

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie

Studijní obor: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Jan Kastner

Studium časně kancerogeneze u spinoceluárního karcinomu hlavy a krku

Early cancerogenesis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce / Školitel: Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Jan Plzák, PhD.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29.8.2019

Jan Kastner

Podpis:

Identifikační záznam

KASTNER, Jan. *Studium časně kancerogeneze u spinocelárního karcinomu hlavy a krku.*

[Early cancerogenesis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma]. Praha, 2019

Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. Lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN v Motole, katedra IPVZ. Školitel Jan Betka.

Poděkování

Velice rád bych poděkoval za pomoc a optimální vedení v profesním životě svému školiteli prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc., který mě podporoval z pozice přednosta nejenom po dobu strávenou na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole, ale i poté, co jsem z klinického pracoviště v roce 2012 odešel.

Dále bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., který mi poskytl cenné rady na začátku mého postgraduálního studia a možnost spolupráce s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN.

Velmi rád bych poděkoval prof. Dr. phil. nat. et med. habil. Jürgenu Briegerovi z Laboratoře molekulární biologie nádorů při Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Guttenbergovy univerzity v Mohuči za pomoc při vstupu do světa molekulární biologie i odborné vedení, pomoc při sběru a zpracování dat a rovněž za podporu, kterou mi věnoval po celou dobu mého pobytu na zahraniční stáži.

Neméně velké díky náleží prof. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D. z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole za odbornou i lidskou pomoc po celou dobu mého postgraduálního studia a podporu v realizaci dokončení studia i po odchodu z klinického pracoviště.

Rád bych také poděkoval svým přátelům doc. MUDr. Janu Boučkovi, Ph.D. z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole a Mgr. Ondřeji Hovorkovi, Ph.D., bývalému vědeckému pracovníkovi Mikrobiologického Ústav AV ČR, za cenné rady a možnost konzultace při přípravě disertační práce.

A neméně rád bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Živnému, DrSc. za pečlivý dozor i trpělivost, kterou se mnou měl po celou dobu postgraduálního studia.

Souhrn

Spinocelulární karcinom hlavy a krku (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) je nejčastějším zhoubným nádorem ORL oblasti. Prognostické a prediktivní informace, získané na podkladě molekulárně genetického rozboru procesu kancerogeneze u HNSCC, jsou nezbytné pro zhodnocení a individualizaci léčby i výběr optimální léčebné modality. A v případě chirurgického výkonu i optimální resekce tumoru s cílem dosáhnout co nejlepší kvality života a nejdelšího přežití.

Studium časně kancerogeneze (nebo též karcinogeneze) je založeno na poznání, že histologicky normální tkáň v okolí nádoru vykazuje na molekulární úrovni preneoplastické změny. Molekulárně genetické změny v histologicky normální tkáni přilehlé k nádoru tak mohou hrát zásadní roli při ozřejmění procesu kancerogeneze.

Disertační práce shrnuje současné poznatky o časně kancerogenezi u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku a uvádí molekulárně biologické trendy, které mohou přispět k detailnějšímu poznání časně fáze kancerogeneze u tohoto typu karcinomu a tím i zlepšit detekci, výhledově pak i léčbu tohoto zhoubného onemocnění.

Nosným tématem práce je detekce mikrosatelitních lézí pomocí fragmentační analýzy ve tkáni nádorové, ve tkáních nenádorových v blízkosti nádoru a ve tkáni dostatečně vzdálené od nádoru. Výsledky práce přispívají k potvrzení teorie plošné kancerizace i na molekulární úrovni a v rámci vědeckého týmu zaměřeného na studium HNSCC na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK jsou podkladem pro řadu dalších následných projektů, které jsou zmíněny v diskuzi.

Klíčová slova: spinocelulární karcinom hlavy a krku, molekulární biologie, časná kancerogeneze, fragmentační analýza, mikrosatelit, 3q26, plošná kancerizace

Summary

Squamous cell carcinoma is the most frequent malignant tumour of head and neck.

Prognostic and predictive information as an individual imprint of molecular-genetic analysis of HNSCC will help to determine the best individual treatment. And in case of surgical approach the optimal resection with adequate quality of life and long-term survival.

Study of early cancerogenesis in our project is based on knowledge, that histological normal mucosa next to tumor shows preneoplastic molecular alterations. Molecular genetic changes in a histological normal mucosa harbouring a tumor may play a principal role in revealing of early cancerogenesis process.

Molecular-genetic analysis of cancerogenesis in HNSCC reveals prognostic and predictive factors, which are necessary for evaluation and decision for the best individual treatment. This is the concept of tailored medicine

The text summarizes current knowledge of early cancerogenesis in HNSCC and presents molecular-biological trends, which are necessary to discover details of early cancerogenesis and thus to get a tool for better detection as well as treatment of malignant disease.

The study is based on fragment analysis of microsatellites lesions in tumor tissue in comparison to adjacent mucosa and the healthy mucosa. Results show significant molecular-biological differences in all three types of tissue and confirms the theory of field cancerization at molecular level, thus contributing to a molecular biology reasearch of HNSCC at the ENT dept. of the 1st Faculty of Medicine of the Charles University.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma, molecular biology, early cancerogenesis, fragment analysis, microsatellite, 3q26, field cancerization

OBSAH

1. ÚVOD	12
- Od histopatologie k imunitním dějům a molekulární biologii	14
- Proces kancerogeneze, onkogeny a tumor-supresor geny	20
- Od klasické onkologie a onkochirurgie k terapii „šité na míru“	23
- Ztráta heterozygosity	27
- Fragmentační analýza, amplifikace genetického materiálu	28
- CGH a FISH	29
- Genová exprese, využití Biočipu a real-time PCR	30
- Od vyšetření solidní tkáně k “tekuté biopsii“, od DNA k cirkulující mRNA ...	32
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	35
3. MATERIÁL A METODIKA	37
4. VÝSLEDKY	41
- Fragmentační analýza vzorků z tumoru a normální tkáně	41
- Korelace fragmentační analýzy a CGH	42
5. DISKUSE	49
- Cirkulující nukleové kyseliny	52
- Úvaha o medicínsko–ekonomických vztazích	53
- Experimentální chirurgie ?	56
6. ZÁVĚR	57
7. BIBLIOGRAFICKÉ CITACE	59
8. PUBLIKACE	65
9. PŘÍLOHA (impaktované vědecké články, které jsou podkladem disertace)	72

Seznam zkratek

- BMP - kostní morfogenetický protein, patří mezi transformující růstové proteiny, podílí se na apoptóze buněk neurální lišty; z angl. bone morphogenetic protein
- cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina, vzniklá zpětným přepisem (reverzní transkripcí) z RNA do DNA; z angl. complementary deoxyribonucleic acid
- CGH - komparativní genomická hybridizace, z angl. comparative genomic hybridization
- CIS - karcinom v počátečním stadiu, z angl. carcinoma in-situ
- CNA - cirkulující nukleová kyselina, z angl. circulating nucleotic acid
- D1, D2 a D3 - mírná, střední a těžká dysplazie
- DFS - přežití bez nemoci, z angl. disease-free survival
- DNA - deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
- EGFR - receptor pro epidermální růstový faktor, z angl. epidermal growth factor receptor
- FA - fragmentační analýza, z angl. fragment analysis
- FISH - fluorescenční in-situ hybridizace, z angl. fluorescence in-situ hybridization
- GOH - amplifikace genetického materiálu, z angl. gain of heterozygosity
- HD - vysoké rozlišení, z angl. high definition (většinou v souvislosti s endoskopií)
- HNSCC - spinocelulární karcinom hlavy a krku, z angl. head and neck squamous cell carcinoma
- HPV - lidský papilomavirus, z angl. human papillomavirus
- IGF - insulinu podobný růstový faktor, z angl. insulin like growth factor
- LOH - ztráta heterozygosity, z angl. loss of heterozygosity
- M1 - sliznice 1 cm od okraje nádoru (v popisu vzorků; M = okraj, z angl. margin)
- M2 - sliznice 2 cm od okraje nádoru (v popisu vzorků; M = okraj, z angl. margin)
- MDR - mnohočetná rezistence k lékům, z angl. multiple drug resistance
- mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina, z angl. messenger ribonucleic acid
- N - normální sliznice bez známek dysplazie (v popisu vzorků)
- NBI - zobrazení v úzkopásmovém spektru světla, z angl. narrow band imaging
- OS - celkové přežití, z angl. overall survival
- PCR - polymerázová řetězová reakce; z angl. polymerase chain reaction
- PD - receptor podílející se na programované buněčné smrti, apoptóze, z angl. programmed cell death
- PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza
- PIK3CA - katalytická podjednotka fosfatidylinositol-3-kinázy
- RNA - ribonukleová kyselina, z angl. ribonucleic acid

- RT-PCR nebo qPCR - polymerázová řetězová reakce v reálném čase nebo kvantitativní PCR;
z angl. real-time (quantitative) PCR
- SSR - krátké opakující se úseky DNA, tzv. mikrosatelitů, z angl. simple sequence repeats;
často používané s detekcí jejich polymorfismu
- STR - krátké opakující se úseky DNA, tzv. mikrosatelitů, z angl. short tandem repeats; často
používané s detekcí jejich polymorfismu
- T - primární nádor (v popisu vzorků)
- Treg - regulační T lymfocyty
- TSG - tumor supresorový gen, z angl. tumor suppressor gene
- VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor, z angl. vascular endothelial growth factor

1. Úvod

Spinocelulární neboli dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) je celosvětově pátým nejčastějším karcinomem a v mužské populaci tvoří asi 10 % karcinomů (Forastiere et al., 2001; Greenlee et al., 2001; Vigneswaran et al., 2014). Je zdaleka nejčastějším zhoubným nádorem ORL oblasti a v ČR postihuje ročně přes tisíc pacientů (Statistická ročenka ČR 2002 a 2016).

Pro jeho biologické chování je typická agresivní lokální invazivita, lokoregionální rekurence a nádorové duplicity (Chiesa et al., 1998). Rizikové faktory zůstávají obecně známé, některé další se však v ORL oblasti objevují až v posledních dvou dekadách (Hashibe et al. 2009, Tachezy et al. 2009). I přes pokroky v chirurgické i onkologické terapii v posledních několika dekadách se celkové přežití pacientů zvýšilo jen málo. Hlavním důvodem, proč zůstává pětileté přežití pod 50 % i přes zavádění nových operačních postupů (endoskopické výkony, funkční blokovaná disekce aj.), přístrojů (laser, harmonický skalpel) [obr. 1] či onkologických schémat u lokálně pokročilého nádoru (Pignon et al., 2009), je způsobeno zejména tím, že až dvě třetiny případů jsou diagnostikovány v pozdních stádiích (III a IV) [obr. 2] a že dochází často k výskytu druhého primárního tumoru či recidivy (Esser et al., 2000). A to i přes zavádění nových endoskopických diagnostických vyšetření jako jsou HD-endoskopie a NBI-endoskopie [obr. 3 a, b] (Zábrodský et al. 2014, Lukeš 2012, 2014).



Obr. 1. Endoskopicky asistovaná laserová resekce nádoru ORL oblasti. Na obrázku vlevo je dobře diferencovatelná makroskopická hranice nádoru (černá šipka).

Na rozdíl od břišních nebo hrudních výkonů, jejichž mutilující kosmetické následky lze ukryt pod oblečením, toto není v oblasti hlavy a krku možné. Při výkonech může též dojít k poškození důležitých cév a hlavových nervů či jiných nervových pletení. Výsledkem bývá pak neurologický deficit či omezení pohybové funkce. V rámci zachování radikalitly operace může dojít i k poškození smyslových orgánů (zrak, sluch, čich, chuť) a jejich drah.

Nepříznivým faktorem ovlivňujícím kvalitu života po operacích HNSCC je tedy fakt, že jsou prováděny v „opticky přístupné“ oblasti lidského těla a mohou tedy často asocializovat postiženého jedince. Hlavním problémem ORL výkonů bývá míra zachování radikalitly v rámci kompletního odstranění nádorové tkáně s okolním lemem zdravé tkáně (Brieger et al., 2003). Na rozdíl od břišního chirurga, který nemusí váhat s resekci několika centimetrů zdravého střeva v okolí nádoru, pro ORL lékaře a jeho pacienta může být každý centimetr lemu zdravé tkáně v okolí nádoru limitující z hlediska pooperační kvality života, kvality dýchání, žvýkání, polykání, ale i funkčních a estetických následků v oblasti hlavy a krku. Proto je důležitá snaha nalézt optimální nástroj, tedy prediktory pro posouzení míry radikalitly resekce i úspěšnosti zvolené terapie, a to i na molekulární úrovni (Smilek. 2010).

Do budoucna je tedy žádoucí spoléhat nejenom na klasické histopatologické vyšetření, ale zaměřit pozornost na molekulárně biologické možnosti posouzení, zda je tkáň „molekulárně zdravá či podezřelá“, neboť je prokázáno, že histologicky zdravá tkáň v okolí nádoru mívá množství molekulárních změn, které mohou být nádorově prekurzorové (Braakhuis et al, 2004, 2005). To platí i pro HNSCC, kde může docházet k ne zcela ojedinělému výskytu druhého primárního tumoru nebo časných či pozdních recidiv. Snahou tedy je zaměřit pozornost na časnou diagnostiku primárních tumorů i recidiv tak, aby se předešlo zbytečně mutilujícím zákrokům u pokročile rozvinuté choroby (Brieger et al, 2006).

Od histopatologie k imunitním dějům a molekulární biologii

Současná úroveň vědeckých poznatků v oblasti molekulární biologie vede k poznání, že naše až doposud používané diagnosticko-terapeutické postupy u nádorových onemocnění doznávají poměrně významných změn či modifikací. Nádorová biologie dosáhla v posledních 20 - 30 letech významných úspěchů, a to zejména při detekci změn na subcelulární, molekulární úrovni (Califano et al, 1996) a bylo dosaženo značného pokroku v poznání zákonitostí vzájemného ovlivnění imunitního systému jedince a nádorového procesu (Bouček et al, 2009, 2010).

Vznik zhoubného nádoru je komplexní proces akumulace molekulárně genetických změn od normální po nádorovou buňku, tzv. vícestupňový proces kancerogeneze. Počet genetických změn stoupá se stupněm malignity zhoubného procesu, zdaleka ne vždy ale histologický obraz odpovídá stupni molekulárně genetických změn ve vyšetřované tkáni (Brieger J et al, 2006).

Pozn.: pojmy kancerogeneze a karcinogeneze jsou synonyma a jsou používána v textu zástupně, ve shodném významu.



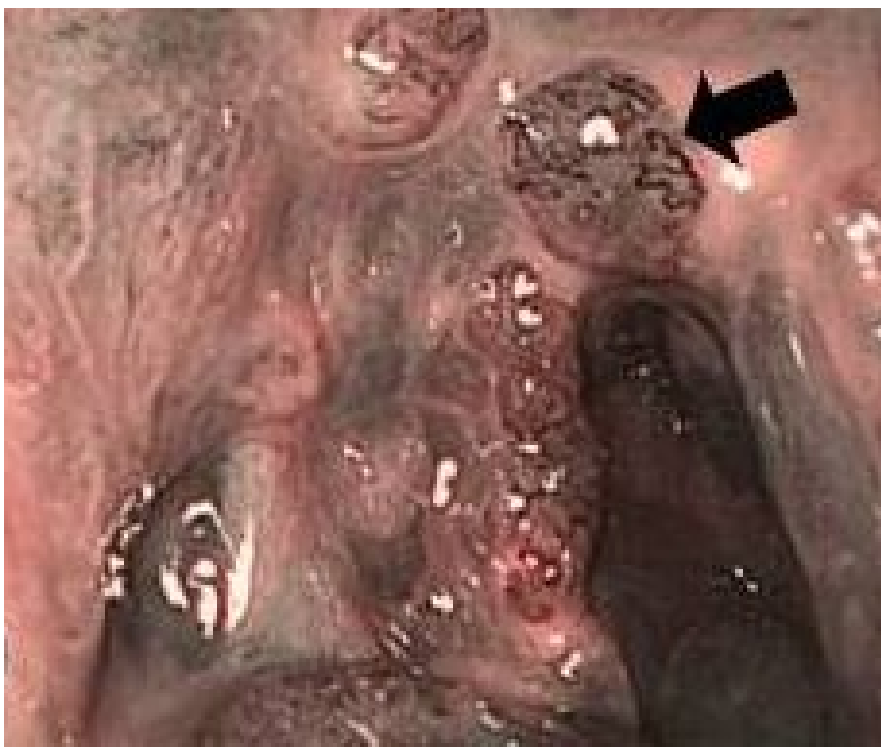
Obr. 2. Lokálně pokročilý spinoceulární karcinom orofaryngu a dutiny ústní vycházející z patrové tonzily vpravo.

