar elde edilse de, çalışmalardaki olgu sayıları sınırlıdır ve bu radyotraserin yaygın olarak bulunamaması nedeniyle rutin klinik kullanıma girememiştir.
- (v) Endojen hipoksi ilişkili markerların değerlendirilmesi: İndirekt olarak tümör dokusunda hipoksi ilişkili faktörlerin (hipoksi indusibl factor-1,-2,-3, karbonik anhidraz-9, osteopontin, vs.) saptanmasıdır. Bu biyobelirteçler tümör mikroçevresinde hipoksi artışı ile korele olarak artmaktadır. Böylelikle, bu biyobelirteçlerin incelenmesi ile tümörün hipoksi düzeyi hakkında bilgi sahibi olunabilmekte ve radyo/kemoterapi direnci ve prognozu hakkında yorum yapılabilmesi mümkün olmaktadır. Ancak, bu tekniklerin en önemli sınırlılığı tümör mikroçevresindeki heterojenite nedeniyle biyopsi alınan alana göre farklı sonuçlar elde edilebilmesidir. Bununla birlikte, biyobelirteçlerin hipoksi dışı nedenlere bağlı artış göstermesi de, hipoksi düzey belirleme hatalarına yol açabilmektedir.

Tümör mikroçevresinde hipoksi gelişimi ile birlikte birçok sinyal ağı aktive olmaktadır; ki bunlar arasında başlıcaları: hipoksi indusibl faktörler (HIF), osteopontin ve karbonik anhidraz-9'dur. Hipoksi indusibl faktörler, tümör mikroçevresinde “*hipoksi sensörü*” olarak rol oynamaktadır. Bu proteinler transkripsiyonel komplekslerdir ve HIF- α ve HIF- β olmak üzere iki heterodimerden oluşmaktadır (44, 45). Günümüzde üç adet HIF sınıflandırılmıştır: HIF-1, -2 ve -3. Bunlar arasında en çok araştırma ve klinik çalışma yapılan HIF-1'dir. Normoksik ortamlarda hücreler sürekli olarak HIF-1 α sentezlemektedir, ancak spesifik hidroksilaz enzimler yardımıyla oksijene bağlı bir reaksiyonla hızla hidroksile oldukları için yarı-ömürleri kısa sürelidir. Hidroksile olan HIF-1 α proteini, bu protein hedefleyen von Hippel-Lindau proteini için bir substrat haline gelir ve ubiquitinasyon işlemi sonrasında yıkılır. Ancak, ortamdaki oksijen konsantrasyonunun azalması (hipoksi/anoksi) ile birlikte HIF-1 α hidroksile olamaz ve yıkılmadığı için ortamdaki konsantrasyonu giderek artar. Hipoksi indusibl faktörler, transkrip-

siyonel olarak birçok genin fonksiyonunu düzenlemektedir, ki bu genler büyüme gelişme, apoptoz, epitelyal-mezenkimal geçiş, invazyon yeteneği, anjiyojenik sinyalleme, enerji metabolizmasının düzenlemesi gibi kanser gelişimi ve progresyonunun birçok aşamasında önemli rol oynamaktadır (Tablo 2) (44-46). Beasley ve ark. (47) baş boyun kanser hücre hatlarında ve tümör dokularında HIF-1 ve -2 düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, her iki biyo-belirtecin ekspresyonunda önemli düzeyde artış olduğunu ortaya koymuştur.

Tablo 1. Solid tümörlerin mikroçevresinde gelişen metabolik değişiklikler

| |
|---|
| Kaotik ve amorf vasküler yapılanmada artış |
| Perfüzyon yetersizliğinde artış |
| Perfüzyon heterojenitesinde artış |
| Tümör mikrodamarlarının permeabilitesinde artış |
| İnterstitiyel sıvı basıncında artış |
| Laktat üretiminde artış |
| Besin sağlanmasında azalma |
| Parsiyel oksijen basıncında azalma |
| Yüksek enerjili yapıların üretiminde azalma |
| Ekstrasellüler matris pH'sında azalma |

Osteopontin (OPN), multifonksiyonel, negatif-şarjlı asidik bir proteindir. Her ne kadar, özellikle kemikte yüksek oranda eksprese edilse de, birçok farklı hücre (makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas ve epitel hücreleri) tarafından da sentezlenebilmektedir (48). Osteopontin, HIF'in yıkımında önemli rol oynayan von Hippel-Lindau proteininin ekspresyonu ile ters ilişkilidir. Böylelikle, tümör mikroçevresinde OPN düzeyinin artması von Hippel-Lindau proteini ekspresyonunu düşürmektedir ve buna bağlı olarak HIF yıkımı azalmaktadır. Le ve ark. (49) baş boyun kanserli olguların kan örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, plazma OPN düzeyi ile tümör hipoksisi arasında korelasyon olduğunu ortaya koymuştur.

