A) PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

1. DLAŽDICOBUNĚČNÉ KARCINOMY HLAVY A KRKU

Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, **HNSCC**) jsou zhoubné novotvary vycházející z epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému. Z biologického hlediska jsou charakterizovány lokální agresivitou, tendencí k zakládání regionálních lymfatických a méně často vzdálených metastáz, sklonem k časnému lokálnímu a regionálnímu lymfatickému recidivování a vysokou frekvencí výskytu mnohočetných nádorů. Tvoří 85-90% všech karcinomů hlavy a krku, ke kterým patří karcinomy dutiny nosní a vedlejších dutin nosních, dutiny ústní, hltanu, hrtanu, slinných žláz a štítné žlázy (Vokes et al., 1993). Jde o nejčastější maligní onemocnění současně postihující lidskou komunikaci a přežití.

Jsou-li včas diagnostikovány a odpovídajícím způsobem léčeny, jsou šance na přežití a vyléčení poměrně vysoké. Bohužel většina pacientů přichází až v pokročilém stádiu. Je tedy smutný fakt, že přes pokroky v diagnostice a léčbě v posledních třech dekádách nedošlo k výraznému zlepšení prognózy a tak i nadále patří mezi malignity s největší mortalitou vůbec. Díky značným pokrokům však umíme vyléčit minimálně stejné množství pacientů za cenu nižší morbidity s léčbou spojené. K tomuto přispělo a přispívá prohlubující se porozumění příčinám a procesům spojeným s jejich vznikem a progresí, definování nových a přesnějších prognostických znaků, zavádění nových léčebných modalit a standardizace léčebných postupů.

1.1. EPIDEMIOLOGIE

Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku představují asi 5% z nově diagnostikovaných malignit. Každým rokem je celosvětově registrováno na 500 000 nových případů (Jemal et al., 2003). Incidence se zvyšuje s věkem (Klozar a Betka, 2003). Maximum výskytu je v páté a šesté dekádě. Postižení lidí mladších 30 let je vzácné (Devesa et al., 1995). Nejčastěji se setkáváme s postižením dutiny ústní, hltanu a hrtanu.

Více než 90% karcinomů hlavy a krku vzniká v souvislosti s expozicí známým karcinogenům (Spitz et al., 2003). Nejdůležitější z těchto jsou abusus tabáku a jemu podobných substancí (Kjaerhaim et al., 1998; Klozar a Betka, 2003). Mezi další identifikované etiologické faktory patří viry, genetická predispozice, karcinogeny v pracovním prostředí, expozice radiaci a složení potravy.

Tabák obsahuje komplexní směs řady definovaných karcinogenů uplatňujících se v různých fázích karcinogeneze. Z hlediska expozice je délka významnější než její intenzita. Zvýšené riziko vzniku přetrvává u těžkých kuřáků minimálně po dobu patnácti let (Cann et al., 1985). Expozice **alkoholu** je zpravidla doprovázená expozicí tabáku a uplatňuje se jako agens potenciující tabákem indukovanou karcinogenezi (Blot et al., 1988). Tento efekt je nejvýraznější při vysoké expozici oběma těmto faktorům.

Lidské papiloma **viry** (Human papilloma virus, HPV) jsou v dlouhodobém měřítku považovány za faktor uplatňující se v etiopatogenezi benigních a maligních epiteliálních nádorů. Nejvíce je prostudována jejich role při vzniku karcinomů ženského pohlavního systému. V oblasti hlavy a krku se HPV infekce uplatňuje při vzniku laryngeální papilomatózy, papilomů dutiny ústní a nosní (Steinberg, 2003). Na úlohu HPV infekce při vzniku karcinomů hlavy a krku poukázala maligní transformace laryngeálních papilomů (Rehberg a Kleinsasser, 1999). Uplatňuje se též při vzniku verukozních karcinomů. Prevalence detekované HPV DNA ve tkáni konvenčních HNSCC je extrémně variabilní (0 - 100%). Rozdíly je možné zčásti vysvětlit odlišnostmi v technice zvolené k detekci (Morrison et al., 1992). Obecně je uznáván podíl této infekce na vznik části z těchto malignit, nejčastěji v oblasti orofaryngu, především tonzily (Gillison et al., 2000).

Karcinom nosohltanu, bez ohledu na histologický subtyp (WHO I-III), geografickou či etnickou náležitost, sporadický či endemický typ, je malignita spojená s infekcí virem Epsteina-Barrové (EBV) (Connors et al., 1985). Vzhledem k průkazu jak EBV, tak HPV DNA z tkáně karcinomů nosohltanu (ale i tonzily) je zvažována možnost kooperativního uplatnění obou těchto virů (Tung et al., 1999). Některé sérologické studie poukazují na možný vztah mezi infekcí virem herpes simplex typ 1 (HSV-1) a vznikem HNSCC. Role HSV-1 při vzniku těchto malignit je v porovnání s rolí HPV a EBV kontroverzní (Shillitoe et al., 1986).

Dietní faktory. Řada studií prokázala inverzní vztah mezi vznikem karcinomů dutiny ústní a hrtanu, a dietním příjmem vitamínu A a ß-karotenu v čerstvém ovoci a zelenině (Nomura et al., 1997). Opakovaně bylo též prokázáno, že kouření je spojeno se sníženým příjmem a sérovou hladinou karotenoidů.

Faryngolaryngeální reflux v rámci refluxní choroby je v dlouhodobém měřítku uznávaným, a v řadě retrospektivních studií potvrzeným, faktorem spojeným se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu hrtanu (El-Serag et al., 2001)

Genetická predispozice. Na podkladě molekulárně epidemiologických studií byla definována řada genů, ve kterých přítomnost určité konkrétní alely u daného jedince je spojena se zvýšeným a nebo naopak sníženým rizikem vzniku HNSCC (enzymy uplatňující se při aktivaci a detoxifikaci karcinogenů, proteiny uplatňující se při reparaci DNA, proteiny uplatňující se při regulaci buněčného cyklu) (Spitz et al., 2003).

1.2. PATOLOGIE

KLINICKÁ A PATOLOGICKÁ TERMINOLOGIE SLIZNIČNÍCH ZMĚN

Leukoplakie je klinický pojem popisující bílou slizniční lezi, již nelze setřít, a kterou není možno klinicky spojit s jinou diagnosou. Spektrum histopatologických změn zjišťovaných v rámci tohoto klinického obrazu je široké (od keratozy epitelu bez dysplastických změn po invazivní keratinizující dlaždicobuněčný karcinom). Obecně se malignita pod tímto obrazem projevuje relativně vzácně. Riziko vzniku malignity v leukoplakii je odhadováno na 10 - 12 % (Silverman et al 1984; Wenig a Cohen, 2003).

Erytroplakie je klinický pojem popisující červenou slizniční lezi. Histopatologický nález, při tomto klinickém obrazu je variabilní. Často se setkáváme s těžkou dysplazií, karcinomem in situ či invazivním kracinomem (Mashberg a Feldman, 1988).

Erytroleukoplakie je klinický pojem popisující slizniční lezi kombinující známky leuko- a erytroplakie. Malignita pod tímto obrazem je relativně častým jevem. V porovnání s čistou leuko- a erytroplakií je riziko vzniku malignity v takovéto lezi

intermediární. Z klinického hlediska by na tuto lezi mělo být nahlíženo jako na erytroplakii (Mashberg a Samit 1995).

Hyperplazie je ztluštění epitelu v důsledku absolutního zvýšení počtu buněk.

Akantóza je hyperplazie a stluštění stratum germinativum Malpighi (jádra obsahující, viabilní část vrstevnatého dlaždicobuněčného epitelu tvořená stratum bazale a spinosum).

Pseudoepiteliomatozní hyperplazie je nadměrné reaktivní či reparativní přerůstání dlaždicobuněčného epitelu (hyperplazie) nevykazující cytologické známky malignity.

Hyperkeratoza je nadměrné zvýšení produkce povrchových keratinových vrstev. Pro sliznice, kde je fysiologicky přítomen nerohovějící dlaždicobuněčný epitel (např. hlasivky), by byl pojem hyperkeratoza redundantní, je tedy preferován pojem **keratoza**.

Parakeratoza je stav, kdy nacházíme v keratinizované vrstvě dlaždicobuněčných epitelů jaderné buňky.

Dyskeratoza je pojem popisující abnormální keratinizaci jednotlivých buněk epitelu.

Ulcerace znamená ztrátu či erozi povrchového epitelu.

Metaplazie je benigní alterace představovaná změnou jednoho histologického typu v druhý. Zpravidla jde o adaptační reakci tkáně na opakované inzulty či poranění.

Koilocytoza je deskriptivní pojem popisující vakuolizaci buněk dlaždicobuněčných epitelů. Jde zpravidla o projev virové infekce (např. HPV).

DYSPLAZIE A INTRAEPITELIÁLNÍ NEOPLAZIE

Dysplazie a **intraepiteliální neoplazie** představují spektrum abnormalit buněčné maturace a aberací, které mohou, avšak nemusí předcházet invazivnímu karcinomu. Synonymum dysplazie je **atypie**. Obecně se však pojem dysplazie vztahuje k abnormalitám architektoniky, zatímco pojem atypie vystihuje změny cytomorfologické. Histologická kriteria intraepiteliální neoplazie sliznic horních cest dýchacích a polykacích jsou tedy představovány jak abnormalitami cytomorfologickými tak maturačními: ztráta buněčné polarity, nukleární

pleomorfizmus, vzestup poměru karyoplazma/cytoplazma, hyperchromazie a nehomogenní distribuce chromatinu, zvýšený počet mitotických figur včetně atypických ve všech vrstvách epitelu. Dysplastické změny mohou být doprovázeny keratozou a dyskeratozou. Lokalizace architektonických a cytomorfologických změn epitelu je při hodnocení závažnosti dysplazie nezbytná (Wenig a Cohen, 2003).

Snaha přiblížit klasifikaci dysplazií epitelů sliznic hlavy a krku klasifikaci „klasických" nekeratinizujících dysplastických změn děložního hrdla (CIN I - III) naráží na řadu problémů (Crissman et al., 1993). Naprostá většina intraepiteliálních neoplazií sliznic horní části dýchacích a polykacích cest je keratinizujícím typem dysplazie. Dle definice in situ karcinomu děložního hrdla je tato leze charakterizovaná ztrátou vyzrávání dlaždicobuněčného epitelu. Keratinizující dysplazie by pak nemohla být in situ karcinomem neboť keratoza vyžaduje určitý stupeň vyzrávání. Kriteria klasifikace jednotlivých stupňů keratinizujících dysplazií, v porovnání s klasifikací nekeratinizujících dysplastických změn děložního hrdla, jsou relativně hůře definována a značně subjektivní.

Vzhledem ke komplexnosti problematiky intraepiteliálních lezí je snaha o zavedení uniformní standardně užívané terminologie. Preferovaný systém popisu závažnosti dysplastických změn (squamosních intraepiteliálních neoplazií - SIN) dělí tyto leze do tří stupňů: SIN I (lehká dysplazie), SIN II (střední dysplazie), SIN III (těžká dysplazie) (Gnepp et al., 1998; Zarbo et al., 2000). Často užívanou klasifikací laryngeálních prekanceróz je Ljubljanská klasifikace (Gale et al., 2000). Tento systém rozlišuje jednoduchou hyperplazii (keratoza bez atypií), abnormální hyperplazii (keratoza s přítomností atypií), atypickou hyperplazii (těžká dysplazie) a in situ karcinom. Úzká spolupráce klinika s patologem k správnému zhodnocení biologického potenciálu leze je vždy nezbytná.

Riziko přechodu epitelu s keratozou bez dysplastických změn v invazivní karcinom je nízké (1 - 5%). Keratotický epitel se známkami dysplazie je již spojen s rizikem přechodu v jednoznačně premaligní či invazivní lezi (11 - 18%). Riziko přechodu je závislé na závažnosti dysplastických změn (Crissman et al., 1993; Gale et al., 2000). Na rozdíl od těžké dysplazie je lehká a středně těžká dysplazie považována za reverzibilní lezi, především v případě eliminace iniciačního faktoru. Značným problémem je správné zhodnocení biologické závažnosti středně těžkých

dysplazií. Recidiva či perzistence středně těžké dysplazie může svědčit o nastupující maligní transformaci. Definice těžké dysplazie epitelu sliznic hlavy a krku je mnohem širší a v sobě zaujímá řadu histologicky odlišných lezí (Michaels, 1997; Sengiz et al., 2004). Dle některých studií je těžká dysplazie spojena s vyšším rizikem přechodu v invazivní karcinom než „klasický" in situ karcinom (Crissman et al., 1988a).

Dle imunohistochemických studií vyšetřujících expresi proteinů bazální laminy (kolagen IV a laminin) je u normálních epitelů, reaktivní hyperplazie, lehké a středně těžké dysplazie bazální lamina kontinuální a prominentní. Struktura bazální laminy je u těžké dysplazie a in situ karcinomů ztenčená až diskontinuální (Sakr et al., 1987).

Karcinom in situ (**CIS**) představuje dle klasické definice stav, kdy dysplastické změny postihují epitel v celé tloušťce při současně intaktní bazální lamině. V horních oblastech dýchacího a trávicího traktu se však nezřídka setkáváme s invazivními karcinomy, které vycházejí pouze z narušených bazálních vrstev, kdy v suprabazálních vrstvách takovéhoto epitelu atypie nenacházíme. V širším slova smyslu tedy lze za CIS považovat všechny natolik závažné cytologické změny, kde riziko přechodu v invazivní karcinom je vysoké. Za CIS je též považováno rozšíření dysplastických změn do oblasti slizničních žlázek (Crissman et al., 1988a; Wenig a Cohen, 2003).

INVAZIVNÍ DLAŽDICOBUNĚČNÉ KARCINOMY

Mikroinvazivní karcinom je pojem označující karcinom penetrující přes bazální membránu do lamina propria sliznice. Někteří užívají tento pojem k popisu jednotlivých nádorových buněk zasahujících těsně pod bazální laminu či do vzdálenosti 1-2 mm od této. Je nutno podotknout, že definice mikroinvazivního karcinomu není jednotná. Histologicky se s mikroinvazivním karcinomem setkáváme ve dvou variantách: (1) CIS přecházející v mikroinvazivní karcinom a (2) mikroinvazivní karcinom bez sousedícího CIS. Klinicky je mikroinvazivní karcinom od hlouběji invazivního karcinomu zpravidla neodlišitelný. Bez ohledu na definici jde histopatologicky o lezi odlišnou od CIS či invazivního karcinomu s infiltrací hlubších vrstev stěny orgánů. Vzhledem k bohaté síti lymfatických cév v lamina propria nevylučuje toto časné stádium karcinomů možnost zakládání metastáz. Přítomnost lymfangioinvaze by se měla s diagnózou mikroinvazivního karcinomu vylučovat. Z

biologického hlediska je však na tuto lezi, pro možnost metastazování, nutné nahlížet jako na jednoznačně maligní nádor. Výjimkou, vzhledem k chudé síti lymfatik, se zdá být mikroinvazivní karcinom laryngeální glottis (Crissman et al., 1988a).

Invazivní dlaždicobuněčné karcinomy. Makroskopický vzhled invazivních karcinomů bývá různorodý (ulcerativní, plochý, exofytický, verukoidní, papilární růst). Variabilní je též histologický obraz. Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku dosahují různého stupě diferenciace. Na jedné straně stojí dobře diferencované karcinomy s bohatou keratinizací, tvorbou rohových perel a hojnými intercelulárními můstky. Na druhé straně se setkáváme se špatně diferencovanými karcinomy bez známek keratinizace se silně dyskohezivním růstem. Buňky nádorových čepů vykazují cytologické známky malignity (dysplastické změny, dyskeratoza, mitotické figury včetně atypických). Buněčná jádra bývají velká, hyperchromatická, s výraznými jadérky, jaderná membrána vytváří hojné konvoluty. Nádorové čepy jsou proti okolí špatně ohraničené a infiltrují přilehlé tkáně. Přítomnost invazivního karcinomu vede ke stromální indukci či desmoplastické reakci. Ty spolu s přítomností buněk z cizích těles (reagujících na přítomnost keratinu) ve stromatu mohou napomáhat k identifikaci nádorové invaze. Invazivita nádoru je jednoznačnou známkou malignity. Invazivní mohou být jak jednotlivé buňky (dyskohezivní invazivita) tak malé či velké agregáty buněk (kohezivní invazivita). Dle imunohistochemických studií přítomnost či absence komponent bazální membrány koreluje s charakterem invaze (Sakr et al., 1987).

S invazivním karcinomem může být spojena těžká dysplazie či CIS a to v epitelu karcinomu blízkém i vzdáleném. Buňky karcinomu narušují architekturu normálního epitelu. Může být zřejmá invaze vaskulárních prostor, neurotropismus, invaze do svalu, chrupavky či kosti.

Morfologické subtypy dlaždicobuněčných karcinomů. Kromě konvenčního typu dlaždicobuněčných karcinomů byla popsána řada morfologických variant (Wenig a Cohen, 2003).

Papilární (exofytický) **dlaždicobuněčný karcinom** je vzácným subtypem HNSCC. Postihuje častěji muže než ženy. Převážně se s ním setkáváme v sedmé dekádě života. Popsán byl ve většině lokalizací horních cest dýchacích a polykacích (Crissman et al., 1988b; Suarez et al., 2000). Jeho vznik je dáván do souvislosti s

HPV infekcí. Obvykle vzniká de novo bez koexistujících benigních lezí, včetně papilomů.

Zpravidla je tento karcinom solitární, makroskopicky charakterizovaný exofytickým papilárním růstem, nevelkého rozsahu (T1 - T2). Centra prstovitých výběžků obsahují fibrovaskulární stroma. Buňky nádorového epitelu jeví cytologické známky malignity, čímž je odlišný od papilomů. Keratinizace je omezená či chybí. Invazivní charakter je v biopsii často obtížně prokazatelný. Nádor má charakter spíše in situ karcinomu, avšak rozsah růstu jej z této diagnózy vylučuje.

Preferovanou léčebnou modalitou je chirurgie. Prognóza je v porovnání s konvenčním typem lepší (Thompson et al., 1999).

Verukozní karcinom (Ackermanův tumor) je vysoce diferencovaný subtyp dlaždicobuněčného karcinomu charakterizovaný lokální destruktivitou a absencí metastatické aktivity. Častěji postihuje muže. Maximum výskytu je v šesté a sedmé dekádě života. Nejčastěji postiženými lokalitami jsou dutina ústní a hrtan (Medina et al., 1984). Hlavní roli při vzniku sehrává expozice tabáku. HPV infekci je připisována role promotoru (Gillison et al., 2000).

Makroskopicky mají nádory charakter trsovitě rostoucích, široce přisedlých, šedobělavých mas různé velikosti. Histologicky má leze charakter relativně benigní proliferace. Mezi typické rysy patří přítomnost uniformních buněk bez význačnějších atypií či mitoz, vystupňovaná ortokeratinizace a široké bulbosní nádorové čepy vtlačující se do okolních tkáně bez výrazné infiltrace. V přilehlém stromatu bývá bohatá infiltrace lymfocyty, plazmatickými buňkami a histiocyty. Ke správnému stanovení histologické diagnózy je nezbytný odběr hluboké excize jež postihuje pomezí nádorový epitel - stroma.

Primárně volenou léčebnou modalitou je chirurgie. V literatuře je udržováno dogma, jež spojuje užití radioterapie s rizikem anaplastické transformace a nabytím metastatického potenciálu. K této však může dojít i bez léčby, navíc byla popsána i jako recidiva po radikálním chirurgickém odstranění (Medina et al., 1984). Šíření do regionálních lymfatických uzlin jakož i zakládání vzdálených metastáz bez anaplastické transformace je extrémně vzácné. Prognóza pacientů při radikálním chirurgickém odstranění je příznivá.

Vřetenobuněčný dlaždicový karcinom (karcinosarkom) je maligní nádor tvořený konvenčním dlaždicobuněčným karcinomem a maligní vřetenobuněčnou stromální komponentou. Většina těchto nádorů postihuje muže v šesté až osmé dekádě života. V oblasti hlavy a krku byl popsán v řadě lokalizací, nejčastěji v hrtanu, dutině ústní, tonzile a hltanu. V etiopatogenezi se pravděpodobně neuplatňují typické rizikové faktory HNSCC (tabák, alkohol). Je udáván vztah k předchozí radioterapii (Berthelet et al., 1994).

Nádory bývají polypoidní, tuhé, šedo-bělavé až hnědo-růžové, různé velikosti. Histologicky zjišťujeme přítomnost maligní nediferencované vřetenobuněčné populace, jakož i konvenčního dlaždicobuněčného karcinomu (invazivního, zpravidla dobře diferencovaného, či CIS). Vřetenobuněná populace v nádoru převažuje. Vzácně jsou tyto oblasti hypocelulární s výraznou kolagenizací stromatu (kolagenizovaný karcinosarkom). Pro vřetenobuněčnou část nádoru je typický buněčný pleomorfizmus, velká hyperchromatická jádra, prominentní jadérka, četné mitozy (typické i atypické). Charakter uspořádání se liší (fascikulární, storiformní či palisádující). Vzácně může být stroma myxomatózní či mohou být přítomny heterologní tkáňové elementy (kost, chrupavka), které mohou též nabývat maligní charakter (ložiska chondro- či osteosarkomu). Histogeneze vřetenobuněčné komponenty je kontroverzní. Pro její epiteliální původ (epiteliálně-mezenchymální transformace) svědčí řada nálezů: (1) intimní vztah s konvenčním dlaždicobuněčným karcinomem, (2) ultrastrukturální známky epiteliálního původu (přítomnost desmosomů, tonofilament, macullae adherentes), (3) imunohistochemický průkaz cytokeratinů ve většině případů, (4) identický profil exprese p53 v obou komponentách nádoru. Kromě přítomnost cytokeratinů, je popisována exprese různých myogenních markerů (desmin, aktin) (Lewis et al., 1997; Ansari-Lari et al., 2002). Z biologického hlediska u tohoto morfologického subtypu karcinomu metastazování není vzácností (regionální i vzdálené metastázy). Histologicky se v metastatických ložiscích můžeme setkat s: (1) ložisky karcinosarkomu, (2) ložisky pouze konvenčního dlaždicobuněčného karcinomu, (3) ložisky jak karcinosarkomu tak konvenčního dlaždicobuněčného karcinomu. S izolovaným metastazováním stromální komponenty se nikdy nesetkáváme.

Primární léčebnou metodou je chirurgie. Radioterapie se uplatňuje zpravidla jako adjuvantní léčebná modalita. Užití radioterapie a chemoterapie jako izolovaných léčebných postupů není považováno za účinné. Prognóza pacientů je závislá na klinickém stádiu onemocnění, obecně je však považována za nepříznivou.

Basaloidně squamosní karcinom je variantou dlaždicobuněčného karcinomu vysokého gradu, charakteristický časným zakládáním regionálních a vzdálených metastáz. Postihuje častěji muže, s maximem výskytu v šesté a sedmé dekádě života. Setkáváme se s ním především v oblasti kořene jazyka, supraglottické části hrtanu, hypofaryngu a patrové mandli (Banks et al., 1992).

Makroskopicky jde o velmi tuhé tumory šedo-bělavé barvy, s výrazným endofytickým růstem. Histologicky je tumor tvořený basaloidními buňkami s úzkým vztahem k: (1) dysplastickému dlaždicobuněčnému epitelu, (2) CIS nebo (3) invazivnímu dlaždicobuněčnému karcinomu. Vzhledem k histogenezi bývá uváděn původ z totipotentní buňky stratum bazale dlaždicového epitelu či oblasti seromucinozních žlázek, schopné divergentní diferenciace. Basaloidní komponenta je převažující buněčnou populací. Tvoří ji silně mitoticky aktivní buňky s výrazným hyperchromatickým jádrem, chudé na cytoplazmou. Můžeme se setkat s periferním palisádováním jader. V centrech nádorových čepů bývá přítomna komedonekróza. Nezřídka je popisováno intercelulární ukládání hyalinního či mukohyalinního materiálu. Častá je reduplikace materiálu bazální laminy, se kterou se setkáváme u některých nádorů slinných žláz. Dlaždicobuněčná část nádoru obvykle vykazuje menšinové zastoupení (ložiska keratinizace, dysplastický dlaždicobuněčný epitel, CIS, invazivní dlaždicobuněčný karcinom). Tato část nádoru může přecházet v přilehlý dlaždicobuněčný epitel. V oblastech metastáz zjišťujeme přítomnost obou komponent nádoru. Imunohistochemicky jsou v nádoru prokazovány epiteliální markery (cytokeratiny, EMA, CEA) (Banks et al., 1992; Wieneke et al., 1999). Variabilně bývá prokazována exprese vimentinu, aktinu a S-100 proteinu. Ultrastrukturálně bývají zjišťovány rysy charakteristické po dlaždicobuněčné karcinomy: svazky tonofilament, hojné desmosomy, tvorba rohových perel, hvězdicovitá granula či přítomnost reduplikované bazální laminy v cystických prostorách (Hewan-Lowe a Dardick, 1995).

Vzhledem k biologické agresivitě tohoto nádoru (časné zakládání regionálních a vzdálených metastáz) se v léčbě uplatňuje zpravidla kombinace léčebných modalit (chirurgie, radioterapie a chemoterapie). Prognóza tohoto subtypu HNSCC je v porovnání s konvenčním výrazně horší.

Nediferencovaný karcinom nasofaryngeáního typu (lymfoepiteliom, Schminckeho karcinom, Regaudův karcinom) se zpravidla vyskytuje v oblasti nosohltanu a méně často vychází z ostatních struktur Waldeyerova lymfatického okruhu (Ferlito et al., 1997). V následujících odstavcích bude tento morfologický subtyp prezentován v kontextu lokalizace v nosohltanu.

Karcinom nosohltanu je obecně vzácný nádor, v některých zeměpisných oblastech (Jihovýchodní Asie, Severní Afrika, Grónsko) však patří k velmi častým malignitám. Spolu s geografickou predispozicí byly stanoveny další faktory spojené se zvýšeným rizikem vzniku: infekce virem Epsteina-Barrové (EBV), genetická predispozice (HLA-A2 haplotyp), dietní faktory (nitrosaminy).

Dle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO klasifikace) jsou v oblasti nosohltanu histologicky odlišovány dva typy: (1) I typ (keratinizující dlaždicobuněčný karcinom), (2) II typ (nekeratinizující diferencovaný a nediferencovaný karcinom - označovaný též jako typ III) (Peters, et al., 2003). Jednotlivé typy karcinomů nosohltanu se liší nejen histologicky, ale i biologickými a klinickými charakteristikami.

Keratinizující subtyp (WHO I) tvoří asi 25% karcinomů nosohltanu. Postiženi jsou častěji muži s maximem výskytu v šesté dekádě života. Histologicky jde o konvenční dlaždicobuněčný bohatě keratinizující karcinom s četnými intercelulárními můstky a výraznou desmoplastickou reakcí stromatu na invazi. Vazba k infekci EBV je slabá. Imunohistochemicky je možné prokázat přítomnost cytokeratinů. Zakládání metastáz nebývá časté. Pětileté přežití je vzhledem k nízké odpovědi na radioterapii (u karcinomů nosohltanu primárně volenou léčebnou modalitou) pouze 20 - 40%.

Nekeratinizující subtyp karcinomu nosohltanu (WHO II) se též vyskytuje častěji u mužů, zpravidla v šesté dekádě. Vazba k EBV je silná. Keratinizace je výrazně omezená či chybí. Desmoplastická reakce nebývá přítomna. Imunohistochemicky je prokazatelná přítomnost cytokeratinů. Karcinom má výrazný sklon k zakládání

regionálních lymfatických metastáz. Odpověď na radioterapii je různá. Pětileté přežití je 35 - 50%.

Nediferencovaný karcinom (WHO III) je nejčastějším subtypem karcinomu nosohltanu (60%). Opětovně jsou častěji postiženi muži. Věková distribuce je bimodální s maximem výskytu v druhé a následně šesté dekádě života. Vztah k infekci EBV je výrazný. K histologickým charakteristikám patří: absence keratinizace a desmoplastické reakce na invazi, kohezivní (syncytiální - Schminckeho karcinom) či dyskohezivní (Regaudův karcinom) růst, prominentní oválná buněčná jádra se silně eosinofilními jadérky, malé množství cytoplazmy, četné mitózy a především bohatě zastoupená nenádorová lymfoidní komponenta. Imunohistochemicky jsou prokazatelné cytokeratiny. Z biologického hlediska má tento karcinom sklon k bohatému a časnému zakládání regionálních lymfatických metastáz, a vysokou odpověď na radioterapii. Díky této je i přes často pokročilé stádium onemocnění prognóza relativně příznivá. Pětileté přežití je udáváno v 60% případů.

Adenosquamosní karcinom je vzácný subtyp HNSCC histologicky charakterizovaný současnou přítomností dlaždicobuněčné a adenomatozní komponenty. Jde o malignitu s vysoce agresivním biologickým chováním. Většinu popsaných případů představují muži v šesté dekádě života (Sheahan et al., 2003; Alos et al., 2004). Nejčastější se s ním setkáváme v hrtanu a dutině ústní.

Dlaždicobuněčná část nádoru (obvykle rohovějící dlaždicobuněčný karcinom nebo CIS) objemově převažuje a přechází v sousední dlaždicobuněčný epitel. Adenokarcinom je druhou nezbytnou součástí nacházející se v nejhlubších partiích nádoru. Histogeneze této malignity nebyla doposud objasněna. Původ ze slinných žlázek se nezdá pravděpodobný. Relativně často je zjišťováno perineurální šíření. Imunohistochemicky v adenokarcinomové části nádoru zjišťujeme znaky žlazové diferenciace (CEA, CK7, CAM5.2). V obou částech karcinomu je možné prokázat vysokomolekulární cytokeratiny. Exprese CK20 charakteristicky chybí. Většina nádorů je vysoce proliferativně aktivní.

Slizniční adenosquamosní karcinomy jsou vysoce agresivní nádory se sklonem k zakládání regionálních lymfatických a nezřídka též vzdálených hematogenních metastáz, časnému a častému lokálnímu recidivování. Jsou považovány za radiorezistentní. Užívané chemoterapeutické postupy též nebyly v

léčbě výrazně efektivní (Mancusi et al., 2002). Prognóza v porovnání s konvenčním subtypem se zdá být výrazně horší, většina pacientů nemoci podléhá do 2 až 3 let.

Adenoidně squamosní karcinom je vzácnou variantou HNSCC (Ferlito et al., 1996). Nejčastěji se s ním setkáváme v kůži. Ve slizničních oblastech horní části dýchacího a trávicího systému se s ním setkáváme nejčastěji v dutině ústní. Častěji se vyskytuje ve vyšších věkových skupinách.

Histologicky je zjišťována současná přítomnost struktur konvenčního dlaždicobuněčného karcinomu a akantolytických nádorových keratinocytů uspořádaných v pseudoglandulární struktury, jež mohou nabývat vzhledu cévních struktur. Buněčné atypie jsou hojné. Imunohistochemicky prokazujeme znaky epiteliálního původu (cytokeratiny, EMA, laminin-5). Žlazovou diferenciaci je možné vyloučit absencí epiteliálních mucinů.

Biologické chování a prognóza, v porovnání s konvečním subtypem dlaždicobuněčných karcinomů, jakož i s histopatologicky identickým kožním nádorem, je výrazně horší.

MNOHOČETNÉ NÁDORY A PLOŠNÁ KANCERIZACE

Vznik mnohočetných primárních nádorů v oblasti hlavy a krku, plic a jícnu je jednou z hlavních příčin mortality u pacientů s časným stadiem HNSCC. Patogenezi **synchronních a metachronních duplicit** popisuje termín **plošná kancerizace** („field cancerization"), vyzdvihující význam celoplošné expozice buněk sliznic horních cest dýchacích a polykacích karcinogenům (Wenig a Cohen, 2003). Původně pojem označoval mnohotné, na sobě nezávislé procesy maligní transformace postihující jednotlivé buňky „prekondiciovaného epitelu" (preconditioned epithelium) či „odsouzené sliznice" (condemned mucosa). V oblasti karcinogenům vystavené plochy sliznic dýchacích a polykacích cest pak tedy mohou vzniknout mnohočetná na sobě nezávislá nádorová ložiska s maligním chováním. Klinicko-patologicky tomuto stavu odpovídají rozsáhlé plošné změny závažné dysplazie s častým přechodem v invazivní karcinom u vysoce rizikových pacientů (např. u těžkých kuřáků s velkou expozicí alkoholu).

Ve vztahu k vzniku mnohočetných nádorů se setkáváme se dvěma hypotézami: (1) polyklonální a (2) monoklonální. Dle polyklonální hypotézy vznikají v

místech nejintenzivnější plošné kancerizace jednotlivé nádory nezávisle a jsou geneticky nepříbuzné. Dle monoklonální hypotézy je primárním dějem transformace buňky jediné. Z ní pak vznikají dceřiné buňky, které se šíří laterálně a zakládají ložiska s potenciálem pro vznik geneticky příbuzných mnohočetných tumorů (Bedi et al., 1995; Califano et al., 1996).

1.3. MOLEKULÁRNÍ PATOGENEZE

Dlaždicobuněčné epitely sliznic hlavy a krku představují morfologicky a funkčně stratifikovaný typ tkáně. Mitoticky aktivní buňky (buňky kmenové a buňky dočasně se dělící) jsou lokalizovány ve stratum bazale. Postmitotické, terminálně diferencované buňky jsou lokalizovány též ve stratum bazale, ale především v suprabazálních vrstvách těchto epitelů. Vlastní dlaždicobuněčný epitel představuje dynamicky se měnící tkáň, ve které dochází ke kontinuální sebeobnově, se snahou o udržení tkáňové homeostázy. Tkáň epitelu je izolována od pojiva lamina propria kontinuální bazální membránou, jejíž výstavby se účastní oba sousedící typy tkání.

Dojde-li působením fyzikálních, chemických či biologických agens k poškození buněk epitelu, mohou tyto v závislosti na rozsahu a typu odumřít (ireversibilní poškození buňky - nekroza, apoptoza) či takovéto škody opravit (reverzibilní poškození). Jsou-li takovéto inzulty opakované, odpovídá nezřídka tkáň nastartováním adaptačních mechanismů, majících morfologický korelát například v hyperplazii či metaplazii.

Karcinogenní látky vedou k poškození genetického materiálu. Za určitých okolností může dojít k selhání reparativních mechanismů a poškození genetického materiálu v buňkách přetrvává. Dojde-li k tomuto ději v buňkách kmenových stává se poškození ve tkáni fixované. Progresivní nahromadění neletálních poškození DNA kmenových buněk v určitých specifických oblastech je spojeno se závažnými změnami fenotypu těchto a jejich dceřiných buněk, jež jsou podkladem nádorového bujení a v případě maligních nádorů podkladem jejich agresivního chování. Na nádorová onemocnění tedy můžeme nahlížet, jako na onemocnění kmenové buňky.

Přechod normálního epitelu v přednádorové stavy a následně v invazivní karcinom se schopností zakládat lymfatické a eventuálně vzdálené metastázy je

proces mnohastupňový. Komplexní kaskáda alterací genů je příčinou několika pro maligní nádor charakteristických vlastností: (1) získání autonomní proliferační signalizace, (2) ztráta růst tlumících signálů, (3) únik mechanismům programované buněčné smrti, (4) imortalizace, (5) zabezpečení dostatečného cévního zásobení (neoangiogeneze), (6) nabytí invazivního a metastatického fenotypu (Califano a Sidransky, 2003).

ZÍSKÁNÍ AUTONOMNÍ PROLIFERAČNÍ SIGNALIZACE

Za normálních podmínek buňky vyžadují k dosažení proliferační aktivity přítomnost růst indukujících signálů. Ty mají charakter: (1) difuzibilních molekul (růstové faktory), (2) molekul extracelulární matrix, (3) interakcí se sousedícími buňkami. Růst vyvolávající signály jsou přenášeny od buněčného povrchu do jádra různými a často vysoce komplexními nitrobuněčnými signálními cestami. Důsledkem je regulace exprese genů, řídících a umožňujících buněčnou proliferaci, ale i genů jež se uplatňují v jiných dějích.

Jednou z charakteristických vlastností nádorové tkáně je nabytí určitého stupně nezávislosti na přítomnosti exogenních růst indukujících signálů. Řada studií prokázala u HNSCC aberace v produkci růstových faktorů a jejich receptorů.

Receptor pro epidermální růstový faktor. Epidermální růstový faktor (EGF, Epidermal Growth Factor) je jedním z prvních identifikovaných růstových faktorů. Do rodiny receptorů pro EGF (HER rodina) náleží čtyři receptory pro EGF: ErbB1 (**EGFR**, Epidermal Growth Factor Receptor), ErbB2 (c-Neu), ErbB3 a ErbB4. Všechny z těchto receptorů nesou intracelulární doménu s tyrosinkinázovou akivitou.