V rámci studia etiopatogenetických činitelů hraje kromě imunitních dějů velkou roli i infekce Lidským papilomavirem (human papilloma virus, HPV). Nedávné studie prokázaly, že 20 - 25 % dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku je kauzálně spojeno s chronickou infekcí vysoce rizikovým kmenem HPV (high risk HPV, zkr. HR HPV). Nejvyšší je prevalence u tonzilárních karcinomů (50-60 %) (Munoz et al, 2006, Parkin and Bray 2006).

Pacienti s HPV pozitivními tumory vykazují vyšší celkové přežití (overall survival, zkr. OS) i delší přežití bez nemoci (disease-free survival, zkr. DFS). Mají též nižší riziko recidivy onemocnění (Hafkamp et al, 2008). Zprvu se zdálo, že HPV pozitivní nádory jsou pouze radiosenzitivnější (Mellin et al. 2000). Jiné práce však dokumentovaly lepší výsledky přežití i u pacientů léčených pouze chirurgicky (Licitra et al. 2006), což naznačuje, že dochází k daleko komplexnějším dějům než pouze ke zvýšení radiosenzitivity. Zdá se však, že toto platí pouze u pacientů s nádory orofaryngu. V jiných anatomických lokalitách žádný rozdíl v prognóze HPV pozitivních versus HPV negativních pacientů pozorován nebyl. To může souviset zejména s tím, že prevalence HPV v jiných anatomických lokalitách než v orofaryngu je značně zanedbatelná (Zheng and Baker 2006, Rotnáglová et al. 2010).

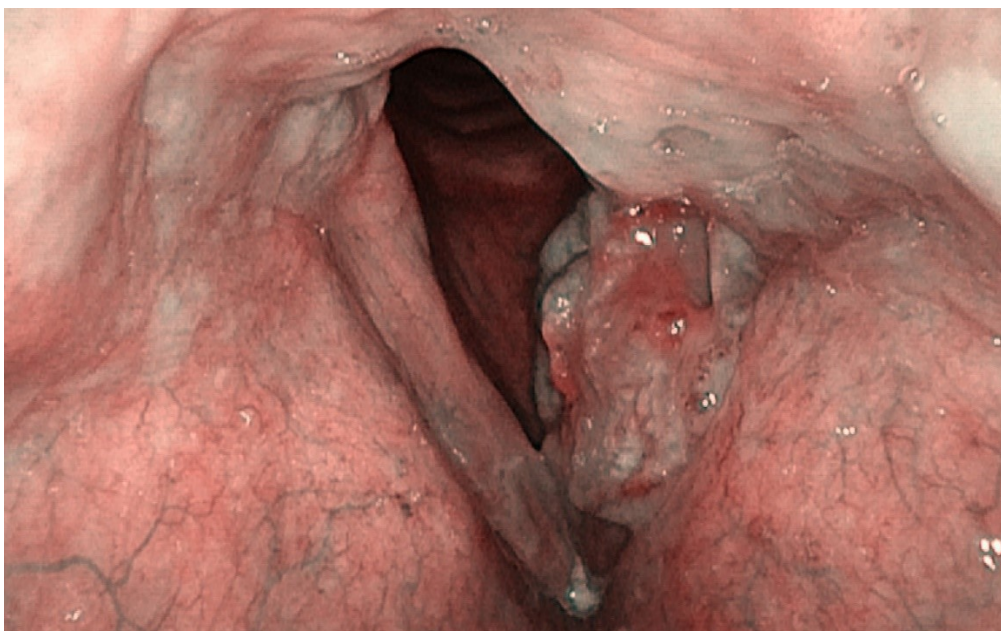
Jedná se zejména o imunitní mechanismy, jejichž alterace se hlavní měrou podílejí na rozvoji zhoubného tumoru, a to i u nádoru vyvolaného virem. Imunogenicita viru je významným činitelem v procesu kancerogeneze a samozřejmě i v protinádorové reakci organismu (Bouček et al, 2009).

Imunitní regulační mechanismy, zahrnující i protinádorovou imunitní odpověď, patří k základním mechanismům zachování homeostázy organismu. Imunitní systém je regulován na několika úrovních, zejména buněčné a humorální, které zajišťují udržení rovnováhy při odpovědi proti antigenům cizím i vlastním. Vhodná regulace imunitní odpovědi je nezbytná pro správné nastavení léčebné strategie u celé řady různých chorob. Mezi velmi důležité patří koncept periferní tolerance, který vychází z transplantačních a autoimunitních zvířecích modelů, kdy bylo možné přenosem T lymfocytů z „tolerantní“ myši zajistit „neodpovídavost“ u „naivního“ příjemce. Subpopulace T lymfocytů, která potlačuje aktivaci a proliferaci efektorových T buněk, je známa jako regulační T lymfocyty (Treg) (Sakaguchi. 2005, Vignali et al. 2008). Víme, že Treg jsou součástí normálně fungujícího imunitního systému a hrají kritickou roli při navození tolerance vůči antigenům exprimovaným na vlastních buňkách organismu, a to i buňkách nádorových. Absence dostatečného počtu Treg vede jednak k těžkým autoimunitním onemocněním, na straně druhé neadekvátní množství či působení Treg negativně ovlivňuje imunitní odpověď vůči nádorovým buňkám a přispívá tak i k rozvoji



Obr. 3 a, b. NBI (narrow band imaging) endoskopie

a. Detailní pohled na sliznici hltanu, kde šipka ukazuje okrsky nepravidelné vaskularizace.



b. Pohled do hrtanu s rekurencí nádoru v oblasti levé hlasivky.

nádorového onemocnění. Jako negativní prognostický parametr u některých typů malignit bylo popsáno jak zvýšené zastoupení Treg v periferní cirkulaci pacientů, tak i jejich akumulace v nádorovém mikroprostředí (Woo et al. 2001, Schaefer et al. 2005). Tento vztah byl prokázán i u dlaždicobuněčných karcinomů v oblasti hlavy a krku (HNSCC) (Bouček et al. 2010, Lukešová et al. 2014).

Je prokázáno, že námi až doposud používaná histopatologická diagnostika chorobných procesů tkání je na subcelulární úrovni nepoměrně složitější a komplexnější, než v současnosti stále platný zlatý standard histopatologického vyšetření (Braakhuis et al. 2005). Molekulární biologie buňky se stává důležitou metodou analýzy normální i patologické tkáně a je velice pravděpodobné, že v blízké budoucnosti doplní či nahradí klasickou patologii, na níž spoléhaly operační obory posledních více jak sto let.

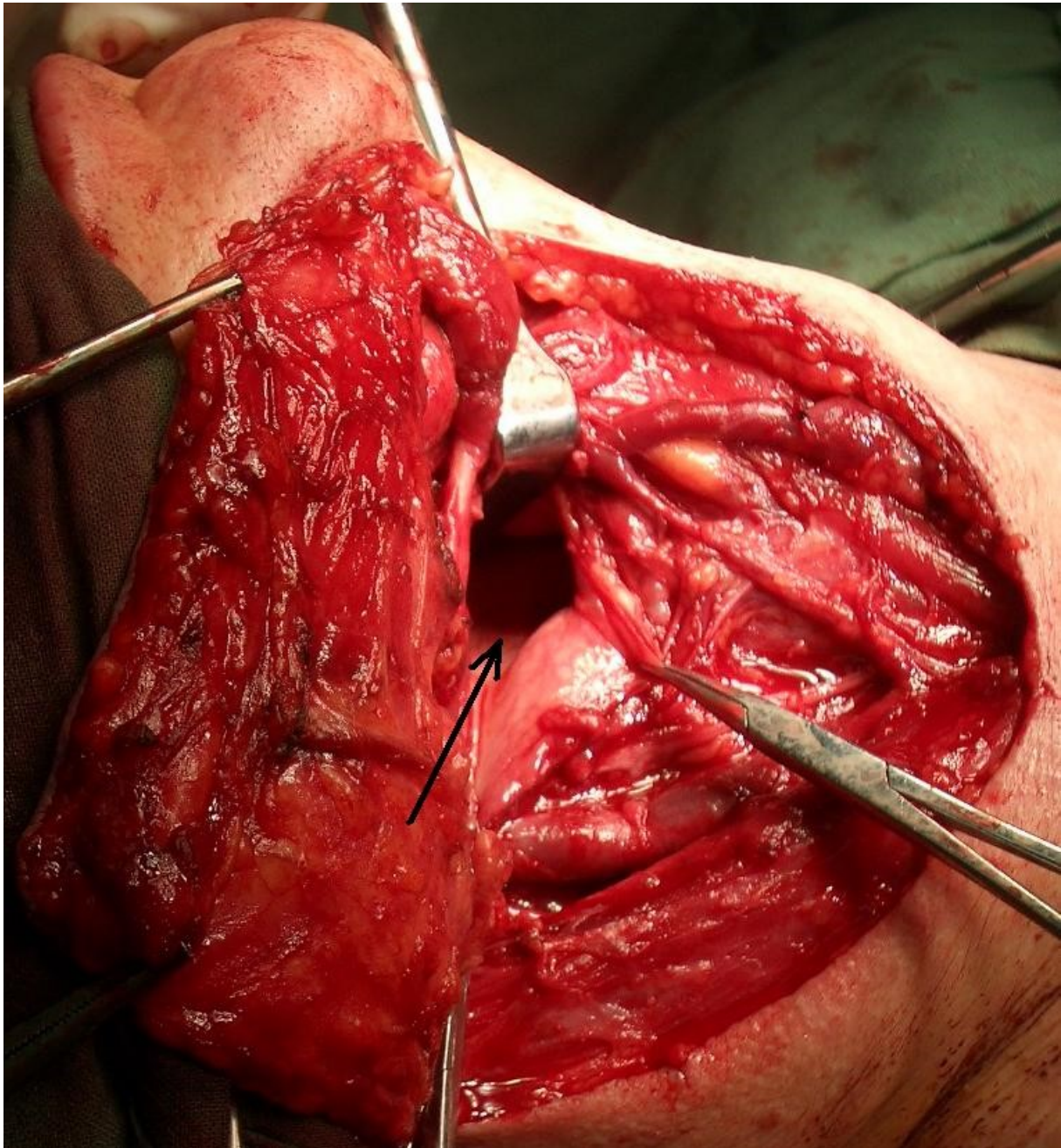
Pre-symptomatický screening, diagnostika i staging chorobného procesu na molekulární úrovni se pomalu, ale jistě stávají součástí diagnostického postupu. Tento molekulárně genetický otisk chorobného procesu se s dalším rozvojem molekulární biologie stane i základem úspěchu metod terapeutických u doposud obtížně terapeuticky ovlivnitelných chorobných stavů, například u onkologických onemocnění. S tím souvisí i stále více skloňovaný pojem „tailored medicine“ (Smart et al. 2004), což v onkologii znamená individuálně modifikovanou, cílenou (z anglického překladu doslova "ušitou na míru") léčebnou strategii na základě genetického otisku určitého typu nádoru u jednotlivého pacienta. Tyto moderní přístupy se samozřejmě týkají i nejčastějšího představitele maligního nádoru v ORL oblasti – spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (Goerner et al. 2010, Smilek et al. 2010).

Hlavní léčebnou modalitou zůstává radikální chirurgická resekce a/i/nebo různá chemo-radioterapeutická schémata, která jsou v poslední době čím dál více doplňovány biologickou léčbou (Alterio et al. 2017, Matta et al. 2009).

Úspěšnost chirurgické léčby a dostatečná radikalita spočívá v průkazu negativních okrajových excizií, přičemž k dosažení tohoto cíle je resekční pole v ORL oblasti rozšiřováno „nebezpečně blízko“ důležitým strukturám. Dochází pak k jakési skeletizaci důležitých krčních struktur [obr. 3], což se například v břišní chirurgii děje jen výjimečně. Molekulárně biologické studie zaměřené na proces kancerogeneze HNSCC ale potvrdily množství genetických aberací i v nenádorové tkáni přiléhající k nádoru (Brieger et al. 2003). Řada publikací definuje jako hlavní charakteristiku tzv. nádorových kmenových buněk nebo progenitorových buněk nádoru, že se vyznačují sníženou metabolickou aktivitou a MDR fenotypem (López-Verdín et al. 2018).

Detekce těchto buněk závisí na znalosti, dostupnosti a spolehlivosti molekulárních markerů (Feldman et al. 2015).

V oblasti protinádorové imunologie bylo prokázáno, že vzestup hladiny Treg negativně ovlivňuje efektivní imunitní reakci proti nádorovým buňkám a koreluje s prognózou onkologicky nemocného pacienta. Zároveň bylo prokázáno, že Treg jsou hlavní překážkou pro



Obr. 4. Pohled zvnějšku do nitra hltanu (šipka) při klasické operaci pro karcinom kořene jazyka s krčním metastazováním (tzv. laterální faryngotomie s blokovou krční disekcí).

imunoterapii a aktivní protinádorovou vakcinaci. Pokud porozumíme skutečnému mechanismu inhibičního působení regulačních T buněk, dá se předpokládat, že se výraznělepší i léčebné výsledky. Velmi slibně vypadají studie, prokazující efekt adjuvantní vakcinace pacientů s pokročilými dlaždicobununečnými karcinomy v oblasti hlavy a krku (HNSCC) (Whiteside. 2007). Díky kombinaci chirurgie a radioterapie, zlepšení chirurgických technik, novým chemoterapeutickým režimům a zavedení „orgán zachovávajících terapeutických režimů“ se již v současné době přeci jenom zlepšují vyhlídky pacienta s HNSCC nejenom na vyléčení, ale i slušnou kvalitu života, a to i v těžších stadiích nemoci (Lo Nigro et al. 2017, Huang J et al. 2016). Zavedení cílené biologické terapie pak představuje další krok (Kozakiewicz et al. 2018).

U pacientů s HNSCC byly prokázány odchylky v mnoha parametrech imunitního systému (Lee et al. 2018). Změny rovnováhy, absolutního počtu i procentuálního zastoupení CD8+ i CD4+ lymfocytů jsou dokumentovány měsíce až roky po úspěšném ukončení onkologické terapie. V periferní krvi může být snížen počet NK buněk, které jsou představitelem přirozené protinádorové odpovědi. Tento fakt koreluje s horší prognózou pacientů s HNSCC (Kuss et al. 2004). Pochopení imunitních mechanismů ve vztahu ke vzniku a progresi nádorového onemocnění nám do budoucna umožní časnější diagnostiku i účinnější terapeutický zásah. Regulační T lymfocyty jsou klíčovou podskupinou, která hraje významnou roli v regulaci a ovlivnění nádorového procesu, a součástí rutinního onkologického terapeutického schématu možná jednou bude i léčba namířená proti těmto buňkám (Bouček et al. 2009).

Proces kancerogeneze, onkogeny a tumor-supresor geny

Klasická histopatologická Slaughterova teorie plošné kancerizace („field cancerization“) popsala před více než 65 lety vznik vícečetných ložisek dysplazie i karcinomu u téhož jedince při dlouhodobé expozici karcinogenu v jednom orgánovém systému a při klonální expanzi alterovaného epitelu (Slaughter et al. 1953). Tato teorie byla v důsledku rozvoje molekulárně genetických postupů posunuta na další, subcelulární, molekulární úroveň (Braakhuis BJ et al. 2003). Teorie geneticky alterovaného pole v histologicky normální tkáni je potvrzena mnoha studii z poslední doby a byly publikovány neúplné modely molekulární kancerogeneze u HNSCC. Mnoha studii bylo potvrzeno, že k „molekulárně genetické dysplázii“ dochází i v tkáni histologicky normální (Brieger et al. 2003).

