

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Klinická onkologie a radioterapie

Systémová zánětlivá a imunitní odpověď při léčbě nádorových onemocnění
Systemic inflammatory and immune response in the treatment of tumor diseases

MUDr. Petra Holečková

Školitel: prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.

Hradec Králové, 27. 6. 2014

Obhajoba dne:
(doplň studijní odd.)

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze, 25. 6. 2014

Poděkování

Na prvním a zcela nezastupitelném místě děkuji panu prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D., mému školiteli, za obrovskou míru energie, času, trpělivosti a laskavosti i za jeho pomoc a radu při realizaci tohoto projektu. Zároveň mu děkuji a za jeho přístup nejen v rovině odborné, ale hlavně lidské.

Děkuji všem, kteří byli ochotni pomoci mi při realizaci této práce a to od samého jejího počátku. Děkuji vedoucí lékařce paní doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D a celému kolektivu laboratoře při Geronto-metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Na tomto místě děkuji i MUDr. Haně Kalábové, Ph.D. za pomoc.

Děkuji statistikům, kteří se zhostili nesnadného úkolu zpracování korelací nespojitých a spojitých dat.

Děkuji sestřám všech tří lůžkových oddělení Ústavu radiační onkologie Nemocnice Na Bulovce v Praze za pomoc při sběru biologického materiálu i edukaci pacientů. Děkuji kolegům MUDr. Pavlu Vítkovi, Ph.D. a MUDr. Miloslavu Pálovi, Ph.D. za podporu.

Děkuji pacientům, kteří se svým vstupem do tohoto projektu a pečlivým sběrem potřebného biologického materiálu k dalšímu zkoumání podíleli na podobě této práce.

Obsah

Úvod	10
Cíl disertační práce	12
Literární přehled	13
1.Systémová zánětlivá a imunitní odpověď a nádorová onemocnění	13
1.1.Imunitní systém zdravého jedince	13
1.1.1. Typy imunity	14
1.1.1.a.Vrozená imunita	15
1.1.1.b. Získaná imunita	16
1.2. Kooperace vrozené a získané imunity	19
1.3. Dendritické buňky	19
1.4. Nádorová imunologie	19
1.4.1. Chronická zánětlivá onemocnění a vznik nádoru	20
1.4.2. Působení zánětlivých cytokinů v mikroprostředí tumoru	20
1.4.3. Imunitní odpověď a růst nádoru	20
1.4.4. Paraneoplastické příznaky jako důkaz imunitní odpovědi na nádor	21
1.4.5.Výskyt buněk imunitního systému v nádoru jako prognostický faktor.....	22
1.4.6.IDO: více než enzym	22
1.4.7.Únik karcinomů imunitní obraně organismu	23
2. Oxidační stres, volné radikály, antioxidanty a imunitní odpověď	23
2.1.Oxidační stres, volné radikály a imunitní odpověď	23
2.1.1.Volné radikály.....	24
2.1.2. Oxidační stres a kancerogeneza	24
2.2.Antioxidanty	25
2.3. Onkologická terapie a oxidační stres	26
2.4. Radioterapie a oxidační stres	26
2.5. Chemoterapie a oxidační stres	26
3.Neopterin	27
3.1. Pteridiny a neopterin.....	27
3.2.Imunologické a biochemické podklady tvorby neopterinu	29

3.3. Deriváty neopterinu a radikály zprostředkované procesy	33
3.4. Stanovení neopterinu v tělních tekutinách	34
3.5. Normální hodnoty neopterinu	34
3.6. Neopterin a maligní onemocnění	36
3.7. Vztah neopterin – tryptofan a maligní nádorová onemocnění	37
4. Karcinomy hlavy a krku	38
4.1. Epidemiologie karcinomů hlavy a krku	39
4.2. Etiologie karcinomů hlavy a krku	41
4.3. Prevence karcinomů hlavy a krku	44
4.3.1. Primordiální a primární prevence	44
4.3.2. Sekundární prevence	45
4.3.3. Terciární prevence	46
4.3.4. Kvartérní prevence	46
4.3.5. Chemoprevence	46
4.4. Molekulární biologie a genetika karcinomů hlavy a krku	47
4.4.1. HPV pozitivní karcinomy (HPV+)	47
4.4.2. HPV negativní karcinomy (HPV-)	47
4.4.3. EGFR (epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor)	48
4.4.4. Molekulární biologie a genetika progredujících karcinomů hlavy a krku	49
4.6. Histopatologie nádorů ORL oblasti	49
4.7. Příznaky ORL nádorů	50
4.8. Diagnostika	50
4.8.1. Endoskopické metody	50
4.8.2. Zobrazovací metody	50
4.8.3. Získání bioptického materiálu	51
4.9. TNM systém	52
4.10. Prognostické faktory	52
4.11. Prediktivní faktory	54
4.12. Léčba karcinomů ORL oblasti	55
4.12.1. Léčba resektabilního lokálně a lokoregionálně pokročilého karcinomu ORL oblasti	55

4.12.2. Radioterapie lokálně a lokoregionálně pokročilého karcinomu ORL oblasti	57
4.12.3. Konkomitantní chemoradioterapie	58
4.12.4. Cílená biologická léčba aplikovaná konkomitantně s radioterapií (bioradioterapie) u lokálně či lokoregionálně pokročilých neresekovaných karcinomů ORL oblasti.....	60
4.13. Karcinomy nazofaryngu a konkomitantní chemoradioterapie.....	61
4.14. Toxicita radioterapie neresekovaných karcinomů ORL oblasti.....	62
4.14.1. Akutní toxicita.....	63
4.14.2. Pozdní toxicita.....	64
4.14.3. Velmi pozdní toxicita.....	64
4.14.4. Radioprotektiva.....	64
4.15. Toxicita cisplatiny.....	65
4.16. Toxicita cetuximabu.....	65
4.17. Podpůrná péče a výživa při léčbě neresekovaného karcinomu ORL oblasti.....	65
4.18. Rehabilitace.....	66
4.19. Sekundární primární nádory.....	67
4.20. Poléčebné sledování (follow - up).....	67
5. Soubory pacientů, statistická analýza.....	68
5.1. Soubory pacientů.....	68
5.2. Zařazování pacientů.....	69
5.2.1. Vstupní kritéria zařazení do studie.....	70
5.2.2. Kritéria pro nezařazení do studie či vyřazení ze studie.....	70
5.2.3. Požadovaná vstupní vyšetření.....	70
5.3. Léčba neresekovaného ORL nádoru ve studii.....	71
5.4. Soubor č. 1 - Neopterin a toxicita léčby.....	72
5.4.1. Cíl výzkumu.....	73
5.4.2. Zařazování pacientů do studie.....	73
5.4.3. Podpůrná léčba.....	73
5.4.4. Hodnocení toxicity léčby.....	73
5.4.5. Management odběrů neopterinu.....	74
5.4.6. Charakteristika souboru.....	74
5.4.7. Statistické zpracování dat.....	76

5.5. Soubor č. 2 - Neopterin, retinol a α - tokoferol jako prognostický faktor u ORL karcinomů.....	77
5.5.1. Cíl výzkumu.....	77
5.5.2. Podpůrná léčba.....	77
5.5.3. Poléčebné sledování – follow up.....	77
5.5.4. Management studijních odběrů.....	78
5.5.5. Charakteristika souboru.....	78
5.5.6. Statstické zpracování dat.....	81
6. Laboratorní metodika	82
6.1. Soubor č. 1 - Neopterin a toxicita léčby	82
6.2. Soubor č. 2 - Neopterin, retinol a α - tokoferol jako prognostický faktor u ORL karcinomů.....	83
7. Výsledky a diskuze	84
7.1.Soubor č. 1 - Neopterin a toxicita radioterapie.....	84
6.1.1.Výsledky.....	84
6.1.2. Diskuze.....	84
7.2.Soubor č. 2 - Neopterin, retinol a α - tokoferol jako prognostický faktor u ORL karcinomů.....	86
7.2.1. Výsledky.....	86
7.2.2. Diskuze.....	90
8. Závěr.....	93
9. Seznam literatury.....	95
10. Přílohy.....	112

Použité zkratky

AJCC - American Joint Committee on Cancer

CAS – Chemical Abstract Service

cDDP - cisplatina

CT – computer tomography,

CTC - AE – Common Toxicity Criteria – Adverse Event

EGFR – epidermaľ growth faktor receptor

EGFR - receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)

EORTC – European Organization for Research and Treatment of Cancer

5-FU – 5- Fluorouracil

GIT – gastrointestinální trakt

HBV – hepatitis B virus

HCV – hepatitis C virus

HIF – 1 - hypoxií indukovaný faktor -1

HNSCC- Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

HPV – human papilloma virus

IL - interleukin

IOE – Institut of Education, University London

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

LENT- SOMA - Late Effects Normal Tissue Task Force (LENT)-Subjective, Objective, Management, Analytic (SOMA)

MRI - Magnetic Resonance Imaging, magnetická rezonance

mTOR – mammalian Target of Rapamycin

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

NCI – National Cancer Institut

NSCLC - non small cell lung cancer

PEG – perkutánní endoskopická gastrostomie

PI3-kinázy- fosfatidylinositol – 3- kinázy

ROM - range of motion

ROS- Reactive oxygen speciement, volné radikály

RTOG – Radiation Treatment Oncology Group

SCC - spinocellular carcinoma

SMILES - Simplified molecular input line entry specification

TGF α , β - tumor growth factor α , β

TILs - tumor infiltrative lymphocytes, lymfocyty infiltrující tumor

TKI's – tyrozinkinázové inhibitory

UICC – Union Internationale Contre la Cancer

UZ - ultrazvuk

VEGFR – receptor pro vaskulární endoteliální faktor

WHO – World Health Organization

Úvod

Systémová zánětlivá odpověď je organizmem vyvíjena při jakémkoli inzultu, ať už přichází zvenčí či zevnitř organismu. Součástí imunitních mechanismů organismu je nejen jejich humorální, ale i buněčná složka, která má význam při vzniku i progresi různých onemocnění. Význam buněčné imunity nelze přehlížet ani u maligních onemocnění, protože stejně jako ostatní onemocnění, jsou i ta maligní provázána systémovou zánětlivou odpovědí organismu.

Dalším velmi důležitým mechanismem pro vznik nádorů, stejně jako pro mnoho dalších chronických chorob, je oxidační stres, který je vyvolán buď nadbytkem volných radikálů, nebo nedostatečnou aktivitou antioxidantů. Z literatury je zřejmé, že snížená hladina vitamínu E a A koreluje se zvýšenou hladinou markerů systémového zánětu u pokročilých karcinomů a že je špatným prognostickým faktorem.

Neopterin je produkován z guanosin – trifosfátu aktivovanými makrofágy v reakci katalyzované GTP – cyklohydrolázou I, je jedním z biomarkerů imunitní odpovědi i molekulou asociovanou s antioxidační rovnováhou.

Nádory ORL oblasti (ORL nádory, ORL karcinomy, nádory hlavy a krku) patří mezi onkologická onemocnění, která se sice neřadí k nejčastěji se vyskytujícím maligním onemocněním, přesto jsou relativně četná a na okraji zájmu odborníků rozhodně nestojí. Naopak. Karcinomy hlavy a krku tvoří poměrně heterogenní skupinu onemocnění. Většina z nich je diagnostikována v lokálně či lokoregionálně pokročilém stadiu. Při jejich léčbě jsou využívány multimodální přístupy a bez nadsázky lze tvrdit, že v terapii těchto nádorů se v současnosti využívají téměř všechny dostupné terapeutické modalities. Ty se různě vzájemně kombinují podle toho, v jaké lokalitě a v jakém stadiu se onemocnění nalézá. Využívány jsou jak lokální léčebné přístupy – chirurgické a radioterapeutické, tak systémové léčebné modalities – chemoterapie i cílená biologická léčba. U některých typů ORL onemocnění lze využít hypertermii či fotodynamickou terapii.

V posledních letech došlo k intenzifikaci léčebných postupů používaných u těchto nádorů. To s sebou však přináší mnohem větší riziko vzniku nežádoucích efektů, zhoršení a prodloužení jejich výskytu. Bez dobré podpůrné léčby by nebylo možné tyto intenzifikované režimy používat. Přestože je podpůrná léčba využívána, jsou to právě nežádoucí účinky, které limitují onkologickou léčbu. Nežádoucí účinky snižují kvalitu života nemocného jedince nejen v průběhu onkologické léčby, ale často i mnoho let po jejím ukončení, dokonce mohou

přetrvávat po celý zbytek života pacienta. I v dnešní době se stále setkáváme s výraznou toxicitou onkologické léčby, která i při použití podpůrné léčby může vést k úmrtí nemocného jedince.

Léčba karcinomů hlavy a krku se vyznačuje zcela specifickým spektrem nežádoucích účinků např. nemožností fonace po totální laryngektomii nebo zhoršením fonace po radioterapii, dysfagií až afagií, xerostomií či osteoradionekrózou dolní čelisti po radioterapii atd.

Prohlubující se znalosti o nádorové imunologii, molekulární biologii a genetice přinášejí nové poznatky o vzniku nádorů, jejich chování a odpovědi na léčbu. Díky novým informacím z těchto oblastí, jsou nádory tříděny do dalších kategorií a podkategorií, jsou zkoumány molekulární, genetické a imunologické markery, které by měly sílu prognostických či prediktivních faktorů. Důležité však je mít při těchto výzkumech na paměti význam toxicity léčby a její predikci.

V dnešní době stále neexistují specifické markery či prediktivní faktory, pomocí nichž bychom byli schopni předpovědět závažnost a tíži nežádoucích účinků zvoleného terapeutického postupu při onemocnění nádorem ORL oblasti. Výskyt nežádoucích účinků při zvoleném postupu jsme schopni částečně předvídat na základě obecných kritérií: stavu pacienta, velikosti nádoru, přidružených chorob a našich zkušeností s léčbou, kterou poskytujeme a našich znalostí o ní. Prognózu onemocnění stanovujeme v podstatě na základě stejných kritérií, byť dnes k těmto faktorům přibyly další – EGFR a HPV, které by mohly být i prediktivními faktory.

Mnohaletou touhou odborníků je nalézt jednoduše stanovitelný a přitom objektivně měřitelný prediktivní, případně prognostický biomarker, který by usnadnil výběr terapeutických modalit a jejich kombinací podle tolerance léčby pacientem a podle prognózy onemocnění. Přibývá sice znalostí o nádorových buňkách, o jejich diferenciaci, růstovém potenciálu, přibývá informací o buněčných receptorech, transdukčních dráhách buněk, ale stále chybí specifické markery, které by měly dostatečnou výpovědní hodnotu o jejich nositelích tj. pacientech. V případě, že by byly dostupné, znamenalo by to, že pro tvorbu standardů pro léčbu jednotlivých maligních onemocnění podle stadia onemocnění a vlastností nádorových buněk, by bylo možné při použití specifických prognostických a prediktivních biomarkerů opravdu „ušít léčbu na míru konkrétnímu pacientovi“ podle specifik onemocnění i pacienta.

Vzhledem k tomu, že nežádoucí účinky léčby jsou jedním z limitujících faktorů onkologické léčby, je tato práce zaměřena nejen na prognózu, ale i predikci odpovědi toxicity při onkologické léčbě. Karcinomy hlavy a krku jsou skupinou nádorů, u které je používána

intenzivní protinádorová léčba, která indukuje závažné nežádoucí účinky, proto se karcinomy hlavy a krku staly v této práci zkoumaným onemocněním a neopterin biologickým biomarkerem, který byl použit spolu s hladinou retinolu a α - tokoferolu. O těchto molekulách u karcinomů ORL oblasti v současné době není k dispozici dostatek dat.

Cíl disertační práce

Maligní onemocnění, karcinomy hlavy a krku nevyjímaje, jsou ve své podstatě onemocněními systémovými a jako taková jsou provázána systémovou zánětlivou odpovědí. Z mnoha prací je zřejmé, že spolehlivým biomarkerem buněčné imunitní odpovědi je neopterin, jehož hladina se při onemocnění většinou maligních nádorů zvyšuje. Zatím provedené práce se většinou věnují hladině neopterinu u nádorových onemocněních např. v závislosti na jejich stadiu, ale příliš se nevěnují systémové zánětlivé reakci organismu a/ nebo hladinám neopterinu přímo při onkologické léčbě pacientů ať už pouhým sledováním či z hlediska aplikace onkologické léčby a její toxicity. Velmi málo dat o těchto molekulách je k dispozici pro nádory ORL oblasti. Pozornost si zaslouží i oxidační stres a antioxidanty.

V práci byly vytyčeny dva primární cíle:

Zhodnotit, zda koncentrace neopterinu v moči může predikovat rozvoj akutní toxicity onkologické léčby karcinomů hlavy a krku. Vzorky moči byly odebírány sériově denně po celou dobu radioterapie.

Studovat prognostický význam hladiny neopterinu, hladiny retinolu a α - tokoferolu před zahájením léčby pro karcinomy hlavy a krku.

Sekundárním cílem bylo evaluovat správnost denního provádění odběrů a jejich uskladnění po edukaci pacientů a to nejen v prostředí zdravotnického zařízení.

Pro tuto práci byli vybráni pacienti s karcinomy ORL oblasti primárně neresekovanými, lokálně či lokoregionálně pokročilými.

Literární přehled

1. Systémová zánětlivá a imunitní odpověď a nádorová onemocnění

1.1. Imunitní systém zdravého jedince

Imunitní systém savců a imunitní reakce mají za úkol spolu s dalšími mechanismy, kterými organismus disponuje, udržovat homeostázu a integritu organismu. *Immunis* znamená v latině odolný. Hlavním cílem imunitního systému je chránit organismus před škodlivými vlivy přicházejícími zvenčí popřípadě i z vlastních buněk - zbavovat organismus cizorodých látek, patogenů a poškozených vlastních buněk a molekul, regulovat buněčné přežívání i buněčnou smrt (apoptózu). Tímto systémem se dokáže organismus bránit proti vzniku a rozvoji různých, nejen infekčních, onemocnění.

Imunitní systém je tvořen množstvím buněk a imunitních mediátorů, které reagují s ostatními buňkami v těle. Tím je vytvořena velmi bohatá, dynamická, komplexní a dokonalá záchytná síť sloužící k obraně organismu a zároveň vytvářející toleranci na vlastní antigeny.

Antigenem rozumíme makromolekulární látku, nejčastěji protein, ale také polysacharid popřípadě nukleovou kyselinu, kterou organismus rozpozná jako cizorodou a proti níž vyvine imunitní reakci (*Hořejší, 2009*)

Vlastním antigenem rozumíme protein, který není poškozen, který je derivován z proteinů normální struktury z vlastních buněk organismu. Takto vniklý antigen/ protein není schopen normálně fungující imunitní systém rozpoznat a bránit se mu právě díky mechanismům způsobujícím toleranci na vlastní proteiny, antigeny, buňky, tkáň. Nicméně, někdy v organismu nastanou takové podmínky, že se imunitní systém začne vlastním antigenům bránit, což dává vzniknout autoimunitním chorobám. Autoimunitní choroba je selhání mechanismů imunitního systému, které rozlišují mezi tkání vlastní a cizorodou. To se stává nejen díky vlivům genetickým, ale někdy i vnějším (*Sinha, 1990*).

1.1.1. Typy imunity

Podle času vzniku a rozvoje imunitního systému ve vývoji jedince, rozlišujeme imunitu vrozenou a imunitu získanou.

1.1.1.a. Vrozená imunita

Vrozená imunita (nespecifická imunita, přirozená imunita, stereotypní imunita) vzniká na podkladě genetické informace, se kterou se jedinec narodí. Díky vrozené imunitě je organismus chráněn i v prvních hodinách po napadení antigenem. Antigen je díky této imunitě rozpoznáván bez předchozího střetu organismu s tímto antigenem a jeho rozpoznávání je nespecifické. Tento typ imunity zprostředkovává okamžitou obranu organismu proti cizorodé molekule či látce a zahajuje imunitní odpověď organismu při prvním střetu s antigenem. Do vrozené imunity řadíme:

1. Humorální nespecifickou imunitu – komplement, lysozym, bílkoviny akutní imunologické fáze a interferony. Jedná se o tzv. rozpustné faktory.
2. Buněčnou nespecifickou imunitu – buňky se schopností fagocytózy, přirození zabíječi (NK = natural killers)
3. Neimunologické složky nespecifické imunity – mechanické bariéry (poporodní vermiformní červa, sliznice, kůže), pH sekretů, enzymy, pohyby řasinkového epitelu

Molekuly a buňky nespecifické imunity používají k rozpoznání receptorů lektiny, Toll-like receptory (TLRs), NOD-like receptory (NLRs) a helikázy. Z objev TLRs z roku 1990 byla vědcům udělena Nobelova cena

Buňky vrozené imunity

Mezi buňky vrozené imunity řadíme *monocytomakrofágový systém*, do kterého patří monocyty a makrofágy (histiocyty, alveolární makrofágy, pleurální a parietální makrofágy, Kupferovy buňky, synoviální makrofágy, chondroklasty, osteoklasty, buňky mikroglie, žírné buňky, dendritické buňky) a *neutrofilní systém*, do kterého patří neutrofilní granulocyty. Mezi základní funkce těchto buněk patří schopnost *migrace*. Pro tuto funkci je nutná schopnost adheze buňky, diapedéza, schopnost průniku přes extracelulární membránu včetně buněčné membrány, chemotaxe. Chemotaxí rozumíme řízenou migraci proti koncentračnímu spádu chemotaxinů (chemotaktických látek) a to díky receptorům uloženým na povrchu buňky. Další velmi důležitou funkcí buněk vrozené imunity je schopnost fagocytózy. *Fagocytóza* je

vlastním a hlavním nástrojem buněčné imunity. Fagocytózou jsou odklizeny nejen cizorodé částice, ale také přestárlé, odumřelé či defektní buňky vlastního organismu. Z tohoto důvodu musí být fagocytóza specifickou záležitostí, protože jinak by mohly být fagocytovány i buňky zdravé. Proto jsou fagocyty do místa poškozené či cizorodé látky přitahovány pomocí tzv. chemokinů, které poškozené místo označí.

Fagocytóza probíhá v několika krocích – v první řadě musí dojít k adhezi k povrchu cizorodé částice. Adheze bývá ulehčena opsonizací mikroorganismu. Opsoniny jsou v podstatě markery buněk, které mají být fagocytovány. Nejúčinnějšími opsoniny jsou protilátkou molekuly, které se navazují na speciální determinanty na buněčném povrchu bakteriálních buněk popřípadě na molekuly, které jsou odhaleny na starých či poškozených buňkách (*Trojan, 2003*). Díky tomu jsou fagocyty schopny rozpoznat buňku, která má být fagocytována, s tou se pak spojí pomocí receptorů, které mají na svém povrchu. Disponují receptory jak pro komplement, tak pro protilátky. Pokud mají být pohlceny inertní částice, děje se tak prostou fyzikální interakcí a nejdená se o fagocytózu zprostředkovanou.

Druhým krokem fagocytózy je *ingesce* (pohlcení) částice. Vzhledem k tomu, že fagocyty mají ve své fyziologické výbavě pseudopodie, je částice pseudopodiemi uchopena, obklopena, tím vzniká vakuola, která je vystlána plazmatickou membránou - fagosom.

Třetím krokem fagocytózy je vnik *fagolyzozomu* fúzí fagosomu a plazmatické lazozomu.

Následuje čtvrtý krok, kterým je vlastní *destrukce* pohlcené částice pomocí enzymů obsažených ve fagolyzozomu i působením jeho pH nebo pomocí respiračního vzplanutí (respiratory burst), při kterém vznikají superoxidové anionty a další toxické kyslíkové látky, což způsobuje smrt většiny bakterií a cizorodých částic (*Trojan, 2003*).

Makrofágy mají schopnost předkládat antigen imunokompetentním buňkám a to poté, co antigen pohltní a následně natráví částici. Její antigeny následně vestaví do své povrchové membrány a takto upravené je předkládá T- lymfocytům. Pro tuto funkci makrofágů je důležitý systém HLA (MHC).

Makrofágy mají na svém povrchu i receptory pro lymfokiny, což jsou látky koordinující imunitní odpověď s lymfocyty a ostatními imunitními buňkami a slouží také k regulaci proliferace makrofágů.

Přirozená cytotoxicita, natural killers

10-15% imunitních buněk, velkých granulárních lymfocytů, na svém povrchu nenesou známky ani T- ani B- lymfocytů ani specifické receptory pro antigeny, proto byly nazvány

nulové buňky. Přesto jsou tyto buňky schopné destruovat cílové buňky bez HLA antigenů či bez předchozí senzibilizace. Tyto buňky jsou nadány přirozenou agresivitou, jsou schopny zasahovat velmi rychle bez předchozí imunizace, uvolňují cytolytické látky nazývané perforiny. Vzhledem ke své přirozené cytotoxicitě jsou tyto buňky nazývány přirozenými zabíječi (natural killers).

Komplement

Do vrozené imunity patří také komplement, který sestává z glykoproteinů a plazmatických proteinů a představuje asi 15% globulinů krevní plazmy. Většinou je komplement složen z prekurzorů enzymů, tedy neaktivních látek, jejichž aktivace nastává kaskádovitě. K této aktivaci dochází na komplexu antigen- protilátka nebo na povrchu membrán buněk.

Komplement je zodpovědný za chemotaxi, za opsonizaci, která usnadňuje nejen fagocytózu, ale zprostředkovává cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity). Komplement rovněž zodpovídá za aglutinaci buněk, neutralizaci virů a za vyplavování imunitních buněk z kostní dřene.

1.1.1.b. Získaná imunita

Získaná imunita (specifická imunita, adaptivní imunita) je fylogeneticky mladší typ imunity. Rozvíjí se na rozdíl od vrozené až po setkání s antigenem. Její rozvoj je také po setkání s antigenem mnohem delší a trvá až několik dní a organismus je pomocí ní chráněn pouze proti tomu antigenu, proti němuž se reakce rozvinula. Tato reakce je způsobena receptorem, na který se naváže pouze daná antigenní determinanta. Ještě léta po odstranění antigenu, poté co byla antigenní reakce ukončena, je možné v organismu nalézt imunokompetentní buňky, které nesou receptory, na které se daný antigen může okamžitě navázat. Tyto paměťové buňky umožňují rychlý rozvoj sekundární imunitní reakce v případě, že antigen opět vstoupí do těla.

Do získané imunity patří:

1. Humorální specifická imunita = protilátky. Výkonnou buňkou tohoto typu získané imunity je B – lymfocyt.
2. Buněčná specifická imunita = T - lymfocyty, které jsou efektorovými buňkami získané imunity.

B- lymfocyty

B – lymfocyty (CD20+) zajišťují humorální specifickou imunitu. Vyvíjí se v lymfoepiteloidních tkáních podobných tkáni v bursa Fabricii u ptáků, sekundárně pak osidlují lymfatické orgány. U člověka se tvoří v kostní dřeni a lymfatických placích gastrointestinálního traktu (Payerovy plaky v ileu, v appendixu a také v tonzilách). Specifická reakce je způsobena receptorem na povrchu- BcR. B- lymfocyty vyžívají v *plazmatické buňky*, které zajišťují humorální imunitní odpověď tím, že do tělních tekutin vylučují protilátky, které mají schopnost vázat antigen tím, že v imunoglobulinu jsou stejná vazebná místa, jako je BcR. Tím je také zajištěna specifická reakce. Další možnou variantou vyžívání B- lymfocytů jsou paměťové B- buňky, které osidlují většinou sliznice, kde čekají na vstup antigenu zvenčí. Po setkání s ním jej nabídnou T- lymfocytům.

T- lymfocyty

T- lymfocyty se vyskytují v několika variantách. Jako tzv. pomahačské T – lymfocyty (helpem T- lymphocytes), T_H –lymfocyty, supresorové T lymfocyty, T_s –lymfocyty nebo jako cytotoxické lymfocyty – T_c –lymfocyty a paměťové T- lymfocyty.

Klíčovou úlohu v imunitní reakci mají T_H –lymfocyty (CD4+), které poté, co jsou aktivovány antigen předkládající buňkou, uvolňují cytokiny – především interleukiny a to hlavně interleukin- 2 (IL -2), který stimuluje k činnosti další buňky imunitního systému. Působení T_H – lymfocytů je nepostradatelné pro diferenciaci B- lymfocytů v plazmatické buňky. Díky působení IL-2 dochází k proliferaci dalších imunitních buněk, čímž se zvětšuje počet buněk účastnících se na imunitní reakci. Mezi T_H – lymfocyty rozlišujeme další skupiny a to např. T_{H1} – lymfocyty a T_{H2} – lymfocyty, které působí na jiné populace imunitních buněk a produkují odlišné cytokiny, které se spolupodílí na imunitní reakci.

Naopak T_s – lymfocyty (CD8+) jsou nezbytné popotlačení imunitní reakce a pro její ukončení.

T_c – lymfocyty (CD8+) jsou schopny nalézt cílovou buňku a zlikvidovat ji. Cytotoxický účinek je navozován pomocí perforinu a pomocí FasL (Fas Ligandu na povrchu T_c – lymfocytů), pomocí něhož dochází k navození apoptózy.

Paměťové T – lymfocyty vznikají jako B- lymfocyty po střetu s antigenem a lze je nalézt v organismu dlouhou dobu po kontaktu s antigenem.

1.2. Kooperace vrozené a získané imunity

Aby byla zajištěna dokonalá obrana organismu, spolupracují spolu v průběhu imunitní reakce jak složky nespecifické, tak specifické imunity. Klíčovou roli v propojení obou imunitních typů hrají *dendritické buňky*, jejichž význam v onkologii v současné době výrazně roste a vakcíny z dendritických buněk jsou testovány v klinických studiích jako nový prostředek léčby hematologických (Büchler et al., 2003) i jiných onkologických onemocnění (Reichardt et al., 2004).

1.3. Dendritické buňky

Za objev dendritických buněk (DC) v roce 1973 byla Ralphu Steinmanovi udělena Nobelova cena. DC jsou relativně řídké se vyskytující buňky, patří však k nejefektivnějším antigen prezentujícím buňkám (APC). Vznikají v kostní dřeni a následně se vyskytují, vyjma rohovky, varlat a mozku, ve všech tkáních. Na svém povrchu mají dlouhé výběžky, jimiž komunikují s okolím i okolními buňkami a jimiž jsou schopny zachytit cizorodou buňku či částici a tuto informaci zprostředkovat jak T- lymfocytům, tak B- lymfocytům (*Pelucka et al., 2012*). Proto hrají dendritické buňky roli prostředníka mezi oběma typy imunitních systémů. I z tohoto důvodu se staly v poslední době cílem zkoumání vědců, kteří vyvíjejí a testují vakcíny z DC v klinických studiích u různých typů malignit – melanomem počínaje, přes karcinomy prostaty, nádory glie až po hematologické malignity.

1.4. Nádorová imunologie

Přestože je lidský imunitní systém dobře fungujícím mechanismem, vznikají v lidské populaci nádory poměrně často. I to je předmětem zkoumání, přestože se *in vivo* lidský imunitní dohled zkoumá velmi obtížně. Často jsou proto ke studiu imunitních reakcí využívány zvířecí modely a epidemiologické studie. V imunitní odpovědi vznikající při vzniku a výskytu nádorových onemocnění se uplatňuje jak vrozená, tak získaná imunita.

To, že jsou nádorová onemocnění provázána celkovou odpovědí organismu, která nemá zcela unikátní charakter, ale naopak v ní lze nalézt mnoho paralel k průběhu zánětlivých, infekčních komplikací nebo hojení ran, je známo mnoho let.

Již v roce 1836 pozoroval Virchow leukocyty v nádorech, což považoval za důkaz, že mezi nádorem a zánětem existuje spojení a že nádory vnikají v chronickém zánětu.

1.4.1. Chronická zánětlivá onemocnění a vznik nádoru

I dnes platí, že v chronickém zánětu mohou vznikat nádory. Příčinou vzniku nádorů v podmínkách chronického zánětu je chronické narušení homeostázy tkání, narušená kooperace mezi vrozenou a získanou imunitou. Tím mohou být nastartovány destruktivní buněčné cykly, které vedou k remodelacím tkání, ztrátě správné stavby tkáně, tvorbě změněných proteinů a alteracím DNA vlivem oxidativního stresu.

Více než 15% všech nádorů v lidské populaci způsobují infekční patogeny, které indukují kancerogenezu výše uvedenými podmínkami chronického zánětu. Příkladem mohou být *Helicobacter pylori*, který může způsobit výskyt jak karcinomu žaludku, tak MALT lymfomu v dlouhodobě zánětlivě změněné tkáni nebo HCV či HBV, které mohou být příčinou vzniku hepatoelulárního karcinomu v terénu chronické hepatitidy, HPV bývají příčinou karcinomů děložního čípku, schistostomiáza karcinomů močového měchýře.

Chronický zánět nemusí být způsoben pouze infekčním patogeny, ale také jinými částmi, které způsobují dlouhodobé dráždění sliznic a tím dávají vzniknout chronickému zánětu. Azbest a křemičitý prach a kouření způsobující mohou být rizikovým faktorem pro vznik karcinomu plicního, kouření a alkohol jsou pak rizikovými faktory pro vznik nádorů hlavy a krku, žaludku či jícnu.

1.4.2. Působení zánětlivých cytokinů v mikroprostředí tumoru

Zánětlivé cytokiny ovlivňují mutace, proliferaci, diferenciaci, růst, přežívání i pohyb tumorózních buněk i buněk stromatu. Cytokiny také zajišťují a regulují komunikaci mezi tumorem a buňkami stromatu a extracelulární matrix.

1.4.3. Imunitní odpověď a růst nádoru

Dnes se ovšem předpokládá, že zánětlivé buňky a cytokiny, které můžeme ve vlastní nádorové tkáni nalézt, jsou mnohem více příčinou progresu nádoru, jeho růstu a imunosuprese, než že by samy o sobě byly efektivní imunitní odpovědí na vznik a růst nádoru v organismu (*Balkwill et al., 2001*). Pokud tedy jsou genetické změny příčinou vzniku nádoru,

mohou být zánětlivé markery, cytokiny a chemokiny jakýmsi hnacím motorem pro jeho růst a progresi. To byl také jeden z důvodů, pro který byly a jsou cytokiny, chemokiny a jiné zánětlivé buněčné produkty podrobovány zkoumání. Zdá se, že TILs (tumor infiltrating lymphocytes) mohou být prediktorem účinnosti ORL karcinomů na chemoradioterapii (Balermipas et al., 2013).

