

HABILITAČNÍ PRÁCE

Vybrané prognostické a prediktivní onkologické markery nádorů hlavy a krku

Odb. as. MUDr. Richard SALZMAN, Ph.D.

Klinika otolaryngologická
Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

komentovaný soubor prací

Praha 2017

Poděkování

Na tomto místě v první řadě děkuji Prof. Ivo Stárkovi, který mne uvedl do hlubin oboru nejen po jeho klinické, ale i vědecké stránce. Byl a je nejen mým odborným rádcem, ale i osobním přítelem. Dále děkuji mým kolegům a nadřízeným na brněnské ORL klinice, kde se mi dostalo základů oboru, na kterých jsem v následujících letech mohl stavět. Velmi děkuji všem svým vědeckým partnerům, bez kterých bych nejen neuskutečnil, ale ani nenaplánoval žádnou z vědeckých studií. Mezi nimi bych rád vyzvedl Prof. K. Kaňkovou, Doc. J. Tomandla a Mgr. L. Pácala, se kterými jsem měl příležitost spolupracovat na výzkumu oxidativního stresu a Prof. A. Skálovou a Dr. L. Kučerovou, se kterými jsme se společně věnovali problematice molekulární biologie salivárních nádorů.

Tato práce by nikdy nevznikla bez podpory mé rodiny, manželky Hanky a mých dětí Adama a Bereniky, kteří mi poskytovali rodinné zázemí.

Obsah

1	Úvod	5
2	Cíle práce	7
3	Přehled současné problematiky	8
3.1	Nádory hlavy a krku	8
3.1.1	Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku	8
3.1.1.1	Epidemiologie a rizikové faktory	8
3.1.1.2	Diagnóza a klinická klasifikace	9
3.1.1.3	Terapie	10
3.1.1.4	Výhledy do budoucna	12
3.1.2	Salivární nádory	12
3.1.2.1	Epidemiologie	12
3.1.2.2	Rizikové faktory	13
3.1.2.3	Diagnóza	15
3.1.2.4	Klasifikace salivárních nádorů	18
3.1.2.5	Terapie	20
3.1.2.6	Prognóza	25
3.2	Vybrané onkologické markery hlavy a krku	31
3.2.1	Oxidativní stres	32
3.2.1.1	Zdroje volných radikálů	33
3.2.1.2	Poškození makromolekul oxidativním stresem	34
3.2.1.3	Antioxidativní ochranný systém	35
3.2.1.4	Antioxidativní enzymy	36
3.2.1.5	Genetický podklad antioxidantních obranných mechanismů	37
3.2.1.6	Oxidativní stres a nádory hlavy a krku	37
3.2.2	Vaskulární endoteliální růstové faktory	39
3.2.2.1	Význam VEGF pro hematogenní metastazování ACC	40
3.2.2.2	Význam VEGF pro lymfogenní metastazování ACC	41
4	Parametry oxidativního stresu u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku	43
5	Vaskulární endoteliální růstové faktory u salivárních nádorů	46
6	Závěr	50
7	Literatura	52
8	Přílohy - soubor publikací autora k tématu habilitační práce	63
9	Přílohy - seznam všech prací autora	64

Použité zkratky

ACC – adenoidně cystický karcinom, AOE – antioxidantní enzymy, ARDS – syndrom akutní dechové tísně, z angl. originálu acute respiratory distress syndrome, CAT – kataláza, CT – počítačová tomografie, EC SOD – extracelulární superoxid dismutáza, EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor, z angl. originálu epidermal growth factor receptor, FNAC – aspirační cytologie tenkou jehlou, z angl. originálu fine needle aspiration cytology, GIST – gastrointestinální stromální tumor, GPx – glutathion peroxidáza, GR – glutathion reduktáza, GSH – redukováná forma glutathionu, GSSG – oxidovaná forma glutathionu, HPV – lidský papiloma virus, z angl. originálu human papilloma virus, KIT – kinase inhibitor tyrozin, MDA – malodialdehyd, MnSOD – manganistá superoxid dismutáza, MRI – magnetická rezonance, NADPH – nikotinadenindinukleotidfosfát, OS – oxidativní stres, PIGF – homologní placentární růstový faktor, z angl. originálu placental growth factor, RTK – receptorové tyrozinkinázy, SCC – spinocelulární karcinom, z angl. originálu squamous cell carcinoma, SNP – polymorfizmy jediného nukleotidu, z angl. originálu single nucleotide polymorphism, SOD – superoxid dismutáza, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, z angl. originálu vascular endothelial growth factor, VEGFR – endoteliální receptor pro VEGF, VR – volné radikály, Zn/CuSOD – měďnato-zinečnatá superoxid dismutáza

1 Úvod

Rakovina zůstává i nadále jedním z hlavních zdravotních problémů v rozvinutých zemích. Ročně je na celém světě nově diagnostikováno přes půl milionu zhoubných nádorů hlavy a krku (Stenson 2014), které každý rok zahubí čtvrt milionu takto nemocných (Parkin 1999). Až 90 % maligních nádorů hlavy a krku jsou dlaždicobuněčné karcinomy (SCC z angl. originálu squamous cell carcinoma) (Sanderson 2002). Jejich prognózu, která se i přes použití moderních diagnostických metod a léčebných schémat, zahrnujících dnes již i biologickou terapii, v posledních dekadách významně nezlepšila (Stoll 2012), determinuje časnost stanovení diagnózy a zahájení léčby, jakož i přítomnost metastatického postižení krčních uzlin (Kyzas, Clinical cancer research 2005). Pacienti v časných stádiích nádorového onemocnění mají relativně uspokojivou prognózu. Naopak u pacientů v pokročilých stádiích je i přes radikální léčbu, spojenou s výraznou morbiditou a trvalým negativním vlivem na kvalitu života, prognóza pochmurná (celkové pětileté přežití nedosahuje ani 60 %, Ragin 2007). Mnoho výzkumných týmů proto hledá ještě jiné nežli dosud známé onkologické markery, díky kterým by bylo možno rozlišit pacienty s předpokládanou horší prognózou, vyžadující radikálnější léčbu, od těch, kteří takovýto rozsah léčby nepotřebují, a ušetřit je tak nežádoucích účinků onkologické terapie. Další vědecké skupiny se zaměřují na diagnostické onkologické markery, umožňující dřívější stanovení diagnózy v rámci onkologického skríningu, a tedy časnější zahájení léčby, a tím i lepší prognózu. Tyto markery by mohly sloužit i k brzké detekci nádorových lokoregionálních recidiv, jejichž odhalení je v terénu pozměněném předchozí protinádorovou léčbou i při použití moderních zobrazovacích metod často složité.

Špatná prognóza (až polovina pacientů umírá do 2 let od stanovení diagnózy) pacientů se SCC hlavy a krku souvisí zejména s pozdním stanovením diagnózy (až 2/3 pacientů je diagnostikovaných v pokročilých stádiích) a s ním spojeným častým vznikem lokoregionálních recidiv (Ragin 2007). Dalším významným problémem je výrazně negativní vliv intenzivní onkologické léčby na kvalitu života. Tyto a mnohé jiné aspekty v léčbě nádorů hlavy a krku nás inspirují k zavádění moderních

analytických metod, zkoumajících biologii nádorů hlavy a krku na molekulární úrovni. Jen detailním pochopením jejich mechanismů bude možno nabízet adekvátní, individuálně nastavenou protinádorovou léčbu s přijatelnými, v ideálním případě se žádnými nežádoucími účinky.

Mezi nádory hlavy a krku mají zvláštní postavení tumory slinných žláz. Na rozdíl od ostatních nádorů této krajiny, tvořených téměř uniformně dlaždicobuněčným karcinomem, jsou salivární neoplazmata charakterizována velkým počtem histopatologických jednotek, vykazujících značnou patomorfologickou i biologickou variabilitu, a to nejen mezi, ale i v rámci jedné a téže entity. Nejčastěji je postižena příušní žláza, u které až 80 % tvoří nádory benigní, dominantně zastoupené pleomorfním adenomem. Tento sialom vykazuje zvláštní biologické chování, charakterizované relativně vysokou mírou typicky multifokálních recidiv, které v raritních případech zakládají dosud neobjasněným mechanismem vzdálené metastázy.

Malignity slinných žláz, ač relativně řídké, tvoří až 5 % všech zhoubných nádorů hlavy a krku (Speight 2002). Nejnovější klasifikace Světové zdravotnické organizace z roku 2017 zahrnuje 21 typů salivárních karcinomů (El-Naggar 2017) Jejich biologické chování je a priori určeno již samotnou histopatologickou diagnózou. To je důvodem, proč pro tuto nádorovou skupinu není zaveden generální histopatologický grading, jež je prognostickým činitelem u řady non-salivárních malignit. Grading se uplatňuje jen u 4 typů karcinomů slinných žláz. V současné době se jako prognosticky významné jeví u některých jednotek molekulárně-genetické markery, které mohou být i cílem pro jejich biologickou terapii.

