

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



**Prognostické a prediktivní markery  
u nádorů hlavy a krku**

**David Kalfěřt**

Autoreferát disertační práce

**Doktorský studijní program: Chirurgie**

**Hradec Králové**

**2015**

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Chirurgie na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: **MUDr. David Kalfeřt**  
Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku,  
LF UK a FN v Hradci Králové

Školitel: **doc. MUDr. Jan Vokurka, CSc.**  
Department of ORL/HNS, University of Umeå,  
Norrlands University Hospital, Umeå, Sweden

Školitel konzultant: **doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.**  
Ústav biologie, LF UK v Plzni

Oponenti: **prof. MUDr. Jan Plzák, Ph.D.**  
Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku,  
1. LF UK a FN v Motole, Praha

**doc. MUDr. Svetlana Brychtová, Ph.D.**  
Ústav klinické a molekulární patologie,  
LF UP a FN Olomouc

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Chirurgie  
dne..... v..... od ..... hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu *GAUK č. 444311, Grantu s podporou vnitřní soutěže Lékařské fakulty UK v Hradci Králové 2010, Programu rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36) a Projektem Ministerstva zdravotnictví (Projekt koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00669806 – FN Plzeň).*

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

doc. MUDr. RNDr. Milan Kaška, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Chirurgie  
Garant studijního programu

# Obsah

Souhrn.....	3
Summary.....	4
1 Úvod do problematiky .....	5
1.1 Obecná charakteristika nádorových markerů .....	5
1.2 Nádorové markery studované v disertační práci .....	5
2 Cíle disertační práce .....	6
3 Metodika a soubor .....	6
3.1 Studie 1 - sérové matrixové metaloproteinázy .....	7
3.2 Studie 2 - tkáňové proteiny p16, p53 a galektin-3.....	8
3.3 Studie 3 - tkáňové markery – mikroRNA.....	9
3.4 Statistické metody.....	10
4 Výsledky.....	10
4.1 Studie 1 - sérové matrixové metaloproteinázy .....	10
4.2 Studie 2 - tkáňové proteiny p16, p53 a galektin-3.....	11
4.3 Studie 3 - tkáňové markery – mikroRNA.....	11
5 Diskuze .....	12
5.1 Studie sérových matrixových metaloproteináz.....	13
5.2 Studie tkáňových proteinů p16, p53 a galektinu-3 .....	15
5.3 Studie vybraných tkáňových mikroRNA .....	17
6 Závěry.....	18
6.1 Závěry vyplývající z provedených studií.....	18
6.2 Závěry pro praxi .....	20
7 Vybraná použitá literatura .....	20
8 Přehled publikační činnosti autora .....	25

## Souhrn

**Úvod.** Dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku (HNSCC) je agresivní nádor s nepříznivou prognózou navzdory pokrokům v léčbě v posledních desetiletích. HNSCC se vyznačuje klinicko-patologickou a biologickou heterogenitou, což činí obtíže při klinickém rozhodování. Proto je nezbytné lépe porozumět jeho molekulární patobiologii. Cílem našich studií bylo analyzovat expresní profil a možnou prognostickou a prediktivní roli vybraných sérových matrixových metaloproteináz (MMP), tkáňových mikroRNA (miR) a proteinů p16, p53 a galektinu-3 s ohledem na lokalitu nádoru (orofarynx, hypofarynx a larynx) a na klinicko-patologické parametry.

**Materiál a metody.** Byly provedeny 3 studie (1. studie: prospektivní, 46 pacientů, analýza předoperačních sérových hladin MMP-1, MMP-2 a MMP-9 multiplexovou metodou MAGPIX (Luminex, TX, USA); 2. studie: retrospektivní, 58 pacientů, imunohistochemická analýza p16, p53 a galektinu-3; 3. studie: retrospektivní: 51 pacientů, analýza let-7a, miR-21, miR-34a, miR-200c a miR-375 kvantitativní real-time PCR.

**Výsledky.** Statisticky signifikantní rozdíl sérových hladin MMP mezi jednotlivými lokalitami karcinomů nebyl nalezen. Byla potvrzena statisticky významná korelace mezi p16 pozitivitou a orofaryngeálním karcinomem, MMP-1 a p16 pozitivitou, recidivou a kouřením.

V porovnání s nenádorovou tkání byly v nádorech miR-21, miR-200c, miR-34a up-regulovány a miR-375 byla down-regulována. Signifikantní rozdíl hladin let-7a, miR-200c, miR-34a byl nalezen mezi karcinomy orofaryngu a laryngu ( $p < 0,05$ ). MiR-34a signifikantně korelovala s orofaryngem ( $p = 0,0284$ ) a p16 pozitivitou ( $p = 0,0218$ ) a tato up-regulace nebyla dosud popsána.

**Závěry.** MMP-1,-2,-9 a deregulace miR-21, miR-200c a miR-375 mohou být považovány za faktory podílející se na patobiologii, progresi a šíření HNSCC, a to bez ohledu na místo nádoru. Expres let-7a a miR-34a podporují hypotézu o rozdílné kancerogenezi HNSCC v závislosti na anatomické lokalitě.

## Summary

### Prognostic and predictive markers of the head and neck tumors

**Introduction.** Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is aggressive tumor with unfavorable prognosis despite the improved therapy in the last decades. HNSCC with its clinicopathological and biological heterogeneity remains difficult to be clinically managed. Therefore, a better understanding its molecular pathobiology is required. The aim of our studies was to analyze the expression profile and possible prognostic and predictive role of selected matrix metalloproteinases (MMP), microRNAs (miR) and proteins p16, p53 and galectin-3 in HNSCC with respect to tumor location (oropharynx, larynx, hypopharynx) and clinicopathological parameters.

**Material and Methods.** Three studies were performed (1. study: prospective, 46 patients, analysis of preoperative serum levels of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 by multiplex method MAGPIX (Luminex, TX, USA); 2. study: retrospective, 58 patients, immunohistochemical analysis of p16, p53 and galectin-3; 3. study: retrospective, 51 patients, analysis of tissue let-7a, miR-21, miR-34a, miR-200c, and miR-375 by real-time quantitative PCR method.

**Results.** Statistically significant differences in serum levels of MMPs between cancers of different locations were not found. Significant correlations were confirmed between p16 positivity and oropharyngeal cancer, MMP1 and p16 positivity, and recurrence and smoking.

Compared to non-neoplastic tissue, miR-21, miR-200c, miR-34a were up-regulated and miR-375 was down-regulated in tumors of all sites. Significant differences of let-7a, miR-200c, miR-34a levels between oropharyngeal and laryngeal cancers were found ( $p < 0.05$ ). MiR-34a significantly correlated with oropharyngeal origin ( $p = 0.0284$ ) and p16 positivity ( $p = 0.0218$ ) and this upregulation has not been so far described.

**Conclusions.** MMP-1,-2,-9 and deregulated miR-21, miR-200c, and miR-375 can be considered as factor regulating pathobiology, progression and spreading of HNSCC irrespective to tumor location. Let-7a and miR-34a expression support hypothesis on site-specific cancerogenesis in HNSCC.

# 1 Úvod do problematiky

Karcinomy hlavy a krku vyrůstají z epitelu horních cest dýchacích. Většinou se jedná o karcinom dlaždicobuněčný neboli spinocelulární (zkratka HNSCC z angl. head and neck squamous cell carcinoma), jehož etiologickými faktory jsou kouření cigaret, požívání alkoholu a infekce lidským papilomavirem (HPV) (Ramqvist et Dalianis, 2011). Navzdory stejnému histologickému typu nádoru vykazují HNSCC rozdílné biologické chování a odlišné molekulárně biologické pozadí v závislosti na anatomické lokalitě tumoru. Tradiční prognostické a prediktivní ukazatele nepostačují zcela k určení klinického chování a léčby těchto nádorů. Proto se v současné době studium těchto nádorů zaměřuje na molekulární markery a jejich diagnostickou, prognostickou i prediktivní roli v dlaždicobuněčných karcinomech hlavy a krku.

## 1.1 Obecná charakteristika nádorových markerů

Každá měřitelná jednotka použitelná k hodnocení abnormální patobiologie nádorových buněk a tkání, jejich typu a klinického chování se nazývá nádorový marker. Na základě jejich úlohy v onkologii a v onkopatologii se nádorové markery rozdělují na diagnostické, prognostické a prediktivní. Vedle tradičních nádorových ukazatelů (např. velikost, grading a staging nádoru) se v poslední době uplatňují markery molekulární, které můžeme detekovat přímo v nádorové tkáni nebo v tělesných tekutinách.

