

Nádorové markery u dlaždicových karcinomů hlavy a krku

David Kalfeřt¹, Marie Ludvíková^{2,3}

¹Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, LF v HK, UK v Praze, FN HK

²Ústav biologie, Lékařská fakulta v Plzni, UK v Praze

³Ústav patologie, VFN v Praze

Dlaždicový karcinom hlavy a krku (HNSCC) je šestým nejčastěji se vyskytujícím nádorem na světě. Ve snaze zlepšit léčbu se současný výzkum zaměřuje zejména na hledání nových nádorových markerů a sledování jejich diagnostického, prognostického a prediktivního významu v rutinní klinické praxi. Molekulární nádorové markery rovněž dobře odrážejí patobiologické procesy v nádorech. V poslední době došlo k rozšíření poznatků o etiologii a patobiologii nádorů hlavy a krku. Velký podíl na kancerogenezi mají epigenetické mechanismy, RNA interference a microRNA, nádorové kmenové buňky a epiteliálně-mezenchymální tranzice, které zároveň představují nový zdroj molekulárních nádorových markerů a vhodný cíl biologické léčby.

Klíčová slova: molekulární nádorové markery, epigenetika, RNA interference, nádorové kmenové buňky, cílená léčba.

Tumor markers in head and neck squamous cell carcinomas

Head and neck squamous cell cancer (HNSCC) is the six most common cancer in the world. In attempts to improve therapy of this cancer, contemporary research is focused predominantly on new tumor markers and evaluation of their diagnostic, prognostic and predictive significance for routine clinical practice. Molecular tumor markers at the same time very well reflect pathobiological processes in tumors. New etiological and pathobiological aspects of cancerogenesis of HNSCC were lately introduced. Namely epigenetic mechanisms, RNA interference and microRNA, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition play important role in cancerogenesis as well as represent new source of molecular tumor markers and potential target of biological therapy.

Key words: molecular tumor markers, epigenetics, RNA interference, cancer stem cells, target therapy.

Onkologie 2012; 6(5): 241–246

Úvod

Karcinomy hlavy a krku vyrůstají z epitelu horních cest dýchacích a polykacích. Zahrnují nádory dutiny ústní a nosní, nasofaryngu, orofaryngu a hypofaryngu, laryngu, ucha, štítné žlázy a slinných žláz. Malignity uvedených oblastí představují asi 6 % všech zhoubných nádorů, přičemž incidence se liší dle geografické oblasti. Asi 90 % těchto karcinomů (vyjma nádorů štítné žlázy a slinných žláz) představuje karcinom dlaždicový neboli spinocelulární (keratinizující i nonkeratinizující) (zkratka HNSCC z angl. head and neck squamous cell carcinoma). Nejčastěji je postižen larynx a orofarynx, na karcinomy těchto lokalit bude především zaměřen další výklad.

Navzdory pokrokům v diagnostice a léčbě dlaždicového karcinomu hlavy a krku se přežití pacientů s těmito nádory změnilo v poslední době jen nevýznamně. Tumory mají velmi variabilní chování. Tradiční prognostické a prediktivní markery nepostačují zcela k určení klinického chování a léčbě. Velice slibné se v současné době zdají molekulární markery, které mohou lépe vystihnout proces patobiologie nádorů a zároveň mohou být vhodným molekulárním cílem biologické léčby. Molekulární nádorové markery mohou tedy sloužit

k účelům diagnostickým, prognostickým a prediktivním nebo pro detekci přítomnosti minimálního množství reziduálních nádorových buněk. Analýza markerů je umožněna díky novým technologiím, které se v nedávné době začaly využívat ke studiu nádorů. Nutným předpokladem pro stanovení vhodných molekulárních markerů a jejich následné využití v rutinní klinické praxi je především detailní znalost etiopatogeneze konkrétního nádorového procesu. Vzhledem k nedávno nově definovaným faktorům patobiologie nádorů počet nádorových markerů neustále roste, a proto je nutné pečlivě analyzovat jejich přínos pro klinickou praxi (1).

Etiologické a patobiologické aspekty

Etiologické faktory podílející se na vzniku orofaryngeálního a laryngeálního karcinomu jsou především reprezentovány kouřením, konzumací alkoholu a infekcí HPV. Kouření a alkohol jsou považovány za tradiční rizikové faktory, pro něž se předpokládá synergický efekt. Pouze asi 3 % zhoubných nádorů orofaryngu a laryngu se vyskytuje u nekuřáků. Uplatňuje se rovněž vliv některých dalších faktorů, jako profesionální (práce s niklem, se dřevem apod.) nebo dietní

(např. nízký příjem ovoce a zeleniny) (2–4). Kromě výše zmíněných exogenních rizikových faktorů se mohou při nádorové transformaci uplatňovat vrozené choroby a genetická predispozice.

Role HPV při vzniku HNSCC byla široce popsána a dokumentována zejména u karcinomu orofaryngeálního. Naopak o vztahu HPV a laryngeálního karcinomu je daleko méně referencí a role papilomaviru v kancerogenezi v této lokalitě je do značné míry kontroverzní. Z doposud publikovaných prací je pozitivita HPV v karcinomech laryngu asi v 25 % (5, 6).

HPV jsou, podle jejich potence vyvolávat maligní transformaci, rozděleny na „low-risk“ a „high-risk“ typy. Onkogenní potenciál „high-risk“ typů byl poprvé prokázán Haraldem zur Hausenem, který za objev obdržel v roce 2008 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (7, 8). Z HPV virů s vysokým onkogenním rizikem jsou nejvíce zastoupeny typy 16 a 18, jejichž výskyt může být různý dle anatomických lokalit.