Přestože prediktivní onkologie prošla v posledních letech výrazným rozvojem, její klinický význam u nádorů hlavy a krku zůstává malý.

2 Cíle práce

Dizertace shrnuje autorem a dalšími členy týmu doposud publikované práce, které se zabývají problematikou onkologických markerů v onkologii hlavy a krku. Věnuje se 2 stěžejním tématům. První se zabývá rolí parametrů oxidativního stresu u spinocelulárních karcinomů hlavy a krku. Popisuje prognostický význam antioxidantních enzymů a vztah alterací jejich exprese a funkce ke stupni diferenciaci a klinickému stádiu těchto malignit. Ve druhé části věnované parametrům lymfangiogeneze u vybraných salivárních nádorů se autoři zaměřují na expresi vaskulárních endoteliálních růstových faktorů a hustotu lymfatických cév uvnitř jednotlivých nádorů, v jejich okolí i ve zdravé tkáni, a vztah jednotlivých nádorů k jejich biologickému chování.

Tato práce prohlubuje dosavadní poznatky v oblasti prediktivní onkologie u uvedených nádorů hlavy a krku. Jejím cílem je identifikace klinicky použitelných onkomarkerů, které by umožnily individualizaci léčby a tím zlepšení prognózy a kvality života nemocných.

3 Přehled současné problematiky

3.1 Nádory hlavy a krku

3.1.1 Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku

Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku jsou epiteliální novotvary, tvořící až 90 % všech zhoubných nádorů této anatomické oblasti (Sanderson 2002). Postihují nejčastěji horní aerodigestivní trakt, zahrnující dutinu ústní, hltan a hrtan (Ragin, 2007). Vzniku tumoru zde předchází dlouholetá expozice karcinogenům, mezi nimiž hrají největší roli vzájemně při nádorové iniciaci se potencující alkohol a řada složek cigaretového kouře (Dal Maso 2015). Přibližně 2/3 pacientů přicházejí k lékaři v pokročilých stádiích nemoci, zpravidla již s metastatickým šířením do krčních uzlin (Argiris 2008). Naopak vzdálený rozsev krevní cestou není pro tuto nádorovou skupinu obvyklý, vyskytuje se až u velmi pokročilých primárních a recidivujících lézí. Přítomnost uzlinových metastáz zhoršuje křivku přežití až o 50 procent (Narayan 1999). Volba léčby SCC hlavy a krku probíhá ve většině center na multidisciplinárních indikačních onkologických komisích. Terapie je u většiny nemocných kombinovaná, v různém pořadí zahrnuje chirurgickou resekci, ozáření a chemoterapii (Argiris 2008). V posledních letech v některých indikacích může být doplněná o biologickou léčbu.

3.1.1.1 Epidemiologie a rizikové faktory

Karcinom hlavy a krku, šestý nejčastější typ rakoviny, tvoří asi 6 % všech humánních maligních nádorů (Argiris 2008). Obyvatelé některých oblastí světa (orofaryngeální nádory v Oceánii, Indii a v Evropě nebo laryngeální nádory v jižní a východní Evropě a Jižní Africe) jsou postiženi častěji (Parkin 2005). Stenson uvádí, že celosvětová incidence SCC hlavy a krku činí 550 tisíc případů ročně (Stenson 2014), přičemž 270 tisíc nemocných každoročně své nemoci podlehne (Parkin 1999). Typický pacient s těmito tumory je asi 60-letý svobodný nebo rozvedený muž nadměrně užívající alkohol a tabák. Jak alkohol, tak kouření cigaret zvyšuje riziko vzniku tohoto nádoru asi trojnásobně. Současná

expozice oběma noxám nebezpečí jeho vzniku násobí až 15x (Vineis 2004). V zemích středního a dálného Východu je významným rizikovým faktorem žvýkání betelových listů (Warnakulasuriya 2002). Od roku 1980 nastává mírný pokles incidence rakoviny hrtanu, což s dvacetiletým zpožděním kopíruje úspěšné kampaně za omezení kuřáctví (Mechl 2016). Naopak mírně se zvyšuje počet pacientů s orofaryngeálními SCC (Saraiya 2007). Nárůst jejich incidence se dává do souvislosti se šířením lidského papiloma viru (HPV), zejména typu 16 a 18. Přítomnost DNA HPV 16 byla prokázána až u 72 % všech orofaryngeálních SCC (D'Souza 2007). Pacienti s HPV pozitivními karcinomy jsou obvykle mladší, nekuřáci, a nekonzumují nadměrně alkohol. Molekulární mechanismy, které se uplatňují při vzniku těchto HPV asociovaných malignit, se velmi pravděpodobně liší od těch, jimiž při iniciaci tumorů působí ostatní známé karcinogeny (Mechl 2016). HPV pozitivita je příznivým prognostickým faktorem (Li 2003) orofaryngeálních karcinomů, protože tato skupina nádorů lépe reaguje na onkologickou léčbu. Předpokládá se, že u těchto nemocných by mělo být možné dosáhnout identického protinádorového účinku nižší dávkou ozáření (tzv. dezintenzifikace onkologické léčby), a tedy dobrat se při redukci morbiditý stejné prognózy (Mechl 2016).

3.1.1.2 Diagnóza a klinická klasifikace

Časně stanovení diagnózy je „condicio sine qua non“ pro bezodkladné zahájení protinádorové léčby. Pro nádory hlavy a krku nejsou dosud známy žádné skrínigové metody, respektive onkomarkery, které by v současnosti bylo možno použít k detekci jejich přítomnosti v klinické praxi. Na základě anamnézy se provádí důkladné klinické vyšetření, jež ve většině případů vede k určení místa, podezřelého z výskytu karcinomu. Definitivní potvrzení diagnózy je však možné až na základě probatorní excize. Před naplánováním terapie je nutno přesně stanovit rozsah onemocnění (klinický staging). Pro určení velikosti a rozsahu tumoru, jeho prorůstání do okolních struktur a vyloučení nádorové duplicity slouží kombinace klinického vyšetření (včetně hluboké palpce kořene jazyka), endoskopie a zobrazovacích metod. Z jejich škály je nejvýznamnější vyšetření počítačovou tomografií

s aplikací nitrožilního kontrastu. Umožňuje posouzení velikosti nádoru a jeho šíření do okolí. Pozitronová emisní tomografie bývá nejčastěji indikována k průkazu neznámého primárního nádoru u metastáz do lymfatických uzlin krku, k vyloučení nepříliš časté generalizace nádoru před rozsáhlými resekčními výkony nebo v rámci léčebného sledování k vyloučení vzniku recidivy.

Ke srovnání léčebných výsledků a určení prognózy zhoubných nádorů slouží TNM klasifikace, kterou vypracoval již ve 40. letech minulého století Pierre Denoix. Kromě jí určeného klinického stádia však prognózu pacienta ovlivňuje i řada dalších parametrů (lokalizace tumoru, histopatologický stupeň diferenciace, atd.). T stádium popisuje velikost primárního tumoru a při zohlednění jeho anatomické lokalizace i vztah k okolním strukturám. N hodnotí postižení krčních uzlin. Pacienti se vzdálenými metastázami jsou označeni jako M1 (TNM Klasifikace zhoubných novotvarů 2011). Obecně jsou jako časný nádory označovány ty, jež spadají do I. a II. stádia. Naopak nádory III. a IV. stádia jsou pojímány jako pokročilé (tabulka 1).

Tabulka 1. Prognóza pacientů se spinocelulárními karcinomy hlavy a krku v jednotlivých stádiích udaná v procentech 5-letého přežití. (Lefebvre 2005)

Stadium TNM	5-leté přežití
I	91 %
II	77 %
III	61 %
IVa	31 %
IVb	25 %
IVc	4 %

3.1.1.3 Terapie

Léčba SCC hlavy a krku je komplexní. Zahrnuje jejich chirurgické odstranění, ozáření a chemoterapii samostatně nebo v kombinaci, aplikované v různém pořadí. Všeobecně u časných nádorů (stádia I-II), jež jsou zachyceny pouze u jedné třetiny nemocných, je doporučována jediná **léčebná modalita**, kterou je operace nebo ozáření. Konkrétní doporučení záleží na mnoha faktorech. Operační řešení je upřednostňováno, pokud může nabídnout radikální odstranění nádoru bez nebo jenom s malým

vlivem na následnou kvalitu života. Například u časných glotických nádorů, zasahujících do přední komisury, je výhodnější ozáření, protože resekce v této oblasti často vede ke vniku srůstu s následnou dysfonií a dyspnoí. U léčebných modalit se srovnatelnou úspěšností léčby nelze opominout ani přání pacienta, srozumitelně informovaného o způsobu a následcích terapie.