Doposud bylo charakterizováno 6 ligandů EGFR: EGF, TGF-α (Transforming Growth Factor- α), amphiregulin, HB-EGF (Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor), betacellulin a epiregulin. V lidských tkáních, včetně sliznic hlavy a krku, je nejvíce produkovaným ligandem TGF-α.

Nejvyšší frekvence změn EGFR byla mezi lidskými malignitami zjištěna právě u HNSCC (Stanton et al., 1994). EGFR sehrává časnou roli v průběhu nádorové transformace buněk epitelů sliznic horních cest dýchacích a polykacích. Onkogenní potenciál mají jak strukturální abnormality vedoucí ke konstitutivní aktivaci, tak zvýšená exprese receptoru. Příčinou je nadměrná transkripce genu nedoprovázená

změnou stability mRNA, i když u části HNSCC byla též detekována amplifikace genu receptoru. Vedle buněk karcinomů je zvýšená exprese EGFR prokazatelná v hyperplastickém epitelu, dysplastickém epitelu a buňkách histologicky normálního epitelu v těsném sousedství s ložiskem karcinomu. Kvantitativní změny EGFR jsou doprovázeny zvýšenou produkcí TGF-α (Shin et al., 1994b). Buňky zvýšeně exprimující EGFR mohou obcházet mechanismy G1-S kontrolního bodu díky nadměrné produkci cyklinu D1 (Grandis et al., 1998). Patologicky zvýšená aktivita EGFR v nádorové tkáni vykazuje vztah k vystupňované proliferaci, zvýšené buněčné migraci, angiogenezi, odchylkám v maturaci, invazivitě buněk a snížené odpovědi k apoptotickým signálům (Harari et al., 2003).

Zvýšené exprese EGFR i TGF-α představují nezávislé negativní prognostické markery, vykazující vztah k celkové délce přežití, přežití bez známek recidivy onemocnění a lokoregionální účinnosti standardně aplikovaných léčebných postupů. Vzhledem k významu EGFR, představují léčebné strategie zaměřené na inhibici aberantní signalizace velmi slibnou léčebnou modalitu. Používány jsou jak monoklonální protilátky, specificky interagující s extracelulární ligand vážící doménou, blokující interakci receptoru s jeho ligandem (Cetuximab), tak malé molekuly inhibující tyrosinkinázovou aktivitu EGFR (Irresa) (Harari et al., 2003; Caponigro et al., 2005).

Jiným z receptorů EGFR rodiny se vztahem ke vzniku HNSCC je **ErbB2** (Her-2). Vystupňovaná exprese vykazuje vztah k biologické agresivitě karcinomů dutiny ústní a hrtanu (Tantawy et al., 1999). ErbB2 též představuje negativní prognostický marker přežití pacientů s karcinomem nosohltanu (Roychowdhury et al., 1996).

Hepatocytární růstový faktor (Hepatocyte Growth Factor, HGF) je růstový faktor s širokým spektrem biologických funkcí, sehrávající významnou úlohu v průběhu hojení. Jeho receptor (HGF-R) je produktem c-met protoonkogenu.

Buňky HNSCC produkují řadu cytokinů a růstových faktorů (TGF- α, IL-1α, IL-6, IL-8, GRO-α, GM-CSF, VEGF) s prozánětlivým a proangiogenním působením (Chen et al., 1998). IL-1α je cytokin řídící tvorbu řady dalších faktorů produkovaných nádorovými buňkami (IL-8, GM-CSF, VEGF), ale též parakrinně stimulující stromální fibroblasty k produkci hepatocytárního růstového faktoru. Aktivace signální osy HGF - HGF-R je spojena se zvýšenou proliferací nádorových buněk, nabytím invazivního a

metastatického fenotypu, a indukcí neoangiogeneze (Hanzawa et al., 2000, Dong et al., 2001b).

Přenašeče signálu a aktivátory transkripce (Signal Transducers and Activators of Transcription, **STATs**) jsou malé cytoplazmatické proteiny účastnící se přenosu signálu od povrchových receptorů do buněčného jádra, kde se uplatňují jako transkripční faktory. Sehrávají roli při EGF/TGF indukované buněčné proliferaci (Song a Grandis, 2000).

Onkogeny ras a myc. Do rodiny ras onkogenů náleží tři blízké geny (H-ras, K-ras, N-ras) kódující GTP vážící proteiny účastnící se přenosu mitogenních signálů do buněčného jádra. Mutace ras onkogenů se vyskytují relativně vzácně (5%) u pacientů s HNSCC v západní populaci. Setkáváme se s nimi však relativně často u pacientů s dlaždicobuněčnými karcinomy dutiny ústní v Indii (35%) (Saranath et al., 1991). Nález by mohl mít vztah ke zvyku žvýkání betelového listu v těchto oblastech.

Rodina myc onkogenů (c-myc, N-myc, L-myc) kóduje proteiny s transaktivační aktivitu. Procento prokázané amplifikace či zvýšené exprese c-myc u HNSCC se liší (Rodrigo et al., 1996). Zjišťované změny vedou k narušení funkce četných genů, přispívají k maligní transformaci a korelují se špatnou prognózou (Field et al., 1989).

Jaderný faktor kappa B (Nuclear Factor kappa B, NF-κB) je transkripční faktor uplatňující se za normálních okolností v průběhu imunitních a zánětlivých reakcí. V buňkách HNSCC zvyšuje transkripci genů umožňujících proliferaci, modulujících procesy apoptozy, zodpovědných za invazivní chování, angiogenezi a metastazování (Dong et al., 2001a).

Eukaryotní protein iniciační faktor (eIF4E) sehrává roli v průběhu iniciace translace, kdy se váže k mRNA. Nadměrná exprese byla prokázána u většiny HNSCC a vede k vystupňované produkci růstových faktorů se vztahem k proliferaci a angiogenezi. Zvýšená exprese v histopatologicky negativních okrajových excizích po resekci karcinomů koreluje s lokálním recidivováním (Nathan et al., 1999).

ZTRÁTA RŮST REGULUJÍCÍCH SIGNÁLŮ

Výše popsané cesty spouštějící patologické buněčné dělení jsou pro vznik nádorů typické, sami o sobě však nejsou dostatečné. Dalším nezbytným krokem je překonání růst tlumících signálů. Přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu

je kontrolován řadou faktorů. Centrální úlohu v těchto dějích sehrávají cykliny, jejich regulátory, cyklin-dependentní kinázy (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs) a inhibitory cyklin-dependentních kináz (Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors, CDKIs).

Cyklin D1. Ve tkáních dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku jsou velmi často zjišťovány chromozomální abnormality (amplifikace, rearangement) postihující oblast 11q13. Do oblasti je lokalizován gen *CCND/PRAD-1* kódující cyklin D1. Ten za normálních okolností odpovídá na extracelulární mitogenní signály a v komplexu s CDK4 či CDK6 je hlavním rychlost limitujícím faktorem ovlivňujícím přechod přes G1 fázi buněčného cyklu. Zvýšená produkce cyklinu D1, zkracuje G1 interval a proliferaci nezávisle na mitogenních signálech. Vykazuje vztah k agresivnímu chování, zakládání regionálních lymfatických metastáz, lokoregionálnímu recidivování, koreluje s patologickým stádiem onemocnění a nepříznivě ovlivňuje přežití (Michaelides et al., 1997; Bova et al., 1999).

Inhibitory cyklin dependentních kináz (Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors, CDIs) jsou schopné zastavit buněčný cyklus v některých z jeho fází v důsledku inhibice cyklin-dependentních kináz. U savců jsou představovány dvěma rodinami proteinů. Proteiny z INK4 rodiny ($p15^{INK4B}$, $p16^{INK4A}$, $p18^{INK4C}$ a $p19^{INK4D}$) se uplatňují především v G1 fázi buněčného cyklu inhibicí komplexů cyklin D/CDK4 či cyklin D/CDK6. Proteiny z cip/kip rodiny ($p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$ a $p57^{KIP2}$) mají širší působení, a inhibují četné komplexy cyklin/CDKs.

Nejvíce prostudovaným z CDIs je protein **p16** ($p16^{INK4A}$). Vazba tohoto proteinu k CDK4 či CDK6 brání vzniku jejich komplexů s cyklinem D1. Výsledkem je blok v přechodu mezi G1 a S fází buněčného cyklu. Chromozomální abnormality v oblasti genu kódujícího p16 (9p21-22) jsou zjišťovány nejen u invazivních karcinomů, ale též u dysplazií a CIS. To nasvědčuje uplatnění již v časných fázích maligní transformace (van der Riet et al, 1994). Charakter alterací je rozmanitý, nejčastěji jde o homozygotní delece a hypermetylace v promotorové oblasti genu. Závěry ohledně prognostického významu alterací v genu pro p16 jsou nesourodé (Danahey et al., 1999).

Dalšími ze studovaných CDKIs jsou **p21** a **p27**. Snížené exprese p21 i p27 korelují se špatnou prognózou pacientů s HNSCC (Erber et al., 1998; Mineta et al., 1999).

Rb protein (Retinoblastoma protein, pRb) je kódován tumor supresorovým genem (Rb; 13q21). Protein bývá označován jako „vstupní brána do buněčného cyklu". Ve své aktivní (nefosforylované) formě, pRb váže a touto cestou inaktivuje transkripční faktor E2F. Komplexy cyklinu D s CDK4 či CDK6 vznikající na podnět mitogenních signálů inaktivují fosforylací pRb a vedou k uvolnění E2F, který spouští transkripci genů nezbytných pro přechod mezi G1 a S fází buněčného cyklu a řídících replikaci jaderné DNA. U HNSCC je ztráta lokusu 13q21 zjišťována ve více jak 50% případů, snížená exprese pRb je však relativně vzácná (Yoo et al., 1994).

Protein p53 („strážce genomu") patří mezi nejvíce prozkoumané proteiny uplatňující se v procesech karcinogeneze. Působí na úrovni pozitivní či negativní regulace genové transkripce. Vyvolává zastavení buněčného cyklu v pozdní G1 fázi a dává tak možnost k opravě subletálně poškozené DNA. V případě její nemožnosti spouští procesy vedoucí k programované buněčné smrti. Reguluje též syntézu DNA a koordinuje procesy buněčného cyklu. Oblast ve které se gen pro p53 (TP53; 17p13) nachází patří k místům nejčastějších mutací u lidských malignit. K dysfunkci p53 může přispívat interakce s buněčným proteinem mdm-2, který se účastní jeho inaktivace a degradace (Shin et al., 1994a). Obdobně interagují a p53 inaktivují E6 a E7 virové onkoproteiny v rámci HPV infekce. Narušení funkce p53 má za následek nestabilitu genomu, pro malignity charakteristickou. Brání též nastartování apoptozy a eliminaci pro organizmus potenciálně nebezpečných buněk. Z léčebného hlediska vykazují takovéto nádorové buňky rezistenci k chemoterapii a radioterapii (Fouret et al., 2002).

Aberace funkcí p53 pravděpodobně sehrávají významnou roli při vzniku a progresi HNSCC. Mutace v TP53 jsou popisovány u přibližně 20% premaligních slizničních lezí a téměř ve všech případech invazivních karcinomů (Boyle et al., 1993; Kropveld et al., 1999). Charakter mutací ovlivňuje jejich efekt a biologické chování nádoru (Erber et al., 1998). Průkaz mutací TP53 v oblasti resekce nádorů je spojen se zvýšeným rizikem lokálního recidivování (Brennan et al., 1995). Vzhledem k častosti mutací TP53 u HNSCC se velmi slibným zdá léčebná snaha o obnovení funkce p53 (transfer divokého typu p53 adenovirem ONYX-015) (Edelman et al., 2003).

Proteiny p63 patří spolu s proteiny p73 do rodiny proteinů p53 (Thanos et al., 1999). Gen pro proteiny p63 (Activated in Sqamous Cell Carcinomas, AIS; 3q27-29) má dvě různé promotorové oblasti, proto jsou z něj kódovány dvě odlišné izoformy proteinů, lišící se přítomností (TAp63) či absencí (ΔNp63) N-terminální transaktivační domény. Každá z izoforem, pak vzhledem k alternativnímu sestřihu mRNA kódující C-terminální oblast, může existovat ve třech odlišných izotypech (p63α, p63β, p63γ). Proteiny p63 řídí expresi genů regulujících buněčný cyklus, odpovídajících na stres, účastnících se signální transdukce a v průběhu morfogeneze. Jsou též nezbytné pro přežití a diferenciaci rezervních/kmenových buněk v řadě epitelů včetně dlaždicobuněčných (Pellegrini et al., 2001). ΔNp63 izoformy, které představují dominantní izoformu v normálních i maligně transformovaných dlaždicobuněčných epitelech, indukují funkční blok vůči aktivitám p53, TAp63 a TAp73 (Sniezek et al., 2004). Varianta ΔNp63α je potentním inhibitorem apoptózy. U HNSCC je amplifikace AIS genu spojená se zvýšenou expresí izotypu ΔNp63α velmi časným dějem jejich vzniku bez ohledu na stav p53 (Choi et al., 2002). Exprese ΔNp63α stimulována signalizační osou EGF/TGF-α – EGFR vede k jaderné akumulaci β-kateninu a aktivaci β-katenin-dependentní transkripce (Patturajan et al. 2002; Matheny et al., 2003).

ÚNIK MECHANISMŮM PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI

Programovaná buněčná smrt (**apoptoza**) představuje kritický stupeň diferenciace. Je nezbytným dějem pro udržení buněčného obratu v tkáni. Během apoptozy dochází vlivem indukujících stimulů ke kontrolované degradaci chromozomů, fragmentaci jádra a všech buněčných membrán. Posledním krokem je eliminace odumřelé buňky. V současnosti je na apoptozu nahlíženo jako na třístupňový proces. V první fázi dochází vlivem charakteristických intra- či extracelulárních signálů k její iniciaci. V druhé fázi dochází k exekuci, kdy efektorové molekuly přenášejí signály z receptorů či intracelulárních molekul apoptozu spouštějících. Výsledkem je uvolnění enzymů, které vedou ke zničení buňky. Třetí fázi odpovídají morfologické změny odumírající buňky a odpověď okolních buněk. Pro vznik nádorů je ztráta mechanismů regulujících procesy vedoucí k apoptoze jedním z důležitých kroků.

Rodina kaspáz je tvořena minimálně 13 proteiny s proteázovou aktivitou. Iniciátorové kaspázy (kaspáza 8, 9 a 10) spouští a amplifikují tuto kaskádu. Efektorové kaspázy (kaspáza 2, 3, 6 a 7) jsou konečnými efektory apoptózy. Řada chemoterapeutik působí na úrovni zvýšení jejich aktivity (Kuwahara et al., 2000).

Rodinu Bcl proteinů tvoří proapoptotické molekuly (Bax, Bak, Bid) a molekuly s antiapoptotickým účinkem (Bcl-2, Bcl-XL, Bfl-1), které regulují uvolňování cytochromu C z mitochondrií. Zvýšená exprese Bcl-2 a naopak snížená exprese Bax koreluje se špatnou prognózou pacientů s HNSCC (Jäckel et al., 2001).

IMORTALIZACE

Za fyziologických poměrů jsou replikující se buňky schopné podstoupit určitý – definitivní počet dělení. Následně se dostávají do kritického stavu **senescence** (Counter et al., 1996). Příčinou je zkracování DNA na koncích chromozomů. Tyto úseky DNA, známé jako telomery, fungují jako oblast chromozomů bránící jejich poškození. Dojde-li v důsledku opakujících se replikací k jejich úplné ztrátě chromozomy přestávají být chráněny, dochází k jejich fůzi, abnormitám v karyotypu a eventuálnímu nastartování apoptozy.

Prakticky u všech nádorů byly prokázány mechanizmy, které brání zkracování telomer. K nejlépe prostudovaným mechanizmům patří exprese enzymu telomerázy, která řídí jejich syntézu. Aktivace telomerázy je jedním z časných dějů vzniku HNSCC. V buňkách normální sliznice není **telomeráza** zjišťována, na rozdíl od hyperplazie, dysplazie a invazivních karcinomů (Mao et al., 1996). Její exprese koreluje se stupněm dediferenciace, stádiem nemoci a odpovědí na terapii (Kannan et al., 1997).

NEOANGIOGENEZE

Stejně jako v normální tkáni musí nádorové buňky pro svůj růst dosáhnout určitých metabolických požadavků. Bez odpovídajícího cévního zásobení nádory větší jak 1-2 mm^3 podstupují nekrozu. Většina nádorů se s těmito obtížemi vyrovnává stimulací endotelu k proliferaci a tvorbě nových cév (**angiogeneze**). Tento děj je pro další růst, invazi a zakládání metastáz zcela nezbytným krokem. Proces je sám o sobě

mnohastupňový a účastní se ho jak stimulační, tak inhibiční faktory (Chen et al., 1995).

Vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Cell Growth Factor, VEGF) je nejvýznamnější z faktorů ovlivňující angiogenezi u HNSCC. Tento glykoprotein náleží do rodiny PDGF/VEGF růstových faktorů, tvořených pěti strukturálně příbuznými faktory VEGF (též VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a PIGF kódovaných separátními geny. Účinky VEGF jsou zprostředkovány třemi receptory VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Kdr a VEGFR-3/Flt-4. Prostřednictvím fosforylace cytoplazmatických domén těchto receptorů je aktivována řada signálních kaskád ústící v ovlivnění genové transkripce. Působení VEGF na buňky endotelu je široké, stimuluje jejich dělení, tlumí apoptozu, zvyšuje jejich permeabilitu, migrační aktivitu a ve svém důsledku vede k vlastní novotvorbě cévních struktur (Stacker a Achen, 1999).

Zvýšená exprese VEGF vykazuje vztah k pokročilému stádiu nemoci, zakládání metastáz, agresivnímu biologickému chování a špatné prognóze. Hypoxií stimulovaná produkce VEGF nádorovými buňkami a následná stimulace endotelových buněk především prostřednictvím VEGR-2/Kdr je považována za zcela klíčovou (Kyzas et al., 2005). Ovlivnění VEGF signalizace (inhibiční monoklonální protilátky a antagonisté tyrosinkinázových receptorů) představuje další slibnou protinádorovou léčebnou modalitu (Caponigro et al., 2005).

Ve tkáni HNSCC jsou ve zvýšené míře produkovány četné další faktory s proangiogenním účinkem jako **bazický fibroblastový růstový faktor** (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), **destičkami produkovaný endoteliální růstový faktor** (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor, PD-ECGF) a **interleukin-8** (IL-8) (Myoken et al., 1994; Richards et al., 1997).

Při vzniku HNSCC se mohou uplatňovat i aberace faktorů angiogenezi inhibujících jako jsou **interferony** (IFN-α a IFN-β), **trombospondiny** (Thrombospondins, TSPs), **oxid dusnatý** (NO) a PTEN/MMAC1 (Slaton et al., 1999; Nor et al., 2000). **PTEN** (Phosphatase and Tensin Homolog) je produktem tumor supresorového genu lokalizovaného na dlouhém raménku 10. chromozomu (10q23). Mutace v této oblasti patří mezi časté abnormality zjišťované u HNSCC. Snížená produkce PTEN je nezávislým negativním prognostickým znakem (Lee et al., 2001).

Neoangiogenezi je možno kvantifikovat průkazem cévních struktur vyšetřováním markerů endotelových buněk (faktor VIII, CD31, CD34) a následným měřením **mikrovaskulární denzity**. Vysoká hodnota představuje nezávislý negativní prognostický parametr u řady maligních nádorů včetně HNSCC (Shpitzer et al., 1996).

Lymfangiogeneze. Donedávna se nepředpokládala přítomnost a novotvorba lymfatických cév v nádorech, ale dle výsledků novějších studií se zdá, že jsou možné. Tyto děje se zdají být pod vlivem signalizace VEGF-C/Flt-4 a VEGF-D/VEGFR-2 a VGFR-3 (O-charoenrat et al., 2001; Stacker et al., 2001; Karkkainen et al., 2002).

NABYTÍ INVAZIVNÍHO A METASTATICKÉHO FENOTYPU

Normální epitel je oddělen od pojiva lamina propria sliznice kontinuální bazální laminou, která je bohatá na kolagen IV, kolagen VII, lamininy a fibronektin. Ta představuje přirozenou barieru, kterou invazivní nádorové buňky rozrušují a překonávají. Procesy invaze a metastazování jsou mnohastupňové. Během nich dochází k oslabení vazby nádorových buněk navzájem a k bazální lamině, adhezi k molekulám extracelulární matrix a její ložiskové degradaci, migraci podél jejich struktur, a invazi cév. V závislosti na typu invadovaných cév jsou nádorové buňky transportovány do regionálních lymfatických uzlin či vzdálených míst s eventuální extravazací a založením sekundárních ložisek nádoru (Wetzels et al., 1992; Holsinger et al., 2003).

Lamininy představují jedny z hlavních molekul extracelulární matrix. Jsou tvořeny třemi polypeptidovými řetězci navzájem poutanými disulfidickými můstky. Rozlišné funkční domény jejich molekul tvoří receptorová místa pro další molekuly lamininů, kolageny, entaktin a adhezivní molekuly buněčného povrchu. Produkce lamininu-5 nádorovými buňkami sehrává důležitou roli během jejich invaze. Specifický sestřih lamininu-5γ2 proteázou MMP-2 je nezbytný pro následnou migraci a tkáňovou remodelaci. Zvýšená produkce lamininu-5γ2 u karcinomů jazyka představuje nezávislý negativní prognostický marker (Giannelli et al., 2001).

Syndekany jsou proteoglykany bohaté na heparansulfát vážící se k molekulám extracelulární matrix a růstovým faktorům. V průběhu diferenciace

slizničních keratinocytů je bohatě produkován syndekan-1. Naopak u HNSCC je jeho produkce snížená. Bohatá produkce tohoto proteoglykanu je spojena s malým rozsahem primárního tumoru, vysokým stupněm diferenciace a nepřítomností lymfatických metastáz (Anttonen et al., 1999).

Buňky normálního i nádorového epitelu nesou na svém povrchu specifické receptory pro molekuly extracelulání matrix. Jednu z rodin těchto receptorů představují **integriny**. Jde o heterodimerní glykoproteiny tvořené dvěma typy řetězců (α a β), které zprostředkovávají vazbu k lamininům, fibronektinu, vitronektinu a kolagenům. **α6β4 integrin** (antigen A9) je v normálním dlaždicobuněčném epitelu exprimován pouze na bazálním pólu keratinocytů bazální vrstvy. Ve tkáni HNSCC je jeho exprese difúznější. Zvýšená exprese koreluje s výskytem regionálních lymfatických metastáz a sklonem k časnému recidivování (Carey et al., 1992). Obdobný charakter exprese v normálním epitelu i HNSCC vykazují **integriny α2β1 a α3β1**. Jejich zvýšená exprese koreluje s vystupňovanou proliferací a imortalizací nádorové populace (Van Waes et al., 1995). Naopak snížená exprese **integrinu αVβ5** koreluje s maligním fenotypem HNSCC (Thomas et al., 1997).

Kadheriny a kateniny. K jiným adhezivním molekulám patří kadheriny, jejichž aktivita je závislá na přítomnosti kalciových iontů. **E-kadherin** je nezbytný pro organizaci, udržení a morfogenezi epitelů. Tyto glykoproteiny se na cytoplazmatické straně spojují s molekulami kateninů (α, β a γ), které je poutají k cytoskeletu. Aberace exprese kterékoliv z těchto molekul přispívá k narušení funkce epitelu a malignímu chování HNSCC. Snížená exprese E-kadherinu a cytoplazmatická akumulace α-kateninu koreluje s dediferenciací, schopností metastazovat a nepříznivou prognózou (Hirvikoski et al., 1998; Chow et al., 2001).

CD44 je povrchová molekula uplatňující se v mezibuněčných interakcích a interakcích buněk s extracelulární matrix. V normálním epitelu jsou bohatě exprimovány dvě izoformy: (1) CD44H (silně vážící glykany extracelulární matrix), (2) CD44v6 (glykany slabě vážící). Snížená exprese obou izoforem u karcinomů hrtanu koreluje se zvýšeným metastatickým potenciálem a nižším přežitím (Spafford et al., 1996).

Proteolýza komponent extracelulární matrix je nezbytným krokem provázející agresivní chování maligních nádorů. Účastní se jí proteázy produkované nádorovými buňkami, ale i invadujícími buňkami zánětlivé reakce.

Matrix metaloproteázy (Matrix Metaloproteinases, MMPs) jsou širokou rodinou proteáz závislých na přítomnosti kovových iontů (Zn^{II+}). Třídíme je dle jejich substrátů na: (1) intersticiální kolagenázy (MMP-1, -8, -12 a -13), (2) stromelyziny (MMP-3, -7, -10 a -11) a (3) gelatinázy (MMP-2 a -9). Metaloproteázy se účastní procesů invaze, intravazace a extravazace krevních a lymfatických cév.

Ve tkáni HNSCC jsou produkovány četné z rodiny metaloproteáz (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10 a MMP-11). Jejich zvýšená exprese koreluje s invazivním a metastatickým fenotypem karcinomů (Wiegand et al., 2005).

Tkáňové inhibitory matrix metaloproteáz (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, TIMPs) jsou proteiny produkované především stromálními buňkami, které vazbou k aktivovaným MMPs brání jejich degradačnímu účinku. Zdá se, že pro agresivní chování a vznik metastáz HNSCC je důležitá změna poměru MMPs/TIMPs (Petruzzelli, 2000).

Urokinázový typ aktivátoru plazminogenu (Urokinase-Type Plasminogen Activator, uPA) je jinou z proteáz. Její aktivita je regulována vazbou ke specifickému receptoru (Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor, uPAR) a dále ovlivňovaná inhibitorem (Plasminogen Activator Inhibitor). Ve tkáni HNSCC je zvýšená produkce jak uPA tak uPAR. Vystupňovaná koexprese obou molekul koreluje s vysoce invazivním fenotypem a lymfatickým metastazováním (Nozaki et al., 1998).

Serpiny jsou rodinou tkáňových inhibitorů proteáz. Headpin je jedním z členů této rodiny. V normálním epitelu je bohatě exprimován, zatímco u karcinomů dutiny ústní je jeho produkce výrazně snížena (Nakashima et al., 2000). Snížená produkce jiného ze serpinů, maspinu koreluje s metastatickým fenotypem (Xia et al., 2000).

Katepsiny (katepsin-D, -B, -H a -L) jsou lysozomální kyselé endoproteázy účastnící se degradace endogenních či endocytovaných proteinů. Zvýšené exprese katepsinu-D a -B korelují s agresivnim a metastatickým chováním a představují negativní prognostické markery HNSCC (Vigneswaran et al., 2000).

S invazí krevních a lymfatických cév se setkáváme u většiny maligních nádorů, ne všechny však zakládají životaschopné metastázy. Je odhadováno, že méně jak 0,1% všech cirkulujících nádorových buněk dává vznik sekundárním ložiskům (Fidler a Hart; 1982). K jejich zániku přispívají imunitní systém, mechanická traumata a nenalezení příznivých poměrů. Na lokalizaci nádorových buněk se podílí jak aktivní přichycení k endotelovým buňkám, tak mechanické zaklínění nádorových embolů a agregátů v drobných cévách. Následně nádorové buňky adherují k endotelu, vyvolávají jeho retrakci, šíří se do subendoteliálního prostoru a po rozrušení bazální laminy dále do okolního stromatu. Mechanizmy uplatňující se během těchto dějů a další invaze postižených tkání a orgánů jsou shodné s ději odehrávajícími se v místě primárního nádoru (Petruzzelli et al., 2001).

1.4. DIAGNOSTIKA, KLINICKÁ KLASIFIKACE A LÉČBA

Převážnou většinu pacientů postižených karcinomy hlavy a krku tvoří muži starší 50 let. Příznaky jsou určeny lokalizací a rozsahem postižení. Pacienti v časných stádiích nemoci mají obvykle pouze neurčité obtíže charakteru dyskomfortu s minimálním klinickým nálezem. Je třeba vyzdvihnout nutnost pečlivého sledování a vyšetřování pacientů rizikových skupin, zejména kuřáků, jak praktickými lékaři, stomatology, tak i otorinolaryngology.

KARCINOMY DUTINY ÚSTNÍ

Karcinomy dutiny ústní patří k nejčastějším HNSCC. Umístění vede k narušení artikulace a polykání. K projevům časných nádorů patří bolestivost, nehojící se slizniční defekty, neefektivní usazení zubní protézy.

Klinické třídění rozeznává tyto sublokalizace: ret, orální část jazyka, spodina ústní, tvrdé patro, alveolární výběžky, bukální sliznice, retromolární trigonum. Rozsah onemocnění (staging UICC/AJCC) určuje léčebný postup (Shah a Zelefsky, 2003).

V případě časných tumorů (cT1N0, cT2N0) je zpravidla volena chirurgická resekce v místě primárního nádoru s či bez ipsi-/bilaterální elektivní blokové krční disekce. Přibližně stejné léčebné výsledky poskytuje v těchto stádiích léčba zevní radioterapií. Výhodou chirurgie v případě současného ošetření krčních lymfatik je

zpřesnění stagingu (patologický staging), který poskytuje cenné diagnostické a prognostické informace, jež eventuálně vedou k rozšíření léčby. Adjuvantní radioterapie je indikována v případě nádoru blízké linie resekce, perineurální, vaskulární či lymfatické invaze, přítomnosti více jak jedné lymfatické metastázy (pN2, pN3) a při známkách extrakapsulárního šíření. Při postižení jediné lymfatické uzliny bez extrakapsulárního šíření (pN1) je též možné indikovat následné zevní ozáření, ač jeho užitek v této indikaci je sporný (Medina, 2001).

V případě lokálně a regionálně pokročilých resekovatelných nádorů (cT3-4N0, cT1-4N1-3) je zpravidla volena kombinace primární chirurgické resekce s adjuvantní radioterapií na oblast primárního nádoru a regionálních krčních lymfatických uzlin. Hromadí se však výsledky užití chemoradioterapie v těchto indikacích s chirurgií rezervovanou pro případ selhání. Volba chirurgického přístupu (transorální vs. zevní) je určena lokalizací, rozsahem, nutností rekonstrukce vzniklého defektu (Levine a Hood, 2001; Klozar, 2003a).

KARCINOMY OROFARYNGU

Incidence karcinomů orofaryngu v posledních dekádách nebývale vzrostla. Přibývá postižených žen a pacientů bez expozice klasickým rizikovým faktorům. V časných stádiích jsou karcinomy zřídka příčinou výraznějších obtíží a proto bývají onemocnění ve valné většině případů diagnostikována až ve stádiích pozdních. Jejich umístění vede k obtížím při polykání, žvýkání a artikulaci. K nejčastějším obtížím patří chronický dyskomfort a bolest v krku, dysfagie, odynofagie, trizmus, a bolest vyzařující do ucha. Nezřídka pacienti přichází pro zduření regionálních lymfatických uzlin.

Z klinického hlediska rozlišujeme tyto oblasti: patrová mandle, kořen jazyka, měkké patro a zadní stěna. Rozsah onemocnění (staging UICC/AJCC) spolu s lokalizací určuje léčebný postup (Hu et al., 2003).

V časných stádiích onemocnění (cT1N0, cT2N0) je léčebný efekt chirurgie a radioterapie přibližně shodný. Vzhledem k rozsáhlé a bilaterální lymfatické drenáži (snad s vyjímkou lateralizovaných karcinomů tonzily) a funkční morbiditě chirurgie ze strany polykání, je primární volba radioterapie velmi atraktivní (především v USA) (Seikaly a Rassekh, 2001). Výhodou je též zavzetí retrofaryngeálních lymfatických

uzlin do ozařovaného pole. Vzhledem k časnosti postižení regionálních lymfatik je jejich elektivní ošetření, bez ohledu na volenou modalitu, v případech kdy riziko přítomnosti metastáz převažuje 20% standardní součástí léčebného plánu. Je-li volena chirurgie jsou indikací k adjuvantnímu ozáření nádoru blízká linie resekce, perineurální, vaskulární či lymfatická invaze, přítomnosti více jak jedné lymfatické metastázy (pN2, pN3), a extrakapsulární šíření (Rassekh a Johnson, 2001; Klozar, 2003a). Následné ozáření pří postižení jediné lymfatické uzliny bez extrakapsulárního šíření (pN1) je opět kontroverzní (Medina, 2001).

V případě resekovatelných lokálních a regionálně pokročilých nádorů (cT3-4N0, cT1-4N1-3) je zpravidla volena kombinace primární chirurgické resekce s adjuvantní radioterapií na oblast primárního nádoru a regionálních krčních lymfatických uzlin. Hromadí se však výsledky randomizovaných studií užití chemoradioterapie v identických indikacích s ponecháním chirurgie pro případ neúspěchu. Volba chirurgického přístupu (transorální, zevní s/bez protětí mandibuly) je určena lokalizací, rozsahem, nutností rekonstrukce vzniklého defektu. Chemoterapie následovaná radioterapií je vyhrazena pro rozsáhlé inoperabilní leze.

KARCINOMY HYPOFARYNGU

Dlaždicobuněčné karcinomy hypofaryngu jsou vysoce agresivní a jednou z nejletálnějších forem HNSCC. Vzhledem k umístění jsou zpravidla diagnostikovány až v pokročilém stádiu. Hlavními obtížemi bývá dysfagie, odynofagie, chrapot a bolest vyzařující do ucha. Klinicky zjevné lymfatické metastázy jsou v době diagnózy zjišťovány v 70-80% případů, v 10-20% případů pak kontralaterálně či oboustranně (především jde-li o nádor překračující střední čáru). Přerůstání nádoru do okolních oblastí je časté.

Z klinického hlediska rozlišujeme tyto oblasti: piriformní recessus, postkrikoidní a retrokrikoidní oblast. Určení rozsahu onemocnění se řídí klinickým stagingem (staging UICC/AJCC) (Pfister et al., 2003).

Volba léčebného postupu je zatížena řadou kontroverzních témat. Ty odráží špatnou prognózu bez ohledu na užitý léčebný postup, časnost a častost lymfatického postižení, a anatomické poměry v hypofaryngu, jež v případě volby chirurgie zpravidla vyžadují současné provedení totální laryngektomie. Vzácně

diagnostikované časné karcinomy ve vhodné lokalizaci (cT1) je možno stejně úspěšně léčit primární radioterapií nebo omezeným chirurgickým výkonem šetřícím alespoň částečně hrtan (resekce primárního tumoru endoskopicky či zevně z laterální faryngotomie, nebo horizontální supraglotickou laryngektomií). Naprostou většinu karcinomů hypofaryngu však tvoří pokročilá onemocnění (cT2-4) zpravidla se současným postižením lymfatických uzlin (cN1-N3). Dle výsledků retrospektivních analýz je izolované užití radioterapie v těchto případech spojeno s horšími výsledky. Proto je za primární léčebný postup považována kombinace chirurgické resekce tumoru, ošetření regionálních lymfatik a adjuvantní radioterapie. Alternativou k tomuto léčebnému postupu, je vzhledem k morbiditě, indukční chemoterapie s následnou radioterapií (Pfister et al., 2003).

KARCINOMY HRTANU

Hlavními příznaky karcinomů hrtanu je změna hlasu (chrapot, „horký knedlík“), obstrukce dýchacích cest, hemoptýza, odynofagie, dysfagie, bolest vyzařující do ucha, zduření lymfatických uzlin. Charakter obtíží je určen rozsahem a umístěním primárního nádoru – supraglottis, glottis, subglottis. Vzhledem k centrální úloze hrtanu pro tvorbu hlasu a ochranu dolních dýchacích cest před aspirací je rozhodování o léčebném postupu vždy zatíženo otázkami kvality života po léčbě (Desanto, 2001; Bailey, 2001). Obecně v klinických stádiích I a II (cT1N0, cT2N0) jsou aplikovány stejně efektivně konzervativní chirurgické výkony na hrtanu (endoskopické a zevní) či primární radioterapie. Onemocnění v klinickém stádiu III a IV pak buď vyžaduje laryngektomii (parciální zevní a endoskopické výkony, či totální výkony na hrtanu) s či bez blokové krční disekce a adjuvantní radioterapii, nebo indukční chemoterapii s následnou radioterapií (Gopal et al., 2001; Slavíček, 2003). Vzhledem k morbiditě totální laryngektomie přibývá studií druhého z těchto léčebných postupů, kdy je chirurgie volena jako záchranná léčebná modalita v případě neúspěchu. Za těchto okolností je někdy stále možné indikovat parciální výkon na hrtanu.