HPV je DNA epitelotropní virus s dvouvláknovou nukleovou kyselinou, která představuje HPV genom složený ze dvou kódujících oblastí; oblast **časných proteinů (E1-E8) a oblast pozdních proteinů (L1 a L2)** (9). Za normálních okolností se vi-

rový genom udržuje v infikované buňce mimo její DNA. Časné proteiny E1 a E2 se za těchto podmínek podílejí ve slizniční epitelové hostitelské buňce na replikaci virové DNA a tvorbě nových virionů, jejichž kapsidu tvoří pozdní proteiny L1 a L2. Protein E2 zároveň plní funkci transkripčního represoru pro virové onkogeny E6 a E7.

Integrace HPV DNA do genomu hostitelské buňky je zásadní stupeň v HPV indukované kancerogenezi. Integrace narušuje expresi E1 a E2 genů, což má za následek ztrátu příslušných proteinů. Naopak dochází ke zvýšené tvorbě významných onkogenních proteinů E6 a E7. Virové onkoproteiny E6 a E7 jsou sice exprimovány ve všech typech HPV (high-risk i low-risk), avšak pouze proteiny produkované ve vysoce rizikových typech mají vysokou afinitu k cílovým tumor-supresorovým proteinům p53 a pRB, jejichž inaktivace vede k buněčnému přežívání, potlačení apoptózy a stimulaci buněčného cyklu a replikace DNA. E6 a E7 se rovněž podílejí na interakci s adhezními molekulami, což v konečném důsledku přispívá k invazi nádorových buněk do tkáně a k metastazování. Protein E6 interferuje s DNA reparačními enzymy a protein E7 indukuje strukturální a numerické chromozomální abnormality narušením syntézy centrozomů. Celkovým výsledkem je vznik genomické nestability a získání dalších genetických a epigenetických změn potřebných pro nádorovou transformaci a progresi. HPV též přispívá ke ztrátě dozoru imunitního systému nad nádorovými buňkami (5, 9–11). Pouhá přítomnost virové DNA v buňce není tak důležitá, nýbrž musí být prokázána onkogenní aktivita. Dobrým markerem této aktivity je zvýšená exprese proteinu p16, jehož přítomnost dobře koreluje s přítomností biologicky aktivního HPV v nádoru. Velice vhodná je též detekce E6 a E7 mRNA (12–14).

HPV-negativní karcinomy se vyskytují většinou u osob starších 60 let, bez predilekční lokalizace a mají častou mutaci genu TP53 a špatnou prognózu, zatímco HPV-pozitivní karcinomy mají vzrůstající incidenci, vznikají u jedinců mladších 60 let, postihují především orofarynx, mutace TP53 je vzácná a prognóza je příznivá (tabulka 1) (3, 15). Predilekční postižení orofaryngu s dominancí HPV typu 16 se vysvětluje na základě skutečnosti, že tento high-risk typ kolonizuje orofaryngeální lymfatickou tkáň a z neznámých důvodů má tropismus pro tonzilární epitel (16). V ostatních lokalitách horního aerodigestivního traktu (zejména dutině ústní a laryngu) je výskyt HPV-pozitivních nádorů méně častý a biologické vlastnosti těchto dlaždicových karcinomů nejsou zcela jednoznačné a vyžadují další intenzivní výzkum (15, 16).

Patobiologické faktory dlaždicových karcinomů hlavy a krku zahrnují vícestupňové procesy, které vedou k narušení základních regulačních mechanismů v buňce, což má za následek její nekontrolovatelné množení, přežívání a metastazování. Za hlavní podstatu nádorové transformace buňky jsou považovány genetické změny spočívající v narušení sekvence DNA. V poslední době bylo popsáno několik dalších patobiologických fenoménů, které se mohou vedle genetických změn významnou měrou též podílet na složitém procesu kancerogeneze a nádorové progresi. Mezi tyto jevy řadíme epigenetické změny, posttranskripční regulace – RNA interferenci, epiteliálně mezenchymální tranzici a existenci nádorových kmenových buněk. Všechny uvedené fenomény mohou významně přispívat k nádorové transformaci a ovlivňovat tak fenotyp nádoru, jeho chování a progresi a mohou být východiskem pro nové, personalizované směry nádorové terapie (1). Ačkoliv v nádorové diagnostice nadále zůstává zlatým standardem histologické vyšetření, další profilace nádorů z hlediska diagnostického, prognostického i prediktivního založená nejen na genetické analýze DNA, ale i na bližším stanovení výše uvedených nádorových jevů, se zdá přínosná.

Genetické mechanismy spočívají v narušení původní sekvence nukleotidů DNA. Změny označujeme jako **mutace**. Na nádor je tradičně pohlíženo jako na genetické onemocnění způsobené akumulací mutací klíčových, s rakovinou souvisejících genů (tzv. cancer-related genes). Hlavními zástupci těchto genů jsou **onkogeny** a **tumor-supresorové geny**, které se za normálních okolností podílejí prostřednictvím jimi kódovaných proteinů na regulovaném buněčném dělení (jeho iniciaci nebo supresi) a apoptóze. V důsledku mutace dochází k alteraci genových produktů a k deregulaci a k narušení signálních drah v buňce, která tímto získává růstové výhody. V poslední době byly v nádorech hlavy a krku studovány expresní profily, které odhalily zejména význam mutací genů p53, p16INK4a, bcl-2 a EGFR (17).

Epigenetické mechanismy jsou chemické, enzymaticky podmíněné změny, které posti-

hují molekulu DNA nebo chromatin, ale nemají na rozdíl od mutací bezprostřední vliv na sekvenční nukleotidů (18). Epigenetické změny však ovlivňují expresi genů, čímž mohou dosáhnout stejného účinku jako mutace v těchto genech. Postihují-li epigenetické faktory „cancer-related“ geny, pak se může výsledný efekt rovněž podílet na procesu nádorové transformace nebo na změnách fenotypu nádorů. Epigenetické modifikace vznikají dvěma mechanismy – **metylací DNA** a/ nebo chemicky podmíněnou změnou v uspořádání chromatinu (tzv. **remodelaci chromatinu**).