U zbývajících 2/3 pacientů s pokročilými nádory (stádia III-IV) se používá **kombinovaná léčba**, která by měla být individualizována. Indikační onkologické komise jednotlivých pracovišť musí zvážit všechna specifika nádoru u konkrétního pacienta a s přihlédnutím ke známým doporučeným postupům (například National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines in Oncology, www.nccn.org, cit. 25.3.2017) navrhnout nejlepší léčbu. Mezi nejdůležitější faktory pro volbu terapie patří velikost a lokalizace nádoru, rozsah lokoregionálního a vzdáleného metastazování, potvrzená HPV etiologie (u orofaryngeálních nádorů), dále celkový stav nemocného (tabulka 2), předpokládaná prognóza a následná kvalita života. V neposlední řadě i pacientovo přání. Velký vliv na upřednostňování určitého způsobu léčby má i chirurgova „škola“, předchozí zkušenosti, ale i místní dostupnost zvažované terapie (DiNardo 1999).

Tabulka 2. Hodnocení celkového stavu pacienta dle Světové zdravotnické organizace (WHO) vlevo a dle Karnofského stupnice (vpravo) (Smilek 2004).

Stupeň (WHO)	Odpovídající stav tělesné aktivity	Karnofsky [%]
0	Schopen normální tělesné aktivity bez omezení	90-100
1	Neschopen těžké fyzické námahy, ale může vykonávat lehčí práci.	70-80
2	Soběstačný, ale neschopen práce. Tráví více než 50 % denní doby mimo lůžko.	50-60
3	Omezeně soběstačný. Upoután na lůžko více než 50 % denní doby.	30-40
4	Odkázán na cizí péči. Trvale upoután na lůžko.	20-30
-	Moribundní nemocný	0-20

3.1.1.4 Výhledy do budoucna

Současný výzkum SCC hlavy a krku se zaměřuje na identifikaci skriningových onkologických markerů, které by umožnily časně odhalení nejen jeho primárních, ale i recidivujících forem. Dalším zamýšleným výstupem je individualizace terapie, umožňující cílenou léčbu vybrané subpopulace pacientů nevhodnějšími režimy bez nárůstu nežádoucích účinků při udržení současné lokoregionální kontroly i celkového přežití. Jiné výzkumné skupiny se snaží zmírnit nežádoucí účinky léčby pomocí méně agresivní léčby, přesněji cíleného dávkování ozáření a aplikací radioprotektivních látek.

3.1.2 Salivární nádory

Nádory slinných žláz postihují 3 páry velkých (příušní, podčelistní a podjazykovou) a malé slinné žlázy, nacházející se na patře, rtech, jazyku, sliznici tváří a jinde. Aktuální klasifikace Světové zdravotnické organizace popisuje 21 typů salivárních karcinomů (El-Naggar 2017). Je pochopitelné, že takto morfologicky i biologicky nehomogenní onkologická skupina vykazuje rozdílnou incidenci jednotlivých histopatologických jednotek. Zejména u méně frekventních narážíme na problém s nedostatkem až absencí validních studií, ze kterých bychom mohli lépe pochopit jejich biologické chování a vytvořit doporučené postupy léčby.

Klinickou problematiku nádorů slinných žláz pozitivně ovlivňuje fakt, že 80 % z nich jsou benigní léze (Myers 2008).

3.1.2.1 Epidemiologie

Celosvětově jsou nádory slinných žláz nepříliš častou patologií s incidencí 2,5-3 případy na 100 tisíc obyvatel ročně (Speight 2002). Salivární malignomy, představující jen asi 7 % nádorů hlavy a krku, se na všech zhoubných tumorech podílejí asi 0,3 % (Shah 2012). Rozdílný výskyt benigních nádorů v jednotlivých slinných žlázách ukazuje tab. 3.

V celé populaci ČR se incidence parotického karcinomu dle údajů ÚZIS v posledních sledovaných 15 letech (2000-2014) pohybovala mezi 0,42 až 0,54/100 tisíc obyvatel, přičemž byla o něco větší

u mužů než u žen. Úmrtnost činila celkově 0,14 až 0,23, u mužů byla horší než u žen. Incidence ani mortalita této nádorové skupiny však nevykazuje dlouhodobě vzestupnou tendenci. Z téhož zdroje pak vyplývá, že za stejný časový interval nebyl rozdíl mezi výskytem časných (I+II) a pozdních (III+IV) klinických stádií (0,13 až 0,30 vs. 0,10 až 0,25), tato se však lišila mortalitou (0,01 až 0,07 vs. 0,11 až 0,25). Dále je zřejmé, že incidence a mortalita stoupá s věkem, nejvyšší je u nemocných nad 65 let (www.uzis.cz, cit. 25.3.2017).

Tabulka 3 Incidence benigních nádorů dle typu slinné žlázy

Lokalita	Incidence [%]
Příušní žláza	85
Podčelistní žláza	60
Malé slinné žlázy *	50
Podjazyková žláza	10

* V některých sublokality (jazyk a retromolární oblast) jsou téměř všechny léze maligní (Speight 2002).

3.1.2.2 Rizikové faktory

Zatím jediný potvrzený rizikový faktor karcinogeny nádorů slinných žláz je expozice radioaktivnímu záření. Lidé, kteří přežili atomové útoky v Hirošimě nebo byli vystaveni radiaci v oblasti Černobylu a pacienti po radioterapii mají vyšší riziko vzniku salivárních malignomů (Williams 2008). Dále byla prokázána až 8-krát vyšší incidence Warthinova tumoru u kuřáků (De Ru 2004). Mezi potenciální rizikové faktory řadíme genetickou predispozici, virové infekce, práci s gumou a niklem a používání mobilních telefonů (Myung 2009).

V některých geografických oblastech je lymfoepiteliální karcinom parotis dáván do kauzativního vztahu k infekci EBV virem. Jiné uvažované etiologické faktory, jako např. používání barev na vlasy, jsou spekulativní. V současné době se pozornost zaměřuje na genetické alterace, zodpovědné za vznik některých jednotek. Jde většinou o chromosomální translokace (tab. 4). Stanovení těchto genetických změn má vedle diferenciálně-diagnostického u některých jednotek i význam prognostický (např. u karcinomu mukoepidermoidního).

Tabulka 4 Genetické aberace u nádorů slinných žláz

Typ nádoru	Chromozomální aberace	Gen
pleomorfní adenom	8q12 translokace 12q13-15 translokace	PLAG1 fúze HMGA2 fúze
ca z pleomorf. adenomu	8q12 translokace 12q13-15 translokace 12q15 amplifikace	PLAG1 HMGA2 fúze MDM2 fúze TP53 mutace
epiteliálně myoepiteliální ca		HRAS mutace
tubulotrab. basocel. adenoca		CTTNB1 mutace
membr. basocel. adenoca	16q12-13 delece	CYLD LOH/mutace
mukoepidermoidní ca	t(11;19)(q21;p13) t(11;15)(q21;q26) 9p21.3	CRTC1-MAML2 CRTC3-MAML2 CDKN2A delece
salivární duktální ca	17q21.1 3q26 Xq12	TP53 mutace ERBB2 amplifikace PIK3CA mutace AR copy gain
adenoidně cystický ca	6q22-23 translokace 8q13 translokace	fúzní transkript MYB-NFIB a MYBL1-NFIB NOTCH1 mutace
sekr. ca (mammární analogický)	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
ca z jasných buněk	t(12;22)(q21;q12)	EWSR1-ATF1
polymorfni adenoca		PRKD1 mutace
kribriformní adenoca	t(1;14)(p36.11;q12) t(X;14)(p11.4;q12) 19q13.32 2p21	ARID1A-PRKD1 DDX3X-PRKD1 PRKD2 rearrangement PRKD3 rearrangement
myoepitel. ca světlobun. varianta	t(22;xx)	EWSR1-xx

Pozn. ca – karcinom

3.1.2.3 Diagnóza

Diagnostika tumorů slinných žláz je založena na anamnéze a klinickém vyšetření. V případě potvrzení zduření ve slinné žláze jsou indikovány zobrazovací metody, mezi které patří ultrazvukové vyšetření, počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI). Výběr samotné modalitě závisí spíše na zvyklostech pracoviště. U menších dobře pohyblivých lézí se můžeme spokojit s ultrazvukovým vyšetřením. U větších a fixovaných nádorů s podezřením na šíření do hlubokého listu příušní žlázy, do okolních struktur nebo do krčních uzlin je indikováno CT vyšetření s kontrastem, lépe však MRI. I když se u obou posledně uvedených diagnostických modalit uvádí senzitivita 100 %, specifická v určení malignity dosahuje u MRI 90 %, u CT jen 73 % (Koyuncu 2003).