Tumor je nejvýznamnějším imunosupresorem v těle pacienta, imunitu může potlačovat systémově a v mikroprostředí tumoru. Tumory také produkují imunosupresivní molekuly – např. TGF - β a solubilní Fas ligand a imunosupresivně působící enzym IDO. Mikroprostředí nádoru může hrát významnou úlohu v regulaci T- lymfocytů, protože antitumorové efektorové T- lymfocyty suprimuje produkcí TGF - β a IL - 10. TGF - β má také schopnost měnit antitumorové T - lymfocyty na regulační T - lymfocyty, čímž uniknou vlastní destrukci imunitními buňkami. Imunosupresivní efekt karcinomů je také systémový. Zvýšení regulačních T- lymfocytů periferní krvi bylo zjištěno u pacientů s karcinomy ORL oblasti (Finn, 2008).

V případě, že by byla nalezena efektivní cesta, jak tyto buněčné produkty způsobující růst nádorových buněk brzdit, či zcela zastavit, nebo naopak posílit jejich protinádorové působení, bylo by možné těchto cest využít v terapii nádorových onemocnění.

1.4.4. Paraneoplastické příznaky jako důkaz imunitní odpovědi na nádor

Lidský imunitní systém disponuje potenciálem eliminovat maligní buňky již v samém počátku. Přesto tento systém někdy selže. Jedním z nejpřesvědčivějších důkazů toho, že imunitní systém pracuje i tehdy, je – li v organismu přítomen nádor, je výskyt paraneoplastických příznaků či paraneoplastický syndrom. Například neurologické poruchy provázející paraneoplázie mají souvislost s protinádorovou odpovědí. Onkoneurální antigeny, které jsou normálně exprimovány na neuronech, se mohou vyskytnout také na buňkách nádorů prsu.

Nádorové buňky jsou velmi špatné APC. Proto se výše uvedené paraneoplastické příznaky, které jsou důkazem naopak velmi silné imunitní reakce, dávají do souvislosti s DC, které se v tumoru vyskytují a které se pak stávají prezentujícími buňkami nádorových antigenů (Pelucka et al., 2012).

1.4.5. Výskyt buněk imunitního systému v nádoru jako prognostický faktor

V nádorech se vyskytují buňky nespecifické imunity – makrofágy, mastocyty a neutrofilové ve velkém množství, což vede ke zvýšené angiogenezi a předznamenává *zhoršenou prognózu onemocnění*. Příkladem mohou být nádory prsu, plic a melanom.

Naopak zvýšené množství lymfocytů v tumoru koreluje s *lepší prognózou*, stejně tak jako výskyt NK buněk v nádoru žaludku nebo kolorektálním karcinomu. (*de Visser et al., 2006*).

1.4.6. IDO: více než enzym

Intracelulární enzym indolamin 2,3- dioxygenáza (IDO) byl původně znám jako enzym zajišťující toleranci matky k antigenům fétu, nyní je znám jako regulátor autoimunity, má imunomodulační charakter a je součástí katabolismu tryptofanu, což prokazují početné studie týkající se působení tohoto enzymu. Odbourávání tryptofanu je započato právě tímto enzymem a tento děj balancuje na pomezí rozvoje zánětlivé odpovědi a imunologické tolerance (*Puccetti, 2007*). Exprese IDO je indukována řadou imunitních reakcí. V neposlední řadě má význam v tvorbě interferonů (INF) typu I (α , β) a INF typu II (γ) a následné vazby na TLR. IDO bývá také aktivován při vazbě kostimulačních molekul na DC. Při indukci je nalézána vysoká hladina IDO primárně plasmacytoidních DC exprimujících CD8 a CD 19, ale IDO je možné nalézt i na jiných buněčných liniích – makrofágách, epitelálních buňkách a některých fibroblastům podobných buňkách.

Zahájení řetězce odbourávání tryptofanu vede ke snížení hladin tryptofanu a tím ke zvýšení hladin toxických metabolitů mezi něž patří kynurenin. Tyto reakce mohou vyústit v supresi linií T- lymfocytů. T_{H1} – lymfocyty jsou ke změnám množství tryptofanu mnohem citlivější než T_{H2} – lymfocyty. To vede k prohloubení imunosuprese řízené T_{H1} – lymfocyty (*O'Connor, 2013*).

Imunosupresivní role IDO v nádorové imunologii je velmi dobře známa. Overexprese IDO byla zaznamenána jak v nádorových buňkách, tak v buňkách prezentujících nádorový antigen, které se vyskytují v regionálních lymfatických uzlinách a kde také vzniká periferní tolerance imunitního systému na nádorové antigeny (*Katz et al, 2008*).

1.4.7. Únik karcinomů imunitní obraně organismu

V dnešní době, na základě dostupných dat, není pochyb o tom, že rostoucí, progredující karcinomy, unikly pozornosti imunitní obrany organismu. Tato schopnost nádorů je v současné době podrobována rozsáhlému výzkumu. Zdá se, že klíčový podíl na progresi nádorů má spotřeba tryptofanu nádorem. Nové nálezy potvrzují, že mnoho karcinomů dereguluje enzym tryptofan deoxygenázu (TDO) a tím zvyšuje konzumpci tryptofanu. Primární produkt tohoto procesu je kynurenin, který je endogenním ligandem pro AHR (aryl hydrocarbon receptor) a ten je mediátorem progresu nádorů.

Karcinomy vznikají kvůli alterované genetické struktuře nebo expresi, ale neméně důležité ne mikroprostředí, ve kterém se vyvíjejí, neboť je velmi účinnou bariérou jejich růstu. Malé karcinomy mohou být destruovány imunitními buňkami.

Právě únik karcinomu této obraně, mu umožní další růst, progresi, metastazování. Mnoho mechanismů úniku imunitní obraně zahrnuje potlačení imunitního systému nádorovými buňkami. Jednou z nich je právě spotřeba tryptofanu, vznik kynureninu díky IDO a TDO. Kynurenin pak inhibuje aktivaci imunitních buněk, např. T- lymfocytů a to různými mechanismy, které mají vliv na ostatní druhy imunitních buněk. Buňky tumoru i dendritické buňky mohou být klíčovým místem pro účinek IDO, který způsobí toleranci organismu vůči nádorovým buňkám (*Prendergast, 2011*).

2. Oxidační stres, volné radikály, antioxidanty a imunitní odpověď

2.1. Oxidační stres, volné radikály a imunitní odpověď

Živé buňky produkují volné radikály (ROS- reaktiv oxygen species) nepřetržitě, ale v organismu je udržována rovnováha mezi ROS a antioxidanty. Oxidační stres může být definován jako dysbalance mezi produkcí ROS a mezi hladinou antioxidantů. Vzniká nadměrnou tvorbou volných radikálů nebo naopak nízkou aktivitou antioxidantů (*Holeček, 2010*), což následně vede k poškození buňky i tkání. Oxidační stres pak vede ke vzniku mnoha akutních i chronických nemocí včetně nádorových, neurodegenerativních,

kardiovaskulárních, onemocnění jater, ledvin a dalších. Je však i přirozeným průvodním jevem u stárnutí.

2.1.1. Volné radikály

Volné radikály je možno popsat jako molekuly nebo části molekul, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů v atomových či molekulových orbitalech. Díky nepárovému elektronu jsou vysoce reaktivní. Nejvýznamějším volným radikálem je superoxidový anion, mezi další významné radikály patří hydroxylový radikál, peroxid vodíku, peroxinitrid a oxid dusnatý.

Volné radikály jsou tvořeny jednak endogenně v mitochondriích v dýchacím řetězci, na endoplazmatickém retikulu (systém cytochromu P450), v lyzosomech a peroxysomech (za normálních podmínek je v nich tvořen H₂O₂), buňky schopné fagocytózy - zejména potom neutrofilů jsou schopny tvořit také volné radikály. Tvorbu volných radikálů podmiňují i exogenní faktory: kouření, průmyslové znečištění životního prostředí, pesticidy, rozpuštědla, léčiva (cytostatika, celková anestetika) či radioterapie (*Holeček, 2010; Klaunig et al, 2010, Dostálek, 2007*).

Volné radikály jsou důležité jak ve vrozené, tak v získané imunitě. Makrofágy a neutrofilů vytvářejí kromě jiného i tzv. "respirační vzplanutí" (respiratory burst), při kterém dochází k vyšší spotřebě kyslíku buňkou a to z toho důvodu, aby mohla vytvořit volné hydroxylové radikály, jejichž cílem je zneškodnit patogen. Volný radikál oxidu dusnatého, který je produkován makrofágy, reaguje se superoxidovým radikálem na peroxinitrid, který je také významně baktericidní.

Mezi typické oxidativní procesy patří reakce ROS a polynenasycených mastných kyselin, která vede k tvorbě toxických produktů a jevů: tvorba aldehydů, oxidace nukleotidů, snížení metabolismu proteinů, poškození buněčných a mitochondriálních membrán, nadprodukce genů, snížení produkce specifických enzymů.

Ke stanovení míry oxidačního stresu jsou hledány biomarkery.

2.1.2. Oxidační stres a kancerogeneza

Chronický oxidativní stres může vést ke vzniku nádorů velmi často na podkladě chronického zánětu – ulcerativní kolitida, chronická gastritida způsobená *H. pylori* jsou sdruženy s výskytem nádorů.

Díky oxidačnímu stresu může dojít k oxidaci nukleotidových bazí DNA, které se pak transkribují nesprávně do RNA a tím dochází k poruše proteosyntézy (Klauning *et al.*, 2010). Oxidace může vést k dysregulaci exprese genů, např. oxidace tumor supresorového genu p53 může vést k nekontrolované buněčné proliferaci (Holeček, 2010).

2.2. Antioxidanty

Enzymatické endogenní antioxidantní systémy: cytochrom c, katalázu, glutathion peroxidázy, cytosolický superoxid dismutázy a ceruloplazmin, mitochondriální superoxid dismutázy.

Neenzymatické endogenní antioxidantní systémy: vitamín A a provitamín A, vitamín C, vitamín E a vitamín K, glutathion, sulfhydrylové skupiny, thioredoxin, koenzym Q10, flavonoidy, bilirubin a další.

Exogenní antioxidantní systémy: stopové prvky – selen, zinek, měď, mangan, strava bohatá na zeleninu a ovoce.

Retinol a α - tokoferol

Vitamín A a vitamín E jsou v tučích rozpustné vitamíny, které působí v těle jako antioxidanty. Mají několik biologicky velmi důležitých funkcí a jsou zapojeny do důležitých procesů jako je imunita, ochrana proti poškození tkáně, vývoj a růst, reprodukce a jsou velice důležité v dětství.

Vitamín A je souborný název pro všechny trans – formy, které mají biologickou funkci, retinoidy označují obě formy přirozeně se vyskytujícího vitamínu A i syntetické formy, ať už mají nebo nemají biologickou aktivitu. Různé formy vitamínu A jsou – retinol, retinal, kyselina retinová a retinyl – ester kyseliny retinové nejčastěji jako palmitát, ale také jako stearát, oleát a linoleát. **Retinol** je hlavní cirkulující forma vitamínu A, která má funkci antioxidantu a v těle zajišťuje velmi důležité fyziologické funkce zahrnující zrak, růst, vývoj, diferenciaci a imunitní odpověď (Debiez a Larondelle, 2005). Retinol je přítomnosti kyslíku velice nestabilní. Hlavním zdrojem vitamínu A jsou mléčné výrobky, vajíčka a rybí tuk. Karotenoidy nebo také pro-vitamín A se nalézají v zelené a žluté zelenině. β – karoten je nejdůležitější karotenoid. Do těla se vitamín A dostává jako pro-vitamín a pankreatickými enzymy je hydrolyzován v tenkém střevě na retinol. Jeho absorpce je závislá na kvalitě tuku v potravě.

Snížená hladina retinolu byla popsána u pacientů s pokročilými karcinomy.

Vitamín E je souhrnný název pro α -, β -, γ -, δ - tokoferol a pro α -, β -, γ -, δ - tokotrienol. Biologicky neaktivnější formou je **D - α - tokoferol**, který se vyskytuje v 90%. Zdrojem vitamínu E je zelená zelenina. Tokoferylové estery jsou hydrolyzovány pankreatickými a intestinálními enzymy na tokoferol.

U pokročilých karcinomů snížená hladina retinolu a α - tokoferolu koreluje se zvýšenou hladinou zánětlivých parametrů a je negativním prognostickým faktorem (*Melichar et al., 2010*).

2.3. Onkologická terapie a oxidační stres

2.3.1. Radioterapie a oxidační stres

Radioterapie ve své druhé fázi, která následuje po fázi fyzikální, tzv. chemické tvoří v buňkách ROS. Které jsou pro účinek radioterapie na buňku zcela nezbytné. Ionizovány mohou být všechny molekuly v buňce, ale vzhledem k množství vody v buňce, je nejčastěji ionizována právě molekula vody. Ionizací je molekula vody destabilizována za vzniku hydroxylového radikálu a vodíkového iontu. Díky vysokému reakčnímu potenciálu interaguje hydroxylový radikál s dalšími ionty nebo hydroxylovými radikály za vzniku peroxidového radikálu. Radikály pak mohou poškozovat biomolekuly. Za přítomnosti kyslíku, který je za normálních okolností v buňkách přítomen - radiobiologický kyslíkový efekt, je reakce mnohem silnější. Další fází ozáření živého organismu je fáze bimolekulární. Při které jsou přímá ionizace biomolekul nebo napadení ROS využity k přerušení vazeb mezi molekulami. Nejdůležitější je poškození DNA, které má pak dopad na další osud buňky i tkáně. Tento efekt je žádoucí u nádorových buněk, méně pak ve zdravé tkáni.

Poruchy v cirkulujících antioxidantech jako je vitamín E mohou být sdruženy s toxicitou radioterapie např. postradiační fibrózou (*Delanin et al., 2003*).

2.3.2. Chemoterapie a oxidační stres

Aplikace chemoterapie je sdružena také s oxidačním stresem a stejně jako při radioterapii mohou poruchy v hladině cirkulujících antioxidantů způsobovat toxicitu

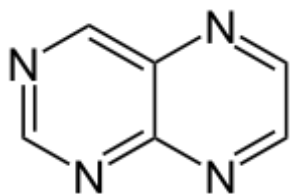
chemoterapie (Pace et al., 2003). Některé studie poukazují na snížení hladiny a-tokoferolu v průběhu chemoterapie (Faure et al., 1996; Jonas et al., 2000, High, 2002, Faber, 1995).

3. Neopterin

Neopterin patří mezi pteridiny - heterocyklické sloučeniny. Tyto sloučeniny jsou charakterizovány 5- ti až 6- ti člennými kruhy se dvěma či více heteroatomy.

3.1. Pteridiny a neopterin

Řecké slovo pteron znamená v překladu křídlo. 2- amino – 4,6 – pteridinedion (xanthopterin – žlutý pigment) byl objeven v motýlích křídlech. Pteridiny patří do chemické skupiny heterocyklických sloučenin s dusíkatým heterocyklem. Základní sloučeninou této skupiny je **pteridin**:



Identifikace:

IUPAC name – pteridine

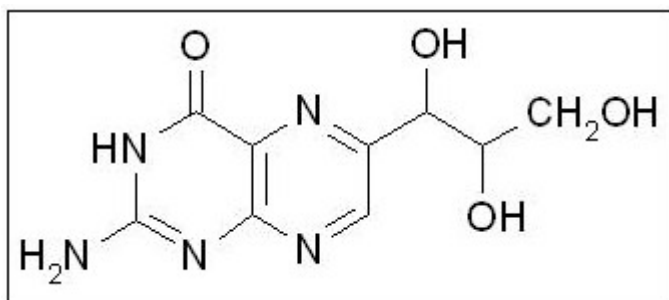
CAS number (unikátní číselný identifikátor chemických prvků a sloučenin) 91-18-9

SMILES: C1=CN=C2C(=N1)=NC=N2

Vlastnosti:

Molekulární vzorec: C₆H₄N₄, Molární hm.: 132.123

Neopterin



Obr. 1 (www. neopterin.net) : Neopterin = 2- amino - 4- hydroxy- 6 (D- erythro – 1', 2', 3' - trihydroxypropyl) – pterin , molární hmotnost 253 Da

Neopterin je nízkomolekulární sloučenina, jejíž hladina se zvyšuje při probíhající imunitní reakci. Hladina neopterinu může být velmi jednoduše určena ve všech tělních tekutinách (moč, sérum, plazma, mozkomíšni mok), protože neopterin je biologicky stabilní (*Rembold a Guyre, 1972*).

Při vzniku a progresi různých onemocnění včetně virových infekcí, autoimunitních i kardiovaskulárních onemocnění a maligních onemocnění má zásadní význam buněčná imunita. Neopterin může být označen za biologický marker aktivity buněčného imunitního systému, neboť jeho hladina odráží aktivaci celulárního imunitního systému. Laboratorně – diagnostický význam neopterinu spočívá v tom, že pochází z volného buněčného materiálu.

Pomocí koncentrace neopterinu je možné stanovit prognózu u pacientů s HIV infekcí, pacientů s poltraumatem a sepsí i u pacientů s maligním onemocněním (*Reibnegger et al. 1986; Murr et al. 2006*), u pacientů po transplantacích může predikovat akutní nežádoucí jevy jako je virová infekce či dokonce odhojení štěpu (*Fuchs et al., 1992*), zatímco jeho pokles u pacientů s karcinomem znamená zlepšení kontroly onemocnění (*Melichar et al., 2007*). Nejnovější studie ukazují, že neopterin podává informace o prognóze i u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními a také s některými neurodegenerativními onemocněními. S určením neopterinu může být zlepšeno rozlišení virové a bakteriální infekce. Zvláště u virových infekcí dochází k časnému vzestupu hladiny neopterinu. Ze stejného důvodu může být neopterin velmi dobrým ukazatelem nákazy krevních transfuzí např. hepatitidou B.

Kromě neopterinu jako důležitého diagnostického markeru, je brán nově zřetel i na biologickou úlohu jeho derivátů – např. tetrahydrobiopterin.

Vzestup koncentrace neopterinu v tělesných tekutinách jako je sérum nebo moč, se děje v souvislosti s aktivací buněčné imunitní odpovědi, která pak hraje roli v systémovém zánětu. Se vzestupem koncentrace neopterinu jsou tedy sdružena onemocnění, u kterých se uplatňuje systémová buněčná odpověď. Jedná se tedy o onemocnění virová vč. poměrně studované HIV infekce a onemocnění způsobená intracelulárními bakteriemi, parazitární onemocněními, autoimunitní onemocnění, ale také epizody odhojení po transplantaci orgánů či allogenních transplantacích dřeně, polytraumata, sepse, některá neurodegenerativní onemocnění a značné množství malignit.

Byť jsou výše uvedené situace velmi odlišné, hraje v nich významnou úlohu aktivace buněčného imunitního systému, který je buď přímo zapojen do patogeneze onemocnění, nebo je diagnózou ovlivňován. Vzhledem k tomu, že se jedná o onemocnění, která mají výrazný

dopad celou populaci, není divu, že je zájem o výzkum imunitních pochodů v organismu tak velký.

Určení neopterinu v séru, plasmě, moči, ale i v jiných tělních tekutinách umožňuje tento cíl poměrně jednoduše, ale s velkou signifikancí dosáhnout.

Také jako je vysoká produkce neopterinu asociovaná se zvýšenou produkcí reaktivních oxygenových iontů a s nízkou koncentrací antioxidantů (např. α - tokoferol), může být neopterin brán jako **marker oxidačního stresu** způsobeného aktivací imunitního systému. Proto může být na základě hladiny neopterinu odhadnut nejen stupeň aktivace imunitního systému, ale také stupeň poškození tkání způsobený reaktivními oxygenovými ionty. (*Murr et al., 1999*).

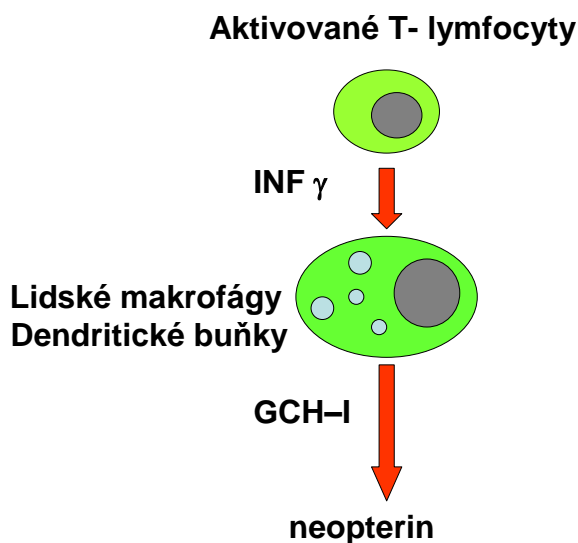
3.2. Imunologické a biochemické podklady tvorby neopterinu

Neopterin, který patří mezi pteridiny, je derivován biosyntézou z guanosin – trifosfátu (GTP). Nekonjugované pteridiny jsou syntetizovány de novo u savců a jiných vyšších živočišných druhů (*Kraut et al., 1963*). Na rozdíl od purinů, biologická funkce většiny nekonjugovaných pteridinů je stále nejasná navzdory jejich výskytu v různých organismech.

V roce 1979 byla demonstrována důležitost neopterinu v detekování a charakterizaci řídké vrozené chybě metabolismu – atypické fenylketonurii (PKU) – incidence je méně než 1/ milión narozených. Tento defekt látkové výměny je jako klasická PKU spojena se zvýšenou hladinou fenylalaninu v krvi a obvykle je diagnostikován a v prvních měsících života dítěte.

Ve stejném roce popsal Helmut Wachter a jeho spolupracovníci zvýšenou hladinu koncentrace neopterinu u pacientů trpících maligními onemocněními a virovými onemocněními (*Wachter et al., 1979*). Tím se byl vytyčen další směr výzkumu. První výzkumy neopterinu v oblasti maligním onemocnění byly sice zklamáním, ale byl jimi dán základ pro další zkoumání a pochopení neopterinu v komplexu vztahů mezi imunitní odpovědí a patogenezí onemocnění.

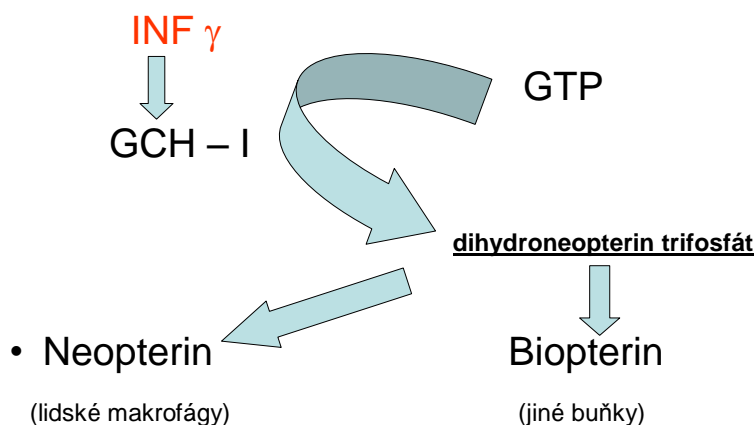
Imunitní reakce a tvorba neopterinu



Obr. č. 2 (podle www.neopterin.net): Tvorba neopterinu

Jsou-li tělu cizí či vlastní buňky, kvůli jejich modifikaci, rozpoznány lymfocyty ať už vrozené či získané imunity, začnou tyto lymfocyty produkovat různé mediátory, tzv. cytokiny. Jedním nejdůležitějších v tomto procesu je interferon gama (dále $\text{INF-}\gamma$). $\text{INF } \gamma$ je produkován hlavně T lymfocyty a přirozenými zabíječi (natural killers – NK buňkami) a má zvláštní význam v antimikrobiální a antivirové aktivaci imunitního systému. V lidských makrofágách je produkce a uvolňování neopterinu řízeno $\text{INF- } \gamma$ (*Schrecksadel et al., 2004*). Neopterin je syntetizována díky klíčovému enzymu biosyntézy pteridinů, GTP-cyklohydroláze I, z guanosintrifosfátu. GTP- cyklohydroláza I štěpí GTP na meziprodukt 7,8-dihydroneopterintrifosfátu .

Tvorba neopterinu

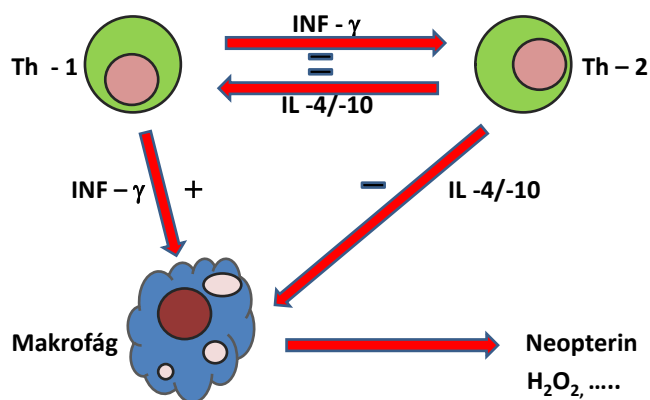


Obr. č. 3 (podle www.neopterin.net): Tvorba neopterinu

Na rozdíl od ostatních buněk a druhů mají lidské monocyty jen nepatrnou aktivitu enzymů tvořících tetrahydrobiopterin, pyruvoyltetrahydropterin syntézy, takže místo biopterinových derivátů je téměř výhradně tvořen a uvolňován neopterin a 7, 8-dihydroneopterin. Vedle makrofágů generovaných z periferních krevních buněk jsou z periferních krevních buněk diferencovány dendritické buňky schopné produkovat neopterin. Významné množství neopterinu v tělních tekutinách bylo pozorováno pouze u lidí a primátů. V monocitech však převažuje spíše biopterin.

V buněčných kulturách buněčných linií makrofágů či myelomnocytních buněčných liniích Th -1 byl identifikován cytokin $INF- \gamma$, který vede k přímé stimulaci tvorby neopterinu.

Ostatní cytokiny, různé interleukiny jako fagocytózu stimující faktory, nejsou v tvorbě neopterinu důležité. Taktéž faktor $TNF- \alpha$ (tumor nekrosis faktor - alfa) dokáže uvolnit pouze minimální množství neopterinu, zesiluje však interferonem indukovanou tvorbu neopterinu. Stejně jako u makrofágů tak i u dendritických buněk působí nejen $INF - \gamma$, ale i $INF - \alpha 1$ a $INF - \beta$ podobnou tvorbu neopterinu. Rozsah tvorby neopterinu je vždy výsledkem pozitivních i negativních regulačních vlivů, na kterých se podílí $INF - \gamma$ aktivovaný monocytomakrofágový systém.



Obr. č. 4. (podle www.neopterin.net) : Aktivace makrofágů a tvorba neopterinu

INF- γ je rozhodujícím stimulujícím faktorem pro tvorbu neopterinu a to díky aktivovaným T- lymfocytům, hlavně Th- 1 typ buněk, které jsou odpovědné především za tvorbu INF- γ a interleukinu – 2. Stimulační faktory ovlivňující aktivitu těchto buněčných T- subpopulací tímto vlastně reagují nepřímo i na aktivaci makrofágů i tvorbu neopterinu. IL -12 je také schopen zvýšit tvorbu neopterinu. Naproti tomu imunosupresiva jako cyklosporin A, která zpomalují tvorbu cytokinů, snižují také tvorbu neopterinu.

Tvorba neopterinu může být stimulována i jinými faktory, pravděpodobně především Typ - 1 interferonen nebo přes Toll - like receptorovou mediátorovou drahou. Zpětnou kontrolou syntézy pteridinů může být jejich tvorba potlačena prostřednictvím tzv. „GTP – I cyklohydrolasis feedback regulatory protein, GFRP“. A GFRP může být naopak potlačen např. lipopolysacharidy a tak dojde k aktivaci GTP cyklohydrolázy.

Výpovědní hodnota hladiny neopterinu je vyšší než INF- γ , protože neopterin je biologicky inertní a jeho poločas v lidském organismu je určen vyloučením ledvinami. Zatímco biologický poločas a tím laboratorní diagnostika a přístupnost cytokinů jako je INF- γ je ovlivňována nejrůznějšími vlivy. Uvolněný INF- γ je velmi rychle zabudován do buněčných struktur nebo neutralizován volnými receptory. Z tohoto důvodu se nedostávají lokálně tvořené cytokiny často vůbec do krevního oběhu a jsou velmi obtížně

diagnostikovatelné laboratorně. Hladina neopterinu tedy odráží nejen účinek jednotlivých cytokinů, ale také umožňuje pochopení výsledného účinku imunologické sítě a napojení na populaci monocytomakrofágových a dendritických buněk.

3.3. Deriváty neopterinu a radikály zprostředkované procesy

INF- γ je velmi potentní antimikrobiální a antitumorózní mediátor imunitního systému. Jeho význam tkví především v uvolňování toxických kyslíkových vazeb. Je popsána silná korelace mezi tvrbou neopterinu a schopností monocyto-makrofágového systému uvolňovat kyslíkové vazby. Protože je INF- γ jedním z nejsilnějších spouštěčů uvolnění těchto reaktivních kyslíkových metabolitů, může být hladina koncentrace neopterinu použita také jako nepřímé měřidlo imunologického oxidačně-redukčního stresu. Neopterin sám o sobě by mohl hrát důležitou roli ve výměně toxických reaktivních látek jako partnerů aktivovaných makrofágů a 7,8 – dyhydroneopterin účinkuje jako zametač volných radikálů.

Tvorba neopterinu ve vysokých koncentracích je specifickou vlastností makrofágů a dendritických buněk primátů. Jedna z nejvýraznějších cytotoxických reakcí INF- γ stimulovaných makrofágů je tvorba NO z argininu přes indukovanou NO syntézu (iNOS). Tento mechanismus, který byl popsán a je znám u různých druhů savců, je u lidí prokázán pouze omezeně. iNOS potřebuje pro svou plnou funkci tetrahydrobiopterin jako kofaktor, ten ale v aktivovaných lidských makrofágách hraje pouze malou úlohu, v biosyntéze neopterinu až téměř žádnou. Přijatelným vysvětlením může být, že nevýznamný cytotoxický mechanismus v lidských makrofágách může být kompenzován vedlejší produkcí neopterinu. Nálezy svědčí o tom, že je neopterin schopen zesílit účinek toxických iNOS produktů. ONOO- může vzniknout z reakce NO superoxidací a tyto reakční partneři se mohou vyskytovat díky iNOS současně, když enzym přes nedostatek tetrahydrobiopterinu je přemostěn.

Vedle fyzikálně- chemických reakcí mohou deriváty neopterinu interferovat s biologickými událostmi, které jsou regulovány přes oxidačně – redukční reakce. Tyto nálezy jsou v souladu s předchozími pozorováními, že neopterinové vazby v makrofágách zesilují jejich vlastní syntézu jako reakci na zánět. Podobnými cestami je zpomalena i tvorba erythropoetinu a programovaná smrt buňky a pomocí neopterinu, dihydroneopterinu a jiných derivátů pterinu jako např. 6-formylpterinu může být vyvolána nebo zesílena.

3.4. Stanovení neopterinu v tělních tekutinách

Neopterin a 7, 8- dihydroneopterin jsou díky imunitním reakcím tvořeny v konstantním poměru a proto v periferní krvi jejich hladiny vzrůstají společně, přičemž jejich poměr neopterinu : 7, 8- dihydroneopterin při rutinním laboratorním vyšetření periferní venosní krve je 1:2, v arteriální krvi (a tím i v moči) je přebytek 7, 8 dihydroneopterinu a poměr je 1:3. Vyšetřuje se však hladina neopterinu. Neopterin je v tělních tekutinách dostatečně stabilní, zatímco 7, 8- dihydroneopterin je chemicky labilní. Neopterin je vylučován ledvinami a změny v krevních hladinách neopterinu vedou k analogickým změnám hladiny neopterinu v moči. Za předpokladu normální funkce ledvin je stanovení neopterinu v moči a v séru stejně senzitivní pro vyšetření aktivace buněčné imunity, důležité je, že koncentrace neopterinu séru a plasmě se neliší. Kvůli fotolabilitě neopterinu musí být při skladování a transportu vzorky chráněny před přímým slunečním zářením.

V **moči** se neopterin vyšetřuje pomocí HPLC, zatímco stanovení neopterinu **v tělních tekutinách obsahujících proteiny** jako je sérum, plasma, likvor, pankreatická šťáva, žluč, ascites je užitečné použít immunoassay např. ELISA nebo radioimmunoassay. K jednoduchému stanovení hladiny neopterinu za použití immunoassay stačí 20 – 100 μ l séra, plasmy či likvoru. Neopterinu v plasmě či séru je stabilní 3 dny v pokojové teplotě, stejně tak je možné odeslání vzorků chlazených, pro skaldování jeden týden stačí teplota 4° C. Pro delší uskladnění musí být vzorky zamrazeny (na 3 měsíce -20° C). Nemělo by docházet k roztátí a znovuzamražení, které může hladinu neopterinu změnit. V případě, že má být neopterin stanoven ve žluči je vhodné žluč nejprve zředit 0,9% fyziologickým roztokem v poměru 1:11.

3.5. Normální hodnoty neopterinu

Hodnoty neopterinu v plasmě a séru se neliší a průměrně jsou 5, 2 +/- 2, 5 nmol/l. Normální hodnoty a horní meze (97, 5 percentil) vykazují určitou závislost na věku, což si vyžádalo rozdělení do třech věkových kategorií. Hodnoty neopterinu v likvoru jsou o něco menší než v séru či plasmě.