DNA metylace je proces, při němž se váže metylová skupina na vybrané nukleotidové báze. Tímto dějem se vytváří v normálních tkáních relativně stabilní DNA metylační vzorec, který se ustanoví během embryonálního vývoje. Cílovou molekulou pro metylaci jsou cytosinové báze v CpG dinukleotidech. V somatických buňkách jsou metylovány až 4% cytosinových bází. Metylace jsou v genomu nerovnoměrně rozloženy. Nacházíme je jak v genech a jejich promotorech, tak v intergenových oblastech. Metylace jako epigenetická informace se přenáší do dalších dceřiných buněk, může však nově vznikat i zanikat (19). Abnormality v DNA metylaci (globální hypometylace a fokální hypermetylace) přispívají ke vzniku nádorů v důsledku změněné exprese „cancer-related“ genů (aktivace genů dříve neaktivních nebo naopak umlčení genů aktivních). Metylované cytosiny navíc snadno podléhají mutacím. V nádorech hlavy a krku bylo v poslední době popsáno několik genů (p16, E-cadherin, cyclin A1 apod.), které jsou umlčeny v důsledku hypermetylace promotoru. Tyto geny se podílejí na kontrole buněčného cyklu, apoptózy, oprav DNA, buněčných adhezích a nádorové invazi (20).

Remodelace chromatinu jsou epigenetické změny spočívající v chemické modifikaci (metylací, acetylací nebo fosforylací) histonových proteinů (vzniká tzv. **histonový kód**), čímž ovlivňují kondenzaci chromatinu a následně i genovou expresi v důsledku změněné přístupnosti transkripčních enzymů k promotorům genů. Výsledný efekt (zvýšení nebo potlačení genové exprese) závisí na typu chemické změny (19).

Tabulka 1. Hlavní rozdíly mezi HPV-pozitivními a HPV-negativními orofaryngeálními karcinomy

	HPV-negativní nádory	HPV-pozitivní nádory
Incidence	Nezměněna	Vzrůstá
Věk	> 60 let	< 60 let
Rizikové faktory	Kouření a konzumace alkoholu	Sexuální chování
Prognóza	Dle stagingu	Příznivá
Histologie	Keratinizující dlaždicový	Nekeratinizující dlaždicový

Znalost epigenetického profilu nádoru se může uplatnit při jeho diagnostice, prognózování i terapii následujícím způsobem:

- epigenetické změny (metylační vzorec, histonový kód) mohou být využity jako **bio-marker maligní transformace a prognózy nádoru** (21, 22),
- epigenetické změny slouží jako cíl nádorové terapie. Princip léčby vychází ze skutečnosti, že na rozdíl od genetických změn jsou epigenetické změny potenciálně reverzibilní. Otevírá se tedy možnost reaktivace epigeneticky umlčených nádorových genů užitím hypometylačních léků nebo inhibitorů deacetylase histonů (7, 9, 18).

RNA interference (RNAi) je další jev, který je významným regulátorem genové exprese a může se tak významně podílet na procesu kancerogeneze. Za objev tohoto převratného fenoménu v molekulární biologii obdrželi v roce 2006 Craig C. Mello a Andrew Z. Fire Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (23).

Na podkladě RNA interference je možné v buňce posttranskripčně kontrolovat aktivitu genů. Základem pro interferenci jsou malé RNA molekuly (siRNA a miRNA), které se mohou komplementárně vázat k mRNA a blokovat tak tvorbu proteinů (24). Zdrojem malých, krátkých dvouřetězcových fragmentů RNA (tvořených 20–25 páry bází) je dlouhá dvouřetězcová RNA (dsRNA), která může být exogenního nebo endogenního původu. Tato dsRNA je v cytoplasmě enzymaticky štěpena do krátkých dvouřetězcových fragmentů zvaných siRNA a miRNA (dle exogenního, resp. endogenního původu), jejichž vlákna se od sebe posléze oddělí a vedoucí vlákno této RNA se pak naváže na komplementární sekvenci mRNA, kterou buď rozštěpí a degraduje (při neúplné komplementaritě), nebo zablokuje pro translaci (při úplné komplementaritě) (24, 25).

Díky objevu RNA interference získal nádorový výzkum novou platformu. Malé RNA ovlivňují množství genového produktu (proteinu) u mnoha tzv. cancer-related genů, což může spolu s dalšími změnami vyústit v nádorovou transformaci (25). MiRNA (též zvané microRNA) jsou produkovány vlastními nádorovými buňkami. Geny kódující miRNAs jsou obvykle lokalizovány v oblastech buněčného genomu, které jsou často v nádorových buňkách ztraceny nebo amplifikovány (26). V lidském genomu bylo dosud experimentálně identifikováno více než 700 miRNAs a jejich počet průběžně narůstá (27, 28). Malé nekódující RNA plní úlohu v normálních buněčných a vývojových procesech.

Jejich aberantní exprese vede k různým onemocněním včetně vzniku nádorů. Příčinou porušené exprese mohou být chromozomální abnormality či mutace genů pro miRNA nebo epigenetické změny postihující zmíněné geny, zejména hypermetylace promotorů. Bylo prokázáno, že v nádorech je globální pokles miRNA exprese. Pokles miRNA může přispívat k produkci a udržování nádorových buněk, včetně méně diferencovaných nádorových kmenových buněk (cancer stem cells; CSC) (29). Studium miRNA v různých typech nádorů a nádorových buněčných linií ukázalo velkou variabilitu v dysregulaci miRNA. Nicméně se zdá pravděpodobné, že určité typy nádorů mají charakteristický profil miRNA. Některé miRNA jsou specifické pro konkrétní tumor, jiné se vyskytují ve více nádorových typech (26).

V tumorigenezi mohou **miRNA** vykazovat **funkci tumor supresorovou** nebo **onkogenní** (27). MiRNAs fungují jako tumor supresorové v případě, kdy dojde k jejich redukcí nebo chybění, ať již v důsledku genového defektu nebo jejich porušené biogeneze. Důsledkem změn je zvýšená produkce onkoproteinu, jehož mRNA je cílová pro příslušnou miRNA. Naopak miRNA plní funkci onkogenní, pokud je produkována v nadbytku a utlumí tvorbu proteinu, který je kódován příslušným tumor supresorovým genem (tabulka 2).