## 1.2 Nádorové markery studované v disertační práci

Ke studiu nádorových markerů v dlaždicobuněčných karcinomech hlavy a krku jsme zvolili různé typy markerů tak, abychom co nejlépe přispěli ke zmapování patobiologického procesu v uvedených nádorech, a to zejména s ohledem na jednotlivé lokality a na různé klinické chování nádorů. Při výběru nádorových markerů jsme vycházeli jednak ze známého klíčového podílu některých markerů na kancerogenezi nádorů jiných primárních lokalit, jednak jsme chtěli ověřit přínos některých nových markerů pro objasnění nádorového procesu v HNSCC.

Zaměřili jsme se jednak na markery, u nichž již byla prokázána souvislost s progresí u jiných nádorů než HNSCC (matrixové metaloproteinázy; MMP-1, MMP-2, MMP-9) s cílem ověřit, zda je tomu

tak i v karcinomech hlavy a krku a v jejich jednotlivých lokalitách. Dále jsme chtěli zjistit úlohu vybraných proteinových markerů v patobiologickém procesu nádorů specifických lokalit (p16, p53 a galectin-3) a roli některých mikroRNA molekul (let-7a, miR-21, miR-200c, miR-375 a miR-34a) jakožto nově definované skupiny nádorových ukazatelů. Zabývali jsme se analýzou jak markerů sérových, tak markerů tkáňových.

## **2 Cíle disertační práce**

**Hlavní cíle disertační práce jsou následující:**

1. Stanovení a porovnání expresního profilu vybraných nádorových markerů (sérových matrixových metaloproteináz MMP-1, MMP-2 a MMP-9; tkáňových proteinů p16, p53 a galectinu-3; miR-21, miR-34a, miR-200c, miR-375 a let-7a) v dlaždicobuněčných karcinomech orofaryngu, laryngu a hypofaryngu.
2. Studium korelace exprese studovaných nádorových markerů (viz bod 1.) s vybranými klinicko-patologickými ukazateli (zejména gradingem a stagingem nádorů, agresivitou a metastatickou potencií a s odpovědí na léčbu), a to jak v rámci všech HNSCC, tak v rámci skupin dlaždicobuněčných karcinomů dle lokalit.
3. Posouzení vhodnosti vyšetřovaných nádorových markerů pro diagnostiku, pro predikci a prognózu v rutinní klinické praxi a na základě dosažených výsledků odhad dalšího směru vlastního výzkumu v oblasti dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku.

## **3 Metodika a soubor**

Vybrané nádorové markery byly analyzovány v rámci dvou prospektivních a jedné retrospektivní studie na třech samostatně definovaných souborech pacientů (Tab. 1), u nichž byl diagnostikován dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku. Zařazení pacientů do jednotlivých souborů bylo určeno zejména načasováním studie (prospektivní, retrospektivní), charakterem vyšetřovaných vzorků (sérum, nádorová tkáň), dostupností vhodných vzorků (archivované parafínové bloky), histologickým typem (dlaždicobuněčný karcinom)

a lokalizací nádoru (orofaryngu, hypofaryngu a laryngu). Všichni pacienti ve studovaných souborech podstoupili primární chirurgickou léčbu dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice Hradec Králové, pacienti v prospektivní studii byli detailně informováni o průběhu studie a podepsali informovaný souhlas (schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové; číslo 201105 S14P). Všechny nádory byly histologicky ověřeny a v rámci rutinního diagnostického procesu byl u nich imunohistochemicky stanoven p16 status (p16 pozitivita = exprese v 51-100 % nádorových buněk; p16 negativita = exprese v 0-50 % nádorových buněk) (Chernock et al 2013). Klinické údaje jsme získali jednak při osobním pohovoru s pacientem, jednak z nemocniční databáze.

**Tab. 2: Studované soubory pacientů**

Studie č. - soubor pacientů č.	Analyzovaný materiál	Studované markery
1	sérum	MMP-1; MMP-2; MMP-9
2	nádorová tkáň	Proteiny p16, p53, gal-3
3	nádorová tkáň	mikroRNA (let-7a, miR-21, miR-200c, miR-34a, miR-375)

### 3.1 Studie 1 - sérové matrixové metaloproteinázy

Prospektivní studie se uskutečnila od července 2009 do prosince 2012 a zahrnovala 46 pacientů (karcinom orofaryngu/21 pacientů; hypofaryngu/4; laryngu/21). V souboru převažovali muži (38) nad ženami (8) a kuřáci (32; 69,6 %) nad nekuřáky (14; 30,4 %). Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo od 46 do 85 let, při věkovém průměru 60 let a mediánu 60 let. Staging nádoru byl proveden dle současně platné TNM klasifikace. Častěji se vyskytovaly pokročilejší tumory ve stádiu III-IV (33; 71,7 %) než nádory ve stádiu I-II (13; 28,3 %). Metastázy v uzlinách byly prokázány u 26 (56,5 %) pacientů. Více nádorů bylo dobře nebo středně diferencovaných (32; 69,6 %). Chirurgická léčba s ev. následnou onkologickou terapií (radio- či chemoradioterapie) byla



volena v závislosti na rozsahu a primární lokalitě onemocnění. Perzistence či recidiva nádoru byla za sledované období prokázána u 7 (15,2 %) pacientů.

### **Metodika vyšetření nádorových markerů**

*Odběr krve a příprava krevního séra.* Žilní krev (cca 10ml) byla odebrána v den plánované operace mezi 7 a 9 hodinou ranní za podmínek standardních pro venepunkci. Po koagulaci bylo sérum separováno centrifugací po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Získané analyty byly ihned zamraženy a uchovávány při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Vzorky byly rozmrazeny až před vlastní analýzou.

*Multiplexová analýza hladin MMP v krevním séru.* Koncentrace MMP-1, MMP-2 a MMP-9 v séru byla vyšetřována metodou multiplexového stanovení, které bylo prováděno na multiplexovém přístroji MAGPIX (Luminex corp. Austin, TX, USA) komerčně dostupným kitem (Human MMP Panel 2 Milliplex MAP Magnetic Bead kit) od firmy EMD Millipore Corporation, USA. Principem multiplexové analýzy je vazba antigenu na protilátku kovalentně vázanou na povrchu barevně kódovaných magnetických mikrokuliček s tzv. spektrálním kódem. MAGPIX kombinuje fluidní systém, mechanický systém, elektronický systém, optický systém s magnetickými mikrokuličkami a komplexní počítačovou analýzou k provedení multiplexních testů. Analýza uložených obrazů je provedena programem xPONENT® software a spočívá v klasifikaci (tj. určení typu) a kvantifikaci zkoumané látky. Vyhodnocení je provedeno pomocí kalibrační křivky pro každý analyt. Výstupem je hodnota hladiny sledované látky v pg/ml.

### **3.2 Studie 2 - tkáňové proteiny p16, p53 a galektin-3**

Do retrospektivní studie bylo zařazeno 58 pacientů primárně chirurgicky léčených pro glotický dlaždicobuněčný karcinom hrtanu (LSCC) v období 2001 až 2009. V souboru převažovali muži (54) nad ženami (4) a kuřáci (48; 82,8 %) nad nekuřáky (10; 17,2 %). Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo od 28 do 79 let, při věkovém průměru 62,6 let a mediánu 63 let. Nádorové onemocnění bylo dle platné TNM klasifikace hodnoceno nejčastěji jako stádium I (43; 74,1 %) a II (10; 17,2 %), pokročilejší tumory ve stádiu III-IV se vyskytovaly vzácněji (5; 8,6 %). Metastázy v uzlinách byly prokázány u 4 (6,9 %)

pacientů. Většina nádorů byla středně diferencovaných (36; 62,1 %), následovaly nádory dobře (11; 19 %) a nízcí (11; 19 %) diferencované. Perzistence či recidiva nádoru byla do 4 let od primární diagnostiky prokázána u 9 (15,5 %) pacientů

### **Metodika vyšetření nádorových markerů**

V archivu Fingerlandova ústavu patologie FNHK byly vyhledány parafinové bločky nádorů, z nichž byly zhotoveny histologické řezy (4 µm silné) pro imunohistochemickou analýzu p16, p53 a galektinu-3 (gal-3).

Pro *detekci proteinu p16* byl použit CINtec® Histology Kit (Roche mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany). Jako pozitivní kontrola sloužil preparát cervikální intraepitální neoplasie stupně III. Nádor byl považován za p16 pozitivní v případě 51-100 % exprimujících nádorových buněk (Chernock et al., 2013). *Detekce p53* byla provedena s monoklonální protilátkou proti proteinu p53 (ředění 1:50 klon D07, BioGenex, Fremont, CA). Jako pozitivní kontrola byl použit p53 pozitivní karcinom mléčné žlázy, přičemž nádor byl považován za p53 pozitivní v případě 6-100 % pozitivních buněk v každém nádoru (Jalali et al., 2011).