KARCINOMY NOSOHLTANU

Karcinom nosohltanu mimo endemické oblasti tvoří jen kolem 2% HNSCC. Nejčastěji se projevuje nosní neprůchodností, epistaxí a často jednostranným serózním zánětem středního ucha s převodní sluchovou vadou, v důsledku obstrukce Eustachovy trubice. Pokročilé karcinomy se projevují cefaleou, kraniálními neuropatiemi a krční lymfadenopatií. 70-75% pacientů má regionální lymfatické metastázy v době prezentace. Zobrazovací metody (CT a MRI) jsou nezbytné pro správné posouzení invaze lební baze, přilehlých hlubokých krčních prostor a ke zhodnocení postižení lymfatického. Určení rozsahu onemocnění se řídí klinickým stagingem (staging UICC/AJCC) (Witte a Neel, 2001).

Vzhledem k anatomickým poměrům jsou primárními léčebnými modalitami postupy nechirurgické. V klinickém stádiu I a II je voleno zevní ozáření. V klickém stádiu III a IV (M0) je zpravidla volena konkomitantní chemoradioterapie (Mrzena, 2003; Peters, et al., 2003). Chirurgická léčba je omezena na případy perzistence a recidivy v oblasti regionálních lymfatik, vzácně není-li indikována reiradiace je možná chirurgická resekce lokálních recidiv po ukončené onkologické léčbě. V případě vzdáleného metastatického postižení je možné aplikovat chemoterapii (cisplatinu obsahující režimy) a v případě kompletní odpovědi je pak zpravidla indikována radioterapie.

KARCINOMY DUTINY NOSNÍ A PARANASÁLNÍCH DUTIN

Karcinomy dutiny nosní a vedlejších dutin nosních jsou relativně vzácné. Nejčastěji je postižen sinus maxillaris, dutina nosní a čichový labyrint. V této oblasti se setkáváme histopatologicky se širokým spektrem nádorů, dlaždicobuněčné karcinomy pak tvoří kolem 80% zde lokalizovaných malignit. K časným příznakům patří jednostranně zhoršená nosní průchodnost, epistaxe, a na léčbu neodpovídající sinusitida. Anatomické uspořádání vysvětluje časné šíření do okolních oblastí (patro, očnice, nitrolebí, měkké tkáně tváře, fossa pterygopalatina a infratemopralis etc.), podmiňující obtíže u lokálně pokročilých nádorů (poruchy okulomotoriky, diplopie, proptóza bulbu, epiforie, kraniální neuropatie, trizmus, otok tváře, uvolnění zubů z

alveolů horní čelisti). Nezřídka se též setkáváme s postižením lymfatik (Constantino et al., 2003).

Při rozhodování o léčebném postupu je nezbytné správné zhodnocení rozsahu procesu (CT, MRI, endoskopie, oční a neurologické vyšetření, etc.). U velmi malých tumorů je eventuálně možné aplikovat endoskopický přístup k resekci. Zpravidla jsou však preferovány přístupy zevní (Carrau a Myers, 2001; Constantino et al., 2003; Klozar, 2003b). K výraznému zlepšení prognózy přispěla multidisciplinární spolupráce (otorinolaryngolog, stomatochirurg, neurochirurg, oftalmolog, intervenční radiolog, onkolog, rekonstrukční chirurg, protetik etc.). Vzhledem k anatomickým poměrům a zpravidla pokročilosti procesu zůstává prognóza závažná.

KRČNÍ LYMFATICKÉ METASTÁZY NEZNÁMÉHO PRIMÁRNÍHO KARCINOMU

Část ORL onkologických pacientů je přešetřována pro zduření lymfatických uzlin, které se na podkladě cytologie z biopsie tenkou jehlou či histopatologického vyšetření exstirpované uzliny prokáže být metastázou dlaždicobuněčného karcinomu, kdy primární ložisko karcinomu není zjistitelné anamnesticky, klinickým vyšetřením, zobrazovací metodou (CT či MRI hlavy a krku, PET, RTG plic), při panendoskopii s vyšetřením pohledem a palpačním ani histopatologicky z nejpravděpodobnějších lokalizací (kyretáž nosohltanu, tonzilektomie, excize z kořene jazyka a piriformního recessu) či jiných suspektních ložisek (Davidson a Harter, 2003). Zmíněné komplexní přešetření (pátrání po okultním primárním karcinomu) je zcela nezbytné, neboť při jeho identifikaci je další postup určen lokalizací primárního karcinomu (viz výše). Vzácně, především v případě supraklavikulárně lokalizovaných metastáz s možností lokalizace primárního karcinomu mimo ORL oblast, mohou být výnosné eventuálně další vyšetření. Do budoucna je možno při pátrání po primárním ložisku očekávat přínos molekulárních diagnostických metod (Califano et al., 1999).

Určení léčebného postupu je závislé na rozsahu onemocnění (staging UICC/AJCC). Vzhledem k nezjištěnému primárnímu ložisku, je T-stádium hodnoceno jako T0, navíc pak pro přítomnost lymfatických metastáz (N1-3) může být klinické stádium hodnoceno pouze jako III či IV.

Volba a rozsah léčebného postupu jsou zatíženy řadou kontroverzních témat, kdy dominujícím z nich je přítomnost lymfatických metastáz bez prokazatelného

primárního zdroje, který je předpokládán v oblasti horní části dýchacího a trávicího traktu. Proto je léčba směřována nejen na postižené lymfatické uzliny, ale i potenciální primární ložisko. Zpravidla je prováděna bloková krční disekce následovaná zevním ozářením na oblast krku a osy společné horní části dýchacího a trávicího traktu. Kontroverzní je rozsah obou léčebných modalit. V případě neresekovatelných krčních lymfatických metastáz je možná redukce masy metastáz radioterapií a/nebo chemoterapií s disekcí lymfatických uzlin při pozitivní odpovědi. V těchto případech je kontroverzní rozsah chirurgického výkonu. Jsou-li současně s lymfatickými metastázami diagnostikovány též metastázy vzdálené je léčba obecně paliativní.

Prognóza těchto onemocnění je závažná. Je určena rozsahem postižení (N-staging, extrakaspulární šíření, přítomnost vzdálených metastáz). Lepší prognózu mají pacienti, u kterých léčba proběhla kombinací chirurgie s nechirurgickými postupy, a dále pak pacienti u nichž po ukončení léčby nedojde ke klinické manifestaci před léčbou okultního primárního zdroje (Davidson a Harter, 2003).

1.5. PROGNOSTICKÉ FAKTORY

Navzdory diagnostickým i terapeutickým pokrokům zůstává prognóza pacientů s karcinomy hlavy a krku vážná. Prognostické informace jsou nezbytné pro zhodnocení a výběr optimální léčebné modality s cílem dosáhnout co nejlepší kvality života a nejdelšího přežití. Je nutné zachování dostatečné radikality léčby a zároveň ochrana pacientů před zbytečně agresivními postupy, které zhoršují funkční výsledky (Chiesa et al., 1999). Na prognostické faktory je možno nahlížet z různého hlediska a podle toho je též klasifikovat.

Rizikové faktory (věk, kouření, konzumace alkoholu, etc.) stanovují riziko výskytu nádoru v populaci exponované tomuto faktoru ve srovnání s celou populací. Jejich význam je především v prevenci.

Diagnostické faktory (SCC Ag, Cyfra 21-1, etc.) napomáhají v diagnostice nových nádorů či recidivy onemocnění v preklinickém stádiu. Jejich význam je především diagnostický.

Prognostické markery v užším slova smyslu slouží k přesnějšímu popisu biologických vlastností nádoru (TNM klasifikace, histologická klasifikace, etc.). Jejich význam spočívá v určení správného léčebného postupu.

Prediktivní markery (exprese produktů tumor supresorových genů, onkogenů, angiogeneze, etc.) nám napomáhají k předpovězení účinnosti specifického léčebného postupu.

Jiný náhled na prognostické faktory představuje jejich dělení na faktory týkající se pacienta a faktory popisující vlastnosti nádoru (Smith a Haffty, 2003).

FAKTORY SE VZTAHEM K PRIMÁRNÍMU NÁDORU

Rozsah primárního nádoru (T-staging) v sobě zohledňuje velikost a invazi primárního ložiska. Jeho stanovení se řídí doporučeními AJCC/UICC. Tato klasifikace je pravidelně upravována a snaží se v sobě zahrnout jak informaci prognostickou, tak informace napomáhající ke správné volbě léčebného postupu. Stádium může být stanoveno klinikem (cT) či patologem (pT) měřením maximálního rozměru nádoru.

Rozsah primárního nádoru v případě konvenčního typu HNSCC koreluje s výskytem krčních lymfatických metastáz, lokálním recidivováním a přežitím (Magnano et al., 1997).

Vzhledem ke stanovení rizika přítomnosti krčních lymfatických metastáz, se více než plošný rozsah tumoru, zdá být významnější **hloubka invaze**. Na tuto by měl být brán ohled při rozhodování o léčebném postupu u pacientů bez klinicky suspektního postižení krčních lymfatických uzlin (cN0) (Giacomarra et al., 1999).

Vztah k prognóze a riziku selhání léčby má též **objem primárního nádoru**. K jeho stanovení může napomoci CT či MRI vyšetření (Mancuso et al., 1999).

Radikalita resekce. Pozitivní postresekční okrajové excize mohou jednak představovat podcenění rozsahu onemocnění chirurgem, na druhou stranu mohou odrážet agresivní biologické chování (mikroskopické šíření mezi svalovými vlákny, perineurální šíření, submukozní lymfatické šíření). Pod pojmem nádor v resekční linii se skrývají různé patologické stavy: invazivní karcinom ve vzdálenosti do 5 mm od okraje resekce, CIS či dysplazie v oblasti resekce. Ke správnému zhodnocení stavu je nutná úzká spolupráce chirurga s patologem. Vzhledem k prognostickému

významu je standardní užití peroperačního vyšetření zmrazených řezů z okrajů resekce. Pozitivní výsledek vede k radikalizaci výkonu. Bez ohledu na charakter leze v resekční linii je stav spojen s vysokým rizikem lokálního i regionálního recidivování a celkově špatným přežitím. Dle některých studií zůstávají tyto i přes radikalizaci zvýšené a proto pokud by jinak nebyla indikována adjuvantní radioterapie, mělo by tak být učiněno. U pacientů s perzistentní pozitivitou i přes snahu o radikalizaci výkonu je adjuvantní radioterapie nedílnou částí léčebného postupu. I přes aplikaci kombinovaného léčebného postupu v těchto případech prokazuje řada studií horší prognózu (Ord a Aisner, 1997).

Histopatologický grading. V dlouhodobém měřítku je shledávána buněčná morfologie dlaždicobuněčných karcinomů prognosticky významným faktorem. Současný systém hodnotící proporci nádorové tkáně připomínající normální vrstevnatý dlaždicobuněčný epitel (grading) umožňuje semikvantitativní stanovení histologických parametrů jak vlastního nádoru tak pomezí nádor-hostitel. Systém zohledňuje šest morfologických parametrů: stupeň keratinizace, jaderný pleomorfizmus, mitotickou aktivitu, charakter invaze, stupeň invaze, lymfoplazmocytární invazi. Hodnocení gradingu v nejinvazivnějších porcích nádoru má své opodstatnění, neboť tyto partie jsou pro biologické chování nejdůležitější. Histopatologický grading představuje velmi významný, nezávislý a reprodukovatelný faktor popisující agresivitu chování a korelující s prognozou (Bryne et al., 1989; Giacomarra et al., 1999).

Kromě vlastního gradingu vykazuje řada z hodnocených parametrů vztah k prognóze. Nádory s prominentní dyskohezivní infiltrací zakládají častěji lymfatické a vzdálené metastazy a jsou spojeny s vyšší mortalitu (Spiro et al., 1999). Zvýšená intra- a peritumorosní lymfocytární infiltrace koreluje s nižším a intratumorozní plasmocytární infiltrace naopak s vyšším výskytem krčních lymfatických metastáz (Magnano et al., 1997).

Perineurální invaze představuje relativně častý nález u HNSCC. Koreluje s rizikem krčních lymfatických metastáz, rizikem lokoregionálního recidivování a negativně ovlivňuje přežití (Fagan et al., 1998; Yilmaz et al., 1998).

Vaskulární invaze je považována za známku agresivního chování. Výskyt koreluje s lokoregionálním recidivováním a sklonem k lymfatickému i vzdálenému metastazování (Yilmaz et al., 1998).

FAKTORY SE VZTAHEM K REGIONÁLNÍM LYMFATICKÝM UZLINÁM

Přítomnost regionálních lymfatických metastáz představuje nezávislý a jeden z nejvýznamnějších prognostických faktorů. Jejich přítomnost (c/pN1 – 3) či absenci (c/pN0) zohledňuje TNM-staging UICC/AJCC. Vedle přítomnosti mají k prognóze vztah též další faktory: počet postižených lymfatických uzlin, jejich velikost, lokalizace a přítomnost extrakapsulárního šíření. Postižení více jak jedné lymfatické uzliny větší jak 3 cm (pN2, pN3) spolu se známkami extrakapsulárního šíření jednoznačnou indikací k adjuvantní radioterapii. Je nutno dodat, že proces regionálního lymfatického metastazování je postupný, a při odpovídajícím zhodnocení klinických faktorů (viz výše) a užití dostupných vyšetřovacích metod (US, FNA-cytologie, CT, MRI, PET etc.) relativně předpověditelný (co do lokalizace tak rizika).

Přítomnost patologicky potvrzených lymfatických uzlin (pN+), v porovnání s jejich absencí (pN0), je spojena přibližně s polovičním přežíváním pacientů a koreluje s regionálním recidivováním (O´Brien et al., 1986; Olsen et al., 1994).

Počet lymfatických metastáz též koreluje s regionálním recidivováním, výskytem vzdálených metastáz a přežitím (Olsen et al., 1994).

Velikost regionálních lymfatických metastáz je zavzata do N-klasifikace TNM-stagingu. Velikost lymfatických metastáz koreluje s rizikem regionálního recidivování, vzdálených metastáz, a špatnou prognózou (Mamelle et al., 1994).

Extrakaspulární šíření (Extracapsular Spread, ECS) je přítomno téměř v 60% případů regionálních lymfatických metastáz. Výskyt roste s pokročilostí N-stádia. ECS vykazuje negativní vliv na prognózu v důsledku častého výskytu regionálních recidiv a vzdálených metastáz (Leemans et al., 1993; Gavilan et al., 2000).

Lokalizace krčních lymfatických metastáz. Pro zjednodušení komunikace mezi kliniky a patology, jakož i pro srozumitelnou klasifikaci chirurgických výkonů na krčních lymfatických uzlinách je užívána klasifikace krčních uzlin do šesti oblastí (I-VI), a dalších oblastí mimo tyto (retrofaryngeální, periparotické, bukcinátorové, perifaciální, retroaurikulární, subokcipitální a horní medisatinální) navržená

v Memorial Sloan Cettering Cancer Center a dále upravená. Tato je uznávaná i užívaná většinou otorinolaryngologů a chirurgů hlavy a krku (Robins et al., 1991). Jako **sentinelové uzliny** jsou označovány ty jež představují primární lymfatickou drenáž dané oblasti. Výskyt metastáz mimo sentinelové uzliny je považován za prognosticky nepříznivý (Mamelle et al., 1994). Lokalizace lymfatických metastáz v dolních partiích krku je spojena se zvýšeným rizikem regionálního recidivování a vznikem vzdálených metastáz (Ellis et al., 1989; Shah, 1990).

MNOHOČETNÉ PRIMÁRNÍ KARCINOMY

Vznik **mnohočetných primárních karcinomů** v oblasti hlavy a krku, plic, a jícnu výrazně zasahuje do možnosti efektivního užití léčebných modalit (nemožnost dalšího chirurgického výkonu vzhledem k morbiditě, vyčerpaná radioterapie, kumulující se negativní efekt chemoterapie, etc.). V porovnání s nepostiženým zbytkem populace je riziko synchronních (diagnostikovaných do 6 měsíců od doby stanovení diagnózy primárního nádoru) či metachronních (diagnostikovaných s časovým odstupem větším jak 6 měsíců od diagnózy primárního nádoru) nádorových ložisek ve zmíněných lokalizacích výrazně zvýšené (10 – 30 násobně). Jejich lokalizace má vztah k umístění primárního karcinomu. V případě karcinomů dutiny ústní a orofaryngu bývají další nádory lokalizované častěji do oblasti hlavy a krku, zatímco karcinomy hrtanu jsou častěji spojeny se vznikem karcinomů plic. Histologicky jsou mnohočetné nádory zpravidla obdobného nálezu jako ložiska primárního karcinomu.

K faktorům korelovaným se zvýšeným rizikem mnohočetných HNSCC patří: lokalizace primárního nádoru (dutina ústní, orofarynx, hypofarynx), charakteristiky primární nádoru a lymfatického postižení (nízké T- i N-stádium), nižší věk pacienta, po léčbě pokračující expozice tabáku a alkoholu.

Přežití pacientů se vznikem duplicitních až mnohotných nádorů je závislé na lokalizaci a rozsahu postižení. Obecně horší prognózu, v porovnání s pacienty s duplicitou v oblasti hlavy a krku (5. leté přežití: 20%), mají pacienti s duplicitním karcinomem v oblasti jícnu (5. leté přežití: 3%), a plic (5. leté přežití: 2%) (Schwartz et al., 1994).

Vzhledem k vysoké incidenci a závažnosti mnohočetného výskytu HNSCC a karcinomů v dalších lokalizacích je pravidelná dispenzarizace nedílnou součástí péče o pacienty s HNSCC (klinické vyšetření, zobrazovací metody: US, RTG plic, MRI, CT, FNA-biopsie etc.). Tato, vedle snahy o časnou detekci recidivy v oblasti sliznic a krčních lymfatik, je zaměřena právě k vyloučení vzniku mnohočetných nádorů.

VZDÁLENÉ METASTÁZY

Incidence vzdálených metastatických ložisek dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku je v porovnání s jinými solidními malignitami relativně nízká. Prevalence vzdálených metastáz v klinických studiích je výrazně nižší než ve studiích patologických. Výskyt v době prezentace je udáván mezi 1.5-17%. Nejčastější lokalizací vzdálených hematogenních ložisek jsou plíce, dále pak skelet, játra, kůže, mediastinum a kostní dřeň. Přibližně polovina vzdálených metastáz se manifestuje do 9 měsíců od ukončení léčby a 80% do 2 let (Ferlito et al., 2001b).

Vzhledem ke zmíněným faktům je nutný dostatečně efektivní screening s cílem vyloučení vzdálených ložisek před započetím vlastní lokoregionálně zaměřené léčby (Ferlito et al., 2001c). Součástí běžného screeningového vyšetření je nativní RTG snímek plic a laboratorní biochemické vyšetření. V případě vysokého rizika, nejasného nálezu či podezření na vzdálená ložiska jsou užívány metody s vyšší sensitivitou a specifitou (CT hrudníku, US břicha, CT břicha, scintigrafie skeletu, etc.) (Betka, 2001). Opakování screeningových vyšetření je též nezbytné při zvažované léčbě recidivy či duplicity onemocnění. Vzhledem k závažnosti budou jistě v budoucnosti sehrávat významnou roli nově zaváděná vyšetření (FDG-PET, imuno-PET, molekulárně-biologická vyšetření) (Regelink et al., 2002; de Bree et al., 2003).

Výskyt vzdálených metastáz vykazuje vztah k histologickému typu, lokalizaci primárního tumoru, jeho iniciálnímu T- a N-stádiu, a regionální kontrole nemoci nad úrovní klíčku (Ferlito et al., 2001a).

Přítomnost vzdálených, stejně jako regionálních metastáz je netypická pro verukozní karcinomy bez anaplastické transformace (Medina et al., 1984). Naopak časté jsou vzdálené metastázy u basaloidně skvamosní a vřetenobuněčné varianty HNSCC (Berthelet et al., 1994).

Nejvyšší prevalence vzdálených metastáz je u karcinomů hypofaryngu, orofaryngu, dutiny ústní a hrtanu (Ferlito et al., 2001b).

Výskyt vzdálených metastáz bez postižení regionálních lymfatik je extrémně vzácný. Velmi vysoký výskyt plicních metastáz je častý v případě pokročilého postižení regionálních lymfatických uzlin (bilaterálně stádium N3) (Ferlito et al., 2001b). S vyšším rizikem jsou též spojeny lymfatická a vaskulární invaze, a extrakapsulární šíření.

Efekt léčby je v naprosté většině případů malý a pacienti se vzdálenými metastázami jsou v obecném měřítku považováni za nevyléčitelné. Průměrné přežití se pohybuje v řádech měsíců. Proto je další úsilí zpravidla paliativní (de Bree et al., 2000). Možnosti chirurgie jsou omezeny častým mnohočetným rozsevem. Zkušenosti s metastazektomii v případě izolovaných ložisek (zpravidla v oblasti plic) jsou malé, ale u vhodně vybraných pacientů, se zdají být přínosem (Liu et al., 1999). Efekt radioterapie není považován za kurativní, metoda je však přínosem v rámci paliace. Metastázy HNSCC zpravidla odpovídají na chemoterapii, léčba však výrazně neovlivňuje přežití (de Mulder, 1999). Do budoucna jsou velké naděje vkládány v molekulárně založené léčebné postupy ovlivňující aberantní proliferaci, nádorovou neoangiogenezi či jiné z dějů charakteristické pro HNSCC.

FAKTORY SE VZTAHEM K PACIENTOVI (DEMOGRAFICKÉ FAKTORY)

Řada faktorů ze strany pacienta vykazuje přímý či nepřímý vztah k prognóze těchto zhoubných onemocnění.

Věk vykazuje u řady maligních nádorů přímý vztah k prognóze. Spíše než věk k prognóze HNSCC vykazují vztah faktory s věkem spojené (Leon et al., 1998; Verschuur et al., 1999). Výskyt u extrémně mladých pacientů bez jednoznačné expozice hlavním rizikovým faktorům může nasvědčovat pro genetickou predispozici. Vysoký věk spojený se závažnými komorbiditami může být na překážku užití standardního léčebného režimu, dále se může uplatnit snížená imunitní odpověď či dlouhodobější expozice karcinogenům.

Pohlaví není považováno za faktor ovlivňující přežití pacientů s HNSCC. V některých studiích je zjišťována nepatrně lepší prognóza žen, která je přičítána nižšímu výskytu komorbidit (Kowalski et al., 1991).

Rasa. Dle některých studií z USA vykazují afroameričané s HNSCC horší prognózu, která je však přičítána častější prezentací v pokročilejším stádiu onemocnění (Hoffman at al., 1998).

Pokračující expozice tabáku a alkoholu patří k hlavním faktorům negativně ovlivňujícím prognózu HNSCC pacientů. Přetrvávající expozice alkoholu zvyšuje mortalitu obecně i specificky způsobenou karcinomy hlavy a krku (Deleyiannis et al., 1996). Ještě významnější vliv má pokračující expozice tabáku. Kouření snižuje aktivitu NK buněk a buněčnou imunitu obecně. Navíc zvyšuje hladinu karboxyhemoglobinu čímž vede k tkáňové hypoxii spojené s radiorezistencí (Browman et al., 2000). K horší prognóze navíc přispívá vyšší výskyt mnohotných nádorů (Day et al., 1994). Negativní efekt na výsledky léčby a prognózu se snižuje s prodlužujícím se obdobím mezi ukončením expozice těmto karcinogenů a zahájením léčby.

Komorbidity představují přítomnost dalších onemocnění a stavů výrazně zhoršujících zdravotní stav. Vzhledem k tomu, že většina HNSCC je spojena s dlouhodobou expozicí tabáku a alkoholu není překvapující, že se u těchto pacientů setkáváme s dalšími závažnými onemocněními dýchacího, kardiovaskulárního, zažívacího a centrálního nervového systému. Tyto stavy výrazně ovlivňují péči, volbu léčebného postupu a její výsledky (Piccirillo, 2000).

Vedle komorbidních stavů spojených s expozicí dvěma hlavními karcinogenům, byl prokázán významný vztah mezi stupněm výživy a anemií k prognóze (Goodwin a Torres, 1984; Lee et al., 1998).

MOLEKULÁRNÍ PROGNOSTICKÉ MARKERY

V současnosti je enormní pozornost věnována molekulárnímu podkladu všech nádorových onemocnění. Jistě není s podivem, že řada alterací na molekulární úrovni vykazuje vztah k biologickému chování a prognóze HNSCC (viz kapitola Molekulární mechanizmy vzniku dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku). Nové poznatky napomáhají porozumět dějům spojeným s jejich vznikem a progresí. Je více než pravděpodobné, že některé z těchto „molekulárních cílů“ v blízké budoucnosti (některé již dnes, například inhibitory EGFR signalizace a neoangiogeneze) povedou k zavedení nových efektivnějších léčebných postupů.

Některé mohou představovat nové a spolehlivější prognostické prediktivní faktory HNSCC, které povedou k lepší stratifikaci pacientů, s ohledem na definovaní efektivity (chirurgie, radioterapie, chemoterapie, molekulárně směřovaná terapie, chemoprevence), jakož i eliminaci pro pacienty nadměrně zatěžujících a neúčinných léčebných postupů.

Vedle alterací chromozomálních oblastí se známou lokalizací genů byla definována řada oblastí lidského genomu, kde **ztráta heterozigotnosti** (Loss of Heterozygosity, LOH) vykazuje významný vztah k biologickému chování a prognóze HNSCC (Hussein a Cullen, 2001).

U většiny lidských malignit, je se špatnou prognózou spojena též **DNA aneuploidie**. DNA non-diploidní HNSCC jsou spojovány s vyšším výskytem regionálních lymfatických metastáz, častějším lokálním i regionálním recidivováním, zvýšenou radiorezistencí a horší prognózou (Fu et al, 1994).

Je snaha o efektivnější hodnocení stupně **diferenciace**. Jsou užívána imunohistochemická vyšetření charakteru exprimovaných cytokeratinů a jiných diferenciačně podmíněných markerů (van der Velden LA et al., 1993; Moll, 1998).

Mezi další markery hodnotící biologický potenciál patří vyšetření proliferační kinetiky. Jsou užívány imunohistochemické techniky hodnotící buněčnou **proliferaci** stanovováním exprese PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen; nehistonový jaderný protein asociovaný s DNA polymerázou - znak buněk vstupujících do buněčného cyklu či buněk reparujících poškozenou DNA), či velmi spolehlivého markeru pKi67 (Ki67 Nuclear Antigen; jaderný protein exprimovaný ve všech fázích buněčné cyklu kromě G0) (Brown a Gatter, 2002). Exprese pKi67 u HNSCC je v souhlasu s pokročilým T- a N- stádiem a odpovědí na radioterapii (Valente et al., 1994; Liu et al., 2003). Jinou z technik představuje měření inkorporace brom- a jod-deoxyuridinu do DNA pomocí průtokové cytometrie či imunohistochemie (Begg et al., 1999).

Vzhledem k charakteru molekulárních parametrů je zřejmé, že dominantními studovanými parametry jsou znaky chromozomální/genové a jejich proteinové produkty. V současnosti však začíná být zřejmé, že ke vzniku a progresi zhoubných nádorů přispívají též kvantitativní a kvalitativní aberace sacharidových molekul (buněčné glykokonjugáty) a je rozpoznávajících proteinových molekul (lektiny). Na

tuto doposud méně studovnou část buněčné a nádorové biologie je zaměřena tato práce.

2. GLYKOBIOLOGIE

Glykobiologie je jednou z nejvíce se rozvíjejících podoborů buněčné biologie. Je zaměřena na studium sacharidů a jejich konjugátů, je rozpoznávajících molekul lektinů, a jejich úlohy za fyziologických a patologických stavů. Z glykobiologického hlediska můžeme pod pojem **glykofenotyp** zahrnout soubor glykokonjugátů a lektinů zjišťovaných v buňkách či tkáni.

2.1. SACHARIDY

Sacharidy jsou aldehydy nebo ketony vyšších polyolů. **Monosacharidy** (triosy, tetrosy, pentosy, hexosy, etc.) jsou tvořeny atomy uhlíku, vodíku a kyslíku. U pěti a šestiuhlíkatých monosacharidů aldehydová či ketonová skupina vytváří reakcí s hydroxylovou skupinou na nejvzdálenějším konci molekuly hemiacetalovou vazbu. Tak vzniká pěti- (pentosový) nebo šestičlenný (hexosový) cyklus. Na uhlíku, kde byla aldehydová či ketonová skupina, vzniká nová hydroxylová skupina (hemiacetalový hydroxyl), která je reaktivní. Substitucí hydroxylových skupin jinými skupinami mohou vznikat četné deriváty. V aminocukrech je hydroxylová skupina substituována aminoskupinou (např. N-acetylglukosamin, GlcNAc; N-acetylgalaktosamin, GalNAc; či složitější deriváty jako kyselina N-acetylneuraminová, NeuNAc). Aminocukry jsou součástí glykoproteinů a proteoglykanů, kde výrazně ovlivňují jejich biologické vlastnosti. V molekulách deoxycukrů je určitá hydroxyskupina nahrazena atomem vodíku (např. 2-deoxyribosa, součást deoxyribonukleotidů molekuly DNA).

Pojem cukry označuje mono- a oligosacharidy. **Oligosacharidy** jsou tvořené 2 – 10 monosacharidovými jednotkami navzájem spojenými glykosidickými vazbami. **Polysacharidy** (glykany) jsou tvořeny více jak 10 monosacharidovými jednotkami. Homopolysacharidy jsou tvořené identickými monosacharidovými jednotkami (např. škrob, glykogen, celulosa, agar). Heteropolysacharidy jsou tvořené různými

monosacharidovými jednotkami. Setkáváme se s nimi v řadě makromolekul (proteoglykanů, glykoproteinů, glykopeptidů).

Proteoglykany jsou makromolekulární agregáty, tvořené centrální molekulou proteinu (core protein), ke které jsou prostřednictvím aminokyselin serinu nebo threoninu a trisacharidu Xyl-Gal-Gal vázány molekuly **glykosaminoglykanů**. Řetězce glykosaminoglykanů jsou tvořeny repetitivně se opakujícími disacharidy, ve kterých se střídá molekula uronové kyseliny (D-glukoronová, L-iduronová) s molekulou aminocukru (N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin). Dále pak jsou často molekuly monosacharidů modifikovány esterickou vazbou navázaným sulfátovým reziduem (přes C-4 či C-6). S proteoglykany se v různém kvalitativním zastoupení setkáváme především v pojivových tkáních.

Základem molekul **glykoproteinů** je proteinový řetězec, ke kterému je vázán sacharidový podíl prostřednictvím N-glykosidické (přes amidový dusík asparaginu) či O-glykosidické vazby (přes hydroxylovou skupinu serinu či threoninu).

K dalším glykokonjugátům, se kterými se setkáváme v živé přírodě patří **glykopeptidy** (součást buněčných stěn bakterií) a **glykolipidy** (součást buněčných membrán), ve kterých je sacharidová komponenta vázána k molekule lipidu O-glykosidickou vazbou.

2.2. CUKERNÝ KÓD A BIOLOGICKÝ VÝZNAM SACHARIDŮ

Na sacharidy je v obecné míře nahlíženo jako na jedny ze základních stavebních kamenů živé přírody s úlohou strukturální, energetického rezervoáru, a metabolického zdroje syntézy NADPH a ribosy.

V dlouhodobém měřítku byla opomíjena role sacharidů při ukládání a přenosu informací (Gabius et al., 2002). Ve srovnání s nukleotidy či aminokyselinami poskytuje glykosidická vazba monosacharidům nesoucím velký počet hydroxylových skupin mnohonásobně větší rozmanitost při spojování jednotlivých článků sacharidového řetězce. Vzhledem k této variabilitě, je vedle popisu typu a posloupnosti monosacharidů v oligo- a polysacharidovém řetězci, nutné přesně definovat lokalizaci glykosidické vazby a anomerickou konfiguraci (α/β pozici hemiacetalového hydroxylu vzhledem k rovině cyklu).

Z hlediska informačního potenciálu oligo- a polysacharidy přesahují při identickém počtu základních stavebních kamenů v řetězci počtem možných permutací řádově možnosti nukleotidů i proteinů. Uveďme si několik příkladů a začněme na úrovni trimeru. Trinukleotid tvořený čtyřmi typy purinových a pyrimidinových nukleotidů by mohl existovat ve $4^3 = 64$ možných permutací. Tripeptid tvořený třemi z přirozeně se vyskytujících 20 aminokyselin by mohl existovat ve $20^3 = 8000$ možných permutací. Na výstavbě trisacharidu tvořeném přirozeně se vyskytujícími monosacharidy bychom se mohli setkat s odhadovaným počtem 9×10^6 možných izomerů, které by daly eventuální vznik $9x10^9$ možných permutací. Pokud by byla substituována například jen jedna z hydroxylových skupin (například sulfátem či aminoskupinou) vzrostl by počet desetkrát. Na úrovni vyšší než trimery, vzhledem k většímu množství hydroxylových skupin, které se mohou uplatnit při vzniku větvených řetězců, by počet nebývalým způsobem dále narůstal. Na úrovni hexamerů by počet permutací pro hexanukleotid byl 4096, pro hexapeptid $64x10^6$, pro hexasacharid již $144x10^{12}$.

Cukerný kód má několik úrovní. První z nich je představován sekvencí monosacharidů v oligo- či polysacharidovém řetězci, která je dále ovlivněna konformací. V porovnání s relativně flexibilními peptidovými řetězci je konformační uspořádání glykosidických vazeb mnohem rigidnější. Rigidita je podmíněna strukturou pyranosových a furanosových cyklů spolu s objemnými exocyklickými skupinami. Druhou úroveň představuje větvení sacharidových řetězců. Za další úroveň je možno považovat úroveň prostoru/lokalizace a času. S řadou specifických glykokonjugátů se v organizmech setkáváme pouze v určitých tkáních a orgánech. Exprese jiných je charakteristická pro určitý stupeň vývoje a diferenciace. S přítomností a nebo naopak absencí některých specifických glykokonjugátů se setkáváme pouze za stavu nemoci (Schachter, 1999; Gabius et al., 2002). Je nutno podotknout, že enzymatických procesů vedoucích k výstavbě sacharidových řetězců se účastní široké spektrum enzymů, jejichž aktivita je komplexně regulována. Děje na pozadí regulačních pochodů jsou v současnosti zkoumány a jejich taje odkrývány.

Význam glykobiologických parametrů je nutno vyzvednout vzhledem k praktické všudypřítomnosti cukerných molekul. Více jak polovina všech proteinů v přírodě jsou glykoproteiny (Apweiler et al., 1999). K dalším neméně důležitým

glykokonjugátům je nutno připočítat glykolipidy (neutrální glykolipidy a gangliosidy) buněčných membrán a proteoglykany extracelulární matrix. Buněčný povrch je dokonale pokryt glykokonjugáty (glykokalix) jejichž „sacharidové antény“ dosahují na značnou vzdálenost od plazmalemy. Pak tyto představují místa vlastních intercelulárních interakcí a interakcí buněk s komponentami extracelulární matrix.

Sacharidový podíl glykokonjugátů ovlivňuje jejich buněčné směřování, metabolizmus, jakož i biochemické a biofyzikální vlastnosti (Hirschberg a Snider, 1987; Berninsone a Hirschberg, 2000).

Sacharidové molekuly jsou specificky rozpoznávány řadou proteinů s rozličnými biologickými funkcemi (enzymy, protilátky, transportní proteiny a lektiny). Dále se budeme věnovat lektinům.

2.3. LEKTINY

Lektiny jsou proteiny schopné interagovat se sacharidovými strukturami a tyto vázat. Jsou odlišné od enzymů, protilátek a proteinů akomodujících volné mono- a disacharidy (transportní nebo chemotaktické receptory). S lektiny se setkáváme u virů, prokaryot, rostlin i živočichů (Gabius et al., 2002; Loris, 2002).

Vazba lektinu se sacharidovým ligandem je nekovalentní. Připomíná interakci protilátky s antigenem (Danguy et al., 1998). Z funkčního hlediska je nejdůležitější strukturální součástí molekuly lektinu, která určuje specifickou biologickou aktivitu **doména rozpoznávající sacharidy** (Carbohydrate Recognition Domain, **CRD**).

ROSTLINNÉ LEKTINY

Rostlinné lektiny byly popsány před více jak sto lety, kdy byla rozpoznána jejich schopnost aglutinovat erytrocyty a některé jiné buňky. Teprve později byly nazvány lektiny a byly definovány jako sacharidy vážící proteiny. Největší množství lektinů bylo izolováno a charakterizováno z luštěnin, ale vyskytují se široce v celé rostlinné říši. Předpokládá se jejich úloha při likvidaci patogenů, například hub (Loris, 2002).

Význam rostlinných lektinů pro glykobiologii spočívá v možnosti užití jejich specifické vazby k vybranému typu sacharidu. Lze tak zkoumat glykokonjugáty po kvalitativní i kvantitativní stránce v živočišných a jiných buňkách, tkáních i orgánech.

Rostlinné lektiny bylo a je možné aplikovat například v histologickém a histopatologickém výzkumu (Danguy et al., 1994; Danguy et al., 1998).