V posledních letech jsou malé RNA v mnoha nádorech včetně nádorů hlavy a krku intenzivně studovány jakožto potenciální prognostické a prediktivní nádorové markery (28, 30, 31). Cílená léčba nádorů spočívající na principu RNAi by mohla být založena na následujících mechanismech (27, 32):

- inaktivace onkogenní miRNAs v tumorech prostřednictvím syntetických anti-sense oligonukleotidů (anti-miRNA oligonukleotidy = AMOs),
- potlačení tvorby onkoproteinů aplikací příslušné siRNA do nádoru za účelem inhibice/degradace mRNA dotyčného onkoproteinu.

Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells – CSC) jsou jedním z nově popsáných patobiologických fenoménů v nádorech. Teorie CSC byla navržena v roce 1977 Hamburgerem a Salmonem (33) a spočívá ve vysvětlení původu nádorových kmenových buněk a v objasnění nádorové biologie, mnoha morfologických, klinic-

kých i terapeutických charakteristik zhoubných nádorů a přispívá k hledání nových léčebných strategií (33–35). Nádorové kmenové buňky představují asi 1 % všech nádorových buněk a vznikají transformací z normálních kmenových buněk (36), které se podílejí na embryonálním vývoji a na regeneračních procesech. Přítomnost CSC byla původně odhalena v hematologických malignitách a posléze i v řadě solidních nádorů, včetně nádorů hlavy a krku (37–39).

Kmenové buňky (normální i nádorové) jsou buňky charakterizované jednak schopností „nekoněčné“ sebeobnovy, jednak schopností diferenciace. Pro kmenové buňky je typické asymetrické dělení, jehož výsledkem je vznik populací buněk kmenových, progenitorových a diferencovaných. Velký význam v procesu sebeobnovy a udržování kmenových buněk též hraje telomerázová aktivita a detoxikační schopnost kmenových buněk daná expresí ABC transportérů, produkce antiapoptotických proteinů, sekrece cytokinů a angiogenních faktorů zásadních pro šíření nádoru a zvýšená schopnost provádět opravy DNA (40). Proces sebeobnovy kmenových buněk normálních a nádorových je řízen shodnými molekulárními mechanismy, které zahrnují různé signální cesty (Hedgehog, Notch, Wnt, PTEN aj.) více náchylné k akumulaci mutací. Deregulací signálů může dojít k expanzi kmenových buněk, což je klíčovou událostí kancerogeneze (41).

Teorie existence nádorových kmenových buněk poskytuje vhodnou základnu pro objasnění morfologické a funkční heterogenity nádorů (42). Nádorová heterogenita je důsledkem asymetrického dělení CSC, čímž vzniká jednak nová populace nádorových kmenových buněk (jsou zodpovědné za tumorigenezu), jednak populace často aberantně diferencovaných nádorových buněk s žádnou nebo s omezenou schopností buněčného dělení (43). Dlaždicové karcinomy hlavy a krku jsou solidní nádory složené z heterogenní buněčné populace (39).

Přítomnost CSC v nádoru má vliv na jeho diseminaci i na úspěšnost jeho terapie (44). Protože CSC jsou relativně rezistentní k běžné cytostatické léčbě, současná nádorová terapie vede pouze ke zmenšení nádoru a navození remise, ale není kurativní. Příčinou neúspěchu klasické chemoterapie je fakt, že CSC jsou čas-

Tabulka 2. Charakteristiky miRNA dle jejich funkce v tumorigenezi

	Funkce miRNA	
	Onkogenní	Tumor supresorová
Expresce miRNA	zvýšená	snížená
Typ regulovaného genu	tumor supresorový gen	onkogen
Expresce regulovaného genu	snížená	zvýšená

to v klidovém stavu a že mají mechanismy pro eliminaci toxinů, a proto po léčbě perzistují. Rezistence nádorů k radioterapii je zase vysvětlována aktivací DNA reparačních mechanismů. Důsledkem přetrvávající přítomnosti CSC je recidiva nádoru (45). Pouze terapie zacílená na CSC zabraňuje recidivě a je příslibem pro kompletní odstranění nádoru. Proto se další výzkum zaměřuje na hledání biomarkerů a signálních cest typických pouze pro CSC. Většina dosud popsaných markerů exprimovaných kmenovými buňkami (např. CD 133) neumožňuje odlišení kmenových buněk nádorových a nenádorových. Rovněž neexistuje univerzální marker CSC, dosud známé markery jsou nádorově specifické a závisí na výchozí tkáni i prostředí (tzv. niche), z něhož nádor vyrůstá (46, 47). V nádorech hlavy a krku byly dosud popsány molekulární markery nádorových kmenových buněk jako CD34, CD 44 a v poslední době též aldehyd dehydrogenáza 1 (ALDH1), která byla navržena v těchto nádorech jako indikátor vysoké sebeobnovovací kapacity a chemo- a radiorezistence (48–50).

Epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT)

byla poprvé pozorována v roce 1980 a charakterizována jako dynamický proces transformace epitelových buněk do mezenchymových prostřednictvím speciálního transkripčního programu (51). Později byl popsán i reverzní proces zvaný mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET) (52). EMT v nádorech je klíčovým procesem při invazi a metastazování, kdy se projeví základní vlastnosti transformovaných buněk mezenchymálního fenotypu, jako schopnost oddělovat se od okolních buněk, migrovat do hostitelské tkáně a penetrovat do cév. Ačkoliv molekulární základ EMT není zcela vysvětlen, bylo již odhaleno několik signálních molekul a korespondujících signálních cest (Wnt, TGF- β , Hedgehog, Notch a nukleární faktor- κ B (NF- κ B), které se zdají být zásadní v indukci EMT. Všechny tyto cesty konvergují a způsobují prostřednictvím represivních transkripčních proteinů (Snail, Slug, Twist, apod.) snížení produkce E-cadherinu. V průběhu EMT dochází k důležitým změnám ve fenotypu buněk. Spoje mezi buňkami a extracelulární matrix vymizí a transformované buňky nabývají protáhlého tvaru. Významně též vzrůstá buněčná motilita. Buňky mezenchymálního vzhledu rovněž přispívají k syntéze komponent ECM a k produkci matrixových metaloproteináz a jsou též bohatým zdrojem signálních proteinů, které působí na epitelální buňky jako růstové faktory. Ztráta cadherinové exprese a schopnost buněk přežít v nepřítomnosti komponent extracelulární matrix (podpora antiapoptotické aktivity)

jsou též důležitým znakem EMT (53). Molekuly, které se podílejí v procesu EMT, reprezentují potenciální cíl pro působení farmak, čímž se otevírají nové cesty pro terapeutickou intervenci metastatických nádorů (53). Důležitý je rovněž objev, že v procesu EMT jsou produkovány buňky s vlastnostmi kmenových buněk (47). V nádorovém procesu tak EMT generováním nádorových kmenových buněk umožňuje nejen diseminaci buněk z primárního tumoru, ale rovněž zachování schopnosti sebeobnovy pro vznik metastáz (54).

Nádorové markery

Proces onkogeneze je spjat se změnami genotypu a/nebo fenotypu buněk a s kvantitativními i kvalitativními odchylkami v expresi některých molekul. Každá měřitelná jednotka použitelná k hodnocení abnormální biologie nádorových buněk a tkání, jejich typu a klinického chování se nazývá nádorový marker. Nádorové markery vždy odrážejí patobiologii určitého nádoru, a proto k jejich dokonalému poznání a k jejich využití v klinické praxi je nutné odhalit všechny procesy, které vedou k nádorové transformaci a k progresi nádorů.

Tradiční klinické markery hodnocení nádorů jsou založeny na prognostických ukazatelích klinických (věk, pohlaví) a patomorfologických (velikost a grading tumoru, šíření do okolí, metastázy). V současné době používaná TNM klasifikace zhoubných nádorů hlavy a krku nepostačuje zcela k tradičnímu stážování, k prognózování a k predikci těchto nádorů. Podle uvedené klasifikace se nádory hlavy a krku hodnotí na základě rozsahu primárního tumoru (cT), postižení lymfatických uzlin (cN) a přítomnosti vzdálených metastáz (cM). V průběhu rutinního využívání TNM klasifikace se objevily některé výhrady k současnému systému, které by měly být zohledněny při jeho další revizi. Mělo by se přihlídnout k etiologii nádoru (např. u orofaryngeálních karcinomů), neboť je známo, že HPV-pozitivní nádory vykazují některé molekulární zvláštnosti a mají signifikantně lepší prognózu (55). Dále je kritizována skutečnost, že (s výjimkou nádorů štítné žlázy) není v TNM klasifikaci nádorů hlavy a krku zohledněn histologický typ nádoru. Navrhovaná zlepšení by měla přispět k lepšímu výběru vhodné terapie a spolehlivějšímu prognózování nádorů hlavy a krku (56). Tradiční klinické markery nejsou vždy zcela spolehlivé (např. lymfatické uzliny s okultními metastázami jsou klinicky negativní), a proto bylo v poslední době pátráno po nových nádorových markerech detekovatelných většinou imunologickými nebo molekulárně biologickými metodami (57).

Molekulární markery se těší v současné době nebývalému zájmu, neboť mohou lépe vystihnout proces vzniku a progresu nádorů, biologické vlastnosti nádoru i jeho hostitelského prostředí. Dobrá znalost těchto biomarkerů a jim odpovídajících narušených signálních drah je nezbytná pro časný screening a diagnózu nádorů, pro prognózování a predikci a pro identifikování cílů pro personalizovanou terapii v rutinní klinické praxi (58).

Nejčastějšími molekulárními nádorovými markery jsou proteiny, které jsou kvalitativně nebo kvantitativně odlišné od proteinů produkováných nenádorovými buňkami. Vzhledem k novým poznatkům v oblasti patobiologie nádorů se současně rozšiřuje i spektrum molekulárních nádorových markerů. Vhodnými nádorovými ukazateli se tak stávají nádorové microRNA, metylační status, CSC, EMT, markery nádorového prostředí a vzájemného vztahu nádorového parenchymu a stromatu, jako jsou angiogeneze, adhezivní molekuly, stromální proteázy atd.

Nádorové markery jsou látky produkovány buď přímo maligními buňkami, nebo nenádorovými tkáněmi jako odpověď na nádorové bujení. Dle místa jejich tvorby nebo místa detekce jsou klasifikovány následovně:

- **Nádorově specifické markery** jsou produkovány pouze buňkami nádoru, zatímco s nádory asociované markery jsou vytvářeny nejen nádorovými buňkami, ale v odlišném množství i normálními, nenádorovými buňkami.
- **Tkáňové nádorové markery** jsou lokalizovány a prokazovány ve tkáni nádoru, humorální nádorové markery jsou uvolňovány nádorovými buňkami do krve a jiných biologických tekutin, kde je možné je detekovat. Nejpoužívanější metodou pro analýzu proteinových markerů ve tkáních je imunohistochemie a imunocytochemie, při nichž značenými specifickými protilátkami je detekována přítomnost, lokalizace nebo množství specifických proteinových ukazatelů během histopatologického vyšetření přímo v nádoru. Humorální nádorové markery v tělesných tekutinách slouží především k monitorování průběhu nádorového onemocnění a k jejich průkazu se využívají většinou imunanalytické metody (59).