Peroperační znalost operátora o maligní povaze nádoru vede k radikálnějšímu přístupu, a tím i k lepší prognóze. Z těchto důvodů byla předoperační diagnostika doplněna o aspirační cytologii tenkou jehlou (FNAC) (Stárek 2006). Přes jednoznačný přínos FNAC v předoperační diagnostice její senzitivita a specifická činí 64 %, resp. 95 % (Zbären 2001). V kombinaci se zobrazovacími metodami však její spolehlivost stoupá. Podle Parise dosahuje ultrazvuk spolu s FNAC až 99% diagnostické přesnosti (Que Hee 2001). Histopatologická diagnóza tumorů slinných žláz je velkou výzvou i pro klinické pathology, což je způsobeno mnohdy překrývající se patomorfologií a zejména nízkou incidencí některých patologických jednotek (Speight 2002). Přesné stanovení histopatologického typu sialomu je tak možné prakticky jen pooperačně, ne vzácně až za použití imunohistochemických a molekulárně-genetických metod.

Biologické vlastnosti karcinomů slinných žláz jsou primárně určeny konkrétním histopatologickým typem, který je u mnoha z nich současně i implicitním vyjádřením stupně jejich malignity. Tak např. bazocelulární či acinocelulární karcinom jsou indolentní s tendencí k lokoregionálním recidivám při velmi malém sklonu k uzlinovým a vzdáleným metastázám. Oproti tomu salivární duktální karcinom vykazuje vysoce agresivní růst s vysokou incidencí uzlinových metastáz již při nízkém klinickém stádiu. Většina typů karcinomů slinných žláz tedy vykazuje jim vlastní biologické chování. Obecně používaný histopatologický grading (který je u většiny solidních non-salivárních malignit

základním prognostickým faktorem) se tedy u této onkologické skupiny jeví zbytečným, a není proto v současnosti doporučován. Uplatňuje se jen u některých patologických jednotek, konkrétně u karcinomu adenoidně cystického, mukoepidermoidního, intraduktálního a dále u adenokarcinomu jinak nespecifikovaného. Zbytečnost, resp. absence histopatologického gradingu a odlišnosti v dignitě jednotlivých salivárních karcinomů je důvodem jejich rozdělení na léze s vysokým a nízkým biologickým rizikem (high a low risk) (tab. 5).

Tab. 5. Rozdělení karcinomů slinných žláz dle jejich biologického rizika (El-Naggar 2017).

s nízkým rizikem (low risk)	s vysokým rizikem (high risk)
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom acinocelulární 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom adenoidně cystický <ul style="list-style-type: none"> ○ s převahou tubulární/kribriformní složky ○ > 30 % solidní složky
<ul style="list-style-type: none"> • (mamární analogický) sekretorický karcinom 	<ul style="list-style-type: none"> • špatně diferencovaný karcinom: neuroendokrinní a non-neuroendokrinní <ul style="list-style-type: none"> ○ nediferencovaný karcinom ○ velkobuněčný neuroendokrinní karcinom ○ malobuněčný neuroendokrinní karcinom
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom mukoepidermoidní <ul style="list-style-type: none"> ○ low grade ○ intermediate grade 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom mukoepidermoidní <ul style="list-style-type: none"> ○ high grade
<ul style="list-style-type: none"> • polymorfní adenokarcinom <ul style="list-style-type: none"> ○ klasický 	<ul style="list-style-type: none"> • polymorfní adenokarcinom <ul style="list-style-type: none"> ○ kribriformní
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom epiteliálně-myoepiteliální 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom skvamocelulární
<ul style="list-style-type: none"> • (hyalinizující) karcinom z jasných buněk 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom salivární duktální
<ul style="list-style-type: none"> • adenokarcinom basocelulární 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinosarkom
<ul style="list-style-type: none"> • adenokarcinom sebaceousní 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom lymfoepiteliální
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom intraduktální <ul style="list-style-type: none"> ○ low grade 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom intraduktální <ul style="list-style-type: none"> ○ high grade
<ul style="list-style-type: none"> • adenokarcinom <ul style="list-style-type: none"> ○ low grade 	<ul style="list-style-type: none"> • adenocarcinom <ul style="list-style-type: none"> ○ high grade
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom myoepiteliální 	<ul style="list-style-type: none"> • karcinom z pleomorfního adenomu <ul style="list-style-type: none"> ○ high grade
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom z pleomorfního adenomu <ul style="list-style-type: none"> ○ low grade 	
<ul style="list-style-type: none"> • karcinom onkocytický 	

3.1.2.4 Klasifikace salivárních nádorů

Patomorfologie salivárních nádorů je velmi bohatá (Tab. 6), což spolu s nízkou incidencí některých typů představuje problém ve vytváření validních randomizovaných klinicko-patologických studií.

V následujícím textu popisujeme jen ty histopatologické jednotky, na které jsme zaměřili náš výzkum.

Pleomorfní adenom představuje nejčastější benigní tumor slinných žláz, který se obvykle manifestuje jako roky pomalu rostoucí asymptomatické zduření v oblasti povrchního listu příušní žlázy.

Z morfologického hlediska jej charakterizuje bifázický vzorec s obsahem epiteliální a mezenchymální komponenty (Sunardhi-Widyaputra 1995, Wenig 2008). Morfologicky neobyčejně variabilní epiteliální složka připomíná zralou sekretorickou salivární tkaň. Kromě primitivních acinárních a nediferencovaných solidních struktur obsahuje i cystické, vývodům podobné útvary, složené z vnitřní lumenální a zevní myoepiteliální buněčné vrstvy, která kontinuálně přechází do mezenchymální („stromální“) komponenty tohoto nádoru. Její buňky hvězdčovitěho či vřetenovitěho tvaru se vyskytují izolovaně nebo v malých shlucích. Názory na histogenezu pleomorfního adenomu byly v minulosti značně kontroverzní díky obtížně vysvětlitelné duální histomorfologii (účast jak epiteliální, tak mezenchymální složky), v současnosti je všeobecně akceptován jeho výlučně epiteliální původ. (Obtulovičová 2014).

Tabulka 6 Klasifikace nádorů slinných žláz dle Světové zdravotnické organizace (El-Naggar 2017)

Karcinomy

- acinocelulární karcinom
- mammární analog. sekretorický karcinom
- mukoeptidermoidní karcinom
 - low grade
 - intermediate grade
 - high grade
- adenoidně cystický karcinom
 - s převahou tubulární/kribriformní složky
 - >30% solidní složky
- polymorfní adenokarcinom
 - klasický
 - kribriformní
- epiteliálně-myoepiteliální karcinom
- (hyalinizující) karcinom z jasných buněk
- basocelulární adenokarcinom
- sebaceosní adenokarcinom
- intraduktální karcinom
 - low grade
 - high grade
- adenokarcinoma, NOS
 - low grade
 - high grade

- salivární duktální karcinom
- myoepiteliální karcinom
- karcinom z pleomorfního adenomu
 - intrakapsulární
 - minimálně invazivní
 - invazivní
- karcinosarkom
- špatně diferencovaný karcinom: neuroendokrinní a non-neuroendokrinní
 - nondifferentiated carcinoma
 - large cell neuroendocrine carcinoma
 - small cell neuroendocrine carcinoma

- lymfoepiteliální karcinom
- skvamocelulární karcinom*
- onkocytický karcinom
- jiné
- sialoblastom

* *dlaždicobuněčný karcinom slinných žláz je v naprosté většině případů metastázou z primárního ložiska na kůži*

Benigní epiteliální tumory

- pleomorfní adenom
- myoepiteliom
- bazocelulární adenom
- Warthinův tumor (cystický adenolymfom)
- onkocytom
- lymfadenom

- cystadenom
- papiliformní sialadenom
- duktální papilom
- sebaceosní adenom
- kanalikulární adenom a jiné duktální adenomy

Adenoidně cystický karcinom (ACC) se na všech maligních sialomech podílí asi z 20 %. V oblasti malých slinných žláz je vůbec nejčastějším zhoubným tumorem (El-Naggar 2005). Postihuje pacienty každého věku, poněkud více však 5. a 6. decénia (Gondivkar 2011). Časté je perineurální a perivaskulární šíření, nezřídka prakticky znemožňující úplné chirurgické odstranění tohoto tumoru, který tak

vykazuje výraznou tendenci k lokoregionálním recidivám. Typický je dále vleklý průběh s pozdním výskytem hematogenních metastáz, postihujících zejména plíce, játra a skelet, které jsou schopny zahubit pacienta i za několik desetiletí (Speight 2002). Vzhledem k vleklému průběhu jsou solitérní metastázy indikací k jejich chirurgickému odstranění.