Pro *detekci galektinu-3* byla použita monoklonální protilátka proti gal-3 (ředění 1: 100, klon 9C4, Novocastra, Newcastle, UK) od Roche Benchmark Ultra (Roche, Basel, Switzerland). Pozitivní kontrola byla provedena na preparátu papilárního karcinomu štítné žlázy. Hnědé zbarvení cytoplazmy buněk bylo hodnoceno jako pozitivní. Nádor byl považován za gal-3 pozitivní v případě pozitivity 6-100 % nádorových buněk (Piantelli et al., 2002).

### **3.3 Studie 3 - tkáňové markery – mikroRNA**

Prospektivní studie byla provedena od července 2009 do prosince 2012 na souboru 51 pacientů (karcinom orofaryngu/23 pacientů; hypofaryngu/4; laryngu/24). V souboru převažovali muži (41) nad ženami (10). Věkové rozmezí pacientů 45-85 let, průměr 60,3 let a mediánu 60 let. Kuřáci (38; 74,5 %) převažovali nad nekuřáky (13; 25,5 %). Nádor byl posuzován dle současně platné TNM klasifikace. Tumory ve stádiu III-IV (37; 72,5 %) byly častější než nádory stádia I-II (14; 27,5 %). Metastázy v uzlinách byly prokázány u 27 (52,9 %) pacientů. Více nádorů bylo dobře anebo středně

diferencovaných (30; 58,8 %). Perzistence či recidiva nádoru byla za sledované období prokázána u 8 (15,7 %) pacientů.

### **Metodika vyšetření nádorových markerů**

*Příprava vzorků tkání a RNA izolace.* Resekáty byly fixovány formalínem a vybrané vzorky nádorové i nenádorové tkáně byly zpracovány standardní laboratorní technikou na parafínové bločky (metoda FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded). Na parafínových řezech obarvených hematoxylinem a eozinem byla ručně označena nádorová i nenádorová tkáň vhodná pro makrodisekci, která byla následně provedena na 50  $\mu\text{m}$  silných řezech. Celkem byla pro extrakci RNA použita tkáň o ploše cca 1  $\text{cm}^2$ . Bylo připraveno celkem 51 párů (nádorová a nenádorová tkáň) vzorků tkání. RNA izolace byla provedena metodou miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Německo).

*Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR).* Kvantitativní stanovení let-7a, miR-21, miR-200c, miR-34a, miR-375 a U6snRNA bylo provedeno metodou qRT-PCR detekčním systémem TaqMan® MicroRNA Assays (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), Každý vzorek byl hodnocen paralelně dvakrát. Testy cílily pouze zralé mikroRNA, RNU6B (U6snRNA) byla použita jako kontrola pro normalizaci hladiny exprese.

### **3.4 Statistické metody**

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno programy SAS 9.2 a IBM SSPS Statistic 21. Ke statistickému popisu souborů byly použity metody deskriptivní statistiky a neparametrické testy (Wilcoxonův dvouvýběrový test, Kruskal-Wallisův test, Pearsonova chí-kvadrát nebo Fisherův přesný test). Hladina statistické významnosti byla stanovena na hladině  $p < 0,05$ .

## **4 Výsledky**

### **4.1 Studie 1 - sérové matrixové metaloproteinázy**

Při hodnocení celého souboru (bez ohledu na anatomickou lokalitu) byly nalezen statisticky signifikantně vyšší sérové hladiny MMP-1 a MMP-9 u nádorů s vysokým (III a IV) stadiem onemocnění ( $p=0,0415$ ;  $p=0,0439$ ); dále statisticky významně vyšší sérové hladiny MMP-1 u pacientů s nádory p16 negativními ( $p=0,0179$ ), s recidivou/perzistencí

onemocnění ( $p=0,0247$ ) a u kuřáků. Hladina MMP-2 byla signifikantně vyšší u níže diferencovaných nádorů ( $p=0,0114$ ). Sérová hladina MMP-1 a MMP-9 byla také zvýšena u níže diferencovaných nádorů, ale rozdíl nebyl statisticky významný. Nebyl nalezen signifikantní vztah mezi sérovými hladinami MMP a uzlinovým statusem.

U podskupiny pacientů s karcinomem orofaryngu byl prokázán statisticky významný rozdíl sérových hladin MMP-2 mezi skupinami s uzlinovými metastázami a bez nich ( $p=0,0481$ ) s vyšší hladinou u pacientů s metastázami a nalezena signifikantní korelace p16 pozitivity s karcinomem orofaryngu ( $p=0,0001$ ) a s jeho metastázami do krčních lymfatických uzlin ( $p=0,0366$ ), nekuřáctvím ( $p=0,0001$ ) a absencí recidivy/perzistence ( $p=0,0278$ ).

U podskupiny pacientů s karcinomem laryngu byla prokázána statisticky významně vyšší sérová hladina MMP-1 u kuřáků ( $p=0,0384$ ) a MMP-2 ( $p=0,0140$ ) u pacientů s níže diferencovaným nádorem a nižší sérová hladina MMP-9 u pacientů s recidivou/perzistencí ( $p=0,0430$ ).

#### **4.2 Studie 2 - tkáňové proteiny p16, p53 a galektin-3**

Expres p16 byla hodnocena jako pozitivní u 5 (8,6 %) pacientů. Pozitivní exprese p16 byla prokázána převážně u nekuřáků (4 z 5 pacientů) a současně byl nalezen statisticky významný vztah exprese p16 k nekuřáctví pacientů ( $p=0,002$ ). U žádného z dalších sledovaných parametrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinou p16 pozitivních a p16 negativních. Nicméně lze pozorovat určitou tendenci k příznivějšímu průběhu onemocnění u skupiny p16 pozitivních (vždy I. stádium choroby, nikdy uzlinové metastázy, nikdy perzistence či recidiva nádoru).

Jako pozitivní byla exprese p53 hodnocena u 38 (65,5 %) pacientů. U žádného ze sledovaných parametrů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinou p53 pozitivních a p53 negativních. Celkem 31 (53,5 %) pacientů vykazovalo pozitivní expresi galektinu-3. U žádného ze sledovaných parametrů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinou gal-3 pozitivních a gal-3 negativních.

#### **4.3 Studie 3 - tkáňové markery – mikroRNA**

Expres studovaných mikroRNA v nádorové a nenádorové tkáni (bez ohledu na anatomickou lokalitu nádoru) u téhož pacienta se statisticky

významně lišila u miR-21 ( $p=0,0001$ ), miR-200 ( $p=0,0335$ ) a miR-375 ( $p=0,0020$ ). MiR-21 a miR-200 byly v nádorové tkáni zvýšeně exprimovány, produkce miR-375 byla snížena. U karcinomu orofaryngu byla vyšší exprese miR-34a v nádorové tkáni než v nenádorové ( $p=0,0155$ ). V karcinomech orofaryngu byla signifikantně vyšší exprese let-7a ( $p=0,0242$ ), miR-200c ( $p=0,0378$ ) a miR-34a ( $p=0,0178$ ) než v karcinomech laryngu. U všech nádorů ve zkoumaném souboru (bez ohledu na lokalitu nádoru) byla nalezena statisticky významně zvýšená exprese let-7a a miR-200c u pokročilých stádií (III-IV) onemocnění ( $p=0,0204$ ; resp.  $p=0,0492$ ). Dále byla prokázána signifikantně zvýšená exprese miR-200c ( $p=0,0092$ ) u nízké diferencovaných HNSCC (G3) a miR-375 ( $p=0,0231$ ) u pacientů s metastázami karcinomu laryngu do krčních uzlin (N1-3). Statisticky významně zvýšená exprese miR-21 ( $p=0,0005$ ) a snížená exprese miR-375 ( $p=0,0010$ ) v nádorové tkáni v porovnání s nenádorovou tkáni byla prokázána u kuřáků.

Pozitivita proteinu p16 signifikantně korelovala s orofaryngeální lokalitou karcinomu ( $p=0,0001$ ). U karcinomů orofaryngu byl prokázán statisticky významný vztah mezi p16 pozitivitou a nekuřáctvím pacientů ( $p=0,0428$ ) a odpovědí na léčbu ( $p=0,0018$ ). Při hodnocení celého souboru, bez ohledu na anatomickou lokalitu, byl statisticky významný vztah prokázán mezi p16 pozitivitou a výskytem metastáz do krčních uzlin ( $p=0,0173$ ), nekuřáctvím pacientů ( $p=0,0001$ ) a s nádory bez recidivy či perzistence ( $p=0,0294$ ).