ŽIVOČIŠNÉ LEKTINY

Živočišné lektiny jsou endogenní lektiny schopné rozpoznávat a vázat vlastní (endogenní) glykokonjugáty. V současnosti na základě strukturního uspořádání rozlišujeme pět tříd živočišných lektinů: (1) C-lektiny, (2) I-lektiny, (3) galektiny (dříve S-lektiny), (4) P-lektiny a (5) pentraxiny (viz též tabulka 1.). Každá z pěti rodin je dále tříděna do podrodin. Dále bude věnována pozornost galektinům a dvěma z C-lektinů (langerinu a manosovému receptoru).

Tab. 1 Klasifikace živočišných lektinů

Rodina	Strukturní motiv	Sacharidové ligandy
C-lektiny	konzervativní CRD	různé (manosa, galaktosa, fukosa, heparinový tetrasacharid)
I-lektiny	Imunoglobulinu podobná CRD	různé (hyaluronová kyselina, α2,3/α2,6-sialyllaktosa, manosa-6N-acetylglukosa)
galektiny (S-lektiny)	konzervativní CRD	β-galaktosidy
pentraxiny	pentamerové uspořádání	4,6 cyklický acetal β-galaktosy, galaktosa, sulfonylované a fosforylované monosacharidy
P-lektiny	konzervativní CRD	manosa-6-fosfát

Zkratky: CRD carbohydrate recognition domain

Upraveno dle Gabius, 1997.

GALEKTINY

Galektiny, dříve S-lektiny, jsou rodinou vývojově vysoce konzervativních živočišných lektinů. S galektiny se setkáváme u obratlovců i bezobratlých. Galektinům podobné sekvence byly však popsány u virů, rostlin a protozoí (Cooper, 2002). Pro zařazení mezi galektiny musí lektin splňovat následující kriteria: (1) vykazovat vazebnou afinitu k β-galaktosidům, (2) v CRD obsahovat specifické konzervativní sekvenční elementy pro galektiny charakteristické (Barondes et al., 1994). U savců bylo doposud popsáno čtrnáct členů této rodiny (galektin-1 až galektin-14).

Galektiny jsou zpravidla popisovány v extracelulární lokalizaci (na buněčném povrchu či v extracelulární matrix). Setkáváme se s nimi však i v buněčném jádře, submembranozní lokalizaci a cytosolu. Z molekulárního hlediska jde o cytoplazmatické proteiny (acetylovaná N-terminála, absence sulfhydrylových skupin a glykosylace). Chybí jim typické signální sekreční sekvence a k jejich sekreci nedochází klasickou cestou endoplazmatické retikulum/Golgiho komplex. Patří tak do úzkého spektra proteinů secernovaných do extracelulárního prostoru mechanizmy odlišnými od vezikulami zprostředkované exocytózy (Perillo et al., 1998; Menon a Hughes, 1999).

Další z charakteristických vlastností je jejich divalentnost, zprostředkovaná self-asociací či přítomností dvou CRDs v molekule galektinu (Brewer, 2002). Všechny doposud popsané galektiny jsou schopné dosáhnou di- či multivalentních vazeb. **Multimerizace** je častým rysem u řady sacharidy vážících proteinů, snad protože vazebné interakce jednotlivých CRDs i v případě optimálního ligandu vykazují relativně nízkou afinitu. Multimerizace výrazně zvyšuje vazebnou aviditu vůči multivalentním nebo klastrovaným ligandům. Studie zaměřené na ovlivnění avidity galektinů vůči di- a multivalentním ligandům navíc ukazují na úlohu některých z galektinů pro **zesítění** (intra- a intermolekulární crosslinking) ligandů na buněčném povrchu a v extracelulární matrix. Monovalentní galektiny naopak mohou tyto děje kompetitivně inhibovat.

Galektiny třídíme do tří podrodin. První podrodinu, tzv. **prototypních galektinů** (Prototype group) tvoří galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 a -14. Většina z galektinů této podrodiny asociuje do formy homodimerů (například galektin-1 a

galektin-2), jiné pak do formy multimerů či zůstávají ve formě monomerní (například galektin-5, galektin-7 a galektin-10).

Druhou podrodinu, tzv. **tandemově se opakujících galektinů** (Tandem-Repeat group) s dvěma tandemově uspořádanými CRDs, tvoří galektin-4, -6, -8, -9 a -12. Přítomnost dvou CRDs je opětovně významná pro zesítění dvou odlišných glykoligandů (Wasano a Hirakawa, 1999). Spojovací peptidový segment mezi oběma CRDs sehrává v průběhu zesítění neméně důležitou roli (vzdálnost a orientace CRDs) (Cooper, 2002).

Třetím typem (podrodinou) galektinů je tzv. **chimerní typ** (Chimera group) představovaný u obratlovců jediným galektinem, galektinem-3. Galektin-3 má CRD lokalizovanou na C-konci molekuly a v oblasti N-terminály nelektinovou doménu bohatou na prolin, glycin a tyrozin (Cooper, 2002; Hirabayashi et al., 2002). Nelektinová doména je strukturálně blízká doménám důležitým pro self-agregaci jiných proteinů (synexin, synaptofyzin). Identický mechanizmus se pravděpodobně uplatňuje i u galektinu-3, který tak může vytvářet multimerní komplexy a vykazuje pozitivní kooperativitu při vazbě imobilizovaných klastrů glykoligandů. Tento děj je pravděpodobně regulován na úrovni proteolytické degradace působením některých tkáňových metaloproteáz (MMP-2 a MMP-9). Dojde-li k proteolytickému sestřihu molekuly zůstává reziduum galektinu-3 vázáno prostřednictvím CRD ke svým glykoligandům, ale ztrácí schopnost vytvářet multimerní vazby (Cooper, 2002). Řada z dalších biologických vlastností galektinu-3 (sekrece, antiapoptotický efekt) je též závislá na přítomnosti a funkci N-terminální domény (Gong et al., 1999).

K interakci galektinů s jejich glykoligandy není na rozdíl od jiných typů endogenních lektinů nutná přítomnost Ca^{2+} iontů (Gabius, 1997). **Interakce galektinů s jejich glykoligandy** jsou zprostředkovány jejich CRD. CRD je tvořena dvěmi sendvičově uspořádanými antiparaleleními částmi peptidového řetězce se sekundární β-strukturou (Rini a Lobsanov, 1999). Centrální vazebná část (Core Binding Site) pro β-galaktosu je lokalizována na jedné z těchto částí. Interakce CRD s izolovaným monosacharidem galaktosou je slabá, s disociační konstantou v řádech mikromolů. Pro disacharid laktosu (tvořený jednou molekulou glukosy a jednou molekulou galaktosy) je afinita v porovnání s galaktosou přibližně stonásobná (Leffler a Barondes, 1986). Některé delší oligosacharidy vykazují ještě větší afinitu k CRD

než vlastní laktosa. Na základě těchto poznatků je tedy zřejmé, že vazebné místo pro glykoligandy přesahuje vlastní centrální vazebnou část pro β-galaktosu. Aminokyseliny ve vzdálenějších úsecích CRDs jednotlivých galektinů nejsou konzervativní, a tudíž jejich vazba k různým β-galaktosu obsahujícím oligosacharidům vykazuje odlišnou afinitu a specifitu (Hirabayashi et al., 2002). Dále interakce β-galaktosid - CRD ovlivňují eventuální substituce postranních skupin sacharidu. Například N-acetyllaktosaminové epitopy, hojně rozšířené na glykosaminoglykanech extracelulární matrix, jsou dobrými ligandy pro mnoho galektinů. Galektin-3 vykazuje též afinitu k antigenům krevních skupin A (obsahující N-acetylgalaktosamin v poloze α1-3) a B (součástí je galaktosa α1-3). Je tedy nutno zdůraznit, že typický model receptor-ligand, kde jeden ligandový protein reaguje s jedním receptorovým proteinem, nelze striktně použít. Galektiny se vážou specificky na oligosacharidy, které mohou být součástí mnoha glykokonjugátů. Nicméně ne všechny glykokonjugáty s galektiny interagují. V některých případech nejsou sacharidové epitopy přístupné vazbě s galektinem pro jejich nedostupost, způsobenou jinou sacharidovou strukturou nebo nevhodnou konformací celé molekuly glykokonjugátu. Existují také polypeptidové sekvence, které vazbu galektinu s glykoligandem zesilují.

Určité interakce glykokonjugátú s galektiny prokazatelné *in vitro*, se *in vivo* neuplatňují. Příčinou jsou jednak výše uvedené důvody interakci neumožňující, jednak absence příslušných galektinů v konkrétní tkáni. Specifické glykoligandy galektinů se mezi jednotlivými buněčnými typy a tkáněmi liší. Odpověď buňky na navázání galektinu závisí na druhu vazebného místa, protože různé receptory mohou přenášet různé signály (Liu, 2000).

Funkce galektinů. Jak uvedeno jsou galektiny v přírodě široce rozšířené. To naznačuje, že jejich schopnost rozpoznávat a vázat oligosacharidy je pro život velmi významná. U většiny organizmů se setkáváme s větším počtem členů této rodiny endogenních lektinů. Dále pak různé buňky organizmu exprimují různé typy a množství galektinů a prakticky každá buňka disponuje alespoň jedním typem galektinu. Exprese alespoň některých z galektinů je vývojově regulována (Colnot et al., 1996).

Proč jsou v organizmech přítomné geny kódující galektiny, jež rozpoznávají velmi obdobné spektrum cukerných epitopů? Jedním z možných vysvětlení jsou jemné rozdíly ve specifitě vazby k rozličným glykoligandům. Na druhé straně je taková redundance běžná v řadě klíčových biologických mechanismů, kde nadbytečnost funguje jako pojistný mechanizmus zabezpečující případné selhání jednoho z jejich článku.

Galektiny jsou zapojeny do různých biologických procesů vyžadujících rozpoznávání sacharidových motivů: (1) adheze buněk (interakce buněk navzájem a interakce buněk s komponentami extracelulární matrix), (2) regulace buněčné proliferace a apoptozy, (3) sestřih pre-mRNA, (4) úloha v imunitních procesech. Je více než pravděpodobné, že s pokračujícím studiem se spektrum rozpoznaných biologických funkcí galektinů ještě rozšíří.

Adheze buněk. S galektiny se hojně setkáváme na buněčném povrchu a v extracelulární matrix, kde rozpoznávají a vážou poly-N-acetyllaktosaminové řetězce rozličných glykokonjugátů. Tyto se hojně vyskytují v glykoproteinech extracelulární matrix jako jsou laminin, fibronektin a vitronectin (Mataresse et al., 2000). Rozpoznané a vázané glykokonjugáty mohou být galektiny zesítěny. Předpokládá se proto, že galektiny významně modulují interakce buněk navzájem a s mezibuněčnou hmotou (Plzák et al., 2001). Studium významu některých galektinů (**galektin-1** a **galektin-3**) v těchto dějích podalo rozporuplné výsledky ve smyslu pozitivního či negativního ovlivnění adheze buněk ke glykoproteinům extracelulární matrix. Charakter tohoto vlivu (pozitivní či negativní) je totiž pravděpodobně závislý na buněčném typu a vývojovém stádiu buňky (Cooper, 2002; Rabinovich, 2002).

Regulace proliferace a apoptozy. Výsledky ukazují na význam některých galektinů v regulaci buněčné proliferace a apoptozy. Jejich působení (pozitivní či negativní) je určeno typem buňky, její vnímavostí, typem galektinu a jeho koncentrací.

U řady buněk byl prokázán na CRD nezávislý inhibiční vliv **galektinu-1** na proliferaci (Liu et al., 2002). Galektin-1 působí zástavu buněčného cyklu v S a G2/M fázích. Efekt je alespoň u některých buněk závislý na jeho koncentraci. Přidání nízkých dávek exogenního galektinu-1 ke kultuře vnímavých buněk proliferaci stimuluje, vysoká ji naopak inhibuje. Galektin-1 je vazebným partnerem H-ras, a jeho

vazba se zdá být určující pro membránozní lokalizaci tohoto GTP vážícího proteinu (Paz et al., 2001).

U řady normálních i nádorových buněk působí **galektin-3** proproliferačně a antiapopticky. K produkci galektinu-3 dochází vlivem řady proproliferačních signálů (například aktivace T lymfocytů IL-2, IL-4, IL-7 či protilátkou anti-CD3). Pokles produkce je doprovázen sníženou odpovědí na mitogenní signály. Antiapoptotická aktivita je závislá na jeho fosforylaci serinu v pozici 6 (v oblasti N-konce). Fosforylace též určuje intranukleární lokalizaci tohoto galektinu (Yoshii et al., 2002). Vzhledem k antiapoptotickému působení je zajímavé, že galektin-3 interaguje s řadou proteinů s pro- či antiapoptotickým působením (Bcl-2, JNK, AIP-1) (Liu et al., 2002). Antiapoptotické působení se však může odehrávat i na extracelulární úrovni. Galektin-3 se lektinovým mechanizmem uplatňuje v procesech adheze buněk ke komponentám extracelulární matrix a zvýšená adheze chrání buňky před indukcí apoptozy v důsledku ztráty ukotvení (anoikis) (Kim et al., 1999).

Galektin-7 je specificky exprimován ve vrstevnatých dlaždicobuněčných epitelech. V nádorových tkáních vycházejících z těchto epitelů je exprese tohoto lektinu dramaticky redukována (Magnaldo et al., 1998). Jeho mRNA patří k p53 nejvíce indukovaným a zvýšená exprese vlastního lektinu je spojena se zvýšenou apoptozou keratinocytů po expozici UV záření (Bernerd et al., 1999). Má se za to, že galektin-7 sehrává roli při p53 indukované apoptóze. K rozpoznaným mechanizmům spojeným s proapoptotickým působením galektinu-7 patří zvýšený sestřih pro-kaspázy-3 v kaspázu-3, modulace aktivity JNK a ovlivění redoxního potenciálu buňky (uvolňováním cytochromu c) (Kuwabara et al., 2002).

Galektin-12 je charakteristicky exprimován v adipocytech. Je zvažována jeho role při regulaci buněčného cyklu (zástava v G1 fázi) a možném proapoptotickém působení. CRD galektinu-12 má nezávislý vliv na pokles fosforylace pRb a expresi cyklinu A (Hotta et al., 2001). K dalším z galektinů s možnou úlohou v regulaci apoptozy patří **galektin-9** (Liu et al., 2002).

Některé z galektinů se uplatňují při biogenezi RNA, konkrétně **sestřihu pre-mRNA** (pre-mRNA splicing). Během těchto dějů dochází k odstranění exonů a spojování intronů mRNA. Jak **galektin-1** tak **galektin-3** jsou součástí jaderných spliceosomů, kde kolokalizují s dalšími proteiny, jejichž úloha při sestřihu pre-mRNA

je známa (Gemin4, SMN, Sm proteiny, splicing faktor SC35). Sestřihová aktivita je závislá na přítomnosti CRD galektinů (Liu et al., 2002; Purkrábková et al., 2003).

Úloha galektinů v imunitních procesech. Řada z galektinů sehrává roli v imunitních procesech. Na jedné straně galektiny působí amplifikaci kaskády pochodů zánětu, na straně druhé se účastní mechanizmů sloužících k potlačení imunitních dějů, které by mohly organizmus poškodit (Rabinovich at al., 2002).

Galektin-1 je exprimovaný řadou epiteliálních buněk včetně thymu, kde se váže k 2-O-glykanům nezralých kortikálních thymocytů a moduluje jejich přežití během jejich zrání. Mezi glykoproteiny, ke kterým se galektin-1 váže patří CD45, CD43, CD2, CD3 a CD7. Vazba ke glykokonjugátům koreluje se stupněm jejich aktivace a uplatňuje se při indukci apoptozy u neselektovaných a negativně selektovaných nezralých thymocytů. Proapoptotický účinek galektinu je závislý na intenzitě vazby a je CRD dependentní (Rabinovich et al., 2002).

Galektin-1 sehrává roli v modulaci periferní imunotolerance. Po kontaktu s antigenem a aktivaci T buněk dochází k jeho sekreci. Výsledkem je snížená klonální expanze $CD8^+$ T buněk a snížená produkce IL-2. Za určitých zánětlivých stavů aktivované makrofágy, antigenem stimulované T lymfocyty, aktivované B lymfocyty a aloreaktivní T lymfocyty produkují velká množství galektinu-1, který vede k apoptoze efektorových T lymfocytů po dokončení jejich imunitních funkcí (Vespa et al., 1999). Je zajímavé, že galektin-1 je ve zvýšené míře produkovaný v imunopriviligovaných tkáních (retina, placenta, testes, ovaria). Zde se může účastnit časné eliminace T lymfocytů v případě jejich invaze (Rabinovich et al., 2002).

Galektin-1 též inhibuje IL-2 indukovanou adhezi T lymyfocytů ke glykoproteinům extracelulární matrix. K dalším úlohám je nutno přičíst inhibiční vliv galektinu-1 na uvolňování kyseliny arachidonové z lipopolysacharidem stimulovaných makrofágů, negativní efekt na extravazaci neutrofilů, degranulaci mastocytů a syntézu oxidu dusnatého (Rabinovich et al., 2000).

Galektin-3, na rozdíl od galektinu-1, působí na T lymfocyty proproliferačně a antiapoptoticky. Úroveň, na které se jeho působení odehrává je pravděpodobně intracelulární (Rabinovich et al., 2002).

Galektin-3 indukuje adhezi neutrofilů k lamininu (Kuwabara a Liu, 1996). Navíc potencuje prezentaci antigenů zprostředkováním interakce dendritických buněk s naivními lymfocyty. Galektin-3 se spolu s jiným lektinem, langerinem, účastní formování Birbeckových granul, se kterými se setkáváme v Langerhansových buňkách (Smetana et al., 1999; Valladeau et al., 2000).

Galektin-3 též vykazuje chemoatrakční vliv na monocyty a makrofágy. Během zánětu galektin-3 stimuluje tvorbu superoxidových radikálů neutrofily, aktivuje NADPH oxidázu a potencuje lipopolysacharidem indukovanou produkci IL-1 monocyty (Jeng et al., 1994; Karlsson et al., 1998).

Aberace funkcí galektinů v řadě experimentálních modelů na zvířatech korelují se vznikem autoimunitních chorob. Je možné, že se účastní jejich vzniku i u člověka (Rabinovich et al., 2002).

Některé z galektinů se též účastní hypersensitivních reakcí I. typu. Galektin-3 působí zesítění preformovaných IgE protilátek vázanách k Fcε receptorům (byl proto nazýván IgE-Binding Protein, εBP). Zatímco galektin-1 vede k cytokinové odpovědi „Th2 typu“, galektin-3 blokuje transkripci genu pro IL-5 u eozinofylů a alergen-specifických T buněk (Cortegano et al., 2000). Vzhledem k prozánětlivému působení galektinu-3 a zároveň pravděpodobnému antialergickému působení se zdá, že jeho působení je závislé na patofyziologické situaci (Th1 či Th2 typ). Vzhledem k úloze v hypersenzitivních reakcích je nutné zmínit i další galektiny. Galektin-9 je ve zvýšené míře produkován periferními mononukleáry u alergických pacientů a působí jako selektivní, T buňkami derivovaný chemoatraktant eozinofylů (Matsumoto et al., 1998). **Galektin-10** (protein Charcot-Leidenových krystalů) je selektivně exprimovaný eozinofyly a bazofily (Ackerman et al., 1993). K dalším z galektinů uvolňovaným eozinofyly v rámci odpovědi na alergen je **galektin-14** (Dunphy et al., 2002).

VYBRANÉ C-LEKTINY - LANGERIN A MANOSOVÝ RECEPTOR

Langerin (CD207) patří k transmembránovým receptorům druhého typu. Obsahuje ve své struktuře jednu CRD, pomocí které rozpoznává a váže manosu obsahující glykokonjugáty. Vzhledem k této schopnosti langerin náleží do jedné z podrodin C-lektinů (manosové receptory). Exprese langerinu je charakteristická pro specifický typ dendritických buněk – Langerhansovy buňky (Valledau et al., 2000). Tyto

specializované buňky imunitního systému se účastní prezentace antigenů (Antigen Presentating Cells, APCs). S Langerhansovými buňkami se setkáváme v epitelech, kde sehrávají esenciální roli při imunitních funkcích (immunosurveillance) (Plzák et al., 2002a; Plzák et al., 2003). Z glykobiologického hlediska je zajímavé, že langerin spolu s dalším endogením lektinem, galektinem-3 se účastní formování Birbeckových granul, se kterými se setkáváme právě v Langerhansových buňkách. Je zajímavé, že nebyla prokázána exprese galektinu-3 vlastními Langerhansovými buňkami (v dlaždicobuněčných epitelech ano), což navědčuje významné spolupráci mezi tímto typem dendritických buněk a keratinocyty při rozpoznávání antigenů (Smetana et al., 1999). K rozpoznaným funkcím langerinu patří prezentace nepeptidových antigenů, především glykolipidů, T lymfocytům (Hunger et al., 2004).

Z imunologického hlediska je zajímavé, že manosylované antigeny v porovnání s nemanosylovanými jsou APCs prezentovány mnohem efektivněji (Agnes et al., 1998). Při prezentaci manosylovaných atigenů sehrává dominantní roli právě **manosový receptor** (CD206) (Linehan et al., 1999). S tímto C-lektinem se setkáváme u řady nematurovaných dendritických buněk a makrofágů, nikoliv však u Langerhansových buněk (Mommaas et al., 1999).

2.4. GLYKOBIOLOGICKÉ PARAMETRY V NÁDOROVÉ BIOLOGII

Některé z charakteristických rysů nádorových buněk (invazivní chování, metastatická aktivita, únik před imunitními mechanizmy) jsou spojeny s kvalitativními či kvantitativními odchylkami oligosacharidových sekvencí buněčného povrchu (Schauer, 2000; Dall´Olio a Chiricolo, 2001; Cao et al., 2002; Lin et al., 2002). K nejčastějším alteracím maligních buněk patří zvýšená exprese hypersialylovaných (bohatých na kyselinu N-acetylneuraminovou; NeuNAc) N-vázaných oligosacharidoých řetězců. Exprese α2,3/6-NeuNAc glykoepitopů se zdá být v lidských tkáních pod vlivem onkofetální regulace (Vertino-Bell et al., 1994; Holíková, et al., 2002). Sialylované epitopy mohou být rozpoznávány specifickými lektinovými receptory (Sigleky, Siglecs). Dále je popisován maskující NeuNAc na rozpoznávání subterminálně lokalizovaných galaktosových reziduí sacharidových řetězců

glykokonjugátů některými z galektinů (galektin-3) (Hirabayashi et al., 2002; Holíková, et al., 2002).

Řada studií popisuje vztah některých z lektinů k malignímu chování rozličných nádorů. Velká pozornost je věnována především galektinům (Danguy et al., 2002).

Zvýšená exprese galektinu-3, v porovnání s normálními tkáněmi sliznice žaludku a hepatocyty koreluje s metastatickým chováním adenokarcinomů žaludku a hepatocelulárního karcinomu (Lotan et al., 1994; Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1999). Ve tkáni kolorektálního karcinomu je popsána zvýšená exprese galektinu-1 a galektinu-3, která vykazuje vztah k pokročilému stádiu a kratšímu přežití (Schoeppner et al., 1995). Naopak v průběhu maligní transformace je snížena exprese galektinu-8 (Nagy et al., 2002).

Ve tkáni adenokarcinomů pankreatu je popsána intenzivní imunoreaktivita stromálních fibroblastů pro galektin-1. Nádorové buňky lymfatických a jaterních metastáz vykazují vysoký stupeň exprese galektinu-3, zatímco imunoreaktivita pro galektin-1 zjišťována není (Danguy et al., 2002).

Zvýšená cytoplazmatická exprese galektinu-1 a galektinu-3 je popisována u všech typů karcinomů štítné žlázy (Chiariotti et al., 1995). Exprese galektinu-3 roste v řadě normální tkáň, folikulární adenom, folikulární karcinom, papilární karcinom. Z hlediska vztahu exprese tohoto endogenního lektinu k biologickému potenciálu papilárních karcinomů štítné žlázy je též zajímavé, že v tkáni lymfatických metastáz není exprese zjišťována (Kawachi et al., 2000).

U karcinomů endometria je zvýšená exprese galektinu-1 a naopak snížená exprese galektinu-3 (v porovnání s netransformovaným epitelem). Exprese je popisována jak intracytoplazmaticky, tak intranukleárně. Izolovaná exprese pouze v cytoplazmě koreluje s invazivním fenotypem (van den Brule et al., 1996). U adenokarcinomů prsu je popisována snížená cytoplazmatická exprese galektinu-3, která koreluje se zvyšujícím se histopatologickým gradem. Adenkoarcinomy prsu (především lobulární) jsou jediné, ve kterých je popsána zvýšená produkce galektinu-8 (Danguy et al., 2001).

U adenokarcinomů prostaty je popsána zvýšená exprese galektinu-1 ve stromálních fibroblastech, která koreluje s agresivním chováním (van den Brule et al., 2001). V adenokarcinomech ledviny je pozorována snížená exprese galektinu-1. Její

pokles koreluje se stupněm dediferenciace a biologickou agresivitou (Gabius et al., 1999).

Úloze galektinů u neepitelových nádorů je též věnována pozornost. Koexprese galektinu-3 a CD30 je popsána u anaplastického velkobuněčného lymfomu a zdá se být pro tento typ non-Hodgkinských lymfomů charakteristická (Hsu et al., 1996). U leiomyosarcomů dělohy je zvýšená exprese galektinu-3 a jeho ligandů, která není zjišťována u leiomyomů (Schwarz et al., 1999). U astrocytomů je popisován variabilní stupeň exprese galektinu-3. Nálezy jsou dávány do souvislosti s proteolytickým účinkem matrix metaloproteáz (Ochieng et al., 1998). Zvýšená exprese galektinů-1 a -3 koreluje se zvýšenou migrací a agresivitou těchto nádorů (Camby et al., 2002).

GLYKOFENOTYP DLAŽDICOBUNĚČNÝCH EPITELŮ A KARCINOMŮ HLAVY A KRKU

V posledních letech byly publikovány výsledky několika prací zaměřené na glykobiologické parametry netransformovaných a maligních dlaždicobuněčných epitelů sliznic hlavy a krku jakož i morfologicky obdobného epitelu kůže (epidermis). V těchto studiích byly užívány techniky lektinové histochemie (značených rostlinných a rekombinantních endogenních lektinů) a imunohistochemie k popisu exprese endogenních lektinů a jimi rozpoznávaných glykoligandů (Smetana et al., 2003). Simultánně prováděná vyšetření, současně detekující jiné dobře definované znaky, byla zaměřena na vztah glykobiologických parametrů ke stupni diferenciace a jiným vlastnostem buněk epitelů.

Galektin-1 a jím rozpoznávané glykoepitopy jsou bohatě exprimovány v cytoplazmě buněk stratum bazale i vrstev suprabazálních **dlaždicobuněčných epitelů** sliznic hlavy a krku i v epidermis (Plzák et al., 2000; Smetana et al., 2003). Obdobný charakter, co do lokalizace, vykazuje exprese galektinu-7, jehož exprese je pro tyto epitely charakteristická (Magnaldo et al., 1998; Liu et al., 2002). Exprese galektinu-3 a jeho glykoligandů je popisována pouze v suprabazálních vrstvách epitelů, tedy vrstvách, kde jsou lokalizovány pouze terminálně diferencované postmitotické buňky (Plzák et al., 2001). Není tedy překvapující, že buňky reagující s galektinem-3 neexprimují pKi67 a β_1-řetězce integrinů (znaky charakteristické pro buňky stratum bazale). Vazebná místa pro galektin-3 jsou lokalizovaná do oblasti

extracelulární a kolokalizují s expresí desmozomálních proteinů desmoplakinu a desmogleinu (Plzák et al., 2002b).

Ke studiu spektra exprimovaných sacharidových motivů byly užity některé rostliné lektiny. *Dolichus biflorus* agglutinin (DBA) rozpoznává α-N-acetylgalaktosaminová rezidua oligosacharidových řetězců (včetně trisacharidu krevní skupiny A, tedy sacharidového motivu rozpoznávaného též galektinem-3). Obdobně jako vazba galektinu-3 je vazba tohoto rostlinného lektinu prokazována v suprabazálních vrstvách dlaždicobuněčných epitelů. Dále je popisována jeho extracelulární reaktivita v určitých okrscích buněk stratum bazale. Lektinem rozpoznané buňky nevykazují známky mitotické aktivity (pKi67), navíc exprese β_1-integrinových řetězců (v oblasti kontaktu s bazální laminou) je výrazně nižší než u DBA-areaktivních buněk (Hrdličková-Cela et al., 2001). Mitoticky aktivní buňky stratum bazale (exprimující pKi67) vykazují perinukleární DBA-reaktivitu. Tyto DBA-pozitivní cisterny a granula též obsahují β_1-řetězce integrinů a protein p58 (marker ERGIC, Endoplasmatic Reticulum Golgi Intermediate Compartment) (Dvořánková et al., 2002; Plzák et al., 2002b). S akumulací β_1-řetězců integrinů v ERGIC oblasti se setkáváme u buněčných mutant s narušenou adhezivní aktivitou (Martel et al., 2000). Je tedy zvažováno uplatnění glykosilace β_1-integrinových řetězců vedoucí k jejich retenci v ERGIC. Na DBA-reaktivní buňky stratum bazale by pak mohlo být nahlíženo, jako na buňky časných stádií diferenciační kaskády migrující z vrstvy bazální do vrstev suprabazálních (Smetana et al., 2003).

Ke studiu silalylovaných (kyselinu N-acetylneuraminovou obsahujících, NeuNAc) sacharidových motivů bylo užito dvou jiných rostlinných lektinů: *Maackia amurensis* agglutinin (isolektin typ II) a *Sambucus* nigra agglutinin (lektin), které specificky rozpoznávající NeuNAc vázanou v pozici α2,3 a α2,6 respektive. Tento aminocukr je obvykle lokalizován v terminálních pozicích oligosacharidových řetězců. Exprese α2,6-NeuNAc vykazuje v řadě tkání charakter onkofetální regulace. V dlaždicobuněčných epitelech kůže, rohovky a hlasivky je exprese α2,6-NeuNAc omezená do oblasti stratum bazale. Exprese α2,3-NeuNAc v těchto epitelech je popisována v suprabazálních vrstvách a též některých oblastech vrstvy bazální. Je zajímavé, že enzymatické odštěpení neuraminových kyselin vede ke zpřístupnění normálně nezjišťovaných vazebných míst pro galektin-3 v oblasti stratum bazale.

Data jsou v souhlasu s popsaným maskujícím efektem α2,6-NeuNAc na subterminálně lokalizovaná galaktosová rezidua (Hirabayashi et al., 2002). Vzhledem k tomu, že tyto galektin-3-reaktivní ligandy jsou extrahovatelné solventy lipidů je pravděpodobné, že se na této arteficiální reaktivitě podílí sacharidové řetězce glykolipidů (Holíková et al., 2002).

V suprabazálních vrstvách nekeratinizujících dlaždicobuněčných epitelů byla u osob s krevní skupinou A/B a sekretorickým fenotypem popsána exprese A/B sacharidových antigenů v molekulách glykolipidů a glykoproteinů (Dabelsteen, 2002). Glykosilace některých glykoproteinů může ovlivňovat asociaci α6, α3 s β1 řetězci integrinů (Ichikawa et al., 1997).

Charakter glykofenotypu **nádorů vycházejících z dlaždicobuněčných epitelů** vykazuje v porovnání s normálními tkáněmi některé odlišnosti, jež činí další studium těchto parametrů velmi atraktivním.

Ve tkáni **dlaždicobuněčných karcinomů** hrtanu a orofaryngu byla zjištěna bohatá a prakticky uniformní exprese galektinu-1 a jeho glykoligandů (Plzák et al., 2000; Plzák et al., 2001). Existují studie jež udávají expresi galektinu-1, v porovnání s netransformovanými epitely sníženou (Choufani et al., 1999).

Exprese galektinu-3 bývá u těchto malignit udávána snížená a omezená na diferencované oblasti nádorů (Plzák et al., 2000; Plzák et al., 2001). Galektin-3 je popisován v intranukleární a extracelulární lokalizaci (Pianteli et al., 2002). Snížená exprese koreluje s horším stupněm diferenciace a klinicky agresivním chováním karcinomů (Choufani et al., 1999; Delorge et al., 2000). Galektin-3-reaktivní ligandy jsou detekovány pouze v diferencovaných oblastech dlaždicobuněčných karcinomů. Obdobně jako u netransformovaných epitelů vykazují galektin-3-reaktivní buňky expresi desmosomálních proteinů desmogleinu a desmoplakinu (Plzák et al., 2000; Plzák et al., 2001). Absence galektin-3-reaktivních glykoligandů byla popsána ve většině případů regionálních krčních metastáz u karcinomů orofaryngu (Plzák et al., 2001).

Maligní transformace dlaždicobuněčných epitelů, včetně epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího traktu, je spojena s poklesem exprese galektinu-7 (Bernerd et al., 1997; Magnaldo et al., 1998).

Ve vztahu k expresi sacharidových epitopů antigenů ABH systému u HNSCC je ztráta A/B epitopů spojená se zvýšenou expresí α6β4 integrinů, a koreluje s agresivnějším chováním a horší prognózou (Dabelsteen, 2002).

Charakter exprese α2,3/6-NeuNAc v karcinomech vykazuje vztah k morfologickému vzhledu nádorových buněk. α2,6-NeuNAc obsahující sacharidové epitopy jsou detekovány u špatně diferencovaných buněk. Naopak α2,3-NeuNAc glykoepitopy jsou popisovány v morfologicky dobře diferencovaných oblastech dlaždicobuněčných karcinomů. Stejně jako v netransformovaných epitelech je natrávení neuraminidasou spojeno s odkrytím dříve nedetekovatelných vazebných míst pro galektin-3 (Holíková et al., 2002; Plzák et al., 2002b). Sialylace vykazuje vliv na efektivitu signalizace EGFR. Desialylace (především eliminace α2,3-NeuNAc) je spojena se snížením afinity receptoru k jeho ligandům a snížením proliferační aktivity nádorové linie (Bergler et al., 1998).

Ve slizničních papilomech a basocelulárních karcinomech epidermis je udávána exprese galektinu-1 a -3, jejich glykoligandů a α2,3/2,6-NeuNAc analogní fenotypu netransformovaných epitelů sliznic a kůže (Plzák et al., 2001).

B) CÍLE PÁCE, MATERIÁLY A METODY

Disertační práce je zaměřena na glykobiologické aspekty (glykofenotyp) dlaždicobuněčných epitelů a karcinomů hlavy a krku, epidermis a buněčných kultur keratinocytů. Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- **Stanovení exprese endogenních lektinů, jejich vazebných míst a užití rostlinných lektinů pro hodnocení exprese jimi rozpoznávaných glykokonjugátů.**
- **Zhodnocení významu glykobiologických parametrů a jejich zavedení do buněčné a nádorové biologie dlaždicobuněčných epitelů.**

V práci byly využívány cyto- a histochemické techniky. Užíváno bylo tří základních metod: (1) imunocyto- a imunohistochemie – jež sloužily k detekci příslušných endogenních lektinů či jiných sledovaných proteinových markerů, (2) lektinová cyto- a histochemie - s užitím rostlinných a značených endogenních lektinů sloužila k detekci jejich sacharidových ligandů odpovídající vazebným místům pro dané sondy, (3) reverzní lektinová cyto- a histochemie - užívající neoglykokonjugáty k průkazu endogenních vazebných míst pro užité sacharidové znaky.

Uvedené techniky byly užity při zpracování zmrazených řezů, z odebraných biopsií, a buněk tkáňových kultur *in toto*. Zpracování zmrazených vzorků je obecně doporučováno pro lektinové histochemické studie (Kannan et al., 1997), neboť při tomto postupu je minimalizována ztráta a alterace zkoumaných sacharidových skupin v průběhu zpracování tkání. K vizualizaci proběhlých histochemických reakcí byly užity fluorescenční metody pro jejich výhodu možnosti dvojitého a vícenásobného simultánního značení. K počítačové analýze snímaného obrazu byl užíván systém LUCIA GF Magic 4.31, který dovoluje podrobnější zpracování získaného obrazu včetně měření profilu fluorescenčních intenzit. Ke statistickému zpracování dat při retrospektivní analýze vztahu glykobiologických parametrů (exprese vazebných míst pro galektin-3) k parametrům klinickým a patologickým bylo užito programu STATISTICA 6.0.

Dále je část materiály a metody koncipována jako soubor publikovaných prací.

C) SOUBOR PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

(Jednotlivé práce jsou přiloženy v chronologickém pořadí.)