Nádor je složen z tubulární, kribriformní a solidní složky. Poměrné zastoupení posledně uvedené komponenty je základem histopatologického gradingu, který má současně i prognostický význam (Seethala 2009), protože převaha solidního uspořádání (> 30 %) vykazuje nejhorší průběh, kdy 90 % pacientů umírá do čtyř let. Naopak nádory s převahou tubulární/kribriformní složky charakterizuje pomalá, indolentní progresse. Většina pacientů (80-90 %) umírá až 10-15 let od stanovení diagnózy. Proto je salivární adenoidně cystický karcinom řazen mezi high risk tumory (Speight 2002).

3.1.2.5 Terapie

Jedinou racionální léčbou nádorů slinných žláz je jejich **operační odstranění** (Shah 2012). Názory na chirurgii benigních parotických tumorů nejsou zcela jednotné. U nejčastějšího typu, tedy pleomorfního adenomu, jevícího výrazný sklon k recidivám, je v závislosti na jeho velikosti a lokalizaci prováděna parciální, povrchová či totální parotidektomie. Filozofií těchto poměrně extenzivních postupů je vyloučení potenciálních nádorových reziduí, která se formou extrakapsulárních čepů šíří do parenchymu žlázy. U zcela malých (do cca 1 cm) lézí, uložených povrchově při zadním okraji žlázy, je v poslední době některými autory preferována **extrakapsulární disekce**. Při ní jsou potenciální, těsně za zevní hranicí pouzdra či okraje tumoru se nacházející ložiska likvidována elektrokoagulací. Dosavadní zkušenosti dokazují, že tento výkon, který na rozdíl od parotidektomie jakéhokoliv rozsahu není a priori spojen s disekcí lícního nervu, nevykazuje vyšší procento recidiv, má však významně nižší incidenci výskytu dočasných i trvalých obrn lícního nervu a dalších ranných i pozdních komplikací (Iro 2013). Ze stejných důvodů je tato minimální chirurgie některými autory používána i u malých, klinicky jako benigní léze imponujících karcinomů T1 v analogické lokalizaci. Bylo prokázáno,

že procento recidiv se signifikantně neliší od nádorů stejného klinického stádia, které byly odstraněny radikálněji parotidektomií (McGurk 2003).

Druhým nejčastějším benigním parotickým tumorem je Warthinův nádor (cystadenolymfom), u něhož se setkáváme s obou- i jednostrannou, simultánní či sukcesivní multiplicitou. V současné době se dříve odlišné názory na rozsah resekce příušní žlázy u této jednotky sjednotily v preferenci její pouhé exstirpace, k čemuž přispěla i skutečnost, že velká část Warthinových tumorů není pravým neoplazmatem, ale reaktivním pseudotumorem (Witt 2015). Uvedený přístup nevede k výraznějším jizevnatým změnám v okolí větví lícního nervu. Případně následné chirurgické odstranění dalšího nádorového ložiska exstirpací či parotidektomií tak nepůsobí většinou potíže.

Ideálem pro stanovení rozsahu, resp. radikality chirurgické léčby parotických karcinomů by byla spolehlivá předoperační informace o jejich biologickém riziku. To lze však určit až definitivním histopatologickým vyšetřením chirurgického specimen. Z hlediska operační strategie se proto jako důležitá jeví skutečnost, že tumory časného klinického stádia T1-2 (tedy menší než 4 cm), vykazují signifikantně nižší incidenci uzlinových metastáz, menší riziko vzniku lokoregionálních recidiv i vzdálených metastáz a lepší pětileté přežití. To (bez ohledu na histologický typ, resp. stupeň biologického rizika nádoru) dosahuje 80–90 %, zatímco u karcinomů vyššího stádia (T3-4) klesá k 50 %. Uvedená skutečnost se odráží i v současných přístupech, kdy tumory T1 a T2 jsou indikovány (s výjimkou nádorů hlubokého laloku) k **povrchové**, karcinomy T3 a T4 k **totální parotidektomii** (Bell 2005). Karcinomy ostatních velkých slinných žláz se odstraňují vždy v bloku s celou žlázou (Poorten 2014).

Pro salivární karcinomy je příznačná, nikoliv však absolutně platná korelace mezi stupněm malignity a klinickým stádiem. Léze nízkého biologického rizika jsou tak valnou měrou zachyceny v stádiích počátečních. Jsou převážně dobře ohraničené, vzácněji opouzdřené, a dosažení mikroskopicky negativních resekčních okrajů nečiní proto většinou potíží. Hlavním klinickým problémem těchto tumorů je skutečnost, že při fyzikálním vyšetření i na zobrazovacích metodách často imponují jako benigní adenomy. Neadekvátní chirurgický výkon vede - mnohdy až za řadu let či desetiletí -

k opakovaným recidivám, završeným exitem nemocného. Tyto (především acinocelulární, low grade mukoepidermoidní, epiteliálně-myoepiteliální karcinom) primárně biologicky příznivé léze mohou podlehnout tzv. high grade transformaci, která dramaticky mění jejich chování a tedy i terapeutický přístup. Uvedená vysoce prognosticky nepříznivá konverze může proběhnout i u karcinomu adenoidně cystického.

Zcela jiná je situace u karcinomů vysokého biologického rizika. Pro značně agresivní růst jsou diagnostikovány většinou až v pokročilých klinických stádiích, kdy na široké frontě pronikají do okolních tkání, cév a nervů, asi v 20 % pak vykazují regionální metastázy. U salivárního duktálního karcinomu není vzácné, že výrazně infiltrativně roste již v počátcích svého růstu. Kompletní odstranění je z onkochirurgického hlediska proto možné jen u menší části nemocných, ve většině případů nacházíme mikroskopickou pozitivitu resekcčních hranic. Prognóza je tudíž špatná. I přes radikální operační výkon na primárním ložisku i krčních uzlinách a adjuvantní radioterapii činí pěti- a desetileté přežití méně než 50 %, resp. 30 % (Speight 2002, Renehan 1999).

Současným trendem v chirurgii tumorů příušní žlázy je snaha co nejvíce šetřit **lícní nerv**. Pouze v případě jeho postižení se provádí resekce infiltrovaných větví a dle možnosti i jejich okamžitá rekonstrukce. Primární sutura end-to-end obvykle nepřichází v úvahu. Pokud není možná ani náhrada volným štěpem (nejčastěji z nervus auricularis magnus nebo nervus suralis), nabízí se hypoglosofaciální anastomóza nebo našití periferní části nervu na centrální pahýl vhodné větve kontralaterální (cross facial graft) (Bussu 2014).

Komprehenzivní bloková disekce krčních uzlin je vždy indikována u karcinomů příušní žlázy s prokázaným šířením do regionálních uzlin (cN+), které nacházíme u 15 až 38 % případů (Nobis 2014). Lymfogenní metastázy mají podobně jako u jiných, non-salivárních malignit obecně prognostický význam, který však u karcinomů slinných žláz vykazuje určitou variabilitu v závislosti na daném histopatologickém typu. Jejich incidence je závislá především na příslušném histopatologickém typu, respektive biologickém riziku salivárního nádoru. U high risk parotických karcinomů činí průměrně 49 %, u neagresivnějších forem dosahuje až 60 - 80 % (např. high grade

mukoepidermoidní karcinom, nediferencovaný karcinom). U low risk nádorů se udávaný výskyt uzlinových metastáz pohybuje v závislosti na histopatologickém typu a autorovi mezi 0 a 20 % (Myers 2007). Krční metastázy karcinomů příušní žlázy postihují především (v 74 %) úroveň II, ostatní úrovně asi v 15 – 20 % cN+ pacientů. Incidence okultních metastáz parotických karcinomů kolísá ve značném rozmezí 12-50 %. Většina je lokalizována v oblasti II, III a Va (Myers 2007). Názory na indikace a rozsah **elektivních blokových krčních disekcí** u cN0 pacientů nejsou jednotné, většina autorů je však provádí u karcinomu vysokého biologického rizika a pokročilého klinického stádia (T3, T4) (www.nccn.org, cit. 15.5.2017).