Karbonik anhidraz-9 (KA-9), geniş bir metalloenzim ailesinin üyesi olan transmembran bir glikoproteindir. Bu ailenin üyeleri CO₂'in HCO₃'a geri dönüşümlü çevrilmesini sağlamaktadır; böylelikle, ekstrasellüler matris ve mikroçevrenin pH düzenlemesi, solunum ve kalsifikasyon gibi birçok önemli işlevin yerine getirilmesinde rol oynamaktadır. Tümör mikroçevresinde, hipoksiyle birlikte yükselen HIF düzeyi, KA-9 ekspresyonunu da tetiklemektedir. Serviks, böbrek, meme, akciğer ve baş boyun kanseri gibi birçok solid tümörde KA-9 düzeyinin yüksek olduğu ve olumsuz sağkallımla yakın ilişkili olduğu rapor edilmiştir (50). Baş boyun kanser hücre hatları ve tümör spesimenlerinde yapılan bir çalışmada, KA-9'un artmış oranda eksprese edildiği ve ileri evre tümörlerde daha yüksek düzeylerde olduğu saptanmıştır (51).

Baş boyun kanserlerinde hipoksinin klinik etkilerinin incelendiği ilk çalışma 1996 yılında Nordmark ve ark. (52) tarafından 34 radyoterapi planlanan ileri evre baş boyun kanseri olgusunun

Tablo 2. Hipoksi indusibl faktörün kanser gelişiminde etkili olduğu hedef genleri

| Fonksiyon | Hedef gen |
|--------------------------------|--|
| Eritropoez/demir metabolizması | Eritropoetin Transferrin Transferrin reseptör Serüloplazmin |
| Anjiyogenez | Vasküler endotelial büyüme faktörü Endokrin bez derive vasküler endotelial büyüme faktörü Leptin Transforming büyüme faktörü-β |
| Vasküler tonus | Nitrik oksid sentetaz Hem oksijenaz 1 Endotelin 1 Adrenomedulin α-adrenerjik reseptör |
| Matriks metabolizması | Matriks metalloproteinaz Plazminojen aktivator reseptör ve inhibitörü Kollajen prolyl hidroksilaz |
| Enerji metabolizması | Adenilat kinaz-3 Aldolaz-A, C Karbonik anhidraz-9 Enolaz-1 Glukoz transporter-1,3 Gliseraldehid fosfat dehidrogenaz Hekzokinaz 1,2 Laktat dehidrogenaz-A Pirüvat kinaz M Fosfofruktokinaz L Fosfogliserat kinaz 1 6-fosfofrükto-2-kinaz/gruktoz-2, 6-bisfosfat-3 |
| Hücre proliferasyonu/sağkallım | İnsülin benzeri büyüme faktörü-2 Tranforming büyüme faktörü-α Adrenomedllin |
| Apoptoz | Bcl-2 * Nip3 benzeri protein X † |

*B-cell lymphoma-2

†Nineteen kD interacting protein-3

tedavi öncesi lenf nodlarından Eppendorf polarografik oksijen elektrodları (KIMOC 6650; Sigma pO₂ Histogram; Eppendorf, Hamburg, Germany) ile yapılan ölçümler ile gerçekleşmiştir. Bu çalışmada uzmanlar, hipoksi sınır düzeyi olarak pO₂=2.5 mmHg belirlemişler ve olguları bu düzeyin altında ve üstünde olanlar şeklinde iki gruba ayırmıştır. Çalışma sonucunda, pO₂<2.5 mmHg olan olguların %22'sinde lokorejyonel başarısızlık geli-