Nádorové markery se na základě úlohy v onkologii a v onkopatologii rozdělují do následujících tříd:

- **Diagnostické nádorové markery** (slouží k primární diferenciální diagnostice nádoru nebo k diagnostice metastáz)
- **Prognostické nádorové markery** (slouží ke stanovení prognózy choroby)

■ **Prediktivní nádorové markery** (slouží k odhadu odpovědi nádoru na specifické způsobu terapie, tzv. cílená léčba) (60)

Diagnostické nádorové markery hrají stěžejní roli zejména v rutinní diagnostické patologii. Úloha markerů prognostických a prediktivních v poslední době vzrůstá zejména vzhledem k souvislosti se zaváděním nových vysoce selektivních terapeutických metod. Navzdory velkým pokrokům v diagnostice a léčbě dlaždicového karcinomu hlavy a krku se v posledních třech desetiletích incidence a mortalita změnila jen minimálně. Tumory mají velmi variabilní chování. Studium nádorových markerů je tedy velkou výzvou zejména u nádorů orofaryngu a laryngu s cílem zlepšit úspěšnost jejich léčby. V tabulce je uveden přehled vybraných biomarkerů HNSCC odvozených ze základních atributů maligních nádorů (tabulka 3) a z dalších patobiologických mechanismů kancerogeneze (61, 62):

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je především **prediktivním markerem**. EGFR je exprimován ve více než 90 % HNSCC. Amplifikace onkogenu EGFR (Her2/neu) a zvýšená exprese růstového faktoru vede k nadměrné aktivaci signální dráhy, která vyústí v neregulovanou proliferaci nádorových buněk dlaždicového karcinomu hlavy a krku. V některých studiích bylo prokázáno, že EGFR je negativním prognostickým faktorem, prediktorem recidivy a zároveň cílovou doménou biologické léčby cetuximabem (15, 62). Expres EGFR je snížena u HPV+/p16+ orofaryngeálních karcinomů, což přispívá k vysvětlení jejich lepší prognózy (63).

Protein p16 slouží jako pozitivní **prognostický a prediktivní marker** u orofaryngeálních karcinomů. Jeho význam u laryngeálních karcinomů nebyl dosud spolehlivě zhodnocen. P16 je produkt tumor-supresorového genu lokalizovaného na chromozomu 9, který se podílí na inhibici buněčného cyklu (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 4A). Je exprimován u HPV-pozitivních karcinomů, přičemž rozsáhlé studie byly prováděny zejména na karcinomech orofaryngeálních (55). Produkce p16 je za normálních okolností potlačována pRB prostřednictvím represe transkripce. U HPV-pozitivních nádorů dochází k degradaci pRB, což má za následek zvýšenou expresi p16 v jádře i v cytoplasmě. P16 je velmi senzitivní a specifický marker HPV infekce v nádorech hlavy a krku a zároveň je to pozitivní prognostikátor (rovněž u skupiny p16 pozitivních a HPV-negativních nádorů, jejichž frekvence dosahuje až 20 %) (55, 64). p16 pozitivní dlaždicové karcinomy mají vzrůstající incidenci, vyskytují se v mladším věku a mají nižší frekvenci výskytu

mutace p53 (64). Ačkoliv z klinického hlediska bývají HPV-pozitivní tumory sdruženy s pokročilejším stadiem zejména díky postižení uzlin, jejich prognóza je překvapivě příznivější než prognóza nádorů HPV-negativních (65).

Protein p53 je kódován tumor-supresorovým genem a plní funkci **negativního prognostického markeru** a zároveň **prediktora** horší odpovědi nádoru na chemoterapii a radiační terapii. Normální protein p53 je kódován genem P53 a je považován za „strážce genomu“, neboť při poškození DNA zastaví buněčný cyklus, iniciuje apoptózu a potlačuje expresi survivinu. Survivin je inhibitor apoptózy, který se váže ke klíčovým enzymům procesu apoptózy kaspáze-3 a kaspáze-7 a inhibuje je. Ztráta funkce p53 v důsledku mutace příslušného genu má za následek buněčné přežívání, genetickou nestabilitu a zvýšenou expresi **survivinu**, který tak slouží jako **marker horší prognózy** nádorů. Gen P53 je mutován v 50 % malignit včetně HNSCC, kde reflektuje etiologii. HPV+ nádory mají často nemutovaný (wild type) p53, zatímco u HPV- nádorů je častá mutace p53, což koresponduje s jejich horší prognózou (62, 66).

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) byl ve většině studií HNSCC prokázán jako **negativní prognostický nádorový marker** (67, 68). Tento protein se podílí na zvýšené angiogeneze, stimulaci proliferace endoteliálních buněk a zvýšení cévní permeability. V dalších studiích však nebyla prokázána žádná statisticky významná korelace mezi expresí VEGF a progresí orofaryngeálních karcinomů (69, 70). Využití VEGF jako prognostického nádorového markeru je v klinické praxi prozatím sporné.

E-cadherin je **prognostický nádorový marker**, jehož nízká nebo chybějící exprese je ukazatelem zvýšené motility, invazivity a metastatické potence nádorových buněk. Cadheriny jsou adhezní molekuly, které kontrolují buněčné interakce a EMT. Expres E-cadherinu může být alterována mutací nebo promotorovou hypermetylací (62). E-cadherin jako nádorový marker byl analyzován ve vztahu ke klinickopatologickým parametrům nádorů orofaryngu v několika studiích (71, 72), přičemž pouze v jedné z nich

nebyla prokázána korelace mezi nízkou hladinou E-cadherinu a uzlinovými metastázami (73).

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou extracelulární proteázy, které narušují okolí nádorových buněk a umožňují jejich metastázování. Slouží tedy jako **prognostický marker**. Vzhledem k existenci širšího spektra matrixových metaloproteináz, liší se od sebe jednotlivé studie typy analyzovaných enzymů. V dlaždicových karcinomech hlavy a krku byly studovány především MMP-2, MMP-3 a MMP-9, jejichž zvýšené hladiny korelovaly s progresí nádoru. Bylo rovněž zjištěno, že tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP), zejména TIMP-2, jsou negativním prognostickým nádorovým markerem díky své duální funkci, která spočívá jednak v inhibici angiogeneze a metastázování, jednak v aktivaci MMP-2 a nezávislé regulaci buněčného růstu (62).