Karcinomy slinných žláz patří mezi radiosenzitivní, nikoliv radiokurabilní tumory. Adjuvantní **pooperační radioterapie** je indikována u karcinomů stádia T3-4 a vysokého biologického rizika. U low grade lézí a iniciálních klinických stádií (T1-2), jsou-li pozitivní histologické resekcční okraje, přítomny mikroskopické známky invaze do lymfatických a krevních cév, či do nervů, a při pN+. Dále je adjuvantní radioterapie doporučována u všech adenoidně-cystických karcinomů nezávisle na jejich dalších parametrech (National Comprehensive Cancer Network, cit. 15.5.2017). Klinickými studiemi byl zjištěn příznivý vliv adjuvantní radioterapie na riziko vzniku lokoregionálních recidiv u pokročilých salivárních karcinomů a vysokého stupně malignity, kde dochází až k jejich 50 % poklesu (Theriault 1986). Význam pooperačního ozáření na celkové přežití nebyl dosud jednoznačně potvrzen.

Samotná radioterapie jako primární léčba je indikována u pacientů, u nichž je tumor z lokálních či celkových příčin inoperabilní. Její výsledky jsou však signifikantně horší než chirurgické odstranění samotné či jeho kombinace s následným ozářením.

Chemoterapie má u karcinomů slinných žláz význam jen paliativní, je indikována u diseminovaných tumorů, kde prodlužuje život nemocného jen v řádu měsíců. Vzhledem k velkému počtu histotypů a chybění validních studií neexistují platné guidelines. V monoterapii se nejčastěji užívá fluorouracil, cisplatina a doxorubicin, v kombinačním léčebném schématu cyklofosamid, doxorubicin a cisplatina. Částečná odpověď se dostavuje ve 22 až 100 %, kompletní až ve 35 % (Venook 1987), efekt léčby

je však jen krátkodobý. Značné rozpětí udávaných čísel je podmíněno odlišnou velikostí sledovaných souborů nemocných a různým zastoupením jednotlivých histopatologických jednotek.

Pro neuspokojivé výsledky komplexní léčby u karcinomů vysokého biologického rizika a klinického stádia se v současné době se stále více pozornosti věnuje identifikaci jejich molekulárních, prediktivních a prognostických markerů s potenciálním využitím k cílené biologické léčbě. Tak u salivárního duktálního karcinomu byl prokázán 100% výskyt androgenních receptorů a ve 20 až 30 % exprese a amplifikace genu HER2/neu. Malý počet klinických studií však dosud brání zavedení jejich blokady do terapeutických standardů. Aktuálně probíhají klinické zkoušky Entrectinibu (inhibitor tyrozinkinázy) u sekrečního karcinomu slinných žláz (původně označený jako mamárně analogický sekretorický karcinom slinných žláz – MASc).

Základní principy léčby jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7 Základní principy léčby primárních karcinomů slinných žláz (Seethala 2009).

Chirurgie	Chirurgie+RT	Blok. krční disekce	ChT
negativní okraje	blízký okraj (<2 mm)		M1
	pozitivní okraj		neresekabilní tumor
low risk	high risk - infiltr. růst	high risk-angioinvaze	
bez infiltr. Růstu	T3 nebo T4	T3 nebo T4	
T1 nebo T2	pN+	cN+	
	perineurální šíření		

Pozn. T a N dle TNM klasifikace.

3.1.2.6 Prognóza

Starší práce poukazují na závislost prognózy na histopatologickém gradingu (tabulka 8, Bell 2005, Lima 2005, Zbären 2003).

Tabulka 8 Závislost prognózy (celkového přežití) na histopatologickém gradingu (Frankenthaler 1997)

	5-leté přežití	10-leté přežití
low grade	97 %	95 %
intermediate grade	92 %	90 %
high grade	59 %	53 %

Speight však prokázal, že bez ohledu na stupeň diferenciacie salivárního karcinomu je rozhodujícím faktorem jeho klinické stádium (Speight 2002). Nádory T1-2 při srovnání s T3-4 mají lepší 5-leté přežití (90 % versus 40 %) (Renehan 1996, Spiro 1986) a nižší výskyt okultních metastáz do krčních uzlin (4-8 % versus 19-20 %) (Armstrong 1992, Frankenthaler 1993). Navíc se u T1-2 nádorů téměř nevyskytují vzdálené metastázy, oproti tomu u nádorů T3-4 činí jejich incidence 1,6-8,5 % (Gallo 1997).

Závěry Speightovy studie potvrzuje i práce Walvekara, který prokázal, že šíření mimo pouzdro tumoru je silnější prediktor recidivy a přežití než rozdělení nádorů na „low risk“ a „high risk“ (Walvekar 2011). Klinické stádium nádoru a histopatologický grading (resp. míra biologického rizika – low versus high risk) nejsou nezávislými prognostickými faktory, neboť high grade karcinomy rostou rychleji, a bývají tak zachyceny až v pozdějších klinických stádiích. Pozitivita resekčních okrajů zvyšuje riziko lokoregionální recidivy i výskytu vzdálených metastáz.

V poslední době se pozornost zaměřuje na molekulárně-genetické prediktory. C-kit je protoonkogen, lokalizovaný v pozici 4 (q 11-12). Jeho produkt patří mezi receptorové tyrosinkinázy, což jsou transmembránové proteiny, převádějící signál po vazbě ligandu růstových faktorů přes buněčnou

membránu. Tím spouští intracelulární kaskádu, kterou se předává signál do jádra. Zde po aktivaci transkripčních faktorů dojde k expresi genů nutných pro aktivaci mitózy. C-kit hraje významnou úlohu ve vývoji mastocytů, melanocytů, kmenových buněk bílé i červené krevní řady, jakož i germinálních a intersticiálních buněk Cajalových gastrointestinálního traktu. Jeho výrazná exprese, prokázána u myeloidní leukémie, melanomu, karcinomu prsu, plic, štítné žlázy, seminomu a zejména pak u gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST), je u nádorů slinných žláz značně variabilní. Výjimku však představuje právě ACC, který vykazuje pozitivní c-kit reakci v 80-100 % případů (Andreadis 2006, Sørensen 2006). Její přítomnost může sloužit jako pomocný diferenciálně diagnostický znak k odlišení velmi podobného, avšak prognosticky daleko příznivějšího kribriiformního polymorfního adenokarcinomu (dříve polymorfní low grade adenokarcinom) slinných žláz a benigního pleomorfního adenomu s absencí „stromální“ komponenty (Mino 2003).

Sorensenová ve skupině 73 karcinomů, pozůstávající z 10 nejčastějších histopatologických subtypů, včetně ACC, neprokázala žádný prognostický význam exprese c-kit (Sørensen 2006). K analogickým závěrům dospěl i Stárek (Stárek 2010), v jehož souboru, čítajícím 33 karcinomů širokého histopatologického spektra, nebyl potvrzen rozdíl v celkovém nádorově specifickém přežívání mezi pacienty s c-kit negativními a c-kit pozitivními karcinomy. To je v kontrastu s prognostickým významem c-kit genu u GISTu, kde byla zjištěna souvislost mezi jeho expresí a délkou přežití (Miettinen 2006, Taniguchi 1999).

Protože naprostá většina ACC vykazuje silnou c-kit imunoreakci, vkládaly se do blokády c-kit signální cesty tyrozinkinázovými inhibitory (TKI) velké naděje. Určitý entuziazmus byl vyvolán výsledky prvních aplikací imatinibu (Glivec), protože Alcedo (Alcedo 2004) v r. 2004 referoval o dvou pacientech s ACC, úspěšně léčených tímto preparátem. V roce 2005 Faivrová (Faivre 2005) publikovala výsledky u jen o málo většího souboru 8 pacientů s ACC. K pozitivní odpovědi na léčbu došlo u jednoho z nich. Podobně ani Hotte (Hotte 2005) nezaznamenal výraznější efekt působení imatinibu u 16 nemocných s tímto nádorem. Kritický pohled potvrdily i další, rozsáhlejší studie (Heinrich 2008, Pfeiffer 2007). Linem byl po uvedené terapii dokonce popsán akcelerovaný růst metastáz (Lin 2005). Ghosal ve studii, publikované v roce 2010, podával imatinib v kombinaci s cisplatinou v léčbě tohoto nádoru

s částečným efektem, kdy u 3 z 28 pacientů došlo k dočasnému zastavení jeho progresu (Ghosal 2011). Nověji byly syntetizovány TKI nové generace (sunitinib, nilotinib, dasatinib a jiné), které se od imatinibu liší tím, že kromě c-kit působí i na další receptory s tyrozinkinázovou aktivitou. V současnosti probíhá intenzivní výzkum léčby salivárního ACC těmito novými preparáty, dosavadní zprávy však jsou zdrženlivé. Chau (Chau 2005) nezaznamenal reakci u 14 nemocných, léčených sunitinibem. Podobně nedošlo k pozitivní odpovědi na léčbu dasatinibem v kombinaci s cetuximabem (Argiris 2012). Recentní studie, která má za úkol sledovat odpověď na léčbu Dasatinibem, dosud nebyla ukončena (www.clinicaltrials.gov, cit. 25.3.2017). Dosavadní negativní zkušenosti s uvedenou terapií je ovšem nutno hodnotit ve světle skutečnosti, že do studií byli zahrnuti jen pacienti s generalizovanými progredujícími, nikoliv s primárními tumory. Dalším možným důvodem neúčinnosti léčby imatinibem je dle Bellové (Bell 2011) skutečnost, že c-kit je exprimován toliko v nádorových duktálních, a nikoli v myoepiteliálních buňkách. Posledně uvedené elementy exprimují MYB gen, který není cílovou molekulou pro léčbu TKI.