Při operaci zhoubného nádoru je radikalita chirurgické léčby potvrzena histopatologickým vyšetřením excidovaného tumoru s negativním okrajovým lemem nenádorové tkáně. Přesto i při kompletním odstranění nádorové tkáně dochází v horizontu 5 ti-leté dispenzarizace ve více než 50 % případů k selhání léčby [obr. 4]. Incidence druhého primárního tumoru (SPT, second primary tumor, duplicitní nádor) v ORL oblasti se udává v rozmezí 3 - 20 % (Priante et al. 2011). Ačkoliv v posledních 25 letech dosáhla lékařská věda značných pokroků, vedoucích k lepší lokální kontrole, diagnostice i terapii, zůstávají rekurence či duplicita hlavní příčinou selhání terapie u HNSCC. Důvodem selhání léčby může být různá úroveň molekulárně genetických změn v histologicky normální tkáni přilehlé k nádoru u histopatologicky jednotně postižených jedinců a také různá úroveň nastavení imunitního systému jednotlivého pacienta. Mechanismy protinádorové imunity a jejich poruchy zcela jistě hrají ústřední roli v procesu kancerogeneze (Bouček et al. 2009).

Je známo mnoho genů, jejichž exprese je v nádorové tkáni změněna oproti tkáni zdravé, jde zejména o geny kódující proteiny, které ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci a plánovanou buněčnou smrt, apoptózu (Feldman et al. 2015). Zjednodušeně lze rozdělit geny podílející se na řízení těchto dějů na onkogeny a tumor supresorové geny (TSG). Základním kritériem je míra jejich exprese (up/down regulace) ve vyšetřované tkáni – zatímco ve zdravé tkáni převažují TSG nad onkogeny, u nádorových buněk je tomu naopak (Brieger et al. 2003). Onkogeny ale kódují i proteiny, které jsou nutné pro vývoj zdravé buňky, jsou ale exprimovány s nízkou regulovanou úrovní, nebo jen v časných stádiích organogeneze v prenatalním vývoji. Právě porucha regulace exprese onkogenů je rizikovým faktorem přispívajícím ke vzniku maligní transformace. Mezi nejznámější onkogeny či tzv. onkogenové rodiny patří geny kódující transkripční regulační faktory (myc, fos, jun), kódující proteinkinázy a receptory

růstových faktorů (src, ebr), růstové faktory, signální transduktory (ras), geny blokující apoptózu (bcl) a řada dalších. Nádorové supresory se uplatňují při regulaci buněčného dělení a blokují buněčný cyklus v případě abnormální proliferace nebo poškození genetické informace. Jejich inaktivace má za následek ztrátu kontrolních mechanismů buňky s následnou převahou faktorů podporujících růst a invazivitu a tím i vývoj nádoru. Často jsou to i geny kódující proteiny extracelulární matrix, strukturální proteiny, adhesiny a inhibitory proteáz. Představiteli TSG jsou geny p53, Rb, cyklin D a mnohé jiné. U některých lokalit HNSCC (dutina ústní a orofarynx) je studována role lidského papilloma viru (HPV, human papilloma virus) jako etiologického činitele (mutagenní a kancerogenní efekt) či kofaktoru v procesu časné kancerogeneze (Smilek. 2010, Feldman et al. 2016). Spolu s detekcí těchto změn se čím dál častěji objevují pokusy o zavádění cílené biologické léčby monoklonální protilátkou (Kozakiewicz et al. 2016).



Obr. 5. Paratracheostomická rekurence (šipka) u pacienta 9 měsíců po chirurgické léčbě a adjuvantní chemoradioterapii pro laryngofaryngeální spinocelulární karcinom.

Od klasické onkologie a onkochirurgie k terapii „šité na míru“

Vznik zhoubného nádoru, tzv. vícestupňový proces kancerogeneze, je tedy komplexní děj počínající akumulací molekulárně genetických změn na pozadí nádorového mikroprostředí ovlivněný do značné míry imunitním systémem. Nastane-li v určité oblasti orgánového systému akumulace genetických změn (posléze vedoucí ke vzniku nádoru), dochází v této tkáni ke změně exprese genů oproti tkáni molekulárně zdravé. Počet genetických změn se zvyšuje od zdravé přes preneoplastickou až po nádorovou tkáň. Zdaleka ne vždy ale histologický obraz odpovídá stupni molekulárně genetických změn ve vyšetřované tkáni. Tyto postuláty se opírají o studie, které popisují rozsah klonální expanze molekulárních změn v preneoplastické, histologicky zdravé tkáni v blízkém okolí nádoru souvisejících s procesem časné kancerogeneze a růstem nádoru (Szukala et al. 2004, Braakhuis et al. 2005).

Obor onkologie prodělal v posledních třiceti letech obrovský vývoj, a to zejména s rozvojem chemoterapeutických schémat, vliv na celkové přežití pacientů u některých, zejména solidních, nádorových procesů však zůstal minimální. Spinocelulární karcinom hlavy a krku postihuje v České republice přibližně 1 000 pacientů ročně, celosvětově tvoří kolem 5 % všech nově diagnostikovaných karcinomů. Nejčastěji se setkáváme v oblasti hlavy a krku s nádory hrtanu, střední a dolní části hltanu (orofarynx a hypofarynx) a dutiny ústní (Statistická ročenka 2016). Vzácnější jsou procesy nosohltanu, nosních a paranazálních dutin, které se od výše uvedených do určité míry odlišují (rizikové a etiologické faktory, léčebná modalita aj.) (Lund et al. 2010).

Jedinými specifickými prognostickými faktory rutinně užívanými při plánování terapeutického postupu, jsou v dnešní době, spolu s histopatologickou povahou nádoru (grading), pouze lokalizace a rozsah primárního nádoru, přítomnost regionálních lymfatických a vzdálených metastáz (TNM staging), zavedené do klinické praxe před více než 50 lety. Rozmanitost biologického chování spinocelulárních nádorů a stav či různě nastavená rovnováha imunitního systému jsou ale důvody, proč pacienti diagnostikovaní ve stejném stádiu onemocnění odpovídají odlišně na shodnou léčbu (Salzman et al. 2009, Kalfeřt et al. 2017). Existují tedy další prognostické a prediktivní markery, jejichž odhalení pomůže výhledově stratifikovat a individualizovat léčbu u postižených pacientů a ovlivnit zhoubný proces metodami molekulární biologie u jednotlivého pacienta (Kozakiewicz et al. 2017). To je podstatou léčby pojmenované jako „medicína šité na míru“ (tailored medicine). Je ale zřejmé, že v současnosti nelze vyrábět jeden lék pro jednoho pacienta, ani nelze každého pacienta léčit veškerými dostupnými přípravky, neboť se jedná o velice nákladnou léčbu. Určitá pravidla v rozhodování, komu lék podat a komu ne, přináší výzkum potenciálních markerů (Salzman et al. 2007, Kalfeřt et al.

2017). Obecně vzato, nejstarším markerem mohla být ve starověké medicíně glukóza, resp. její obsah v moči u jedince trpícího diabetem. V dnešní době to jsou nejčastěji proteiny/enzymy (nejsnadněji prokazatelné biochemicky), ale i jejich prekurzory prokazatelné metodami molekulární genetiky (DNA, RNA a další) nebo složitější molekuly, např. proteoglykany (Čada et al. 2007, Plzák 2010).

Zlatým standardem v terapii HNSCC zůstává i dnes primární chirurgická léčba tumoru, při přítomnosti regionálních metastáz doplněná o blokovanou krční disekci, při rozsáhlejších tumorech (T3, T4) či přítomnosti regionálních metastáz (N1–3) je v případě operability chirurgická léčba následována adjuvantní onkologickou terapií (radioterapie nebo chemoradioterapie). V chirurgii ORL oblasti platí, že je nutné zachovat dostatečnou radikalitu resekce při snaze o co největší omezení zbytečně agresivních postupů, které zhoršují funkční výsledky. Proto se uplatňují i modifikované chirurgické postupy a nově zaváděné přístroje v diagnostice (MRI, PET-CT, NBI-endoskopie) [obr. 2] i terapii (laser, radiofrekvence, harmonický skalpel a d.) [obr. 1].

Zřejmé je ale, že i tato schémata mají svá omezení a nežádoucí efekty, a to zejména vysokou toxicitu a omezenou selektivitu. I proto je velká naděje upřena k molekulárně biologickým terapeutickým postupům, které představují cílený specifický zásah do procesu kancerogeneze a nejsou pro organismus tolik toxické. Cílená biologická, resp. molekulárně biologická léčba má za úkol zasažení nádorové buňky na úrovni regulačních a signálních proteinů, které jsou ve zdravé tkáni nepřítomné, neaktivní nebo marginální. Již dnes je v klinické praxi několik látek, které můžeme hrubě rozdělit jak podle mechanismu účinku, tak podle charakteru vlastní účinné látky. Jednotlivé molekuly mohou mít různé mechanismy účinku a jedna látka může být současně řazena do několika podskupin. Jednou z nejnadějnějších jsou tzv. monoklonální protilátky (Kozakiewicz et al. 2018). Tyto představují zatím v praxi nejvíce využívanou skupinu a současně velkou množinu molekul, které mohou zasahovat na nejrůznějších úrovních řízení procesu kancerogeneze v postižené buňce. Monoklonální protilátka je taková, která je tvořena pouze jedním klonem B-lymfocytů a která je zaměřena na jeden konkrétní antigen (zatímco při obranné reakci organismu vznikají v těle protilátky polyklonální, které jsou vytvořeny mnoha klony B-lymfocytů a které jsou směřovány proti různým antigenům). Monoklonální protilátky mohou být kompetitivními inhibitory receptorů pro růstové faktory (např. EGFR, receptor pro epidermální růstový faktor), mohou být zaměřeny proti tzv. CD antigenům (cluster of differentiation, tzv. diferenciační antigeny, označují se tak membránové antigeny, které mají na povrchu stejnou antigenní determinantu - tzv. epitop), z nichž některé

jsou zvýšeně exprimovány na povrchu nádorových buněk (např. CD20 u non-hodgkinského lymfomu, CD52 u chronické lymfatické leukémie aj.). Monoklonální protilátka může být využita jako léčivo, které blokuje například receptor pro růstový faktor, signální dráhu pro apoptózu či angiogenezi, anebo může být využita jako směřující struktura pro jiný typ terapeutika. Monoklonální protilátku je možné konjugovat s toxiny, s radioaktivním izotopem, či přes polymerní nosič s konvenčním cytostatikem. V ORL oblasti je do klinické praxe již zaveden cetuximab (Erbix, anti_EGFR), který v kombinaci s radioterapií u lokálně pokročilého karcinomu hlavy a krku zlepšuje přežití o 20 měsíců (prodloužení přežití z 29 měsíců na 49 měsíců, tj. o 68 %) ve srovnání se samotnou radioterapií bez navýšení toxicity a přibližně o třetinu také snižuje riziko lokoregionálního relapsu. Je schválen pro léčbu lokálního a lokálně pokročilého karcinomu hlavy a krku v kombinaci s radioterapií u pacientů s neresekovatelným nádorem a jako monoterapii u pacientů s metastatickým karcinomem po selhání standardní platinové chemoterapie. Další potencionální monoklonální protilátkou je bevacizumab (Avastin), který selektivně blokuje VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), vyřazuje jej z vazby na receptor, a tak brání angioneogenezi (Smilek. 2010). Klinické použití Avastinu je možné u kolorektálního karcinomu, pro klinické použití v ORL oblasti není dosud registrován.

Mezi další skupinu látek využitelných pro cílenou léčbu patří inhibitory tyrosinkináz. Tyrosinkinázy představují širokou skupinu membránových i buněčných enzymů, katalyzujících fosforylaci tyrosinových zbytků. Tak dochází k aktivaci proteinů jednotlivých signálních drah, které se podílejí na přenosu signálu do nitra buňky. Za normálních okolností jsou tyto proteiny zodpovědné za regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. V procesu kancerogeneze mohou jejich inhibitory ovlivňovat tyto signální dráhy, a tak blokovat patologickou proliferaci, angioneogenezi či poruchu dějů nutných k apoptóze buňky. Existují tři hlavní mechanismy inhibice tyrosinkináz, buď blokádou vazebného místa pro ATP (kompetitivní vazba na vazebné místo pro ATP na intracelulární doméně receptoru a zabránění jeho fosforylaci a přenosu signálu do buňky) nebo vazbou na extracelulární doménu receptoru prostřednictvím monoklonálních protilátek anebo inhibicí stimulačních ligandů těchto drah. Z inhibitorů tyrosinkináz se jako nejlepší z těchto cílů u HNSCC jeví inhibitor tyrosinkinázové aktivity signalizační dráhy receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) gefitinib (Iressa). Pro snadnější orientaci lze říci, že monoklonální protilátky využívané v léčbě nádorových onemocnění mají koncovku -ab (např. cetuximab/Erbix), zatímco názvy inhibitorů enzymatických reakcí mají koncovku -ib (např. gefitinib/Iressa).

Potencionální způsoby cílené léčby nádorů představují inhibitory matrixmetaloproteináz, které mohou zablokovat destrukci bazální membrány a tím zabránit invazivnímu růstu tumoru. Další skupinu tvoří cykliny, které s cyklin-dependentními kinázami vytvářejí aktivní komplexy a hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu. Inhibitory cyklin-dependentních kináz mohou zastavit buněčný cyklus a indukovat apoptózu. Ve fázi klinických zkoušek se slibnými výsledky je inhibitor proteinkinázy-C (enzastaurin), který současně blokuje angiogenezi, buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu. Pozornost se zaměřuje i na jiné možnosti ovlivnění kancerogeneze. Velké úsilí se věnuje imunitním mechanismům, protože i když se se prokáže klinický účinek preparátu, nelze dopředu říci, jak konkrétní pacient na léčbu zareaguje. To je dáno nejenom genetickou výbavou daného jedince, charakteristikami určitého typu nádoru a vlastnostmi léků, důležitou roli hraje nastavení imunitního systému daného jedince v danou chvíli. Proto je extrémní pozornost věnována procesu vzniku a růstu dlaždicobuněčného karcinomu v oblasti hlavy a krku a jeho ovlivnění imunitním systémem. Je zřejmé, že zastoupení jednotlivých subpopulací buněk imunitního systému v mikroprostředí nádoru přímo souvisí s rozvojem a prognózou onemocnění. Bylo prokázáno, že subpopulace T lymfocytů, tzv. regulační T lymfocyty (CD4+CD25+), přímo korelují s časnou recidivou HNSCC (Bouček et al. 2010). Analýza zastoupení lymfocytárních subpopulací by mohla být jedním z údajů ovlivňujících naše rozhodování při volbě terapie či plánování dispenzarizace pacienta. Je dokonce velice pravděpodobné, že revoluční pokroky v imuno-onkologii změní současná paradigmatata uplatňovaná při léčbě zhoubných onemocnění. O tom svědčí i fakt, že Nobelovu cenu za medicínu za rok 2018 získali James P. Allison a Tasuku Honđó "Za objev rakovinové léčby inhibicí negativní imunitní regulace". Velmi nadějným preparátem je monoklonální protilátka proti PD-1. PD-1 (programed cell death 1) je receptor na povrchu buněk, který se řadí mezi tzv. kontrolní body (checkpoints) imunitního systému. Signalizace přes PD-1 je jedním z mechanismů indukce a udržení periferní tolerance tím, že vede k indukci apoptózy efektorových T-buněk a k inhibici apoptózy T-reg. Signalizace přes PD-1 mohou využít nádorové buňky pro únik před imunitním systémem, což vede k toleranci nádoru. Terapeutické zacílení této dráhy monoklonální protilátkou, tedy inhibitorem PD-1, má za následek zlepšení T-buněčné odpovědi proti nádorovým onemocněním (Bouček et al. 2010) a je již v klinických studiích u melanomu, ale i HNSCC (zdroj: databáze SÚKL).