(1) Plzáková Z, Chovanec M, Smetana K Jr, Plzák J, Štork J, Saeland S. Comparison of the expression of Langerin and 175 kD mannose receptor in antigen-presenting cells in normal human skin and basal cell carcinoma. Folia Biol (Praha). 2004;50:71-3. **(IF 0.527)** – podíl 15%

(2) Chovanec M, Smetana K Jr, Purkrábková T, Holíková Z, Dvořánková B, André S, Pytlík R, Hozák P, Šedo A, Vacík J, Gabius HJ. Detection of cell type and marker specifity of nuclear binding sites for anionic carbohydrate ligands. Biotech Histochem. 2004;79:139-50. **(IF 0.400)** – podíl 15%

(3) Chovanec M, Plzák J, Betka J, Brabec J, Kodet R, Smetana K Jr. Comparative analysis of alpha 2,3/2,6-linked N-acetylneuraminic acid and cytokeratin expression in head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2004;12:297-301. **(IF 1.256)** – podíl 50%

(4) Plzák J, Betka J, Smetana K Jr, Chovanec M, Kaltner H, André S, Kodet R, Gabius HJ. Galectin-3 – an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. Eur J Cancer. 2004;40:2324-30. **(IF 3.694)** – podíl 20%

(5) Chovanec M, Smetana K Jr, Dvořánková B, Plzáková Z, André S, Gabius HJ. Decrease of nuclear reactivity to growth-reagulatory galectin-1 in senescent human keratinoctes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for glectin-1 and –3. Anat Histol Embryol. 2004;33:348-54. **(IF 0.709)** – podíl 30%

(6) Klíma J, Smetana K Jr, Motlík J, Plzáková Z, Liu FT, Štork J, Kaltner H, Chovanec M, Dvořánková B, André S, Gabius HJ. Comparative phenotypic characterization of keratinocytes originating from hair follicles. J Mol Histol. 2005;36:89-96. **(IF 0.671)** – podíl 10%

(7) Plzák J, Smetana K Jr, Chovanec M, Betka J. Glycobiology of head and neck squamous epithelia and carcinomas. ORL . 2005;67:61-9. **(IF 1.300)** – podíl 15%

(8) Chovanec M, Smetana K Jr, Betka J, Plzák J, Brabec J, Álvarez VM, André S, Kodet R, Gabius HJ. Correlation of expression of nuclear proteins pKi67 and p63 with

lectin histochemical features in head and neck squamous cell cancer. Int. J. Oncol. 2005;27:409-415. **(IF 3.056)** – podíl 50%

(9) Chovanec M, Smetana K Jr, Plzák J, Betka J, Plzáková Z, Štork J, Hrdličková E, Kuwabar I, Dvořánková B, Liu FT, Kaltner H, Gabius HJ. Detection of new diagnostic markers in pathology by focus on growth-regulatory endogenous lectins. The case study of galectin-7 in squamous epithelia. Prague Med. Rep. 2005; 106:209-216. – podíl 30%

(10) Dvořánková B, Smetana K Jr, Chovanec M, Lacina L, Štork J, Plzáková Z, Galovičová M, Gabius HJ. Transient expression of keratin 19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. Int J Mol. Med. 2005;16: 525-531. **(IF 3.190)** – podíl 15%

(11) Smetana K Jr, Dvořánková B., Chovanec M, Bouček J, Klíma J, Motlík J, Lensch M, Kaltner H, André S, Gabius H-J. Nuclear presence of adhesion-/ growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. Histochem. Cell Biol. 2006;125: 171-182. **(2.594)** – podíl 15%

C) VÝSLEDKY

NETRANSFORMOVANÉ DLAŽDICOBUNĚČNÉ EPITELY SLIZNIC HORNÍ ČÁSTI TRÁVICÍHO A DÝCHACÍHO SYSTÉMU

PROTEINOVÉ ZNAKY DIFERENCIACE A PROLIFERAČNÍHO/ ANTIAPOPTICKÉHO POTENCIÁLU: CK10, pCK37, pKi67, ΔNp63α
(publikace 3., 4., 7., 8.)

Exprese vybraných proteinových znaků byla studována imunohistochemicky užitím specifických monoklonálních protilátek v epitelech dutiny ústní (orální část jazyka, spodina ústní), orofaryngu (kořen jazyka, patrová mandle), hlasivky a hypofaryngu.

Přítomnost intermediálních filament s podílem cytokeratin peptidu 37 (pCK37) byla zjišťována v oblasti stratum bazale všech studovaných epitelů. Vzácně byla též pozorována u buněk nízkých parabazálních vrstev. Exprese cytokeratinu 10 byla sledována v buňkách suprabazálních vrstev epitelu orální části jazyka.

Jaderné proteiny pKi67, ΔNp63α byly sledovány pouze v buňkách stratum bazale vyšetřovaných epitelů. Zatímco exprese ΔNp63α byla v této oblasti téměř homogenní, exprese pKi67 byla omezená (1-5% buněk stratum bazale). Proliferující buňky (pKi67+) byly uspořádány do drobných ostrůvků nebo jsme se s nimi setkávali izolovaně.

Vztah studovaných glykobiologických parametrů k jednotlivým vyšetřovaným parametrům diferenciace a proliferačnímu/antiapoptickému potenciálu je rozebírán dále.

ROSTLINNÉ LEKTINY: *MAACKIA AMURENSIS* AGGLUTININ (ISOLEKTIN TYP II), *SAMBUCUS NIGRA* AGGLUTININ
(publikace 3., 7., 8.)

Technikou lektinové histochemie využívající vazbu značených rostlinných lektinů *Maackia amurensis* agglutininu (isolektinu typ II) (MAA) a *Sambucus nigra* agglutininu (SNA) byly rozpoznávány glykokonjugáty buněčného povrchu obsahující

kyselinu N-acetylneuraminovou (NeuNAc) vázanou v poloze α2,3 a α2,6 respektive. Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání (dutina ústní, orofarynx, larynx, hypofarynx) byla též prováděna simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, cytokeratin peptid 37, pKi67, ΔNp63α).

Již dříve popsaný diferenciačně podmíněný charakter exprese α2,3/6-NeuNAc v epitelu rohovky, epidermis a hlasivky byl potvrzen v popsaných i dalších lokalizacích sliznic horní části trávicího a dýchacího systému (dutina ústní – spodina ústní, kořen jazyka, patrová mandle, hlasivka, hypofarynx) (Holíková et al., 2002). Přítomnost α2,6-NeuNAc obsahující povrchových glykoepitopů byla charakteristická pro buňky stratum bazale. Jen vzácně byla NeuNAc v této pozici pozorována u buněk parabazálních vrstev. SNA-reaktivní buňky bazální vrstvy vykazovaly přítomnost intermediálních filament s podílem pCK37. Identické buňky vykazovaly proliferační aktivitu (pozitivita jaderného signálu pro pKi67), jakož i expresi transkripčního faktoru ΔNp63α.

Přítomnost α2,3-NeuNAc obsahující glykoepitopů se tedy zdá být charakteristická pro terminálně diferencované postmitotické buňky suprabazálních vrstev. Vzácně byly tyto cukerné epitopy zjišťovány v malých ostrůvcích buněk bazální vrstvy, které neexprimovaly jaderné proteiny pKi67 a ΔNp63α. V analogii s tímto nálezem buňky suprabazálních vrstev vykazovaly reaktivitu pro MAA a absenci jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α. MAA-reaktivní buňky suprabazálních vrstev exprimovaly intermediální filamenta s obsahem cytokeratinu 10. Vzhledem k obdobnému fenotypovému profilu buněk suprabazálních vrstev a MAA-reaktivních okrsků buněk stratum bazale, lze usuzovat na vztah mezi expresí α2,3-NeuNAc obsahující glykoepitopů a postmitotickým diferencovaným fenotypem.

EXPRESE GALEKTIN-3-REAKTIVNÍCH GLYKOEPITOPŮ
(publikace 4., 7., 8.)

Technikou lektinové histochemie užívající vazbu značeného rekombinantního galektinu-3 byly detekovány reaktivní glykokonjugáty (β-galaktosidy, sacharidové epitopy krevních skupin A a B) v oblasti povrchu buněk epitelů. Intracelulární reaktivita pro galektin-3 pozorována nebyla. Pro bližší charakterizaci byla prováděna

simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, cytokeratin peptid 37, pKi67, ΔNp63α).

V souladu s dříve publikovanými výsledky byla ve studovaných epitelech sliznic (dutina ústní, kořen jazyka, patrová mandle, hlasivka) pozorována přítomnost glykoepitopů reaktivních s galektinem-3 v oblasti buněčného povrchu pouze v suprabazálních vrstvách (Holíková et al., 2002; Plzák et al., 2002).

Pro galektin-3-reaktivní buňky je charakteristická absence exprese jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α, intermediálních filament obsahujících cytokeratin peptid 37, a naopak bohatá exprese cytokeratinu 10.

Exprese galektin-3-reaktivních epitopů v dlaždicobuněčných epitelech se tedy zdá být charakteristická pro terminálně diferencované postmitotické buňky suprabazálních vrstev.

GALEKTIN-7 DEPENDENTNÍ PARAMETRY
(publikace 9.)

Exprese galektinu-7 byla vyšetřována imunohistochemicky užitím polyklonální protilátky proti tomuto endogennímu lektinu a jeho vazebná místa reverzní lektinovou histochemií užitím rekombinantního biotinem značeného galektinu-7 ve vybraných netransformovaných epitelech (hlasivka).

Exprese galektinu-7 byla detekována v buňkách všech vrstev dlaždicobuněčných epitelů. Vazebná místa pro galektin-7 ve vyšetřovaných vzorcích zjišťěna nebyla.

JADERNÁ VAZBA GLYKOSAMINOGLYKANŮ
(publikace 2.)

Biotinem značené glykosaminoglykany (heparin, heparan-sulfát, chondroitin-sulfát, hyaluronová kyselina, *Fucus vesiculosus* fukoidan) byly užity k vyšetřování tkání dlaždicobuněčných epitelů (hlasivka, kořen jazyka). Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání byla prováděna simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, pKi67, ΔNp63α, heparin vážící lektin).

Ve všech buňkách studovaných epitelů byla sledována specifická jaderná vazba heparinu. Nebyl zjištěn vztah ke stupni diferenciace a proliferačnímu/antiapoptickému potenciálu (exprese cytokeratinu 10 a pKi67/ ΔNp63α respektive). U ostatních studovaných glykosaminoglykanů jaderná vazba zjištěna nebyla. Jadernou vazbu značeného heparinu bylo možné zcela inhibovat preinkubací tkáně s neznačeným heparinem či odstraněním histonů.

Nebyla pozorována jaderná lokalizace heparin vážícího lektinu a preinkubace vzorků tkání s protilátkou proti heparin vážícímu lektinu nevedla k alteraci vazby heparinu v oblasti buněčného jádra.

DLAŽDICOBUNĚČNÉ KARCINOMY HLAVY A KRKU

PROTEINOVÉ MARKERY DIFERENCIACE A PROLIFERAČNÍHO/ ANTIAPOPTICKÉHO POTENCIÁLU: CK10, pCK37, pKi67, ΔNp63α
(publikace 3., 4., 7., 8.)

Exprese vybraných proteinových znaků byla studována imunohistochemicky užitím monoklonálních protilátek v karcinomech dutiny ústní, orofaryngu, laryngu a hypofaryngu.

Exprese studovaných jaderných a cytoplazmatických proteinových parametrů byla v nádorové tkáni variabilní, co do kvantity, a vykazovala ve studovaném souboru vzorků kontinuum odlišných typů. Na jedné straně byly pozorovány histopatologicky dobře diferencované karcinomy s výrazným rohověním, kohezivním růstem a invazivitou, jež vykazovaly nízký proliferační/antiapoptotický potenciál ($pKi67^+$, $\Delta Np63\alpha^+$) a bohatou expresí cytokeratinu 10 (především v oblastech rohovění: keratinové perly a monocelulární keratinizace), na straně druhé jsme se setkávali se špatně diferencovanými karcinomy s výrazně agresivním morfologickým korelátem, kde byl proliferační potenciál enormní a exprese cytokeratinu 10 minimální. Podíl zjišťované pozitivity/negativity pro přítomnost cytokeratinu 10 byla v případě tkání lymfatických metastáz nižší než ve tkáni karcinomů primárních. Ve smyslu proliferující populace ($pKi67^+$, $\Delta Np63\alpha^+$) nádorové tkáně nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi primárními nádory a jejich lymfatickými metastázami.

V případě karcinomů s ložiskovou expresí cytokeratinu 10, byla tato buněčná populace pozorována v morfologicky dobře vyzrálých okrscích nádorů. Takovéto buňky převažovaly v centrálních oblastech nádorových čepů se zjevným kohezivním uspořádáním a v oblastech tvorby rohových perel. Bohatá exprese cytokeratinu 10 byla zjišťována ve studovaných vzorcích verukozních karcinomů.

Cytokeratin peptid 37 (pCK37) byl bohatě a téměř uniformně exprimován v nádorové tkáni (s výjimkou oblasti rohových perel).

Vztah studovaných glykobiologických parametrů k jednolivým vyšetřovaným parametrům diferenciace a proliferačnímu/antiapoptickému potenciálu je rozebírán dále.

ROSTLINNÉ LEKTINY: *MAACKIA AMURENSIS* AGGLUTININ (ISOLEKTIN TYP II), *SAMBUCUS NIGRA* AGGLUTININ
(publikace 3., 7., 8.)

Technikou lektinové histochemie využívající vazbu značených rostlinných lektinů *Maackia amurensis* agglutininu (isolektinu typ II) (MAA) a *Sambucus nigra* agglutininu (SNA) byly rozpoznávány glykokonjugáty buněčného povrchu obsahující kyselinu N-acetylneuraminovou (NeuNAc) vázanou v poloze α2,3 a α2,6 respektive. Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání byla prováděna simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, cytokeratin peptid 37, pKi67, ΔNp63α). Vyšetřovány byly vzorky karcinomů dutiny ústní, orofaryngu, laryngu a hypofaryngu.

Ve tkáních primárních a regionálně metastatických dlaždicobuněčných karcinomů byla pozorována bohatá exprese cukerných epitopů s obsahem α2,3/2,6-NeuNAc. Vyjímkou jsou pravděpodobně verukozní karcinomy, kde ve studovaných vzorcích exprese NeuNAc nebyla zjištěna.

V souladu s dříve publikovanými prácemi (Holíková et al., 2002; Plzák et al., 2002b) byla přítomnost α2,6-NeuNAc obsahujících glykokonjugátů zjišťována u morfologicky méně diferencovaných buněk, a naopak α2,3-NeuNAc obsahující glykoepitopy pozorovány v morfologicky dobře vyzrálých okrscích nádorů. SNA-reaktivní buňky byly sledovány v nejinvazivnějších částech nádorových čepů,

v oblastech s výrazným dyskohezivním růstem a invazivním chováním. MAA-reaktivní buňky převažovaly v centrálních oblastech nádorových čepů se zjevným kohezivním uspořádáním a v oblastech tvorby rohových perel. Při vyšetřování paralelních řezů bylo zjištěno, že převažující populací tkání karcinomů jsou hypersialylované α2,3/2,6-NeuNAc^{+} buňky, bohatě především ve tkáni lymfatických metastáz. Jak již uvedeno u studovaných verukozních karcinomů nebyla zjištěna přítomnost NeuNAc. Vedle tohoto subtypu HNSCC byla absence NeuNAc obsahujících epitopů též pozorována u malého počtu vysoce diferencovaných karcinomů. Za pozornost jistě stojí zjištění, že měl-li nádor biologický potenciál k zakládání krčních lymfatických metastáz, tak v metastatické tkáni NeuNAc obsahující epitopy prokázána byly.

Ve vztahu k expresi α2,3-NeuNAc obsahujících, MAA-reaktivních epitopů, byly tyto zjišťovány ve tkáni karcinomů, s popsanými výjimkami. Lze tedy říci, že bez ohledu na histopatologický stupeň diferenciace (grading), je naprostá většina dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku schopna exprimovat tento diferenciační marker.

Ve vztahu mezi studovanými glykobiologickými a proteinovými markery byly v nádorové tkáni pozorovány jak buňky s fenotypem zjišťovaným v netransformovaných epitelech (pCK37^{-} CK10^{+} α2,3-NeuNAc^{+} α2,6-NeuNAc^{-}, pCK37^{+} CK10^{-} α2,3-NeuNAc^{-} α2,6-NeuNAc^{+}, pKi67^{+} ΔNp63α^{+} α2,3-NeuNAc^{-} α2,6-NeuNAc^{+}, pKi67^{-} ΔNp63α^{-} α2,3-NeuNAc^{+} α2,6-NeuNAc^{-}), tak fenotypově atypické buňky (pCK37^{+} α2,3-NeuNAc^{+} α2,6-NeuNAc^{+}, pKi67^{+} ΔNp63α^{+} α2,3-NeuNAc^{+} α2,6-NeuNAc^{+}). Ve vztahu k proliferačnímu potenciálu karcinomů hlavy a krku je zajímavé, že populace s atypickým fenotypem převažovala.

EXPRESE GALEKTIN-3-REAKTIVNÍCH GLYKOEPITOPŮ
(publikace 4., 7., 8.)

Technikou lektinové histochemie využívající vazbu značeného rekombinantního galektinu-3 byly detekovány reaktivní glykokonjugáty pro tento endogenní lektin (β-galaktosidy, sacharidové epitopy krevních skupin A a B) v oblasti buněčného povrchu karcinomů dutiny ústní, orofaryngu, laryngu a hypofaryngu. Přítomnost intracelulární

reaktivity pro galektin-3 pozorována nebyla. Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání byla též prováděna simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, cytokeratin peptid 37, pKi67, ΔNp63α).

Ve tkání primárních a regionálně metastatických karcinomů hlavy a krku byla proporce galektin-3-reaktivních buněk různá. V některých nádorech, především ve vzorcích studovaných verukozních karcinomů a dalších dobře diferencovaných keratinizujících karcinomech s výrazně kohezivním růstem a hojnými intercelulárními můstky, byla přítomnost buněk s tímto fenotypem velmi bohatá. Naopak v nerohovějících nádorech s nízkým stupněm diferenciace a rysy agresivního chování, především prominentní invazí okolní tkáně a dyskohezivním růstem, byla galektin-3-reaktivní nádorová populace vzácná.

Nádorové buňky charakterizované přítomností povrchových galektin-3-reaktivních glykoepitopů byly lokalizovány v centrálních oblastech nádorových čepů, především v oblastech vystupňované keratinizace (rohové perly). Měly vzhled velkých, polygonálních buněk připomínajících buňky suprabazálních vrstev dlaždicobuněčných epitelů. Pro tyto oblasti karcinomů bylo charakteristické vysoce kohezivní uspořádání s hojnými intercelulárními můstky. Obdobně jako v netransformovaných epitelech byla pro galektin-3-reaktivní buněčnou populaci typická přítomnost cytokeratin 10 obsahujících intermediálních filament a absence jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α.

Vzhledem k rozlišnému zastoupení galektin-3-reaktivní buněčné populace (karcinomy extrémně chudé vs. karcinomy s hojnou populací galektin-3-reaktivních buněk) byly tyto dále zkoumány vzhledem k biologickému potenciálu (proliferační/antiapoptotická kapacita), histopatologickým a klinickým parametrům.

V závislosti na hojnosti exprese studovaných markerů (pKi67, ΔNp63α, Gal-3-reaktivní epitopy – Gal-3-RE) v nádorové populaci byl prokázán inverzní vztah mezi proliferačním/antiapototickým potenciálem ($pKi67^{+}/\Delta Np63\alpha^{+}$) a bohatostí galektin-3-reaktivní populace karcinomů. Exprese galektin-3-reaktivních epitopů v našich studiích statisticky významně korelovala se stupněm histopatologického gradingu (G1 vs. G2: $p = 0.007$, G2 vs. G3: $p = 0.006$, G1 vs. G3: $p = 0.002$; G4/nediferencované karcinomy v tomto souboru zastoupeny nebyly). Vzhledem ke studovaným proteinovým znakům, byl statisticky významný vztah ke gradingu zjištěn

pouze u ΔNp63α mezi gradem 1 a gradem 3 (G1 vs. G3: p = 0.03). Vzhledem k lokalizaci primárních nádorů, byl vztah mezi studovanými parametry a gradingem nejvýraznější u karcinomů hrtanu. Omezený počet vzorků z jednotlivých lokalizací však neumožňoval jednoznačně definovat existenci obecného vztahu mezi lokalizací HNSCC a studovanými znaky. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi studovaných parametrů mezi primárními nádorovými ložisky a lymfatickými metastázami.

Obecně lze říci, že špatně diferencované, nekeratinizující, intenzivně proliferující a agresivně se chovající karcinomy jsou chudé na populaci galektin-3-reaktivních buněk, a naopak více diferencované, rohovějící karcinomy s nízkým proliferačním potenciálem, jakož i karcinomy verukozní vykazují hojné zastoupení galektin-3-reaktivní buněčné populace.

Zjišťované rozdíly v expresi reaktivních epitopů pro galektin-3 mezi jednotlivými dlaždicobuněčnými karcinomy hlavy a krku inicioval retrospektivní studii zaměřenou na vztah tohoto glykobiologického parametru ke klinicko-patologickým charakteristikám 53 primárně léčených pokročilých karcinomů (klinické stádium III a IVa) při užití standardního léčebného postupu (chirurgická resekce a adjuvantní radioterapie). Jednotlivé karcinomy byly rozděleny v závislosti na hojnosti exprese tohoto znaku (galektin-3-areaktivní karcinomy: reaktivita pro galektin-3 zjišťovaná v izolovaných buňkách v méně jak 5% nádorové populace či nezjišťovaná; galektin-3-reaktivní karcinomy: přítomnost více jak 5% galektin-3-reaktivních buněk v nádorové populaci).

V takto definovaných skupinách nebyl vysledován vztah k věku, lokalizaci, rozsahu primárního nádoru a klinickému stádiu onemocnění. Bohatá reaktivita karcinomů pro galektin-3 byla korelována s příznivějším histopatologickým gradingem (G1, G2 vs. G3, G4: p = 0,0001), s přítomností keratinizace (p = 0,0007) a absencí regionálních lymfatických metastáz (N0 vs. N1-3: p = 0,0224).

Byl též definován vztah mezi galektin-3-reaktivitou/areaktivitou studovaných karcinomů a prognostickými parametry (celkové přežití a přežití bez známek relapsu onemocnění). Na konci periody sledování pacientů bylo 63,7% pacientů s galektin-3-reativními karcinomy bez známek relapsu onemocnění, v porovnání se 43,3% pacientů s galektin-3-areaktivními karcinomy (p = 0,00111). Celkové přežití ve

skupině pacientů s galektin-3-reaktivními karcinomy činilo 79,5%, v porovnání s 50% pacientů ve skupině galektin-3-areaktivních karcinomů ($p = 0,0024$). Při multiparametrové analýze sledovaných znaků dosahovala galektin-3-reaktivita nezávislého prognostického vztahu k celkovému přežití i přežití bez známek relapsu onemocnění. Ze studovaných klinicko-patologických parametrů pouze přítomnost regionálních lymfatických metastáz vykazovala vztah k přežití bez známek onemocnění.

GALEKTIN-7 DEPENDENTNÍ PARAMETRY
(publikace 9.)

Exprese galektinu-7 byla vyšetřována imunohistochemicky užitím polyklonální protilátky a jeho vazebná místa reverzní lektinovou histochemií užitím rekombinantního biotinem značeného galektinu-7 v primárních a regionálně metastatických dlaždicobuněčných karcinomech hrtanu.

Ve většině tkání studovaných dlaždicobuněčných karcinomů hrtanu byla pozorována významná redukce exprese galektinu-7. Obdobný nález byl zjištěn i ve tkáni regionálních lymfatických metastáz. Je zajímavé že v jednom vzorku primárního karcinomu hrtanu stejně jako v jeho metastáze vykazovaly nádorové buňky poměrně bohatou expresi tohoto endogenního lektinu. Vazebná místa pro galektin-7 ve vyšetřovaných vzorcích zjišťěna nebyla.

JADERNÁ VAZBA GLYKOSAMINOGLYKANŮ
(publikace 2.)

Pomocí biotinem značených glykosaminoglykanů (heparin, heparan-sulfát, chondroitin-sulfát, hyaluronová kyselina, *Fucus vesiculosus* fukoidan) byly vyšetřovány tkáně dlaždicobuněčných karcinomů kořene jazyka a hrtanu. Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání byla prováděna simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, pKi67, ΔNp63α, heparin vážící lektin).

Ve tkáni studovaných dlaždicobuněčných karcinomů byla pozorována pouze jaderná vazba heparinu. Přítomnost vazebných míst nevykazovala vztah ke stupni

diferenciace (exprese cytokeratinu 10) a proliferačnímu/antiapoptotickému potenciálu buněk (exprese pKi67/ΔNp63α).

Jadernou vazbu značeného heparinu bylo možné zcela inhibovat preinkubací tkáně s neznačeným heparinem.

Analogně s nálezem u netransformvaných epitelů nebyla pozorována jaderná lokalizace heparin vážícího lektinu v tkáních. Preinkubace vzorků tkání s protilátkou proti heparin vážícímu lektinu nevedla k alteraci vazby heparinu v oblasti buněčného jádra.

EPIDERMIS, Z NÍ VYCHÁZEJÍCÍ NÁDORY A ROHOVKA

GALEKTIN-7 DEPENDENTNÍ PARAMETRY
(publikace 9.)

Exprese galektinu-7 byla vyšetřována imunohistochemicky užitím polyklonální protilátky proti tomuto endogennímu lektinu a dostupnost vazebných míst pro galektin-7 užitím tohoto biotinem značeného rekombinantního lektinu v netransformovaných epitelech (epidermis, rohovka) a kožních nádorech (basocelulární karcinom, trichoepiteliom, spinocelulární karcinom).

V tkáních studovaných basocelulárních karcinomů nebyla exprese tohoto endogenního lektinu pozorována. Naopak ve tkáni trichoepiteliomu byla exprese galektinu-7 zřejmá, ačkoliv intenzita signálu, v porovnání s netransformovanou epidermis, byla nižší.

Obdobně jako v dlaždicobuněčných karcinomech hrtanu, byla ve studovaných dlaždicobuněčných karcinomech vycházejících z kůže pozorována významná redukce exprese galektinu-7. Přítomnost galektin-7-reaktivních epitopů zjišťována nebyla.

LANGERIN A VAZBA MANOSY
(publikace 1.)

Metodou simultánního dvojitého imunohistochemického značení proti langerinu a 175 kDa-manosovému receptoru byly ve tkáních epidermis a basaliomů detekovány dendritické buňky.

V netransformované kůži byly langerin-pozitvní buňky (Langerhansovy buňky) zjišťovány v oblasti epidermis, zatímco přítomnost dendritických buněk exprimujících 175 kDa-manosový receptor byla omezena na oblast dermis. V oblasti dermo-epidermálního přechodu byly v limitovaném počtu pozorovány buňky vykazující přítomnost obou znaků dendritických buněk.

Přítomnost Langerhansových buněk ve tkáni epitelu basocelulárních karcinomů byla zjišťována ve 2/3 studovaných vzorků. V porovnání s netransformovanou epidermis bylo však jejich zastoupení chudé. Dendritické buňky exprimující 175 kDa-manosový receptor byly sledovány v oblasti stroma/dermis v sousedství čepů karcinomů. Infiltrace nádorové tkáně těmito buňkami jakož i přítomnost dendritických buněk exprimujících oba studované parametry zjištěna nebyla. V 1/3 případů byly detekovány langerin-pozitivní buňky, mimo oblast nádorového epitelu, v oblasti přechodu stroma/dermis v okolí nádorových čepů, zpravidla od těchto značně vzdálených. Tyto atypicky lokalizované elementy byly zpravidla v těsném kontaktu s dendritickými buňkami exprimujícími 175 kDa-manosový receptor.

JADERNÁ VAZBA GLYKOSAMINOGLYKANŮ
(publikace 9.)

Pomocí značených glykosaminoglykanů (heparin, heparan-sulfát, chondroitin-sulfát, hyaluronová kyselina, *Fucus vesiculosus* fukoidan) byly vyšetřovány tkáně epidermis a basocelulárních karcinomů. Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání byla prováděna simultánní glyko- a imunohistochemická vyšetření (cytokeratin 10, pKi67, ΔNp63α, heparin vážící lektin).

Ve všech buňkách netransformované epidermis byla sledována jaderná vazba heparinu. Nebyl zjištěn vztah ke stupni diferenciace (exprese cytokeratinu 10). V epidermis byla sledována též jaderná vazba fukoidanu, se kterou jsme se nesetkali v dlaždicobuněčném epitelu hlasivky a kořene jazyka. U ostatních studovaných glykosaminoglykanů jaderná vazba zjištěna nebyla.

Ve tkáni basocelulárních karcinomů byla prokazatelná jaderná vazba fukoidanu a heparinu. Přítomnost vazebných míst nevykazovala vztah k proliferačnímu/antiapoptotickému potenciálu buněk (exprese pKi67 a ΔNp63α).

Jadernou vazbu značeného heparinu i fukoidanu bylo možné zcela inhibovat preinkubací tkáně s neznačeným heparinem.

Nebyla pozorována jaderná lokalizace heparin vážícího lektinu v tkáních netransformovaných a nádorových epitelů. Preinkubace vzorků tkání s protilátkou proti heparin vážícímu lektinu nevedla k alteraci vazby heparinu v oblasti buněčného jádra.

FENOTYPOVÁ CHARAKTERIZACE KERATINOCYTŮ VLASOVÉHO FOLIKULU, INTERFOLIKULÁRNÍ EPIDERMIS A BASOCELULÁRNÍCH KARCINOMŮ
(publikace 5., 6., 10.)

Vzorky ochlupené lidské kůže a z ní vycházejících basocelulárních karcinomů, a prasečí kůže byly vyšetřovány technikou dvojitého značení. Bylo užito glykohistochemických (stanovení reaktivních míst pro endogenní lektiny: galektin-1 a galektin-3) a imunohistochemických (exprese galektinu-1 a -3; exprese cytokeratin peptidu 37; exprese panelu cytokeratinů s výjimkou cytokeratinu 1, 8, 18 – protilátka CK1/LP34; exprese cytokeratinu 10; exprese cytokeratinu 19; cytokeratinu 20, exprese jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α) metod. Protilátky užité v této studii byly vyvinuty proti lidským antigenům a s výjimkou protilátky proti cytokeratinu 19 byly aplikovatelné též při vyšetřování zmrazených řezů tkáně prasečí.

Byla též hodnocena velikost (průměr) cytokeratin 19-pozitivních buněk vlasového folikulu, cytokeratin 19-pozitivních i -negativních buněk basocelulárních karcinomů, cytokeratin 19-negativních buněk stratum bazale interfolikulární epidermis. Tyto parametry byly porovnávány s identickým parametrem kultivovaných

fiolikulárních a interfolikulárních keratinocytů v jednotlivých fázích kultivace (viz níže). Vzhledem k nepravidelnosti tvaru, byla měřena plocha jednotlivých buněk a následně byl pomocí analýzy obrazu vypočítán jejich průměr. Měření byla prováděna pouze na buňkách s viditelnými jádry.

Charakter exprese endogenních lektinů – galektinu-1 a galektinu-3 a jimi rozpoznávaných glykoepitopů v lidské i prasečí ochlupené kůži byl obdobný. Exprese galektinu-1 a galektin-1-reaktivních glykoepitopů byl zjišťován v cytoplazmě keratinocytů všech vrstev interfolikulární epidermis a pochev vlasových folikulů. Přibližně ve 25% vlasových folikulů byla v oblasti ztluštění zevní kořenové pochvy pod vyústěním mazové žlázy, v keratinocytech zjišťována cytoplazamatická přítomnost cytokeratinu 19. Tato byla doprovázená sníženou cytoplazmatickou expresí galektin-1-reaktivních glykoepitopů a naopak jejich nitrojadernou akumulací.

Extrémně malé množství buněk exprimujících cytokeratin 19 (0,2% bazální vrstvy) bylo zjišťováno ve vyšetřovaných vzorcích interfolikulární epidermis. Množství buněk exprimujících cytokeratin 20 (Merckelovy buňky) bylo analogní. Galektin-1-reaktivní ligandy byly v buňkách interfolikulární epidermis zjišťovány v cytoplazmě, jejich jaderná lokalizace pozorována nebyla. Velikost keratinocytů vykazujících přítomnost cytokeratin 19 obsahujících intermediálních filament v oblasti „bulge“ a cytokeratin 19-negativních buněk stratum bazale interfolikulární epidermis byla prakticky shodná.

Buňky stratum bazale exprimovaly cytokeratin peptid 37 a keratinocyty suprabazálních vrtev pak cytokeratin 10. Exprese galektinu-3 a galektin-3-reaktivních glykoepitopů byla omezena na oblast buněčného povrchu keratinocytů především suprabazálních vrstev epidermis. Cytoplazmatická reaktivita protilátky CK1/LP34 byla zjišťována v keratinocytech všech vrstev lidské i prasečí epidermis.

Ve studovaných vzorcích basocelulárních karcinomů vykazovaly nádorové buňky cytoplazmatickou expresi galektinu-1 i galektin-1-reaktivních glykoligandů. Intenzita signálu však vykazovala nižší intenzitu než v případě keratinocytů netransformované epidermis k nádoru přilehlé. Ve čytřech z vyšetřovaných 14 vzorků byla pozorována přítomnost cytokeratinu 19 nádorovými buňkami. Exprese cytokeratinu 19 byla ve třech případech v nádorové populaci homogenní, ve čtvrtém z karcinomů byla omezena na izolované subpopulace buněk. Velikost cytokeratin 19

exprimujících buněk byla v porovnání s buňkami negativními menší. Ve dvou z vyšetřovaných vzorků byla prokazatelná též jaderná reaktivita galektinu-1. Zmíněná exprese galektin-1-reaktivních jaderných ligandů nevykazovala vztah k expresi cytokeratinu 19 ani pKi67. Přítomnost galektin-3-reaktivních glykoepitopů ve vzorcích basocelulárních karcinomů pozorována nebyla.

BUNĚČNÉ KULTURY

ENDOGENÍ LEKTIN GALEKTIN-7
(publikace 9.)

Exprese galektinu-7 byla vyšetřována imunocytochemicky užitím polyklonální protilátky proti tomuto endogennímu lektinu a přítomnost jeho vazebných míst užitím biotinem značeného rekombinantního galektinu-7 v kultivovaných keratinocytech interfolikulární epidermis a rohovky.

Ve studovaných primárních kulturách keratinocytů vykazovala exprese galektinu-7 vztah k vrstevnatosti buněčného porostu. V iniciálním stádiu kultivace nebyla přítomnost galektinu-7 zjišťována. Exprese tohoto lektinu byla detekovatelná až ve stádiu formace mnohovrstevných kolonií v druhém týdnu kultivace, kdy keratinocyty tvoří souvislý porost, místy s mnohovrstevnými oblastmi. Exprese galektinu-7 byla detekována pouze ve vyšších vrstvách mnohovrstevných oblastí. Vazebná místa pro galektin-7 zjišťěna nebyla.

ZMĚNY GLYKOFENOTYPU VE VZTAHU K DÉLCE KULTIVACE LIDSKÝCH KERATINOCYTŮ
(publikace 5.)

Na 3T3 fibroblastovém „feederu“ kultivované buňky lidské interfolikulární epidermis a vlasového folikulu byly fenotypově charakterizovány v různých fázích od nasazení kultury (24. hodina, 8. a 74. den kultivace). Opakovaně pasážované buňky byly hodnoceny ve stádiu subkonfluence, kdy nevykazovaly známky proliferační aktivity, tedy nacházely se ve stádiu známém jako „replikační senescence“ (Hayflick a

Moorhead, 1961). Byl hodnocen časový interval, za kterého oba typy kultivované při identických podmínkách tohoto stádia dosáhly. K fenotypové charakterizaci bylo užito glykocytochemických (stanovení reaktivních míst pro galektin-1 a galektin-3) a imunocytochemických (exprese galektinu-1 a -3; exprese cytokeratin peptidu 37; exprese panelu cytokeratinů s výjimkou cytokeratinu 1, 8, 18 – protilátka CK1/LP34; exprese cytokeratinu 10; exprese cytokeratinu 19; exprese jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α) metod.

Doba, za kterou buňky vycházející z vlasového folikulu dosáhly „replikační senescence“ byla delší než v případě buněk vycházejících z interfolikulární epidermis (v průměru 63 dnů vs. 41 dnů).

Při krátkodobé kultivaci (24 hodin) byla v buňkách interfolikulární epidermis detekována přítomnost intermediálních filament s obsahem cytokeratinu 19 a cytokeratin peptidu 37, jakož i přítomnost jaderných vazebných míst pro galektin-1.