MYB gen je lokalizován v oblasti q22-q23 chromozomu 6. Jeho proteinový produkt je klíčový transkripční faktor pro správnou diferenciaci buněk hematopoetického systému, nervových a kožních buněk a střevních krypt (Sørensen 2006). Jeho deregulace a aberantní funkce vede k iniciaci různých nádorů. Vysoká exprese MYB genu je spojená se špatnou prognózou T buněčné i akutní myelogenní leukémie (Slamon 1986) a kolorektálního karcinomu (Wilkins 2010).

Alteraci MYB genu u ACC popsala jako první Perssonová (Persson 2009) u 6 pacientů s nádory vycházejícími z velkých a malých slinných žláz, ze slzní a prsní žlázy. Ve všech těchto případech šlo o fúzní translokaci, na níž se jako partner podílel NFIB gen, lokalizovaný na chromozomu 9. Autorka se proto domnívala, že tato alterace, zvyšující MYB transkripční aktivitu nádorových buněk, je jediným mechanismem vzniku této histopatologické jednotky. Výsledky dalších studií (Brill 2011, Mitani 2010, Stárek 2010) však prokázaly, že overexprese MYB proteinu není vždy spojená s MYB-NFIB fúzí. Mitani se proto spekulativně domnívá, že MYB gen je aktivován ještě dalšími, ne zcela objasněnými mechanismy (Mitani 2010).

Alterace MYB genu byla nalezena u karcinomu prsu a kolorekta (Wilkins 2010). Ze salivárních tumorů ji vykazuje výlučně ACC, což má význam v jejich histopatologické diferenciální diagnóze, především v odlišení této jednotky od nejčastěji se vyskytujícího benigního pleomorfního adenomu (Pusztaszeri 2014). MYB gen může být poškozen více dosud ne zcela přesně identifikovanými mechanismy (Mitani 2010), mezi něž patří i translokační fúze s genem NFIB, jež je přítomna v 28-49 % případů (Mitani 2010, West 2011).

Několik recentních studií zkoumalo prognostický potenciál exprese MYB genu u ACC. Mitani (Mitani 2010) v klinickopatologické analýze vzorků 102 pacientů prokázal signifikantní asociaci zvýšené MYB exprese s horší prognózou. Oproti tomu West (West 2011) u 37 a Bellová (Bell 2010) u 156 pacientů s těmito tumory nezjistili statisticky významnou souvislost mezi MYB expresí a délkou přežití. Závěry dosavadních studií, hodnotících prognostický význam MYB genu u ACC, se tedy různí. V tomto směru však probíhá v současnosti intenzivní výzkum. Dosavadní výsledky naznačují, že některé z jeho alterací jeví prognostickou relevanci (Mitani 2010).

Terapeutický potenciál blokady MYB genu u malignit byl zkoumán zatím pouze experimentálně, protože transkripční faktory, mezi něž tento patří, jsou obecně považovány za velmi obtížné terapeutické cíle (Pattabiraman 2013). Na zvířatech bylo zjištěno, že MYB gen lze u hematologických malignit zablokovat buď přímo na transkripční či nižší signální úrovni (Ramsay 2003). Další studie prokázala, že jinak imunitnímu dohledu unikající MYB pozitivní buňky murinního kolorektálního karcinomu jsou po navázání MYB protilátky imunokompetentními mechanismy rozpoznány a následně zničeny (Cross 2015). Výsledky uvedených experimentálních studií se jeví terapeutickým příslibem nejen u zmíněných nádorů, ale i u ACC (Brož 2016).

Netypicky pro benigní léze má pleomorfní adenom vysoké riziko recidiv. Protože bezpříznakový interval je velmi variabilní, neodpovídá zřejmě udávaná nízká incidence recidiv (Stevens 1982) skutečnosti, neboť starší pacienti mohou umřít dříve, než dojde k recidivě tohoto nádoru. Celonárodní dánská studie za 25 let sledování zjistila alespoň jednu recidivu u 2,9 % pacientů (Andreasen 2015). Předpokládá se, že výskyt recidiv pleomorfního adenomu může být vedle peroperačního rozsevu nádorových buněk, způsobeného rupturou pouzdra, zapříčiněn i ponecháním

nádorových reziduí ve formě extrakapsulárních mikroskopických pseudopodií. Z hlediska nádorové biologie je tedy opakovaný výskyt pleomorfního adenomu spíše jeho perzistencí nežli recidivou (Stennert 2001).

Multiplicita recidivujícího pleomorfního adenomu je vysvětlována enormní implantabilitou jeho buněk. Ta je formálním důvodem, proč nádorová, makro- i mikroskopická ložiska nacházíme v okolních měkkých tkáních, často ve velké vzdálenosti od primárního tumoru. Tento fenomén, který chybí u ostatních salivárních adenomů, však po biologické stránce nebyl dosud jednoznačně objasněn. Briegerova studie však naznačuje, že buňky recidivujícího pleomorfního adenomu ve zvýšené míře exprimují fascin a cadherin-11. Tyto proteiny podněcují buněčnou motilitu a migraci. Jejich up-regulace je spojena s iniciálním krokem v invazi a metastazování nádorů (Brieger 2008). Stennert vysvětluje multiplicitu recidivujícího pleomorfního nádoru šířením jeho buněk v lymfatických cévách. Avšak důkazy, které tento autor ve své práci v tomto smyslu poskytl, nejsou přesvědčivé (Stennert 2004). Naše studie (Salzman 2014) porovnávající lymfangiogenezu v primárním a recidivujícím nádoru, však Stennertovy závěry nepotvrdila.

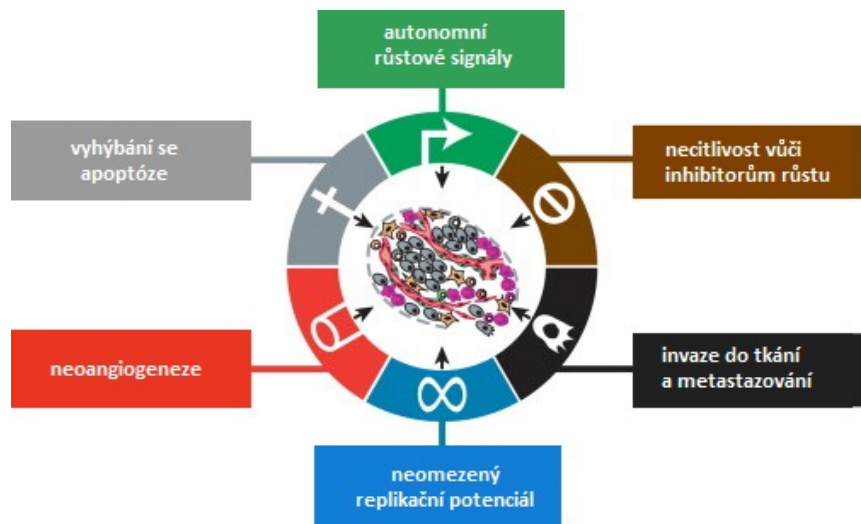
Odlišnosti v biologii primárních a recidivujících pleomorfních adenomů vedou k domněnce, že posledně uvedené formy vykazují zvýšenou biologickou agresivitu. Tento názor podporuje řada následně uvedených, dřívějších i recentních prací: Bankamp prokázal zvýšenou Ki-67 proliferační aktivitu u primárních tumorů, které následně recidivovaly, jakož i u recidiv samotných (Bankamp 1999). Glas zjistil u recidiv vysokou expresi estrogenových, progesteronových a některých dalších receptorů (Glas 2002). Jiná studie (Soares, J Clin Pathol 2011) prokázala rozdíly v expresi nádorového supresorického genu p16 mezi oběma uvedenými klinickými formami pleomorfního adenomu. K analogickým výsledkům dospěly i dvě další publikace, zabývající se expresí některých cytokinů, regulujících buněčný růst a dělení (Soares 2012), apoptózu a invazi nádorových buněk (Soares, Histopathol 2011). Sami jsme potvrdili signifikantně zvýšenou expresi antiapoptotického genu bcl-2 v recidivujících pleomorfních adenomech (Obtulovicova 2015).