Snížená exprese miR-375 v nádorové tkáni signifikantně souvisela s p16 negativitou ( $p=0,0038$ ) s výjimkou orofaryngu, kde byla statisticky významně vyšší u p16 negativních v porovnání s p16 pozitivními nádory ( $p=0,0441$ ). MiR-34a byla statisticky zvýšeně exprimována u orofaryngeálních karcinomů p16 pozitivních ( $p=0,0218$ ). U miR-21, let-7a a miR-200c korelace s expresí p16 nebyla prokázána.

## 5 Diskuze

HNSCC jsou považovány, i přes pokroky v terapii v posledních desetiletích, za agresivní nádory s nepříznivou prognózou. Nádory hlavy a krku jsou převážně studovány společně, bez ohledu na anatomickou lokalitu nádoru. Avšak rozmanitost chování těchto nádorů v závislosti na anatomické lokalitě a specifické nádorové vlastnosti známé z klinické

praxe pravděpodobně odráží různé dráhy kancerogeneze (Silva et al., 2012, Tamas et al., 2011). Vzhledem k tomu se pro studium a objasnění patobiologie a optimalizace diagnosticko-terapeutického přístupu těchto nádorů jeví vhodnější studie zaměřené pouze na určitou anatomickou lokalitu HNSCC (Tamas et al., 2011). Z výše uvedených důvodů jsme se v naší studii zaměřili na studium vybraných národových markerů ve vztahu ke klinicko-patologickým parametrům, ale také na specifikaci rozdílné onkogeneze HNSCC ve vztahu k anatomické lokalitě. Výsledky jednotlivých studií jsou diskutovány samostatně.

## **5.1 Studie sérových matrixových metaloproteináz**

Matrixové metaloproteinázy mají často protichůdné role v nádorové patobiologii (Hadler-Olsen et al., 2013). Recentně byly publikovány studie zaměřené na diagnostický a prognostický význam MMP v HNSCC, avšak jejich výsledky jsou rozporné a navzájem těžko srovnatelné, neboť výzkumy byly provedeny na rozdílně strukturovaných souborech pacientů s HNSCC, různými diagnostickými postupy a byly hodnoceny různé typy MMP (Wang et al., 2013). Málo je také v současné době známo o sérových hladinách MMP u jednotlivých anatomických lokalit karcinomů hlavy a krku.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem jsme se v naší studii pokusili přispět k objasnění patogeneze a progresu HNSCC posouzením vztahu předoperační sérové hladiny MMP-1, MMP-2 a MMP-9 ke klinicko-patologickým charakteristikám karcinomu orofaryngu, laryngu a hypofaryngu. Zaměřili jsme se na posouzení prognostického předoperačního potenciálu a rozdíly v sérových hladinách MMP-1, MMP-2 a MMP-9 s ohledem na anatomickou lokalitu HNSCC, a proto nebyla použita kontrolní skupina zdravých pacientů.

Nebyly prokázány signifikantní rozdíly sérových hladin MMP-1, MMP-2 a MMP-9 mezi karcinomy orofaryngu, hypofaryngu a laryngu, a proto se nepředpokládá specifická role některé studované MMP v patobiologii HNSCC určité anatomické lokality.

Studované MMP nekorelovaly s klinicko-patologickými parametry (pohlaví, věk, grading, staging, uzlinový status). Tyto závěry jsou zčásti ve shodě s prací Kawaty a kol týkající se MMP-2 a MMP-9 a metastáz v krčních lymfatických uzlinách (Kawata et al., 2002). Při hodnocení celého našeho souboru bez ohledu na anatomickou lokalitu nebyla

u žádné ze studovaných MMP nalezena korelace sérové hladiny s tradičními klinicko-patologickými parametry jako jsou pohlaví, věk, histopatologický grading či uzlinový status. Závěry jsou ve shodě s prací Kawaty a kol., kteří také neprokázali korelaci mezi sérovou hladinou MMP-2 a MMP-9 a přítomnosti metastáz v krčních uzlinách, ačkoliv u pacientů s uzlinovými metastázami byla v nádorové tkáni významně vyšší koncentrace MMP-2 (Kawata et al., 2002). V kontrastu s výsledky naší studie o významné korelace mezi sérovou hladinou MMP-1 a MMP-9 a stádiem onemocnění je práce Ruokolainena a kol., která tuto souvislost pro MMP-9 neprokázala (Ruokolainen et al., 2005). V jiné studii stejných autorů nebyl potvrzen prognostický význam předoperační sérové hladiny MMP-2, ačkoliv vztah exprese MMP-2 v nádorové tkáni a prognózy byl signifikantní. Důvod, proč MMP exprimované v nádoru nereflktují sérovou hladinu, zůstává nejasný (Ruokolainen et al., 2006). Kouření cigaret a užívání alkoholu jsou hlavní rizikové faktory pro vznik HNSCC, hlavně karcinomů laryngu a hypofaryngu. V souladu s námi prokázanou signifikantně vyšší sérovou hladinou MMP-2 u kuřáků s karcinomem laryngu je i práce Mercera a kol o indukcii exprese genu MMP-2 cigaretovým kouřem (Mercer et al., 2009). Zdá se tedy pravděpodobné, že MMP-1 může představovat jednu nejdůležitějších patobiologických nádorových drah u karcinomu laryngu u kuřáků. HPV infekce se jako etiologický faktor uplatňuje zejména u karcinomů orofaryngu (Sudhoff et al., 2011). Protein p16 je nepřímý marker HPV indukované onkogeneze a je zvýšeně exprimován v HPV pozitivních nádorech (Thomas et Primeaux, 2012, Ramqvist et Dalianis, 2011). P16 je považován za jeden z prognostických faktorů u karcinomu orofaryngu a laryngu (Laco et al., 2012, Silva et al., 2012). Naopak u karcinomu hypofaryngu zvýšená exprese p16 nekoreluje s HPV pozitivitou či příznivější prognózou (Wendt et al., 2014). Protein p16 inhibuje expresi MMP-2 (Wang et al., 2006). V naší studii jsme prokázali signifikantní korelaci mezi nízkou sérovou hladinou MMP-1 a p16 pozitivitou v celém studovaném souboru, bez ohledu na anatomickou lokalitu. Statisticky významná korelace mezi p16 pozitivitou a výskytem metastáz do krčních uzlin v naší studii není v rozporu s údaji o příznivé prognóze p16 pozitivních HNSCC, protože přítomnost metastáz do lymfatických uzlin u p16 pozitivních karcinomů

orofaryngu není považována za negativní prognostický faktor (Klozar et al., 2013).

## 5.2 Studie tkáňových proteinů p16, p53 a galektinu-3

### Protein p16

Dle řady studií je frekvence p16 pozitivních LSCC velmi variabilní (Tamas et al., 2011, Young et al., 2015). V naší studii byla pozitivní exprese p16 nalezena u 8,6 % (5/58) glotických LSCC. Rozptyl výsledků může být vysvětlen různě nastavenou hranicí počtu exprimujících buněk, kdy exprese p16 byla hodnocena jako pozitivní. P16 pozitivita je některými autory spojována s lepší prognózou LSCC, zatímco p16 negativita determinovala nádorovou progresi se špatnou prognózou (Silva et al., 2012). Některé další studie o prognostické úloze p16 u nádorů hrtanu prezentují protichůdné výsledky (Larque et al., 2015). Koscielny a kol. verifikovali významnou asociaci mezi inaktivací genu p16 a horší prognózou LSCC (Koscielny et al., 2007). V naší studii byla u 9 (15,5 %) pacientů diagnostikována recidiva onemocnění, vždy u p16 negativních nádorů, ale statistické významnosti. Ve shodě s dalšími studiemi byla prokázána statisticky významná korelace mezi expresí p16 a kouřením pacienta (Silva et al., 2012).

### Protein p53

Změny exprese proteinu p53 a mutace genu *TP53* byly rozsáhle studovány ve smyslu jejich potencionální prediktivní hodnoty. V předchozích pracích byla prokazována pozitivita p53 ve 40–95 % LSCC (Sun et al., 2012, Moz et al., 2013). V naší studii jsme prokázali pozitivitu p53 u 65,5 % nádorů, což je v souladu s recentními pracemi. V literatuře bývá uváděno, že vyšší incidence mutace genu *TP53* u HNSCC se nachází u kuřáků než u nekuřáků (Baumann et al., 2009). Také v naší studii byla pozitivita p53 přítomna častěji u kuřáků, při srovnání s nekuřáky však nebyl nalezen staticky významný rozdíl. Někteří autoři se domnívají, že p53 je nezávislý prognostický faktor a že jeho mutace jsou spojeny přímo s progresí nádoru a horším přežitím (Edstrom et al., 2001). Ashraf a kol. prokázali u pacientů s karcinomem hrtanu statisticky významnou korelaci mezi pozitivitou p53 a vyšším stádiem onemocnění a metastatickým postižením krčních uzlin (Ashraf et al., 2010). Naproti tomu, Mielcarek-Kuchta a kol. však tuto závislost nepotvrzují (Mielcarek-Kuchta et al., 2003).