Při 8. denní kultivaci buněk vlasových folikulů byla sledována přítomnost dvou typů kolonií lišících se velikostí (malé a velké kolonie). Buňky obou typů kolonií exprimovaly intermediální filamenta reaktivní s protilátkou CK1/LP34 a též obsahující cytokeratin peptid 37. V malých koloniích byla dominantním fenotypovým znakem (80%) přítomnost nitrojaderných galektin-1-reaktivních glykoepitopů. Exprese pKi67 v této fázi hojně detekovaná, nevykazovala vztah k tomuto glykofenotypovému znaku. Naopak byla sledována korelace mezi nitrojadernou expresí ΔNp63α a vazebných míst pro galektin-1. Buňky vlasového folikulu vykazující expresi nitrojaderných galektin-1-reaktivních glykoepitopů neexprimovaly v cytoplazmě intermediální filamenta s obsahem cytokeratinu 10. Cytokeratin 10 byl jen ojediněle prokazován v této kultuře u buněk nevykazujících přítomnost intranukleárních vazebných míst pro galektin-1. V porovnání s tímto nálezem, byla hojná exprese cytokeratinu 10 v buňkách z interfolikulární epidermis. Přítomnost intranukleárních glykoepitopů reaktivních s galektinem-3 nebyla pozorována ani v jednom z obou typů kultur keratinocytů. Přítomnost cytoplazmatických a povrchových vazebných míst pro oba studované galektiny byla detekována jen ojediněle, především v oblastech interceluárních kontaktů. Nebyla pozorována intranukleární exprese endogenního galektinu-1 u obou buněčných typů.

Počet buněk vlasového folikulu ve stádiu 74. dne kultivace byl stabilní. Buňky v tomto stádiu dosahovaly značných rozměrů (30 - 50μm). Nebyla prokázána nitrojaderná exprese galektin-1-reaktivních glykoepitopů, pKi67 a ΔNp63α. Naopak byla detekována hojná exprese (50%) galektin-3-reaktivních glykoepitopů v oblastech intercelulárních kontaktů. Exprese intermediálních filament s obsahem cytokeratinu 10 byla zjištěna pouze u cca. 10% buněčné populace. Jaderná, na rozdíl od cytoplazmatické, lokalizace endogenního galektinu-1 a -3 pozorována nebyla.

FENOTYPOVÁ CHARAKTERIZACE KERATINOCYTŮ POCHÁZEJÍCÍCH Z VLASOVÉHO FOLIKULU
(publikace 6.)

Z dermoepidermálních štěpů ochlupené lidské kůže byla enzymaticky odvolněna epidermis od dermis a keratinocytů vlasových folikulů v ní ukotvených. Keratinocyty z vlasových folikulů migrovaly z kousků dermis uložených v kultivační misce a postupně kolonizovaly její dno. Fenotypizace buněk byla provedena po jejich vycestování z tkáně a následně po dvanáctidenní kultivaci. Nálezy byly dále porovnávány s fenotypovým profilem keratinocytů vycházejících z interfolikulární epidermis kultivovaných za identických podmínek (viz výše).

Jednotlivé vlasové folikuly z prasečí kůže byli izolovány mikropreparací. Zbytky dermis byly odstraněny působením kolagenázy. Tak byly připraveny vlasové folikuly obsahující pouze epidermální elementy. Po krátkodobé trypsinizaci (10 minut) byly tyto buňky nasazeny do neadhezivní Petriho misky, zality kultivačním médiem a ponechány při 37 °C. V průběhu 24 hodin se vytvořily sférické kolonie, které i s vlasovým folikulem byly přeneseny do kultivační misky osázené „feederem“, následně kultivovány a posléze provedena jejich fenotypová charakterizace.

K fenotypové analýze bylo užito glykocytochemických (stanovení reaktivních míst pro endogenní lektiny: galektin-1 a galektin-3, a rostlinné lektiny: *Maackia amurensis* agglutinin (isolektin typ II) (MAA) a *Sambucus nigra* agglutinin (SNA)) a imunocytochemických (exprese galektinu-1 a -3; exprese cytokeratin peptidu 37; exprese panelu cytokeratinů s výjimkou cytokeratinu 1, 8, 18 – protilátka CK1/LP34;

exprese cytokeratinu 10; exprese cytokeratinu 19; exprese jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α) metod. Pro bližší charakterizaci studovaných buněk tkání byla prováděna simultánní glyko- a imunocytochemická vyšetření. Protilátky užité v této studii byly vyvinuty proti lidským antigenům a s výjimkou protilátky proti cytokeratinu 19 byly aplikovatelné též při vyšetřování buněk prasečích.

V kultuře lidské dermis bylo optimálního vycestování buněk dosaženo kolem 3. dne kultivace. Ve většině migrovaných buněk byla zjišťována bohatá jaderná vazba a cytoplazmatická reaktivita pro galektin-1. 10-30% těchto buněk též vykazovalo přítomnost intermediárních filament s obsahem cytokeratinu 19. Tyto buňky exprimovaly v buněčném jádře galektin-1-reaktivní glykoepitopy. Buňky s identickým fenotypem (intermediární filamenta s cytokeratinem 19 v cytoplazmě a galektin-1-reaktivní epitopy intranukleárně) byly též identifikovány v kultuře při 12. denní kultivaci.

V kultuře vycházející z izolovaných prasečích vlasových folikulů pěstovaných v přítomnosti „feederu“ vytvářely keratinocyty kolonie podél celé délky folikulu. Morfologický vzhled vlasového folikulu se po jednotýdenní kultivaci významně neměnil. Takto vznikající kolonie keratinocytů byly v porovnání s koloniemi vycházejícími z interfolikulární epidermis výrazně menší. Keratinocyty vykazovaly expresi panelu cytokeratinů detekovaných protilátkou CK1/LP34 a prakticky všechny vykazovaly nitrojadernou expresi ΔNp63α.

Populace kolonií keratinocytů vycházející z jednotlivých vlasových folikulů vykazovaly uniformní fenotyp, co do vztahu k expresi endogenního galektinu-1 a galektin-1-reaktivních glykoepitopů. V případech, kdy v buňkách kolonií nebyly intranukleárně detekovány ligandy galektinu-1 byla prokázána jaderná exprese tohoto endogenního galektinu. Buňky s největší signálovou intenzitou byly zjištěny na periferii rostoucích kolonií. Exprese endogenního galektinu-3 a galektin-3-reaktivních glykoepitopů v oblasti cytoplazmy a buněčného jádra nebyly stanoveny. Prakticky ve všech případech buněk, kdy byla prokazatelná jaderná exprese ΔNp63α, vykazovala jádra současně reaktivitu s galektinem-1. Přibližně 1/3 buněčné populace vykazovala expresi jaderného proteinu pKi67. Keratinocyty s tímto fenotypovým rysem též vykazovaly jadernou expresi galektin-1-reaktivních glykoepitopů. Na druhou stranu

pouze část z populace keratinocytů exprimující intranukleárně galektin-1-reaktivní ligandy exprimovala současně pKi67.

V pokusech kdy nebylo během kultivace folikulárních elementů užito „feederu“ vytvářely keratinocyty v mediu sférické útvary o 30-100 buňkách v počtu cca. 3-4 na jeden vlasový folikul. Tyto struktury nebyly zjišťovány v analogně uspořádaném pokusu při kultivaci buněk interfolikulární epidermis. Keratinocyty tvořící sféroidy vykazovaly cytoplazmatickou reaktivitu s protilátkou CK1/LP34 (exprese panelu cytokeratinů s výjimkou cytokeratinu 1, 8, 18) a intracytoplazmatickou reaktivitu s galektinem-1. Přibližně v 1/3 sféroidů byla tvořena keratinocyty jež vykazovaly cytoplazmatickou expresi cytokeratinu 10 a galektin-3-reaktivních glykoepitopů. V buňkách tvořících sféroidy nebyla prokazatelná exprese pKi67 ani ΔNp63α. Přibližně 1/3 sféroidů byla tvořena keratinocyty s povrchovou reaktivitou s rostlinným lektinem MAA (rozpoznávajícím sialylované glykoepitopy nesoucí NeuNAc v pozici α2,3). Kolem 1/2 sferoidů pak analogní reaktivitu s rostlinným lektinem SNA (rozpoznávajícím sialylované glykoepitopy nesoucí NeuNAc v pozici α2,6). Kolem jedné třetiny sféroidů bylo schopno adherovat k povrchu prekolonizovaném buňkami „feederu“ a dát vznik normálně rostoucím koloniím. Po adhezi vykazovaly keratinocyty jadernou expresi ΔNp63α a galektin-1-reaktivních epitopů. Jaderná reaktivita s galektinem-3 zjištěna nebyla. Malá část sféroidů (cca. 10%), byla schopna pouze částečné adheze k povrchu prekolonizovaném „feederem“. Část keratinocytů tvořících tyto kolonie exprimovala cytokeratin 10 a naopak nevykazovala v jaderné lokaci galektin-1-reaktivní ligandy.

VZTAH FENOTYPU BUNĚK BLÍZKÝCH KMENOVÝM K DÉLCE KULTIVACE A VLIV UDRŽOVÁNÍ BUNĚK INTERFOLIKULÁRNÍ EPIDERMIS V SUSPENZI NA KINETIKU RÚSTU KULTURY
(publikace 10.)

Ze vzorků lidské kůže byla po enzymatickém odloučení epitelu připravena kultura buněk interfolikulární epidermis. Takto připravené buňky byly s užitím 3T3 firoblastového „feederu“ kultivovány a pasážovány po různě dlouhý časový interval. Fenotypová analýza byla provedena v těchto časových obdobích kultivace: 24, 48,

144, 168, 1272 + 24 hodin (buňky sklizené po 1272 hodinách a znovu readherované).

V druhém z pokusů byl sledován vliv inkubace keratinocytů v suspenzi (2 a 24 hodin při teplotě 37°C) na expresi β1-integrinu a kinetiku růstu kultury (MTT test) po následném nasazení.

Z malých vzorků lidské kůže byla enzymaticky odvolněna epidermis od dermis a vlasových folikulů v této invaginovaných. K optimální migraci zde lokalizovaných keratinocytů docházelo kolem 3. dne. Takto připravená kultura pěstovaná na 3T3 fibroblastovém „feederu“ byla opakovaně pasážována a fenotypově analyzována. Analýza byla provedena v těchto časových obdobích kultivace: 72, 144, 168, 1272 + 24 hodin.

K fenotypové charakterizaci bylo užito glykocytochemických (stanovení reaktivních míst pro endogenní lektiny: galektin-1 a galektin-3) a imunocytochemických (exprese galektinu-1 a -3; exprese β1-integrinových řetězců/CD29; exprese cytokeratin peptidu 37; exprese cytokeratinu 10) metod. Vyšetření jednotlivých parametrů byla prováděna izolovaně pro jeden parametr a dále pak jako dvojitá simultánní glyko- a imunocytochemická vyšetření.

Byla srovnávána velikost (průměr) cytokeratin 19 pozitivních a negativních krátkodobě kultivovaných buněk a β1-integrin pozitivních buněk. Tyto parametry byly porovnávány s identickým parametrem vlasového folikulu, cytokeratin 19 pozitivních i negativních buněk basocelulárních karcinomů, cytokeratin 19 negativních buněk stratum bazale interfolikulární epidermis vyšetřovaných *in situ* (viz výše). Vzhledem k nepravidelnosti tvaru, byla měřena plocha jednotlivých buněk a následně byl pomocí softwaru k analýze obrazu vypočítán jejich průměr. Měření byla prováděna pouze na buňkách s viditelnými jádry.

V kultuře keratinocytů vycházející z do dermis invaginovaný vlasových folikulů bylo optimálního vycestování buněk dosaženo kolem 3. dne kultivace. 25% z těchto buněk vykazovalo přítomnost intermediárních filament s obsahem cytokeratinu 19. Buňky v tomto stádiu kultivace (bez ohledu na expresi cytokeratinu 19) vykazovaly intenzivní jadernou reaktivitu pro galektin-1. Exprese cytokeratin peptidu 37 byla pozorována u cca. 3/4 buněk. Při delší kultivaci (144 hodin) byla exprese cytokeratinu 19 zjištěna v cca. 50% populace. Vedle buněk s difuzním signálem byly

pozorovány keratinocyty s granulární cytoplazmatickou expresí tohoto cytokeratinu. Přítomnost nitrojaderných galektin-1-reaktivních ligandů byla pozorována v cca. 50% populace a exprese cytokeratin peptidu 37 prakticky homogenně. Při dalším prolongování kultivace (168 hodin) cytokeratin 19 pozitivních a galektin-1-jaderně reaktivních buněk dále ubývalo. Keratinocyty exprimující v cytoplazmě cytokeratin 19 a intranukleárně galektin-1-reaktivní epitopy byly pozorovány ve všech fázích kultivace včetně adherujících supendovaných buněk kultivovaných po 1272+24 hodin.

V kultuře interfolikulárních keratinocytů kultivovaných po 24 a 48 hodin byly pozorovány okrouhlé špatně rozprostřené keratinocyty (průměr 11 μm) jež exprimovaly cytokeratin 19 (30% a 25% respektive) a intranukleární galektin-1-reaktivní ligandy (50% a 25% respektive). Buňky nevykazující přítomnost intermediárních filament s obsahem cytokeratinu 19 byly v porovnání s cytokeratin 19 pozitivními keratinocyty výrazně větší 16 μm (24-48 hodin kultivace) a 23 μm (144 hodin kultivace). Při dlouhodobější kultivaci (144 a 168 hodin) byl počet cytokeratin 19 pozitivních a galektin-1-jaderně reaktivních buněk dramaticky redukován. Exprese cytokeratin peptidu 37 byla zjišťována v naprosté většině buněk za podmínek krátkodobé i dlouhodobé kultivace. Keratinocyty neexprimovaly cytokeratiny 10 a 20.

Ke stanovení vlivu opakovaného pasážování a délky kultivace, byly kultivované buňky při 5. pasáži (folikulární) a 7. pasáži (interfolikulární) trypsinizovány, sklizeny a znovu nasazeny. Po 24 hodinách kultivace značná část populace jak folikulárních (30%) tak interfolikulárních (30%) keratinocytů vykazovala v cytoplazmě přítomnost intermediárních filament s obsahem cytokeratinu 19. Tyto keratinocyty byly na rozdíl od buněk připravených z čerstvě suspendované interfolikulární epidermis zpravidla dobře rozprostřené (35±12 μm). Přítomnost jaderných galektin-1-reaktivních ligandů byla v těchto podmínkách detekována pouze v případě folikulárních keratinocytů (30%). Morfologicky dlouhodobě kultivované a opakovaně pasážované cytokeratin 19 pozitivní keratinocyty vykazovaly známky terminální diferenciace (keratohyalinová granula) a nezřídka též degenerace (vakuolizace cytoplazmy – prominentní především v případě interfolikulárních keratinocytů).

β1-integrin pozitivní buňky připravené ze suspenze interfolikulárních keratinocytů inkubovaných při 37 °C vykazovaly stejnou velikost jako buňky cytokeratin 19 pozitivní. Bylo potvrzeno již dříve pozorované perzistování exprese β1-integrinu při dlouhodobější suspenzi. Počet β1-integrin pozitivních keratinocytů však s délkou inkubace v suspenzi klesal. Růstový potenciál se zdá nezměněn, neboť z nich nasazené kultury vykazují velmi podobnou kinetiku proliferace.

MULTIPARAMETROVÁ ANALÝZA KULTIVOVANÝCH FaDu BUNĚK A PRASEČÍCH FOLIKULÁRNÍCH KERATINOCYTŮ
(publikace 11)

Analýza znaků byla provedena na buňkách linie spinocelulárního karcinomu hypofaryngu (FaDu) po čtvrté subkultivaci (kultura opakovaně pasážovaná po 4. či 5. dnech), následném nasazení na krycí sklíčko a kultivaci po 48 nebo 168 hodin. V souladu s předchozími studiemi připravené kultury prasečích folikulárních keratinocytů byly opakovaně pasážovány a následně po 31. pasáži připraveny k analýze obdobně jako buňky linie FaDu.

K fenotypové charakterizaci bylo užito glyko- a imunocytochemických metod. Galektin-reaktivní ligandy byly studovány pomocí biotinilovaných rekombinantních galektinů. Vedle fyziologicky se vyskytujících proteinů bylo též užito trunkované formy galektinu-3 (bez N-terminální domény), která umožňovala simultánní vyšetření exprese lektinu a jeho reaktivních glykoepitopů. Galektiny-1, -2, -3 a -7 byly vyšetřovány specifickými polyklonálními protilátkami, galektin-3 pak navíc monoklonální protilátkou A1D6. Stupeň diferenciace, proliferační potenciál a formace intercelulárních kontaktů, mRNA splicing byly studovány pomocí monoklonálních protilátek specificky rozpoznávající tyto proteinové znaky v oblasti buněčného povrchu, cytoplazmy a jádra: cytokeratiny 8, 14 a 19; pKi67; ΔNp63α; desmoplakiny 1 a 2, E-cadherin, β-katenin, β1-integrin (CD29); transferinový receptor (CD71); splicing faktor SC35.

Vyšetřování studovaných znaků u FaDu buněk bylo prováděno ve dvou stádiích buněčné kultury. Po 2 denní kultivaci vykazovaly buňky subkonfluentní růst a fibroblastům podobnou morfologii. Buňky epiteliálního vzhledu uspořádané do jedné

vrstvy a počínající utváření mnohovrstevných oblastí byly zjišťovány po 7 dnech kultivace. Vytváření intercelulárních kontaktů bylo prominentním rysem části buněk uspořádaných do jedné vrstvy jakož i buněk v oblastech mnohovrstevných. Exprese panelu vyšetřovaných znaků se v obou stádiích kultury FaDu buněk významně lišila.

U subkonfluentních buněk byla exprimována řada znaků jejichž výskyt je typický pro buňky s nízkým stupněm diferenciace, naopak v konfluentním stádiu růstu kultury byly zjišťovány zejména znaky typické pro terminálně diferencované buňky normálních epitelů suprabazálních vrstev.

V subkonfluentní fázi byla zjišťována exprese cytokeratinu 8 a 19, jejich detekovatelnost klesala s utváření souvislého porostu buněk, kdy se počala objevovat exprese cytokeratinu 14. Buňky exprimující cytokeratin 14 vykazovaly homogenní morfologii a byly uspořádány do okrsků obklopených buňkami tento cytokeratin neexprimujících. V konfluentní fázi růstu byly zjišťovány znaky typické při vytváření intercelulárních kontaktů pozorované u normálních epitelů v suprabazálních vrstvách. (vazebná místa pro galektin-3, desmoplakiny 1 a 2, E-kadherin, membránový β-katenin). V subkonfluentní fázi růstu β-katenin vykazoval cytoplazmatickou lokalizaci. Jaderná akumulace β-kateninu nebyla zjištěna. V subkonfluentním stádiu byla též sledována exprese β1-integrinových řetězců. Exprese pKi67, na rozdíl od ΔNp63α (nebyl detekovatelný), nebyla ovlivněna délkou kultivace. Exprese transferinového receptoru (CD71) nebyla pozorována.

V subkonfluentním stádiu byl galektin-1 pozorován v oblasti jadérek, dále též v extranukleolární lokalizaci, kde kolokalizoval s expresí „splicing“ faktoru SC35 a v cytoplazmě. Počet buněk exprimujících galektin-1 v jádře a cytoplazmě s utvářením konfluentního porostu a mnohovrstevných oblastí klesal, naopak byl prokazatelný v oblastech intercelulárních kontaktů. Přítomnost galektin-1-reaktivních glykoepitopů nebyla u linie FaDu zjišťována.

Bohatá exprese galektinu-2 byla zjištěna v jádrech v subkonfluentním stádiu. U buněk subkonfluentních na počátku utváření souvislého buněčného porostu a v oblastech s mnohovrstevným uspořádáním byl galektin-2 sledován též v cytoplazmě a místech intercelulárních kontaktů. Reaktivita galektinu-2 byla pozorována v jádře i cytoplazmě, přičemž exprese reaktivních epitopů klesala s délkou kultivace.

U buněk kultury v subkonfluentním stádiu růstu byl galektin-3 detekován v oblasti jádra a cytoplazmy, ve stádiu konfluentním pak v intercelulárních kontaktech buněk s mnohovrstevným uspořádáním. Galektin-3-reaktivní epitopy byly u buněk v subkonfluentním stádiu růstu pozorovány v cytoplazmatické lokalizaci. Jaderná reaktivita nebyla v této fázi zjištěna a jen ojediněle byla pozorována reaktivita v oblasti intercelulárních kontaktů. V konfluentním stádiu růstu byla pozorována bohatá exprese galektin-3-reaktivních ligandů právě v této lokalizaci buněk mnohovrstevně uspořádaného porostu. Identická reaktivita byla detekována pro trunkovanou variantu galektinu-3.

Exprese galektinu-7 nebyla u buněk linie FaDU zjištěna.

Studium vybraných znaků (exprese galektinu-1, -3 a –7; a galektin-1 a –3 reaktivních ligandů) v kultuře prasečích keratinocytů bylo provedeno ve stádiu subkonfluentní a konfluentní fáze růstu (1. a 6. den). Na rozdíl od FaDu buněk buňky vykzovaly epiteloidní morfologii jakož i citlivost ke kontaktní inhibici. Obdobně jako u FaDu byly zjišťovány rozdíly ve výskytu některých znaků obou fází růstu kultury.

Exprese galektinu-1 byla pozorována v buněčných jádrech (prominentně v jadércích) a perinukleární cytoplazmě v subkonfluentním a časném konfluentním stádiu. Ve stádiu konfluentního růstu byla sledována v oblasti utváření mezibuněčných kontaktů. Cytoplazmatická exprese galektinu-3 byla zjišťována pouze u proliferujících buněk. Přítomnost galektin-1-reaktivních ligandů v jádře a cytoplazmě byla pozorována ve stádiu subkonfluentním a na počátku utváření splývajícího porostu. Bohatá exprese galektin-3-reaktivních epitopů byla opět sledována v místech utváření mezibuněčných kontaktů buněk na periferii velkých kolonií v konfluentním stádiu růstu, naopak buňky v centru kolonií byly takřka areaktivní. Subkonfluentní buňky v sousedství těchto kolonií pak vykazovaly bohatou reaktivitu s tímto galektinem v perinukleární lokalizaci.

JADERNÁ VAZBA GLYKOSAMINOGLYKANŮ
(publikace 2.)

Využitím biotinem značených glykosaminoglykanů (heparin, heparan-sulfát, chondroitin-sulfát, hyaluronová kyselina, *Fucus vesiculosus* fukoidan) byly

vyšetřovány vybrané buněčné typy (epidermální keratinocyty, stromální buňky kostní dřeně, 3T3 myší fibroblasty a linie gliomů: Hs683, T98G, U87, U373). Pro bližší charakterizaci studovaných buněk byla též prováděna simultánní glyko- a imunocytochemická vyšetření (cytokeratin 10, pKi67, ΔNp63α, heparin vážící lektin, hydrokortizon, lamin B1). Dále byl studován vliv strukturálního uspořádání chromatinu, vliv extrakce histonů a pre-treatmentu RNA-asou a DNA-asou, na dostupnost a afinitu jaderných receptorů glykosaminoglykanů.

K potvrzní vazebných aktivit histonů vůči glykosaminoglykanům, byl vedle studií prováděných na buňkách a tkáních, navržen a následně realizován pokus s užitím syntetických kuliček.

Kromě na našem pracovišti užívané „wide field“ fluorescenční mikroskopie byla ke zhodnocení některých nálezů užitá konfokální mikroskopie.

Ve studovaných buněčných typech (epidermální keratinocyty, stromální buňky kostní dřeně, 3T3 myší fibroblasty a linie gliomů: Hs683, T98G, U87, U373) byla studována jaderná vazba panelu glykosaminoglykanů. U stromálních buněk kostní dřeně pak byl studován vliv vazby heparinu na dostupnost vazebných míst pro hydrokortizon. Přidáním značených glykosaminoglykanů do kultivačního média keratinocytů a stromálních buněk kostní dřeně byla studována schopnost buněk glykosaminoglykany internalizovat a následně je transportovat do jaderného kompartmentu. Zajímal nás též vliv přidání FGF-2 na tyto děje.

U všech studovaných buněčných typů s výjimkou linie gliomu T98G byla prokázána jaderná vazba heparinu. U T98G linie gliomu byla na rozdíl od ostatních pozorována jaderná vazba chondroitin-sulfátu. U všech studovaných buněčných typů s výjimkou stromálních buněk kostní dřeně byla identifikována jaderná vazba fukoidanu. Jaderná vazba hyaluronové kyseliny u studovaných buněk zjištěna nebyla. Specifita jaderné vazby pro jednotlivé glykosaminoglykany vylučuje nespecifickou vazbu zprostředkovanou negativním nábojem studovaných molekul. Charakter vazby značených glykosaminoglykanů byl u keratinocytů a buněk gliomů disperzní, u stromálních buněk kostní dřeně a 3T3 fibroblastů granulární. Distribuce signálu DAPI a heparinu byla prostorově separovaná.

Extrakce histonů H2A, H3 a H4 roztokem NaCl vedla ke kompletní inhibici do té doby zjišťovaných jaderných interakcí. „Pretreatment“ DNA-asou a RNA-asou

nevedl ke kvantitativní alteraci vazby heparinu v jaderném kompartmentu studovaných buněk, avšak v případě stromálních buněk kostní dřeně došlo ke změně charakteru vazby od granulární v jemně dispergovanou. U studovanách linií gliomu nevedly změny kultivačních podmínek (medium bez obsahu séra, indukce diferenciace přidáním cAMP) k změnám interakcí glykosaminoglykanů s jadernými komponentami. Nebyl též shledán vztah k expresi proliferačního markeru pKi67 a transkripčnímu fakoru ΔNp63α na jadernou vazbu glykosaminoglykanů u stromálních buněk kostní dřeně a keratinocytů respektive.

U stromálních buněk kostní dřeně byla detekována cytoplazmatická a nitrojaderná vazebná místa pro hydrokortizon. Preinkubace permeabilizovaných buněk s heparinem vedla ke snížení dostupnosti cytoplazmatických a k absolutní eliminaci dostupnosti nitrojaderných vazebných míst pro hydrokortizon.

Po preinkubaci stromálních buněk kostní dřeně se značenými glykosaminoglykany byla detekována omezená reaktivita s heparinem pouze u části populace (4 %).

Přidání FGF-2 ke stromálním buňkám kostní dřeně vedlo k potenciaci internalizace a jaderné vazby heparinu. Kultivace těchto buněk v přítomnosti FGF-2 bez značených glykosaminoglykanů vedla k výrazným změnám do té doby zjišťovaného jaderného signálu vazby heparinu. Za těchto podmínek zjišťovaný granulární vzhled vazby nabýval vzhledu fibril. Konfokální mikroskopické studie v těchto fibrilárních strukturách prokázaly přítomnost laminu B1. Fibrilární charakter reaktivity nebyl v případě ostatních studovaných glykosaminoglykanů zjištěn.

U keratinocytů byla zjišťována intenzivní internalizace vazby heparinu do buněčných jadérek buněk vytvářejících malé kolonie (do 20. buněk). Tento jev nebyl ovlivněn přidáním FGF-2. Dále pak přibližně ve třetině buněčné populace těchto malých kolonií byla v oblasti jadérek prokazována vazba heparan-sulfátu.

V pokusu na bezbuněčném systému bylo užito syntetických kuliček pokrytých molekulami histonu H3 a sledován vliv heparinu na interakci histonu s DNA. Přidání značeného heparinu k tomuto systému vedlo k uvolnění molekul DNA z jejich vazby k histonovému proteinu, a naopak navázání heparinových molekul k těmto.

D) DISKUSE

(diskuse je vedena s ohledem na problematiku, čísla publikací, ke kterým se vztahuje viz závorka a seznam)

ROSTLINNÉ LEKTINY: *MAACKIA AMURENSIS* AGGLUTININ (ISOLEKTIN TYP II), *SAMBUCUS NIGRA* AGGLUTININ
(publikace 3., 7., 8.)

N-acetylneuraminovou kyselinu v terminálních pozicích obsahující oligosacharidové řetězce jsou běžnou součástí přirozených glykokonjugátů buněčného povrchu. Exprese α2,3/2,6-NeuNAc vykazuje v řadě tkání charakter onkofetální regulace. Kvalitativní a kvantitativní aberace těchto struktur byla spojena s některými charakteristikami biologického chování vybraných lidských malignit (Dall´Olio a Chiricolo, 2001; Cao et al., 2002; Lin et al., 2002).

Studiu vztahu exprese NeuNAc v biologii dlaždicobuněčných epitelů a karcinomů byl věnován doposud omezený počet prací. Je popsán maskující efekt na rozpoznávání subterminálně lokalizovaných galaktosových reziduí oligosacharidových řetězců glykokonjugátů galektinem-3 (Hirabayashi et al., 2002; Holíková, et al., 2002).

V souhrnu lze na základě studovaných proteinových a glykobiologických markerů definovat normálně se vyskytující fenotypy buněk ve studovaných dlaždicobuněčných epitelech sliznic horní části dýchacího a trávicího traktu:

(1) mitoticky aktivní buňky: $pKi67^+$ $\Delta Np63\alpha^+$ $pCK37^+$ $\alpha2,6\text{-}NeuNAc^+$
(2) postmitotické, terminálně diferencované buňky: $CK10^+$ $\alpha2,3\text{-}NeuNAc^+$
(3) postmitotické buňky stratum bazale (buňky na počátku řetězce diferenciace): $pCK37^+$ $\alpha2,3\text{-}NeuNAc^+$

Aberantní exprese α2,3/2,6-NeuNAc představuje častý nález ve tkáni studovaných karcinomů. α2,3/2,6-NeuNAc obsahující cukerné epitopy nebyly zjišťovány ve tkáních studovaných verukozních karcinomů, tedy podskupiny HNSCC, pro které je typická absence metastatické aktivity. Dále pak nebyly NeuNAc

obsahující epitopy pozorovány u omezeného počtu vysoce diferencovaných karcinomů. Pokud měly tyto nádory potenciál k zakládání krčních lymfatických metastáz, tak v metastatické tkáni NeuNAc obsahující epitopy detekovány byly. Lze tedy zvažovat možnost, že přítomnost sialylovaných glykokonjugátů je pro metastatickou aktivitu jedním z nezbytných předpokadů, a nebo tuto schopnost doprovází.

Druhým ze závažných nálezů je pozorování populace, pro netransformované dlaždicobuněčné epitely necharakteristické, vykazující přítomnost hypersialylovaných (α2,3/2,6-NeuNAc$^+$) sacharidových glykokonjugátů. Vzhledem k dominantnímu podílu v proliferačně aktivní populaci těchto karcinomů je zajímavý popis vztahu sialylace EGFR na aktivitu jím zprostředkované signalizace a kinetiku růstu linie karcinomu hrtanu (Bergler et al., 1998).

V souhrnu, lze tedy říci, že ve tkáni dlaždicobuněčných karcinomů se vedle fenotypů běžně pozorovaných u mitoticky aktivních buněk stratum bazale (tedy: pKi67$^+$ ΔNp63α^+ pCK37$^+$ α2,6-NeuNAc$^+$) a u postmitotických, terminálně diferencovaných buněk suprabazálních vrstev (tedy: CK10$^+$ α2,3-NeuNAc$^+$) setkáváme s buňkami s atypickým fenotypem, jež jsou predominantním v populaci proliferačně aktivních buněk: pCK37$^+$ pKi67$^+$ ΔNp63α^+ α2,3-NeuNAc$^+$ α2,6-NeuNAc$^+$

EXPRESE GALEKTIN-3-REAKTIVNÍCH GLYKOEPITOPŮ
(publikace 4., 7., 8.)

Výsledky řady studií poukázaly na vztah galektin-3 dependentních parametrů (exprese galektinu-3 a jeho reaktivních epitopů) ke stupni diferenciace a biologického chování dlaždicobuněčných epitelů a karcinomů (Gillenwatter et al., 1996; Choufani et al., 1999; Delorge et al., 2000; Plzák et al., 2000; Plzák et al., 2001; Piantelli et al., 2002). Vedle popsaných úloh galektinu-3 v intracelulárních dějích (regulace procesů apoptozy/anoikis a proliferace, pre-mRNA splicing) se galektin-3 a jeho vazebné epitopy v extracelulární lokalizaci uplatňují v interakcích mezi buňkami samými a buňkami s extracelulární matrix (Plzák et al., 2001; Liu et al., 2002). Vzhledem k procesům invazivity a metastazování se právě extracelulární aktivity zdají být rozhodující.

Dle prezentovaných dat je v konkrétních případech dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku zjišťována variabilní dostupnost galektinem-3 rozpoznávaných glykokonjugátů buněčného povrchu. V souladu s dostupnými prácemi, přítomnost reaktivních epitopů koreluje se stupněm jejich diferenciace. Navíc pak byl zjištěn jejich inverzní vztah k proliferačnímu/antiapoptotickému potenciálu těchto malignit. Vzhledem k maskujícímu efektu neuraminových kyselin v terminálních pozicích oligosacharidových řetězců, může být jejich biologická a glykohistochemicky prokazovaná nedostupnost přičítána aberantní sialylaci (Hirabayashi et al., 2002; Holíková, et al., 2002). Vzhledem k definovanému vztahu mezi přítomností galektin-3-reaktivních epitopů ve tkáni studovaných karcinomů a biologickým/klinicko-patologickým charakteristikám, je možné glykobiologické profilování zařadit mezi výhledové prediktivní prognostické markery HNSCC. Tkáňová reaktivita pro galektin-3 v této studii korelovala s účinností standardně užívaného léčebného postupu. Ve vztahu k obecně nepříznivě prognóze pokročilých stádií studovaných karcinomů hrtanu a orofaryngu, a jistě benefitní úloze adjuvantní radioterapie v léčebném schématu, je možné spekulovat o možné korelaci mezi radiosensitivitou a zmíněným glykobiologickým rysem. Z tohoto hlediska by mohlo být velmi atraktivní studium glykobiologického profilu u pacientů podstupujících indukční chemoradioterapii.

GALEKTIN-7 DEPENDENTNÍ PARAMETRY
(publikace 9.)

Galektin-7 je charakteristickým galektinem vrstevnatých dlaždicobuněčných epitelů (Magnaldo et al., 1998). Jeho exprese byla popsána ve všech vrstvách epitelu orofaryngu, hlasivky, rohovky, lidské i prasečí kůže. Galektin-7 se za fyziologických podmínek uplatňuje v procesech regulace proliferace a apoptozy, jakož i stratifikace dlaždicobuněčných epitelů (Liu et al, 2002).

Maligní transformace epitelu lidské kůže a imortalizace keratinocytů byla spojena s poklesem exprese tohoto endogenního lektinu v buňkách basocelulárních a dlaždicobuněčných karcinomů (Bernerd et al., 1997, Magnaldo et al., 1998; Chen

et al., 2004). Tento nález je v souladu s pozorovanou redukcí přítomnosti tohoto galektinu u dlaždicobuněčných karcinomů kůže a hrtanu.

Pozorovaná absence exprese galektinu-7 v jednovrstevné fázi růstu kultury keratinocytů a epiteliálních malignitách může odrážet neschopnost vytvářet mnohovrstevnou strukturu typickou pro netransformované dlaždicobuněčné epitely. Je zajímavé, že v linii kolorektálního karcinomu, byla popsána regulace exprese galektinu-7 prostřednictvým p53 (Polyak et al., 1997). Vzhledem k významu ΔNp63α v molekulární patogenezi dlaždicobuněčných karcinomů (dominantně negativní efekt vůči aktivitám p53/TAp63/TAp73), je možné u tohoto transkripčního faktoru předpokládat negativní regulační působení na expresi galektinu-7 (Pellegrini et al., 2001; Sniezek et al., 2004).

Glykohistochemické studie zaměřené na detekci vazebných míst galektinu-7 tyto v netransformovaných i nádorových epitelech nedetekovaly. Tento fakt je možno vysvětlovat obsazením jeho vazebných míst či jejich blokací dosud neznámým mechanismem.

FENOTYP KERATINOCYTŮ VYCHÁZEJÍCÍCH Z VLASOVÉHO FOLIKULU A INTERFOLIKULÁRNÍ EPIDERMIS: VZTAH K DÉLCE KULTIVACE, CHARAKTERU KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK, A VZTAH FENOTYPU BUNĚK BLÍZKÝCH KMENOVÝM K DÉLCE KULTIVACE A VLIV UDRŽOVÁNÍ BUNĚK INTERFOLIKULÁRNÍ EPIDERMIS V SUSPENZI NA KINETIKU RŮSTU KULTURY (publikace 5., 6., 10, 11.)