V první ranní moči je průměrná hladina neopterinu 1500 nmol/l a koncentrace kreatininu kolem 12 mmol/l. Proto jsou normální hodnoty poměru neopterin/kreatinin 125+/- 35 μ mol/l. Normální hodnoty a horní toleranční meze neopterinu v moči zdravých jedinců se liší v závislosti na věku a pohlaví.

Clearance kreatininu je podobná clearance neopterinu, takže poruchy ledvinných funkcí ovlivňují poměr neopterin/ kreatinin velmi málo. Na rozdíl od toho jsou hladiny neopterinu v krvi na funkci ledvin závislé velmi, neboť při renálních insuficiencích se neopterin hromadí v krvi a hodnoty neopterinu naměřené v séru či plazmě pacientů s renální insuficiencí jsou velmi vysoké (200 nmol/l a více). Pacienti s jasně zhoršenými funkcemi ledvin mohou vykazovat snížení i vylučování neopterinu a tuto skutečnost je nutno zohlednit.

Věk	Muži	97,5 %	Ženy	97,5 %
19-25	123 + 30	195	128 + 33	208
26-35	101 + 33	182	124 + 33	209
36-45	109 + 28	176	140 + 39	239
46-55	105 + 36	197	147 + 32	229
56-65	119 + 39	218	156 + 35	249
> 65	133 + 38	229	151 + 40	251

Tab. 1: Normální hodnoty neopterinu v tělních tekutinách (medián \pm standardní odchylka a 95. ev. 97,5. percentil). Neopterin v moči ($\mu\text{mol/mol}$ kreatinin).

Věk	Muži/ ženy	95 %
<19	6.8 + 3.6	13.5
19-75	5.3 + 2.7	8.7
>75	9.7 + 5.0	19.0

Tab. č. 2: Neopterin v séru (nmol/l)

Věk	Muži/ ženy	95 %
20-60	4.2 + 1.0	5.5

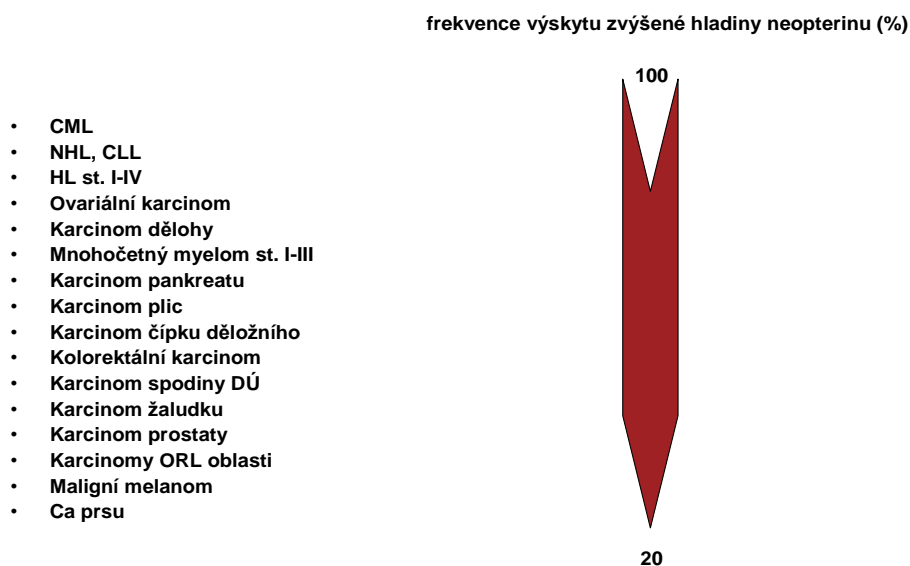
Tab. č. 3: Neopterin v likvoru (nmol/l):

3.6. Neopterin a maligní onemocnění

Zvýšená hladina neopterinu se vyskytuje prakticky u všech tumorů v závislosti na stadiu onemocnění. Neopterin je tvořen buňkami buněčné imunity, ne buňkami nádorovými, proto není tumorovým markrem v pravém slova smyslu. Aktivace T - buněk je vyvolána nejspíše maligně změněnými buňkami, vede k produkci cytokinů a aktivaci makrofágů a dendritických buněk a konečně k uvolňování neopterinu. Senzitivita měření hladiny neopterinu závisí velmi silně na lokalizaci tumoru.

Přibývají doklady o významu neopterinu jako prognostického faktoru onemocnění (*Melichar et al. 2006*), jako markeru při chemoterapii (*Melichar et al., 2007; Melichar et al., 2010*).

Neopterin u maligních onemocnění



Obr. č. 5 (podle www.neopterin.net): Výskyt neopterinu u maligních onemocnění

Téměř všichni pacienti s hematologickými malignitami mají hladiny neopterinu zvýšené výrazně, zatímco pacienti s karcinomem prsu mají koncentraci neopterinu v tělních tekutinách zvýšenou pouze nepatrně. Obecně však dochází u maligních onemocnění ke zvýšení hladiny neopterinu, tím větší, čím je stadium onemocnění vyšší, tzn. že čím je větší masa tumoru, tím vyšší je hladina neopterinu a tím vyšší je riziko progresu onemocnění. Proto

není neopterin důležitý ve screeningu maligních onemocnění, ale může být užitečným pomocníkem v odhadu prognózy a v kontrole po terapii (*Melichar et. al. 2006d*).

Signifikantní prognostická hodnota hladiny neopterinu změřená v plazmě, séru, moči či ascitu před zahájením terapie, byla zjištěna u pacientů s hematologickými a gynekologickými malignitami, ale i u karcinomu prostaty, plic, hepatocelulárního karcinomu a gastrointestinálních karcinomů u kožních lymfomů i maligního melanomu. V terapii karcinomů se ukazuje, že normalizace hladiny neopterinu může zamenat nekomplikovaný průběh onemocnění, zatímco neklesající či dokonce stoupající hladina může ukazovat na nekompletní regresi či progresi onemocnění. Z tohoto důvodu může neopterin sloužit při monitoringu chování onemocnění a zvýšená hladina pak může upozornit na nutnost provedení dalších vyšetření.

Zvýšená hladina neopterinu u různých onemocnění upozorňuje také na stav buněčné imunity v průběhu onemocnění.

Stejně tak u HIV infekcí dochází k asociaci mezi hladinou neopterinu a vznikem anémie či kachexie, které ukazují na roli inhibujících cytokinů v patogenezi těchto symptomů. Ty samé cytokiny, které jsou odpovědné za vznik neopterinu, se zdají být odpovědné i za vznik anémie a úbytku hmotnosti díky procesům odehrávajících se na úrovni centrálního nervového systému. Látková výměna neopterinu může být přímo spojena s maligními onemocněními a to interferencí s intracelulárními signálními drahami, které ovlivňují oxidační stres.

3.7. Vztah neopterin – tryptofan a maligní nádorová onemocnění

Důležitý je také vztah mezi tvorbou neopterinu a odbouráváním tryptofanu za pomoci enzymu indolamin – 2,3 – dioxygenázy (IDO), který byl zmíněn již v kapitole „IDO: více než enzym“. Oba enzymatické procesy jsou vyvolány v rámci buněčné imunitní odpovědi díky proinflatornímu cytokinu INF- γ .

Vzhledem k tomu, že u nádorových onemocnění však bývá imunitní systém poškozen, ztrácejí např. T- lymfocyty reakční schopnost. Tak je pochopitelné, proč zvýšená hladina neopterinu u pacientů s maligním onemocněním neznamena dobrou prognózu a dlouhodobé přežití ale naopak.

Mezi ostatními markery imunitní aktivace a zánětu je koncentrace neopterinu v séru a moči pacientů s různými typy nádorů jednoduše měřitelným biomarkerem a jeho hladina je zvýšena a může predikovat horší prognózu. Paralelně s růstem hladiny neopterinu, INF- γ indukuje enzym IDO v různých buňkách. IDO konvertuje esenciální aminokyselinu tryptofan na kynurenin v rámci nikotinamid-adenino dinukleotidové biosyntetické cesty. Jestliže je endogenní INF – γ v lidském organismu produkován, pak je zvýšena nejen koncentrace neopterinu, ale také tryptofanu. Posílení degradace tryptofanu a tím snížená koncentrace tryptofanu je taktéž detekovatelná v krvi pacientů s maligním onemocněním a je asociována se zhoršenou prognózou.

Jedna z cest úniku tumoru před imunitní obranou organismu je právě zvýšená konzumpce tryptofanu a vznik kynureninu pomocí IDO a IDO2 a TDO (tryptofan dioxigenáza). Kynurenin napomáhá inhibici aktivovaných T – lymfocytů (*Prendergast, 2011*).

Tryptofan je také prekursorem biosyntézy neurotransmiteru serotoninu = 5 – hydroxytryptaminu (5-HT), proto je snížení hladiny tryptofanu asociováno se sníženou produkcí serotoninu. U pacientů s kolorektálním karcinomem byla snížená hladina tryptofanu spojena se snížením kvality života (*Katz et al., 2008*). Snížení hladiny tryptofanu a depresivní symptomy byly pozorovány u pacientů, kterým byly aplikovány cytokiny (*Schrecksadel et al., 2004*). Tumory, které vyvolávají silnější imunitní odpověď, jak je pozorováno u zvýšené hladiny neopterinu, jsou odpovědné také za zvýšenou mortalitu. Snížení hladiny tryptofanu a tím vznikající neurotransmitterová disturbance může být podkladem pro zvýšený sklon k depresím u pacientů s těžšími formami karcinomů (*Murr et al., 2013*).

4. Karcinomy hlavy a krku

Karcinomy hlavy a krku jsou relativně častým zhoubným onemocněním. Uvádí se, že jsou osmou nejčastější malignitou v USA. Název celé skupiny pramení z topografické blízkosti jednotlivých struktur. Jedná se však o velmi heterogenní skupinu nejen histologicky, ale i biologickým chováním. Tomu pak odpovídá i management léčby, který je multimodální. U časných stádií je možné využít samostatně některou z lokálních terapií samostatně - chirurgickou léčbu či radioterapii. U lokálně či lokoregionálně pokročilých stádií, která

mohou být úspěšně řešena s kurativním záměrem, se kombinuje léčba lokální a to jak vzájemně, tak s léčbou systémovou. Používáme tedy buď léčbu chirurgickou s následnou radioterapií samostatnou či konkomitantní chemoradioterapií nebo pouze radioterapii kombinovanou s chemoterapií či biologickou léčbou a to nejčastěji konkomitantně. S rozvojem terapeutických možností nádorů hlavy a krku a s intenzifikací léčby, rostou i nežádoucí/ vedlejší účinky této léčby. Nežádoucí účinky jsou limitujícím faktorem onkologické léčby jako takové, karcinomy ORL oblasti nevyjímaje.

Přestože se léčba karcinomů hlavy a krku v posledních letech výrazně posunula kupředu, kombinují se léčebné modalita, velmi významně je při terapii nádorů ORL oblasti využívána podpůrná léčba, jsou výsledky léčby těchto nádorů neuspokojivé. V posledních třiceti letech nedošlo k žádnému zlepšení dlouhodobého přežití pacientů s pokročilým karcinomem ORL oblasti (*Chaturvedi, 2014*).

Do množiny nádorů hlavy a krku řadíme: karcinomy vedlejších dutin nosních, karcinomy dutiny nosní, karcinomy dutiny ústní, karcinomy rtu, karcinomy jazyka, karcinomy orofaryngu, hypofaryngu, laryngu a karcinomy slinných žláz. O karcinomech slinných žláz práci však o nádorech slinných žláz pojednáno nebude a to kvůli jejich odlišnostem od ostatních nádorů ORL oblasti.

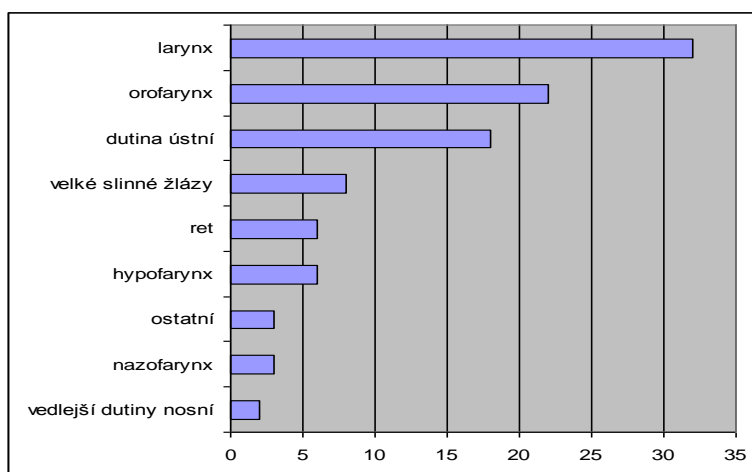
4.1. Epidemiologie karcinomů hlavy a krku

Karcinomy hlavy a krku jsou poměrně časté zhoubné nádory. Jedná se o šestý nejčastěji se vyskytující zhoubný nádor. Celosvětová roční incidence je 650 000 případů a mortalita 350 000 (*Argiris et al 2008*). V Evropě je incidence tohoto karcinomu 143 000 nových případů za rok a ročně na ně zemře 68 000 lidí (*Vermorken et al. 2010*). V České republice představují nádory hlavy a krku 2-3% všech zhoubných nádorů, což je méně, než udávají světové statistiky. Celková incidence karcinomů hlavy a krku v ČR se v posledních letech tj. od roku 1999 příliš nemění. Avšak u karcinomy tonsily pozorujeme výrazný nárůst i od zmiňovaného roku 1999 – viz příloha 1. K nejčastěji hlášeným zhoubným nádorům ORL oblasti patří karcinomy laryngu, orofaryngu a dutiny ústní (viz graf 1). Naopak podle některých zdrojů je ve světě v posledních letech zaznamenán signifikantně vyšší počet zhoubných o nemocnění hlavy a krku (*Braakhuis et al, 2009*).

Muži jsou maligní chorobou této lokality postiženi dva až osmkrát častěji než ženy. Podle údajů NOR (Národní onkologický registr) je v ČR postiženo čtyřikrát více mužů než

žen. U některých typů nádorů je poměr výraznější například u karcinomu laryngu (viz příloha 1). Vrchol incidence karcinomu laryngu je stejný jako u karcinomy hypofaryngu a to mezi 50. – 54. rokem věku. Křivka hrubé incidence se však zvedá od 39. roku věku. Karcinom tonsil zaznamenává trvale stoupající incidenci jak u mužů, tak u žen, byť v mužské populaci je jeho výskyt častější. Vrchol jeho vzestupu je ve věkové skupině 55 - 59 let (viz příloha 1).

Oproti tomu karcinomy nazofaryngu se vyznačují odlišnou epidemiologií (i etiologií). V naší republice je jeho výskyt poměrně malý. Nejvyšší výskyt karcinomu nazofaryngu je v jihovýchodní Asii, nejvíce v Číně. Jeho incidence je však opět vyšší u mužů než u žen. Věková křivka výskytu má dva vrcholy: první mezi 50. – 54. rokem věku a druhý mezi 65. a 69. rokem věku (viz příloha 1). Karcinom nazofaryngu často postihuje i mladé lidi, dokonce i děti do pěti let.



Graf č. 1.: Relativní incidence zhoubných nádorů ORL oblasti v ČR v roce 1999 (v %), zdroj www.uzis.cz

Smutnou skutečností je, že i přes zdokonalující se diagnostické možnosti těchto karcinomů se jich stále velké množství vyskytuje ve stadiu III a IV, to znamená ve stadiu pokročilém lokálně, lokoregionálně či dokonce jako onemocnění metastatické. (viz přílohy 1).

4.2. Etiologie karcinomů hlavy a krku

Etiologie nádorů ORL oblasti je poměrně dobře známa a je velmi pestrá, byť podíl abusu alkoholu a/ nebo kouření na vzniku ORL nádorů se odhaduje na 85 - 90%. Dnes však k významným etiologickým faktorům řadíme také HPV (human papiloma virus).

Kouření

Nejzávažnějším rizikovým faktorem pro vznik nádorů hlavy a krku je beze sporu kouření. Nejde jen o kouření cigaret, ale také doutníků a fajfky. Etiologicky se na vzniku karcinomů hlavy a krku podílejí i jiné formy konzumace tabáku než jen kouření cigaret, ale také jeho žvýkání či šňupání.

Patogeneticky se jedná o chemickou kancerogenezi způsobenou kancerogenními produkty tabákového kouře. Diskutuje se i chronickém tepelném dráždění, změně pH sliznic, chronické mechanické dráždění částicemi tabáku, o vazokonstrikci, kterou způsobuje nikotin atd.

Alkohol

Dalším významným a zřejmým a častým rizikovým faktorem je alkohol, přestože mechanismus jeho působení na vznik nádorových změn není zcela jasný. Nejedná se však pouze o jeho lokální působení, protože konzumace alkoholu má vliv na vznik např. i karcinomu laryngu, kde s ním sliznice do styku nepřicházejí. Riziko vzniku karcinomu není závislé na koncentraci alkoholu, ale na jeho celkovém pozřeném množství v průběhu života. S největší pravděpodobností se jedná o vliv alkoholu na celkový stav pacienta. Byl prokázán synergní účinek alkoholu a kouření, který lze vysvětlit tím, že alkohol funguje jako rozpouštědlo kancerogenů obsažených v cigaretovém kouři.

UV záření

Mezi další etiologické faktory patří UV záření (karcinom rtu), ionizující záření (karcinomy slinných žláz, zejména epidermoidní karcinomy).

Virové infekce

Mezi etiologické faktory nádorů ORL oblasti řadíme také virové infekce- HPV, který je v centru zájmu vědců a dalších odborníků v posledních letech a již dlouho známý EBV.

HPV (human papiloma virus)

Jako etiologický faktor je HPV znám dlouho u nádorů čípku děložního a u análního karcinomu. V posledních letech je však zřejmé, že se tento virus uplatňuje i při vzniku nádorů oblasti hlavy a krku.

Zejména u karcinomů orofaryngu - tj. u karcinomů tonzil a kořene jazyka - se uplatňuje lidský papilomavirus HPV 2, 11, 16. Největší význam je připisován v patogenezi nádorů ORL oblasti HPV -16. HPV byl zjištěn u karcinomů orofaryngu přibližně v 80 % . Zřejmý vliv HPV na vznik i u nádorů jiných ORL oblastí např. dutiny ústní a laryngu.

Předpokládá se přenos HPV při orálním sexu. Nutné je však dodat, že existují práce, které tento předpoklad nepotvrzují.

EBV (Epstein – Barrové virus)

Odlišná je etiologie karcinomu nazofaryngu, kde se uplatňuje jako etiologický faktor Epstein – Baarové virus (EBV) a uvažuje se i o jiných vlivech např. o dietních návycích (požívání slanných ryb).

Imunosuprese

Imunosuprese včetně HIV a AIDS je etiologickým faktorem vzniku karcinomů obecně.

Dlouhodobě je navozována imunosuprese podáváním imunosupresiv po orgánových transplantacích k zamezení odhojení štěpu. Transplantačních operací v poslední době přibývá. Ve studii 905 pacientů, kteří byli po transplantaci srdce či plic bylo riziko vzniku karcinomu 7,1 krát vyšší než u běžné populace. Karcinomy hlavy a krku byly pozorovány jako druhé nejčastější maligní onemocnění vznikající v této populaci. Riziko jejich vzniku je 21 krát větší. Nejčastějšími nádory vznikajícími podáváním imunosupresiv jsou hematologické malignity, u nichž je riziko vzniku 26,2 krát vyšší než v běžné populaci (*Roithmaier et al., 2007*).

Nelze přehlížet ani míru dlouhotrvajícího stresu jinak zdravých jedinců (xx).

Malnutrice

Malnutrice a typ diety může být jedním z nejzávažnějších rizikových faktorů. Typ diety a systém výživy je záležitostí nejen kulturní, ale i socioekonomickou. Kromě toho jsme výživě „exponováni“ od svého narození, proto je „zátěž“ výživou dlouhodobou záležitostí. Zcela otevřeně se dnes hovoří o nutričních kancerogenech. Mezi genotoxické nutriční

kancerogeny (mikrokomponenty) řadíme heterocyklické aminy, nitrity i nitráty, mykotoxiny (aflatoxin B) a také výše zmíněný alkohol. Mezi negenotoxické nutriční kancerogeny (makrokomponenty) zařazujeme zvýšený příjem energie, zvýšený příjem živočišných tuků a kuchyňskou sůl (NaCl).

U karcinomů ORL oblasti se uvádí jako rizikový faktor i hypovitaminóza A, E, C a vitamínů B. Nízká hladina karotenoidů a tokoferolu je rizikovým faktorem pro vznik nádorů horních dýchacích a polykacích cest (*Nomura, 1997*).

Jako jeden z rizikových faktorů pro vznik nazofaryngeálního karcinomu v jihovýchodní Asii se například uvádí vysoká konzumace solených ryb. To, že dietní vlivy mají vliv na vznik nádorů, je nesporné. Dokládají to epidemiologické studie o výskytu nejen nazofaryngeálního karcinomu Číňanů, kteří se přesídlili do severní Ameriky, a jimž tímto přestěhováním významně klesla pravděpodobnost vzniku tohoto onemocnění, byť se ovšem nedostává na úroveň bělochů žijících v severní Americe. Proto není možné tvrdit, že dietní faktory jsou jediným etiologickým činitelem zapříčiňujícím vznik nazofaryngeálního karcinomu. Další významná studie dokládá naopak zvýšení rizika vzniku karcinomu prsu; japonských žen, které se přestěhovaly do USA z Japonska. Zde se předpokládá zvýšení expozice těchto žen dietě obsahující zvýšené množství převážně živočišných tuků.

Věk

Dalším rizikovým faktorem pro vznik karcinomů ORL oblasti je věk. Ve vyšším věku se pravděpodobnost vzniku karcinomu ORL oblasti zvyšuje. Od 40. roku věku vzrůstá pravděpodobnost vzniku tohoto karcinomu.

Pohlaví

Muži mají větší pravděpodobnost výskytu ORL nádorů větší než ženy.

Rasa

Větší pravděpodobnost vzniku maligních nádorů ORL oblasti mají černoši oproti bělochům.

Malhygiena dutiny ústní

Předpokládá se, že i nedostatečná péče o zuby, dásně a dutinu ústní jako takovou může být rizikovým faktorem pro vznik karcinomu ORL oblasti.

Expozice vnějším vlivům

Riziko vzniku karcinomu ORL oblasti zvyšuje expozice některým chemickým látkám, výparům barev a laků, dřevěným pilinám a dřevěnému prachu a azbestu.

Gastroesofageální a laryngofaryngeální reflex

Reflux žaludečních kyselin do horních cest dýchacích a polykacích a do trachey je považován za rizikový faktor pro vznik karcinomů hlavy a krku.

Prekancerózy

Výskyt prekanceróz v ORL oblasti zvyšuje pravděpodobnost vzniku maligního nádorů této oblasti. Mezi prekancerózy patří leukoplakie či erytroplakie - bílé či červené afekce na sliznicích. V karcinomu se leukoplakie změní asi v 5% případů, zatímco tzv. verukózní leukoplakie je považována za iniciační stadium verukózního karcinomu, stejně tak je nutné vyšetřit histologicky erytroplakii, neboť se častěji může jednat již o karcinom (*Kufer, 2002 a Hellquist 1999*).

Rodinná zátěž

Výskyt karcinomu ORL oblasti u některého z přímých příbuzných může lehce zvýšit riziko výskytu tohoto typu karcinomu.

4.3. Prevence karcinomů hlavy a krku

Karcinomy hlavy a krku nejsou sice zahrnuty do preventivních programů zdravotních pojišťoven, přesto je jejich prevence možná a není nedostupná ani nákladná.

4.3.1. Primordiální a primární prevence

Jak primordiální, tak primární prevence si klade za cíl zabrzdit či snížit výskyt onemocnění a to buď zabráněním vzniku zvýšených rizik (primordiální prevence) nebo odstraněním již vzniklých rizikových faktorů (primární prevence). Oba typy prevence se týkají celé populace popřípadě jejích vybraných skupin například skupin obyvatelstva, které jsou exponovány vyššímu riziku, ale nenesou ještě známky onemocnění. Do postupů *primordiální prevence* patří utváření optimálních životních podmínek – správné stravy,

udržování zdravého životního prostředí, dodržování přiměřené tělesné aktivity, relaxace, boj proti stresu, nekouření či neužívání jiných drog včetně alkoholu. Efektivita tohoto stupně prevence se zvyšuje uplatňováním všech výše zmíněných zásad již od útlého dětství. Do postupů *primární prevence* patří změna režimových opatření nebo medikace. Jde hlavně o snížení rizikových vlivů a zvýšení působení projektivních vlivů. Jde o prevenci týkající se opět životního stylu a motivací jedince.

V těchto fázích prevence je nutné stále informovat a edukovat širokou veřejnost o zdravém životním stylu, o škodlivém vlivu alkoholu, kouření a dalších drog apod. Úspěch této formy prevence tkví v proaktivním a aktivním přístupu jedince a jeho zodpovědnosti vůči sobě, svým blízkým, svému okolí jako takovému.

U karcinomů hlavy a krku patří do tohoto typu prevence nekouřit ani jinak neužívat tabákové výrobky, vyvarovat se většímu množství alkoholu, dodržovat správnou výživu – dodržování Středomořské diety s vysokým příjmem citrusů, zeleniny, hlavně rajčat, olivového a rybího oleje tzn ω -3-nasycených mastných kyselin (SIGN, 2006), dodržovat zásad správné hygieny dutiny ústní a dodržovat doporučená preventivní opatření „zdravého“ sexu.

4.3.2. Sekundární prevence

Sekundární prevence má za úkol bránit progresi asymptomatického či časného stadia onemocnění. Skupinou, které se tento typ prevence týká, jsou pacienti s časnými – zde míněno subklinickým- stádii onemocnění popřípadě s prekancerózami. Mezi nejdůležitější metody sekundární prevence patří včasná detekce onemocnění pomocí *skriningových programů nebo preventivních prohlídek*. I v této fázi prevence je nutná spolupráce s jedincem, kterou je možno zajistit dobrou informovaností veřejnosti a znalostí vlastních rizikových faktorů jedince a v neposlední řadě i časných příznaků onemocnění. Přesto však intervenční opatření v sekundární prevenci jsou doménou lékařů.

Přestože karcinomy ORL oblasti v ČR nespadají do skriningových programů, není obtížné u rizikových jedinců vyšetření ORL oblasti provést. ORL vyšetření je jednoduché, nezatěžující a pro ORL nádory velmi často dostačující, neboť většina nádorů této oblasti vzniká povrchově ve sliznicích. Při nejistotě lze pak doporučit vyšetření endoskopické v celkové narkóze.

Jiný přístup k sekundární prevenci nádorů ORL oblasti by měl být v endemických oblastech výskytu tohoto typu nádoru – například v jihovýchodní Asii, kde je vysoký výskyt karcinomu nazofaryngu.

4.3.3. Terciární prevence

Terciární prevence si klade za cíl zabránit progresi onemocnění, omezení recidiv, zabránění ztrátě soběstačnosti či jinému postižení jedince. Tento typ prevence je zaměřen na pacienty, kteří již absolvovali léčbě. V případě nádorů ORL oblasti se jedná o *poléčebnou rehabilitaci*, která by měl pacienta vrátit do stavu, který se blíží stavu před léčbou. U většiny pacientů je nemožné navrácení do stavu, ve kterém byli před zahájením onkologické léčby. Další metodou terciální prevence je *poléčebné sledování* (follow up), které je prováděno podle stanoveného protokolu a o kterém je pojednáno v další části této práce. Tato část prevence patří sice do rukou lékařů- specialistů, nicméně i v této fáze prevence se samozřejmě pracuje mnohem lépe s poučeným jedincem, který terciární prevenci vnímá jako důležitou součást svého léčebného plánu.

4.3.4. Kvartérní prevence

„Kvartérní prevence znamená předvídání a předcházení důsledkům progredujících a nevyлéčitelných nádorových onemocnění, které mohou zkracovat zbytek života nebo snižovat a jeho kvalitu“ (Skála, 2005). Ve zkratce řečeno: Jde tedy o dobrou paliativní péči a o zajištění její dostupnosti pro všechny pacienty. Kvartérní prevence zahrnuje i hospicovou péči, která by měla být dostupná pacientům v terminální fázi onemocnění. Kvartérní prevence se týká poměrně početné skupiny pacientů s nádory ORL oblasti, jejichž onemocnění bylo nalezeno v metastatickém stadiu onemocnění, nebo pacientů, u kterých selhaly dostupné metody léčby, a u nichž došlo k progresi onemocnění či jeho recidivě.

Kvartérní prevence je tedy nezanedbatelnou součástí péče o onkologicky nemocné.

4.3.5. Chemoprevence

V chemoprevenci používáme farmakologické nebo přirozené látky k zastavení a potlačení již započatého nádorového procesu. U karcinomů hlavy a krku v tuto chvíli chemoprevence význam nemá. Doposud nebyl nalezen přípravek, který by odpovídal požadavkům spojeným s chemoprevencí, která musí být dlouhodobá – mnohdy po celý život, neboť po skončení jejího užívání končí také její ochranný efekt. To jsou důvody, pro které je hledán preparát bezpečný, netoxický. S rozvíjejícími se znalostmi o molekulární biologii a

imunologii nádorů hlavy a krku je možné, že se podaří takový preparát nelézt. Možná také díky cíleným biologickým preparátům bude možné lépe bránit rozvoji rekurencí i sekundárních primárních nádorů.

4.4. Molekulární biologie a genetika karcinomů hlavy a krku

Výsledky molekulární biologie a genetiky, identifikace tumor supresorových genů, onkogenů a proto-onkogenů podávají důležité informace o biologické iniciaci, progresi a chování těchto nádorů a mohou se stát důležitými prognostickými i prediktivními faktory.

Nový pohled na karcinomy hlavy a krku přineslo zjištění, že se na vzniku tohoto onemocnění může podílet HPV. Nádory hlavy a krku se tedy dělí na dvě velké skupiny: **HPV pozitivní a HPV negativní nádory**. Z hlediska molekulární biologie jsou tyto dvě skupiny *zcela různé entity*, které se odlišují nejen příčinou vzniku, molekulárně biologickými charakteristikami, ale také klinickými charakteristikami a svou prognózou. Přes tyto rozdíly obou skupin, je stále jejich terapie stejná. Uvažuje se však o tom, a některé studie to dokládají, že HPV+ nádory budou moci být léčeny méně intenzivně.

V poslední době ubývá HPV – a přibývá HPV+ karcinomů. Úbytek HPV- je nejspíše dán sníženou konzumací tabákových výrobků. Zda nárůst HPV+ nádorů je způsoben snížením kouření či změnou sexuálního chování nebo tím, že se HPV v nádorech ORL oblasti více vyšetřuje, není zatím zcela jasné.

Posun ve znalostech molekulární biologie nádorů hlavy a krku dovoluje další dělení obou skupin - *z hlediska molekulární biologie lze říci, že existuje pět skupin karcinomů hlavy a krku*. V HPV negativní skupině nalézáme další tři podskupiny a v HPV pozitivní skupině nalézáme dvě podskupiny. Tyto skupiny mohou mít prognostickou sílu a v následujících letech by mohly mít dopad i na výběr léčebných postupů. V současnosti se zdá, že v HPV - skupině jde o změny v buněčném cyklu, amplifikace EGFR, zatímco HPV+ skupina nádorů je způsobena imunitními reakcemi a imunitnímu modulacemi (Cohen, 2014).

V souvislosti s karcinomy hlavy a krku se nejčastěji hovoří o mutacích p53 a p16. Ale vedle poškození či inaktivace Notch kinázové signální dráhy, má 25-30 % nádorů hlavy a krku amplifikovaný cyklin D1, přes 20% těchto nádorů má alteroavanou signální transdukční kinázovou dráhu PI3, delece v genu PTEN nebo mutace v PIK3CA. Zhruba v 10% je mutovaná dráha RAS. V případě karcinomů hlavy a krku je to však HRAS (KRAS je mutována u kolorektálních karcinomů).

4.4.1. HPV pozitivní karcinomy (HPV+)

HPV + karcinomy vznikají na podkladě dvou virových onkogenů, které inaktivují tumor supresorový gen. Tím dochází k maligní transformaci v dlaždicovém epitelu. Velmi často dochází k inaktivaci genu Rb (*deVita et al. 2001*).

HPV status je spojen s expresí p16. V HPV + karcinomech nalézáme méně mutací a delecí a to převážně v p53, což je tumor supresorový gen. Pro HPV + karcinomy je příznačná mutace PIK3CA tak, že PI3- kinázová signální dráha je vysoce aktivovaná.

Přestože HPV+ nádory dorůstají větších rozměrů a častěji metastazují do lymfatických uzlin a vyznačují se horší diferenciací. Přesto mají lepší prognózu než HPV-.

4.4.2. HPV negativní karcinomy (HPV-)

HPV – karcinomy vznikají postupnou mutací a transformací dlaždicového epitelu, která čítá několik kroků od normálního dlaždicového epitelu, přes dlaždicobuněčnou hyperplasii, mírnou dysplazii – SIN 1 (skvamózní intraepiteliální neoplázie), středně těžkou dysplazii – SIN 2, těžkou dysplazii – SIN 3, po carcimoma in situ SIN 3 až k invazivnímu karcinomu (*Vermorken et al., 2010; Huret et al., 2014*).

Nově se u této skupiny nádorů ukazuje význam Notch signální. Tato dráha hraje významnou úlohu v diferenciaci buněk a u této skupiny nádorů je inaktivována. Dále můžeme pozorovat mutace a delece v kritických genech inaktivované Notch signální dráhy. Přesný význam této inaktivace však ještě neznáme, je možné, že dochází k ovlivnění okolí buněk a pak následují další alterace, které mohou zapříčinit vznik nádoru (*Cohen, 2014*).

Obecně, v HPV- nádorech, jejichž vznik byl vyvolán tabákovým kouřem, nalézáme vysoký podíl mutací p53 a p16.

HPV- mají prognózu horší než HPV+. Proto se v poslední době v odborných kruzích více diskutuje o tom, jak tento negativní efekt překonat.