V mnoha studiích je považována přítomnost mutovaného genu *TP53* také za důvod horší radio- či chemosenzitivity u HNSCC (Couture et al., 2002). Golusinski a kol. prokázali statisticky významnou korelaci mezi expresí p53, T a N stádiem, diferenciací nádoru a dobou celkového přežití (Golusinski et al., 1998). Tannapfel a Weber však ve své přehledové práci dokumentovali fakt, že ve většině recentně publikovaných studií nebyla prokázána korelace mezi mutací genu *TP53* a klinicko-patologickými parametry (Tannapfel et Weber, 2001). V souladu s těmito závěry jsou i výsledky naší studie, která neprokázala statisticky signifikantní vztah exprese p53 a klinicko-patologických parametrů.

### **Galektin-3**

I když zapojení gal-3 do progresu byla popsána u řady různých nádorů, vzhledem k mnoha protichůdným výsledkům zůstává jeho klinický význam kontroverzní (Miranda et al., 2009). Exprese gal-3 může být zvýšená u řady typů nádorů a také u HNSCC (Saussez et al., 2007).

V naší studii byla potvrzena pozitivita gal-3 u 31 (53,5 %) případů glotického LSCC. Jedná se o nižší výskyt než v práci Konga a kol., kteří prokázali pozitivitu gal-3 u 89,7 % LSCC (Kong et al., 2009). Řada autorů poukazuje na možnou souvislost míry exprese gal-3 s diferenciací nádoru (Almadori et al., 2005). Snížení exprese gal-3 lze pozorovat během ztráty diferenciaci LSCC, což koreluje s vyšší agresivitou těchto tumorů (Gillenwater et al., 1996). Choi a kol. prokázali statisticky významně vyšší expresi gal-3 u vyšších stadií LSCC (Choi et al., 2010). Nižší exprese gal-3 v cytoplasmě či receptorů pro gal-3 u LSCC by mohla být prediktorem negativní prognózy (Piantelli et al., 2002, Plzak et al., 2004). Na rozdíl od této studie byla v práci Honjo a kol. u dlaždicobuněčného karcinomu jazyka zvýšená exprese cytoplazmatického gal-3 spojována s horší prognózou, tj. s rizikem recidivy onemocnění (Honjo et al., 2000). Miranda a kol. neprokázali statisticky významný vztah mezi expresí gal-3 a klinicko-patologickými ukazateli (Miranda et al., 2009). V naší práci jsme nenalezli statisticky signifikantní vztah mezi expresí gal-3 a prognózou onemocnění, v podskupině pacientů s perzistencí či recidivou byla celkově nižší, ale statisticky nevýznamná exprese gal-3.

### 5.3 Studie vybraných tkáňových mikroRNA

MikroRNA jsou regulátorem genové exprese na posttranskripční úrovni (Chen et al., 2010). Exprese mikroRNA v buňkách je za různých chorobných stavů deregulována (zvýšena či snížena). Málo je dosud známo o úloze mikroRNA v patobiologii a prognózování HNSCC, zejména s ohledem na jednotlivé anatomické lokality. Výsledky prezentovaných studií jsou kontroverzní a jejich porovnání je limitováno různými typy studovaných mikroRNA, použitými metodami, charakterem vzorků a různými klinicko-patologickými charakteristikami nádorů (Janiszewska et al., 2013, Chen et al., 2010). Ačkoliv byl popsán již velký počet deregulovaných mikroRNA, zatím jen některé z nich jsou dávány do souvislosti s karcinogenezí HNSCC a možným prognostickým či prediktivním dopadem (Janiszewska et al., 2013). V souladu s našimi pozorováními zvýšené exprese miR-21 a snížené produkce miR-375 v HNSCC jsou i jiné studie (Janiszewska et al., 2013). Úloha miR-200c v regulaci karcinogeneze a klinického chování HNSCC nebyla ještě popsána. V naší studii byla signifikantně vyšší exprese miR-200c sdružena s nízcí diferencovanými nádory a pokročilým stádiem onemocnění, ačkoliv zvýšenou expresí miR-200c s ohledem na udávanou tumor-supresorovou funkci lze však spíše očekávat u prognosticky příznivějších stádií onemocnění (Chen et al., 2010). Malý počet případů ve studii a neúplné objasnění interakce miR-200c limitují lepší interpretaci těchto výsledků. Sledování exprese let-7a, miR-200c a miR-375 může mít určitý potenciální prognostický význam. Prognostický význam vybraných mikroRNA byl hodnocen u HNSCC několika autory, ale výsledky se zdají být heterogenní a zatím nepřínosné pro klinickou praxi (Childs et al., 2009).

Jsme si vědomi pouze jedné studie, a to autorů Hui a kol., která se zaměřila na hodnocení expresního profilu mikroRNA mezi anatomickými podskupinami HNSCC (Hui et al., 2010). Autoři však na rozdíl od naší studie nenašli žádné rozdíly v expresi miR-21 a miR-375 mezi karcinomy orofaryngu, hrtanu a hypofaryngu. U karcinomů orofaryngu jsme překvapivě prokázali signifikantně zvýšenou expresi miR-34a.

Různé etiologické faktory mohou dysregulovat mikroRNA. Karcinomy iniciované kouřením vykazují obvykle bimodální expresní profil mikroRNA, kdy v iniciální fázi nádoru je exprese snižena

(down-regulace) a v konečné fázi u pokročilých nádorů je exprese zvýšená (up-regulovaná) (Momi et al, 2014). V naší studii jsme u kuřáků odhalili významně vyšší expresi miR-21 ( $p=0,0005$ ) a nižší expresi miR-375 ( $p=0,0010$ ) v nádorové tkáni v porovnání se zdravou nenádorovou tkání.

Role HPV/p16 v regulaci exprese mikroRNA u HNSCC je do značné míry neznámá (Lajer et al., 2011). Onkogenem indukovaná senescence (stárnutí) představuje bariéru proti vzniku nádorů. V tomto procesu je klíčovým regulátorem p16 ve spolupráci s příslušnými mikroRNA. V průběhu stárnutí u mnoha typů buněk byla popsána akumulace miR-34a s tumor supresorovou funkcí. U většiny nádorů je miR-34a snižena a sdružena s progresí, avšak v naší studii prokázána zvýšená exprese miR-34a u p16 pozitivních karcinomů orofaryngu (Overhoff et al., 2014). Toto zjištění by mohlo být v souladu s již dokumentovanou lepší prognózou těchto nádorů (p16 pozitivních karcinomů orofaryngu) (Lajer et von Buchwald, 2010). Detailnější objasnění základních patobiologických mechanismů a možnou souvislost zvýšené exprese miR-34a s onkogeny vyvolanou senescencí a následnými klinickými dopady se jeví jako opodstatněné.

Studie o významu mikroRNA v HNSCC by měly být komplexnější a vzít v úvahu vliv exogenních a endogenních faktorů včetně anatomické lokality nádoru. Nicméně na základě naší pilotní studie a literárních znalostí jsme přesvědčeni, že určení profilu mikroRNA HNSCC má potencionální diagnostický, prognostický a terapeutický přínos. Z tohoto důvodu se zdá, že mikroRNA mohou v budoucnu rozšířit spektrum nádorových biomarkerů u HNSCC.

## **6 Závěry**

### **6.1 Závěry vyplývající z provedených studií**

1. HNSCC jsou heterogenní nádory z hlediska etiologie, lokalizace, klinických i patobiologických charakteristik, což koresponduje s námi prokázanou odlišnou regulací a expresí některých studovaných markerů.
2. MikroRNA a MMP se mohou podílet na procesu nádorové transformace a progresu dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, o čemž svědčí následující výsledky: HNSCC vykazují signifikantní

up-regulaci miR-21 ( $p=0.001$ ) a miR-200c ( $p=0,0335$ ) a down-regulaci miR-375 ( $p=0,0020$ ) při srovnání s nenádorovou tkání v rámci celého souboru. Zvýšená exprese let-7a ( $p=0,0204$ ), miR-200c ( $p=0,0492$ ; resp.  $p=0,0092$ ), MMP-9 ( $p=0,0439$ ), MMP-2 ( $p=0,0114$ ), MMP-1 ( $p=0,0415$ , resp.  $p=0.0247$ ) statisticky signifikantně korelovala s pokročilými stadii onemocnění, resp. s nízkou diferenciací (miR-200c; MMP-2) či recidivou (MMP-1) karcinomu.