Ztráta heterozygosity

Ztráta heterozygosity (angl. Loss of heterozygosity, zkr. LOH) a mikrosatelitní instabilita (MSI) je obecnou vlastností nádorových buněk, které při klonální expanzi podléhají množství genetických změn. Průkaz ztráty heterozygosity intragenových nebo v blízkosti genu ležících mikrosatelitových markerů v nádorových buňkách vypovídá o delecii alely příslušného genu. Typicky se dá ztráta heterozygosity prokázat u hereditárních nádorových syndromů způsobených zárodečnými mutacemi tumorsupresorových genů (např. Lynchův syndrom). Analýza se používá k průkazu inaktivace obou alel tumorsupresorového genu v nádorové tkáni. Nestabilita mikrosatelitů se typicky prokazuje v nádorových buňkách u hematologických malignit. Rozdílná délka mikrosatelitových repetitivních sekvencí v nádorové tkáni, při srovnání s tkání normální, vzniká v důsledku defektu v DNA reparačních pochodech u hereditárních mutací mismatch repair genů (Medintz et al. 2000).

Mikrosatelitní DNA neboli mikrosatelity, také nazývané STR (short tandem repeats – krátká tandemová opakování) nebo SSR (simple sequence repeats), jsou krátké segmenty DNA, ve kterých se mnohokrát opakují specifické motivy nukleotidových sekvencí. Nejčastěji jsou tvořeny opakováním mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidů. Počet opakování jednotky (repetice) v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu. Každý jedinec má v jaderné DNA dvě kopie každého mikrosatelitu, jeden zděděný po matce, druhý po otci. Délku alel(y) zjistíme PCR amplifikací daného lokusu pomocí primerů přiléhajících k mikrosatelitní sekvenci. Pro analýzu mikrosatelitů tedy potřebujeme znát okolní sekvence. PCR fragmenty pak rozdělíme podle délky v automatickém sekvenátoru tzv. fragmentační analýzou. Ke každému vzorku se přidá fluorescenčně značený standard (500-LIZ), obsahující fragmenty DNA o známé délce, aby bylo později možné identifikovat délku každého fragmentu (alely) a jednoznačně ji srovnávat s délkou fragmentů v jakémkoliv jiném běhu.

Mikrosatelity jsou považovány za jedny z nejvhodnějších genetických markerů díky jejich hojnému výskytu v celém genomu, extrémní variabilitě (polymorfismu) a kodominantní dědičnosti (umožňuje tedy rozlišit heterozygoty) (Wang et al. 1997).

Fragmentační analýza a možnost využití i v amplifikovaných oblastech

Fragmentační analýza (zkr. FA) byla zavedena v 90. letech 20. století jako metoda detekce různé délky repetitivních chromozomálních sekvencí, známých jako mikrosatelity. Tato metoda je s úspěchem využívána pro studium genetických onemocnění vzhledem k vysokému polymorfismu a velmi rozšířeným oblastem mikrosatelitů v genomu. Polymerázová řetězová reakce amplifikuje tyto vybrané sekvence a dvě alely jsou pomocí kapilárové elektroforézy separovány a kvantifikovány. Termín „ztráta heterozygosity“ (z angl. Loss of Heterozygosity, zkr. LOH), který v obecném slova smyslu znamená ztrátu jedné z alel u heterozygota a v užším slova smyslu v této práci je pak používán ve smyslu ztráty jedné mikrosatelitní alely, většinou představuje ztrátu či nefunkčnost tumor supresorového genu. Ztráta heterozygosity byla popsána poměrně často u solidních tumorů, včetně HNSCC (Hashimoto et al, 2001, Ha et al. 2002). Tato metoda je použitelná i k detekci amplifikovaných oblastí genomu (tj. lokusů, které ukrývají onkogeny). V literatuře se dokonce objevil termín GOH (gain of heterozygosity) (Riazimand et al. 2001). Zisky genomického materiálu (gains) v oblasti 3q26-27 mají vysokou prevalenci u HNSCC a byla také potvrzena korelace vzhledem k přežití, což potvrzují studie využívající např. komparativní genomové hybridizace (angl. Comparative Genomic Hybridization, zkr. CGH) (Sing et al. 2002, Brieger et al. 2003).

CGH a FISH

CGH (z angl. Comparative Genome Hybridization) je molekulárně-cytogenetická metoda umožňující analýzu genomu v jediném experimentu. Vychází z principů jiné metody FISH (z angl. Fluorescence in situ hybridization) a někdy se definuje i jako dvojbarevná nebo obrácená FISH. Používá se k detekci kvantitativních změn genomu (amplifikace nebo delece), přičemž se při samotné hybridizaci využívá DNA značená dvěma rozdílnými fluorescenčními barvivy (tzv. fluorochromy) a jako sonda je využita DNA izolovaná z vyšetřované tkáně. Tyto dvě DNA (proband a referenční DNA) soutěží o vazebná místa na chromozomech. V závislosti na tom, zda je určitý úsek vyšetřované DNA amplifikován, či deletován, pak ve výsledku v různých místech chromozomu převládá fluorochrom vyšetřované, nebo referenční DNA. Pomocí počítačové analýzy jsou získány hodnoty fluorescenčních intenzit vyšetřované a referenční DNA a je sestaven CGH profil v podobě křivky vyjadřující poměr intenzit obou fluorochromů v průběhu každého chromozomu. CGH se uplatňuje zejména v onkocytogenetice při zjišťování nebalancovaných chromozomálních změn u nádorů. Umožňuje identifikovat místa v genomu, kde jsou oblasti delecí nebo amplifikace. Tyto se mohou uplatňovat v kancerogenezi, neboť hostí (nefunkční) tumor supresor geny nebo (amplifikované) onkogeny (Brieger et al. 2003).

HNSCC a genová exprese, využití Biočipu a real-time PCR

Při studiu exprese genů je zásadní porovnání exprese genů ve zdravé a v patologické tkáni. Zajímavé je ale také sledovat genovou expresi ve tkáni přilehlé k nádoru, která je, jak bylo uvedeno výše, histologicky normální, ale molekulárně již prokazatelně patologická. Pro zjednodušení lze říci, že při studiu exprese genů je třeba nejprve izolovat RNA, poté ji převést reverzní transkripcí na stabilnější cDNA (komplementární DNA je tedy jakýmsi otiskem exprimovaného genu) a tuto detekovat kvalitativně (např. biočip) či semikvantitativně (např. real-time PCR). Porovnáním výsledků mezi tkání zdravou a patologickou se určí, nakolik je daný gen v příslušné tkáni exprimován.

Biochip si můžeme představit jako mikrodestičku (umělohmotná destička, sklíčko aj.), kde na ploše řádově několika mm² je možné kvantifikovat míru exprese až několik desítek tisíc genů současně pomocí hybridizačního procesu mezi na destičce navázanými sondami a zkoumanou (fluorescenčně značenou) komplementární DNA. K dispozici jsou komerčně vyráběné „screeningové“ biochipy pro celý genom (tzv. profil genové exprese v genomickém měřítku) i pro některé podoblasti výzkumného zájmu, například „onkologické“ biochipy, biochipy pro studium polymorfismu vybraných genů (cytochrom P450 aj.) pro účely farmakogenetiky a jiné (Čapková et al. 2014).

Další metodou kvantitativní analýzy exprese je tzv. real-time PCR (někdy zkracováno RT-PCR nebo qPCR, ale pozor, tak se označuje i reverzní transkripce, tedy zpětný přepis RNA na komplementární DNA, která je nicméně také nutná k provedení samotné real-time PCR), tedy polymerázová řetězová reakce v reálném čase nebo kvantitativní PCR. Tato metoda umožňuje semikvantitativní analýzu exprese genů na základě sledování zvyšující se fluorescence označené zkoumané cDNA při polymerázové řetězové reakci srovnáním se standardně exprimovaným genem (tzv. housekeeping gen, který je ve zdravé i patologické buňce exprimován ve stejné míře) a standardním genetickým materiálem (např. buněčná linie). Existují i složitější a náročnější analýzy výsledku genové exprese na podkladě tzv. proteomiky, která se zabývá identifikací jednotlivých proteinů kódovaných genomem, jejich vzájemnými interakcemi a stanovením jejich trojrozměrné struktury.

Na podkladě analýzy pomocí biočipu a real-time PCR získaných výsledků je možné určit tzv. target geny, tedy ty, které jsou ve zvýšené míře exprimovány v nádorové či přednádorové tkáni. Za předpokladu, že v histologicky normální tkáni přilehlé k nádoru jsou přítomny molekulárně genetické změny, vede další akumulace genetických změn k transformaci zdravé buňky v maligní, nádorovou tkáň. Akceptujeme-li teorii klonální expanze, tedy že je molekulárně

alterována i histologicky zdravá tkáň v těsném okolí nádoru, pak srovnání míry exprese genu mezi molekulárně postiženou tkání (v těsném okolí nádoru) a molekulárně zdravou tkání (odebranou v dostatečné vzdálenosti od nádoru) může určit potenciální target geny, které jsou zapojeny do časných fází kancerogeneze.

Rozpoznání těchto genů časně kancerogeneze by napomohlo například časnějšímu záchytu druhého primárního tumoru, který se v ORL oblasti vyskytuje relativně často. V budoucnu přispějí tyto poznatky k optimálnímu cílení biologické léčby v časných stádiích kancerogeneze u dosud obtížně terapeuticky ovlivnitelných nádorových stavů ale i při časně detekci rekurencí. Kombinace biochipové technologie s Real-Time PCR se jeví jako vhodná kombinace studia procesu kancerogeneze, zejména pak jeho časných fází, a to u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, který představuje ideální model solidního nádoru pro studium časně kancerogeneze.

Biochipová technologie (microarray), jejíž nástup na přelomu tisíciletí výrazně zefektivnil molekulárně genetické analýzy, se uplatnila při studiu genové exprese, ale i studiu genotypizace při identifikaci alel, studiu mutací, polymorfismů apod. Tato technologie dospěla v současné době do stadia, kdy je možné na ploše „sklíčka“ identifikovat hybridizačním procesem až několik desítek tisíc genů. Jsou k dispozici komerčně vyráběné „screeningové“ biochipy pro celý genom (globální, resp. genomová genová exprese) i pro některé podoblasti výzkumného zájmu, například „onkologické“ biochipy, biochipy pro studium polymorfismu některých genů pro účely farmakogenetiky a jiné. Existují i další metody analýzy genové exprese.

Metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR) je molekulárně genetická metoda umožňující semikvantitativní analýzu exprese genů na základě srovnání se standardně exprimovaným genem a standardním genetickým materiálem (např. buněčné linie).

Při porovnání změn exprese potenciálních genů v tkáni normální, v tkáni přilehlé k tumoru a v nádoru (HNSCC) a to jak kvalitativně, tak i semikvantitativně, je možné v budoucnu identifikovat geny zodpovědné za časnou fázi kancerogeneze. Vycházejí z předpokladu, že v tkáni přilehlé k tumoru jsou přítomny molekulárně genetické změny, jejichž akumulací se transformuje maligní buňka, tak zvýšená exprese genu i v nenádorové tkáni z blízkosti nádoru pomůže určit potenciální geny, které jsou zapojeny do časných fází kancerogeneze. Případná kombinace biochipové technologie s Real-Time PCR se nám jeví jako vhodná kombinace studia procesu kancerogeneze, zejména pak jeho časných fází, a to u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, který představuje ideální model solidního nádoru pro studium časně kancerogeneze.

Od vyšetření solidní tkáně k “tekuté biopsii“, od DNA k cirkulující mRNA

V poslední dekádě minulého století zaznamenala ohromný pokrok technologie DNA-diagnostiky, jejímž nejvýznamnějším mezníkem bylo úspěšné dekodování sekvence DNA lidského genomu v roce 2000. Práce na analýze lidského genomu umožnily i daleko rychlejší rozvoj technologií detekce genové exprese. Tento rozvoj a miniaturizace laboratorních přístrojů v posledních letech pomohly zefektivnit a mnohonásobně zrychlit vyšetřovací postupy. Tak např. k izolaci mRNA ze slizniční tkáně postačoval již před 15-20 lety vzorek o hmotnosti 10-30mg, tj. excize ze sliznice o velikosti 2x2mm a v dnešní době to je ještě výrazně méně.

Při studiu genové exprese v solidních tkáních je nutné porovnat studovanou tkáň s tkání referenční. Jako referenční materiál pro analýzu genové exprese z nádoru a jeho okolí je možné použít sliznici ORL oblasti (s výjimkou nosní sliznice), která je v určité vzdálenosti od nádoru, která není již molekulárně geneticky alterována a lze ji považovat za molekulárně zdravou tkáň. Tato sliznice obsahuje stejný typ epitelu (vrstevnatý dlaždicový epitel), tvoří jeden orgánový systém a exprimuje za normálních okolností v celém svém rozsahu podobné geny. Nastane-li v určité oblasti tohoto orgánového systému akumulace genetických změn, vedoucí ke vzniku nádoru, dochází v nádorové i preneoplastické tkáni v okolí nádoru ke změně exprese genů oproti tkáni molekulárně zdravé.

Biochipová technologie (microarray), jejíž nástup na přelomu tisíciletí výrazně zefektivnil molekulárně genetické analýzy, se uplatnila při studiu genové exprese, ale i studiu genotypizace při identifikaci alel, studiu mutací, polymorfismů apod. Tato technologie dospěla v současné době do stadia, kdy je možné na ploše „sklíčka“, jehož velikost nepřesahuje řádově cm², identifikovat hybridizačním procesem až několik desítek tisíc genů. Jsou k dispozici komerčně vyráběné „screeningové“ biochipy pro celý genom (globální, resp. genomová genová exprese) i pro některé podoblasti výzkumného zájmu, například „onkologické“ biochipy, biochipy pro studium polymorfismu některých genů pro účely farmakogenetiky a jiné. Existují i další metody analýzy genové exprese.

Metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR) je molekulárně genetická metoda umožňující semikvantitativní analýzu exprese genů na základě srovnání se standardně exprimovaným genem a standardním genetickým materiálem (např. buněčné linie). Kombinace biochipové technologie s Real-Time PCR se jeví jako vhodná kombinace studia procesu kancerogeneze. Vycházejí z předpokladu, že v tkáni přilehlé k tumoru jsou přítomny molekulárně genetické změny, jejichž akumulací se transformuje maligní buňka, pak zvýšená exprese genu i v nenádorové tkáni z blízkosti nádoru pomůže určit potencionální geny, které

jsou zapojeny do časných fází kancerogeneze. Vybrané potencionální geny zodpovědné za časnou kancerogenezi mohou být dále analyzovány metodou semikvantitativní, pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (Real-Time PCR). Real-Time PCR je molekulárně genetická metoda umožňující semikvantitativní analýzu exprese genů na základě srovnání se standardně exprimovaným genem a standardním genetickým materiálem (např. buněčné linie). Kombinace biochipové technologie s Real-Time PCR se nám jeví jako vhodná kombinace studia procesu kancerogeneze, zejména pak jeho časných fází, a to u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, který představuje ideální model solidního nádoru pro studium časně kancerogeneze. To, zda je nějaký gen v dané tkáni exprimován, se zjišťuje analýzou ribonukleové kyseliny (RNA). Mírou exprese genu tedy rozumíme vyjádření jeho genetické informace v primární struktuře RNA, resp. mRNA (messengerové RNA). Reverzní transkripcí mRNA se syntetizuje cDNA (komplementární DNA), se kterou se pak dá při laboratorní analýze daleko lépe nakládat zejména proto, že je stabilnější (nepodléhá vlivu „všudypřítomných“ ribonukleáz), je možné ji snadno využít pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a další analýzy. mRNA lze izolovat jak ze solidní tkáně, tak z tělních tekutin, včetně krve a séra.