4.4.3. EGFR (epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor)

EGFR je transmembránový glykoprotein, který bývá overexprimován u 80-90% epidermoidních nádorů ORL oblasti. Skládá se z domény extracelulární, na kterou jsou ligandy navazovány, z transmembránové lipofilní domény a intracelulární proteinkinázové domény. Po navázání ligandu dochází k dimerizaci receptorů, aktivaci protinové kinázy a

autofosforylaci tyrozinu. Tím je spuštěna kaskáda biochemických dějů, které jsou součástí signální transdukční dráhy (Baselga, 2001) Rodina EGFR (erb-B) je složena ze čtyř receptorů – EGFR nebo HER-1 (erb-B1), HER -2 (erb-B2/neu), HER 3 (erb-B3) a HER-4 (erb-B4). Na EGFR se váže více ligandů- EGF, TGF – α , amfiregulin, neuregulin. Efektorem EGFR je signální dráha RAS a PI3K (Cojocariu et al., 2007). EGFR je negativním prognostickým faktorem.

4.4.4. Molekulární biologie a genetika progredujících karcinomů hlavy a krku

Na progresi tohoto onemocnění se podílejí, popřípadě spolupodílejí některé chromozomální alterace (Marur et al., 2008). Důležitá je pochopitelně i posloupnost v jaké k jednotlivým změnám dochází.

Velmi významná je **LOH** (loss of heterozygocity) některých chromozomů- 3p14, 9p21, 17p13, 8p, 6p, 11q, 13 g, 14 q 10q23, 4q27. Tumor supresorový gen p53 je uložen na 17p13, dojde – li k LOH v tomto locusu, dochází k inaktivaci tohoto genu a progresi onemocnění, stejně tak na 8pa 6p jsou lokalizovány geny suprimující tumor (Califano et al., 1996). Mezi nejčastější genetické odchylky patří LOH 9p21, čímž je inaktivován gen p16, který inhibuje cyklin dependentní kinázu (CDK), která reguluje buněčný cyklus (Forastiere et al. 2001).

Mezi další genetické alterace, které progresi způsobují, řadíme **amplifikace, delece, up regulace nebo down regulace** receptorů, oncogenů či tumor supresorových genů – EGFR, p53, Rb, p65, COX-2, p16, cyklin D, PTEN (Vermorcken et al. 2010, Califano et al. 1996).

4.6. Histopatologie nádorů ORL oblasti

O histologické stavbě ORL nádorů se obtížně pojednává v jedné kapitole, neboť jde o heterogenní skupinu nádorů. Histologická stavba ORL nádorů je závislá na místě vzniku. V 90-95% se však jedná o dlaždicobuněčné karcinomy (epidermoidní karcinomy, spinocelulární karcinomy, SCC) vycházející z horních partií polykacích a dýchacích cest. SCC se vyskytují v různých stupních diferenciaci, kterým odpovídá různý stupeň keratinizace těchto nádorů. Nejčastější jsou konvenční SCC a nejčastější morfologickou jednotkou SCC je ulcerativní typ (Šlampa et al. 2007). Mezi varianty spinocelulárních karcinomů řadíme

varukózní karcinom i sarkomatoidní (vřetenobuněčný) SCC (*Barnes et al. 2007; deVita et al. 2001*), přičemž každý má jinou prognózu. Dalšími variantami SCC jsou basaloidní, papilární, acyntolytický a adenoskvamózní karcinom (*Huret et al, 2014*).

Mimo spinocelulární karcinomy jsou v této lokalitě diagnostikovány *adenokarcinomy, adeniodněcystické karcinomy, mukoepidermoidní karcinomy, sarkomy, lymfomy, teratomy, estesioneurolblastom* v dutině nosní atd.

4.7. Příznaky ORL nádorů

Příznaky ORL nádorů jsou velmi rozmanité a závisí na uložení nádoru, jeho vztahu k okolí a na jeho velikosti. Obecně platí, že časná stádia onemocnění mohou být bezpříznaková, pokročilá stádia onemocnění jsou provázena i systémovými příznaky jako je nechutenství, úbytek hmotnosti, únava, teplota, anemizace. Lokální příznaky pak variují v široké škále – hmatná či viditelná rezistence na krku, bolesti, dysfagie, hemoptýza, chraptot, dysfonie až afonie, otalgie, neprůchodnost nosní, pocit cizího tělesa v krku, inspirační dušnost či příznaky postižení hlavových nervů.

4.8. Diagnostika

V diagnostice nádorů hlavy a krku hraje důležitou úlohu **anamnéza** i základní fyzikální vyšetření - **aspekce**, při které zjišťujeme asymetrie obličeje, krku i jazyka, pohyblivost jazyka, viditelné rezistence či útvary na krku, rtech, v dutině ústní i na jazyku, tonzilách. **Palpací** posoudíme velikost, konzistenci, pohyblivost či fixaci rezistence.

4.8.1. Endoskopické metody

Nepřímá laryngoskopie se používá při vyšetření tonzil, kořene jazyka, hrtanu a hypofaryngu. Posuzují se slizniční změny, ulcerace, hybnost hlasivek, symetrie vyšetřovaných oblastí, zda jsou volné piriformní recesy a zda v nich nedochází ke stagnaci slin. Většina pacientů toto vyšetření zvládá bez anestezie, některým pacientům je nutné aplikovat lokální anestezii, ve výjimečných případech dokonce anestezii celkovou. Při nejasném nálezů se doplňuje vyšetření zvětšovací laryngoskopem. K odlišení benigních změn od časných

karcinomu na hlasivkách je vhodné použít **stroboskopické vyšetření**, kterým lze posoudit kmitání hlasivek.

Při podezřelém nálezu, je potřeba provést odběr **biopsie**. Přesnější odběr materiálu z míst, která jsou hůře přístupná, se provádí za použití **přímé laryngoskopie** v celkové anestézii. Vyšetření nosní sliznice a nazofaryngu se provádí **přední a zadní rhinoskopií** a event. se doplňuje o vyšetření **rigidním rhinoepifaryngoskopem**.

V případě dysfagií či nálezu v hypofaryngu, piriformním recesu či při stagnaci slin, je možné vyšetření doplnit o **rigidní hypofaryngoezofagoskopie**.

Bronchoskopie je rezervována pouze pro specifické případy, v rutinním vyšetření ORL nádorů nemá význam.

4.8.2. Zobrazovací metody

Sonografie lze využít jako nezatěžující a spíše orientační vyšetření krčních uzlin, štítné žlázy či slinných žláz. Není vhodné jako vyšetření stagingové. Při dysfagických obtížích či pozitivním nálezu v horních polykacích cestách, je možné využít **rtg vyšetření polykacího aktu**.

Preferovaným vyšetřením pro všechny ORL nádory je **MRI** vyjma laryngálních a hypofaryngálních nádorů (*Grégoire et al., 2010*) kvůli vyšetření nazofaryngu je důležité provést MRI včetně baze lebni (*Chan et al., 2012*). Používané je také **CT** vyšetření, není však doporučováno používat ho pro vyšetření lymfatických uzlin k určení extrakapsulárního šíření (*Chai et al., 2013*).

Kvůli odhalení vzdálených metastáz či sekundárních primární tumorů je doporučováno rutinně provádět **rtg plic** a **CT plic**.

Pacientům, u nichž jsou objeveny pozitivní lymfatické uzliny na krku a není možné nalézt primární nádor, je doporučován **CT – PET**. Stejně tak pacientům s rekurentními tumory a to z důvodů diagnostiky vzdálených metastáz (*SIGN, 2006*).

4.8.3. Získání bioptického materiálu

Odběr bioptického materiálu je pro diagnostiku a léčbu zcela nezbytným krokem. Provádí se podle místa odběru buď v lokální či celkové anestézii buď pod kontrolou zraku – dutina ústní, nebo s využitím endoskopických metod. Možné je provést excizi či exstirpaci

lymfatické uzliny nebo využít aspiračního cytologického vyšetření při odběru tenkou jehlou za kontroly UZ – FNAB či FNAC (fine needle aspiration biopsy/ cytology).

V rámci vyšetřování by měly být provedeny laboratorní testy – krevní obraz, biochemické vyšetření. Vyšetření nádorových markerů nemá u SCC ORL oblasti význam.

4.9. TNM systém

Pro karcinomy ORL oblasti je užívána v Evropě TNM klasifikace zhoubných nádorů, v severní Americe AJCC staging system, který v podstatě z TNM klasifikace vychází. Oba systémy procházejí v čase revizemi a filozofie obou je stejná. Cílem jejich použití je zařadit nádor do klinických stádií na základě provedených vyšetření. Po zařazení nádoru do klinického stadia spolu s dalšími faktory týkajícími se pacienta je volena onkologická léčba. Stadium choroby je také jedním z prognostických faktorů a slouží k hodnocení odpovědi na léčbu (*Sobin et al. 2007; Edge et al., 2010*,).

Oba systémy k zařazení do stádií využívají: velikost nádoru -**T**, počet a velikost postižených spádových lymfatických uzlin -**N**, přičemž dalším důležitým ukazatelem je, zda jsou lymfatické uzliny postiženy unilaterálně či bilaterálně a přítomnost vzdálených metastáz – **M**.

U karcinomů hlavy a krku je vytvořen TNM systém pro jednotlivé ORL oblasti. Není předmětem této práce, uvádět zde TNM klasifikace všech. Obecně lze říci, že stadiem I/II jsou označovány časně nádory, stadia III a IVA, IVB jsou označována podle postižení lymfatických uzlin jako lokálně pokročilá (N0) nebo lokoregionálně pokročilá (N+). U těchto stádií se uvažuje o léčbě kurativní. Jsou – li nalezeny vzdálené metastázy, jsou nádory řazeny do stadia IVC a volena je léčba paliativní.

4.10. Prognostické faktory

Diagnóza, prognóza a léčba jsou základem onkologické péče. Prognostické faktory jsou klinické nebo biologické znaky či markery, které lze objektivně měřit a které přinášejí informace o přežití pacientů bez ohledu na léčbu (*Italiano, 2011*). Na základě nich je možné prohlásit, jaké je riziko vzniku vzdálených metastáz či lokálního relapsu. Tato úvaha např.

vede k podání adjuvantní terapie. Vzhledem k tomu, že ORL nádory jsou heterogenní skupinou, neexistují pro ně zcela jednotné prognostické faktory

Mezi prognostické faktory pro karcinomy hlavy a krku patří **faktory týkající se nádoru** – klinické, histologické a **faktory týkající se pacienta a faktory okolí** (Gospodarowicz *et al.*, 2003).

Množství lymfocytů CD3+ a CD8+ infiltrujících tumor (TILs) pozitivně koreluje s přežitím pacientů po léčbě chemoradioterapií pro karcinom hlavy a krku (Balermipas *et al.*, 2013).

4.10.1. Prognostické faktory týkající se nádoru

Klinické prognostické faktory

Obecně je klinickým prognostickým faktorem **TNM klasifikace**. **Velikost nádoru**- má vliv např. u karcinomů orofaryngu, zatímco u karcinomu hypofaryngu jsou rozdíly mezi skupinami T1-2 a T3-4 malé, přesto v jedné studii mezi těmito skupinami byly nalezeny rozdíly ve třiletém přežití. (Cojocariu *et al.*, 2009). Jiné studie však ukazují skupinu T0-3 jako prognosticky příznivou bez ohledu na stav uzlin (Brockstein *et al.* 2004). **Stav postižení lymfatických uzlin** - je velmi precizním prognostickým markerem (Grandis *et al.*, 1998). Prognóza onemocnění se zhoršuje s *přibývajícím počtem lymfatických uzlin* (Cojocariu *et al.*, 2009). Špatným prognostickým faktorem je také *extrakapsulární šíření* (Langendijk *et al.*, 2005; de Carvalho *et al.*, 1998). **Lokalizace primárního tumoru** je prognostickým faktorem s velkou signifikancí, souvisí i s rizikem vzniku regionálních či vzdálených metastáz. V tomto směru je nebezpečnější např. karcinom kořene jazyka než endolaryngu (Cojocariu *et al.*, 2009)..

Histologické a molekulární prognostické faktory

Důležitým prognostickým (i prediktivním faktorem) je **grading tumoru** -stupeň diferenciacce. Sarkomatoidní varianty SCC mají prognózu špatnou, naopak verukózní dobře diferencované SCC jsou prognosticky příznivé (Cojocariu *et al.*, 2009). **Úzký či pozitivní resekcční okraj**, který je AJCC a UICC definován jako nádorem zasažený, zatímco NCCN, ASCO a IEO ho defíhují jako okraj užší než 5 mm bez ohledu na lokalizaci tumoru, což je definice v ČR přijímaná nejčastěji. Review provedených studií však ukazuje na to, že úzký resekcční okraj by měl být definován pro různé lokality ORL: méně než 1 mm pro larynx, méně než 5 mm pro dutinu ústní a méně než 4 mm pro orofarynx (Alicandri-Ciuffelli, 2012).

Příznivým prognostickým faktorem i u rekurentních a metastatických nádorů je **HPV+** (Argiris et al., 2014), zatímco **overexpresse EGFR** je negativním prognostickým faktorem (Grandis et al., 1998). Některé studie však prokazují možnost překonání negativního prognostického efektu v případě, že byla u lokálně pokročilých karcinomů použita chemoradioterapie (Numico J et. al, 2010). Studie ukazují na interakce mezi stavem HPV a expresí EGFR nebo signální dráhou nebo obojím (Young et al., 2011; Vermorken et al., 2010). **Mutace p53** je tumor supresorový gen zapojený regulace buněčného cyklu a apoptózy a je prognostickým faktorem.

4.10.2. Prognostické faktory týkající se pacienta

Kouření v anamnéze je negativním prognostickým faktorem (Brockstein et al, 2005), **performance status** je dalším prognostickým faktorem, stejně jako **nutriční stav, úbytek hmotnosti a přidružená onemocnění pacienta**, které omezují možnosti léčby (Bourhis, 2005). **Tracheostomie** zavedená u karcinomů laryngu pro dechovou nedostatečnost je negativním prognostickým faktorem (MacKenzie, 1997).

4.10.3. Prognostické faktory vycházející z okolí

Na prognózu onemocnění má velký vliv zvolená léčba i její provedení. Silným prognostickým faktorem je **institute**, ve které léčba proběhla (Brockstein et, 2005, Pála et al. 2012).

4.11. Prediktivní faktory

Prediktivní faktor je biologický či klinický znak tumoru, který informuje o tom, zda bude mít daná léčba efekt.

V současné době nejsou k dispozici žádné kvalitní biomarkery popřípadě biomarkery, pomocí nichž bychom byli schopni určit, zda z daného léčebného postupu bude mít pacient benefit či nikoli.

Ještě před několika lety se předpokládalo, že **overexpresse EGFR** může predikovat odpověď na cílenou biologickou terapii, dnes je jasné, že tomu tak není, nicméně se zdá, že je

predátorem horší odpovědi na radioterapii (Goerner et al, 2012). V dohledné době by měl být k dispozici krevní test (VeriStrat) pracující na podkladě proteomiky, který by měl být schopen detekovat pacienty, kteří nemají benefit z léčby EGFR inhibitory a který byl testován u NSCLC (Carbone et al, 2012) i u karcinomů hlavy a krku (Cohen, 2014). Zdá se, že nádory s mutací PI3-kinázové signální dráhy nebo mutací RAS (podobně jako KRAS u kolorektálního karcinomu) nereagují na léčbu inhibitory EGFR. Také není jasné, zda nádory hlavy a krku s mutacemi v PI3-kinázové signální dráhy – většinou HPV+, budou dobře odpovídat na léčbu inhibitory této dráhy. TILs CD3+ a CD8+ mohou predikovat účinnost definitivní chemoradioterapie u ORL nádorů (Balermipas et al., 2013). Při anémii a hypoxii jsou častěji nalézány mutace p53 a neoangiogeneza. **Anémie i hypoxie** je sdružena se zhoršenou odpovědí na cytotoxickou léčbu (Cojocariu et al., 2007) i radioterapii (Harada, 2011). Hypoxie je sdružena s **HIF -1**, který aktivizuje, stejně tak tento faktor může být aktivizován u normoxických buněk některými růstovými faktory a ROS (Harada, 2011) a v konečném důsledku je spuštěna neoangiogeneza. **Mutace p53** má i prediktivní hodnotu, protože p53 je zapojen do apoptózy indukované chemoterapií i radioterapií, jeho mutace jsou tedy jednou z příčin chemo- i radiorezistence. Naopak exprese antiapoptotického genu bcl-2 je predátorem dobré odpovědi jak na radioterapii, tak chemoterapii (Cojocariu et al., 2007).

4.12. Léčba karcinomů ORL oblasti

Časná stadia ORL nádorů mohou být léčena unimodálně - chirurgicky nebo zářením. Lokálně či lokoregionálně pokročilé nádory bývají léčeny multimodálně. To znamená, že jejich léčba sestává z chirurgických přístupů, radioterapie a mnohdy i systémové léčby – chemoterapie nebo cílené biologické léčby. Nové léčebné postupy jsou intenzivnější, jejich cílem je zlepšit výsledky léčby, ale s intenzitou léčby rostou nežádoucí účinky, proto je nutné využívat podpurnou terapii. I to je jeden z důvodů, proč se s intenzifikací terapie zvyšují celkové náklady na léčbu (Lang, 2009).

Míru závislosti mezi lokoregionální kontrolou a jejím dopadem na celkové přežití hodnotila metaanalýza 19 randomizovaných klinických studií. 10% zlepšení ve dvouleté lokoregionální kontrole vede ke zlepšení celkového přežití o 6,7% (Wadsley a Bentzen, 2004).

4.12.1. Léčba resektabilního lokálně a lokoregionálně pokročilého karcinomu ORL oblasti

Lokálně i lokoregionálně pokročilé karcinomy ORL jsou potencionálně kurabilní, v jejich terapii se uplatňují dvě hlavní léčebné strategie, které mohou k vyléčení vést. První z nich je primární chirurgická léčba, při které je radikálně odstraněn vlastní nádor i případně postižené lymfatické uzliny, opereční výkon je pak následován radioterapií nebo konkomitantní chemoradioterapií. Druhým léčebným přístupem je definitivní chemoradioterapie případně bioradioterapie (konkomitantní podání biologické léčby spolu s radioterapií), po jejímž selhání může následovat chirurgický výkon (*Pfister et al., 2014*). Léčebný postup by měl být volen podle lokalizace nádoru, histopatologických charakteristik nádoru, podle předpokládané poléčebné kvality života pacienta a s ní souvisejícím zachováním funkce orgánu. Na volbě strategie léčby by se měl podílet celý tým odborníků, ve kterém nechybí chirurg ani radioterapeut. Velmi důležitou roli v procesu rozhodování o léčbě musí hrát sám pacient.

V současnosti není k dispozici dostatek podkladů, na základě nichž by bylo možné preferovat jeden přístup nad druhým, neboť přímé srovnání těchto dvou přístupů bylo provedeno pro resekabilní karcinomy klinického stadia III-IV pouze v jedné randomizované studii v Singapuru s celkovým počtem 119 pacientů: 1. pooperačně - R0 resekce 60 Gy, R1 resekce 70 Gy a 2. definitivní chemoradioterapie 66 Gy potencována dvěma cykly cisplatinou 20 mg/m²/d1-5 a fluorouracilem 1000 mg/m²/d1-5. Signifikantní rozdíl v pětiletém (50% vs. 40%) ani tříletém přežití (54% vs. 43%) nebyl zaznamenán (*Soo et al., 2005*), ale kritici studie poukazují na nedostatečný počet hodnocených pacientů a tím nemožnost prokázat benefit chirurgické léčby.

V roce 1991 byla představena poměrně malá studie (n=43) RTOG 73-03, ve které byl zkoumán efekt předoperační a pooperační radioterapie a u karcinomů orofaryngu III. – IV. klinického stadia samostatná radioterapie vs. pooperační radioterapie. Vzhledem k nízkému počtu pacientů nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve čtyřletém přežití, ale i na základě této studie lze konstatovat, že radioterapie s případným operačním zákrokem až po jejím selhání může být jednou z léčebných možností (*Tupchong, 1991*).

Méně doporučovanou možností léčebného postupu je podat indukční chemoterapii s následnou radioterapií v rámci orgán záchovného postupu u karcinomů laryngu a hypofaryngu. Ani jedna z velkých provedených studií neprokázala signifikantní rozdíl v celkovém přežití pacientů mezi skupinou, ve které pacienti podstoupili orgán záchovný protokol s indukční chemoterapií a skupinou, ve které byla pacientům provedena totální laryngectomie a pooperační radioterapie (*Department of Veterans, 1991; Lefebvre 1996*).

4.12.2. Radioterapie lokálně a lokoregionálně pokročilého karcinomu ORL oblasti

Radioterapie je léčba lokální stejně jako léčba chirurgická, u lokálně a lokoregionálně pokročilých karcinomů ORL oblasti je stěžejní léčebnou modalitou. Proto také posledních několik desetiletí jsou hledány nové způsoby jejího využití. Se zlepšující se technikou plánování radioterapie, zdokonalením fixačních pomůcek i vývojem přístrojů pro vlastní ozáření, která dovoluje přesnější dodání dávky do cílového objemu, lepší distribuci dávky za kvalitnějšího chránění zdravých tkání, jsou vyvíjena nová léčebná radioterapeutická schémata nebo dochází k navyšování celkové dávky.

Konvenční a konformní radioterapie

Konvenční a konformní radioterapie znamená techniky 2D nebo 3D a při ozařování je používána konstantní intenzita v celé ploše svazku, pouze při použití klínových filtrů dochází k zeslabení intenzity směrem k silnějšímu konci klínového filtru. Pro neresekované karcinomy ORL oblasti by dodána celková dávka měla být 70 Gy v denní frakcionaci 2 Gy. Rozvoj nežádoucích účinků v podobě akutní bolestivé mucositivity i pozdní toxicity v podobě fibrózy, atrofie, xerostomie i osteoradionekróz je však velmi častý (*Harari, 2005*).

IMRT (Intensity modulated radiotherapy)

IMRT je největším zlepšením v technice radioterapie karcinomů hlavy a krku (*Allen a Tishler, 2007*). Do praxe vstoupila v devadesátých letech. Jde o techniku, díky níž je možná modelace svazku záření a která je schopna dodat do ozařovaného objemu předepsanou dávku tak, že je využíváno plánovaného kolísání intenzity ve svazku záření a v jednotlivých podjednotkách svazku (pixelech) jsou rozdílné intenzity výsledkem pohybu listů vícelamelového kolimátoru, který je naprogramován (*Vošmik, 2008*). Pro IMRT je používáno tzv. inverzní plánování, jehož vstupními údaji jsou – požadované rozložení dávky, definice limitů a závažných parametrů (*Kolářová et al., 2008*). Díky IMRT je možné lépe tvarovat cílový objem a lépe chránit zdravé tkáně např. velké slinné žlázy, nicméně při plánování klade IMRT mnohem větší důraz na precizní definování jednotlivých objemů.

Akcelerovaná či hyperfrakcionovaná radioterapie

Cílem akcelerované či hyperfrakcionované radioterapie je překonání repopulace buněk nádoru v průběhu cyklu radioterapie. Dalším předpokladem pro její využití je kinetika buněčné populace těchto nádorů (*Bourhis, 1999; Bourhis, 2006*). Provedené randomizované studie porovnávající konvenční radioterapii a akcelerovanou radioterapii včetně multicentrické studie GORTEC neprokazují dopad na celkové přežití, ale prokazují horší akutní toxicitu akcelerované radioterapie (*Bourhis et al., 2006a; Overgaard et al., 2003; Jackson et al., 1997; Horiot et al., 1997;*), zlepšení lokální a lokoregionální kontroly (*Bourhis et al. 2006a; Horiot et al., 1997*). Neprokazují však zhoršení pozdní toxicity při použití akcelerované radioterapie (*Bourhis et al., 2006a; Jackson et al., 1997*). V roce 2006 byly v provedené metaanalýze MARCH zpracovány data více než 6000 pacientů z 15 randomizovaných klinických studií srovnávající alterovaný frakcionační režim s konvenční normofrakcionovanou radioterapií. V pětiletém přežití bylo zlepšení 3,4% při použití alterovaného režimu a to hlavně u hyperfrakcionací- zde byl 8%. Tohoto zlepšení bylo dosaženo zlepšením lokální kontroly, ale nebylo prokázáno zlepšení regionální kontroly ani kontroly vzdálených metastáz (*Bourhis et al., 2006b*).

Mezi akcelerované režimy řadíme také **konkomitantní boost**, při němž je plánovaný boost zářen jako druhá denní dávka v průběhu základní radioterapie nezmenšeným polem. Důvodem je zkrácení celkového trvání radioterapie při dodání při dodání dostatečné celkové dávky (*Kubes et al., 2011; Knee et al.1985*). **Simultánní boost** využívá novodobých technických možností k dodání boostu zároveň při ozáření základním – nezmenšeným objemem a to po celou dobu radioterapie.

4.12.3.Konkomitantní chemoradioterapie

Původní uplatnění chemoterapie v léčbě karcinomů hlavy a krku byl v paliativní terapii. V posledních zhruba třech až čtyřech dekáдах se zkouší podávání chemoterapie u lokálně pokročilých stádií jako neadjuvantní, adjuvantní, konkomitantní. Provedené metaanalýzy však podávání adjuvantní ani neadjuvantní chemoterapie nepotvrzují, neboť tato strategie podání nemá dopad na celkové přežití (*Munro, 1995; El-Sayed et al., 1996; Pignon et al., 2000*). Dopad na celkové přežití neadjuvantní chemoterapie byl prokázán pouze po přidání taxanů k cDDP a 5-FU (*Vermorken et al., 2007, Bourhis, 2005*). Naopak dalšímu významnému zkoumání podléhá současné podání chemoterapie a radioterapie – konkomitantní, konkurentní či simultánní chemoradioterapie. První studie s chemoradioterapií

byly zahájeny v šedesátých letech dvacátého století. Efektivita této strategie je prokázána provedenými metaanalýzami. Aktualizovaná verze metaanalýzy MACH-NC, do které bylo zahrnuto 16 485 pacientů z 87 randomizovaných klinických studií z let 1965 – 2000, prokazuje přetrvávající trend výhod konkomitantní chemoradioterapie: snížení relativního rizika úmrtí o 19% ($p < 0,0001$) a prodloužení celkového pětiletého přežití o 6,5% ($p < 0,00001$). Kombinací radioterapie a chemoterapie se však zvyšuje akutní toxicita léčby.

Konkomitantní chemoradioterapie se tak stala standardem léčby lokoregionálně pokročilých karcinomů ORL oblasti (*Grégoire et al., 2010*), přestože optimální cytostatikum i jeho dávkování, stejně tak jako optimální režim radioterapie nejsou ještě známé. Reportovány jsou výsledky studií, v nichž byla použita nejen různá cytostatika, ale také různé radioterapeutické režimy a to jak normofrakcionační (*Fountzilas et al., 2004*), tak hyperfrakcionace a akcelerované režimy (*Vokes et al., 2000; Budach et al., 2006*) i kontroverzní radioterapii v přerušovaném cyklu (split- course radiotherapy) (*Arigiris et al., 2003*).

Cytostatika v konkomitantní chemoradioterapii

Předpokladů pro použití chemoterapie při radioterapii je několik: radiosenzibilizace nádorových buněk, překlenutí radiorezistence nádorových buněk, překlenutí hypoxie, působení na mikrometastázy, indukce apoptózy, inhibice reparace DNA poškození vzniklé zářením, pomoc při reoxygenaci nádorových buněk a tím zvýšení účinnosti radioterapie (*Al-Sarraf, 2002*), synchronizace buněk v radiosenzitivnějších fázích buněčného cyklu.

V konkomitantní chemoradioterapii karcinomů ORL oblasti se používala různá cytostatika v různých kombinacích, ať už v monoterapii či v kombinovaných režimech. Jedná se o: Mitomycin – C, 5- fluorouracil (5-FU), hydroxyureu, bleomycin, taxany, gemcitabin, (*Al-Sarraf, 2002, Harari, 2005*), karboplatina, vinca alkaloidy. Přidání těchto cytostatik zhoršuje nežádoucí účinky, zvláště mucositidu.

Cisplatina

Cisplatina (cDDP) je jedním z nejdůležitějších cytostatik. cDDP se váže na jadernou DNA a podle posledních výzkumů i na mitochondriální DNA a na proteiny mitochondriální membrány nádorů hlavy a krku, což může být potenciálním mechanismem v apoptóze (*Yang, 2006*). Cisplatina byla poprvé v konkomitanci podána v roce 1981. Dnes je její podání velmi rozšířené.

Již zmiňovaná metaanalýza MACH prokázala nejlepší výsledky konkomitantní chemoradioterapie při použití cisplatinu (cDDP). Signifikantní rozdíl však není mezi užitím cDDP v kombinovaných režimech nebo v monoterapii a výsledky se nelišily ani v závislosti na frakcionačním režimu (Pignon, 2009). Podle této metaanalýzy nemají z přidání chemoterapie k radioterapii prospěch pacienti starší 70 let.

Velmi častá je aplikace radioterapie a cDDP v monoterapii. Je možné použít aplikaci cDDP 100 mg/m² ve třítydenním režimu. Na podkladě studie RTOG (Al-Sarraf et al., 1987) byl tento režim použit mnohokrát v klinických studiích. I při použití cDDP v konkomitanci je nutné se vyrovnat s jejími nežádoucími efekty jako je nevolnost, zvracení, nefrotoxicita, ototoxicita a další.

Přímé srovnání radioterapie samostatné (70 Gy v normofrakcionaci), radioterapie v konkomitanci s cDDP 100 mg/m² ve třítydenním režimu a radioterapie s cDDP 75 mg/m² d1v kombinaci s 5-FU 1000 mg/m² d1-4 ve třítydenním režimu s radioterapií ve splitu přinesla studie Intergroup 026 (n=295) (Adelstein, 2003). Celkové tříleté přežití bylo: 23% vs. 37% vs 27%, akutní mucositida stupně 3/4: 30% vs.37% vs.36%, celková akutní toxicita stupně 3/4 52% vs. 89% vs. 77%.

Cisplatinu je možné použít taktéž ve 40 mg/m² v týdenním režimu, který je rozšířený v terapii karcinomu děložního čípku. Přímé srovnání těchto dvou režimů podávání cDDP v monoterapii u karcinomů hlavy a krku bylo publikováno teprve před dvěma lety (n=50) (Tsan et al., 2012) se závěrem, že první podání má větší radiosenzitizační efekt, ale druhé podání vede k nižší toxicitě chemoterapie bez snížení efektu léčby.

4.12.4. Cílená biologická léčba aplikovaná konkomitantně s radioterapií (bioradioterapie) u lokálně či lokoregionálně pokročilých neresekovaných karcinomů ORL oblasti

Přesto, že probíhají intenzivní klinické výzkumy v oblasti molekulární biologie u karcinomů ORL oblasti, jediným targetem pro cílenou biologickou léčbu zůstává i po mnoha letech pouze EGFR. EGFR lze blokovat jak extracelulárně pomocí monoklonálních protilátek, tak intracelulárně pomocí tyrosinkinázových inhibitorů (TKI's) neboli tzv. malých molekul, které mají schopnost difundovat do buňky a tam ovlivnit intracelulární doménu receptoru. Obě skupiny blokátorů byly a jsou zkoušeny i u karcinomů hlavy a krku jak v kurativní, tak paliativní terapii: **Monoklonální protilátky** – cetuximab (Bonne ret al.,

2006), panitumumab (*Giralt et al., 2012*), zalutumumab (*Schick et. al., 2012*), **malé molekuly** – gefitinib, lapatinib, erlotinib, afatinib). Uvedené molekuly jsou buď ještě v klinickém zkoušení (afatinib, axitinib, zalutumumab) nebo nevykázaly, kromě cetuximabu, žádný benefit v celkovém přežívání. Vzhledem k tomu, že karcinomy ORL oblasti vykazují množství alterací v **PI3- kinázové dráze**, mohli by pacienti profitovat z léčby PI3-kinázovými inhibitory. To je ovšem zatím také předmětem zkoumání. **mTOR** sám o sobě je u ORL karcinomů intaktní, ale alterovaná může být výše zmíněná PI-3 kinázová dráha, proto i mTOR může být dobrým targetem nejspíše v kombinované léčbě, nicméně data zatím také chybí (*Cohen, 2014*). V klinickém testování jsou však i inhibitory **VEGFR** a to jak monoklonální protilátka bevacizumab, tak malé molekuly axitinib, sorafenib, sunitinib (*Dorsey, 2013*).

Klinická studie kombinace cetuximabu a radioterapie a samostatné radioterapie (*Bonner et al., 2006*) u SCC orofaryngu, laryngu a hypofaryngu stadia III/ IV ukázala zlepšení jak lokoregionální kontroly 24,4 vs. 14,9 měsíců, tak celkového přežití 45,6% vs. 36,4%. Toxicita režimu s cetuximabem uvedená ve studii byla přijatelná, klinická praxe ji však nepotvrdila. Cetuximab je jediným preparátem cílené biologické terapie, který je užíván v léčbě lokálně pokročilých, neresekovaných karcinomů hlavy a krku.

Samozřejmě byla hledána odpověď na otázku, proč cetuximab vykazuje efekt, byť limitovaný, u karcinomů hlavy a krku, zatímco TKI's ne. Je pravděpodobné, že alespoň část z ní byla nalezena v imunologii (*Hansen, 2013*): Na signální dráhu EGFR a s ní související molekuly mohou velké monoklonální protilátky působit jinak než malé TKI's, což může vyústit v jiný klinický efekt. K tomu imunitní efekty, kterými jsou cetuximabem zprostředkovaná na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (ADCC) a na komplementu závislá cytotoxicita, mohou také zprostředkovávat klinickou aktivitu. Tento mechanismus může být vysvětlením, proč biomarkery, které pracují s amplifikací genu nebo expesí proteinu EGFR selhávají.