3. HNSCC jednotlivých lokalit se liší v patobiologii nádorového procesu, v němž významnou roli hrají některé mikroRNA. Tuto představu podporují prokázané rozdíly v expresním profilu let-7a ( $p=0,0242$ , miR-200c ( $p=0,0378$ ) a miR-34a ( $p=0,0178$ ) mezi karcinomy orofaryngu a laryngu s významným zvýšením exprese u karcinomů orofaryngu. V rámci jednotlivých lokalit se však nelišila produkce MMP ani nebyly prokázány souvislosti zásadnějšího významu mezi studovanými markery a klinicko-patologickými ukazateli.
4. Etiologické faktory (kouření, HPV/p16 status) mohou ovlivňovat expresi některých molekul klíčových pro nádorový proces. Kouření signifikantně deregulovalo miR-21 ( $p=0,005$ ) a miR-375 ( $p=0,0010$ ) a zvyšovalo sérové hladiny MMP-1 zejména u karcinomu laryngu ( $p=0,0384$ ), v jehož patogenezi u kuřáků tedy může hrát MMP-1 zásadní význam. P16 status významně ovlivňuje deregulaci některých mikroRNA (p16 pozitivita je signifikantně sdružena s karcinomy orofaryngu, kde snižuje expresi miR-375 a zvyšuje expresi miR-34a ( $p=0,0267$ )).
5. Překvapivý a dosud nepublikovaný výsledek se týká miR-34a, která vykazovala signifikantně zvýšenou expresi v p16 pozitivním orofaryngeálním karcinomu ( $p=0,0218$ ) a při srovnání nádorové a nenádorové tkáně ( $p=0,0155$ ). U ostatních lokalit tato souvislost nebyla prokázána. Vzhledem k běžně popisové down-regulaci a tumor supresorové funkci miR-34a v jiných nádorech je nutná detailnější studie zaměřená regulaci a na případnou prognostickou roli miR-34a v HNSCC.
6. P16 a miR-34 se jeví jako slibné prognostické markery u karcinomu orofaryngu. U karcinomů hrtanu zůstává prognostický význam exprese p16 nejasný a vyžaduje další studie.

## 6.2 Závěry pro praxi

1. Nádorové markery mohou být významným pomocníkem při diagnostice, určení prognózy onemocnění a výběru vhodné léčby u dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku.
2. Další studie širokého spektra nádorových markerů u HNSCC jsou plně opodstatněné, a to především s ohledem na odlišnou patobiologii těchto nádorů, konkrétní anatomické lokality a známé etiologické faktory.
3. Do budoucna lze očekávat v dlaždicobuněčných karcinomech hlavy a krku zejména prognostický a prediktivní přínos nádorových markerů a na základě toho zlepšení přežívání pacientů s těmito nádory.
4. Z analyzovaných nádorových markerů se u HNSCC největší klinický potenciál ukazuje u mikroRNA, a proto je nutné se zaměřit na jejich výzkum v širším měřítku (např. větší soubory pacientů, rozsáhlejší spektrum vyšetřovaných mikroRNA nejlépe mikročipovou technologií).
5. Vztah MMP ke klinicko-patologickým ukazatelům v HNSCC jednotlivých lokalit je velmi variabilní, a proto v klinické praxi není monitorování sérových MMP k prognostickým účelům vhodné.
6. Současné rutinní využívání markeru p16 (p16 pozitivita) jako prognostického markeru je odůvodněné v nádorech orofaryngu a reflektuje některé molekulární a klinické souvislosti, které byly potvrzeny i v naší studii.

## 7 Vybraná použitá literatura

- ALMADORI, G., BUSSU, F., CADONI, G., *et al.* 2005. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer*, 41, 683-93.
- ASHRAF, M. J., MAGHBUL, M., AZARPIRA, N., *et al.* 2010. Expression of Ki67 and P53 in primary squamous cell carcinoma of the larynx. *Indian J Pathol Microbiol*, 53, 661-5.
- BAUMANN, J. L., COHEN, S., EVJEN, A. N., *et al.* 2009. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 119, 1531-7.

- COUTURE, C., RAYBAUD-DIOGENE, H., TETU, B., *et al.* 2002. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*, 94, 713-22.
- EDSTROM, S., CVETKOVSKA, E., WESTIN, T., *et al.* 2001. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. *Laryngoscope*, 111, 124-30.
- GILLENWATER, A., XU, X. C., EL-NAGGAR, A. K., *et al.* 1996. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 18, 422-32.
- GOLUSINSKI, W., SZMEJA, Z., OLOFSSON, J., *et al.* 1998. [Retrospective analysis of selected tumor markers (p53, PCNA, Ki67; DNA ploidy) and ultrastructure in patients with larynx carcinomas]. *Hno*, 46, 233-40.
- HADLER-OLSEN, E., WINBERG, J. O. & UHLIN-HANSEN, L. 2013. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour Biol*, 34, 2041-51.
- HONJO, Y., INOHARA, H., AKAHANI, S., *et al.* 2000. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res*, 6, 4635-40.
- HUI, A. B., LENARDUZZI, M., KRUSHEL, T., *et al.* 2010. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 16, 1129-39.
- CHEN, L. H., TSAI, K. L., CHEN, Y. W., *et al.* 2010. MicroRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. *J Oncol*, 2010, 135632.
- CHERNOCK, R. D., WANG, X., GAO, G., *et al.* 2013. Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol*, 26, 223-31.
- CHILDS, G., FAZZARI, M., KUNG, G., *et al.* 2009. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*, 174, 736-45.
- CHOI, J. Y., CHO, S. I., DO, N. Y., *et al.* 2010. Clinical significance of the expression of galectin-3 and Pim-1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 39, 28-34.

- JALALI, M. M., HEIDARZADEH, A., ZAVAREI, M. J., *et al.* 2011. p53 overexpression impacts on the prognosis of laryngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 1731-4.
- JANISZEWSKA, J., SZAUMKESSEL, M. & SZYFTER, K. 2013. microRNAs are important players in head and neck carcinoma: a review. *Crit Rev Oncol Hematol*, 88, 716-28.
- KAWATA, R., SHIMADA, T., MARUYAMA, S., *et al.* 2002. Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta Otolaryngol*, 122, 101-6.
- KLOZAR, J., KOSLABOVA, E., KRATOCHVIL, V., *et al.* 2013. Nodal status is not a prognostic factor in patients with HPV-positive oral/oropharyngeal tumors. *J Surg Oncol*, 107, 625-33.
- KONG, H., CUI, J., WANG, L., *et al.* 2009. [The expression of Galectin-3 and VEGF in laryngeal squamous cell carcinoma]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 23, 109-12.
- KOSCIELNY, S., DAHSE, R., ERNST, G., *et al.* 2007. The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 69, 30-6.
- LACO, J., NEKVINDOVA, J., NOVAKOVA, V., *et al.* 2012. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma*, 59, 398-408.
- LAJER, C. B., NIELSEN, F. C., FRIIS-HANSEN, L., *et al.* 2011. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*, 104, 830-40.
- LAJER, C. B. & VON BUCHWALD, C. 2010. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *Apmis*, 118, 510-9.
- LARQUE, A. B., CONDE, L., HAKIM, S., *et al.* 2015. P16(INK(4)a) overexpression is associated with CDKN2A mutation and worse prognosis in HPV-negative laryngeal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch*, 466, 375-82.

- MERCER, B. A., WALLACE, A. M., BRINCKERHOFF, C. E., *et al.* 2009. Identification of a cigarette smoke-responsive region in the distal MMP-1 promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40, 4-12.
- MIELCAREK-KUCHTA, D., OLOFSSON, J. & GOLUSINSKI, W. 2003. p53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 260, 549-54.
- MIRANDA, F. A., HASSUMI, M. K., GUIMARAES, M. C., *et al.* 2009. Galectin-3 overexpression in invasive laryngeal carcinoma, assessed by computer-assisted analysis. *J Histochem Cytochem*, 57, 665-73.
- MOZ, L. E., DOMINGUES, M. A., CASTILHO, E. C., *et al.* 2013. Comparative study of the behavior of p53 immunoeexpression in smoking associated lesions: Reinke's edema and laryngeal carcinoma. *Inhal Toxicol*, 25, 17-20.
- OVERHOFF, M. G., GARBE, J. C., KOH, J., *et al.* 2014. Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways. *Nucleic Acids Res*, 42, 1606-18.
- PIANTELLI, M., IACOBELLI, S., ALMADORI, G., *et al.* 2002. Lack of expression of galectin-3 is associated with a poor outcome in node-negative patients with laryngeal squamous-cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 20, 3850-6.
- PLZAK, J., BETKA, J., SMETANA, K., JR., *et al.* 2004. Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*, 40, 2324-30.
- RAMQVIST, T. & DALIANIS, T. 2011. An epidemic of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) due to human papillomavirus (HPV) infection and aspects of treatment and prevention. *Anticancer Res*, 31, 1515-9.
- RUOKOLAINEN, H., PAAKKO, P. & TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. 2005. Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. *Int J Cancer*, 116, 422-7.
- RUOKOLAINEN, H., PAAKKO, P. & TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. 2006. Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma-



- tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Mod Pathol*, 19, 208-17.
- SAUSSEZ, S., CAMBY, I., TOUBEAU, G., *et al.* 2007. Galectins as modulators of tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, 29, 874-84.
- SILVA, S. D., NONOGAKI, S., SOARES, F. A., *et al.* 2012. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*, 45, 1327-33.
- SUN, J., XIONG, J., ZHEN, Y., *et al.* 2012. P53 and PCNA is positively correlated with HPV infection in laryngeal epitheliopapillomatous lesions in patients with different ethnic backgrounds in Xinjiang. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 5439-44.
- TAMAS, L., SZENTKUTI, G., EROS, M., *et al.* 2011. Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res*, 17, 721-7.
- TANNAPFEL, A. & WEBER, A. 2001. Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical effectiveness and prognostic value. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 258, 83-8.
- THOMAS, J. & PRIMEAUX, T. 2012. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol*, 16, 91-9.
- WANG, C. H., CHANG, H. C. & HUNG, W. C. 2006. p16 inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via suppression of Sp1-mediated gene transcription. *J Cell Physiol*, 208, 246-52.
- WANG, W. L., CHANG, W. L., YEH, Y. C., *et al.* 2013. Concomitantly elevated serum matrix metalloproteinases 3 and 9 can predict survival of synchronous squamous cell carcinoma of the upper aero-digestive tract. *Mol Carcinog*, 52, 438-45.
- WENDT, M., ROMANITAN, M., NASMAN, A., *et al.* 2014. Presence of human papillomaviruses and p16 expression in hypopharyngeal cancer. *Head Neck*, 36, 107-12.
- YOUNG, R. J., URBAN, D., ANGEL, C., *et al.* 2015. Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 112, 1098-104.

## 8 Přehled publikační činnosti autora

### *Původní vědecké publikace v časopisech s IF*

1. Vališ, M., Dršata, J., **Kalfert, D.**, Semerák, P., Kremláček, J.: Computerised static posturography in neurology. *Cent Eur J Med*, 7, 2012, 3, s. 317-322. **(IF 0,244)**
2. Skoloudik, L., **Kalfert, D.**, Zborayova, K., Laco, J.: Autoclaving of the middle ear ossicles in an animal experimental model. *Acta Otolaryngol*, 133, 2013, 12, s. 1273-1277. **(IF 0,990)**
3. Celakovsky, P., **Kalfert, D.**, Tucek, L., Mejzlik, J., Kotulek, M., Vrbacky, A., Matousek, P., Stanikova, L., Hoskova, T., Pasz, A.: Deep neck infections: risk factors for mediastinal extension. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271, 2014, 6, s. 1679-1683. **(IF 1,545)**
4. **Kalfert, D.**, Celakovsky, P., Laco, J., Ludvikova, M.: The Role of Protein p16 in Glottic Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 20, 2014, 4, s. 909-915. **(IF 1,855)**
5. **Kalfert, D.**, Ludvikova, M., Topolcan, O., Windrichova, J., Malirova, E., Pesta, M., Celakovsky, P.: Analysis of preoperative serum levels of MMP1, -2, and -9 in patients with site-specific head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res*, 34, 2014, 12, s. 7431-7441. **(IF 1,826)**
6. Celakovsky, P., **Kalfert, D.**, Smatanova, K., Tucek, L., Cermakova, E., Mejzlik, J., Kotulek, M., Vrbacky, A., Matousek, P., Stanikova, L., Hoskova, T.: Bacteriology of deep neck infections: analysis of 634 patients. *Aust Dent J*, 60, 2015, 2, s. 212-215. **(IF 1,104)**
7. Celakovsky, P., Smatanova, K., **Kalfert, D.**, Pracharova, S., Koblizek, V.: Nasal symptomatology, obstruction, and paranasal sinus opacity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Otolaryngol*, 135, 2015, 6, s. 598-601. **(IF 1,099)**
8. **Kalfert, D.**, Pesta, M., Kulda, V., Topolcan, O., Ryska, A., Celakovsky, P., Laco, J., Ludvikova, M.: MicroRNA Profile in Site-specific Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Anticancer Res*, 35, 2015, 4, s. 2455-2463. **(IF 1,826)**

### *Ostatní publikace v časopisech s IF*

1. Rydlova, M., Holubec, L. Jr., Ludvikova, M. Jr., **Kalfert, D.**, Franekova, J., Povysil, C., Ludvikova, M.: Biological Activity and Clinical Implications of the Matrix Metalloproteinases. *Anticancer Res*, 28, 2008, s. 1389 – 1398. (IF 1,309)
2. Laco, J., Celakovsky, P., **Kalfert, D.**, Hornychova, H., Rybnikar, T., Ryska, A.: Tumor-to-tumor metastasis: Warthin tumor as a recipient of lung carcinoma and of renal carcinoma - Report of two cases. *Pathol Res Pract*. 206, 2010, 7 s. 458-62. (IF 1,258)
3. Rybnikár, T., Málek, V., Čelakovský, P., Chrobok, V., Mejzlík, J., **Kalfert, D.**, Dědková, J., Popper, E.: Tortikolis při Griselově syndromu – kazuistiky. *Cesk Slov Neurol N*, 76, 2013, 2, s. 246-249. (IF 0,279)
4. Skoloudik, L., Chrobok, V., **Kalfert, D.**, Koci, Z., Filip, S.: Multipotent mesenchymal stromal cells in otorhinolaryngology. *Med Hypotheses*, 82, 2014, 6, s. 769-773. (IF 1,074)

### *Původní vědecké práce v časopisech bez IF*

1. Školoudík, L., Vokurka, J., **Kalfert, D.**, Rybnikár, T., Čelakovský, P.: Adenoidní vegetace a chronická sekretní otitida. *Otorinolaryng. a Foniatr. /Prague/*, 59, 2010, 2, s. 62-66.
2. Čelakovský, P., **Kalfert, D.**, Kordač, P., Doležal, J.: Prvé zkušenosti s použitím pozitronové emisní tomografie u nádorů hlavy a krku. *Otorinolaryngol Chir Hlavy a krku*, 5, 2011, 2-3, s. 59-62.

### *Monografie, kapitoly v monografiích*

1. Kalfert, D. Slovníček jmen. In: *Krční metastázy*. 1. vyd. Havlíčkův Brod:Tobiáš, 2012, s. 295-299.

### *Ostatní publikace v časopisech bez IF*

1. **Kalfert, D.**, Čelakovský, P., Školoudík, L., Podhola, M., Ludvíková, M.: Periferní paréza lícního nervu při středoušní manifestaci Wegenerovy granulomatózy. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 58, 2009, 2, s. 117-120.

2. Ludvíková, M., Pešta, M., Holubec, L., Jr., **Kalfeřt, D.**: Nové aspekty patobiologie nádorů. *Čes-slov Patol*, 45, 2009, 4, s. 94-99.
3. Dufek, Z., Čelakovský, P., **Kalfeřt, D.**, Kordač, P.: Hluboké krční abscesy u dětí – 1. část (anatomické poznámky, literární přehled). *Otorinolaryngol Chir Hlavy a krku*, 3, 2009, 3, s. 143-146 .
4. Dufek, Z., Čelakovský, P., **Kalfeřt, D.**, Kordač, P.: Hluboké krční abscesy u dětí – 2. část (kasuistiky, diskuse). *Otorinolaryngol Chir Hlavy a krku*, 3, 2009, 3, s. 147-151.
5. Ludvíková, M., **Kalfeřt, D.**: Nádory štítné žlázy z folikulárních buněk – morfologické, patobiologické a diagnostické aspekty. *Lékařské listy speciál*, 2010, 1, s. 15-17.
6. Čelakovský, P., **Kalfeřt, D.**: Anomální průběh vnitřní krkavice v retrofaryngeálním prostoru u nemocného s karcinomem dolní čelisti – kasuistika. *Otorinolaryngol Chir Hlavy a krku*, 4, 2010, č 1, s. 35-37.
7. Vokurka, J., **Kalfeřt, D.**, Zborayová, K.: Šetrná dekonjestiva a šetrné podání dekonjestiv. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 59, 2010, 3, s. 136-141
8. **Kalfeřt, D.**, Jakoubková, S., Nikolov, H.D., Čelakovský, P., Ludvíková, M.: Mnohočetný neurofibrom hrtanu. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 60, 2011, 2, s. 96-98.
9. Školoudík, L., **Kalfeřt, D.**, Růžička, J., Kopřiva, J.: Branchio–oto–renální syndrom. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 60, 2011, 2, s. 99-102.
10. **Kalfeřt, D.**, Kašparová, P., Čelakovský, P.: Extranodální NK/T buněčný lymfom nazálního typu - neobvyklá příčina jednostranné nosní obstrukce. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 61, 2012, 2, s. 130-134.
11. **Kalfeřt, D.**, Ludvíková, P.: Nádorové markery u dlaždicových karcinomů hlavy a krku. *Onkologie*, 6, 2012, 5, s. 241-246.
12. Kordač, P, Chrobok, V., **Kalfeřt, D.**, Koblížek, V.: Současný konsensus péče o pacienty s aspirovaným cizím tělesem ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. *VOX Paediatrie*, 12, 2012, 9, s. 18-21.
13. **Kalfeřt, D.**, Laco, J., Čelakovský, P., Smetanová, K., Ludvíková, M.: Oncocytic Schneiderian Papilloma of Frontal Sinus. *Acta Med (Hradec Králové)*, 56, 2013, 4, s. 170-172.