Samozřejmě jednodušší by bylo v rámci využití spolehlivých markerů genové exprese charakteristické pro časnou kancerogenezi použití velmi dostupného genetického materiálu např. z krve. Této problematice se věnuje další práce vědecké skupiny z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK, která je zaměřena na studium cirkulujících nukleových kyselin u pacientů s HNSCC. Cirkulující nukleové kyseliny (Circulating Nucleic Acids, CNAs) se ukázaly být slibným nástrojem neinvazivní monitorace a sledování dynamiky rozvoje maligního onemocnění, přičemž cirkulující RNA je senzitivnějším markerem nežli s tumorem asociovaná cirkulující DNA. Detekce této RNA v plasmě a séru může sloužit jako pro pacienta daleko komfortnější „kapalná“ biopsie, která pomůže omezit nutnost opakovaných biopsií solidní tkáně z tumoru či podezřelé sliznice, které jsou jednak nepříjemné, jednak omezující pro základní potřeby jako je dýchání, polykání, žvýkání a d., nebo do jisté míry i kosmeticky mutilující.

Vyšetření solidního vzorku tkáně, byť jakkoliv malého, je daleko větším zásahem do organismu i komfortu daného jedince než např. odběr krve; k získání dostatečného množství RNA potřebujeme i v dnešní době stále ještě několik miligramů solidní tkáně a to s sebou nese nutnost invazivní excize.

Daleko příjemnější pro pacienta by byl odběr sliny nebo krve. Ve slinách se již v dnešní době vyšetřuje např. podíl HPV. Problematika HPV positivity a jejího vztahu k HNSCC je dobře známá (Tachezy et al. 2009). Velká pozornost se věnuje též imunobiologii nádorových procesů. Do budoucnosti imunobiologické léčby jsou vkládány velké naděje. V rámci časně diagnostiky a diagnostiky recidiv se zkoumá možnost využití nukleových kyselin cirkulujících právě v krvi a slinách pacientů pro detekci možných prekurzorových genů či genů zodpovědných za rekurenci HNSCC pomocí mikroarray u pacientů s HNSCC. Detekce mimobuněčné RNA v plazmě a séru by mohla sloužit jako jakási „tekutá biopsie“ bez nutnosti probatorních excizi solidní tkáně (Čapková et al. 2014). Možná pozitiva ještě umocňuje fakt, že by bylo takto kontrolovat pacienta při každé klinické návštěvě a neinvazivně sledovat možný vývoj případné rekurence v časném stadiu.

2. Hypotézy a cíle

A)

Za předpokladu, že jsou fragmentační analýzou detekovatelné i amplifikace genetického materiálu, prokázat, že jsou molekulárně genetické změny přítomny i v histologicky zdravé tkáni přiléhající k nádoru.

B)

Určit, které lokusy a případně geny mohou být zodpovědné za proces kancerogeneze u HNSCC.

Následující text popisuje studii, na které se autor podílel jako hlavní autor a řešitel. Tato se zabývá fragmentační analýzou i korelace s komparativní genomickou hybridizací u vzorků solidní tkáně tumoru a přilehlé sliznice.

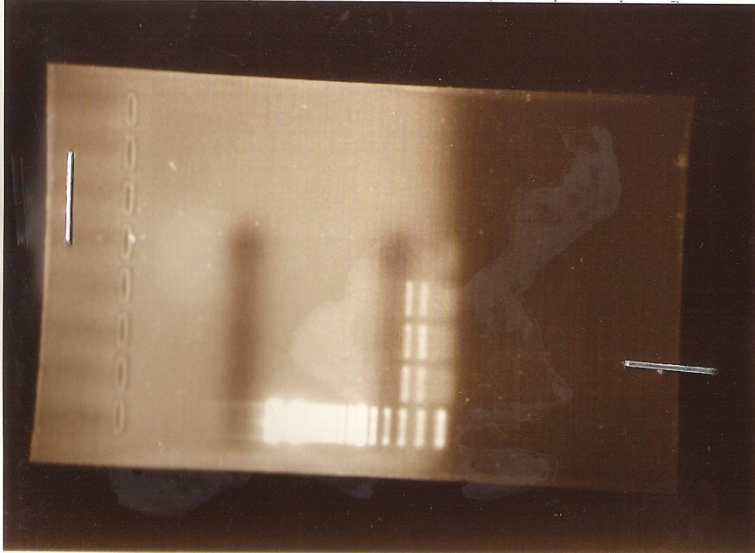
Závěry týkající se studie microarray-analýzy sérových hladin cirkulujících mRNA u pacientů, na které se autor spolupodílel, jsou uvedeny v závěru, v příloze a rozvedeny v diskuzi.

3. Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 20 pacientů léčených pro spinocelulární karcinom hlavy a krku v oblasti orofaryngu. Všichni byli léčeni primárně chirurgicky, přičemž byl odstraněn primární nádor, histologicky zdravá tkáň v okolí nádoru, a pokud byla indikována, tak i blokovou krční dissekcí. Stadium choroby bylo hodnoceno podle kritérií UICC (International Union against cancer). Do studie byly zařazeny pouze případy pokročilé nemoci, tzn. stadia III-IV. Od pacientů byly odebrány vzorky z nádoru (označeno jako T – tumor) a z histologicky zdravé tkáně ve vzdálenosti 1 a 2 cm od okraje nádoru (označeny jako M1 a M2 – mucosa). Normální DNA byla izolována z lymfocytů periferní krve (označeno jako N – normal). Buňky pro fragmentační analýzu byly získány z parafinových řezů barvených HE pomocí laserové mikrodisekce (Micromanipulator Carl Zeiss, Jena, Německo), která umožňuje morfologickou kontrolu vzorku odebraného genetického materiálu cílových buněk, např. nádorových, aby se předešlo významnější příměsi genetického materiálu nenádorových buněk, např. vazivového stromatu. K dostatečné analýze bylo odebráno cca 25 mm² z daného řezu. DNA izolace byla provedena pomocí proteinkinázy K. Získaná DNA byla ošetřena fenol-chloroformem a precipitována ve 100 % etanolu.

Ke zvýšení informativnosti jednotlivých primerů jsme použili detekci heterozygotů pro jednotlivé primery pomocí gelové elektroforézy [obr. 6].

C:\My Documents\Jan\pr 11b(51°C).sgd
1052723938



Obr. 6. Gelová elektroforeza se zobrazením dvou alel (heterozygota) u 3 ze 4 vyšetřovaných pro zvolený primer.

Pacient č.	TN	Histologie		
		T	M1	M2
1	T3N2b	SCC	D2	D1
2	T3N2c	SCC	D1	N
3	T4N2c	SCC	D3	D2
4	T3N2b	SCC	D3	D1
5	T3N2b	SCC	D3	D2
6	T3N2b	SCC	D2	N
7	T3N2b	SCC	D2	N
8	T3N2b	SCC	N	D1
9	T4N2b	SCC	CIS	D1
10	T4N2b	SCC	D2	D1
11	T3N2b	SCC	D2	N
12	T3N2b	SCC	D3	D1
13	T3N0	SCC	D2	D1
14	T3N2b	SCC	D2	N
15	T3N2b	SCC	D2	D1
16	T3N1	SCC	D2	N
17	T3N2b	SCC	D2	N
18	T3N2b	SCC	D2	N
19	T4N2b	SCC	CIS	D2
20	T3N0	SCC	D2	N

Tabulka 1. Klinická a histologická data pacientů s HNSCC. Zkratky: CIS – karcinom in situ; D1, D2 a D3 – mírná, střední a těžká dysplazie; M1 – sliznice 1 cm od okraje nádoru; M2 – sliznice 2 cm od okraje nádoru; N – normální sliznice bez známek dysplazie; T – primární nádor; SCC - spinoceulární karcinom.

K sekvenaci bylo použito následujících 11 primerů (D3S3689, D3S3575, D3S1268, D3S3886, D3S3712, D3S1614, D3S3715, D3S3565, D3S3609, D3S1580 a D3S1601; MWG-Biotech, Ebersberg, Germany; tabulka 2).

Marker	D3S3689	D3S3575	D3S1268	D3S3886	D3S3712	D3S1614	D3S3715	D3S3565	D3S3609	D3S1580	D3S1601	Průměr (%)	
Lokus	3q25.31	3q25.32	3q26.1	3q26.1	3q26.1	3q26.2	3q26.32	3q26.33	3q27.2	3q28	3q28		
Počet (%) heterozygotů tj informativní pacienti	8 (40)	17 (85)	18 (90)	3 (15)	17 (85)	15 (75)	14 (70)	7 (30)	12 (60)	10 (50)	13 (65)	(60)	
Amplifikace genetického materiálu	Pozitivní T informativní (%)	3/8 (38)	12/1 7 (70)	12/1 8 (67)	2/3 (67)	13/1 7 (76)	10/1 5 (67)	9/14 (64)	5/7 (71)	9/12 (75)	6/10 (60)	11/1 3 (85)	(67)
	pozitivní M1 informativní (%)	2/8 (25)	5/17 (29)	6/18 (33)	1/3 (33)	3/17 (18)	3/15 (20)	2/14 (14)	1/7 (14)	3/12 (25)	2/10 (20)	1/13 (8)	(22)
	pozitivní M2 informativní (%)	1/8 (13)	5/17 (29)	5/18 (28)	0/3 (0)	5/17 (29)	1/15 (7)	0/14 (0)	1/17 (14)	1/12 (8)	3/10 (30)	1/13 (8)	(15)

Tabulka 2. Amplifikované mikrosatelity.

Chromozomální lokusy a sekvence primerů jsou k dispozici v databázi ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Všechny primery byly značeny fluorescenčně (6-FAM). Polymerázová řetězová reakce byla provedena ve směsi 25 μ l reakční směsi obsahující 2 μ l s obsahem 10 ng/ μ l genomové DNA, 1.1 μ l roztoku každého z primerů (100 μ M fluorescenčně značený primer), 0.5 μ l 10 mM dNTP (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), 2.5 μ l PCR pufu z PCR Optimizer Kit (Invitrogen, Groningen, Nizozemí), 0.25 μ l z 5u./ μ l Taq polymerázy (Roche, Mannheim, Německo) a vody. PCR byla provedena na přístroji GenAmp PCR 2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA), 35 cyklů (denaturace 95° C /1 min./, zchlazení na 55–62°C (v závislosti na nastavení primeru) na 30 sekund a zvýšení na 72°C na 30 sekund.

Amplifikované produkty PCR byly analyzovány kapilární elektroforézou na přístroji ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). V rámci analýzy bylo 12 μ l deionizovaného formamidu kombinováno s 0.5 μ l Genescan 500 TAMRA size standard (Applied Biosystems, Weiterstadt, Německo) a 2 μ l produktu PCR v každém geneticky analyzovaném vzorku. Vzorky byly denaturovány v zahřívacím bločku po dobu 2 minut na 90° C, zchlazeny během 2 minut na ledové tříšti a vloženy do analyzátoru. K analýze a kvantifikaci výsledků pomocí elektrohistogramů byl použit software GeneScan (verze 3.7). Zisky (gains) byly definovány následující rovnicí:

$$(T1/T2)/(N1/N2) < 0.8 \text{ nebo } > 1.2$$

kde T1, T2 a N1, N2 jsou vrcholy křivek (peak) relativní fluorescence alel.

4. Výsledky

Fragmentační analýza vzorků z tumoru a normální tkáně

Analyzovali jsme kompletní sadu vzorků (T, M1, M2 a N) od všech 20 pacientů pomocí 11 mikrosatelitních primerů. Celkově hodnoceno, procento informativních vzorků (tj. heterozygotů) kolísalo pro zvolené primery mezi 15 % (3/20) a 90 % (18/20) pro analyzované lokusy (tabulka 2).

V nádorových vzorcích byly zisky genetického materiálu od 38 % v informativním lokusu (lokus 3q25.31, MS marker D3S3689) do 85 % v lokusu 3q28 (marker D3S1601). Ve slizničních vzorcích histologicky zdravé tkáně odebrané ve vzdálenosti 1 cm od okraje nádoru byla detekována nejnižší úroveň zisků v lokusu 3q28 (marker D3S1601) s 8 % a nejvyšší v lokusu 3q26 (markery D3S1268 a D3S3886) s 33 %. Ve slizničních vzorcích histologicky zdravé tkáně odebrané ve vzdálenosti 2 cm od okraje nádoru byly zisky 0 % (loci 3q26.1 a 3q26.32 – markery D3S3886 a D3S3715) až 30 % (lokus 3q28 – marker D3S1580).

Celkové zisky ve všech informativních lokusech a analyzovaných vzorcích byly 67 u těch z primárního tumoru, 22 % u M1 vzorků a 15 % u M2 vzorků (tabulka 2). Shrnutí, detekovali jsme zisky v minimálně jednom vyšetřovaném mikrosatelitu dlouhého raménka třetího chromozomu u všech vzorků z primárních tumorů, 15/20 M1 vzorků a 10/20 M2 vzorků.

Korelace fragmentační analýzy a CGH

Korelace mezi přítomností zisků detekovatelných fragmentační analýzou a předchozí CGH analýzou publikovanou naší skupinou je zobrazena v tabulkách 3-5.

CGH analýza ukázala zisky u 14/20 vzorků z nádorů (70 %) v oblastech 3q. Pomocí fragmentační analýzy jsme zjistili, že všechny CGH-negativní vzorky z nádorové tkáně (č. 1, 2, 4, 7, 10 a 18) byly pozitivní alespoň v jednom lokusu. Na druhou stranu, ne všechny informativně pozitivní lokusy z CGH byly detekovány jako amplifikované při fragmentační analýze (obr. 1).

Jenom 4 z 20 M1 vzorků (20 %) měly definované amplifikace v oblastech 3q. Pomocí fragmentační analýzy bylo detekovaných jako pozitivních 15 vzorků (75 %) (tab. 2). Mezi M2 vzorky, 12 z 20 (60 %) bylo detekovaných jako pozitivní při použití fragmentační analýzy, ale žádný nebyl pozitivní při CGH (obr. 3). To naznačuje vysokou senzitivitu fragmentační analýzy a vysokou četnost premaligních buněk s malými chromozomálními aberacemi. Histopatologicky diagnostikované dysplazie byly asociovány s častou imbalancí alel. Zaznamenali jsme 9 M2 vzorků diagnostikovaných jako lehká až středně těžká dysplazie s detekovatelnými zisky (gains) oproti pouze třem lehkým dysplaziím, u kterých nebyly prokázány zisky v CGH (obr. 3). Stejně tak, pouze 3 vzorky se zisky v CGH v oblastech 3q byly histopatologicky normální oproti pěti bez zisků.

Níže jsou výsledky uvedené ve formě přehledných tabulek.

V dalších navazujících studiích, na kterých se autor spolupodílel, bylo prováděno studium kancerogeneze u HNSCC několika dalšími metodami, zejména pak analýza jednotlivých genů pomocí real-time PCR nebo analýza genové exprese pomocí microarraye – biočipové technologie nejenom ze solidní tkáně, ale i z krve.

Marker	D3S 3689	D3S 3575	D3S 1268	D3S 3886	D3S 3712	D3S 1614	D3S 3715	D3S 3565	D3S 3609	D3S 1580	D3S 1601	CGH (T)	Histologie
Lokus	3q25. 31	3q25. 32	3q26. 1	3q26. 1	3q26. 1	3q26. 2	3q26. 32	3q26. 33	3q27. 2	3q28	3q28		
1	Blue	Blue	Blue		Blue	Yellow	Blue	Yellow	Yellow		Blue		SCC
2		Blue	Yellow		Yellow	Blue		Yellow	Yellow		Yellow		SCC
3		Red	Red			Red	Red		Red		Red	3q-	SCC
4		Blue	Blue	Blue	Blue		Blue				Yellow		SCC
5	Green	Green	Green		Green	Green		Red		Green	Red	3q-	SCC
6	Red	Red	Green		Red	Red			Red		Red	3q-	SCC
7		Blue	Yellow			Blue	Yellow			Yellow	Yellow		SCC
8		Red	Green		Green		Green	Green	Green			3q26- 28	SCC
9		Red	Red	Red		Red	Red		Red	Red	Red	3q24-	SCC
10	Blue				Yellow	Blue	Blue		Blue	Blue			SCC
11		Red	Red		Red	Red	Red		Red		Red	3q26- 28	SCC
12	Red	Red	Red		Red	Red	Red			Red		3q-	SCC
13		Red	Red		Red	Red	Red	Red		Red	Red	3q-	SCC
14		Red	Red	Red	Red						Green	3q-	SCC
15	Green	Red	Green		Red	Green		Red		Green		3q26- 28	SCC
16		Red	Red		Red		Red		Red		Red	3q26- 28	SCC
17		Red	Red		Red	Red			Red			3q26- 28	SCC
18	Blue				Yellow		Blue	Blue	Blue	Blue			SCC
19		Red	Red		Red	Red	Red		Red	Red		3q-	SCC
20	Red		Red		Red	Red	Red			Red	Red	3q2 4-	SCC

Fragm entační analýza / CGH pozitiv ita (%)	3/5 (60)	12/13 (92)	10/14 (71)	2/2 (100)	10/12 (83)	9/11 (82)	9/10 (90)	3/4 (75)	8/9 (89)	5/7 (71)	8/9 (89)		
--	-------------	---------------	---------------	--------------	---------------	--------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--	--

Tabulka 3. Korelace amplifikací (gains) mezi fragmentační analýzou (FA) a komparativní genomickou hybridizací (CGH) ve vzorcích z nádoru (T).