4.13. Karcinomy nazofaryngu a konkomitantní chemoradioterapie

Nazofaryngeální karcinom je zvláštní jednotkou karcinomů ORL oblasti a to nejen svým silným vztahem k EBV. Endemickou oblastí pro výskyt tohoto karcinomu je jihovýchodní Asie, severní Afrika a část střeozemí (*Chan, 2002*). V Evropě ani v severní Americe není výskyt tohoto karcinomu zdaleka takový. Karcinomy nazofaryngu mají v onkologii zvláštní postavení, neboť se v jejich léčbě neuplatňují operační postupy a to nejen

vzhledem k uložení nazofaryngu, ale i vzhledem k jejich radiosenzitivitě i chemosenzitivitě. V době diagnózy má až 70% pacientů pokročilou, nemetastazující formu karcinomu. Hlavní roli v léčbě těchto nádorů hraje radioterapie. Také v léčbě karcinomu nasofaryngu byly testovány jiné postupy než jen samostatná konvenční radioterapie a také přidání chemoterapie k radioterapii.

Provedené metaanalýza 8 studií se 1753 pacienty (*Afqir et al., 2002*) ukázala benefit konkomitantní chemoradioterapie s použitím cDDP u pacientů s lokoregionálně pokročilým karcinomem nazofaryngu nad samostatnou radioterapií.

První randomizovaná studie Intergroup 0099 i její upgrade (*Al-Sarraf et al., 1998; Al-Sarraf et al., 2001*) (n= 147) přináší informace o prodloužení přežití bez progresu 58% vs. 29% i o prodlouženém celkovém přežití 67% vs 37% u pacientů s karcinomy nazofaryngu klinického stadia III/IV, kteří byli léčeni radiochemoterapií s cDDP 100 mg/m² ve třítýdenním režimu a následnou adjuvantní chemoterapií v režimu cDDP 80 mg/m² d1 a 5-FU 1000 mg/m² d1-4 v třítýdenním režimu oproti pacientům, kteří byli léčeni samostatnou radioterapií. V obou ramenech byla použita radioterapie 70 Gy v normofrakcionaci. Došlo však ke zvýšení toxicity v rameni s kombinovanou léčbou. U nás je tento protokol akceptován. V endemických asijských oblastech však příliš akceptován není z důvodů špatné compliance pacientů s adjuvantní chemoterapií (*Afqir et al., 2002*). V každém případě by měla u klinických stádií II, III, IVA a IVB použita konkomitantní chemoradioterapie (*Chan et al., 2012*).

Pro podání neadjuvantní chemoterapie jednoznačná data nejsou, podle provedené metaanalýzy nemá neadjuvantní chemoterapie dopad na celkové přežití. Až po použití taxanů v neoadjuvantní chemoterapii u karcinomů hlavy a krku bylo zaznamenáno prodloužení přežití pacientů (*Vermorken, 2009*). Do této studie však karcinomy nazofaryngu zahrnutý nebyly.

4.14. Toxicita léčby léčby neresekovaných karcinomů ORL oblasti

Toxicita léčby ovlivňuje kvalitu života pacienta, je s ní spojena tolerance léčby pacientem a tím podmíněná compliance s léčbou. Toxicita tedy limituje veškerou onkologickou léčbu. V radioterapii míra toxicity závisí na tom, jak jsou chráněny či ozářeny zdravé tkáně tj. na tvaru cílového objemu, jeho velikosti, na velikosti celkové i jednotlivé dávky – hyperfrakcionace a akcelerované režimy vs. normofrakcionace, na použité technice –

např. IMRT vs. konformní či konvenční radioterapie i na aplikované látce v konkomitanci a jejím dávkování, která je součástí léčebného režimu – např. cDDP vs. 5-FU; cetuximab. Při intenzifikaci onkologické léčby HNSCC zavedením akcelerovaných radioterapeutických režimů, konkomitantní chemoradioterapie či bioradioterapie dochází ke zhoršování akutní toxicity léčby – stupeň 3 na 32-84% (Trotti *et al.*, 2001), nicméně by neměla být nikterak omezena pozdní toxicita. Toxicitu ovlivňuje i stav pacienta, jeho nutriční stav, komorbidity a nejspíše i genetická a imunologická výbava pacienta, což bývá označováno „individuální tolerancí“. V současné době neexistuje žádný objektivně měřitelný prediktor toxicity, byť pokusy nalézt jej, provedeny byly – např. TGF- β 1 (Fehl, 2005; Fehl, 2008). Možnost stanovení objektivních, jednoduše měřitelných prognostických a prediktivních faktorů léčby i její toxicity by umožnily jednoznačně utřídit skupiny pacientů nejen podle toho, z které léčby budou mít největší prospěch, ale i podle toho jsou – li schopni ji dokončit v předepsaném režimu či jaký dopad bude mít pozdní toxicita na funkční stav orgánu a tím na kvalitu života.

Toxicitu je nutné sledovat a hodnotit pomocí některé z hodnotících škál – WHO, což byla první škála akutní toxicity publikovaná v roce 1981, v roce 1983 vznikla NCI CTC- AE, která obsahuje hodnocení akutní toxicity chemoterapie a následovala RTOG kritéria pro hodnocení toxicity radioterapie. Pozdní toxicita je hodnocena pomocí RTOG/ EORTC nebo LENT – SOMA systém. Pomocí těchto škál jsou obtíže a příznaky klasifikovány stupni. Ovšem překážkou objektivního hodnocení toxicity např. v klinických studiích je nejednotnost těchto systémů.

4.14.1. Akutní toxicita

V průběhu radioterapie a zhruba tři měsíce po jejím ukončení vzniká akutní toxicita. V dnešní době při intenzifikovaných režimech radioterapie a konkomitantních režimech je možné ji pozorovat déle než tři měsíce (Trotti *et al.*, 2001). Akutní toxicitu můžeme dále rozdělit na lokální a systémovou.

Histologicky jsou známkou **lokální akutní toxicity** zánětlivé změny tkání - hyperémie, zánětlivý infiltrát, otok. Při radiaci vzniká radiací indukovaná čili radiační mucositida, dermatitida, dysfagie, laryngální toxicita, xerostomie, postižení očí, uší a bolesti.

Pozorovat můžeme také **systémovou toxicitu** – hematologickou toxicitu, nauseu, zvracení, únavu, hubnutí, poruchy spánku.

4.14.2. Pozdní toxicita

Po třech měsících od ukončení radioterapie a někdy až mnoho let po ukončení léčby se může vyskytnout toxicita pozdní, která pak přetrvává dlouhou dobu, někdy až do konce života. Pozdní toxicita zahrnuje **podkožní fibrózu**, **mucositidu**, která vzniká na podkladě mucositivity akutní, **dermatitidu**, **laryngální toxicitu** a sní spojené **poruchy fonace**, **dysfagie**, které vznikají často ozářením konstriktorů hypofaryngu, **oční toxicitu**, **míšní toxicitu**, jejímž reverzibilním projevem může být Lhermittův syndrom a ireverzibilním transverzální léze míšní, xerostomii, **osteoradionekrózy**.

Při histologickém vyšetření takto postižené tkáně nacházíme většinou fibrotické změny různého stupně.

Někdy jsou pozdní změny takového rozsahu, že pacienta, který může být bez známek nádorového onemocnění, zásadně mutilují až invalidizují, což má velice negativní dopad na kvalitu života a to jak v rovině fyzické, tak i psychické a v neposlední řadě také sociální. Léčba pozdní toxicity je velmi obtížná až téměř nemožná a někdy je nutné přistoupit k léčbě chirurgické. Příkladem mohou být osteoradionekrózy dolní čelisti, kde je po neúspěšné konzervativní léčbě nutné přistoupit k léčbě chirurgické. Nezřídka je nutné provést hemimandibulectomii.

4.14.3. Velmi pozdní toxicita

Nesmíme zapomínat ani na velmi pozdní toxicitu radioterapie, při které se mohou projevit mutagenní, teratogenní a kancerogenní účinky záření. Jejím projevem může být vznik radioterapií indukovaného sekundárního primárního nádoru.

4.14.4. Radioprotektiva

Jednou ze slibných látek bylo radioprotektivum **amifostin** (Ethyol) vyvinutý pro potřeby americké armády. Při radioterapii se předpokládal její ochranný efekt hlavně na sliznice. Jeho podávání se přes počáteční nadšení neujalo.

Další testovano látkou byl **palifermin** (Kapivance) – růstový faktor pro keratinocyty, nicméně ani v tomto případě nebyl jeho efekt potvrzen.

4.15. Toxicita cisplatiny

Cisplatina je vysoce emetogenní cytostatikum, které působí neurotoxicky a ototoxicky. Kromě toho se při podání cisplatiny objevuje alopecie i hematologická toxicita.

4.16. Toxicita cetuximabu

Dominujícími nežádoucími účinky jsou hypersenzitivita, proto je před podáním cetuximabu aplikováno antihistaminikum, kožní toxicita v podobě pruritu, rashe, folikulární dermatitidy, změn na nehtech a průjmem.

4.17. Podpůrná péče a výživa při léčbě neresekovaného karcinomu ORL oblasti

Podpůrná péče pomáhá lépe tolerovat onkologickou léčbu nádorů hlavy a krku, pomáhá zachovat či dokonce zlepšit kvalitu života a pomáhá v procesu rekonvalescence. Bez rozvoje podpůrné péče by nebylo možné nové intenzifikované léčebné postupy pacientům aplikovat. Do podpůrné péče patří léčba a mírnění nežádoucích účinků onkologické léčby- v případě HNSCC léčba mucositivity- pečlivá péče o hygienu dutiny ústní, výplachy, léčba dermatitidy – péče o kůži, aplikace indiferentních mastí a krémů, použití Calcium pantothenicum, xerostomie, osteoradionekrózy – konzervativní léčba antibiotiky a v hyperbarických komorách nebo resekce postižené kosti a dalších komplikací, léčba bolesti, nevolnosti, zvracení, průjmů, infekčních komplikací, terapie omezené hematopoezy, dušnosti, únavy a v neposlední řadě péče o nutrici.

Podvýživa snižuje kvalitu života, zhoršuje přežití, zhoršuje toleranci léčby a je v souvislosti s významně větším výskytem infekčních i ranných komplikací a častějšími rehospitalizacemi (Holečková, 2012). U onkologických pacientů vzniká podvýživa buď metabolickou zánětlivou reakcí organismu na nádor - primární kachexie anebo sekundární kachexie nedostatkem živin, který může pramenit buď z postižení GIT, a nebo být následkem nádorové anorexie (Holečková et al., 2013a). Ztráta hmotnosti nad 5 % během tří měsíců negativně ovlivňuje zdravotní stav a průběh onemocnění i jeho léčbu. Ztráta nad 30 % hmotnosti je život ohrožující (Holečková et al., 2013b). Prokázán byl význam individualizované péče (Starke et al., 2011). Z těchto důvodů je nutné zajistit výživu všem

pacientům, kteří podstupují konkomitantné chemo(bio)radioterapii. Lepší váhový trend je docílen inzercí PEG, byť za cenu určitého omezení v kvalitě života. Období mukositidy lze sice zkusit překlenout sippingem tekutých výživ, ale to nebývá úspěšné a zavedení PEG v rozvinuté mukositidě již nemusí být možné. Aplikovat enterální výživu cestou PEG za pomoci sondových přípravků nebývá obtížné. Důležité je dodržet principy výživy: Dostatek energie (cca 30kcal/ kg/ d), dostatek tekutin, dostatek proteinů (1,2-1,5 g/kg/d – platí pro onkologické pacienty), dostatek ostatních živin a zajistit pohyb.

4.18. Rehabilitace

Rehabilitace je velmi důležitou, avšak opomíjenou složkou podpůrné péče v onkologii, jejímž cílem pro pacienta s disabilitou je dosáhnout optimálního stavu fyzického, sensorického, psychického, intelektuálního a sociálního, tak aby se jedinec adaptoval v životě a dosáhl co nejvyšší míry soběstačnosti (*Guru et al., 2012*) a aby pokud to je možné došlo k obnovení či zlepšení funkce poškozených orgánů. Rehabilitace může být preventivní, nápravná, podpůrná a paliativní.

Vzhledem k toxicitě léčby HNSCC, v tomto případě radioterapie nebo radiochemoterapie, která má dopad na polykací funkce a na řeč, na mobilitu jazyka i temporomandibulárního kloubu, což následně zhoršuje kvalitu života, stav výživy a má vliv i na začlenění do společnosti, je rehabilitace velmi důležitá. Neměla by být vynechána rehabilitace polykacích a řečových funkcí klinickým logopedem nejlépe po provedené videofluoroskopii polykacího aktu. Tato rehabilitace spočívá i v obnovení pohyblivosti orgánů, pro které jsou užívány speciální cviky někdy nazývané ROM (range of motion) – rozsah pohybů (*Logemann et al., 1997*). Pro tento druh rehabilitace se využívá maximálního možného rozsahu pohybu v danou chvíli (maximální otevření úst pro rehabilitaci temporomandibulárního kloubu, maximální roztažení rtů atd), tato cvičení se pacient naučí s terapeutem a pak opakuje několikrát denně po dobu několika měsíců.

Po radioterapii dochází také k potížím s krční páteří, hrudní páteří a rameny, obzvláště v oblasti abduktorů. I pro tuto oblast je vhodná rehabilitace.

Obecně platí, že potíže se mohou vyvinout kdykoli - již v době čekání na diagnózu v důsledku změny v životním rytmu a stylu pacienta, nebo při léčbě nebo v době follow-up.

S rehabilitací je proto doporučeno začít co nejdříve ev. i v době diagnostiky, před zahájením léčby. Většinou se však stává, že se s rehabilitací začíná, až když je problém rozvinutý (*Ahlberg et al., 2011*). Aby byla rehabilitace účinná, bylo by vhodné pacienta

edukovat tak, aby byl schopen provádět rehabilitaci sám a pravidelně. Rehabilitace je tím účinnější, čím je dříve zahájena.

Po celou dobu onemocnění, tedy již od doby diagnózy nesmíme zanedbávat ani psychologickou podporu a sociální rehabilitaci.

4.19. Sekundární primární nádory

Nádory hlavy a krku bývají se sekundárními nádory sdruženy poměrně často. Nejčastější lokalitou, kde se sekundární primární nádory vyskytují, jsou plíce. Vznikají častěji u nositelů HPV- nádorů a to proto, že tyto nádory častěji vznikají vlivem takzvaného kouře, což je rizikový faktor i pro vznik nádorů plic. Naopak pacienti s HPV+ nádorem mají velmi nízké riziko vzniku sekundárních primárních nádorů (*Syrjänen, 2010*). Zajímavé také je, že ne sice zcela přesně, ale tyto nádory vykazují fenotypově stejné chování jako nádory primární (*Cohen, 2014*).

Zhruba u 17% pacientů se po léčbě pro ORL nádor vyvine sekundární primární nádor. Doba jeho vzniku bývá kolem čtyř let od diagnózy prvního nádoru, druhý nádor výrazně zhoršuje prognózu pacientů a medián přežití je pak 12 měsíců. Vysoké riziko sekundárních primárních nádorů mají mladší jedinci s časnými karcinomy laryngu nebo dutiny ústní stadia I/II (*Rennemo, 2008*).

4.20. Poléčebné sledování (follow - up)

Odpověď onemocnění na léčbu by měla být vyšetřena klinickým vyšetřením a zobrazovacími metodami: CT nebo MRI. Výběr metody záleží po léčbě na tom, jaká metoda byla použita před léčbou. Pro karcinomy nasofaryngu volíme MRI hlavně pro T₃ a T₄ tumory a to každých 6-12 měsíců v prvních několika letech po léčbě. CT-PET může být použita v hodnocení odpovědi na samostatnou radioterapii či chemoradioterapii, a to tehdy, když jde o rozhodování o přínosu krční disekce (*Grégoire et al., 2010; Chan et al., 2012*).

Cílem follow – up je zachytit lokální rekurence či sekundární nádory v časném stadiu, ve kterém je onemocnění léčitelné. Použití zobrazovacích metod je doporučeno v případě, kdy je vysloveno podezření na recidivu při klinickém vyšetření. CT-PET by měla být použita v nejasných případech (*Grégoire et al., 2010; Chan et al., 2012*).

Zároveň by při follow – up mělo být provedeno vyšetření toxicity radioterapie se zaměřením na poškození polykacích a dýchacích funkcí, u karcinomu nazofaryngu ještě vyšetření funkce hlavových nervů (*Grégoire et al., 2010; Chan et al., 2012*).

Každý rok by měl být proveden rentgen plic. Vyšetření funkce štítné žlázy je doporučeno v 1., 2. a 5. roce po léčbě (*Grégoire et al., 2010; Chan et al., 2012*).

5. Soubory pacientů, statistická analýza

5.1. Soubory pacientů

V průběhu přípravy disertační práce byly zpracovány dva soubory pacientů. V obou byl použit neopterin jako marker systémové zánětlivé odpovědi buď jako prediktivní faktor toxicity použité léčby nebo jako prognostický faktor spolu s vitamínem E a vitamínem A u neresekovaných nádorů ORL léčených kombinovanou léčbou.

Výzkum byl povolen lokální etickou komisí Nemocnice Na Bulovce, Praha. Léčba pacientů byla provedena na Ústavu radiční onkologie Nemocnice Na Bulovce, Praha, 1. LF UK Praha. Laboratorní zpracování vzorků moče a krve bylo provedeno v laboratoři Geronto-metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, LF HK UK Praha.

Před zařazením do studie byl od všech pacientů vyžadován podepsaný písemný informovaný souhlas se vstupem do studie.

5.2. Zařazování pacientů

Do studie byli zařazováni pacienti s neresekovaným primárním karcinomem ORL oblasti klinického stadia II- IVB v dobrém výkonnostním stavu (PS podle WHO 0-2) s uspokojivými laboratorními parametry.

Před provedením prvního studijního odběru nebylo povoleno zavedení PEG, aby provedený výkon nezkreslil vstupní hladinu neopterinu ani retinolu či α - tokoferolu. PEG zavedná po prvním odběru povolena byla, neboť se jedná o součást standární podpůrné péče.

Při znalosti o zhoršené prognóze pacientů s tracheostomií (*MacKenzie, 1997*), zavedená tracheostomie povolena byla z etických důvodů, neboť šlo o pacienty s neoperovanými nádory ORL oblasti, které mohou obstrukcí způsobit dyspnoe. Ke zhoršení dýchání může u těchto pacientů docházet i při radioterapii vlivem toxicity léčby – otoku.

K určení stagingu nádoru byl použit TNM systém.

Pro oba soubory pacientů byla vymezena stejná vstupní kritéria, stejná kritéria pro vyřazení a stejné léčebné protokoly, stejné modalities léčby. Proto jsou tyto údaje uvedeny pro oba soubory. Podpůrná léčba je uvedena v obou kapitolách zvlášť.

5.2.1. Vstupní kritéria zařazení do studie

- Histologicky verifikovaný karcinom ORL oblasti
- Neresekovaný karcinom ORL oblasti, povolena exstirpace krčních uzlin
- Klinické stádium ORL nádoru II-IVB
- Nepřítomnost vzdálených metastáz
- Nepřítomnost sekundárního primárního nádoru
- Uspokojivé laboratorní parametry (krevní obraz: absolutní počet neutrofilů $\geq 1,5 \times 10^9/l$, Hb ≥ 90 g/l, trombocyty $\geq 100 \times 10^9/l$, renální funkce ≥ 60 ml/min, jaterní testy - maximálně 1,5 násobek normy)
- PS dle WHO 0-2
- Věk nad 18 let
- Předpokládané dodržení léčebného režimu
- Předpokládaná compliance odběrů požadovaných ve studii
- Nezavedená PEG před studijními odběry popř. prvními studijními odběry
- Souhlas s provedením onkologické léčby
- Písemný a podepsaný souhlas se vstupem do studie

5.2.2. Kritéria pro nezařazení do studie či vyřazení ze studie

- Karcinom ORL oblasti klinického stadia I
- Recidivující nebo metastatický karcinom ORL oblasti
- Zjištěný další primární nádor
- Operovaný karcinom ORL oblasti
- Jiná předchozí onkologická léčba pro karcinom ORL oblasti
- Předchozí onkologická léčba méně než pět let před zařazením do studie
- Neuspokojivé laboratorní parametry
- Zjištěná infekce HBV, HCV nebo HIV
- Nesouhlas pacienta s léčbou

5.2.3. Požadovaná vstupní vyšetření

Obecná vyšetření

- Anamnéza

- Fyzikální vyšetření
- Hematologické a renální parametry

Určení stagingu nádoru podle TNM

Vyšetření primárního nádoru:

- ORL vyšetření včetně endoskopického
- Provedení odběru biopsie
- Histologické vyšetření
- Zobrazovací metody - CT nebo NMR krku

Vyšetření vzdálených metastáz

- RTG nebo CT hrudníku

Fakultativní vyšetření

- UZ nebo CT nebo MRI jater
- scintigrafie skeletu
- Stomatologické vyšetření

5.3. Léčba neresekovaného ORL nádoru ve studiích

Ve studii byla použita definitivní kombinovaná léčba – chemoradioterapie nebo bioradioterapie. Radioterapie je v tomto léčebném režimu hlavní léčebnou modalitou.

Zevní radioterapie

Plánování a simulace radioterapie: Byl použit standardní postup plánování záření nádorů ORL oblasti používaný na ÚRO NNB Praha za použití plánovacího CT a plánovacího systému SomaVision (Varian).

Fixace pacienta: Termoplastická pětibodová maska (Orfit)

Technika ozáření: 3D nebo IMRT

Vlastní ozáření: Radioterapie do celkové ložiskové dávky 70 Gy v normofrakcionaci tj. jedna frakce 2 Gy 5x týdně. Radioterapie byla provedena na lineárním urychlovači Clinac 5-6 MeV.

Chemoterapie

Použité cytostatikum a jeho dávkování: cDDP 40 mg/m² 1 x týdně

Aplikace chemoterapie: Intravenózní aplikace chemoterapie v hydratačním režimu

Plánovaný počet podání (sérií) chemoterapie: Každý týden při radioterapii. Celkový počet sedm.

Antiemetická profylaxe: Byla podávána intravenózně, skládala se ze setronových antiemetik, metoclopramidu a dexamethasonu.

Cílená biologická léčba

Použitá látka a dávkování: cetuximab (Erbix), 1. nasycovací dávka 400 mg/ m², dále 250 mg/ m² 1x týdně (Bonner, 2006)

Aplikace: Intravenózní

Plánovaný počet podání: týden před zahájením chemoradioterapie, každý týden v průběhu radioterapie, celkem osm.

Premedikace: antihistaminikum

5.4. Soubor č. 1 - Neopterin a toxicita léčby

Výzkum byl koncipován jako prospektivní sledování hladiny neopterinu v moči pacientů s neresekovaným karcinomem hlavy a krku bez zjištěných vzdálených metastáz z odběrů před definitivní kombinovanou léčbou - chemoradioterapií či bioradioterapií a pak každý den v průběhu léčby.

Hladina neopterinu je u onkologických pacientů bez komplikací relativně stabilní (Melichar *et al.*, 2007). Velmi málo se však ví o o změnách v hladině neopterinu v moči v průběhu radioterapie.

5.4.1. Cíl výzkumu

Primární cíl

Zhodnotit spojitost mezi hladinou neopterinu v moči a toxicitou indukovanou radioterapií.

Sekundární cíl

Zhodnotit schůdnost denního provádění odběrů ranní moči na vyšetření neopterinu nejen v podmínkách hospitalizace, ale i v podmínkách domácích (v době víkendových propustek) včetně jejich krátkodobého uskladnění.

5.4.2. Zařazování pacientů do studie

Zařazování pacientů do této části výzkumu probíhal podle výše uvedených kritérií a použita byla definitivní radioterapie buď v konkomitanci se systémovou léčbou – chemoterapií či cílenou biologickou léčbou, případně byla aplikována samostatná radioterapie.

Období zařazování pacientů bylo od června 2007 do července 2007.

5.4.3. Podpůrná léčba

V této studii byla podpůrná léčba velmi důležitá i vzhledem k důležitosti průběhu toxicity při léčbě a hodnocení toxicity pro další zkoumání. Kromě antiemetické profylaxe byla vzhledem k předpokládané toxicitě konkomitantní chemoradioterapie pacientům zavedena PEG – vždy však až po provedeném prvním studijním odběru moče. Při nemožnosti zavedení PEG bylo možno zvolit jinou variantu sondy. Vždy však byla pacientům zajištěna nutriční podpora nejčastěji sondovou výživou event.sippingem. Mucsitida, dermatitida, nausea, zvracení a ostatní nežádoucí účinky byly léčeny podle standardů podpůrné léčby ÚRO NNB.

5.4.4. Hodnocení toxicity léčby

Akutní toxicita radiální léčby byla hodnocena *denně* užitím kritérií RTOG (Radiation Therapy Oncology Group), toxicita systémové léčby užitím kritérií NCI-CTC AE (National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria of Adverse Event), performance status byl hodnocen podle WHO také každý den, viz příloha č. 2

Hodnoceny byly jak systémové tak lokální účinky radioterapie, tak vedlejší účinky chemoterapie i cílené biologické léčby, tj. nausea, vomitus, hematologická toxicita, renální toxicita, mucositis, dermatitis) v případě aplikace cílené biologické léčby byla hodnocena tzv. „in field toxicita“ = toxicita v ozařovaném poli i dermatitida mimo ozařované pole, jejíž podoba je odlišná), dysfagie, xerostomie, laryngální toxicita, oční a ušní toxicita, hubnutí a bolest.

5.4.5. Management odběrů neopterinu

Vyšetření neopterinu bylo prováděno ze vzorku 5 ml ranní moče odebraného před zahájením celého léčebného režimu a pak každý den po dobu radioterapie včetně sobot a nedělí, kdy radioterapie neprobíhá, popřípadě v době jiného ať už plánovaného či neplánovaného výpadku radioterapie. Každý pacient tak měl plánováno minimálně 47 odběrů vzorku moče.

Uskladnění vzorků

Vzorky byly uskladněny v -20°C v mrazicím boxu ÚRO NNB, kam byly ukládány denně, do doby analýzy. Při víkendových propustkách pacienti uschovali sobotní a nedělní vzorek v mrazicím boxu doma a do -20°C byl uložen v neděli večer nebo v pondělí ráno po návratu z propustky. Vzorek však nesměl být rozmražen a následně zmražen, neboť tímto způsobem může dojít ke zkreslení výsledku.

5.4.6. Charakteristika souboru

Denně v průběhu radioterapie byly odebírány vzorky moči 12 pacientům, 8 mužům, 4 ženám, v průměrném věku 55 ± 12 let, s mediánem 54 (31-62) let. PS podle WHO: PS 0 - 1 , PS 1 – 10 pacientů, PS 2 – 1 pacient.

Lokalita tumoru: larynx 3 pacienti, orofarynx 5 pacientů, nazofarynx 1 pacient, dutina ústní – 2 pacienti a karcinom neznámého primárního zdroje – 1 pacient, viz tab. č. 4. Grading: G 2 – 7 pacientů, G 3- 2 pacienti, neurčený grading Gx – 3 pacienti. Rozložení stádií: stádium II – 1 pacient, stádium III – 5 pacientů, IVA – 12 pacientů, IVB – 5 pacientů, neurčené stádium – 1 pacient, viz tab. č. 5.

Lokalita	n	%
Larynx	3	25
Oropharynx	5	41,7
Nasopharynx	1	8,3
Dutina ústní	2	1,7
Neznámý primární zdroj	1	8,3

Tab. č. 4.: Rozložení onemocnění podle lokality

T	n	N	n	TNM	n	G	n
x	1	0	1	II	1	2	7
1	0	1	2	III	1	3	2
2	2	2a	2	IVA	7	neurčeno	3
3	1	2b	2	IVB	2		
4	8	2c	3	neurčeno	1		
		3	1				

Tab. č. 5.: Rozložení podle velikosti tumoru (T), postižení krčních uzli (N), stádií (TNM) a podle gradingu (G)

Zavedenou tracheostomií před zahájením terapie měli 2 pacienti. Nikdo neměl před prvním odběrem zaveden PEG, ta byla však následně zavedena 11 pacientům před zahájením nebo v počátku radioterapie.

Kuřáků bylo 10, nekuřáci 2, konzumentů alkoholu 10.

Celkem bylo analyzováno 578 jednotlivých vzorků moči.

Aplikovaná léčba

(n = 12)

Pacienti byli léčeni zevní radioterapií, v kombinaci s chemoterapií cDDP 1x týdně - 7 pacientů, v kombinaci s cetuximabem - 2 pacienti. 3 pacienti měli samostatnou radioterapii.

6 pacientů bylo léčeno IMRT a 6 pacientů 3D technikou.

Dodržení léčebného procesu (n = 12)

Radioterapie (n= 12): Všichni dokončili léčbu 70 Gy v denní frakcionaci 2 Gy.

Dodržení předepsané systémové léčby:

Chemoterapie - cDDP (n = 7): 5 a více cyklů bylo aplikováno 6 pacientům. Průměrný počet cyklů byl 5,29 cyklu, medián 6 cyklů (1-7).

Průměrná celková dávka chemoterapie byla 384,3 mg/ m² s mediánem 340 mg/ m², rozmezí bylo 60 mg/ m² -560 mg/ m².

Cílená biologická léčba – cetuximab (n = 2): Oba pacienti měli 9 podání terapie.

5.4.7. Statistické zpracování dat

Pro porovnání hodnot hladin neopterinu před léčbou a během léčby byl použit Wicoxonův párový test.

Ke zjištění spojitosti mezi poměrem neopterin/kreatinin v denních odběrech jako nezávislé proměnné a toxicity jako proměnné závislé byl použit model logistické regrese ve zobecněném smíšeném modelu s korelovanými daty. Použita byla procedura GLIMMIX a provedena v programu SAS. Do modelu byl navíc zahrnut parametr autokorelace časové řady, tudíž výsledkem je významnost regresního koeficientu neopterin/ kreatinin versus vybraný parametr toxicity se zohledněním rozdílů mezi jednotlivými pacienty. Do modelu byla zahrnuta i autokorelace hodnot jednoho pacienta.

Data pro jednotlivé pacienty jsou brána jako nezávislá, ovšem časová řada hodnot pro každého jednotlivého pacienta je uvažována jako korelovaná data. Z tohoto důvodu byl vybrán model s binominálním rozdělením závislé proměnné, ve kterém lze posoudit opakovaná měření pro více pacientů současně..

Cílem modelu bylo zjistit opoždění toxicity (ve dnech) za vzestupem hodnot koncentrace neopterinu v moči. V tomto případě orgánová toxicita měla polynominální rozložení (stupeň 0-4), přičemž stupeň 0 je výchozím bodem.

V některých případech se však odhad nepodařil, protože se jim model nepřiblížil. Nejčastějším důvodem byla minimální variabilita v daném parametru toxicity – např. vomitus či oční nebo ušní toxicita.

Statistická signifikace je na hladině $p = 0, 05$.

5.5. Soubor č. 2 - Neopterin, retinol a α - tokoferol jako prognostický faktor u ORL karcinomů

Výzkum byl koncipován jako prospektivní sledování hladiny neopterinu v moči, retinolu a α - tokoferolu v séru u pacientů s neresekovaným karcinomem hlavy a krku bez zjištěných vzdálených metastáz z odběrů před definitivní kombinovanou léčbou - chemoradioterapií či bioradioterapií. Sledovanou podskupinou těchto pacientů byl soubor, ve kterém byly odběry na vyšetření retinolu a α - tokoferolu nabírány 1x týdně.

Zařazování pacientů do studie probíhalo podle kritérií uvedených v kapitole 5.2. a to od června 2007 do srpna 2008.

5.5.1. Cíl výzkumu

Vyšetřit a zhodnotit prognostickou signifikaci a změny hladiny neopterinu, retinolu a α -tokoferolu u pacientů s karcinomy hlavy a krku, jejichž hlavní léčebnou modalitou byla radioterapie

5.5.2. Podpůrná léčba

Kromě antiemetické profylaxe byla vzhledem k předpokládané toxicitě konkomitantní chemoradioterapie pacientům zavedena PEG – vždy však až po provedeném studijním odběru moče na vyšetření neopterinu a krve na vyšetření retinolu a α - tokoferolu popř. u sledované podskupiny po první odběru. Při nemožnosti zavedení PEG bylo možno zvolit jinou variantu sondy. Vždy však byla pacientům zajištěna nutriční podpora nejčastěji sondovou výživou event.sippingem. Mucositida, dermatitida a ostatní nežádoucí účinky byly léčeny podle standardů ÚRO NNB.

5.5.3. Poléčebné sledování – follow up

Pacienti byli po léčbě sledování první a druhý měsíc, dále pak každé 3 měsíce první dva roky, mezi 3-5 rokem každých šest měsíců a od 5. roku pak každých 12 měsíců. Tyto kontroly zahrnovaly ORL vyšetření a vyšetření onkologem, součástí každé kontroly bylo hodnocení toxicity léčby.

5.5.4. Management studijních odběrů

Neopterin

Vyšetření neopterinu bylo prováděno ze vzorku 5 ml ranní moče odebraného před zahájením celého léčebného režimu.

Podskupina 12 pacientů

Vyšetření neopterinu bylo prováděno ze vzorku 5 ml ranní moče odebraného před zahájením celého léčebného režimu a pak každý týden po dobu radioterapie.

Uskladnění vzorků

Vzorky byly uskladněny v -20°C do doby analýzy.

Retinol a α - tokoferol

Vyšetření retinolu a α - tokoferolu bylo prováděno ze vzorku 5 ml krve (séra), který byl odebrán nalačno tj. po dvanáctihodinovém nočním lačnění před zahájením celého terapeutického režimu a pak každý týden v průběhu léčby a týden po léčbě.

Podskupina 12 pacientů

Vyšetření retinolu a α - tokoferolu bylo prováděno ze vzorku 5 ml krve (séra), který byl odebrán z periferní krve nalačno tj. po dvanáctihodinovém nočním lačnění před zahájením celého léčebného protokolu a pak každý týden v průběhu léčby a týden po léčbě.

Zpracování a uskladnění vzorků krve

Vzorky byly dopraveny ihned do laboratoře, kde byly centrifugovány při $1600 \times g$, 10 minutes, ve 4°C , poté bylo sérum odděleno a uskladněno v -20°C do provedení analýzy.