MikroRNA (miR) jsou **nádorové markery**, na které je recentně zaměřena velká pozornost v HNSCC. Tyto markery mohou plnit **funkci diagnostickou** (miRNA 205), **prognostickou** a **potenciálně i prediktivní**.

MiR-21 je zvýšeně exprimována v laryngálním karcinomu a je ukazatelem horší prognózy. Plní onkogenní funkci, avšak její biologická role nebyla dosud spolehlivě vysvětlena a cílová mRNA nebyla přesně stanovena. MiR-21 ovlivňuje buněčný cyklus, stimuluje proliferaci a invazivitu a inaktivuje apoptózu a dosud nevysvětleným mechanismem modifikuje expresi Ras proteinu (31, 74).

Let-7a vykazovala většinou v laryngeálním karcinomu sníženou expresi a tumor supresorovou funkci a způsobovala overexpresi RAS a c-MYC a radiorezistenci (75). Expres Let-7a však u některých pacientů s laryngálním ca nebyla změněna nebo vykazovala dokonce zvýšení oproti normální tkáni, takže se u těchto nádorů nepředpokládá jednoznačná účast na patogenezi (obdobné nálezy též u tumor supresorové **miR-16**). Důvody nejsou známy, ale předpokládá se, že cílové mRNA těchto miR mohou být různé v různých dlaždicových karcinomech, a proto někdy nedochází k účasti miR na iniciaci a progresi HNSCC. Je tedy třeba další studium této malé nekódující RNA (31, 76).

Tabulka 3. Základní znaky maligních nádorů a jejich biomarkery v HNSCC (61)

Znak maligního nádoru	Biomarkery znaku maligního nádoru, např.:
Abnormální stimulace buněčného růstu	EGFR, cyklin D1, RAS, PI3K/ NF-kappaB, STAT3)
Abnormální inhibice buněčného růstu	p16, p53, p21
Suprese apoptózy	Bcl-2, bax, survivin
Nádorová angiogeneze	VEGF, COX-2
Invazivita a metastázování	E-cadherin, MMPs
Imortalizace	hTERT

MiR-205 je zvýšeně exprimována v maligních i normálních dlaždicových epitelích. Mohla by tedy být považována za specifický marker nádorových i nenádorových dlaždicových epitelů, protože není exprimována v jiných typech epitelů. Její funkce nebyla dosud objasněna (31).

Hodnocení **epigenetických změn** (metylačního statusu a histonového kódu) a **výskytu CSC** se v daném tumoru může uplatnit jako prognostický a prediktivní nádorový marker. K hodnocení CSC je nutné dobře znát markery nádorových kmenových buněk typické pro konkrétní nádor (47).

Závěr

Nádorové markery jsou významným pomocníkem při diagnostice a výběru vhodné léčby nádorů. V případě nádorů HNSCC se do budoucna očekává podstatný přínos nádorových markerů ke zlepšení přežívání pacientů s těmito nádory. Specifický marker, který by mohl být považován za zlatý standard pro prognózování a predikci HNSCC, není znám (pokud vůbec existuje). Významným rutinně používaným nádorovým markerem v této oblasti je pouze HPV status (prokazovaný imunohistochemickým barvením proteinu p16 nebo prostřednictvím PCR virové nukleové kyseliny). Proto pro stanovení prognózy a správné cílené terapie nádorů je nutné používat celý panel markerů. Současné poznatky v oblasti nádorových markerů HNSCC tvoří pouze část mozaiky a jsou nutné další studie k jejímu smysluplnému rozšíření. Navíc je třeba se ve výzkumu markerů konkrétněji zaměřit na jednotlivé lokality, např. na nádory laryngu, neboť se ukázalo, že patobiologické mechanismy jednotlivých karcinomů oblasti hlavy a krku jsou rozdílné, což vyžaduje odlišné klinické přístupy.

Práce byla částečně podpořena grantovým projektem GAUK č. 444311.

Literatura

1. Ludvíková M, Pešta M, Holubec L, Jr., Kalfeřt D. Nové aspekty patobiologie nádorů. Čes-slov Patol 2009; 4(4): 94–99.
2. Ernoux-Neufcoeur P, Arafat M, Decaestecker C, Duray A, Rimmelin M, Leroy X, et al. Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2011; 137(1): 173–181.
3. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer 2011; 11(1): 9–22.
4. Peltonen JK, Helppi HM, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T, Vahakangas KH. p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. Head Neck Oncol 2010; 2: 36.
5. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M, Jr., Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. Head Neck 2011; 33(4): 581–586.
6. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human Papillomavirus in Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancers: A Systematic Literature Review. Head Neck Pathol 2012; 6(Suppl. 1): 104–120.

7. zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. J Cancer Res Clin Oncol 1996; 122(1): 3–13.
8. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002; 2(5): 342–350.
9. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. Mol Cancer 2005; 4: 38.
10. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. Public Health Genomics 2009; 12(5–6): 268–280.
11. McCance DJ. Human papillomaviruses and cell signaling. Sci STKE 2005; 2005(288): 29.
12. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nat Clin Pract Oncol. 2008; 5(1): 24–31.
13. Laco J, Slaninka I, Jirasek M, Celakovsky P, Vosmikova H, Ryska A. High-risk human papillomavirus infection and p16IN-K4a protein expression in laryngeal lesions. Pathol Res Pract 2008; 204(8): 545–552.
14. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. Laryngoscope 2009; 119(8): 1531–1537.
15. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. J Clin Oncol 2006; 24(25): 4170–4176.
16. Allen CT, Lewis JS, Jr., El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. Laryngoscope 2010; 120(9): 1756–1772.
17. Friedmann DR, Lalwani AK. Genetic basis of conditions commonly seen in ORL practice. Adv Otorhinolaryngol 2011; 70: 1–9.
18. Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. Apms 2007; 115(10): 1039–1059.
19. Shelton BP, Misso NL, Shaw OM, Arthaningtyas E, Bhoola KD. Epigenetic regulation of human epithelial cell cancers. Curr Opin Mol Ther 2008; 10(6): 568–578.
20. Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. Oral Oncol 2009; 45(4–5): 440–446.
21. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol 2002; 196(1): 1–7.
22. Schmezer P, Plass C. Epigenetic aspects in carcinomas of the head and neck. Hno 2008; 56(6): 594–602.
23. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 1998; 391(6669): 806–811.
24. Kontrová K, Škop V, Sajdok J, Zídková J. RNA interference a praktické aspekty jejího využití. Chemické Listy 2009; 103(4): 302–309.
25. Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, Chesterman CN, Dass CR, Cairns MJ, et al. Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies. Am J Pathol 2007; 171(4): 1079–1088.
26. Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J. MicroRNA and cancer: Current status and perspective. Int J Cancer. 2007; 120(5): 953–960.
27. Hagan JP, Croce CM. MicroRNAs in carcinogenesis. Cytogenet Genome Res 2007; 118(2–4): 252–259.
28. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2009; 15(8): 2850–2855.
29. Papagiannakopoulos T, Kosik KS. MicroRNAs: regulators of oncogenesis and stemness. BMC Med 2008; 6: 15.
30. Chen LH, Tsai KL, Chen YW, Yu CC, Chang KW, Chiou SH, et al. MicroRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. J Oncol 2010; 135632.
31. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, et al. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-

- 205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. Oncol Rep 2010; 23(6): 1625–1633.
32. Ghosal A, Kabir AH, Mandal A. RNA interference and its therapeutic potential. Central European Journal of Medicine 2011; 6(2): 137–147.
33. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 1977; 197(4302): 461–463.
34. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. J Appl Genet 2008; 49(2): 193–199.
35. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. Cancer Res 2006; 66(4): 1883–1890; discussion 95–96.
36. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007; 23: 675–699.
37. Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. Trends Cell Biol 2005; 15(9): 494–501.
38. McDonald SA, Graham TA, Schier S, Wright NA, Alison MR. Stem cells and solid cancers. Virchows Arch 2009; 455(1): 1–13.
39. Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, Garg A, Pathak KA, Nutting CM, et al. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. Oral Oncol 2011; 47(4): 237–243.
40. Martinez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. Somatic stem cells and the origin of cancer. Clin Transl Oncol 2006; 8(9): 647–663.
41. Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. J Cell Mol Med 2008; 12(2): 374–390.
42. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. Blood 2008; 112(13): 4793–4807.
43. Bapat SA. Evolution of cancer stem cells. Semin Cancer Biol 2007; 17(3): 204–213.
44. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. Cell Res 2007; 17(1): 3–14.
45. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. N Engl J Med 2006; 355(12): 1253–1261.
46. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. J Pathol 2008; 214(1): 3–9.
47. Albers AE, Chen C, Koberle B, Qian X, Klussmann JP, Wollenberg B, et al. Stem cells in squamous head and neck cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2012; 81(3): 224–240.
48. Pries R, Witkop N, Trenkle T, Nitsch SM, Wollenberg B. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer. In Vivo 2008; 22(1): 89–92.
49. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. Biochem Biophys Res Commun 2009; 385(3): 307–313.
50. Monroe MM, Anderson EC, Clayburgh DR, Wong MH. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. J Oncol 2011; 2011: 762–780.
51. Wu Y, Zhou BP. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008; 40(7): 643–650.
52. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol 2007; 213(2): 374–383.
53. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology 2007; 39(3): 305–318.
54. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 2008; 133(4): 704–715.
55. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. Ann Oncol 2010; 21(10): 1961–1966.
56. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Piccirillo JF, Haigentz M, Jr., Suarez C, et al. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. Head Neck 2010; 32(12): 1693–1711.

57. Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJ, Slijper M. Protein biomarker discovery for head and neck cancer. *J Proteomics* 2010; 73(10): 1790–1803.
58. El-Naggar AK. Pathobiology of head and neck squamous tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(7): 606–612.
59. Lee KD, Lee HS, Jeon CH. Body fluid biomarkers for early detection of head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2011; 31(4): 1161–1167.
60. Demiroz C, Eisbruch A. Individualizing therapy for oropharyngeal cancer patients. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9(9): 1181–1184.
61. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70.
62. Grimminger CM, Danenberg PV. Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011; 268(1): 5–16.
63. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(8): 1731–1738.
64. Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(8): 1088–1096.
65. Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Elashoff DA, Dubinett SM, Abemayor E, et al. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope* 2010; 120(9): 1788–1794.
66. Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GB, Shrivastava BR, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* 2009; 31(8): 1039–1048.
67. Sappayatosok K, Maneerat Y, Swasdison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14(7): E319–324.
68. Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2004; 14(3): 389–395.
69. Brocic M, Kozomara R, Cerovic S, Jovic N, Vukelic-Markovic S, Stosic S. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in patients with carcinoma of the mouth floor and tongue. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(6): 440–448.
70. Fei J, Hong A, Dobbins TA, Jones D, Lee CS, Loo C, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinomas of the tonsil in relation to human papillomavirus status and epidermal growth factor receptor. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(10): 2908–2917.
71. Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42(2): 190–200.
72. Kaur G, Carnelio S, Rao N, Rao L. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res* 2009; 20(1): 71–76.
73. Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis* 2007; 13(4): 386–392.
74. Ren J, Zhu D, Liu M, Sun Y, Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2010; 46(18): 3409–3416.
75. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res* 2007; 67(23): 11111–11116.
76. Long XB, Sun GB, Hu S, Liang GT, Wang N, Zhang XH, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep* 2009; 22(5): 1189–1195.

Článek přijat redakcí: 19. 9. 2012

Článek přijat k publikaci: 8. 10. 2012

MUDr. David Kalfeřt

Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové
david.k100@seznam.cz