Zkratky: CIS – karcinom in situ; D1, D2 a D3 – mírná, střední a těžká dysplazie; M1 – sliznice 1 cm od okraje nádoru; M2 – sliznice 2 cm od okraje nádoru; N – normální sliznice bez známek dysplazie; T – primární nádor; SCC - spinocelulární karcinom.

Graficky zobrazený výsledek korelace mezi FA a CGH; □ neinformativní allelotypy (5 homozygotů), ■ heterozygot, amplifikace při FA, CGH pozitivivní; ■ heterozygot, amplifikace při FA, CGH negativní; ■ heterozygot, bez amplifikace při FA, CGH pozitivivní ■ heterozygot, bez amplifikace při FA, CGH negativní.

Marker	D3S 3689	D3S 3575	D3S 1268	D3S 3886	D3S 3712	D3S 1614	D3S 3715	D3S 3565	D3S 3609	D3S 1580	D3S 1601	CGH (M1)	Histologie
Lokus	3q25. 31	3q25. 32	3q26. 1	3q26. 1	3q26. 1	3q26. 2	3q26. 32	3q26. 33	3q27. 2	3q28	3q28		
1	Blue	Blue	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Yellow	Blue	White	Blue		D2
2	White	Yellow	Yellow	White	Blue	Blue	White	White	Blue	White	Blue		D1
3	White	Blue	Yellow	White	White	Blue	Blue	White	Blue	White	Blue		D3
4	White	Blue	Blue	Blue	Yellow	White	Blue	White	White	White	Blue		D3
5	Green	Green	Green	White	Green	Green	White	Green	White	Green	Green	3q-	D3
6	Green	Green	Red	White	Green	Green	White	White	Green	White	Red	3q2 4-	D2
7	White	Blue	Blue	White	White	Blue	Blue	White	White	Blue	Blue		D2
8	White	Yellow	Blue	White	Blue	White	Yellow	Blue	Yellow	White	White		N
9	White	Blue	Blue	Blue	White	Blue	Blue	White	Blue	Blue	Blue		CIS
10	Blue	White	White	White	Blue	Blue	Blue	White	Blue	Blue	White		D2
11	White	Green	Green	White	Green	Green	Green	White	Red	White	Green	3q26- 28	D2
12	Green	Green	Green	White	Green	Green	Red	White	White	Red	White	3q-	D3
13	White	Yellow	Yellow	White	Blue	Blue	Blue	Blue	White	Blue	Blue		D2
14	White	Blue	Blue	Yellow	Blue	White	White	White	White	White	Blue		D2
15	Yellow	Yellow	Yellow	White	Blue	Yellow	White	Blue	White	Blue	White		D2
16	White	Yellow	Yellow	White	Blue	White	Blue	White	Blue	White	Blue		D2
17	White	Blue	Blue	White	Yellow	Yellow	White	White	Yellow	White	White		D2
18	Blue	White	White	White	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Blue	White		D2
19	White	Blue	Blue	White	Yellow	Yellow	Blue	White	Blue	Blue	White		CIS
20	Yellow	White	Yellow	White	Blue	Blue	Blue	White	White	Yellow	Blue		D2

Tabulka 4. Korelace amplifikací (gains) mezi fragmentační analýzou (FA) a komparativní genomickou hybridizací (CGH) ve vzorcích ze sliznice odebrané 1 cm od okraje nádoru (M1).

Zkratky: CIS – karcinom in situ; D1, D2 a D3 – mírná, střední a těžká dysplazie; M1 – sliznice 1 cm od okraje nádoru; M2 – sliznice 2 cm od okraje nádoru; N – normální sliznice bez známek dysplazie; T – primární nádor; SCC - spinocelulární karcinom.

Graficky zobrazený výsledek korelace mezi FA a CGH; □ neinformativní allelotypy (5 homozygotů), ■ heterozygot, amplifikace při FA, CGH pozitivivní; ■ heterozygot, amplifikace při FA, CGH negativní; ■ heterozygot, bez amplifikace při FA, CGH pozitivivní ■ heterozygot, bez amplifikace při FA, CGH negativní.

Mar ker	D3S 3689	D3S 3575	D3S 1268	D3S 3886	D3S 3712	D3S 1614	D3S 3715	D3S 3565	D3S 3609	D3S 1580	D3S 1601	C G H (M 2)	Histo logie
Lo kus	3q25. 31	3q25. 32	3q26. 1	3q26. 1	3q26. 1	3q26. 2	3q26. 32	3q26. 33	3q27. 2	3q28	3q28		
1												-	D1
2												-	N
3												-	D2
4												-	D1
5												-	D2
6												-	N
7												-	N
8												-	D1
9												-	D1
10												-	D1
11												-	N
12												-	D1
13												-	D1
14												-	N
15												-	D1
16												-	N
17												-	N
18												-	N
19												-	D2
20												-	N

Tabulka 5. Korelace amplifikací (gains) mezi fragmentační analýzou (FA) a komparativní genomickou hybridizací (CGH) ve vzorcích ze sliznice odebrané 1 cm od okraje nádoru (M1).

Zkratky: CIS – karcinom in situ; D1, D2 a D3 – mírná, střední a těžká dysplazie; M1 – sliznice 1 cm od okraje nádoru; M2 – sliznice 2 cm od okraje nádoru; N – normální sliznice bez známek dysplazie; T – primární nádor; SCC - spinocelulární karcinom.

Graficky zobrazený výsledek korelace mezi FA a CGH; □ neinformativní allelotypy (5 homozygotů), ■ heterozygot, amplifikace při FA, CGH pozitivivní; ■ heterozygot, amplifikace při FA, CGH negativní; ■ heterozygot, bez amplifikace při FA, CGH pozitivivní ■ heterozygot, bez amplifikace při FA, CGH negativní.

5. Diskuze

Vznik zhoubného procesu je komplexní proces akumulace molekulárně genetických změn od normální po nádorovou buňku, tzv. vícestupňový proces kancerogeneze. Počet genetických změn stoupá se stupněm malignity zhoubného procesu, zdaleka ne vždy ale histologický obraz odpovídá stupni molekulárně genetických změn ve vyšetřované tkáni. Je prokázáno, že i histologicky normální tkáň v okolí nádoru vykazuje molekulárně genetické odchylky, které jsou předstupněm maligního zvrhnutí histologicky doposud normální buňky. Klasická histopatologická Slaughterova teorie plošné kancerizace (field cancerization) je s rozvojem molekulárně genetických postupů posunuta na další, subcelulární úroveň. Teorie geneticky alterovaného pole v histologicky normální tkáni je potvrzena mnoha studiemi z poslední doby. Genetické změny v histologicky normální tkáni přilehlé k nádoru tedy pravděpodobně hrají zásadní roli při ozřejmění procesu kancerogeneze. Zároveň jsou tyto změny pravděpodobným podkladem pro častější rekurenci nemoci ve vyšších stádiích, kdy jsme u kohorty našich pacientů potvrdili množství molekulárních změn i v okolí, tedy v histologicky nenádorové tkáni. To je zásadní i proto, že rekurence HNSCC zůstává i přes onkologicky radikální operativu primárního tumoru s histopatologicky nenádorovými okrajovými excizemi poměrně vysoká. Tyto rekurence vznikají zejména v ponechaných tkáních obsahujících prekurzorové léze. Senzitivní detekce těchto lézí, resp. molekulárně poškozených buněk či okrsků tkáně, by měla velký dopad na zlepšení přežití pacientů s HNSCC. Na základě výše uvedených výsledků by mohla být fragmentační analýza chromozomální oblasti 3q26 pokládána za vhodný diagnostický nástroj. Chromozomální lokus 3q26 se ukazuje být jedním z vhodných kandidátů, které obsahují onkogeny zodpovědné za rozvoj HNSCC.

Naše data ukazují, že nádorové změny u HNSCC jsou detekovatelné pomocí fragmentační analýzy (založené na PCR) při použití primerů cíleně zvolených z chromozomálního lokusu 3q26 ve všech našich nádorových vzorcích. Je zásadní, že 1 cm od nádoru jsou amplifikace 3q26 zaznamenatelné v 75 % vzorků a ve vzorcích odebraných 2 cm od nádoru v 60 %. Ve studii, která porovnávala stejné vzorky pomocí CGH analýzy, jsme zjistili zisky (gains) v 70 % nádorových vzorků, 20 % slizničních vzorků odebraných 1 cm od nádoru a v žádném slizničním vzorku ze vzdálenosti 2 cm od nádoru. Toto indikuje vyšší senzitivitu metod založených na PCR, kterými jsou detekovány malé mutace v tkáni v blízkosti HNSCC, oproti větším, rozsáhlejším mutacím detekovatelným např. pomocí CGH.

Z výsledků naší studie vyplývá, že amplifikace markerů pro oblasti 3q25.32, 3q26.1, 3q27.2 a 3q28 (D3S3575, D3S3712, D3S3609, D3S1601) jsou dostatečné pro detekci amplifikace 3q26

u všech 20 nádorových vzorků. Nicméně, abychom detekovali zisky v alelách v maximální možné míře s alespoň jedním pozitivním lokusem (3q-) i ve vzdálenějších vzorcích, je vhodné analyzovat všech 11 podoblastí. I proto může být užitečné pracovat s jiným panelem primerů nebo využít k analýze jiný nejčastěji postižený lokus u HNSCC jako např. 11q nebo 15q za účelem dosažení srovnatelné nebo vyšší senzitivity s menším počtem markerů.

Braakhuis se svými kolegy zavedl pojem „second-field tumor“, do češtiny překládáno jako nádor z druhé oblasti. Předpokládá se, že tyto nádory vznikají ze stejně geneticky alterované a klonálně příbuzné oblasti jako primární nádor. Tyto okrsky mohou být rozsáhlé a zabírat až několik centimetrů v průměru. Sliznice v těchto okrscích se jeví jako histologicky nemaligní, ale může obsahovat časné mutace, které mohou progredovat v premaligní a maligní změny v dalším průběhu onemocnění. Stejná skupina také prokázala stejný původ lokálních rekurencí u více než poloviny druhých primárních tumorů („second-field tumor“) a pouze jedna třetina vzniká z residuálních nádorových buněk.

Pokud tedy slizniční, histologicky nemaligní vzorky v naší studii sdílejí stejné zisky (gains) jako vzorky z nádorů, pak naše data podporují předpokládaný mechanismus společného původu z preneoplastického pole či oblasti. Definovat okrajové excize bez nádoru nebo lépe bez molekulární dysplazie může být vlastně v mnoha případech nemožné. Růst a rozvoj v agresivní nádorovou tkáň nebo druhý primární tumor jsou výsledkem klonální evoluce v histologicky normální, ale molekulárně preneoplasticky změněné sliznici, kdy se během mnohastupňového procesu vyvíjí infiltrativní nádor. Tyto buněčné změny jsou reprezentovány mnoha genetickými změnami. I proto by mohly být v budoucnu rozlišeny časné a pozdní změny adekvátními genetickými markery a dalo by se tak i predikovat, zda je pravděpodobná rekurence primárního onemocnění. Tedy zda je možné detekovat v okolí histologicky zdravé tkáni premaligní molekulární změny vedoucí k pravděpodobnému rozvoji HNSCC, tedy detekovat změny charakteristické pro časnou kancerogenezi HNSCC.

Proto by informace o „molekulární dysplazii“ měla mít velký dopad v prevenci a časně detekci možné rekurence zejména v oblastech v sousedství invazivních lézí. Naše data potvrzují, že molekulární změny potencionálně související s nádorovou rekurencí mohou být identifikovány pomocí fragmentační analýzy. Fragmentační analýza okrajových excizí se může stát rychlou a dostatečně spolehlivou metodou, možná i s využitím v rámci peroperačního vyšetření. Toto může mít klinické konsekvence jak pro intraoperativní potvrzení radikální resekcce nádoru s negativními okraji, tak i pro následný follow-up, tj. sledování průběhu nemoci při následných kontrolách (většinou do 5 let po zahájení terapie). Přednosti vyšetřování okrajových excizí

molekulárně genetickými metodami oproti klasickému histopatologickému vyšetření byly popsány výše a předpokládá se jejich potvrzení v dalších letech, např. v rámci navržení optimálního setu mikrosatelitních markerů.

Informace o vyšší pravděpodobnosti možnosti rozvoje infiltrativního karcinomu by vedla k možnosti časně intervence a lepšího zacílení léčby. Tím se myslí přesnější chirurgický zákrok, modernější strategie chemoradioterapie, ale i imunoterapie a další, tedy cílené, moderní a do klinické praxe zaváděné metody. Zmínka o udělení Nobelovy ceny za medicínu zazněla již v úvodu. Předsedkyně České onkologické společnosti ČLS JEP, paní docentka Prausová, v návaznosti na tuto událost uvedla, že: „*Myslím si, že si to imunoterapie určitě zaslouží, protože je to obrovský převrat v léčebných výsledcích a přežití u onkologických pacientů.*“

Je namístě zmínit fakt, že porucha signalizace přes PD-1 (programed cell death 1; viz zmínka v úvodu na straně 25) může pomáhat nádorovým buňkám pro únik před imunitním systémem, což může vést k toleranci nádoru (Borcoman et al. 2019, Plzák et al. 2019). Je známa také role PD-1 a vztah k PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza). Hlavní funkcí receptoru PD-1 je negativní regulace imunitní odpovědi, to vede ke stimulaci apoptózy. Signalizace přes PD-1 vede k inhibici PI3K. Důsledkem inhibice této signální dráhy je zastavení buněčného cyklu. Katalytická podjednotka alfa fosfatidylinositol-3-kinázy (PIK3CA), která plní funkci onkogenu, má lokus v oblasti 3q26.32, jejíž amplifikace jsme ve studii prokázali jak v oblasti 1 cm, tak 2 cm od okraje nádoru. Je tedy zřejmé, že mikroprostředí v okolí nádoru, které obsahuje i imunitně kompetentní buňky, a alterace jejich normální funkce charakterizovaná zvýšenou expresí PIK3CA, se může spolupodílet na progresi nádorových změn.

Monoklonální protilátka proti PD-1, např. pembrolizumab či nivolumab, ve svém důsledku zvyšuje T-buněčnou odpověď a zprostředkovává tedy protinádorovou odpověď. V současné době platí, že tato je velmi nadějnou imunoterapeutickou metodou, která je již zavedena v kombinované terapii u pokročilého onemocnění nejenom u melanomu a karcinomu močového měchýře, ale i u HNSCC.

V budoucnu by se mohlo jednat v predikci informativních změn i o průkaz neinvazivními metodami, např. vyšetřením ze slin nebo i z krve. Tyto metody byly rozpracovány v další studii výzkumné skupiny ORL kliniky 1.LU UK a FN v Motole, kdy byly zkoumány cirkulující nukleové kyseliny v periferní krvi u pacientů s HNSCC (viz níže), a která je v příloze disertační práce uvedena ve formě publikovaného článku.