şirken $pO_2 > 2.5$ mmHg olan olgularda bu oran %6 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, pO_2 düzeyinin radyoterapi yanıtı için bağımsız bir faktör olduğu saptanmıştır. Brizel ve ark. (53) radyoterapi planlanan 63 baş boyun kanseri olgusunun hem primer tümör alanı hem de lenf nodlarından polarografik ölçümler yaptıkları bir çalışmada, hipoksi sınır düzeyi olarak $pO_2 = 10$ mmHg'ı belirlemişlerdir. Bu çalışmada, 2-yıllık lokorejyonel kontrolün ($pO_2 < 10$ mmHg: %30, $pO_2 > 10$ mmHg: %73), hastalıklı ($pO_2 < 10$ mmHg: %26, $pO_2 > 10$ mmHg: %73) ve genel sağ kalımın ($pO_2 < 10$ mmHg: %35, $pO_2 > 10$ mmHg: %83) hipoksik olgularda olumsuz olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmanın sonucunda, tedavi öncesi hipoksik incelemelerin hasta seçimi için iyi bir yöntem olabileceği vurgulanmıştır. Her ne kadar, başka çalışmalarda da farklı hipoksi sınır düzeyleri belirlenmiş olsa da, ortak sonuç hipoksinin olumsuz prognostik etkisi olduğu yönündedir (54).

Bunun yanı sıra, DAHANCA'nın (Danimarka Baş Boyun Çalışma Grubunun) 2005 yılında yayınladığı randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, 320 baş boyun olgusu plazma OPN düzeylerine göre üç gruba (yüksek, orta ve düşük) ayrılmıştır (55). Bu çalışmanın sonucunda da plazma OPN düzeyinin yüksek olmasının radyoterapi başarısızlığı ile yakın ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Sonuç

Baş boyun yassı hücreli karsinomların tümör mikroçevresinde, kanser hücreleri ile enflamatuar ve nonenflamatuar hücrelerarası iletişim ve ortam değişiklikleri kanserin progresyonu, agresivitesi, lenfatik ve hematojenik metastaz yapabilme yeteneği kazanma özelliklerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Baş boyun kanserlerinde, enflamatuar yanıt disfonksiyonu, sirküle olan ve tümör infiltre eden T-lenfositlerde işlevsel bozukluklar olduğu ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra, orofarenks kanserleri dışındaki baş boyun kanserlerinde "sitotoksik CD8+ T-lenfosit/ $T_{regulator}$ " oranı düşüklüğünün kötü bir prognostik faktör olduğu saptanmıştır. Baş boyun kanserleri karakteristik olarak hipoksik bir ortama sahip oldukları için mikroçevrelerinde TİM kümellemelerine sıklıkla rastlanmaktadır. TİM'in yüksek düzeyde olması genel sağ kalımın düşük olmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, baş boyun kanserlerinde kötü bir prognostik faktör olan desmoplazinin gelişiminde KİF'ler önemli rol oynamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle baş boyun yassı hücreli karsinomların tümör mikroçevresindeki değişikliklerin aydınlatılması ve hedef tedavilerin geliştirilmesi gelecekteki tedavi seçenekleri için ümit vaat etmektedir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108. [CrossRef]
2. Argiris A, Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res* 2003; 114: 15-60. [CrossRef]
3. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 1944-56. [CrossRef]
4. McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 280-8. [CrossRef]
5. Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* 1996; 2: 682-5. [CrossRef]
6. Argiris A, Karamouzis MV, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695-709. [CrossRef]
7. Balz V, Scheckenbach K, Götte K, Bockmühl U, Petersen I, Bier H. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* 2003; 63: 1188-91.
8. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, et al. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck* 2000; 22: 234-40. [CrossRef]
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70. [CrossRef]
10. Mohla S, Witz IP. The 5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention Versailles, France, October 20-24, 2009. *Cancer Microenvironment* 2010; 3: 1-5. [CrossRef]
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74. [CrossRef]
12. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125: 5591-6. [CrossRef]
13. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21: 309-22. [CrossRef]
14. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012; 196: 395-406. [CrossRef]
15. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014; 2014: 149-85. [CrossRef]
16. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion, and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 2013; 4: 66-83. [CrossRef]
17. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol* 2014; 41: 217-34. [CrossRef]
18. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial watch: prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 2012; 1: 1323-43. [CrossRef]
19. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 298-306. [CrossRef]
20. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiko T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2553-62.