5.5.5. Charakteristika souboru

Do studie bylo zařazeno celkem 44 pacientů, 30 mužů a 14 žen v průměrném věku 58,6 let, medián věku 58 let. Nejmladšímu pacientovi bylo 31 let a nejstaršímu 71 let. Všichni měli histologicky verifikovaný karcinom, 43 pacientů mělo dlaždicobuněčný nádor, 1 pacient adenoidně cystický karcinom. Grading tumoru: G2 – 21 pacientů, G3 – 9 pacientů, G4 – 1 pacient, neurčený grading Gx – 7 pacientů.

Performance status (PS) podle WHO: v PS 0 byl 1 pacient, v PS 1 bylo 31 pacientů, v PS 2 bylo 12 pacientů.

Lokalizace primárního nádoru: 10 pacientů mělo karcinom kořene jazyka, 10 pacientů karcinom orofaryngu, 8 pacientů karcinom laryngu, 7 pacientů karcinom nazofaryngu, 3

pacienti karcinom dutiny ústní, 2 karcinom hypofaryngu a 4 pacienti karcinom neznámého primárního origa po disekci krční lymfadenopatie – viz tab. č. 6.

Lokalita	n
Baze jazyka	10
Oropharynx	10
Larynx	8
Nasopharynx	7
Neznámý primární zdroj = krční lymfadenopathie	4
Dutina ústní	3
Hypopharynx	2

Tab. č. 6.: Rozložení onemocnění podle lokalit.

Rozložení klinických stádií bylo následující: 2 pacienti stádium II, 7 pacientů stádium III, 26 pacientů stádium IVA a 7 pacientů IVB. 1 pacient byl ve stadiu IVC a u jednoho nebylo stádium určeno, přesto byli v souboru ponecháni, viz tab. č. 7.

T	n	N	n	G	n
0	3	0	2	1	5
1	3	1	7	2	21
2	4	2	4	3	9
3	7	2a	1	4	2
4	27	2b	10	Nezjištěno	7
		2c	13		
		3	6		

Tab. č. 7. : Rozložení podle velikosti tumoru (T), postižení krčních uzlin (N) a gradingu (G)

39 pacientů byli kuřáci, 39 pacientů konzumenti alkoholu.

Nikdo neměl před zahájením studie zavedenu PEG, ale po zahájení studie byla PEG zavedena 40 pacientům, chirurgická gastrostomie 1 pacientovi, nasogastrická sonda 1 pacientovi a 2 pacienti zůstali bez sondové výživy, měli sipping.

8 pacientů mělo zavedenou tracheostomii před vstupem do studie. Přidružené choroby udávalo 42 pacientů, přičemž nejčastější byla hypertenze a další kardiovaskulární onemocnění a onemocnění cév.

Sledovaná podskupina souboru

Odběry neopterinu, retinolu i α - tokoferolu byly provedeno v týdenních intervalech u podskupiny 12 pacientů, 8 mužů, 4 žen, v průměrném věku 55 ± 12 let, s mediánem 54 (31-62) let. PS podle WHO: PS 0 - 1 , PS 1 – 10 pacientů, PS 2 – 1 pacient. Lokalita tumoru: larynx 3 pacienti, orofarynx 5 pacientů, nazofarynx 1 pacient, dutina ústní – 2 pacienti a karcinom neznámého primárního zdroje – 1 pacient. Grading : G 2 – 7 pacientů, G 3- 2 pacienti, neurčený grading Gx – 3 pacienti. Rozložení stádií: stádium II – 1 pacient, stádium III – 5 pacientů, IVA – 12 pacientů, IVB – 5 pacientů, neurčené stádium – 1 pacient, 2 pacienti měli zavedenou tracheostomii před zahájením terapie.

Aplikovaná léčba

(n = 44)

Všichni pacienti byli léčeni zevní radioterapií, která byla plánována do celkové dávky 70 Gy v normofrakcionaci. 28 pacientů bylo zářeno IMRT, 16 pacientů bylo zářeno technikou 3D. 33 pacientů mělo jako systémovou chemoterapii cDDP 40 mg/ m² 1x týdně, 5 pacientů cetuximab (Erbix). 6 pacientů mělo samostatnou radioterapii.

(n = 12)

Pacienti byli léčeni zevní radioterapií v kombinaci s chemoterapií cDDP 1x týdně 7 pacientů, v kombinaci s cetuximabem 2 pacienti. 3 pacienti měli samostatnou radioterapii. 6 pacientů bylo léčeno IMRT a 6 pacientů 3D technikou.

Dodržení léčebného procesu (n =44)

Radioterapie (n= 44): 42 pacientů dokončilo léčbu do předepsané dávky 70 Gy v normofrakcionaci. 2 pacienti ukončili léčbu dříve (44 Gy a 64 Gy – chemoterapie v konkomitanci), oba z důvodů zhoršení stavu. *Skupina pacientů se samostatnou radioterapií* (n = 6): Všichni dokončili radioterapii do celkové dávky 70 Gy.

Dodržení předepsané systémové léčby:

Chemoterapie - cDDP (n = 33): 5 a více cyklů chemoterapie zvládlo 21 pacientů (více než 5 cyklů chemoterapie mělo 13 pacientů, 5 mělo 8 pacientů). Průměrný počet cyklů byl 4,54, medián 5 cyklů. Po zahájení konkomitantní chemoradioterapie byl nejmenší počet cyklů 1 a nejvíce 7 (plná dávka chemoterapie).

Průměrná celková dávka chemoterapie byla 334,39 mg/ m² s mediánem 340 mg/ m², rozmezí bylo 60 mg/ m² -560 mg/ m².

Cílená biologická léčba – cetuximab (n = 5): Průměrný počet podání byl 8,2, medián 9 cyklů, rozmezí 6 -9 cyklů.

Dodržení léčebného procesu (n =12)

Radioterapie (n= 12): Všichni dokončili léčbu 70 Gy v denní frakcionaci 2 Gy.

Dodržení předepsané systémové léčby:

Chemoterapie - cDDP (n = 7): 5 a více cyklů bylo aplikováno 6 pacientům. Průměrný počet cyklů byl 5,29 cyklu, medián 6 cyklů (1-7).

Průměrná celková dávka chemoterapie byla 384,3 mg/ m² s mediánem 340 mg/ m², rozmezí bylo 60 mg/ m² -560 mg/ m².

Cílená biologická léčba – cetuximab (n = 2): Oba pacienti měli 9 podání terapie.

5.5.6. Statistické zpracování dat

Analýzy byly provedeny pomocí NCSS software (Number Cruncher Statistical System, KeySVill, UT, USA).

Měření získaná z odběrů 12 pacientů před a v průběhu léčby byla porovnána pomocí Wilcoxonova párového testu. Korelace mezi odběry před léčbou všech 44 pacientů byla provedena za použití Spearmanova korelačního koeficientu (r_s). Přežití pacientů v závislosti na hodnotách hladin neopterinu v moči, retinolu a α - tokoferolu v séru před léčbou bylo komparováno za použití long - rank testu po dichotomizaci na základě cutoff limits vybraných na podkladě horních mezí normy vybraných z dříve provedených studií – pro neopterin a z mediánu studijních skupin – pro retinol a α – tokoferol.

Statistická signifikace je na hladině $p = 0,05$.

6. Laboratorní metodika

6.1. Soubor č. 1 - Neopterin a toxicita léčby

Neopterin

Pro zpracování neopterinu bylo použito modifikované techniky, která byla popsána již ve starších pracích. Po centrifugaci 12000 x g 45 sekund a naředění 100 µl získaného vzorku s 1,0 ml mobilní fáze obsahující 2 g sodné soli EDTA v litru. Vzorky byly filtrovány za použití Mikrotitru, AcroPrep 96 Filer Plate 0,2 µm/ 350 µl, Pall Life Science (Ann Arbor, MI, USA) a Vacuum manifold Pall Life Science (Ann Arbor, MI, USA) a poté byly injektovány do kolony. Neopterin byl stanoven za použití vysokoúčinného chromatografického systému (HPLC, high performance liquid chromatography) Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan) složené z Rack changer/C - speciálního autosampleru pro mikrotitrační destičky, Degasser DGU-20A5, 2 Liquid chromatograph Pumps LC-20 AB, Auto sampler SIL-20 AC, Column Over CTO – 20 AC Thermostat, Detektor fluorescence RF- 10 AXL, diodový array detektor SPD – M20A a komunikace bus modulu CBM-20A. Fosfátový pufr 15 mmol/l, pH 6,4, s nízkou rychlostí 0,8 ml/min byl použit jako mobilní fáze. Separace byla provedena hybridní analytickou kolonou Gemini Twin 5µ, C18, 150 × 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) ve 25°C, injektovaný objem byl 1µl. Neopterin byl identifikován nativní fluorescencí (353 nm excitace, 438 nm emisní vlnová délka). Kreatinin byl monitorován simultánně ve stejném vzorku moči diodovým array detectorem -235 nm. Čas pro analýzu neopterinu a kreatininu byl 6 minut a analyty byly kvantifikovány externí standardní kalibrací. Koncentrace neopterinu byla vyjádřena jako poměr neopterin/ kreatinin (µmol/mol kreatininu). Kreatinin byl vyšetřen po naředění vzorku 1:50 reakcí aromatických nitrolátek s látkami obsahující aktivní methylenovou nebo methinovou skupinu - Jaffeho reakce - na analyzátoru Modular.

6.2. Soubor č. 2 - Neopterin, retinol a α - tokoferol jako prognostický faktor u ORL karcinomů

Neopterin

Metodika je shodná s použitou metodikou v 1. souboru a je popsána výše.

Retinol a α - tokoferol

Koncentrace retinolu a α - tokoferolu v séru byla stanovena pomocí HPLC. V proceduře extrakce roztok – roztok bylo 500 μ l séra deproteinizováno chlazeným etanolem denaturovaným 5% metanolem (500 μ l, 5 minut, 4°C). Následně bylo přidáno 2500 μ l n-hexanu a v pěti minutách extrahováno aparaturou Vortex. Po centrifugaci 1600 x g, 10 min, 0°C. Pak bylo separováno 2000 μ l čistého extraktu a evaporováno v 45°C ve vakuovém koncentrátoru AD 5301 (Eppendorf, Hamburg, Německo). Reziduum bylo naředěno ve 400 μ l metanolu a analyzováno pomocí HPLC s reverzní fází s použitím standardní kalibrace. Analýza byla provedena s použitím Perkin Elmer HPLC (Norwalk, CT, USA), kompresní pumpy a LC 200 pumpy a LC 200 autosampleru, termostatem LC Column Oven 101, LC 235 Diode Array detector připojený k Perkin Elmer Turbochrom Chromatography Workstation, verze 4.1 separace α - tokoferolu a retinol byla provedena pomocí monolitické kolony Chromolith performance RP – 18e, 100 x 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byl použit 100% metanol v nízké rychlosti 2,5 ml/ min a pak v tlak v koloně 3,3 MPa. Aby byla uchována teplota analytické kolony na 25°C, byl použit Ohřev LC Oven 101 (Perkin Elmer). Injektovaný objem byl 50 μ L. Detekce retinolu a α - tokoferolu byla provedena v 295 nm a 325 nm.

7. Výsledky a diskuze

7.1. Soubor č. 1 - Neopterin a toxicita radioterapie

7.1.1. Výsledky

Po provedení denního měření hladin neopterinu v moči a statistických zpracování můžeme konstatovat, že trend vzestupu hladiny neopterinu v moči v průběhu radioterapie zřejmý, nicméně když byl komparován průměr koncentrací neopterinu s průměrem před léčbou, statistické signifikance bylo dosaženo až v pozdních fázích radioterapie a to v průběhu šestého a sedmého týdne, viz tab. č I, příloha 3.

Mezi změnami v koncentraci neopterinu a změnami v toxicitě byl zjištěn signifikantní vztah. Vzestup koncentrace neopterinu v moči signifikantně ($p \leq 0.01$) predikuje změny v horním GIT, které se pak objevují se zpožděním 6 dní a nausea se zpožděním o 8 dní, viz tab. č II, příloha č.4. Méně vyjádřený efekt ($p < 0, 05$) závislý na vzestupu neopterinu je nausea. Nausea se po vzestupu neopterinu objevuje se zpožděním 7, 10, 13 a 14 dní, xerostomie s nulovým zpožděním a toxicity horního GIT se zpožděním 8 a 23 dní, viz tab.č. II, příloha 4.

Když byl poměr neopterin/ kreatinin zhodnocen jako proměnná s normální distribucí, byly zjištěny vysoce signifikantní ($p \leq 0.01$) změny v parametru nausea, mucositis a performance status závislé na hladině koncentrace neopterinu, viz tab. č. viz tab.č. III, příloha 5.

Méně vyjádřená byla závislost na koncentraci neopterinu ($p < 0, 05$) pro zvracení, mucositidu, kožní toxicitu, xerostomii, laryngeální toxicitu, faryngeální toxicitu, toxicitu horního GIT a bolest.

Grafy vyjadřující závislost mezi poměrem neopterin/ kreatinin a jednotlivými typy toxických reakcí při radioterapii jsou spolu s korelačními koeficienty v příloze 6.

Zároveň bylo ověřeno, že pacienti jsou schopni dodržet metodiku odběru i uskladnění takto prováděných sériových odběrů ranní moči a to nejen za hospitalizace, ale i doma.

7.1.2. Diskuze

Při denním měření hladin koncentrace neopterinu a denním skórování toxicity byla mezi těmito veličinami nalezena závislost. I přes odchylky je zřetelný trend vzestupu hladin

neopterinu při zevní radioterapii, ale statistické signifikance bylo dosaženo až v pozdních fázích radioterapie a to v posledních dvou týdnech. Je zřejmé, že hladiny neopterinu mohou predikovat toxicitu radioterapie. Například zvýšená hladina neopterinu predikuje horní GIT toxicitu s týdenním předstihem. Závislost mezi vzestupem hladin neopterinu zhoršením toxicity horního GIT bychom mohli vysvětlit zánětlivou odpovědí, která je reakcí na radiační toxicitu a tím, že vyvolání toxicity horního GIT je komplexem patogenetických dějů, který v sobě zahrnuje i rebound fenomén, což by mohlo vysvětlit týdenní zpoždění v projevu této toxicity. Neopterin v moči byl signifikantně zvýšen také u jiných nežádoucích reakcí a jejich zhoršení – nausea, zvracení, mucositida, faryngeální toxicita, laryngeální toxicita, toxicita horního GIT a performance status. Změny v toxicitě byly za vzestupem koncentrace neopterinu/ kreatininu opožděny od 5 do 24 dnů. Nejvýraznější vztah byl pozorován mezi koncentrací neopterinu a nauzeou, mucositidou a stavem pacienta. Vztah mezi systémovou zánětlivou reakcí, jejímž markerem je v této studii neopterin, a těmito nežádoucími účinky by mohl vysvětlit zhoršení stavu pacienta.

Patogeneza změn hladin neopterinu, která vyplývá ze změn v tíži nežádoucích efektů jako mucositida, laryngeální toxicita a toxicita horního GIT může také využít rebound fenomenu se zvýšením koncentrace neopterinu a jejím pozdějším poklesem. Tato pozorování mají podobnost s těmi, která byla provedena v minulosti, kdy byl zjištěn vzestup intestinální permeability, která byla obecně odrazem nežádoucích účinků chemoterapie (*Melichar et al., 2005; Melichar et al. 2006*).

Z uvedených dat je možné vyvodit, že interakce mezi systémovým zánětem a toxicitou léčby jsou oboustranné. Zánětlivá imunitní reakce ovlivňuje toxicitu, ale také toxicita ovlivňuje signifikantně změny v hladině neopterinu, coby biomarkeru systémové zánětlivé odpovědi. Zvyšující se produkci neopterinu je možné zaznamenat v krvi či moči pacientů s různými maligními nádory, což bylo dokumentováno v různých studiích (*Melichar et al. 2006d; Melichar et al., 2006c, Reibnegger et al. 1991*). Velmi málo informací je k dispozici o neopterinu, coby biologickém imunitním markeru u karcinomů hlavy a krku. Jedou z mála je studie s pacienty s neresekovaným karcinomem spodiny dutiny ústní, ve které byla zaznamenána u většiny pacientů (19 z 23, včetně pacientů s rekurentními nádory) zvýšená hladina neopterinu a byla negativním prognostickým faktorem přežití pacienta (*Murr et al, 1998*). V časnějších studiích bylo také zjištěno, že zvýšená hladina neopterinu v moči znamenala utlumení některých dalších důležitých funkcí lymfocytů (*Melichar et. al., 2001*).

Také byl pozorován statisticky signifikantní vzrůst koncentrace neopterinu v moči při podávání cytokinů (*Melichar et al., 2006b*), při podávání chemoterapie (*Melichar et al., 2011*) i při aplikaci radioterapie (*Reibnegger et al., 1986*).

Zkušenost s denním měřením hladiny neopterinu v moči předkládá studie, kde byla hladina monitorována u pacientů po transplantaci orgánů a která ukázala, že zvýšení hladiny neopterinu předznamenává nějakou z akutních komplikací. U studovaného vzorku pacientů s pokročilými karcinomy kolorekta byl pokles neopterinu v souvislosti s dosaženou kontrolou onemocnění (*Melichar et al., 2006d*). Přes tyto dostupné informace jsou zkušenosti s denním měřením hladin neopterinu v moči, coby prediktoru komplikací, velmi limitované a vyžadovaly by další zkoumání, neboť se jedná o velmi zajímavý biomarker imunitní odpovědi organismu.

A přesto, že všichni naši pacienti v této studii byli, díky zvyklostem pracoviště, při léčbě hospitalizováni, měli víkendové propustky a odcházeli domů, kde moč odebírali sami uschovávali v lednici. Nutno podotknout, že denní odběr ranní moči není pro pacienta zatěžující a protože neopterin může být uchován až 14 dní v lednici nebo mrazícím boxu doma, nevyžaduje denní návštěvy zdravotnického zařízení.

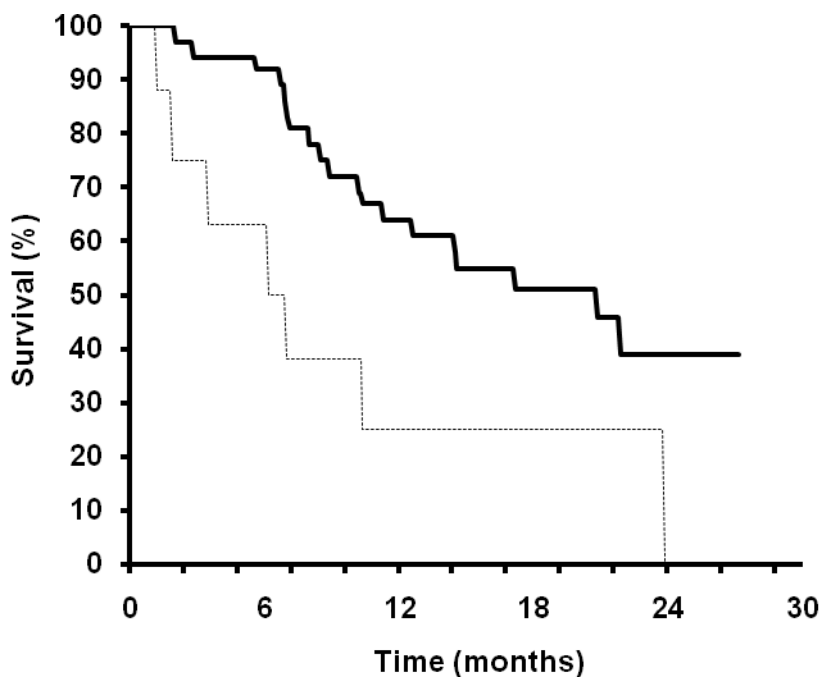
7.2. Soubor č. 2 - Neopterin, retinol a α - tokoferol jako prognostický faktor u ORL karcinomů

7.2.1. Výsledky

Ve studii byly zkoumány laboratorní odběry 44 pacientů s karcinomem ORL oblasti, koncentrace neopterinu v moči byla ($214 \pm 95 \mu\text{mol/ l}$) vyšší než u zdravé populace, retinolu v séru ($1,49 \pm 0,74 \mu\text{mol/ l}$) a α - tokoferolu ($18,20 \pm 7,50 \mu\text{mol/ l}$) nižší než u zdravé populace (*Melichar et al., 2006a; Melichar et al., 2010; Reibnegger et al., 1986; Melichar et al., 2006b*).

Neopterin

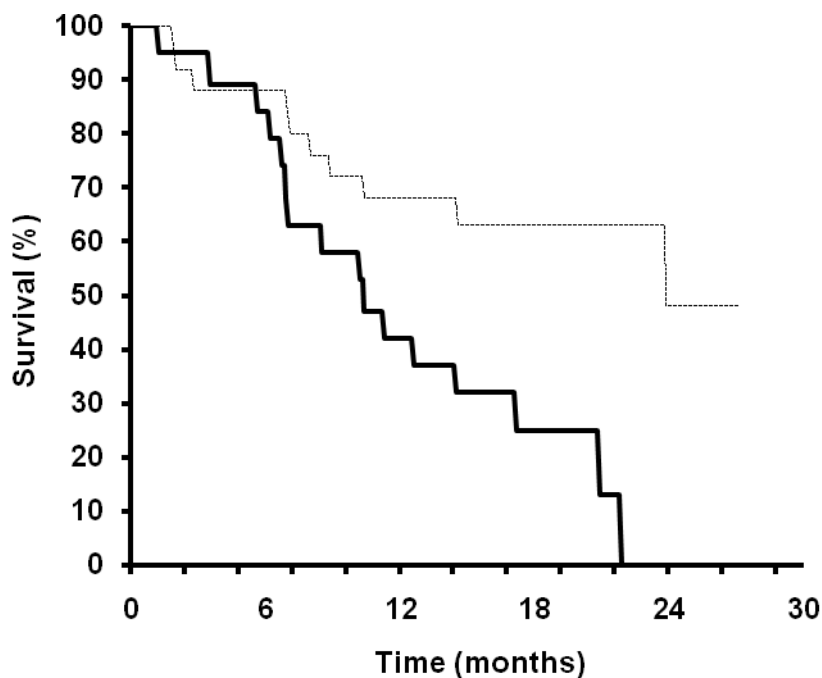
Hladiny neopterinu v moči stejné nebo vyšší než $214 \mu\text{mol/ l}$ kreatininu byly sdruženy s horší prognózou – medián pro přežití byl 7 vs. 21 měsíců, $p 0,046$ (graf č. 2.). Horní mez pro neopterin byla stanovena na základě studií provedených dříve (*Melichar et al., 2006a*).



Graf č.2. (Holeckova et al, 2012) : Kaplan – Meierova křivka: Pacienti s hladinou neopterinu rovnou nebo vyšší 214 µmol/ l kreatininu (přerušovaná linie) vs. pod hodnotou 214 µmol/ l (silná linie; log – rank test, p = 0,046)

Retinol

Hladina sérového retinolu pod 1 µmol/ l byla identifikátorem horší prognózy. Medián přežití byl 10 měsíců vs. 24 měsíce, p = 0,005 – viz graf č. 3.



Graf. č. 3. (Holeckova et al, 2012): Kaplan – Maierova křivka přežití pacientů s hladinou sérového retinolu nižší než 1 µmol/l (silná čára) vs. rovna či vyšší 1 µmol/l (log – rank test, p = 0,005).

Horní limity normálních hladin koncentrace neopterinu korespondují se zkoumanou skupinou přibližně v horním kvartilu. Rozdíl v přežití závislý na koncentraci retinolu, byl také zřejmý, když byl dolní kvartil vybrán jako jeho hranice místo mediánu. Medián přežití 10 měsíců vs. 22 měsíců, p = 0,01.

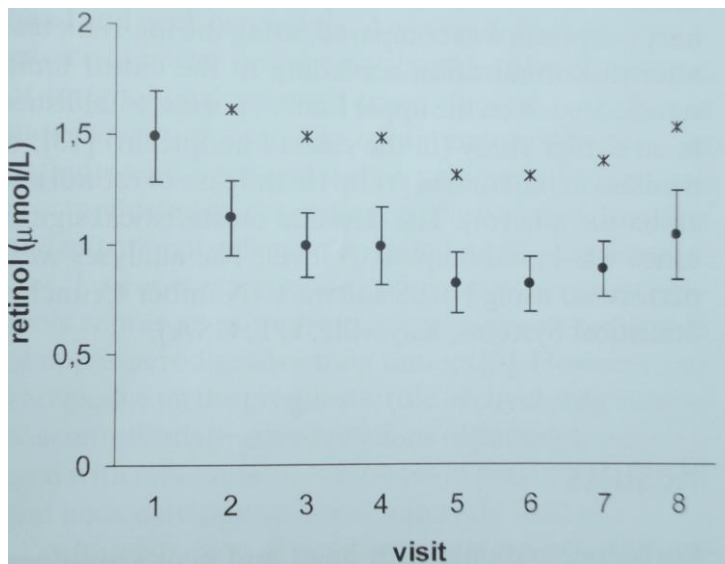
α - tokoferol

Sérové hladina α - tokoferolu pod 19 µmol/l vykazala hraniční signifikanci (medián 10 měsíců vs. nebylo dosaženo, p = 0,07). Podobný trend byl zaznamenán, když byl dolní kvartil použit jako limit místo hodnoty mediánu. Medián přežití 11 měsíců vs. nebylo dosaženo, p = 0,09.

Po analýze dat všech pacientů, byla pozorována signifikantní korelace mezi sérovým retinolem a α - tokoferolem ($r_s = 0,53$, p = 0,0002). Žádná jiná korelace zaznamenána nebyla.

Analýza odběrů podskupiny 12 pacientů

V týdenních intervalech byly odebírány vzorky moče a krve pro analýzu hladin neopterinu, retinolu a α - tokoferolu 12 pacientům. Statisticky signifikantní byl další pokles sérového retinolu v průběhu zevní radioterapie viz graf. č. 4.



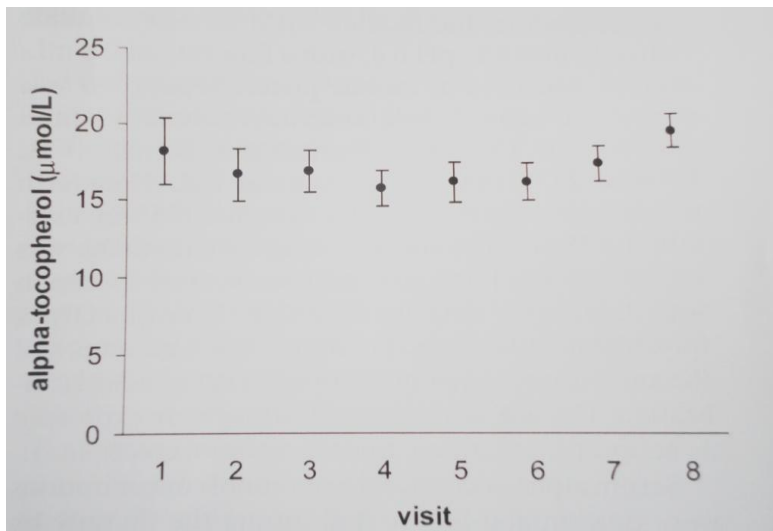
Graf č.4. (Holeckova et al, 2012): Průměry \pm standardní odchylka průměru hladin 12 pacientů v týdenních intervalech v průběhu zevní radioterapie. Hodnoty signifikantně ($p \leq 0.05$) se lišící ve srovnání s počáteční hodnotou jsou označeny hvězdičkou.

α - tokoferol

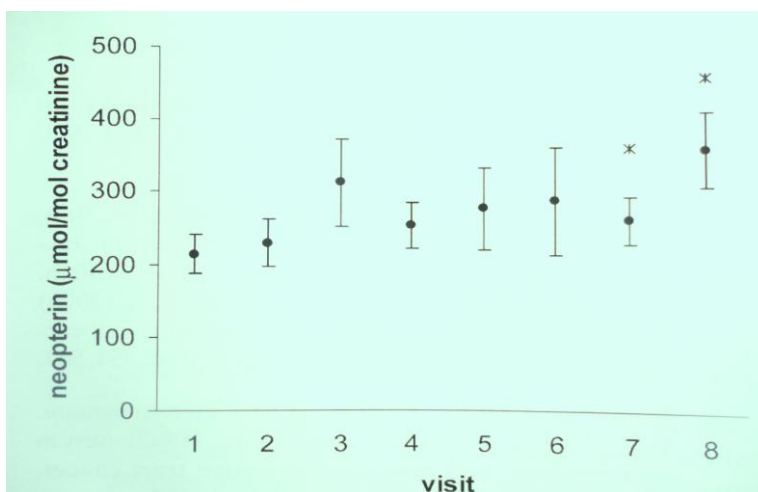
Sérový α - tokoferol poklesl pouze mírně v průběhu radioterapie a tento pokles nedosáhl statistické signifikance. Viz graf č.5.

Neopterin

Vzestup neopterinu dosáhl statistické signifikance pouze v posledních dvou vizitách. Viz graf. č. 6.



Graf č. 5 (Holeckova et al, 2012): Průměry \pm standardní odchylky průměru měření 12 pacientů v týdenních návštěvách v průběhu zevní radioterapie.



Graf č. 6 (Holeckova et al, 2012): Průměry \pm standardní odchylky průměru měření 12 pacientů v týdenních návštěvách v průběhu zevní radioterapie. Hodnoty signifikantně ($p \leq 0.05$) se lišící od počáteční hodnoty jsou označeny hvězdičkou.

6.2.2. Diskuze

Výrazně snížená koncentrace sérového retinolu a α - tokoferolu a vysoká hladina neopterinu v moči zjištěná v této studii u pacientů s karcinomy hlavy a krku v porovnání s normálními hladinami zavedenými v předchozích studiích (*Melichar et al., 2006a; Melichar et al., 2010; Reibnegger et al., 1986; Melichar et al., 2006b*) odrážejí jak přítomnost

malignity, tak komorbidit a malnutrice, které tento typ nádorů doprovázejí. Vzhledem k tomu, že v populaci se vyskytuje velké množství komorbidit i u jedinců bez nádorového onemocnění, bylo by obtížné provést srovnání s kontrolní skupinou. Důležité spíše tedy je, že zkoumané parametry klesaly i v průběhu radioterapie. Koncentrace sérového retinolu kontinuálně klesala, zatímco statistická signifikance vzestupu neopterinu v moči byla zřejmá pouze v pozdních fázích radioterapie. To, že pokles α -tokoferolu, nedosáhl statistické signifikance, může být však způsobeno limitovaným počtem pacientů ve studijním souboru. Vzestup neopterinu v moči byl popsán již u ozáření karcinomu čípku děložního (*Reibnegger et al., 1986*). Zatímco vzestup hladiny neopterinu byl popsán po systémovém podání různých cytokinů (*Melichar et al., 2006b*) i po aplikaci chemoterapie (*Melichar et al., 2006c*), toto je však první studie dokládající vzestup neopterinu v moči pacientů s karcinomem ORL oblasti při radioterapii.

Neopterin je derivován z aktivovaných makrofágů (*Wachter et al., 1989*) a dendritických buněk (*Wirleitner et al., 2002*). Výsledky této studie mohou znamenat, že makrofágy i dendritické buňky mohou být dále aktivovány léčbou a to i v případě, když je hladina neopterinu vysoká.

Výsledky tohoto výzkumu nadále dokládají prognostickou signifikanci neopterinu v moči a sérového retinolu pacientů s karcinomy ORL oblasti léčenými radioterapií. Podobně jako v časnějších studiích (*Melichar et al., 2006a*) byl horní limit normy použit limit pro dichotomizaci kvůli analýze přežití závislém na koncentraci neopterinu v moči, zatímco medián byl nalezen jako limit místo dolního limitu normy v případě sérového retinolu a α -tokoferolu, a to z proto, že v rizikových populacích pro vznik karcinomu hlavy a krku je vysoká prevalence hypovitaminózy, a pak se dolní hranice normy pro zdravou populaci stávají v této méně relevantní. Rozdíly v přežití závislé na koncentraci retinolu jsou také evidentní. Výběr dolního kvartilu pro koncentrace sérového retinolu se zdá důležitý.

Prognostická signifikance vzestupu koncentrace neopterinu v moči byla dokumentována u mnoha karcinomů (*Melichar et al., 2010*). Karcinomy ORL oblasti reprezentují heterogenní skupinu karcinomů. Do této studie byli zařazeni pacienti s nádory různých stádií, různých oblastí ORL a různých komorbidit. Predominantní histologií jsou SCC, ale vyskytují se zde i jiné histologické typy. Relativně často se stává, že je objevena krční lymfadenopatie, ale není nalezen primární zdroj karcinomu. Důležité je, že se tyto karcinomy léčí stejně jako ty, u kterých je v ORL oblasti primární nádor znám. U karcinomů ORL oblasti se používá radioterapie, chemoterapie i cílená biologická léčba. Reference o neopterinu u ORL karcinomů jsou velmi řídké. Murr a spolupracovníci (*Murr et al., 1998*)

zkoumali neopterin v moči 23 pacientů s neléčeným SCC dutiny ústní a 12 pacientů s rekurentním karcinomem dutiny ústní. Zvýšená koncentrace neopterinu v moči byla nalezena u 19 pacientů včetně 9 (75%) s rekurentním karcinomem a vysoká hladina byla negativním prognostickým faktorem přežití jak v univariétní tak multivariétní analýze. Data z předkládaného souboru jsou v souladu s těmito zjištěními.

Aplikace chemoterapie i radioterapie vedou k oxidačnímu stresu, který může vyútit ve snížení hladin cirkulujících antioxidantů a způsobit vzestup molekul spojených se zánětlivou odpovědí. Koncentrace α - tokoferolu a retinolu jsou signifikantně sníženy u pacientů s pokročilým karcinomem hlavy a krku (*McMillan et al., 2002; McMillan et al., 2000*), tento pokles koreluje se systémovou zánětlivou odpovědí (*McMillan et al., 2002; Mayland et al. 2004*). Pokles koncentrace α - tokoferolu byly doloženy při aplikaci systémové chemoterapie (*Faure et al., 1996; Jonas et al., 2000, High, 2002; Faber, 1995*). V této studii pozorovaný pokles retinolu může být způsoben jak radioterapií, tak systémovou léčbou. Nelze vynechat ani možnou malnutrici, která se u pacientů s karcinomy hlavy a krku objevuje.