Cirkulující nukleové kyseliny

Kancerogeneze a růst tumoru jsou komplexní a progresivní procesy, které jsou spojeny s celou řadou genetických i epigenetických alterací, které mohou být detekovány v plazmě nebo v séru. Ačkoliv je historie využití cirkulujících nukleových kyselin (CNAs) jako potencionálních biomarkerů dlouhá, studií, které by kombinovali jejich použití spolu s celogenomovými microarray analýzami, není mnoho. Naše dřívější studie zaměřené celý genom vycházely z analýzy solidní tkáně, přičemž prokázaly odlišnosti mezi tumorózní tkání a tkání odebrané s histologicky zdravé sliznice v okolí nádoru. Podařilo se prokázat, že v peritumorózní tkáni (1 cm od okraje nádoru) je vyšší parakrinní sekrece některých růstových faktorů (např. IGF-2, BMP-4). Tato vyšší aktivita může vysvětlovat biologické změny stromálních fibroblastů v keratinocyty různého fenotypu, přičemž některé aktivované keratinocyty získávají vzhled keratinocytů dlaždicobuněčného karcinomu nebo keratinocyt hojící se kůže.

Ve světle těchto experimentů jsme se pokusili zaměřit na markery potencionálně přítomné v séru osob s tumorem. Výsledky této jsou součástí publikace MUDr. Čapkové, na které se MUDr. Jan Kastner spolupodílel jako spoluautor. Publikovaný článek je uvedený v příloze.

Úvaha o medicínsko–ekonomických vazbách nejenom v rámci péče o pacienty s HNSCC

Kosmetický či funkční hendikep po operativě nádoru v oblasti ORL je pro mnohé z pacientů zdravotně i sociálně značně zatěžující. Jedná se o potíže spojené s poruchou funkce hlavových nervů, ztrátou hlasu, problémy s polykáním, asymetrií obličeje a krku a d.) a proto je v některých vyspělých zemích patrný trend preferovat primárně nechirurgická léčebná schémata založená na kombinaci chemoterapie a radioterapie i při lokálně pokročilé nemoci ve stadiu III – IV. Nakolik je tento trend vyhrazen ekonomicky silným zdravotním systémům je předmětem diskuzí na odborných fórech i otázkou pohledu (chirurg, onkolog, ekonom aj.). Jsou uváděna medicínsko-ekonomická hlediska, která poukazují na výrazně ekonomicky více zatěžující ohodnocení lidské práce zdravotníků v západních zemích, nežli je finančně zatěžující práce přístroje (zářiče) či léků (byť čím dál dražších). Možná se s nástupem ekonomicky náročné biologické terapie, ale i cílenější a dražší radioterapie (protonové zářiče) obrátí opětovně trend a primárně chirurgická terapie se bude dostávat do popředí i v oněch výše zmíněných regionech.

Autor disertace, jako zástupce odborné společnosti ČSORLCHHK ČLS JEP v Komisi pro lékovou politiku a kategorizaci ČLS JEP, v posledních několika letech zblízka sleduje, jak se nejenom zdravotní pojišťovny, ale i Ministerstvo zdravotnictví obávají nástupu cílené léčby i terapie vzácných onemocnění, zejména metabolických, tedy orphanů a ultraorphanů. Je možné vidět, jak se komerční nadnárodní farmaceutické firmy snaží obcházet SÚKL, jak se využívá nebo spíše zneužívá § 16 zákona č. 48/1997 Sb. Fakt, že se tohoto vývoje obávají i zdravotní pojišťovny, která pro nás zdravotníky byly dosud spíše nepřítelem a „kvočnou“ na penězích, kterých samozřejmě není nikdy a nikde dost, může při špatném nastavení pravidel znamenat ohrožení rozumného financování zdravotnictví, zejména na úkor ohodnocení práce zdravotníků ve prospěch farma-firem. Pravda samozřejmě není černobílá a financí nikdy nebude dost. V médiích se běžně ke čtenáři dostávají články o „Experimentálních léčivech“. Letos prý bude pojišťovnam stačit 100 miliónů Kč, ale za 10 let už by to mohlo být 30 miliard. Jenom podotýkám, že na celý segment vědy a výzkumu vydává Česká republika z veřejných zdrojů obdobnou částku (v roce 2018 to bylo 31,4 mld Kč; zdroj web ČTK). Je smutné, že např. roční dotace na solární energii, či spíše pochybné projekty tzv. „solárních baronů“, které hyzdí krajinu s loukami namísto zelené trávy solárními panely, stojí obdobnou částku (27 mld Kč pro rok 2019).

Nezbývá než doufat, že ve státním rozpočtu „něco“ zbyde na platy zdravotníků v nemocnicích a nebude nijak zásadně „osekána“ ani ambulantní specializační péče, byť k tomu některé kroky pojišťoven i Ministerstva zdravotnictví směřují. Neboť optimální vyšetření rizikových pacientů

i optimální dispenzarizace onkologických pacientů s využitím moderních diagnostických metod v podmínkách primární péče nebo v ordinacích ambulantních specialistů může předejít pozdní klinické diagnostice a rozvoji hůře terapeuticky ovlivnitelných vyšších stadií zhoubných nádorů (Zábrodský et al. 2012).

Podobným příkladem této filozofie, byť ne přímo se týkající onkologické problematiky, jsou doporučené postupy v rámci diagnostiky rinosinusitidy uveřejněné jako Mezinárodní konsenzu o rinosinusitidě (International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis; ICOS 2016) (Orlandi et al. 2016). Ve Spojených státech amerických je v posledních letech diskutována otázka, zda by v rámci cost/benefit parametrů zdravotnického systému nebylo optimální v diagnostice chronické rinosinusitidy nahradit endoskopické vyšetření nosu vstupním CT vyšetřením jako primární diagnostickou metodou. Významným medicínským důvodem této snahy je fakt, že nosní endoskopie je v části případů CRS falešně negativní, tzn. že nález v nose nekoresponduje se stavem VDN a se symptomatologií. To může platit i u pacientů po již absolvovaném endonazálním endoskopickém výkonu na dutinách. V oblasti primární péče, ale i u specialistů jsou často navíc nadužívána ATB u onemocnění, jakými jsou nejen prostá virová rýma, ale i chroničtější onemocnění jako alergická rinitida, zubní nebo neuralgické syndromy. U těchto stavů je endoskopický nález ne zcela přesvědčivý, případně normální, a primární provedení CT by tudíž přispělo k vyloučení diagnózy rinosinusitidy. Podle amerických závěrů uvedených v rámci ICOS 2016 je CT vyšetření indikované nejen při pozitivní symptomatologii a nejasném endoskopickém nálezu, případně před plánovanou chirurgickou léčbou (FESS), ale i v rámci diagnostického protokolu u chronické rinosinusitidy jako metoda první volby namísto nosní endoskopie. Dalším významným faktorem výše uvedených postupů je cena obou diagnostických metod v USA. V ČR, kde je práce lékaře finančně podhodnocena, a to jak na klinických pracovištích, tak i v ambulantní sféře, takové „problémy“ zatím nikdo řešit nemusí.

Průměrná platba za diagnostickou nosní endoskopii (nezávisle na tom, zda rigidní, nebo flexibilní) činila v roce 2014 podle americké federální agentury Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS) 212 USD. Tyto náklady by měly pokrývat čas specialisty k provedení výkonu i k vyhodnocení nálezu, kapitál potřebný k nákupu vybavení jakož i výdaje potřebné ke sterilizaci a udržování endoskopu. Platba za CT vyšetření VDN činila podle CMS v roce 2014 průměrně 208 USD (jedná se tedy o podobnou částku jako u endoskopie). Ta opět hradí náklady spojené se zohledněním kapitálové investice na pořízení přístroje, technické provedení vyšetření i vyhodnocení nálezu specialistou (Orlandi 2016). Hodnota práce otorinolaryngologa

v České republice v rámci platby od zdravotních pojišťoven za diagnostickou nosní endoskopii (rigidní či flexibilní) činila v roce 2018 přibližně 250 bodů (jeden bod odpovídá přibližně jedné koruně). Prosté CT VDN je pak v roce 2016 ohodnoceno přibližně 1300 body, CT s kontrastem má hodnotu kolem 2150 bodů. Prostý RTG snímek VDN je ohodnocen přibližně 210 body. Pokud si uvědomíme neporovnatelnou hodnotu výsledného nálezu pro orientaci v oblasti VDN mezi CT vyšetřením a prostým RTG vyšetřením, i fakt, že cena za vyžádaný výkon je v případě CT jen asi 6× vyšší, možná ubude do jisté míry nesmyslně prováděných prostých RTG snímků VDN v diagnostickém procesu u akutní rinosinuitidy. A naopak chronická rinosinuitida by mohla být díky přesnější diagnostice pomocí CT dříve a lépe účinně léčena.

Experimentální chirurgie ?

Obor Experimentální chirurgie studia Biomedicíny rozhodně neznamena začít experimentovat se zavedenými chirurgickými technikami. Je nicméně možné, a dokonce velmi pravděpodobné, že lepší poznání časné kancerogeneze pomůže diagnostikovat malignitu v nižších stádiích onkologického onemocnění s jasně lepšími výsledky stran morbidity i přežití.

Na druhou stranu, stále bohužel platí, že část pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku, má leckdy nízké socio-ekonomické zázemí, zanedbává preventivní vyšetření, o své zdraví nepečuje (byť ne u všech pijanů a kuřáků tomu tak musí být). Tato typická skupina našich pacientů nedává příliš optimismu k výrazně lepším diagnostickým výsledkům na základě časné kancerogeneze. Tito bývají diagnostikováni během pokročilé kancerogeneze. A proto se vyplatí nezapomínat „staré dobré“ chirurgické postupy, přístupy a techniky, které mohou zachraňovat život onkologicky nemocného i v pozdějších vyšších stádiích.

V našich zemích převažuje i u pokročilého HNSCC, pokud je operabilní, stále chirurgie. Onkologická terapie je u HNSCC spíše adjuvantní, samotná radioterapie může být i primární, zejména u karcinomu tonzily nebo karcinomu hrtanu. To, zda je důvodem nižší cena ohodnocení lékaře oproti stavu v severozápadní Evropě či Severní Americe ve srovnání s nepoměrně vyššími náklady na běžnou chemoradioterapii, případně ještě nepoměrně dražší biologickou terapii, je otázka do celospolečenské diskuze a spíše pro politiky. Ostatně i nastavení ohodnocení práce zdravotníků v našich zemích ve středně-dlouhodobém horizontu je dobré zvolit tak, aby i v budoucnu jsme měli vůbec nějaké lékaře, kteří budou zajišťovat složitější chirurgické výkony, nejenom v ORL oboru.

6. Závěr

ad A)

Prokázali jsme, že molekulárně genetické změny ve formě mikrosatelitních aberací (amplifikací) jsou přítomny i v histologicky zdravé tkáni přiléhající k nádoru. Jejich počet je nepřímo úměrný vzdálenosti od nádoru, tedy je nejvyšší v tkáni těsně přiléhající k nádoru a se zvyšující se vzdáleností od nádorové tkáně jich ubývá.

Výsledky této studie přispívají k průkazu geneticky alterovaného pole v okolí nádoru, tedy že v histologicky zdravé tkáni v okolí nádoru jsou již přítomny prekurzorové geny (onkogeny) zodpovídající za časnou fázi kancerogeneze.

ad B)

Mezi zkoumanými lokusy jsme prokázali vysokou prevalenci genetických změn v oblasti 3q26-28 nejenom v nádorové, ale i přilehlé histologicky zdravé tkáni.

Bližší zacílení výzkumu na jednotlivé lokusy v kombinaci s ostatními metodami, jako jsou CGH, ale i metody genové exprese a proteomiky, včetně analýzy cirkulujících nukleových kyselin, pomůže odhalit geny zodpovědné za časnou fázi kancerogeneze a tím snad i jejich využití jako markerů rozvoje nebo recidivy maligního onemocnění. Je zmíněna možná role amplifikace genetického materiálu v lokusu 3q26 i role PIK3CA.

Pro zlepšení prognózy pacientů a snížení post-terapeutické morbidity je zásadní rozpoznat maligní proces nebo jeho rekurenci během ranných stadií. Navíc, nutnost excize nádoru s lemem histologicky nenádorové tkáně značně poškozuje kvalitu života pacienta vzhledem k zásahu v esteticky viditelné oblasti hlavy a krku, ale i v oblasti dýchacích a polykacích cest, důležitých cév a nervových pletení, někdy i v oblasti baze lební a smyslových orgánů a drah (zrak, sluch, čich, chuť). Přesto i při kompletním odstranění nádorové tkáně dochází v horizontu 5 ti-leté dispenzarizace ve více než polovině případů k selhání léčby. Proto je zásadní, aby při nutném zachování dostatečné radikality léčby, docházelo zároveň k ochraně pacientů před zbytečně agresivními postupy, které zhoršují funkční výsledky. Zásadní je identifikace biomarkeru zapojeného do procesu časně kancerogeneze.

Poznatky o časně kancerogenezi u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku zaměřené zejména na možné prekurzorové molekulární změny v nenádorové tkáni v sousedství nádoru, které souvisí s možnou vyšší expresí onkogenů v těchto oblastech, tvoří základní linii této disertační práce. Autor uvádí i pravděpodobné molekulárně biologické trendy, které mohou přispět k dalšímu poznání časně fáze kancerogeneze u tohoto typu karcinomu a tím i zlepšit detekci, výhledově pak i léčbu tohoto zhoubného onemocnění. Tyto změny by mohly hrát i velkou roli v rozpoznání možné vyšší pravděpodobnosti rozvoje rekurence a tím i časnějšímu provedení a zacílení příslušné terapie.

Práce je zaměřena zejména na možnost využití mikrosatelitních amplifikací při detekci možných onkogenů. Fragmentační analýza pomocí primerů z chromozomálního lokusu 3q26 prokázala, že molekulární změny charakteristické pro nádorové změny, amplifikace genetického materiálu, jsou detekovatelné i v přilehlé, histologicky zdravé tkáni.

Fragmentační analýza okrajových excízi by se mohla při správném nastavení setu mikrosatelitů stát dostatečně spolehlivou metodou jak k detekci specifických premaligních změn u dysplázií, tak i možné rekurence. V predikci časných molekulárně genetických změn je možné využití, mezi dalšími metodami, i průkazu vyšetřením genové exprese pomocí mikroarrayí přímo z krve, tzv. analýzou cirkulujících nukleových kyselin.