21. Chikamatsu K, Sakakura K, Whiteside TL, Furuya N. Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007; 29: 120-7. [\[CrossRef\]](#)
22. Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 426-33. [\[CrossRef\]](#)
23. Hanakawa H, Orita Y, Sato Y, Takeuchi M, Ohno K, Gion Y, et al. Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2014; 134: 859-64. [\[CrossRef\]](#)
24. Wallis SP, Stafford ND, Greenman J. Clinical relevance of immune parameters in the tumor microenvironment of head and neck cancers. *Head Neck* 2015; 37: 449-59. [\[CrossRef\]](#)
25. Watanebe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 744-52. [\[CrossRef\]](#)
26. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-6. [\[CrossRef\]](#)
27. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 2012; 7: e50946. [\[CrossRef\]](#)
28. Accomando WP, Wiencke JK, Houseman EA, Butler RA, Zheng S, Nelson HH, et al. Decreased NK cells in patients with head and neck cancer determined in archival DNA. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 6147-54. [\[CrossRef\]](#)
29. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 2010; 15: 166-79. [\[CrossRef\]](#)
30. Wheeler SE, Shi H, Lin F, Dasari S, Bednash J, Thorne S, et al. Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head Neck* 2014; 36: 385-92. [\[CrossRef\]](#)
31. Rosenthal EL, McCrory A, Talbert M, Carroll W, Magnuson JS, Peters GE. Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 943-7. [\[CrossRef\]](#)
32. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth -bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 67-73. [\[CrossRef\]](#)
33. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 509-17. [\[CrossRef\]](#)
34. Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2009; 31: 1346-53. [\[CrossRef\]](#)
35. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiation Oncol* 2004; 14: 198-206. [\[CrossRef\]](#)
36. Hoogsteen IJ, Marres HA, Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: Predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. A review. *Head Neck* 2007; 29: 591-604. [\[CrossRef\]](#)
37. Janssen HL, Haustermans KM, Balm AJ, Begg AC. Hypoxia in head and neck cancer: How much, how important? *Head Neck* 2005; 27: 622-38. [\[CrossRef\]](#)
38. Kim Y, Lin Q, Glazer PM, Yun Z. Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation. *Curr Mol Med* 2009; 9: 425-34. [\[CrossRef\]](#)
39. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: Causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004; 9 (suppl 5): 4-9. [\[CrossRef\]](#)
40. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* 2003; 67: 3-15. [\[CrossRef\]](#)
41. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 2008; 13 (suppl 3): 21-6. [\[CrossRef\]](#)
42. Price JM, Robinson SP, Koh DM. Imaging hypoxia in tumors with advanced MRI. *QJ Nucl Med Mol Imaging* 2013; 57: 257-70.
43. Marcu LG, Harriss-Phillips WM, Filip SM. Hypoxia in head and neck cancer in theory and practice: A PET-Based Imaging Approach. *Comput Math Methods Med* 2014; 2014: 624-42. [\[CrossRef\]](#)
44. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148: 399-408. [\[CrossRef\]](#)
45. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell death and differentiation* 2008; 15: 621-7. [\[CrossRef\]](#)
46. Semenza GL. HIF-1, O(2) and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 2001; 107: 1-3. [\[CrossRef\]](#)
47. Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 2002; 62: 2493-7.
48. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1648-56. [\[CrossRef\]](#)
49. Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Yu SC, Terris DJ, Lin HS, et al. Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 59-67.
50. Kaluz S, Kaluzova M, Liao SY, Lerman M, Stanbridge EJ. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795: 162-72.
51. Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, et al. Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis and microvessel density. *Cancer Res* 2001; 61: 5262-7.
52. Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996; 41: 31-9. [\[CrossRef\]](#)
53. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1999; 53: 113-7. [\[CrossRef\]](#)
54. Rudat V, Vanselow B, Wollensack P, Bettscheider C, Osman-Ahmet S, Eble MJ, et al. Repeatability and prognostic impact of the pretreatment pO(2) histography in patients with advanced head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2000; 57: 31-7. [\[CrossRef\]](#)
55. Overgaard J, Eriksen JG, Nordmark M, Alsner J, Horsman MR, Danish Head and Neck Cancer Study Group, et al. Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitizer nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 757-64. [\[CrossRef\]](#)