Udržení tkáňové homeostázy dlaždicobuněčných epitelů je závislé na intaktní funkci kmenových buněk (Stem Cells, SCs). Uložení epidermálních kmenových buněk (Epidermal Stem Cells, ESCs) bylo popsáno ve dvou odlišných lokalizacích. Má se za to, že pluripotentní kmenové buňky, dávající vznik elementům vlastního dladicobuněčného epitelu, mazových žlázek a chlupů, jsou lokalizovány v oblasti ztluštění zevní pochvy vlasového folikulu (Lavker a Sun, 2000; Pellegrini et al., 2001; Alonso a Fuchs, 2003; Lavker at al., 2003; Smetana et al., 2003). V identické lokalizaci jsou vedle epidermálních kmenových buněk popisovány buňky Merckelovy, jejich prekurzory a kmenové buňky pocházející z neurální lišty (Halata et al., 2003;

Szeder et al., 2003; Sieber-Blum a Grim, 2004). Vedle pluripotentních epidermálních kmenových buněk v oblasti ztluštění se setkáváme s monopotentními kmenovými buňkami. Tyto kmenové buňky, dávající vznik pouze elementům vlastního dlaždicobuněčného epitelu, se zdají být lokalizovány do oblasti interfolikulární epidermis (Watt, 2002; Alonso a Fuchs, 2003; Lavker at al., 2003; Smetana et al., 2003). S obdobným uložením kmenových buněk se setkáváme u dlaždicobuněčných epitelů sliznic. V oblasti dlaždicového epitelu rohovky je lokalizace kmenových buněk popisována v oblasti korneálního limbu (Pellegrini et al., 2001).

Pro epidermální kmenové buňky je charakteristická pomalá, nelimitovaná mitotická aktivita. Této vlastnosti, a tudíž schopnosti zadržení značených prekurzorů syntézy DNA, bylo užito při jejich studiu (Bickenbach, 1981). Informace o charakteru dělení kmenových buněk a zahájení diferenciační kaskády jsou zatím omezené. Je přijímána hypotézy asymetrického dělení mateřské kmenové buňky se vznikem dceřiné kmenové buňky, jakož i buňky dočasně se dělící (Transit Amplifying Cell, TAC). Pro změnu fenotypu kmenové buňky v dočasně se dělící se zdá být důležitá aktivita c-myc a notch genů, pro udržení fenotypu kmenových buněk pak aktivita genů *Sonic hedgehog*, *Wnt* a *AIS* (Ganadarillas a Watt, 1997; Niemann a Watt, 2002). Vznikající dočasně se dělící buňky jsou rapidně proliferující elementy schopné podstoupit omezený počet mitóz. Tímto mechanizmem je zabezpečena dostatečná repopulace epitelu bez rizika fixace eventuálně vzniklého poškození genetického materiálu. Dočasně se dělící buňky zároveň stojí na počátku diferenciační kaskády buněk (Lavker a Sun, 2000; Potten a Booth, 2002; Watt, 2002).

Vzhledem k významu kmenových buněk dlaždicobuněčných epitelů pro fyziologické a patofyziologické děje, je nutné podotknout, že doposud nemáme v rukou znaky je bezpečně identifikující. Ke slibným markerům, vedle výše zmíněné retence značených prekurzorů DNA, které označují buňky kmenové a pravděpodobně též buňky jim fenotypově velmi blízké, patří některé z cytokeratinů (cytokeratiny 15 a 19), některé z integrinových řetězců (α6β4 a β1) a zkrácené izoformy p63 (ΔNp63) (Bickenbach et al., 1981; Lane et al., 1991; Jones et al., 1995; Michel et al., 1996; Li et al., 1998; Lavker a Sun, 2000; Pellegrini et al., 2001; Little a Jochemsen, 2002).

Informace o glykobiologickém profilu buněk kmenových a dočasně se dělících a jejich eventuálních změnách v průběhu biologických a patologických dějů v dlaždicobuněčných epitelech jsou v současnosti limitované. Vzhledem ke zde studovaným galektin-1- a galektin-3-dependentním parametrům, je nutné opětovně zmínit jejich intranukleární aktivity v procesech regulace buněčného cyklu, apoptozy a sestřihu pre-mRNA (Gabius et al., 1986; Gabius et al., 2001; Camby et al., 2002; Liu et al., 2002). V krátkodobě kultivovaných liniích vycházejících z vlasového folikulu lidské a prasečí epidermis, byla pozorována jaderná exprese galektin-1-reaktivních epitopů, jež na úrovni světelné mikroskopie asociovaly s expresí ΔNp63α. Obdobný charakter exprese těchto znaků nebyl popsán u keratinocytů vycházející z interfolikulární epidermis (Purkrábková et al., 2003).

Ve studiích fenotypového profilu folikulárních a interfolikulárních keratinocytů bylo užito glykocytochemických a imunocytochemických metod.

Byl definován charakter galektin-1- a galektin-3-dependentních parametrů kultivovaných keratinocytů lidské interfolikulární a folikulární epidermis, tedy linií vycházejících pravděpodobně z kmenových buněk s odlišným potenciálem (monopotentní vs. pluripotentní kmenové buňky) ve vztahu k délce kultivace těchto buněčných kultur. Parametry byly hodnoceny v různých fázích, tak aby bylo možné hodnotit dynamiku jejich eventuálních změn. Definitivním stupněm bylo dosažení stádia „replikační senescence“. V tomto stádiu, na rozdíl od „replikační quiscence“, je ztráta replikačního potenciálu ireverzibilní (Sharpless a DePinho, 2004). O dosažení tohoto stavu z imuno- a glykocytochemického hlediska svědčilo vymizení proliferační/antiapoptotické aktivity (pKi67/ΔNp63α) a limitovaná exprese cytokeratinu 10, jako znaku terminální diferenciace epidermálních keratinocytů.

Rozdíl v délce časového intervalu nutného k dosažení replikační senescence byl variabilní pro obě ze studovaných kultur. Na odlišnost proliferačního potenciálu kultivovaných buněk interfolikulární epidermis již poukázaly, některé z dřívějších studií (Dvořánková et al., 2002). Delší časovou periodu nutnou k dosažení replikační senescence u kultury buněk vlasového folikulu je možné vysvětlit přítomností pluripotentních kmenových buněk. V souladu s tímto závěrem byla též v časné fázi kultivace pozorovaná exprese galektin-1-reaktivních glykoepitopů v oblasti buněčného jádra (Purkrábková et al., 2003). Detekovaná absence exprese

diferenciačního markeru cytokeratinu 10 a naopak exprese jaderných proteinů pKi67 a ΔNp63α, jakož i malý rozměr galektin-1-nukleárně-reaktivních buněk svědčily o jejich velmi nízkém stupni diferenciace (Barrandon a Green, 1985).

V průběhu stárnutí kultury došlo k výrazným změnám v expresi galektin-1-reaktivních glykoepitopů. Tyto již nebyly detekovány v oblasti jádra, ale reaktivita se přesunula do oblasti cytoplazmy. Současně s těmito změnami bylo pozorováno vymizení jaderné exprese pKi67 a ΔNp63α. Přechod funkčního stavu keratinocytů nebyl doprovázen změnami exprese galektin-3-reaktivních glykoepitopů v oblasti buněčného jádra (nebyly pozorovány), docházelo však k jejich expresi v oblasti interceluárních kontaktů buněčného povrchu.

Lze tedy říci, že multiparametrovou analýzu glyko- a imunocytochemických markerů je možno užít k přesnějšímu definování funkčního stavu buněk kultur folikulárních a interfolikulárních keratinocytů. Vedle imunocytochemicky detekovaných znaků proliferačního/antiapoptotického potenciálu (pKi67/ΔNp63α) a exprese cytokeratinu 19, se z glykobiologického hlediska zdá, pro epidermální kmenové buňky či epidermální elementy jím velmi blízké, charakteristická exprese galektin-1-reaktivních ligandů. Pro buňky terminálně diferencované a buňky replikačně senescentní je charakteristická exprese galektin-3-reaktivních glykoepitopů v oblasti buněčného povrchu. Tyto se pak vzájemně liší schopností exprese intermediálních fiament s obsahem cytokeratinu 10. Vzhledem k odlišnému potenciálu kmenových buněk folikulární a interfolikulární epidermis je velmi zajímavá dynamika změn sledovaných fenotypových parametrů.

Ve studii zaměřené na fenotypovou charakterizaci folikulárních keratinocytů bylo v *in vitro* podmínkách zjištěno, že v přítomnosti „feederu“ jsou keratinocyty pocházející z prasečího vlasového folikulu schopné z tohoto migrovat a dávat vznik adherujícím koloniím. Malá velikost kolonií nasvědčuje nízkému proliferačnímu potenciálu. Buňky migrující z vlasových folikulů vykazovaly jadernou expresi ΔNp63α. Exprese tohoto možného markeru epidermálních kmenových buněk korelovala s přítomností jaderných ligandů galektinu-1. Identický nález byl též sledován v případě keratinocytů migrujících z invaginovaných lidských vlasových folikulů. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky výše uvedenými. Vzhledem k odlišnému potenciálu folikulárních a interfolikulárních kmenových buněk

(pluripotentní vs. monopotentní) je zajímavé, že exprese obou markerů v prvním případě byla detekována po výrazně delší dobu (2 týdny vs. 2 dny). Přítomnost kolonií keratinocytů nevykazujících jadernou reativitu s galektinem-1 je možno vysvětlit blokací těchto ligandů endogenním galektinem-1, jež byla cytochemicky pozorována. Této hypotéze dále nasvědčuje pozorovaný transport galektinu-1 z cytoplazmy do buněčného jádra v případě keratinocytů pocházejících z prasečího vlasového folikulu.

V podmínkách kultivace na neadhezivním povrchu vytvářely keratinocyty sféroidní útvary volně se vznášející v kultivačním médiu. Popsané sféroidy keratinocytů byly schopné adheze k „feederem“ prekolonizovanému povrchu za vzniku buněčných kolonií. Tyto epidermální sféroidy se podobaly neurosférám tvořeným neurálními kmenovými buňkami či embryoidním tělískům tvořeným embryonálními kmenovými buňkami (Chinzey et al., 2002; Pevny a Rao, 2003). Na rozdíl od těchto jsou však tvořeny epiteliálními buňkami, jak potvrzeno detekcí panelu cytokeratinů. Dalším z odlišných rysů je absence proliferační aktivity (absence pKi67). Pro jejich vznik je tedy nezbytná agregace. Formace sféroidů se zdá být typická pro buňky pocházející z vlasového folikulu a jeho pochvy, neboť analogní struktury v pokusu s interfolikulární epidermis nevznikaly. Vzhledem k fenotypovému profilu keratinocytů sféroidy tvořících (exprese cytokeratinu 10, galektin-1- a -3-reaktivních epitopů, a charakteru silalylace) byly 2/3 sféroidů tvořeny buňkami exprimujícími znaky buněk terminálně nediferencovaných a 1/3 těchto sféroidů obsahovala buňky terminálně diferencované (Holíková et al., 2002; Plzák et al., 2002b). V popsaném experimentálním systému epidermální buňky neexprimovaly ΔNp63α. Po adhezi sféroidů došlo ke vzniku dělících se kolonií. Jejich vznik byl doprovázen jadernou expresí ΔNp63α a galektin-1-reaktivních ligandů. Naproti tomu v buňkách kolonií vzniklých z částečně adherujících sféroidů byla detekována exprese cytokeratinu 10 a absence galektin-1-reaktivních jaderných epitopů.

V závěru k diskusi této studie, lze říci, že prasečí folikul představuje vhodný model pro studie zaměřené na fenotypizaci keratinocytů pocházejících z vlasového folikulu v podmínkách *in vitro*. Při analýze pozorovaná jaderná exprese galektinu-1, galektin-1-reaktivních ligandů, transkripčního faktoru ΔNp63α, proliferačního markeru pKi67 se současnou cytoplazmatickou expresí cytokeratinu 19 v keratinocytech v

oblasti bulge ukazuje na fenotyp buněk na počátku diferenciační kaskády. Jejich další studium včetně aplikace glykobiologických technik se zdá být velmi přínosné pro bližší charakterizaci epidermálních kmenových buněk i dějů odehrávajících se během procesů diferenciace.

V poslední ze zde diskutovaných studií jsme se zaměřili na expresi cytokeratinu 19 v kulturách folikulárních a interfolikulárních keratinocytů. Tento cytokeratin (spolu s cytokeratinem 15) je exprimován v buňkách jednovrstevných epitelů. Ve vztahu k epidermis je jeho exprese udávána za jeden z potenciálních markerů kmenových buněk (Michel et al., 1996; Lyle et al., 1998; Commo et al., 2000; Smetana et al., 2003). Jeho exprese v adultní epidermis byla opakovaně popsána v buňkách ztluštění zevní kořenové pochvy vlasového folikulu. U novorozenců je udávána bohatá exprese též v buňkách stratum bazale interfolikulární epidermis. V identické lokalizaci byl popsán v epitelu z orofaryngeální lokalizace (Su et al., 1996). V rohovce je pak jeho exprese udávána v epiteliálních buňkách limbu (Kim et al., 2004).

Exprese cytokeratinu 19 byla hodnocena v primokulturách a pasážovaných keratinocytech folikulárního a interfolikulárního původu. Byl porovnáván vztah k expresi cytokeratin peptidu 37 (charakteristický pro keratinocyty stratum basale) a jadernou galektin-1-reaktivitou (jeden z potenciálních markerů epidermálních kmenových buněk). Vzhledem k popisovanému vlivu absence ukotvení keratinocytů na indukci terminální diferenciace (Hotchin a Watt., 1992), byl zkoumán vztah tohoto děje na expresi výše studovaných parametrů, expresi β1 integrinu a ovlivnění proliferačního potenciálu. Data získaná při studiích *in vitro* byla porovnávána s daty pozorovanými *in situ* ve tkáni basocelulárních karcinomů.

Pozorování buněk exprimujících cytokeratin 19 a intranukleární galektin-1-reaktivní ligandy v oblasti ztluštění vlasového folikulu potvrdila naše předchozí pozorování. Buňky stratum basale v interfolikulární lokalizaci nevykazovaly expresi galektin-1-reaktivních glykoepitopů a jen limitovaná subpopulace exprimovala cytokeratin 19. Exprese cytokeratinu 20 v obdobném množství buněk považujeme za fenotyp odpovídající buňkám Merckelovým.

Analogně s dříve publikovanými výsledky byla v kultuře keratinocytů vycházející z vlasových folikulů opět hojně sledovaná cytoplazmatická exprese cytokeratinu 19 a galektin-1- jaderná reaktivita.

Exprese cytokeratinu 19 a galektin-1-jaderná reaktivita ve velké části populace byla indukovatelná adhezí negativních suspendovaných interfolikulárních buněk. Vzhledem k tomu, že identická populace exprimovala cytokeratin peptid 37 a naopak neexprimovala cytokeratiny 10 a 20, je možné tyto elementy považovat za buňky pocházející z oblasti stratum bazale, odlišné od buněk Merckelových. Pozorovaná exprese cytokeratinu 19, na rozdíl od exprese cytokeratin peptidu 37, měla jen dočasný charakter. Sledovanou granulární expresi cytokeratinu 19 ve folikulární kultuře (při 144 hodinové kultivaci) si vysvětlujeme změnou stavu fosforylace intermediálních filament. Tento děj byl popsán u řady jiných z cytokeratinů (Strnad et al., 2002).

Malá velikost cytokeratin 19 pozitivních buněk v časných fázích kultivace ve srovnání s ostatními buňkami odpovídala velikost buněk s expresí cytokeratinu 19 sledovaných *in situ* v oblasti ztluštění. Nález je v souladu se skutečností, že klonogenní potenciál keratinocytů menších než 11 μm (pravděpodobně kmenových buněk) výrazně přesahuje potenciál buněk větších (Barrandon a Green, 1985). Jejich velikost pak dále odpovídá námi sledovaným β1-integrin pozitivním buňkám resistentním k anoikis.

Absence ukotevní je považována za významný prodiferenciační až proapotptický stimul (Hotchin a Watt, 1992; Dvořánková et al., 2002). V této studii byl sledován pokles podílu buněk bohatě exprimujících β1-integrinové řetězce s délkou inkubace v suspenzi. Růstové kinetiky kultur nasazených v různých časových odstupech se však výrazně neměnily. Toto zjištění naznačuje existenci „poolu“ epidermálních buněk k tomuto stimulu necitlivých.

Je udáváno, že basocelulární karcinomy představují maligně transformované buňky vlasových folikulů (Owens a Watt, 2003; Perez-Losada a Balmain, 2003). Námi i jinými autory popisovaná exprese cytokeratinu 19 tedy není zarážející. Některými autory je udávána až v 70% případů (Habets et al., 1988). Námi prezentované výsledky udávají číslo nižší, avšak je nutné uvést, že studie byla provedena na omezeném počtu vzorků. V těchto nádorech je velikost buněk

cytokeratin 19 pozitivních výrazně menší než buněk negativních. K dalším zajímavým údajům je zjišťovaná absence galektin-3-reaktivních epitopů v oblasti interceluláních kontaktů, což považujeme za znak terminálně diferencovaných postmitotických elementů epidermis.

Přechodnou expresi cytokeratinu 19 v kultuře interfolikulárních keratinocytů přičítáme existenci „poolu“ buněk insensitivních k indukci terminální diferenciace absencí ukotevní. Re-adheze těchto na β1-integrinové řetězce bohatých keratinocytů může vést ke změně v expresi fenotypu ve fenotyp typický pro buňky na velmi nízkém stupni epidermální diferenciace (cytokeratin 19 pozitivní, galektin-1-nukleárně reaktivní). Vzhledem k popisované neonatální expresi cytokeratinu 19, je na zde prezentovanou expresi indukovanou adhezí buněk možno nahlížet jako na rekapitulaci dějů odehrávajících se v průběhu ontogeneze. Dočasnost tohoto fenoménu přičítáme absenci faktorů nezbytných pro správnou funkci epidermálních kmenových buněk přirozeně se vyskytujících v oblasti „bulge“ (Tumbar et al., 2004). Z tohoto hlediska je více než zajímavé že do oblasti „bulge“ jsou vedle epidermálních kmenových buněk lokalizovány též multipotentní kmenové buňky pocházející z neurální lišty (Sieber-Blum a Grim, 2004). Zatím nejsou známy informace o jejich potenciální provázanosti.

Vzhledem k pozorované expresi cytokeratinu 19 v buňkách kultury prolongovaně pasážované a kultivované, jež vykazují morfologické známky terminální diferenciace, je otázkou, zda-li lze na tento imunocytochemický marker nahlížet jako na znak kmenovosti.

MULTIPARAMETROVÁ ANALÝZA KULTIVOVANÝCH FaDu BUNĚK A PRASEČÍCH FOLIKULÁRNÍCH KERATINOCYTŮ
(publikace 11)

Z hlediska současného pojetí je na nádorová onemocnění nahlíženo jako na onemocnění kmenových buněk (Sell, 2004). Proto představuje studium zaměřené na jejich identifikaci a bližší charakterizaci jeden z prominentních cílů biologie a patologie buňky. Jak již mnohokrát v této práci uvedeno, doposud nemáme v rukou znaky je bezpečně identifikující. Na poli histo- a cytochemických vyšetření byla

popsána řada slibných markerů, které však při izolované aplikaci podávají nezřídka rozporuplné výsledky. Z tohoto hlediska se zdají být slibným studie současně vyšetřující větší počet z těchto markerů. Je nutno podotknout, že čím komplexnější analýza je prováděna, tím technicky náročnější je správné hodnocení výsledků. Navíc pak studie prováděné *in vitro* ukazují, že buněčné systémy (linie a kultury) představují z hlediska fenotypových vlastností časoprostorově se měnící systém.

Kultivované buňky spinocelulárního karcinomu (FaDu) exprimovaly na počátku kultivace řadu znaků, které byly výše popsány u buněk kmenových. V dalším průběhu růstu kultury tyto buňky „kmenové znaky" ztrácely a získávaly charakter normálních epitelových buněk. Tato skutečnost vybízí k představám o podílu kmenových buněk na vzniku zhoubných nádorů vycházejících z tohoto typu epitelu (Sell, 2004).

LANGERIN A VAZBA MANOSY
(publikace 1.)

Dendritické buňky jsou základní součástí imunitního systému podílející se na prezentaci antigenů. Langerhansovy buňky, jsou specifické dendritické buňky myeloidního původu, se kterými se setkáváme v epidermis a dalších epitelech. Je pro ně charakteristická přítomnost lektinu langerinu, pomocí kterého jsou schopné rozpoznávat manosylované antigeny. Na rozdíl od Langerhansových buněk, nematurované dendritické buňky k rozpoznávání manosylovaných antigenů užívají 175 kDa-manosový transmembránový receptor (Martínez-Pomares a Gordon, 1999; Mommas et al., 1999; Plzák et al., 2003).

Je známo, že langerinem je zprostředkovaná prezentace nepeptidových antigenů, především glykolipidů, T lymfocytům (Hunger et al., 2004). Tento lektin se spolu s galektinem-3 účastní formování Birbeckových granul (Valladeau et al., 2000; Plzák et al., 2003). Vzhledem k absenci exprese galektinu-3 ve vlastních Langerhansových buňkách sehrává významnou roli jejich spolupráci s keratinocyty (Smetana et al., 1999; Valladeau et al., 2000). Je zajímavé, že v řadě nádorových tkání postihující dlaždicobuněčné epitely je popisován snížený počet dendritických

buněk a jejich snížená reaktivita pro galektin-3 (Sudo et al., 1987; Schreiner et al., 1995; Plzák et al., 2002a).

V souladu s těmito pracemi, byl v porovnání s netransformovanou epidermis, ve tkáních basocelulárních karcinomů pozorován snížený počet, jakož i ektopická lokalizace Langerhansových buněk (Sudo et al., 1987; Schreiner et al., 1995). Kolokalizace signálu v oblasti dermoepidermální junkce a dermis/stromatu karcinomů pro 175 kDa-manosový receptor a langerin v dendritických elementech poukazuje na význam těchto elementů imunitního systému v imunitních pochodech zde se odehrávajících. Jejich selhání pak může výrazně ovlivňovat vznik a progresi nádorového bujení.

JADERNÁ VAZBA GLYKOSAMINOGLYKANŮ
(publikace 2.)

Na glykosaminoglykany bylo vzhledem k opakujícím se negativně nabitým disacharidovým motivům v jejich řetězcích, v dlouhodobém měřítku nahlíženo jako na molekuly vykazující pouze pasivní elektrostatické interakce. Detailní strukturální analýza a potenciál k uložení a přenosu informací vedl k revizi tohoto jednostraného pohledu (Prydz a Dalen, 2000; Gabius et al., 2002; Habuchi et al., 2004). Glykosaminoglykany jako součást proteoglykanů jsou nedílnou součástí extracelulární matrix. Vedle interakcí s komponentami extracelulární matrix byly identifikovány interakce glykosaminoglykanů s řadou jiných molekul a uplatnění při přenosu signálu (Fundenburgh, 2000; Solis et al., 2001).

Je kupříkladu známo, že glykosaminoglykany ovlivňují signalizaci rodiny fibroblastických růstových faktorů (Fibroblast Growth Factors, FGFs) prostřednictvým jejich receptorů s tyrozinkinázovou aktivitou. Některé z těchto peptidů, například molekuly FGF-2, vedle vytváření ternárních komplexů se sacharidovým řetězcem a receptorem, mohou být v komplexu s heparinem či heparan-sulfátem internalizovány a transportovány do buněčného jádra (Gleizes et al., 1995; Hsia et al., 2003).

Na význam jejich nitrojaderné lokalizace ukazuje schopnost buněk značené glykosaminoglykany internalizovat a transportovat je do jaderného kompartmentu, jakož i jejich zde opakovaně popsaná lokalizace (Evanko a Wight, 1999; Richardson

et al., 1999). V jádře byly prokázány jejich interakce s řadou důležitých partnerů, například histony a některými lektiny (heparin vážící lektin) (Kohnke-Godt a Gabius, 1991; Ambrosio et al., 1997; Watson et al., 1999). Nitrojaderné funkce glykosaminoglykanů nebyly doposud objasněny. Zdá se že v této lokalizaci mohou regulovat uspořádání chromatinu a ovlivňovat tak procesy syntézy DNA a RNA (Seki et al., 1979; Furukawa a Bhavanandan, 1983; Prusov, 1995).

V této studii bylo užito panelu značených glykosaminoglykanů ke studiu jejich nitrojaderných interakcí ve vzorcích tkání a různých buněčných kulturách. Ve všech studovaných tkáních a buněčných kulturách s vyjímkou linie gliomu T98G byla sledována jaderná vazba heparinu. V linii T98G však byla sledována jaderná vazba chondroitinsulfátu. Ve tkáni epidermis a basocelulárního karcinomu byla vedle jaderné vazby heparinu navíc pozorována vazba fukoidanu. Přidání heparinu do kultivačního média keratinocytů vedlo ke kompetitivní inhibici jeho jaderných interakcí.

Je tedy zřejmé, že jaderné interakce jednotlivých glykosaminoglykanů jsou tkáňově/buněčně specifické a nejsou určeny pouze jejich fyzikálně-chemickým vlastnostmi. Jejich vazba ve studovaných tkáních a kulturách je nezávislá na stupni diferenciace a proliferačním potenciálu. Jako výjimku z tohoto pravidla je možno považovat pozorovanou absenci jaderné vazby heparinu a naopak přítomnost vazby chondroitin-sulfátu v transformovaných buňkách linie gliomu T98G.

Vzhledem k popsané jaderné lokalizaci heparin vážícího lektinu v lidské placentě byla studována jeho exprese, která přítomnost tohoto lektinu ve studovaných epiteliálních tkáních neprokázala. Glykosaminoglykany tedy v jádrech buněk těchto tkáních interagují s jinými partnery.

V buněčných kulturách byla též studována schopnost glykosaminoglykany internalizovat a transportovat je do buněčného jádra. V případě stromálních buněk kostní dřeně byly jaderný transport heparinu omezený. Transport bylo možné zprostředkovat FGF-2. Identický děj byl též popsán pro jiné z glykosaminoglykanů (heparan-sulfát a hyaluronová kyselina) pod vlivem FGF-2, fibronektinu a séra (Roghani a Moscateli, 1992; Gleizes et al., 1995; He et al., 2001; Hsia et al., 2003). V případě epidermálních keratinocytů byl pozorován selektivní nitrojaderný transport heparinu a do malé míry heparan-sulfátu bez zjevného ovlivnění FGF-2. Je zajímavé,

že vazba glykosaminoglykanů byla v buňkách těchto dvou kultur zjišťována v odlišných jaderných subkompartmentech (chromatin u stromálních buněk kostní dřeně a jadérku u keratinocytů). Tento nález svědčí o možnosti existence odlišných transportních mechanizmů či existenci odlišných vazebných partnerů u jednotlivých buněčných typů. Vzhledem k produkci proteoglykanů s obsahem heparan-sulfátu buňkami feedru, je možné uplatnění těchto molekul v kompetici s exogenně přidanými molekulami glykosaminoglykanů ve studovaných dějích. Je též zajímavé, že v *in vitro* podmínkách u stromálních buněk kostní dřeně, vedlo přidání heparinu, chondroitin-sulfátu, hyaluronové kyseliny a FGF-2 ke změně uspořádání chromatinu. Přidání FGF-2 vedlo ke změně uspořádání vazby heparinu do fibrilárních struktur u části buněk. Konfokálními mikroskopickými studiemi byla ve fibrilárních strukturách sledována kolokalizace vazebných míst pro heparin s laminem B1.

Vzhledem ke zvažovaným jaderným interakcím glykosaminoglykanů s komponentami chromatinu byl sledován vliv extrakce nukleových kyselin a proteinů histonů na dostupnost jejich vazby. Degradace nukleových kyselin (DNA-asou/RNA-asou) nevedla ke kvantitativní alteraci vazby heparinu. U stromálních buněk kostní dřeně však byla sledována kvalitativní změna charakteru vazby. Extrakce histonů hypertonickým roztokem NaCl vedla k eliminaci dostupnosti jaderných míst pro heparin, a tak poukazuje na význam jejich interakce s glykosaminoglykany. V bezbuněčném systému pak byl sledován vliv heparinu na interakce mezi DNA a histonem H3. Tato data jsou v souladu s prácemi postulujícími úlohu glykosaminoglykanů v jaderné lokalizaci v průběhu regulace organizace struktury chromatinu (Brotherton et al., 1989; Prusov, 1995; Watson et al., 1999; Leitch, 2000; Hebbar a Archer, 2003). Ve vztahu k ovlivnění uspořádání chromatinu je zajímavé, že ve studovaných buňkách tkání a kultur nebylo zjištěno významných změn v jaderné vazbě glykosaminoglykanů ve vztahu k diferenciaci, neboť je známo, že buněčná diferenciace je spojená se změnami v poměru euchromatinu a heterochromatinu.

F) ZÁVĚR

Buněčná biologie na přelomu 20. a 21. století zažívá svůj nebývalý rozkvět. Informace, které přináší již nejsou cenné jen z hlediska poznání, ale řada z nich nachází své klinické uplatnění. Z medicínského hlediska je v následujících dekádách očekávána expanze molekulárně zaměřených diagnostických a léčebných postupů. Dochází tedy ke stírání hranic mezi obory teoretickými a klinickými. Množství každoročně publikovaných prací zaměřených na buněčnou biologii za fyziologických i patologických stavů, včetně nádorové biologie jsou enormní. Je však nutné zmínit, že naprostá většina je zaměřena na problematiku nukleových kyselin a proteinů. Cukerné molekuly bezesporu v posledních dekádách nebyly na výsluní. Informace o jejich významu pro děje v organismu se přirozeně odehrávající, jakož i o jejich vztahu k nemocem se začínají hromadit až nyní. Právě proto je glykobiologie jedním z nejvíce se rozvíjejících podoborů buněčné biologie. Výrazně k tomu přispěla identifikace endogenních lektinů, postupné prohlubování znalostí o jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a fyziologických funkcích. Zavedení značených endogenních lektinů nám umožňuje studovat v organizmu se přirozené odehrávající interakce na úrovni sacharidů s proteiny. Živá příroda nám však poskytuje celou řadu dalších lektinů, kterými je možno studovat a vzájemně rozpoznávat odlišné cukerné epitopy. Není tedy zarážející, že vedle genomové a proteomové analýzy je do budoucna zvažována i analýza glykomová.

Tato disertační práce se zaobírala některými z glykobiologických aspektů dlaždicobuněčných epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího traktu a kůže. Značná část práce byla věnována problematice endogenních lektinů, galektinů, a sialylace. Informace které jsme studiem získali, se zdají být velmi slibné na poli vývojové i nádorové biologie. Z hlediska potenciálního klinického uplatnění se zdá být velmi přínosné další studium galektin-dependentních parametrů ve vztahu ke kmenovým buňkám dlaždicobuněčných epitelů, jakož i jejich potenciálního uplatnění při hodnocení biologického chování nádorů. Vyšetřování cukerných epitopů, vedle parametrů proteinových a molekulárně genetických, může na poli onkologie podávat cenné prognostické informace. Část práce se též věnovala problematice transportu glykosaminogykanů do buněčného jádra. Informace o jejím významu a fyziologické

úloze těchto molekul pro procesy zde se odehrávající jsou zatím omezené a bezesporu si zaslouží další pozornost.

G) LITERATURA

Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, Weller PF, Chin DT, Tenen DG. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. J Immunol. 1993;150:456-68.

Agnes MC, Tan A, Jordens R, Geluk A, Roep BO, Ottenhoff T, Drijfhout JW, Koning F. Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosylation. Int Immunol. 1998;10:1299-304.

Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100 Suppl 1:11830-5.

Alos L, Castillo M, Nadal A, Caballero M, Mallofre C, Palacin A, Cardesa A. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: criteria for diagnosis in a study of 12 cases. Histopathology. 2004;44:570-9.

Ambrosio AL, Iglesias MM, Wolfenstein-Todel C. The heparin-binding lectin from ovine placenta: purification and identification as histone H4. Glycoconj J. 1997;14:831-6.

Ansari-Lari MA, Hoque MO, Califano J, Westra WH. Immunohistochemical p53 expression patterns in sarcomatoid carcinomas of the upper respiratory tract. Am J Surg Pathol. 2002;26:1024-31.

Anttonen A, Kajanti M, Heikkila P, Jalkanen M, Joensuu H. Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. Br J Cancer. 1999;79:558-64.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta. 1999;1473:4-8.

Bailey BJ. Early glottic and supraglotic carcinoma; Vertical partial laryngectomy and laryngoplasty. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1469-82.

Banks ER, Frierson HF Jr, Mills SE, George E, Zarbo RJ, Swanson PE. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. Am J Surg Pathol. 1992;16:939-46.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. J Biol Chem. 1994;269:20807-10.

Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:5390-4.

Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. Cancer Res. 1996;56:2484-7.

Begg AC, Haustermans K, Hart AA, Dische S, Saunders M, Zackrisson B, Gustaffson H, Coucke P, Paschoud N, Hoyer M, Overgaard J, Antognoni P, Richetti A, Bourhis J, Bartelink H, Horiot JC, Corvo R, Giaretti W, Awwad H, Shouman T, Jouffroy T, Maciorowski Z, Dobrowsky W, Struikmans H, Wilson GD, et al. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. Radiother Oncol. 1999;50:13-23.

Bergler W, Stanek A, Riedel F, Petroianu G, Hormann K. Role of sialoglycan structures for the function of the epidermal growth factor receptor and the in vitro proliferation of head and neck cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1998;255:414-9.

Bernerd F, Sarasin A, Magnaldo T. Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:11329-34.

Berninsone PM, Hirschberg CB. Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. Curr Opin Struct Biol. 2000;10:542-7.

Berthelet E, Shenouda G, Black MJ, Picariello M, Rochon L. Sarcomatoid carcinoma of the head and neck. Am J Surg. 1994;168:455-8.

Betka J. Distant metastases from lip and oral cavity cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2001;63:217-21.

Bickenbach JR. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. J Dent Res. 1981;60:1611-20.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 1988;48:3282-7.

Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, Morgan GJ, Hughes CJ, Sutherland RL. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. Clin Cancer Res. 1999;5:2810-9.

Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. Cancer Res. 1993;53:4477-80.

Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 1995;332:429-35.

Brewer CF. Binding and cross-linking properties of galectins. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:255-62.

Brotherton TW, Jagannadham MV, Ginder GD. Heparin binds to intact mononucleosomes and induces a novel unfolded structure. Biochemistry. 1989;28:3518-25.

Browman GP, Mohide EA, Willan A, Hodson I, Wong G, Grimard L, MacKenzie RG, El-Sayed S, Dunn E, Farrell S. Association between smoking during radiotherapy and prognosis in head and neck cancer: a follow-up study. Head Neck. 2002;24:1031-7.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology. 2002;40:2-11.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med. 1989;18:432-7.

Califano JA, van der Riet P, Westra WH, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res. 1996;56:2488-92.

Califano JA, Westra WH, Koch W. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. J Natl Cancer Inst. 1999;91:599-604.

Califano JA, Sidransky D. Molecular Biology of Head and Neck Cancer. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 973-84.

Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de Launoit Y, Kaltner H, Musette S, Darro F, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Galectin-1 modulates human glioblastoma

cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. J Neuropathol Exp Neurol. 2002;61:585-96.

Cann CI, Fried MP, Rothman KJ. Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. Otolaryngol Clin North Am. 1985;18:367-88.

Cao Y, Merling A, Crocker PR, Keller R, Schwartz-Albiez R. Differential expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase and sialoglycans in normal and cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. Lab Invest. 2002;82:1515-24.

Caponigro F, Formato R, Caraglia M, Normanno N, Iaffaioli RV. Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus on head and neck tumors. Curr Opin Oncol. 2005;17:212-7.

Carey TE, Laurikainen L, Ptok A, Reinke T, Linder K, Nair TS, Marcelo C. Culture conditions affect expression of the alpha 6 beta 4 integrin associated with aggressive behavior in head and neck cancer. Adv Exp Med Biol. 1992;320:69-79.

Carrau RL, Myers EN. Neoplasms of the nose and paranasal sinuses. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1247-65.

Colnot C, Ripoche MA, Scaerou F, Foulis D, Poirier F. Galectins in mouse embryogenesis. Biochem Soc Trans. 1996;24:141-6.

Commo S, Gaillard O, Bernard BA. The human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath: a unifying hypothesis for stem cell reservoir? Differentiation. 2000;66:157-64.

Connors JM, Andiman WA, Howarth CB, Liu E, Merigan TC, Savage ME, Jacobs C. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with human leukocyte interferon. J Clin Oncol. 1985;3:813-7.

Constantino PD, Murphy MR, Moche JA. Cancer of the Nasal Vestibule, Nasal Cavity, and Paranasal Sinus – Surgical Management. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 455-79.

Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:209-31.

Cortegano I, Pozo V, Cardaba B, Arrieta I, Gallardo S, Rojo M, Aceituno E, Takai T, Verbeek S, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Interaction between galectin-3 and FcgammaRII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII. Glycobiology. 2000;10:237-42.

Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. Mutat Res. 1996;366:45-63.

Crissman JD, Zarbo RJ, Drozdowicz S, Jacobs J, Ahmad K, Weaver A. Carcinoma in situ and microinvasive squamous carcinoma of the laryngeal glottis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1988a;114:299-307.

Crissman JD, Kessis T, Shah KV, Fu YS, Stoler MH, Zarbo RJ, Weiss MA. Squamous papillary neoplasia of the adult upper aerodigestive tract. Hum Pathol. 1988b;19:1387-96.