14. Čelakovský, P., **Kalfěřt, D.**, Chrobok, V., Laco, J.: Klinický význam a možnosti detekce mikrometastáz u dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 62, 2013, 4, s. 209-213.
15. **Kalfěřt, D.**, Ludvíková, M., Pešta, M., Topolčan, O.: Vitamin D ve vztahu ke karcinomu hlavy a krku. *Vnitř. Lék.*, 60, 2014, 1, s. 51-58.
16. Kordac, P., Nikolov, D.H., Smatanova, K., **Kalfert, D.**: Low-grade myofibroblastic sarcoma of the larynx: case report and review of literature. *Acta Med (Hradec Králové)*, 57, 2015, 4, s. 162-164.
17. Rybníkář, T., Čelakovský, P., **Kalfěřt, D.**: Vydechovaný oxid dusnatý jako bioindikátor zánětu horních dýchacích cest - literární přehled. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 64, 2015, 1, s. 50-54.
18. Čelakovský, P., Plzák, J., **Kalfěřt, D.**, Chrobok, V., Betka, J.: Krční disekce u papilárního karcinomu štítné žlázy. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 64, 2015, 2, s. 93-97.

*Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních*

1. **Kalfěřt, D.**, Vokurka, J.: Výplachy nosních dutin – technika, přípravky a účinnost, Krajský seminář České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 17. 4. 2008, Hradec Králové
2. **Kalfěřt, D.**, Zimová, I.: Harmonický skalpel a jeho využití při tonzilotomii, XII. Kongres mladých otorinolaryngologů, 14. - 16. 5. 2008, Jablonné nad Orlicí
3. **Kalfěřt, D.**, Laco, J., Čelakovský, P.: Neobvyklý případ metastázy do nádoru štítné žlázy (kazuistika), 71. kongres ČSORLCHHK, 10. - 12. 9. 2008, Olomouc
4. **Kalfěřt, D.**, Čelakovský, P., Školoudík, L., Podhola, M.: Periferní paréza lícního nervu se smíšenou nedoslýchavostí při primární manifestaci Wegenerovy granulomatózy ve středouší, Otologický den, 4. 12. 2008, Hradec Králové
5. **Kalfěřt, D.**, Jakoubková, S., Hadži Nikolov, D.: Mnohočetné neurofibromy hrtanu, Krajský seminář ČSORLCHHK, 18. 3. 2010, Hradec Králové

6. **Kalfěřt, D.**, Kordač, P., Dufek, Z., Arstad, A.K.H.: Hodnocení kvality života: první zkušenosti. ORL konference pardubického a královéhradeckého kraje, 13. - 14. 5. 2011, Jablonné nad Orlicí
7. **Kalfěřt, D.**, Vokurka, J., Laco, J., Čelakovský, P., Ludvíková, M.: Význam exprese proteinu p16INK4a (p16) u glotického karcinomu hrtanu. 4. Slovensko – český kongres ORL a chirurgie hlavy a krku, 8. - 10. 9. 2011, Starý Smokovec, Slovensko (poster)
8. **Kalfěřt, D.**, Ludvíková, M., Laco, J., Vokurka, J.: Prognostické a prediktivní markery u nádorů hlavy a krku, Společný krajský seminář pardubického a královéhradeckého kraje, 15. 12. 2011, Pardubice
9. **Kalfěřt, D.**, Laco, J., Ludvíková, M., Čelakovský, P., Vokurka, J.: The assessment of p16INK4a (p16) expression in glottic laryngeal cancer. The 5<sup>th</sup> European Conference on Head and Neck Oncology, 18. - 21. 4. 2012, Poznaň, Polsko (poster)
10. **Kalfěřt, D.**, Laco J., Růžička, J.: Onkocytární papilární cystadenom hrtanu, ORL konference pardubického a královéhradeckého kraje, 18. - 19. 5. 2012, Svatka
11. **Kalfěřt, D.**, Laco, J., Ludvíková, M., Čelakovský, P., Vokurka, J.: The assessment of p16INK4a (p16) expression in glottic laryngeal cancer. The 9<sup>th</sup> congress of the European Laryngological Society, 14. – 16. 6. 2012, Helsinky, Finsko (poster)
12. **Kalfěřt, D.**, Laco, J., Čelakovský, P., Vořmík, M., Chrobok, V.: Význam stanovení exprese proteinu p16INK4a (p16) u dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, XIV. Kongres mladých otorinolaryngologů, 13. - 15. 9. 2012, Svatka
13. **Kalfěřt, D.**, Laco, J., Ludvíková, M.: Expresse galektinu-3 u glotického karcinomu hrtanu. Schůze ČSORLCHHK ČLS JEP Pardubického a Královéhradeckého regionu, 13. 12. 2012, Pardubice
14. **Kalfěřt, D.**, Laco, J., Čelakovský, P., Ludvíková, M.: Expression p16INK4a (p16) and galectin-3 in glottic laryngeal cancer. XVII. vědecká konference LF UK v Hradci Králové a FN Hradec Králové, 23. 1. 2013, Hradec Králové
15. **Kalfěřt, D.**, Kordač, P., Čelakovský, P., Laco, J., Ludvíková, M.: Expresse galektinu-3 u glotického karcinomu hrtanu. 5. česko-slovenský kongres otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 75. kongres ČSORLCHHK ČLS JEP a 60. kongres Slovenskej

- spolocnosti pre ORL a chirurgiu hlavy a krku, 23. - 25. 5. 2013, Hradec Králové (poster)
16. **Kalfěřt D.**, Ludvíková M., Čelakovský P., Malířová E., Vrzalová J., Topolčan O.: Význam sérových hladin matrix metaloproteináz (MMP-1, MMP-2, MMP-9) u dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Schůze ČSORLCHHK ČLS JEP Pardubického a Královéhradeckého regionu, 12. 12. 2013, Pardubice
  17. **Kalfěřt, D.**, Ludvíková, M., Čelakovský, P., Malířová, E., Vrzalová, J., Topolčan, O.: Význam sérových hladin matrix metaloproteináz (MMP-1, MMP-2, MMP-9) u dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Nádory hlavy a krku 2014, Chirurgie hlavy a krku, patologie a onkologie, 28. - 29. 3. 2014, Hradec Králové
  18. **Kalfěřt, D.**, Pešta, M., Kulda, V., Topolčan, O., Ryška, A., Laco, J., Čelakovský, P., Ludvíková, M.: Změny exprese vybraných mikroRNA u karcinomů hlavy a krku - první výsledky. Schůze ČSORLCHHK ČLS JEP Královéhradeckého a Pardubického regionu, 15. 1. 2015, Hradec Králové
  19. **Kalfěřt, D.**, Čelakovský, P., Smatanová, K., Prachařová, Š., Koblížek, V.: Involvement of the nose and paranasal sinuses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, 7. – 11. 6. 2015, Praha (poster)
  20. **Kalfěřt, D.**, Růžička, J., Dršata, J., Školoudík, L., Smatanová, K., Laco, J., Čelakovský, P.: Oncocytic papillary cystadenoma of the larynx: comparative study of 7 cases and review of the literature. 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, 7. – 11. 6. 2015, Praha (poster)
  21. **Kalfěřt, D.**, Pešta, M., Kulda, V., Topolčan, O., Ryška, A., Čelakovský, P., Laco, J., Ludvíková, M.: MicroRNA profile in site-specific head and neck squamous cell cancer. 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, 7. – 11. 6. 2015, Praha (poster)