Změny v koncentraci cirkulujícího retinolu a α - tokoferolu by mohly mít velký význam pro pacienty s karcinomy hlavy a krku, kteří jsou léčeni zevním zářením. V časnějších studiích byl demonstrován vliv podaného vitamínu E na zlepšení nežádoucích účinků chemoterapie (*Pace et al., 2003*) nebo radioterapie (*Delanian et al., 2003*). Efekt podání karotenoidů nebo tokoferolu byl zjišťován v prospektivní studii u pacientů s karcinomy hlavy a krku. Podání redukovalo vedlejší účinky způsobené radioterapií (*Bairati et al., 2005; van Zandwijk et al., 2000; Ferreira, 2004*). Na druhé straně je možné, že tyto účinky jsou negovány zvýšeným výskytem rekurencí a sníženým přežíváním (*Bairati et al., 2006*). Zjištění o negativním prognostickém vlivu suplementace karotenoidy a tokoferolu jsou v rozporu s negativní prognózou při jejich nízké hladině před léčbou. Zdá se tedy, že nízká i vysoká koncentrace mohou mít negativní dopad na přežití, ale mechanismus se liší. Nízká sérová hladina retinolu je asociovaná se systémovou zánětlivou odpovědí, která znamená špatnou prognózu mnoha maligních onemocnění. Koncentrace antioxidantů mohou ovlivňovat efektivitu radioterapie (*Bairati et al., 2006*).

8. Závěr

Karcinomy ORL oblasti jsou velmi často diagnostikovány v lokálně či lokoregionálně pokročilých stádiích, u kterých je volen multimodální přístup s kurativním cílem. Pacienti s těmito karcinomy jsou také často nositelé dalších přidružených chorob, které pak mají dopad nejen na přežití pacienta, ale i na toleranci léčby. Toxicita léčby velmi ovlivňuje nejen průběh léčby, ale někdy se může stát její úplnou překážkou. Ovlivňuje také kvalitu života pacienta v průběhu léčby i po léčbě. Specifická toxicita, která doprovází léčbu karcinomů ORL oblasti při léčbě v podobě akutních a po léčbě v podobě pozdních komplikací, které mohou přetrvávat po zbytek života pacienta, vyžaduje následnou rehabilitaci a další úsilí nejen pacienta, ale zdravotníků i nezdravotnických pracovníků. V případě, že by byly k dispozici objektivně měřitelné parametry, které by bylo možné použít jako prognostické faktory, či prediktivní faktory účinnosti léčby i toxicity léčby, značně by se zjednodušil výběr pacientů do léčebných skupin nejen podle účinnosti léčby, ale i podle jejího dopadu na kvalitu života pacienta. Zkvalitněním výběru pacientů by byl zajištěn individuální přístup k pacientovi a jeho léčbě, což by s sebou přineslo i významný ekonomický profit.

Cílem této práce bylo, přinést nové poznatky o možných prognostických a prediktivních markerech – neopterinu, α -tokoferolu a retinolu a to u ORL nádorů, u kterých je o těchto molekulách poznatků velmi málo.

Z provedených dvou pozorování byly předloženy výsledky i diskuze k nim. Můžeme konstatovat, že v průběhu zevní radioterapie karcinomů ORL oblasti hladina neopterinu vzrůstá, byť zřejmé je to hlavně po posledních fázích radioterapie. S největší pravděpodobností dochází ke vzájemnému ovlivňování koncentrace neopterinu v moči a toxicity indukované radioterapií. Nejedná se tedy pouze o jednosměrný proces, ve kterém by toxicita byla ovlivňována systémovou zánětlivou odpovědí organismu nebo ve kterém by toxicita ovlivňovala systémovou zánětlivou odpověď. Nejspíše se jedná o oboustranný proces, ve kterém svou úlohu může hrát i rebound fenomén.

Koncentrace neopterinu v moči v průběhu zevní radioterapie u pacientů s karcinomy hlavy a krku se zvyšuje a může predikovat radioterapií indukovanou toxicitu.

Zároveň se provedením této studie podařilo evaluovat schůdnost denních odběrů ranní moči pro vyšetření koncentrace neopterinu. Tento postup byl pacienty velmi přesně dodržován a to nejen za hospitalizace, ale i doma.

Z těchto důvodů by mohl být neopterin účinným pomocníkem při predikci toxicity radioterapie.

V další části studie byla zjišťována prognostická hodnota koncentrace neopterinu, α - tokoferolu a retinolu. Vysoká hladina neopterinu a nízká hladina retinolu jsou negativními prognostickými markery. Pokles retinolu v séru a vzestup neopterinu v moči v průběhu zevní radioterapie může znamenat také špatnou prognózu onemocnění.

Tyto dvě molekuly by mohly být také prognostickými faktory onemocnění karcinomem hlavy a krku.

Přes tato zjištění je nutné dodat, že by bylo potřeba na započatém výzkumu pracovat dále a hledat další souvislosti mezi jednotlivými molekulami, které se do dějů při onemocnění nádorem, ale i jeho léčbě zapojují. Přínos této práce je v tom, že podle dostupných informací se jedná o první takto provedenou studii, která dokládá význam neopterinu, retinolu i α - tokoferolu u nádorů ORL oblasti.

9. Seznam literatury

ADELSTEIN D J, Li Y, Adams GL, Wagner H, Kish JA, Ensley JF., Schuller DE, Forastiere AA, An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer., *J Clin Oncol*, 2003, Jan 1;21(1):92-8.

AFQIR S, Ismaili N, Errihani H. Concurrent chemoradiotherapy in the management of advanced nasopharyngeal carcinoma: Current status. *J Can Res Ther* 2009;5:3-7

AHLBERG A, Engström T, Nikolaidis P, Gunnarsson K, Johansson H, Sharp L, Laurell G, Early self-care rehabilitation of head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol.* 2011 May;131(5):552-61.

ALICANDRI-CIUFELLI M, Bonali M, Piccinini LM, Ghidini A, CunsoloEM, Maiorana A, Presutti L, Conte PF, Surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma: what is 'close'? *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, DOI 10.1007/s00405-012-2317-8

ALLEN AM, Tishler RB , Commentary: IMRT for Head and Neck Cancer: Many Chapters Left to Write, 565, *The Oncologist*, 2007, 12:565-568. doi: 10.1634/theoncologist.12-5-565, [cit. 27.5.2014], <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/12/5/565.full.pdf>

AL-SARRAF M, Pajak, TF, Marcial VA., Mowry P, Cooper JS, Stetz J, Ensley JF, Velez-Garcia E, Concurrent radiotherapy and chemotherapy with cisplatin in inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck: An RTOG study. *Cancer*, 59, 1987, 2, 259-265.

AL-SARRAF, M., LeBlanc, M., Giri, P., G., et al., Superiority of five year survival with chemo-radiotherapy (CT-RT) vs radiotherapy in patients (Pts) with locally advanced nasopharyngeal cancer (NPC). Intergroup (0099) (SWOG 8892, RTOG 8817, ECOG 2388) phase III study: Final report. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2001, 20,

227a.

AL-SARRAF, M., LeBlanc, M., Giri, P.,G., et al, Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: Phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol* 16, 1998, 4,1310–17.

AL-SARRAF, Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer: Historical and Critical Review, *Cancer Control* ,September/October 2002, Vol. 9, No.5 pp 387-399

ARGIRIS A, Haraf DJ, Kies MS, Vokes EE, Intensive Concurrent Chemoradiotherapy for Head and Neck Cancer with 5- Fluorouracil and Hydroxyurea Based Regimen, Reversing a Pattern of Failure, *The Oncologist* 2003;8,350-360, [citováno 28.5.2014], dostupne na www.TheOncologist.com

ARGIRIS A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371(9625):1695e1709.

ARGIRIS A, Li S, Ghebremichael M, Egloff AM, Wang L, Forastiere AA, Burtness B, Bairati I, Meyer F, Gélinas M, Fortin A, Nabid A, Brochet F, Mecier JP, Tetu B, Harel F, Abdous B, Vigneault E, Vass S and del Vecchio P, Randomized trial, of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients, *J Clin Oncol*, 2005, **23** : 5805-5813.

BAIRATI I, Meyer F, Jobin E, Gelinás M, Fortin A, Nabid A, Brochet F and Tetu B,. Antioxidant vitamins supplementation and mortality: a randomized trial in head and neck cancer patients, *Int J Cancer*, 2006, **119**: 2221-2224.

BALERMPAS P, Michel Y, Wangenblast J, Seitz O, Weiss C, Rödel F, Rödel C, Fokas E, Tumour-Infiltrating Lymphocytes Predict Response to Definitive Chemoradiotherapy in Head and Neck Cancer, *Br. J. Cancer*, 2013 Oct 15;[Epub Ahead of Print]

BALKWILL F, Mantovano A. Inflammation and cancer: back to Virchow?, *The*

Lancet, Volume 357, Issue 9255, Pages 539 - 545, 17 February 2001, doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0

BARNES L, . Eveson JW, Reichart P, Sidarinsky D, *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*, International Agency for Research on Cancer, 2005, reprint 2007, ISBN 92- 832- 2417- 5

BASELGA J, Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol.* 2001;19:41S–44S.

BONNER JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK , Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.*, 2006 Feb 9;354(6):567-78.

BOURHIS J, Lapeyre M, Tortochaux J, Rives M, Aghili M, Bourdin S, Lesaunier F, Benassi T, Lemanski C, Geoffrois L, Lusinchi A, Verrelle P, Bardet E, Julieron M, Wibault P, Luboinski M, Benhamou, Phase III randomized trial of very accelerated radiation therapy compared with conventional radiation therapy in squamous cell head and neck cancer: a GORTEC trial, *J Clin Oncol.*, 2006a, 20;24(18):2873-8

BOURHIS J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot JC, Le Maitre A, Pajak TF, Poulsen MG, O'Sullivan B, Dobrowsky W, Hliniak A, Skladowski K, Hay JH, Pinto LH, Fallai C, Fu KK, Sylvester R, Pignon JP), Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis, *Lancet*, 2006b, 368, 843–54.

BOURHIS J, Pignon JPP, Meta-analyses in head and neck squamous cell carcinoma: What is the role of chemotherapy? *Hematol Oncol Clin North Am*, 1999,13:769-77

BOURHIS J, Redefining "state of the art" in head and neck cancer, *Ann Onc*, 2005, 16(Supplement 6); vi5-vi6

BRAAKHUIS BJ, Visser O, Leemans CR, Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults, *Oral Oncol.* 2009 Sep;45(9):e85-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.03.010. Epub 2009May1

BUDACH V, Stuschke M, Budach W, Baumann M, Geismar D, Grabenbauer G, Lammert I, Jahnke K, Stueben G, Herrmann T, Bamberg M, Wust P, Hinkelbein W, Wernecke KD, Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial., *J Clin Oncol*, 2005;23(6):1125-35.

BÜCHLER T, Michalek J, Kovarova L, Musilova R, Hajek R., Dendritic cell-based immunotherapy for the treatment of hematological malignancies, *Hematology*. 2003 Apr;8(2):97-104.

CALIFANO J, van der Riet P, Westra W, 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 Jun 1;56(11):2488-92.

CARBONE DP, Ding K, Roder H, Grigorieva J, Roder J, Tsao MS, Seymour L, Shepherd FA, Prognostic and predictive role of the VeriStrat plasma test in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with erlotinib or placebo in the NCIC Clinical Trials Group BR.21 trial. *J Thorac Oncol.* 2012 Nov;7(11):1653-60. doi: 10.1097/JTO.0b013e31826c1155

COHEN E, The Latest on the Molecular Biology of Head and Neck Cancers, Interview, *www.practiceupdate.com*, 2014, Elsevier, [citováno 10.6.2014], dostupné na <http://www.practiceupdate.com/expertopinion/267>

COJOCARIU OM, Huguet F, Lefevre M, Périé S , Facteurs pronostiques et prédictifs

des cancers des voies aérodigestives supérieures, *Bull Cancer*. 2009 Apr;96(4):369-78. doi: 10.1684/bdc.2009.0777.

DE VISSER KARIN E, Eichten Alexandra, Coussens Lisa M., Paradoxical roles of the immune system during cancer development, *Nature Reviews Cancer* 6, 24-37 (January 2006) | doi:10.1038/nrc1782

DEBIER C, Larondelle Y, Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr.* ,2005Feb;93(2):153-74.

DELANIN S, Porcher R, Bella-Mekias S, Lefaix JL, Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation – induced fibrosis. *J Clin Oncol.*, 2003, 21, 927

DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS, Laryngeal Cancer Study Group, Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* ,324, 1991, 1685–90.

deVITA et al, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6th edition, Lippincot Williams and Wilkins, 2001, p793, ISBN 0-781-72387-6,

DHODAPKAR MV, Dhodapkar KM, Palucka, AK, 2008, Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ*, Jan 2008; 15(1): 39–50. Published online Oct 19, 2007. doi: 10.1038/sj.cdd.4402247

DORSEY K, Agulnik M., Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer, *Drugs*. 2013 Mar;73(4):315-25. doi: 10.1007/s40265-013-0025-3.

DOSTÁLEK M, Oxidativní stress, biomarkery oxidativního stresu, Postgraduální medicína 4/7, 5.4.2007, [citováno 14.6.2014], dostupné na <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/oxidativni-stres-biomarkery-oxidativniho-stresu-300319>

EDGE S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer, 7th ed. 2010, ISBN 978-0-387-88440-0

EL-SAYED S, Nelson, Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region: A meta-analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol* 14, 1996, 838-47.

FAURE H, Coudaray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F, Cadet J, Favier A, 5- Hydroxymethyl excretion plasma TABARS and okasma antioxidant vitamins in adriamycin – treated patients. *Free Radic. Biol. Med*,1996, 20, 979

FELTL D, Zavadová E, Pála M, Hozák P, Post-treatment plasma transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) level predicts for late morbidity in patients with advanced head and neck cancer, *Neoplasma*. 2005;52(5):393-7

FELTL D, Zavadova E, Pala M, Hozak P, The dynamics of plasma transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) level during radiotherapy with or without simultaneous chemotherapy in advanced head and neck cancer, *Oral Oncol*. 2005 Feb;41(2):208-13.

FERREIRA PR, Fleck JF, Diehl A, Barletta D, Braga-Filho A, Barletta A, Ilha L, Protective effect of alpha-tocopherol in head and neck cancer radiation-induced mucositis: a double-blind randomized trial, *Head and Neck*, 2004, **26**: 313-321.

FINN O., Cancer immunology, *N Engl J Med* 2008;358:2704-15.

FORASTIER A, Koch W, Trotti A, Sidransky, Head and neck Cancer, *N Engl J Med*, 2001, Vol 345, No. 26,

FOUNTZILAS G, Ciuleanu E, Dafni U, Plataniotis G, Kalogera-Fountzila A, Samantas E, Athanassiou E, Tzitzikas J, Ciuleanu T, Nikolaou A, Pantelakos P, Zaraboukas T, Zamboglou N, Daniilidis J, Ghilezan N, Concomitant radiochemotherapy vs radiotherapy alone in patients with head and neck cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group Phase III Study, *Med Oncol*. 2004;21(2):95-

107.

FUCHS D, et al. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:307-41.

GIRALT J, Trigo JM, Ozsahin EM, Skladowski K, Hatoum G, Daisne J, Zhang A, Oliner K, Vanderwalde A, 1016O: Phase 2, Randomized Trial (CONCERT-2) of Panitumumab (PMAB) Plus Radiotherapy (PRT) Compared with Chemoradiotherapy (CRT) in Patients (PTS) with Unresected, Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of The Head And Neck (LASCCHN) , *Abstract Book of the 37th ESMO Congress Vienna, Austria, 28 September – 2 October 2012*

GOERNER M, Seiwert TY, Sudhoff H , Molecular targeted therapies in head and neck cancer - An update of recent developments - *Head & Neck Oncology*, 2010, 2:8, [cit, 1.5.2014], dostupné na <http://www.headandneckoncology.org/content/2/1/8>

GOSPODAROWICZ M., O'Sullivan B, Prognostic factors in cancer. *Semin. Surg. Oncol.*, 2003, 21: 13–18. doi: 10.1002/ssu.10016

GURU K, Manoor UK, Supe SS, A Comprehensive Review of Head and Neck Cancer Rehabilitation: Physical Therapy Perspectives, *Indian J Palliat Care*, 2012 May-Aug; 18(2): 87–97.

HAKIM M, Billan S ,Tisch U, Peng G, Dvorkind I, Marom O , Abdah-Bortnyak R, Kutenand A Haick H, Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath, *British Journal of Cancer* , [citováno 10.6.2014], 104, 1649–1655. doi:10.1038/bjc.2011.128, dostupné na www.bjcancer.com, Published online 19 April 2011

HANSEN AR, Siu LL, 2013, Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Head and Neck Cancers: Have We Been Just Skimming the Surface?, *J Clin Oncol*, April 2013, vol 31 No 11, p 1381 – 1383

HARADA H, How Can We Overcome Tumor Hypoxia in Radiation Therapy?, *J. Radiat. Res.*, 2011, 52, 545–556

HARARI PM, Promising new advances in head and neck radiotherapy, *Annals of Oncology*, 2005, 16(Supplement 6):vi13-vi19; doi:10.1093/annonc/mdi453, [citováno 29.5.2014], dostupné na http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/content/full/16/suppl_6/vi13

HIGH KP, Legault C, Sinclair JA, Cruz J, Hill K, Hurd DD, Low plasma concentrations of retinol and alpha-tocopherol in hematopoietic stem cell transplant recipients: the effect of mucositis and the risk of infection. *Am J Clin Nutr.*;2002,76(6):1358-66.

HOLEČEK V, 2010, Oxidační stres u nádorových onemocnění, *Klin. Biochem. Metab.*, 18 (39), 2010, No. 4, p. 225–230.

HOLEČKOVÁ P, Krčmová L, Létal J, Svobodník A, Kalábova H, Kašparová M, Plišek J, Pála M., Vitek P, Solichová D, Zezulová M, Študentová H, Doležal M, Melichar B, Urinary neopterin concentration and toxicity of radiotherapy in patients with head and neck carcinoma during external beam radiation, *Anticancer Res*, 2013 Sep, 33(9), 4097-101

HOLECKOVA P, Krcmova L, Kalabova H , Kašparova M, Plišek J, Pala M, Vitek P, Solichova D, Zezulova M, Študentova H, Melichar B, Prognostic Significance of Serum retinol, Serum Alpha-Tocopherol, and Urinary Neopterin in Patients with Head and Neck Carcinoma Treated with External Beam Radiation, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 82 (X), 2012, 77 –84

HOLEČKOVÁ P, Maňásek V, Šachlová M, Tomiška M, Pazdrová G, Krčmová L, Beneš P, Zajímavé případy z nutriční péče v onkologii, *Klin Onkol*. 2013b;26(5):365.

HOLEČKOVÁ P, Maňásek V, Tomiška M, Šachlová M, Pazdrová G, Krčmová L, Beneš P, Zajímavé případy z nutriční péče v onkologii, *Klin Onkol*, 2013a; 26(3): 218

HOLEČKOVÁ P, Nutrice v (uro)onkologii, *Urologie pro praxi*, 2010; 11(2):

HOLEČKOVÁ P, Význam nutriční péče u onkologického pacienta. Vývoj nutriční péče v ÚRO. Kazuistika, *Onkologie* 2012; 6(2):

HORIOT JC, Bontemps P, van den Bogaert W, Le Fur R, van den Weijngaert D, Bolla M, Bernier J, Lusinchi A, Stuschke M, Lopez-Torrecilla J, Begg AC, Pierart M, Collette L, Accelerated fractionation compared to conventional fractionation improves locoregional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancer: Results of the EORTC 22851 randomized trial., *Radiother Oncol*, 1997, 44:111-121

HURET JL et al., *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [online], © ATLAS - ISSN 1768-3262 - Hosted by INIST Last update : 2014 Jul 3, <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>, citováno 5.6.2014

CHAI RL, Rath TJ, Johnson JT, Ferris RL, Kubicek GJ, Duvvuri U, Branstetter BF, Accuracy of Computed Tomography in the Prediction of Extracapsular Spread of Lymph Node Metastases in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013 Sep 26;[Epub Ahead of Print]

CHAN ATC, Teo PML, Johnson PJ, 2002, Nasopharyngeal carcinoma, *Ann Oncol*, 2002, 13 (7): 1007-1015.

ITALIANO A., Prognostic or Predictive? It's Time to Get Back to Definitions! October 31, 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.38.3729, *J Clin Onc* December 10, 2011 vol. 29 no. 35 4718

JACKSON SM, Weir LM, Hay JH, Tsang VHY, Durham JS, A randomised trial of accelerated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer, *Radiotherapy and Oncology*, 1997, Volume 43, Issue 1, Pages 39–46,

.

JACKSON SM, Jonas CR, Puckett AB, Jones DP, Griffith DP, Szeszycki EE,

Bergman GF, Furr CE, Tyre C, Carlson JL, Galloway JR, Blumberg JB, Ziegler TR, Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients, *Am J Clin Nutr.*,2002, 72(1):181-9.

KLAUNIG JE, Kamendulis LE, Hocevar BA, Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis, *Toxicol Pathol*, vol. 38 no. 1 96-109

KNEE R, Fields RS, Peters LJ (1985), Concomitant boost radiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, *Radiotherapy and Oncology*, Volume 4, Issue 1, August 1985, Pages 1–7

KOLÁŘOVÁ I, Vaňásek J, Odrážka K, Doležal M, Petruželka L, Nové metody radioterapie, Ročník LXXVII, 2008, č. 3 Vojenské Zdravotnické Listy 93

KUBES J, Cvek J, Vondracek V, Pala M, Feltl D, Accelerated radiotherapy with concomitant boost technique (69.5 Gy/5 weeks), *Strahlentherapie und Onkologie*, 2011, Volume 187, Issue 10, pp 651-655

LEFEBVRE J, Chevalier D., Luboinski B., et al.: Larynx preservation in pyriform sinus cancer (1996): Preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 88, 1996, 890–99.

LOGEMANN JA, PhD, Pauloski BR, Rademaker AW, Colangelo LA, Speech and Swallowing Rehabilitation for Head and Neck Cancer Patients, *Oncology*, 1997, 11(5):651-659,

MacKENZIE R, Franssen E, Balogh J, Birt D, Gilbert R, The Prognostic Significance of Tracheostomy in carcinoma of the Larynx Treated With Radiotherapy and Surgery for salvage, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1 April 1998, Volume 41, Issue 1 , Pages 43-51,

MANDREKAR SJ, Predictive biomarker validation in practice: lessons from real

trials, *Clin Trials*, October 2010 vol. 7 no. 5 567-573

MATTHEWS TW, Lampe HB, Dragosz K, Nutritional status in head and neck cancer patients, *J Otolaryngol.* ,1995, Apr;24(2):87-91.

MAYLAND C, Allen KR, Degg TJ and Bennet M., Micronutrient concentrations in patients with malignant disease: effect of the inflammatory response, *Ann Clin Biochem*, 2004, **41**: 138-141.

McMILLAN DC, Sattar N, Talwar D, O'Reilly J and McArdle CS. Changes in micronutrient concentrations following anti-inflammatory treatment in patients with gastrointestinal cancer., *Nutrition*, 2000, **16**: 425-428.

McMILLAN DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DSJ and McArdle C. The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clin Nutr*, 2002,**21**: 161-164.

MEHRA R, HPV in Advanced Head and Neck Cancer, *Ann. Oncol*, 2014 May 05;[EPub Ahead of Print]

MEIER JD, Oliver DA, Varvares MA, Surgical Margin Determination in Head and Neck Oncology: Current Clinical Practice. The Results of an International American Head and Neck Society Member Survey, *Head & Neck*, 2005, 27: 952– 958,

MELHEM MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ, Grandis JR, Levels of TGF- α and EGFR Protein in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Patient Survival, *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, Vol. 90, No. 11

MELICHAR B, Touskova M, Solichova D, Kralickova P, Kopecky O, CD4+ T – lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumors, *Scand J Clin Lab*, 2001 Inv 61: 363-370

MELICHAR B, Dvorak J, Hyspler R, Zadak Z, Intestinal permeability in the assesment of intesinal toxicity of cytotoxin agents, *Chemotherapy*, 2005, 51, 336-338

MELICHAR B, Dvorak J, Kalabova H, Hyspler R, Krcmova L, Kasparova M, Urbanek L and Solichova D. Intestinal permeability, vitamin A absorpion and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib. 2010, *Scand J Clin Lab Invest* 70: 180-187

MELICHAR B, Kalábová H, Urbánek L, Malířová E, Solichová D, Serial urinary neopterin measurements reflex the disease course in patient with epithelial ovarian carcinoma treated with paclitaxel/ platinum.*Pteridines*, 2007, 18: 1-7, 2007

MELICHAR B, Kašparová M, Kalábová H, Dvorák J, Hyšpler R, Tichá A, Krcmová L, Plíšek J, Holecková P, Solichová D., Intestinal permeability, vitamin A absorpion and serum alpha-tocopherol in gastrointestinal stromal tumor patients treated with imatinib., *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010;56(6):347-52.

MELICHAR B, Krcmová L, Kalábová H, Holecková P, Kasparová M, Plíšek J, Hyspler R, Studentová H, Solichová D, Serum retinol, alpha-tocopherol and systemic inflammatory response in metastatic colorectal carcinoma patients treated with combination chemotherapy and cetuximab. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*;2010,56(4):222-6.

MELICHAR B, Solichová D and Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies.. *Int J Gynecol Cancer*, 2006b, **16**: 240-252.

MELICHAR B, Solichova D, Melicharova K, Cermakova M, Urmiska H, Ryska A, Systemic immune activation, anemia and trombocytosis in breast cancer patiens treated by doxorubicin and paclitaxel., *Pteridines*, 2006c,17, 107

MELICHAR B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M and Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers*, 2006 a, **21**: 190-198.

MELICHAR B, Solichova D, Melicharova K, Malířová E, Cermanová M, Zdáč Z, Urinary neopterin in patient with advanced colorectal carcinoma, *Int J Biol Markers*, 2006d, 21, 190-198

MUNRO AJ, An overview of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 71, 1995, 83-91.

MURR C, Berchtold J, Norer B, Waldhart E, Wachter H and Fuchs D. Neopterin as a prognostic parameter in patients with squamous-cell carcinomas of the oral cavity. *Int J Cancer*, 1998,**79**: 476-480.

MURR C, et al. Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress? *Anticancer Res* 1999;19:1721-8

NOMURA AMY, Ziegler RG, Stmmernann GN, Chyou PH, Graft NE, Serum micronutrients and upper aerodigestive tract cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6,407

NUMICO J, Russi Eg, Colantonio I, Lantermo Ra, Silvestris N, Vitiello R, Comino A, Abrate M, Zavattero C, Melano A, Merlano M, EGFR Status and Prognosis of Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer Treated with Chemoradiotherapy, *Anticancer Research*, February 2010 vol. 30 no. 2 671-676

OVERGAARD J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, Bentzen J, Bastholt L, Hansen O, Johansen J, Andersen L, Evensen JF, Five compared with six per week of conventional radiotherapy of squamous-cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomized controlled trial, *Lancet*, 2003, 362:933-940

PACE A, Savarese A, Picardo M, Maresca V, Pacetti U, Del Monte G, Biroccio A,

Leonetti C, Jandolo B, Cognetti F, BOve L, Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy, *J Clin Oncol*, 2003, 21, 927

PALA M, Odrazka K, Holeckova P, Vitek P, Kubes J, Podlesak T, Klozar J, Petruzalka L, Postoperative radiochemotherapy with weekly cisplatin in patients with head and neck cancer single-institution outcome analysis, *Neoplasma*;2012, 59(2):129-36.

PFISTER DG et al. (2014), *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Head and Neck Cancers version 2.2014*, 2014, citováno 8.6.2014, dostupné na http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf

PIGNON J, Bourhis J, Domenge C, Designé L, on behalf of the MACH-NC Collaborative Group Collaborators, Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma:Three meta-analysis of updated individual data. *Lancet*, 355, 2000, 949-955

PIGNON, J., P., Maître, A.,Maillard, E., Bourhis, J.,Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009, 92, 1, 4-14.

PIGNON, JP, Maître A.,Maillard E., Bourhis, Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*, 2009, 92, 1, 4-14.

PRENDERGAST GC, Why tumors eat tryptofan, *Nature*, 2011, Vol 478, p192 -194

REIBNEGGER G, Bichler AH, Dapunt O, Fuchs DN, Fuith LC, Hausen A, Hetzel HM, Lutz H, Werner ER and Wachter H.. Neopterin as a prognostic indicator in patients with carcinoma of the uterine cervix., *Cancer Res*, 1986 46: 950-955.

REIBNEGGER G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Werner ER, Werner – Feldmayer G,

Wachter H, Neopterin as a marker for activated cell – mediated immunity: application in malignant disease, *Cancer Detect Prev*, 1991, 15: 483-490

SCHICK U, Gujral DM, Richards TM, Harrington KJ, Nutting CM, Zalutumumab in head and neck cancer, *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Jan;12(1):119-25. doi: 10.1517/14712598.2012.643864

SCHROECKSNADEL K., Murr C., Winkler C. et. al., Neopterin to Monitor Clinical Pathologies Involving Interferon gamma Production, *Pteridines*, 2004, Vol.15, pp.75-90

SOBIN LH, Gospodarowicz ML, Wittakind Ch, *TNM klasifikace zhoubných nádorů*, 7. vydání, 2009, česká verze 2011, Willey- Blackwell, ISBN 978-80-904259-6-5

SOO KC, Tan EH, We J. et al., Surgery and adjuvant radiotherapy vs concurrent chemoradiotherapy in stage III/IV nonmetastatic squamous cell head and neck cancer: a randomised comparison, *Br. J. Cancer* 2005, 93(2),279-286.

STARKE J, Schneider H, Alteheld B et al, Short- term individual nutritional care as a part of routine clinical setting improves outcome and quality of life in malnourished medical patients, *Clinical Nutrition*, 2011, 30, 194-201

TROTTI A, Mocharnuk RS, Mariani SM, Management of Radiation-Induced Toxicity in Patients With Head and Neck Cancer, *Medscape Hematology-Oncology eJournal*, cited 13.6.2014, http://www.medscape.com/viewarticle/430701_2

TSAND-L, Lin C-Y, Kang C-J, HuangS-F, FanK-H,, Liao C-T, Chen I-H, Lee L-Y, Wang H-M, Chang J T-C, (2012), The comparison between weekly and three-weekly cisplatin delivered concurrently with radiotherapy for patients with postoperative high-risk squamous cell carcinoma of the oral cavity, *Radiation Oncology*, 2012, 7:215,<http://www.ro-journal.com/content/7/1/215>

TUPCHONG L, Scott CB, Blitzer PH.:Randomized study of preoperative versus post-operative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: Long-term follow-

up of RTOG study 73-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991, 20, 21.

URBANEK L, Solichova D, Melichar B, Dvorak J, Svobodova I and Solich P., Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E human serum using monolithic column and diode-array detection, *Anal Chim Acta*, 2006, **573-574**: 267-272.

van ZANDWIJK N, Dalesio O, Pastorino U, de Vies N and van Tinteren H, EUROSCAN, a randomized trial of vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and neck cancer or lung cancer, *J Natl Cancer Inst* , 2000,**92**: 977-986.

VERMORKEN JB, Bach BA, Failure of anti-EGFR therapy in p16-positive head and neck cancer — Authors' reply, *The Lancet Oncology*, Volume 14, Issue 11, Pages e437 - e438, October 2013

VERMORKEN JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart JS, Jelic S, Betka J, Preiss JH, van den Weyngaert D, Awada A, Cupissol D, Kienzer HR, Rey A, Desauois I, Bernier J, Lefebvre JL, , EORTC 24971/TAX 323 Study Group. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 25;357(17):1695-704.

VOKES EE, Kies MS, Haraf DJ, Stenson K, List M, Humerickhouse R, Dolan ME, Pelzer H, Sulzen L, Witt ME, Hsieh Y-C, Mittal BB, Weichselbaum RR, Concomitant Chemoradiotherapy as Primary Therapy for Locoregionally Advanced Head and Neck Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, No 8 (April), 2000: pp 1652-1661

VOŠMIK M (2008), Radioterapie s modulovanou intenzitou v léčbě karcinomů hlavy a krku, *Onkologie* 2008; 2(2): 82–84, <http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/02/04.pdf>

WACHTER H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G and Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical

application, *Adv Clin Chem*, 1998, **27**: 81-141.