Crissman JD, Visscher DW, Sakr W. Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: pathologic classification. J Cell Biochem Suppl. 1993;17:49-56.

Dabelsteen E. ABO blood group antigens in oral mucosa. What is new? J Oral Pathol Med. 2002;31:65-70.

Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. Glycoconj J. 2001;18:841-50.

Danahey DG, Tobin EJ, Schuller DE, Bier-Laning CM, Weghorst CM, Lang JC. p16 mutation frequency and clinical correlation in head and neck cancer. Acta Otolaryngol. 1999;119:285-8.

Danguy A, Akif F, Pajak B, Gabius HJ. Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. Histol Histopathol. 1994;9:155-71.

Danguy A, Decaestecker C, Genten F, Salmon I, Kiss R. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. Acta Anat (Basel). 1998;161:206-18.

Danguy A, Rorive S, Decaestecker C, Bronckart Y, Kaltner H, Hadari YR, Goren R, Zich Y, Petein M, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Immunohistochemical profile of galectin-8 expression in benign and malignant tumors of epithelial, mesenchymatous and adipous origins, and of the nervous system. Histol Histopathol. 2001;16:861-8.

Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:285-93.

Davidson BJ, Harter KW. Metastatic Cancer to the Neck from an Unknown Primary Site. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 245-65.

Day GL, Blot WJ, Shore RE, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Liff JM, Preston-Martin S, Sarkar S, Schoenberg JB, et al. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. J Natl Cancer Inst. 1994;86:131-7.

de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. Laryngoscope. 2000;110:397-401.

de Bree R, Roos JC, Verel I, van Dongen GA, Snow GB. Radioimmunodiagnosis of lymph node metastases in head and neck cancer. Oral Dis. 2003;9:241-8.

Deleyiannis FW, Thomas DB, Vaughan TL, Davis S. Alcoholism: independent predictor of survival in patients with head and neck cancer. J Natl Cancer Inst. 1996;88:542-9.

Delorge S, Saussez S, Pelc P, Devroede B, Marchant H, Burchert M, Zeng FY, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R, Hassid S. Correlation of galectin-3/galectin-3-binding sites with low differentiation status in head and neck squamous cell carcinomas. Otolaryngol Head Neck Surg. 2000;122:834-41.

de Mulder PH. The chemotherapy of head and neck cancer. Anticancer Drugs. 1999;10 Suppl 1:S33-7.

Desanto LW. Early glottic and supraglottic carcinoma; Supraglotic laryngectomy. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1483-503.

Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, Miller BA, Tarone RE, Fraumeni JF Jr. Recent cancer trends in the United States. J Natl Cancer Inst. 1995;87:175-82.

Dong G, Loukinova E, Chen Z, Gangi L, Chanturita TI, Liu ET, Van Waes C. Molecular profiling of transformed and metastatic murine squamous carcinoma cells by differential display and cDNA microarray reveals altered expression of multiple genes related to growth, apoptosis, angiogenesis, and the NF-kappaB signal pathway. Cancer Res. 2001a;61:4797-808.

Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2001b;61:5911-8.

Dunphy JL, Barcham GJ, Bischof RJ, Young AR, Nash A, Meeusen EN. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. J Biol Chem. 2002;277:14916-24.

Dvořánková B, Motlík J, Holíková Z, Vacík J, Smetana K Jr. Dolichos biflorus agglutinin-binding site expression in basal keratinocytes is associated with cell differentiation. Biol Cell. 2002;94:365-73.

Edelman J, Edelman J, Nemunaitis J. Adenoviral p53 gene therapy in squamous cell cancer of the head and neck region. Curr Opin Mol Ther. 2003;5:611-7.

Ellis ER, Mendenhall WM, Rao PV, Parsons JT, Spangler AE, Million RR. Does node location affect the incidence of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma? Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1989;17:293-7.

El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. Am J Gastroenterol. 2001;96:2013-8.

Erber R, Conradt C, Homann N, Enders C, Finckh M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX. TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer. Oncogene. 1998;16:1671-9.

Evanko SP, Wight TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. J Histochem Cytochem. 1999;47:1331-42.

Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;124:637-40.

Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A, Milroy CM, Carbone A. Mucosal adenoid squamous cell carcinoma of the head and neck. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1996;105:409-13.

Ferlito A, Weiss LM, Rinaldo A, Carbone A, Devaney KO, MacMillan C, Barnes L. Clinicopathological consultation. Lymphoepithelial carcinoma of the larynx hypopharynx, and trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1997;106:437-44.

Ferlito A, Rinaldo A, Buckley JG, Mondin V. General considerations on distant metastases from head and neck cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2001a;63:189-91.

Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2001b;63:202-7.

Ferlito A, Buckley JG, Rinaldo A, Mondin V. Screening tests to evaluate distant metastases in head and neck cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2001c;63:208-11.

Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. Science. 1982;217:998-1003.

Field JK, Spandidos DA, Stell PM, Vaughan ED, Evan GI, Moore JP. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene. 1989;4:1463-8.

Fouret P, Temam S, Charlotte F, Lacau-St-Guily J. Tumour stage, node stage, p53 gene status, and bcl-2 protein expression as predictors of tumour response to platin-fluorouracil chemotherapy in patients with squamous-cell carcinoma of the head and neck. Br J Cancer. 2002;87:1390-5.

Fu KK, Hammond E, Pajak TF, Clery M, Doggett RL, Byhardt RW, McDonald S, Cooper JS. Flow cytometric quantification of the proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in advanced head & neck cancers: results of RTOG 91-08. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1994;29:661-71.

Funderburgh JL. Keratan sulfate biosynthesis. IUBMB Life. 2002;54:187-94.

Furukawa K, Bhavanandan VP. Influences of anionic polysaccharides on DNA synthesis in isolated nuclei and by DNA polymerase alpha: correlation of observed effects with properties of the polysaccharides. Biochim Biophys Acta. 1983;740:466-75.

Gabius HJ, Engelhardt R, Cramer F. Endogenous tumor lectins: overview and perspectives. Anticancer Res. 1986;6:573-8.

Gabius HJ. Animal lectins. Eur J Biochem. 1997;243:543-76.

Gabius HJ, Danguy A, Decaestecker C, Kiss R. Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. Am J Clin Pathol. 1999;112:194-203.

Gabius HJ, Darro F, Remmelink M, Andre S, Kopitz J, Danguy A, Gabius S, Salmon I, Kiss R. Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts. Cancer Invest. 2001;19:114-26.

Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:165-77.

Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, Poljak M. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. Adv Anat Pathol. 2000;7:240-51.

Gandarillas A, Watt FM. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. Genes Dev. 1997;11:2869-82.

Gavilan J, Prim MP, De Diego JI, Hardisson D, Pozuelo A. Postoperative radiotherapy in patients with positive nodes after functional neck dissection. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2000;109:844-8.

Giacomarra V, Tirelli G, Papanikolla L, Bussani R. Predictive factors of nodal metastases in oral cavity and oropharynx carcinomas. Laryngoscope. 1999;109:795-9.

Giannelli G, Milillo L, Marinosci F, Lo Muzio L, Serpico R, Antonaci S. Altered expression of integrins and basement membrane proteins in malignant and pre-malignant lesions of oral mucosa. J Biol Regul Homeost Agents. 2001;15:375-80.

Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 1996;18:422-32.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst. 2000 3;92:709-20.

Gleizes PE, Noaillac-Depeyre J, Amalric F, Gas N. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) internalization through the heparan sulfate proteoglycans-mediated pathway: an ultrastructural approach. Eur J Cell Biol. 1995;66:47-59.

Gnepp DR, Barnes L, Crissman J, Zarbo R. Recommendations for the reporting of larynx specimens containing laryngeal neoplasms. Am J Clin Pathol. 1998;110:137-9.

Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, Raz A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. Cancer Res. 1999;59:6239-45.

Goodwin WJ Jr, Torres J. The value of the prognostic nutritional index in the management of patients with advanced carcinoma of the head and neck. Head Neck Surg. 1984;6:932-7.

Gopal HV, Frankenthaler R, Fried MP. Advanced cancer of the larynx. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1506-21.

Grandis JR, Zeng Q, Drenning SD, Tweardy DJ. Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. Int J Oncol. 1998;13:375-8.

Habets JM, Tank B, Vuzevski VD, Breve J, Stolz E, van Joost T. Absence of cytokeratin 8 and inconsistent expression of cytokeratins 7 and 19 in human basal cell carcinoma. Anticancer Res. 1988;8:611-6.

Habuchi H, Habuchi O, Kimata K. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? Glycoconj J. 2004;21:47-52.

Halata Z, Grim M, Baumann KI. The Merkel cell: morphology, developmental origin, function. Cas Lek Cesk. 2003;142:4-9.

Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, Ono M, Kohgo T, Nakamura M, Notani K, Fukuda H, Totsuka Y, Yoshida K, Fujinaga K. Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. Carcinogenesis. 2000;21:1079-85.

Harari PM, Huang S-M, Herbst RS, Quon H. Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor in Head and Neck Cancer. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 1001-1017.

He D, Casscells W, Engler DA. Nuclear accumulation of exogenous DNA fragments in viable cells mediated by FGF-2 and DNA release upon cellular injury. Exp Cell Res. 2001;265:31-45.

Hebbar PB, Archer TK. Chromatin remodeling by nuclear receptors. Chromosoma. 2003;111:495-504.

Hewan-Lowe K, Dardick I. Ultrastructural distinction of basaloid-squamous carcinoma and adenoid cystic carcinoma. Ultrastruct Pathol. 1995;19:371-81.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:232-54.

Hirschberg CB, Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Annu Rev Biochem. 1987;56:63-87.

Hirvikoski P, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Helin HJ, Rantala I, Johansson RT, Juhola M, Kosma VM. Cytoplasmic accumulation of alpha-catenin is associated with aggressive features in laryngeal squamous-cell carcinoma. Int J Cancer. 1998;79:546-50.

Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;124:951-62.

Holiková Z, Hrdlčcková-Cela E, Plzák J, Smetana K Jr, Betka J, Dvořánková B, Esner M, Wasano K, Andre S, Kaltner H, Motlík J, Hercogová J, Kodet R, Gabius HJ. Defining the glycophenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of alpha2,6- and alpha2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. APMIS. 2002;110:845-56.

Holsinger FC, Lee JI, Lentsch EJ, Myers JN. Invasion and Metastes in Head and Neck Cancer. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 948-72.

Hotchin NA, Watt FM. Transcriptional and post-translational regulation of beta 1 integrin expression during keratinocyte terminal differentiation. J Biol Chem. 1992;267:14852-8.

Hotta K, Funahashi T, Matsukawa Y, Takahashi M, Nishizawa H, Kishida K, Matsuda M, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Bodkin NL, Hansen BC, Matsuzawa Y. Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. J Biol Chem. 2001;276:34089-97.

Hrdličkova-Cela E, Plzák J, Holiková Z, Dvořánková B, Smetana K Jr. Postmitotic basal cells in squamous cell epithelia are identified with Dolichos biflorus agglutinin-functional consequences. APMIS. 2001;109:714-20.

Hsia E, Richardson TP, Nugent MA. Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by heparan sulfate proteoglycans through protein kinase C signaling. J Cell Biochem. 2003;88:1214-25.

Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. Am J Pathol. 1996;148:1661-70.

Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 1999;81:519-26.

Hu KS, Harrison LB, Culliney B, Dicker AP, Sessions RB. Cancer of the Oropharynx. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003,307-51.

Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, Modlin RL. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. J Clin Invest. 2004;113:701-8.

Hussein MR, Cullen K. Molecular biomarkers in HNSCC: prognostic and therapeutic implications. Expert Rev Anticancer Ther. 2001;1:116-24.

Chen C, Parangi S, Tolentino MJ, Folkman J. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. Cancer Res. 1995;55:4230-3.

Chen J, He QY, Yuen AP, Chiu JF. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. Proteomics. 2004;4:2465-75.

Chen Z, Colon I, Ortiz N, Callister M, Dong G, Pegram MY, Arosarena O, Strome S, Nicholson JC, Van Waes C. Effects of interleukin-1alpha, interleukin-1 receptor antagonist, and neutralizing antibody on proinflammatory cytokine expression by human squamous cell carcinoma lines. Cancer Res. 1998;58:3668-76.

Chiariotti L, Berlingieri MT, Battaglia C, Benvenuto G, Martelli ML, Salvatore P, Chiappetta G, Bruni CB, Fusco A. Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors. Int J Cancer. 1995;64:171-5.

Chiesa F, Mauri S, Tradati N, Calabrese L, Giugliano G, Ansarin M, Andrle J, Zurrida S, Orecchia R, Scully C. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. Oral Oncol. 1999;35:590-6.

Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. Hepatology. 2002;36:22-9.

Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. Hum Pathol. 2002;33:158-64.

Choufani G, Nagy N, Saussez S, Marchant H, Bisschop P, Burchert M, Danguy A, Louryan S, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R, Hassid S. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. Cancer. 1999;86:2353-63.

Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2001;127:59-63.

Ichikawa D, Handa K, Withers DA, Hakomori S. Histo-blood group A/B versus H status of human carcinoma cells as correlated with haptotactic cell motility: approach with A and B gene transfection. Cancer Res. 1997 1;57:3092-6.

Jäckel MC, Sellmann L, Youssef S, Dorudian MA, Fuzesi L. Prognostic significance of expression of p53, bcl-2 and bax in squamous epithelial carcinoma of the larynx-a multivariate analysis. HNO. 2001;49:204-11.

Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin. 2003;53:5-26.

Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. Immunol Lett. 1994;42:113-6.

Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell. 1995;80:83-93.

Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK, Tahara E. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6:413-20.

Kannan S, Nair MK. Lectins and neoglycoproteins in histopathology. In: Gabius HJ, Gabius S, eds.: Glycoscience: Status and Perspectives. Chapman&Hall, London and Weinheim 1997, 564-583.

Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. Semin Cell Dev Biol. 2002;13:9-18.

Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. Blood. 1998;91:3430-8.

Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, Sueyoshi K, Aikou T, Sato E. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. Hum Pathol. 2000;31:428-33.

Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. Cancer Res. 1999;59:4148-54.

Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. Exp Eye Res. 2004;79:41-9.

Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10,900 Norwegian men. Cancer Causes Control. 1998;9:99-108.

Klozar J, Betka J. Epidemiologie a rizikové faktory nádorů hlavy a krku. Postgraduální medicína 2003;9:985-987.

Klozar J. Karcinom dutiny ústní a orofaryngu. Postgraduální medicína. 2003a;4:999-1003.

Klozar J. Tumory nosu a vedlejších dutin nosních. Postgraduální medicína. 2003b;4:995-998.

Kohnke-Godt B, Gabius HJ. Heparin-binding lectin from human placenta: further characterization of ligand binding and structural properties and its relationship to histones and heparin-binding growth factors. Biochemistry. 1991;30:55-65.

Kowalski LP, Franco EL, de Andrade Sobrinho J, Oliveira BV, Pontes PL. Prognostic factors in laryngeal cancer patients submitted to surgical treatment. J Surg Oncol. 1991;48:87-95.

Kropveld A, Rozemuller EH, Leppers FG, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, Hordijk GJ, Slootweg PJ, Tilanus MG. Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. Lab Invest. 1999;79:347-53.

Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. J Immunol. 1996;156:3939-44.

Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK, Liu FT. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. J Biol Chem. 2002;277:3487-97.

Kuwahara D, Tsutsumi K, Kobayashi T, Hasunuma T, Nishioka K. Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. Cancer Lett. 2000;148:65-71.

Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. Clin Cancer Res. 2005: 11:1434-40

Lane EB, Wilson CA, Hughes BR, Leigh IM. Stem cells in hair follicles. Cytoskeletal studies. Ann N Y Acad Sci. 1991;642:197-213.

Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:13473-5.

Lavker RM, Sun TT, Oshima H, Barrandon Y, Akiyama M, Ferraris C, Chevalier G, Favier B, Jahoda CA, Dhouailly D, Panteleyev AA, Christiano AM. Hair follicle stem cells. J Investig Dermatol Symp Proc. 2003;8:28-38.

Lee WR, Berkey B, Marcial V, Fu KK, Cooper JS, Vikram B, Coia LR, Rotman M, Ortiz H. Anemia is associated with decreased survival and increased locoregional failure in patients with locally advanced head and neck carcinoma: a secondary analysis of RTOG 85-27. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998;42:1069-75.

Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK, Mao L. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2001;127:1441-5.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. Cancer. 1993;71:452-6.

Leffler H, Barondes SH. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. J Biol Chem. 1986;261:10119-26.

Leitch AR. Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64:138-52.

Leon X, Quer M, Agudelo D, Lopez-Pousa A, De Juan M, Diez S, Burgues J. Influence of age on laryngeal carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1998;107:164-9.

Levine PA, Hood RJ. Neoplasms of the oral cavity. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1311-25.

Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ. Spindle cell carcinoma of the larynx: review of 26 cases including DNA content and immunohistochemistry. Hum Pathol. 1997;28:664-73.

Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:3902-7.

Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. Exp Cell Res. 2002;276:101-10.

Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells,

perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. J Exp Med. 1999;189:1961-72.

Little NA, Jochemsen AG. p63. Int J Biochem Cell Biol. 2002;34:6-9.

Liu D, Labow DM, Dang N, Martini N, Bains M, Burt M, Downey R Jr, Rusch V, Shah J, Ginsberg RJ. Pulmonary metastasectomy for head and neck cancers. Ann Surg Oncol. 1999;6:572-8.

Liu FT. Galectins: a new family of regulators of inflammation. Clin Immunol. 2000;97:79-88.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:263-73.

Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelain B, Remacle M, Marbaix E. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2003;260:28-34.

Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:198-208.

Lotan R, Ito H, Yasui W, Yokozaki H, Lotan D, Tahara E. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. Int J Cancer. 1994;56:474-80.

Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. J Cell Sci. 1998;111:3179-88.

Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified

epithelia. Differentiation. 1998;63:159-68.

Magnano M, De Stefani A, Lerda W, Usai A, Ragona R, Bussi M, Cortesina G. Prognostic factors of cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. Tumori. 1997;83:922-6.

Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. Am J Surg. 1994;168:494-8.

Mancusi G, Susani M, Kornfehl J, Girsch W, Kautzky M. Adenosquamous carcinoma of the palate. Laryngorhinootologie. 2002;81:568-72.

Mancuso AA, Mukherji SK, Schmalfuss I, Mendenhall W, Parsons J, Pameijer F, Hermans R, Kubilis P. Preradiotherapy computed tomography as a predictor of local control in supraglottic carcinoma. J Clin Oncol. 1999;17:631-7.

Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, Lotan R, Hong WK. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. Cancer Res. 1996;56:5600-4.

Martel V, Vignoud L, Dupe S, Frachet P, Block MR, Albiges-Rizo C. Talin controls the exit of the integrin alpha 5 beta 1 from an early compartment of the secretory pathway. J Cell Sci. 2000;113:1951-61.

Martinez-Pomares L, Gordon S. Potential role of the mannose receptor in antigen transport. Immunol Lett. 1999;65:9-13.

Mashberg A, Feldman LJ. Clinical criteria for identifying early oral and oropharyngeal carcinoma: erythroplasia revisited. Am J Surg. 1988;156:273-5.

Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. CA Cancer J Clin. 1995;45:328-51.

Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. Int J Cancer. 2000;85:545-54.

Matheny KE, Barbieri CE, Sniezek JC, Arteaga CL, Pietenpol JA. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling decreases p63 expression in head and neck squamous carcinoma cells. Laryngoscope. 2003;113:936-9.

Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, Stevens RL, Hirashima M. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. J Biol Chem. 1998;273:16976-84.

Medina JE, Dichtel W, Luna MA. Verrucous-squamous carcinomas of the oral cavity. A clinicopathologic study of 104 cases. Arch Otolaryngol. 1984;110:437-40.

Medina JE. Neck dissection. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1345-66.

Menon RP, Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. Eur J Biochem. 1999;264:569-76.

Michaels L. The Kambic-Gale method of assessment of epithelial hyperplastic lesions of the larynx in comparison with the dysplasia grade method. Acta Otolaryngol Suppl. 1997;527:17-20.

Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, Balm AJ. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997;123:497-502.

Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. J Cell Sci. 1996;109:1017-28.

Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, Ichimura K. p27 expression correlates with prognosis in patients with hypopharyngeal cancer. Anticancer Res. 1999;19:4407-12.

Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. Subcell Biochem. 1998;31:205-62.

Mommaas AM, Mulder AA, Jordens R, Out C, Tan MC, Cresswell P, Kluin PM, Koning F. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. Eur J Immunol. 1999;29:571-80.

Morrison EA, Goldberg GL, Kadish AS, Burk RD. Polymerase chain reaction detection of human papillomavirus: quantitation may improve clinical utility. J Clin Microbiol. 1992;30:2539-43.

Mrzena L. Karcinom nosohltanu. Postgraduální medicína. 2003; 4: 992-993.

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). J Oral Pathol Med. 1994;23:451-6.

Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van Ham P, Yeaton P, Pector JC, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R, Gabius HJ. Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon

tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. Gut. 2002;50:392-401.

Nakashima T, Pak SC, Silverman GA, Spring PM, Frederick MJ, Clayman GL. Genomic cloning, mapping, structure and promoter analysis of HEADPIN, a serpin which is down-regulated in head and neck cancer cells. Biochim Biophys Acta. 2000;1492:441-6.

Nathan CA, Franklin S, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Glass J. Analysis of surgical margins with the molecular marker eIF4E: a prognostic factor in patients with head and neck cancer. J Clin Oncol. 1999;17:2909-14.

Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. Trends Cell Biol. 2002;12:185-92.

Nomura AM, Ziegler RG, Stemmermann GN, Chyou PH, Craft NE. Serum micronutrients and upper aerodigestive tract cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6:407-12.

Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. J Vasc Res. 2000;37:209-18.

Nozaki S, Endo Y, Kawashiri S, Nakagawa K, Yamamoto E, Yonemura Y, Sasaki T. Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis. Oral Oncol. 1998;34:58-62.

O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ, Urist MM, Maddox WA. Neck dissection with and without radiotherapy: prognostic factors, patterns of recurrence, and survival. Am J Surg. 1986;152:456-63.

O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. Cancer. 2001;92:556-68.

Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. Biochim Biophys Acta. 1998;1379:97-106.

Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, Frassica DA, DeSanto LW, O'Fallon WM, Hoverman VR. Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1994;120:1370-4.

Ord RA, Aisner S. Accuracy of frozen sections in assessing margins in oral cancer resection. J Oral Maxillofac Surg. 1997;55:663-9.

Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. Nat Rev Cancer. 2003;3:444-51.

Patturajan M, Nomoto S, Sommer M, Fomenkov A, Hibi K, Zangen R, Poliak N, Califano J, Trink B, Ratovitski E, Sidransky D. DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. Cancer Cell. 2002;1:369-79.

Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. Oncogene. 2001;20:7486-93.

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:3156-61.

Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3:434-43.

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. J Mol Med. 1998;76:402-12.

Peters LJ, Rischin D, Corry J, Harari PM. Cancer of the Nasopharynx. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 529-59.

Petruzzelli GJ. The biology of tumor invasion, angiogenesis and lymph node metastasis. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2000;62:178-85.

Petruzzelli GJ. The biology of distant metastases in head and neck cancer. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2001;63:192-201.

Pevny L, Rao MS. The stem-cell menagerie. Trends Neurosci. 2003;26:351-9.

Pfister DG, Hu KS, Lefebvre J-L. Cancer of the Hypopharynx and Cervical Esophagus. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 404-54.

Piantelli M, Iacobelli S, Almadori G, Iezzi M, Tinari N, Natoli C, Cadoni G, Lauriola L, Ranelletti FO. Lack of expression of galectin-3 is associated with a poor outcome in node-negative patients with laryngeal squamous-cell carcinoma. J Clin Oncol. 2002;20:3850-6.

Piccirillo JF. Importance of comorbidity in head and neck cancer. Laryngoscope. 2000;110:593-602.

Plzák J, Smetana K Jr, Betka J, Kodet R, Kaltner H, Gabius HJ. Endogenous lectins (galectins-1 and -3) as probes to detect differentiation-dependent alterations in

human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. Int J Mol Med. 2000;5:369-72.

Plzák J, Smetana K Jr, Hrdličková E, Kodet R, Holiková Z, Liu FT, Dvořánková B, Kaltner H, Betka J, Gabius HJ. Expression of galectin-3-reactive ligands in squamous cancer and normal epithelial cells as a marker of differentiation. Int J Oncol. 2001;19:59-64.

Plzák J, Holiková Z, Dvořánková B, Smetana K Jr, Betka J, Hercogová J, Saeland S, Bovin NV, Gabius HJ. Analysis of binding of mannosides in relation to Langerin (CD207) in Langerhans cells of normal and transformed epithelia. Histochem J. 2002a;34:247-53.

Plzák J, Holiková Z, Smetana K Jr, Dvořánková B, Hercogová J, Kaltner H, Motlík J, Gabius HJ. Differentiation-dependent glycosylation of cells in squamous cell epithelia detected by a mammalian lectin. Cells Tissues Organs. 2002b;171:135-44.

Plzák J, Holiková Z, Smetana K Jr, Riedel F, Betka J. The role of dendritic cells in the pharynx. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2003;260:266-72.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature. 1997;389:300-5.

Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. J Invest Dermatol. 2002;119:888-99.

Prusov AN. Effect of polyanions on the structure of rat liver nuclear chromatin. Biokhimiia. 1995;60:905-16.

Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. J Cell Sci. 2000;113:193-205.

Purkrábková T, Smetana K Jr, Dvořánková B, Holíková Z, Bock C, Lensch M, Andre S, Pytlík R, Liu FT, Klíma J, Smetana K, Motlík J, Gabius HJ. New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow stromal and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites. Biol Cell. 2003;95:535-45.

Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. Eur J Immunol. 2000;30:1331-9.

Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. Biochim Biophys Acta. 2002;1572:274-84.

Rassekh CH, Johnson JT. Controversies in management of the N0 neck in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1367-75.

Regelink G, Brouwer J, de Bree R, Pruim J, van der Laan BF, Vaalburg W, Hoekstra OS, Comans EF, Vissink A, Leemans CR, Roodenburg JL. Detection of unknown primary tumours and distant metastases in patients with cervical metastases: value of FDG-PET versus conventional modalities. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2002;29:1024-30.

Rehberg E, Kleinsasser O. Malignant transformation in non-irradiated juvenile laryngeal papillomatosis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1999;256:450-4.

Richards BL, Eisma RJ, Spiro JD, Lindquist RL, Kreutzer DL. Coexpression of interleukin-8 receptors in head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg. 1997;174:507-12.

Richardson TP, Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate. J Biol Chem. 1999;274:13534-40.

Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. Curr Opin Struct Biol. 1999;9:578-84.

Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1991;117:601-5.

Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suarez C. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1996;122:504-7.

Roghani M, Moscatelli D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. J Biol Chem. 1992;267:22156-62.

Roychowdhury DF, Tseng A Jr, Fu KK, Weinburg V, Weidner N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and C-erbB2 expression. Cancer. 1996;77:1419-26.

Sakr WA, Zarbo RJ, Jacobs JR, Crissman JD. Distribution of basement membrane in squamous cell carcinoma of the head and neck. Hum Pathol. 1987;18:1043-50.

Saranath D, Chang SE, Bhoite LT, Panchal RG, Kerr IB, Mehta AR, Johnson NW, Deo MG. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. Br J Cancer. 1991;63:573-8.

Seikaly H, Rassekh CH. Orpopharyngeal cancer. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1427-41.

Seki S, Misumi H, Tanaka T, Kanzaki Y, Oda T. Effects of some polyamines, polyanions and antitumor drugs on replicative DNA synthesis and unscheduled DNA synthesis in vitro. Acta Med Okayama. 1979;33:149-56.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol. 2004;51:1-28.

Sengiz S, Pabuccuoglu U, Sarioglu S. Immunohistological comparison of the World Health Organization (WHO) and Ljubljana classifications on the grading of preneoplastic lesions of the larynx. Pathol Res Pract. 2004;200:181-8.

Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. Am J Surg. 1990;160:405-9.

Shah JP, Zelefsky MJ. Cancer of the Oral Cavity. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 266-305.

Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. J Clin Invest. 2004;113:160-8.

Sheahan P, Fitzgibbon J, Lee G, O'Leary G. Adenosquamous carcinoma of the tongue in a 22-year-old female: report of a case with immunohistochemistry. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2003;260:509-12.

Shillitoe EJ, Greenspan D, Greenspan JS, Silverman S Jr. Five-year survival of patients with oral cancer and its association with antibody to herpes simplex virus. Cancer. 1986;58:2256-9.

Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, Hittelman WN. Activation of p53 expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. Cancer Res. 1994a;54:321-6.

Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignanat lesions during head and neck tumorigenesis. Cancer Res. 1994b;54:3153-9.

Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1996;122:865-8.

Schachter H. Molecular basis of glycoconjugate disease. Biochim Biophys Acta. 1999;1455:61-2.

Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research. Glycoconj J. 2000;17:485-99.

Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. Cancer. 1995;75:2818-26.

Schreiner TU, Lischka G, Schaumburg-Lever G. Langerhans' cells in skin tumors. Arch Dermatol. 1995;131:187-90.

Schwarz G Jr, Remmelink M, Decaestecker C, Gielen I, Budel V, Burchert M, Darro F, Danguy A, Gabius HJ, Salmon I, Kiss R. Galectin fingerprinting in tumor diagnosis. Differential expression of galectin-3 and galectin-3 binding sites, but not galectin-1, in benign vs malignant uterine smooth muscle tumors. Am J Clin Pathol. 1999;111:623-31.

Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN, Touboul E, De Vataire F, Andolenko P, Lacau-Saint-Guily J, Laugier A, Schlienger M. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. Cancer. 1994;74:1933-8.

Sieber-Blum M, Grim M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. Birth Defects Res C Embryo Today. 2004;72:162-72.

Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. Cancer. 1984;53:563-8.

Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. Clin Cancer Res. 1999;5:2726-34.

Slavíček A. Karcinom hrtanu. Postgraduální medicína. 2003;4:1004-1011.

Smetana K Jr, Holiková Z, Klubal R, Bovin NV, Dvořánková B, Bartůňková J, Liu FT, Gabius HJ. Coexpression of binding sites for A(B) histo-blood group trisaccharides with galectin-3 and Lag antigen in human Langerhans cells. J Leukoc Biol. 1999;66:644-9.

Smetana K Jr, Plzák J, Dvořánková B, Holiková Z. Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia-practical employment. Folia Biol (Praha). 2003;49:118-27.

Smith BD, Haffty BG. Prognostic Factors in Patients with Head and Neck cancer. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 49-73.

Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD, Pietenpol JA. Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope. 2004;114:2063-72.

Solis D, Jimenez-Barbero J, Kaltner H, Romero A, Siebert HC, von der Lieth CW, Gabius HJ. Towards defining the role of glycans as hardware in information storage and transfer: basic principles, experimental approaches and recent progress. Cells Tissues Organs. 2001;168:5-23.

Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. Oncogene. 2000;19:2489-95.

Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1996;122:627-32.

Spiro RH, Guillamondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. Head Neck. 1999;21:408-13.

Spitz MR, Sturgis EM, Wei Q. In: Harrison LB et al., eds. Molecular Epidemiology and Genetic Predisposition for Head and Neck Cancer. In: Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 937-47.

Stacker SA, Achen MG. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: signaling for vascular development. Growth Factors 1999:17:1-11.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med. 2001;7:186-91.

Stanton P, Richards S, Reeves J, Nikolic M, Edington K, Clark L, Robertson G, Souter D, Mitchell R, Hendler FJ, et al. Epidermal growth factor receptor expression by human squamous cell carcinomas of the head and neck, cell lines and xenografts. Br J Cancer. 1994;70:427-33.

Steinberg BM. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 973-84.

Strnad P, Windoffer R, Leube RE. Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. J Cell Sci. 2002;115:4133-48.

Su L, Morgan PR, Lane EB. Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. A study using in situ hybridization and immunohistochemistry. J Oral Pathol Med. 1996;25:293-301.

Suarez PA, Adler-Storthz K, Luna MA, El-Naggar AK, Abdul-Karim FW, Batsakis JG. Papillary squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic and molecular study. Head Neck. 2000;22:360-8.

Sudo S, Saito A, Morohashi M. Immunohistochemical study of Langerhans cells in skin tumors. Dermatologica. 1987;174:76-83.

Szeder V, Grim M, Halata Z, Sieber-Blum M. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. Dev Biol. 2003;253:258-63.

Tantawy A, Youins L, Hamza M. Expression of c-erb B-2 oncoprotein in cancer of the larynx in relation to invasion of the cartilagenous framework and prognosis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1999;256:72-7.

Thanos CD, Bowie JU. p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. Protein Sci. 1999;8:1708-10.

Thomas GJ, Jones J, Speight PM. Integrins and oral cancer. Oral Oncol. 1997;33:381-8.

Thompson LD, Wenig BM, Heffner DK, Gnepp DR. Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases. Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;120:718-24.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science. 2004;303:359-63.

Tung YC, Lin KH, Chu PY, Hsu CC, Kuo WR. Detection of human papilloma virus and Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma by polymerase chain reaction. Kaohsiung J Med Sci. 1999;15:256-62.

Valente G, Orecchia R, Gandolfo S, Arnaudo M, Ragona R, Kerim S, Palestro G. Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma? J Clin Pathol. 1994;47:109-12.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity. 2000;12:71-81.

van den Brule FA, Buicu C, Berchuck A, Bast RC, Deprez M, Liu FT, Cooper DN, Pieters C, Sobel ME, Castronovo V. Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. Hum Pathol. 1996;27:1185-91.

van den Brule FA, Waltregny D, Castronovo V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. J Pathol. 2001;193:80-7.

van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. Cancer Res. 1994;54:1156-8.

van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ramaekers FC, Kuijpers W. Cytokeratin expression in normal and (pre)malignant head and neck epithelia: an overview. Head Neck. 1993;15:133-46.

Van Waes C, Surh DM, Chen Z, Kirby M, Rhim JS, Brager R, Sessions RB, Poore J, Wolf GT, Carey TE. Increase in suprabasilar integrin adhesion molecule expression in human epidermal neoplasms accompanies increased proliferation occurring with immortalization and tumor progression. Cancer Res. 1995;55:5434-44.

Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C, Gullane PJ, Pintilie M. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Laryngoscope. 1999;109:249-58.

Vigneswaran N, Zhao W, Dassanayake A, Muller S, Miller DM, Zacharias W. Variable expression of cathepsin B and D correlates with highly invasive and metastatic phenotype of oral cancer. Hum Pathol. 2000;31:931-7.

Vertino-Bell A, Ren J, Black JD, Lau JT. Developmental regulation of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase in small intestine epithelium. Dev Biol. 1994;165:126-36.

Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG, Miceli MC. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. J Immunol. 1999;162:799-806.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. N Engl J Med. 1993;328:184-94.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity. 2000;12:71-81.

Wasano K, Hirakawa Y. Two domains of rat galectin-4 bind to distinct structures of the intercellular borders of colorectal epithelia. J Histochem Cytochem. 1999;47:75-82.

Watson K, Gooderham NJ, Davies DS, Edwards RJ. Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans. J Biol Chem. 1999;274:21707-13.

Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. EMBO J. 2002;21:3919-26.

Wenig BM, Cohen J-M. General Principles of Head and Neck Pathology. In: Harrison LB et al., eds. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 11-49.

Wetzels RH, van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Leigh IM, Vooijs GP, Ramaekers FC. Immunohistochemical localization of basement membrane type VII collagen and laminin in neoplasms of the head and neck. Histopathology. 1992;21:459-64.

Wiegand S, Dunne AA, Muller HH, Mandic R, Barth P, Davis RK, Werner JA. Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Cancer. 2005;104:94-100.

Wieneke JA, Thompson LD, Wenig BM. Basaloid squamous cell carcinoma of the sinonasal tract. Cancer. 1999;85:841-54.

Vigneswaran N, Zhao W, Dassanayake A, Muller S, Miller DM, Zacharias W. Variable expression of cathepsin B and D correlates with highly invasive and metastatic phenotype of oral cancer. Hum Pathol. 2000;31:931-7.

Witte MC, Neel HB III. Nasopharyngeal cancer. In: Bailey BJ et al., eds. Head and Neck Surgery - Otolaryngology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001, 1413-26.

Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S, El-Naggar A, Hung MC. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Oncogene. 2000;19:2398-403.

Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoglu G, Onerci M, Gursel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. Am J Otolaryngol. 1998;19:83-8.

Yoo GH, Xu HJ, Brennan JA, Westra W, Hruban RH, Koch W, Benedict WF, Sidransky D. Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 1994;54:4603-6.

Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. J Biol Chem. 2002;277:6852-7.

Zarbo RJ, Barnes L, Crissman JD, Gnepp DR, Mills SE. Recommendations for the reporting of specimens containing oral cavity and oropharynx neoplasms. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Hum Pathol. 2000;31:1191-3.