7. Použitá literatura

1. Alterio D, Marvaso G, Maffini F, Gandini S, Chiocca S, Ferrari A, Preda L, Rocca MC, Lepanto D, Fodor C, et al: Role of EGFR as prognostic factor in head and neck cancer patients treated with surgery and postoperative radiotherapy: Proposal of a new approach behind the EGFR overexpression. *Med Oncol*, 2017; 34: 107
2. Borcoman E, De La Rochere P, Richer W, et al. Inhibition of PI3K pathway increases immune infiltrate in muscle-invasive bladder cancer. *Oncoimmunology*. 2019; 8(5): e1581556. doi:10.1080/2162402X.
3. Bouček J et al. Regulační T lymfocyty a jejich význam pro zhoubné novotvary hlavy a krku. *Praktický lékař*, 2009; 89(1): 16-19
4. Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M 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(1-2): 426-433
5. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003; 63: 1727–1730
6. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 317–322
7. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist* 2005; 10(7): 493-500.
8. Brieger J, Kastner J, Gosepath J, Mann WJ Evaluation of microsatellite amplifications at chromosomal locus 3q26 as surrogate marker for premalignant changes in mucosa surrounding head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet*. 2006; 167(1): 26-31
9. Brieger J, Jacob R, Riazimand HS et al. Chromosomal aberrations in premalignant and malignant squamous epithelium. *Cancer Genet. Cytogenet*. 2003; 144(2), 148-155
10. Cada Z, Boucek J, Dvoranková B et al. Nucleostemin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 2007; 27(5A): 3279-3284
11. Califano J, van der Riet P, Westra W et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerisation. *Cancer Res*. 1996, 56(11): 2488-2492

12. Capkova M, Sachova J, Strnad H, et al. Microarray analysis of serum mRNA in patients with head and neck squamous cell carcinoma at whole-genome scale. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 408683
13. Esser D, Anke S, Roessner A, Freigang B. Second carcinomas in cancers of the mouth cavity, pharynx and larynx. Clinical, histopathologic and cell kinetic findings. *Laryngorhinootologie* 2000; 79: 478–82
14. Feldman R, Gatalica Z, Knezetic J et al. Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2015; 38 (Suppl 1): 1625–1638
15. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *NEJM* 2001, 27, 345(26), 1890-1900
16. Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer - an update of recent developments. *Head Neck Oncol.* 2010; 2:8.
17. Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., Thun, M. Cancer statistics, 2001 *CA Cancer J. Clin.* 2001, 51(1), 15-36
18. Ha PK, Pilkington TA, Westra WH, Scubba J, Sidranski D, Califano J. Progression of microsatellite instability from premalignant lesions to tumors of the head and neck. *Int J Cancer.* 2002;102: 615–617.
19. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E et al: Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 541-550
20. Hashimoto Y, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Shimizu N, Nakano T, Imate Y, Yamashita H, Sasaki K. Amplification of 3q26~qter correlates with tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;129: 52-56.
21. Chiesa F, Tradati N, Mauri S. et al. Prognostic factors in head and neck oncology: a critical appraisal for use in clinical practice. *Anticancer Res.* 1998, 18(6B), 4769-4776.
22. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, Hopman AH, Ramaekers FC, Speel EJ. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer,* 2008; 122: 2656-2664

23. Huang J, Zhang J, Shi C, Liu L, Wei Y. Survival, recurrence and toxicity of HNSCC in comparison of a radiotherapy combination with cisplatin versus cetuximab: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2016;16(1): 689
24. Kalfeřt D, Ludvikova M, Topolcan O et al. Serum Levels of IGF-1 and IGFBP-3 in Relation to Clinical and Pathobiological Aspects of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res*. 2017; 37(6): 3281-3286
25. Kozakiewicz P, Grzybowska-Szatkowska L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2018; 15(5): 7497-7505
26. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL et al. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res*. 2004, 10(11): 3755-3762
27. Lee MH, Tung-Chieh Chang J, Liao CT, Chen YS, Kuo ML, Shen CR. Interleukin 17 and peripheral IL-17-expressing T cells are negatively correlated with the overall survival of head and neck cancer patients. *Oncotarget*. 2018; 9(11): 9825–9837
28. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M et al.. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2006; 24: 5630-5636
29. Lo Nigro C, Denaro N, Merlotti A, Merlano M. Head and neck cancer: improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Manag Res*. 2017; 9: 363–371
30. López-Verdín S, Lavallo-Carrasco J, Carreón-Burciaga RG, et al. Molecular Markers of Anticancer Drug Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Literature Review. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(10): 376
31. Lukeš P, Zábrodský M, Lukešová E, Plzák J, Chovanec M, Astl J, Betka Jr, Betka J. Narrow Band Imaging (NBI) - endoskopická metoda pro diagnostiku karcinomů hlavy a krku. *Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/, 2013, 62(4): 173-179*
32. Lukeš P, Zábrodský M, Plzák J, Chovanec M, Foltynová E, Betka Jr, Kastner J, Betka J. Úloha NBI v endoskopické diagnostice dlaždicových karcinomů hlavy a krku. *Endoskopie 2012; 21(1): 15-19*
33. Lukesova E, Boucek J, Rotnaglova E, et al. High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 303929

34. Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P et al. European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol Suppl.* 2010. Suppl 22: 1-143
35. Matta A, Ralhan R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* 2009; 1: 6
36. Medintz I, Lee CR, Wong WW, Pirkola K, Sidransky D, Mathies RA. Loss of heterozygosity assay for molecular detection of cancer using energy-transfer primers and capillary array electrophoresis. *Genome Res* 2000;10:1211-1218.
37. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*, 2000; 89: 300-304
38. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006; 24 (Suppl 3): 1-10
39. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016; Suppl 1: 1-209
40. Parkin D M, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 2006; 24 (Suppl 3): 11-25
41. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E and Bourhis J; MACH-NC Collaborative Group: Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009; 92: 4-14
42. Plzák J, Lacina L, Chovanec M, Dvoránková B, Szabo P, Čada Z, Smetana K Jr. Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Res.* 2010; 30(2): 455-462
43. Plzák J, Bouček J, Bandúrová V, et al. The Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Microenvironment as a Potential Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2019; 11(4): 440. doi:10.3390/cancers11040440
44. Priante AV, Castilho EC, Kowalski LP. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. *Curr Oncol Rep.* 2011; 13(2): 132-137
45. Riazimand SH, Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Jacob R, Mann WJ. Investigations for fine mapping of amplifications in chromosome 3q26.3-28 frequently occurring in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology* 2002;63:385-392.

46. Rotnáglová E, Tachezy R, Saláková M, et al. HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *International Journal of Cancer*. 2010; 129: 101–110
47. Smilek P. Molekulární prediktory u nádorů hlavy a krku Molecular Predictors in Head and Neck Tumours. *Klin Onkol (CZ)* 2010; 23(4): 218–223
48. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 2005; 6(4): 345-352
49. Salzman R, Pácal L, Tomandl J, Kanková K, Tóthová E, Gál B, Kostrica R, Salzman P. Elevated malondialdehyde correlates with the extent of primary tumor and predicts poor prognosis of oropharyngeal cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29(10): 4227-4231
50. Salzman R, Kanková K, Pácal L, Tomandl J, Horáková Z, Kostrica R. Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasma*. 2007; 54(4): 321-325
51. Schaefer C, Kim GG, Albers A et al. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer*, 2005; 92(5): 913-920
52. Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bosl G, Cordon-Cardo C, Shah JP, Rao PH. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 2002;161: 365-371.
53. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 6(5): 963-968
54. Smart A, Martin P, Parker M. Tailored medicine: whom will it fit? The ethics of patient and disease stratification. *Bioethics* 2004, 18(4), 322-342
55. Statistická ročenka České republiky, Zemřelí podle příčin smrti. 2002, 2016.
56. Szukala K, Brieger J, Bruch K, Biczysko W, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K. Loss of heterozygosity on chromosome arm 13q in larynx cancer patients: analysis of tumor, margin and clinically unchanged mucosa. *Med Sci Monit* 2004;10: 233-240.
57. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Fri. 20 Sep 2019. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary/>
58. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews*, 2008; 8(7): 523-532

59. Vigneswaran N and Williams MD: Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2014; 26: 123-141
60. Wang Y, Hung SC, Linn JF, Steiner G, Glazer AN, Sidransky D. Microsatellite-based cancer detection using capillary electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis*. 1997; 18: 1742–1749.
61. Whiteside, T.L. Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor. *Curr cancer drug targets*, 2007; 7(7): 633-642.
62. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research* , 2001; 61(12): 4766-4772.
63. Zabrodsky M, Lukes P, Lukesova E, Boucek J, Plzak J. The role of narrow band imaging in the detection of recurrent laryngeal and hypopharyngeal cancer after curative radiotherapy. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 175398
64. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286-2302

8. Seznam publikací

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

1a) s IF

- **Kastner J**/Brieger J, Gosepath J, Mann W.J. Evaluation of microsatellite amplifications at chromosomal locus 3q26 as surrogate marker for premalignant changes in mucosa surrounding head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 167(1), 2006, 26-31 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise, onkologie, chirurgie hlavy a krku. IF = 1,544.

- Čapková M, Šáchová J, Strnad H, Kolář M, Hroudová M, Chovanec M, Čada Z, Šteffl M, Valach J, **Kastner J**, Vlček Č, Smetana K, Plzák J. Microarray analysis of serum mRNA in patients with head and neck squamous cell carcinoma at whole-genome scale. *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 408683, 10 pages, 2014. - původní článek ve vědeckém časopise. IF = 2,880.

součet IF: 4,424

1b) bez IF

- **Kastner J**, Bouček J, Betka J, Plzák J, Jáchymová M, Betka J. Časná kancerogeneze u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. *Praktický lékař*, 88(9), 2008, 501-505 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise

- Bouček J, Betka J, **Kastner J**, Betka J, Eckschlager T, Říhová B. Regulační T lymfocyty a jejich význam pro zhoubné novotvary hlavy a krku. *Praktický lékař*, 89(1), 2009, 16-19 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise

- Plzák J, Zábrodský M, **Kastner J**, Klozar J, Betka J. Unexpected Tonsillar Carcinoma in a Sleep Apnea Patient – Is Routine Histopathology After Tonsillectomy Avoidable? *Open Otorhinolaryngology Journal*, 3(1), 2009, 33-35 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

2a) s IF

- **Kastner J**, Lisý J, Taudy M, Grabec P, Betka J. Review on orbital and intracranial complications after acute rhinosinusitis. *Rhinology*, 48 (4), 2010, 457-461 - přehledový článek ve vědeckém / odborném časopise. IF = 0.803
- Plzák J, Macokova P, Zabrodsky M, **Kastner J**, Lastuvka P, Astl J. Influence of radiofrequency surgery on architecture of the palatine tonsils. *BioMed Research International. Special Issue on Endoscopic/External Approaches in Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery* (přijato, v tisku). IF = 2.880
- Plzak J, Zabrodsky M, **Kastner J**, Betka J Klozar J. Combined bipolar radiofrequency surgery of the tongue base and uvulopalatopharyngoplasty for obstructive sleep apnea. *Arch Med Sci. Arch Med Sci*, 2013, 9(6), 1097-1101 - původní článek ve vědeckém časopise. IF = 1,067
- Plzák J, Zábrodský M, **Kastner J**, Klozar J. Nasal surgery for sleep-disordered breathing. *Skull Base - An Interdisciplinary Approach*, 16(Suppl. 2), 2006, 12-12 - abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise, 1531-5010, ORL - spánková medicína. IF = 0.500
- Zábrodský M, Bouček J, **Kastner J**, Kuchař M, Chovanec M, Betka J. Immediate revision in patients with bilateral recurrent laryngeal nerve palsy after thyroid and parathyroid surgery. How worthy is it? *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 32(4), 2012, 222-228 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise. IF = 0.786

součet IF: 6,822

2b) bez IF

- **Kastner J**, Kuchař M, Zábrodský M, Balatková Z, Hroboňová J, Plzák J, Lisý J, Betka J. Chronická hypertrofická rinitida rezistentní na konzervativní terapii – porovnání různých chirurgických technik mukotomie/turbinoplastiky (včetně ekonomické analýzy). *Otorinolaryngologie a foniatrie*, roč. 61(3), 2012, 162-171 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise
- **Kastner J**, Kastnerová E, Pelikán L, Kopecký K. ORL diagnostika v oblasti horních cest dýchacích u dětí – současné trendy. *Zdravotnické Noviny*, 61(12), 2012, 5 - přehledový článek

- **Kastner J**, Zábrodský M, Astl J, Zvěřina E, Mrzena L, Šram F, Švec J, Kastnerová E, Betka J. Chirurgická léčba jednostranné parézy zvrtného nervu. Endoskopie, 19(1), 2010, 21-27 - přehledový článek ve vědeckém / odborném časopise
- **Kastner J**, Bouček J, Taudy M, Lisý J, Betka J. Komplikovaná akutní rinosinitida. Praktický lékař, 89(12), 2009, 689-691 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise
- **Kastner J**, Zábrodský M, Astl J, Zvěřina E, Lukeš P, Betka J. Videokymografie a digitální kymografie, kymografické nálezy u pacientů po thyreoidektomii. Endoskopie, 18(2), 2009, 64-66 - přehledový článek ve vědeckém / odborném časopise
- Klozar J, Betka J, **Kastner J**. Operační léčba orofaryngeálních tumorů přesahujících na hrtan. Otorinolaryngologie a foniatrie, 50, 2001, 3-5 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise
- Plzák J, Zábrodský M, **Kastner J**, Klozar J, Betka J. Uvulopalatofaryngoplastika kombinovaná s radiofrekvenční termoterapií kořene jazyka v léčbě obstrukčního syndromu spánkové apnoe. Otorinolaryngologie a foniatrie, 58(3), 2009, 140-143 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise
- Lukeš P, Zábrodský M, Plzák J, Chovanec M, Foltynová E, Betka J, **Kastner J**, Betka J. Úloha NBI v endoskopické diagnostice dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Endoskopie, 21(1), 2012, 16-20 - přehledový článek ve vědeckém / odborném časopise
- Zábrodský M, Lukeš P, Bouček J, **Kastner J**, Kuchař M, Chovanec M, Betka J. Okamžité revize u pacientů s oboustrannou obrnou zvrtných nervů po operaci štítné žlázy a příštítných tělísek. Otorinolaryngologie a foniatrie, 61(2), 2012, 104-111 - původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Kapitoly v monografii

- v anglickém jazyce

Lasers for Medical Applications,

Jelínková H et al.

Woodhead Publishing Limited. 2013

ISBN: 978-0-85709-237-3

(spoluautor kapitoly 18: Lasers in otorhinolaryngology (ORL) and head and neck surgery

Betka J, Plzák J, Kastner J, Zábrodský M, Bouček J. pp 556-572)

Diseases of the Sinuses. A Comprehensive Textbook of Diagnosis and Treatment

Chang CC, Incaudo GA, Gershwin ME et al.

Springer-Verlag, New York, 2014.

ISBN 978-1-4939-0264-4

(hlavní autor kapitoly 27: Orbital and Intracranial Complications of Acute and Chronic Rhinosinusitis. Kastner Jan MD (et al.), pp 495-515)

- v českém jazyce

ORL pro praktické lékaře. Plzák J et al.
RAABE, 2011. ISBN: 978-80-86307-90-9
(autor kapitoly)

Poruchy čichu a chuti. Vodička J, Faitlová H et al
Tobiáš, 2012. ISBN: 978-80-7311-125-0
(autor kapitoly)

Endoskopická chirurgie spodiny lební. Lipina R, Matoušek P et al.
Tobiáš, 2014. ISBN: 978-80-7311-139-7
(spoluautor)

Rinosinusitidy. Schalek P, Kaňa R, Kastner J, Kučera P.
Mladá fronta, 2016. ISBN: 978-80-204-4175-1
(autor 3 kapitol)

Ultrazvuk v otorinolaryngologii. Astl J et al.
Tobiáš, 2020. V přípravě k tisku.
(autor a spoluautor 3 kapitol)

Ocenění, zahraniční stipendia

Kutvirtova cena - cena České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku za nejlepší publikaci

2014

Kastner, J., Simmen, D., Netuka, D., et al.: Orbital and Intracranial Complications of Acute and Chronic Rhinosinusitis. Diseases of the Sinuses, Springer, 2014, 2014, pp 495-515

Laureát Kutvirtovy ceny (hlavní autor)

2016

Schalek, P., Kaňa, R., Kastner J., a kol. Rinosinusitidy. Praha: Mladá fronta, 2016, ISBN 978-80-204-4175-1

Nejlepší publikace v kategorii monografie (spoluautor)

Stipendia Evropské rinologické společnosti (ERS; European Rhinologic Society) a Evropské Akademie Plastické Chirurgie Obličeje (EAFPS; European Academy of Facial Plastic Surgery)

2006 : FESS course – basic and advanced technique (Štýrský Hradec, Rakousko)

2008 : Facial plastic and reconstructive surgery (Nijmegen, Holandsko)

2010 : Functional aesthetic surgery of the nose (Ulm, Německo)

Účast na grantových projektech

GAUK : 203435

Studium časně kancerogeneze u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. 2006 - 2008

Hlavní řešitel

IGA MZ ČR : NS9908

Chronická hypertrofická rhinitida rezistentní na konzervativní terapii - srovnávací studie medicínského a socioekonomického efektu různých chirurgických technik. 2008 – 2010

Hlavní řešitel

IGA MZ ČR : NS9901

Změny ve videokymografickém obraze a objektivní hlasové analýze při aplikaci minimálně invazivních technologií a neuromonitorace v chirurgii patologií štítné žlázy. 2008 – 2011

Spoluřešitel

IGA MZ ČR : NT11544

Využití zobrazení NBI v časně detekci rekurentních hrtanových a faryngeálních nádorů u pacientů léčených radioterapií. 2010 – 2015

Spoluřešitel

IGA MZ ČR : NT11542

Význam infiltrujících imunokompetentních buněk pro rozvoj spinocelulárních karcinomů z oblasti hlavy a krku. 2010 - 2015

Spoluřešitel