WIRLEITNER B, Reider D, Ebner S, Bock G, Widner B, Jaeger M, Schennach H, Romani N, Fuchs D., Monocyte – derived dendritic cells release neopterin, *J Leukocyt Biol*. 2002, 72, 1148

YANG Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ, (2006). Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 1;12(19):5817-25

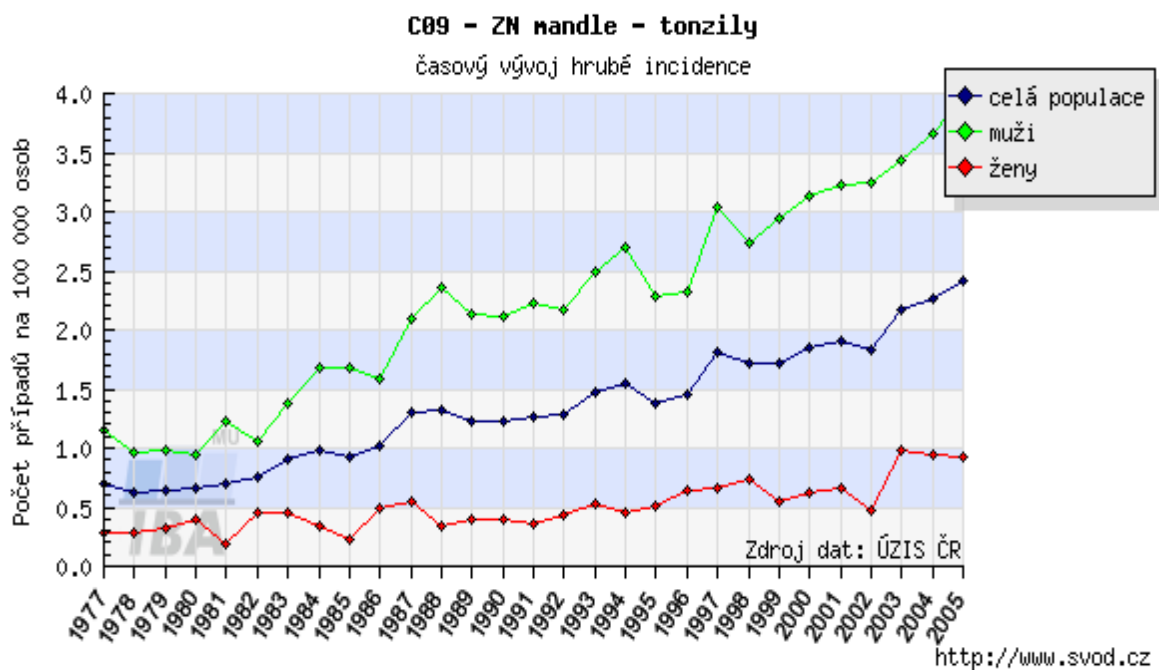
YOUNG RJ, Rischin D, Fisher R, McArthur GA, Fox SB, Peters LJ, Corry J, Lim A, Waldeck K, Solomon B, Relationship between Epidermal Growth Factor Receptor Status, p16INK4A, and Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, June 2011 20; 1230

10. Přílohy

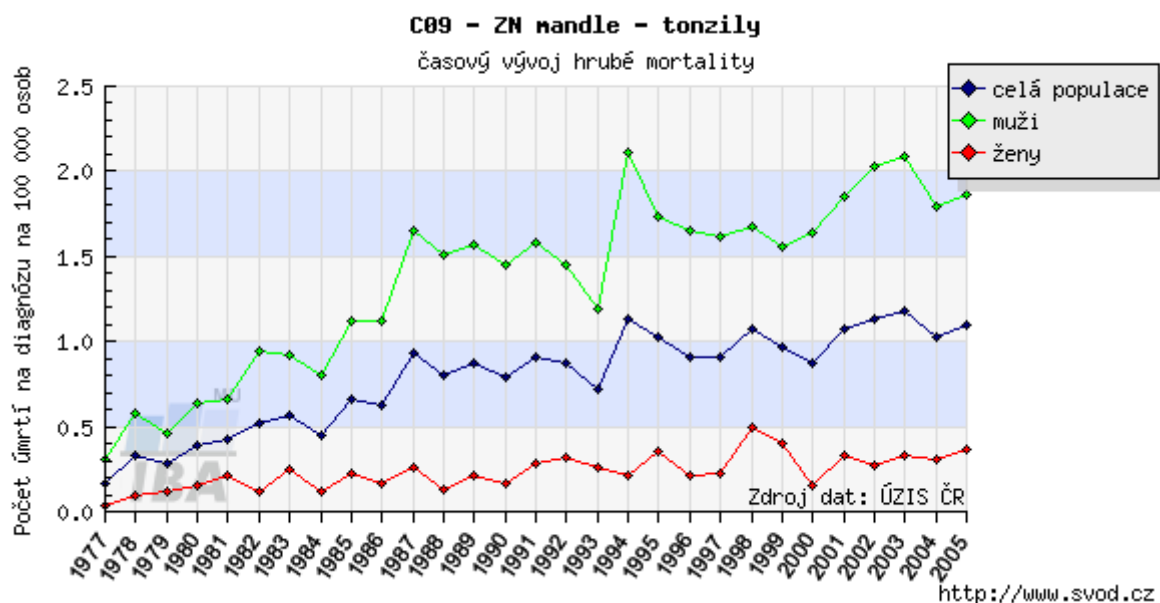
Příloha 1

Epidemiologie karcinomů hlavy a krku

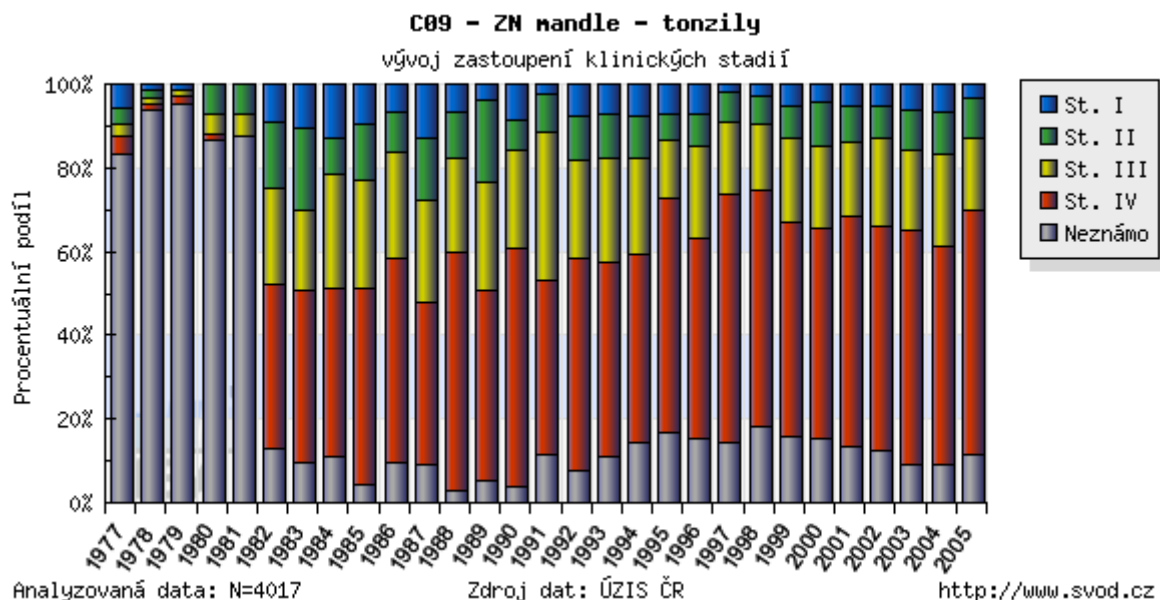
Časový vývoj hrubé incidence karcinomu tonzily – srovnání mužů a žen



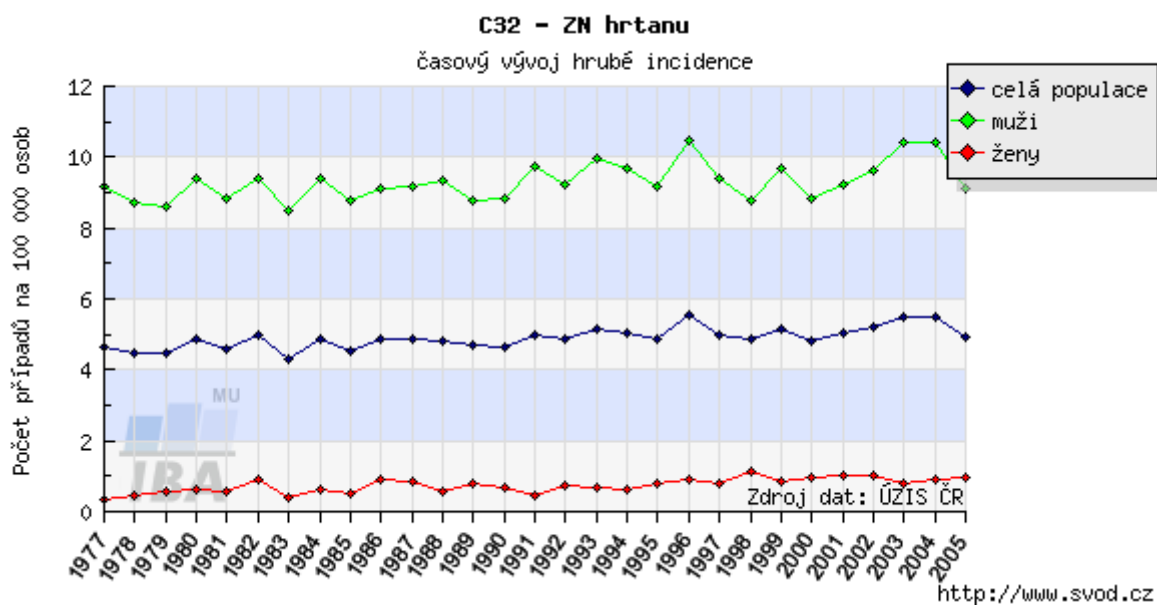
Časový vývoj hrubé mortality karcinomu tonzily – srovnání mužů a žen



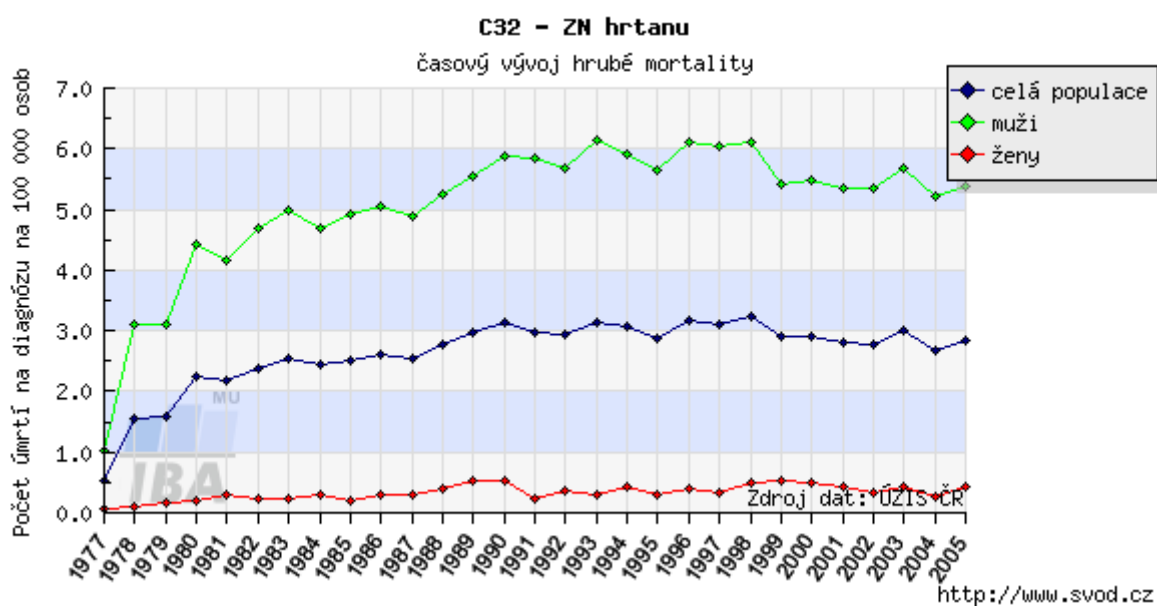
Zastoupení klinických stadií karcinomu mandle v čase



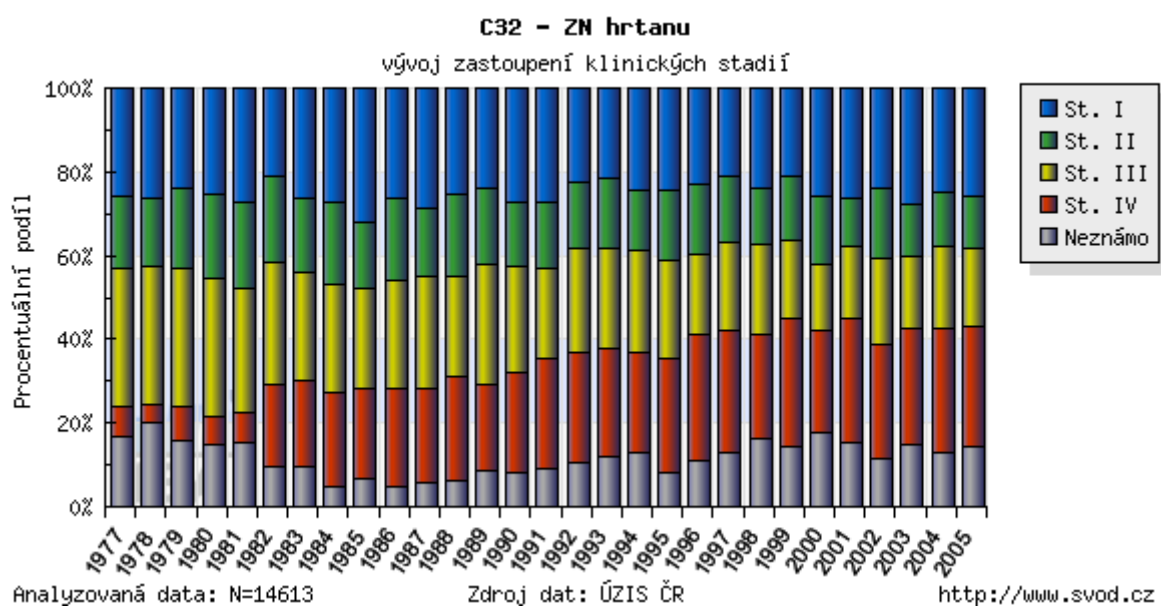
Časový vývoj hrubé incidence karcinomu tonzily – srovnání mužů a žen



Časový vývoj hrubé mortality karcinomu hrtanu – srovnání mužů a žen



Zastoupení klinických stadií karcinomu hrtanu v čase



Příloha 2

Hodnocení akutní toxicity podle RTOG, skórovací tabulka používaná v ÚRO NNB

Ústav radiační onkologie
FNB Praha

HODNOCENÍ AKUTNÍ TOXICITY LÉČBY

ozařovaná oblast: ORL

jméno:

hlavní číslo:

	týden								maximální toxicita v průběhu terapie
	před zahájením terapie	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
datum									
KPS									
hmotnost									
	RADIACNÍ TOXICITA (RTOG) / stupeň								
sliznice									
kůže									
slinné žlázy									
oči									
uši									
hrtan									
hltan									
horní GIT									
bolest									
	HEMATOLOGICKÁ TOXICITA (NCI) / stupeň								
leukopenie									
neutropenie									
anemie									
trombocytopenie									
	TOXICITA CHEMOTERAPIE (NCI) / stupeň								
renální toxicita									
nausea/ vomitus									
	TOXICITA AMIFOSTINU (NCI) / stupeň								
kožní									
nausea/ vomitus									
další									
	OSTATNÍ TOXICITA (NCI) / stupeň								

Příloha 3

Tabulka I – Koncentrace neopterinu v průběhu radioterapie
(Holeckova et al., 2013)

Table I. Urinary neopterin concentrations during the course of therapy.

Day	Pre-treatment	Day of week	Week 1		Week 2		Week 3		Week 4		Week 5		Week 6		Week 7								
			N	Mean±SD	p-Value	N	Mean±SD	p-Value	N	Mean±SD	p-Value	N	Mean±SD	p-Value	N	Mean±SD	p-Value						
-2	2	1	12	242±101	0.31	12	224±166	0.97	12	323±307	0.72	12	294±192	0.15	12	309±218	0.20	11	250±118	0.52	11	300±149	0.03
-1	12	2	12	267±100	0.13	12	270±209	0.46	12	290±223	0.52	12	285±292	0.68	12	204±115	0.96	11	248±122	0.58	11	290±146	0.04
0	12	3	12	278±170	0.17	12	289±146	0.15	12	324±153	0.05	12	315±341	0.56	12	244±153	0.37	11	278±107	0.07	10	245±116	0.23
		4	12	286±193	0.30	12	244±101	0.50	12	322±116	0.009	12	296±287	0.52	12	258±161	0.12	11	307±111	0.008	10	317±148	0.004
		5	12	279±164	0.38	12	255±111	0.79	12	303±148	0.13	12	326±317	0.15	12	243±147	0.64	11	301±156	0.02	10	312±99	0.005
		6	12	274±200	0.58	12	280±197	0.94	12	265±129	0.30	12	237±133	0.57	12	240±140	0.41	11	322±170	0.07	9	365±159	0.007
		7	12	284±236	0.85	12	277±251	0.85	12	243±119	0.79	12	280±255	0.73	12	241±87	0.86	11	288±100	0.02	5	298±98	0.13
Mean	213±93			273±146	0.08		263±124	0.30		296±131	0.06		290±248	0.27		287±195	0.27		285±110	0.01		310±118	0.003

The mean±standard deviations (SD) of neopterin concentrations in all evaluated patients on the respective days of therapy are shown. Daily neopterin concentrations were compared to visit 0 and the weekly means to the mean pre-treatment concentration.

Příloha 4

Tabulka II – Vliv změn koncentrace neopterinu na toxicitu radioterapie
(Holeckova et al., 2013)

Table II. *Effect of changes of urinary neopterin concentrations on the toxicity of therapy.*

Toxicity	Lag (days)	Regression coefficient estimate	95% Confidence interval		Odds ratio	95% Confidence interval		<i>p</i> -Value
Nausea	8	-0.000290	-0.000450	-0.000130	0.9997	0.9996	0.9999	0.0004
	7	-0.000190	-0.000340	-0.000030	0.9998	0.9997	1.0000	0.0193
	10	0.000168	0.000002	0.000334	1.0002	1.0000	1.0003	0.0477
	13	0.000199	0.000022	0.000376	1.0002	1.0000	1.0004	0.0277
	14	0.000183	0.000002	0.000364	1.0002	1.0000	1.0004	0.0475
Xerostomia	0	-0.000310	-0.000620	-0.000006	0.9997	0.9994	1.0000	0.0459
Upper gastrointestinal toxicity	6	0.001411	0.000353	0.002469	1.0014	1.0004	1.0025	0.0091
	8	0.001484	0.000333	0.002635	1.0015	1.0003	1.0026	0.0117
	23	0.003070	0.000663	0.005477	1.0031	1.0007	1.0055	0.0129

The regression coefficient estimates and odds ratios (with 95% confidence intervals and respective *p*-values) describing the effect of the change of urinary neopterin on the organ toxicities with the lag time (in days) are shown.

Příloha 5

Tabulka III – Vliv toxicity radterapie na koncentrace neopterinu v moči
(Holeckova et al., 2013)

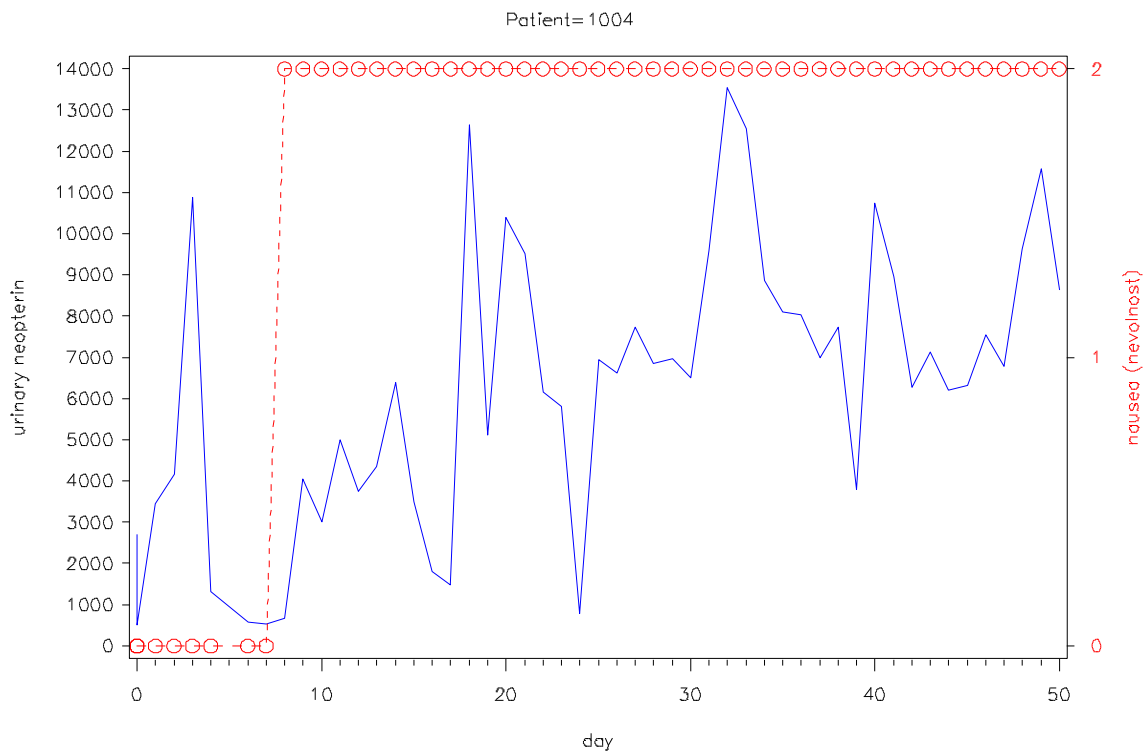
Table III. *Effect of toxicity of therapy on urinary neopterin concentrations.*

Toxicity	Lag (days)	Effect estimate	95% Confidence interval	p-Value
Nausea	14	0.3946	(0.1915; 0.5978)	0.0002
	15	-0.3962	(-0.5982; -0.1942)	0.0001
	10	0.2481	(0.0439; 0.4522)	0.02
	16	0.2188	(0.0137; 0.4239)	0.04
	23	0.2681	(0.0546; 0.4816)	0.01
	24	-0.2602	(-0.4768; -0.0435)	0.02
Vomiting	11	-0.2820	(-0.5382; -0.0258)	0.03
	24	-0.2995	(-0.5711; -0.0280)	0.03
Mucositis	21	0.3661	(0.1944; 0.5379)	<0.0001
	22	-0.3094	(-0.4835; -0.1352)	0.0005
	5	-0.1506	(-0.2908; -0.0103)	0.04
Skin toxicity	23	0.2345	(0.0561; 0.4129)	0.01
	6	0.2320	(0.0065; 0.4575)	0.04
	15	0.2836	(0.0090; 0.5582)	0.04
Xerostomia	6	0.2202	(0.0101; 0.4304)	0.04
	10	-0.2333	(-0.4305; -0.0361)	0.02
Laryngeal toxicity	3	0.2522	(0.0619; 0.4426)	0.01
	4	-0.2207	(-0.4072; -0.0341)	0.02
	20	0.2016	(0.0208; 0.3825)	0.03
Pharyngeal toxicity	9	0.1953	(0.0240; 0.3666)	0.03
	16	0.1912	(0.0232; 0.3592)	0.03
Upper gastrointestinal toxicity	21	0.2391	(0.050; 0.4283)*	0.01
Pain	14	0.1280	(0.0182; 0.2379)	0.02
Performance status	11	-0.4613	(-0.7999; -0.1227)	0.008
	14	0.7809	(0.4464; 1.1154)	<0.0001
	15	0.1722	(-0.7451; -0.0680)	0.02

Regression coefficient estimates (with 95% confidence intervals and respective p-values) characterizing the effect of the organ toxicities on urinary neopterin concentrations with the lag time (in days) are shown.

Příloha 6

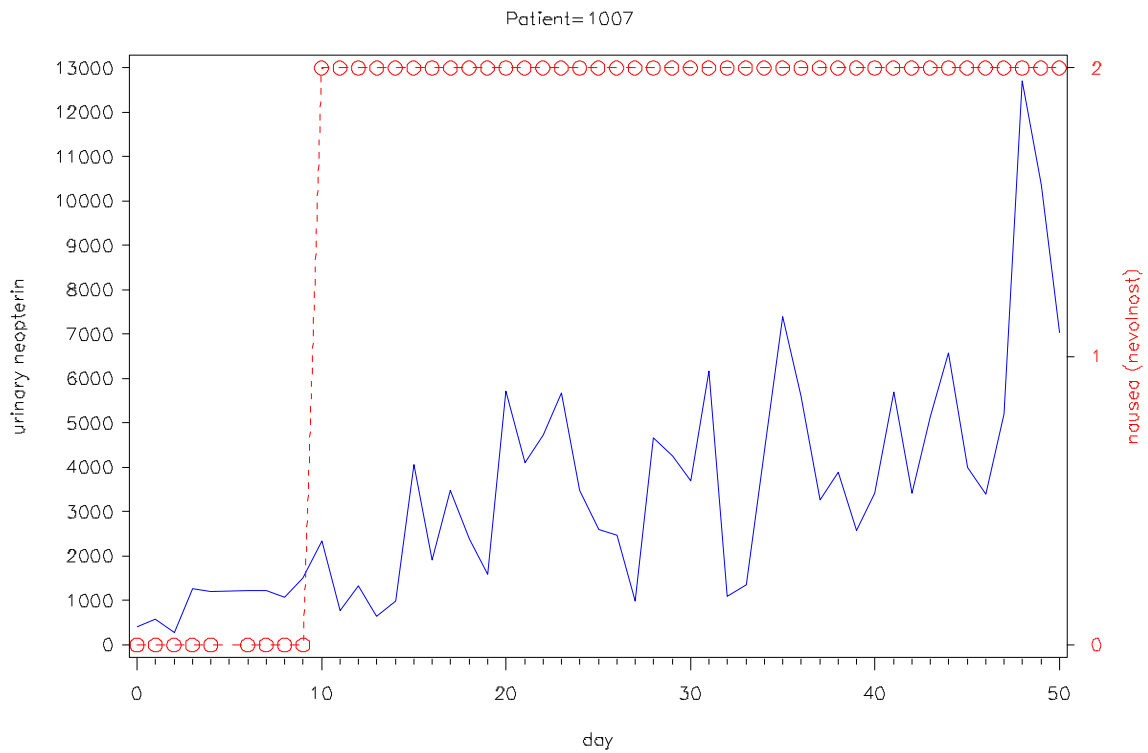
Nausea vs. concentration of neopterin in urine



Significance of correlation coefficients neopterin vs nausea

Patient = 1004		
lag	korelace	PROB
0	0.3387	0.0161
1	0.2422	0.0936
2	0.1320	0.3711
3	0.0105	0.9441
4	0.1575	0.2959
5	0.1257	0.4107

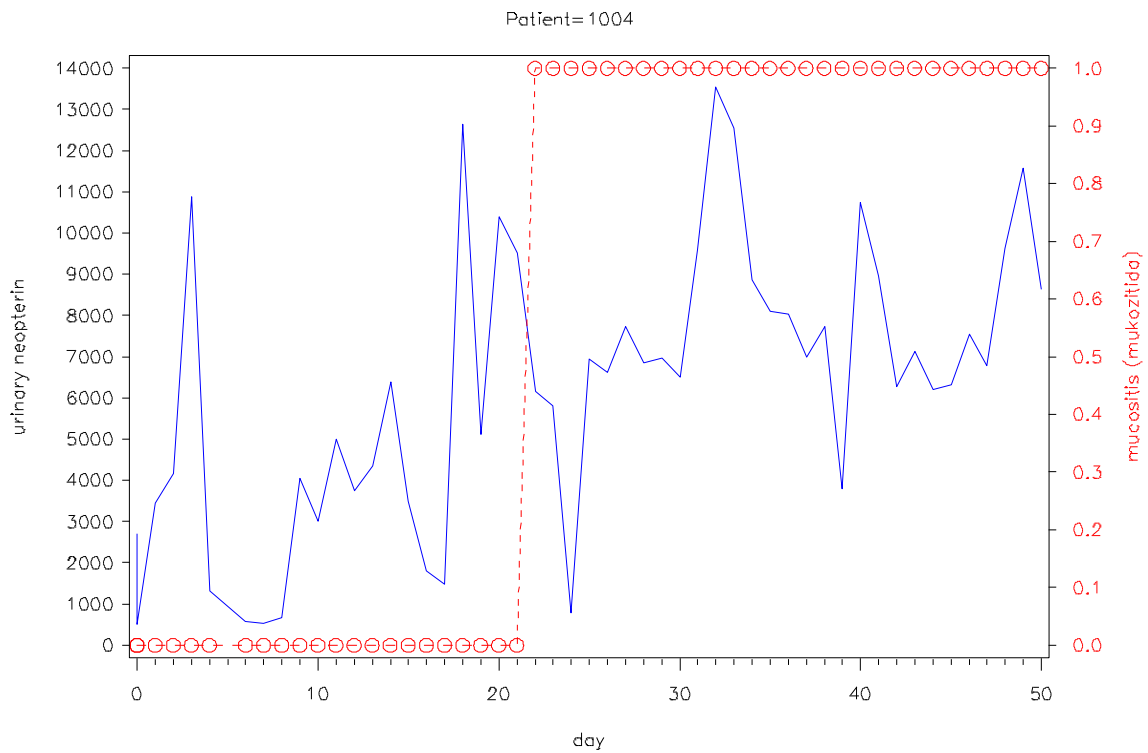
Nausea vs. concentration of neopterin in urine



Significance of correlation coefficients neopterin vs nausea

Patient = 1007		
lag	korelace	PROB
0	0.4363	0.0017
1	0.4109	0.0037
2	0.3899	0.0067
3	0.4123	0.0044
4	0.3752	0.0111
5	0.3384	0.0247

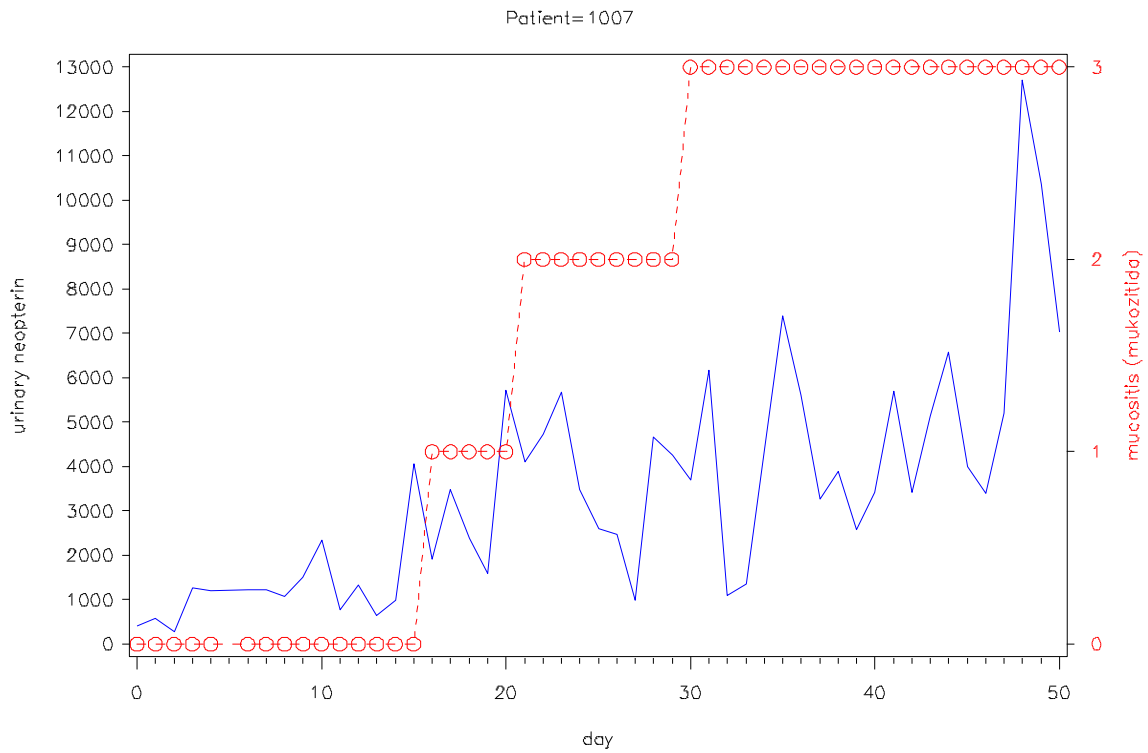
Mucositis vs. concentration of neopterin in urine



Significance of correlation coefficients neopterin vs mucositis

Patient = 1004		
lag	korelace	PROB
0	0.4661	0.0006
1	0.4927	0.0003
2	0.5762	< 0.0001
3	0.5386	0.0001
4	0.5860	< 0.0001
5	0.5430	0.0001
6	0.4743	0.0011
7	0.4461	0.0027
8	0.4739	0.0015
9	0.4451	0.0035
10	0.4631	0.0026
11	0.4850	0.0018
12	0.3341	0.0404

Mucositis vs. concentration of neopterin in urine



Significance of correlation coefficients neopterin vs mucositis

Patient = 1007		
lag	korelace	PROB
0	0.6173	< 0.0001
1	0.6379	< 0.0001
2	0.6297	< 0.0001
3	0.6498	< 0.0001
4	0.6341	< 0.0001
5	0.6098	< 0.0001
6	0.6296	< 0.0001
7	0.6329	< 0.0001
8	0.6185	< 0.0001
9	0.6178	< 0.0001
10	0.6296	< 0.0001
11	0.6180	< 0.0001
12	0.6197	< 0.0001

Příloha 7

Tabulka průměrů \pm standardních odchylek hladin retinolu, α - tokoferolu a neopterinu pro jednotlivé návštěvy, $p \leq 0.05$, * $p < 0.01$ při porovnání s odběrem před zahájením terapie (soubor 12 pacientů)

visit	n	time (days)	retinol (mmol/L)	alpha- tocopherol	neopterin (μ mol/mol creatinine)
0	12	-6 \pm 3	1.49 \pm 0.74	18.20 \pm 7.50	214 \pm 95
1	12	5 \pm 3	1.12 \pm 0.58§	16.69 \pm 6.06	230 \pm 114
2	12	12 \pm 3	1.00 \pm 0.53*	16.92 \pm 4.87	314 \pm 210
3	12	19 \pm 3	1.00 \pm 0.64§	15.75 \pm 4.07	255 \pm 111
4	12	26 \pm 3	0.83 \pm 0.47*	16.11 \pm 4.64	278 \pm 195
5	12	34 \pm 3	0.83 \pm 0.46*	16.08 \pm 4.33	288 \pm 257
6	11	42 \pm 4	0.90 \pm 0.42*	17.24 \pm 3.94	260 \pm 108§
7	10	48 \pm 4	1.06 \pm 0.67§	19.35 \pm 4.68	357 \pm 164*