Dosud temnou zůstává i otázka vzácně se vyskytujícího (dosud jen asi 130 dokumentovaných případů) „benigního“ metastazujícího pleomorfního adenomu. Tento nádor, spojený v naprosté

většině případů s recidivami primární léze, se řadí mezi high risk salivární karcinomy, neboť je spojen až s 40% mortalitou. Na rozdíl od karcinomu v pleomorfním adenomu, který jeví zcela jednoznačné patomorfologické známky malignity, si metastazující pleomorfní adenom zachovává všechny cytologické i histologické charakteristiky benigního pleomorfního adenomu. Obecnou podmínkou vzniku metastáz je průnik nádorových buněk do lymfatických či krevních cév. Takováto invaze je u pleomorfního adenomu předmětem sporů. Coleman ji v souboru 67 nádorů našel v 9 % případů a domnívá se, že jde o biologický fenomén (Coleman 1999). Oproti tomu Skálová uvádí, že jde o artefakt, způsobený chirurgickými nástroji (Skalova 2012).

3.2 Vybrané onkologické markery hlavy a krku

V tomto souboru prací se věnuji 2 skupinám onkomarkerů, a to parametrům oxidativního stresu (OS) a angiogeneze, asociované s rodinou vaskulárních endoteliálních růstových faktorů (VEGF).



Obr. 1. Hanahanem a Weinbergem navržené schéma kroků nutných k transformaci v maligní nádor.

Hanahan a Weiberger popsali 6 změn ve fyziologii buňky, které jsou nutné k její maligní konverzi (Hanahan 2000) získání autonomních růstových signálů, 2/ insenzitivita k inhibičním signálům, 3) schopnost vyhnout se apoptóze, 4) neomezený replikační potenciál (nesmrtelnost), 5) získání dostatečného cévního zásobení (neoangiogeneze), 6) schopnost invaze do tkání a metastazování (obr. 1). Zvýšený oxidativní stres (OS) doprovází většinu kroků onkogeneze. Nadprodukce volných kyslíkových radikálů, jakož i nedostatečná exprese nebo funkce antioxidantních enzymů poškozuje buněčné struktury včetně DNA, což může vést k mutacím v kritických částech genomu (Sanchez-Perez 2005, Valko 2006).

Dalším významným faktorem pro vznik a růst malignomů je jejich schopnost zajistit si dostatečnou výživu (Lothaire 2006). Růst nádoru doprovází její stoupající potřeba, která je zpočátku zajišťována

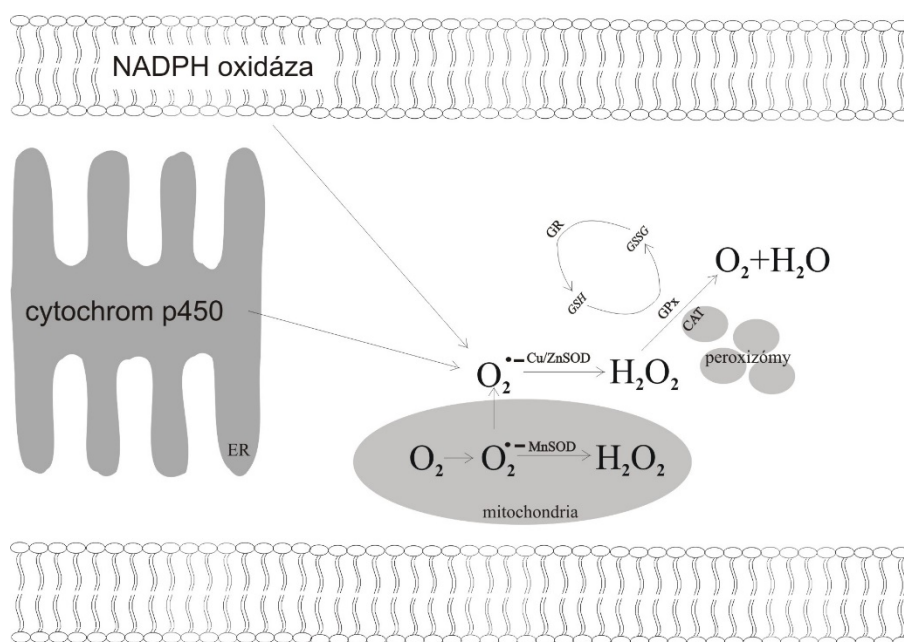
stávajícími cévami. Po vyčerpání jejich kapacity nádor začne produkovat působky, které vedou k novotvorbě cév, umožňujících další navýšení výživovací kapacity (Stennert 2004).

3.2.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres (OS) můžeme definovat jako stav překonání antioxidantní obrany buňky volnými kyslíkovými radikály (VR). Dochází k němu při zvýšené produkci VR nebo při nedostatečné aktivitě antioxidantní obrany buňky.

VR jsou látky pohotově reagující s buněčnými strukturami díky přítomnosti jednoho nebo více nepárových elektronů. Mezi VR zahrnujeme superoxidový anion, hydroxylový radikál, singletový kyslík, peroxynitrit, peroxid vodíku atd. Produkce VR je endogenní nebo exogenní. Klinicky významné ve vztahu k onkologii hlavy a krku jsou zejména VR, obsažené v cigaretovém kouři a alkoholu (Nadif 2003).

Mitochondrie prozánětlivě působících buněk (eozinofily, alveolární makrofágy, atd.) jsou významným endogenním zdrojem VR. I za fyziologických podmínek unikají z dýchacího řetězce ojediné elektrony, které následně reagují s kyslíkem za tvorby superoxidového anionu. Oxidativní enzymy (AOE) 1. stupně (superoxid dismutáza, SOD) jej mění v peroxid vodíku. Vzhledem k jeho oxidativní kapacitě musí být i tento neutralizován antioxidantními enzymy 2. stupně, tedy katalázou v peroxizomech (CAT) a glutathionperoxidázou v cytoplazmě a v mitochondriích (GPx) (obr. 2). Nejsou-li VR neutralizovány dostatečně rychle AOE nebo neenzymatickými antioxidanty, dochází k poškození biomolekul a buněčných struktur (Subapriya 2003), včetně membrán. V nich se vlivem VR rozpadají membránové fosfolipidy, přičemž jedním z koncových produktů tohoto procesu je i malondialdehyd (MDA). Jeho hladina vypovídá o míře expozice buňky OS. Působením VR též dochází k modifikaci struktury proteinů a zlomům DNA (Racek 2003). Oxidativním stresem modifikovaná DNA je geneticky nestabilní, čímž má větší tendenci k mutagenезi.



Obr 2. Metabolismus volných kyslíkových radikálů v buňce.

V posledních letech bylo popsáno několik úrovní vztahu oxidativní zátěže k riziku vzniku a prognóze rakoviny obecně. Jednak VR oxidativně poškozují DNA, jejíž mutace jsou dávány do souvislosti s karcinogenezí. Dále většina maligních buněk postrádá fyziologickou schopnost vypořádat se s OS kvůli změněné aktivitě AOE (Bohn 2006).

Vzhledem k působení chemoterapie i ozáření na maligní buňky pomocí VR, a díky alteraci mechanismů neutralizujících jejich oxidativní zátěž, lze predikovat i vztah OS k rezistenci k adjuvantní terapii. Zdá se, že chemo- i radiorezistence může být podmíněna neschopností buňky vypořádat se s OS.

V onkologii hlavy a krku zatím nebyly žádné významné onkomarkery zavedeny do rutinní praxe. Dle nejnovějších poznatků se právě markery OS teoreticky nabízí jako vhodní kandidáti.

3.2.1.1 Zdroje volných radikálů

VR podle původu můžeme rozdělit na endogenní, které jsou produkovány v organismu, a exogenní, které se do organismu dostávají ze zevního prostředí.

Mitochondrie, organela zodpovědná za aerobní dýchání, je hlavním místem tvorby endogenních VR. Za fyziologických podmínek unikají z dýchacího řetězce četné elektrony. Podle Curtina množství elektronů reagujících s jinými molekulami za tvorby VR představuje až 1-2 % všech elektronů přenášených v dýchacím řetězci (Curtin 2002). Další zdroje endogenních VR jsou enzymatické reakce

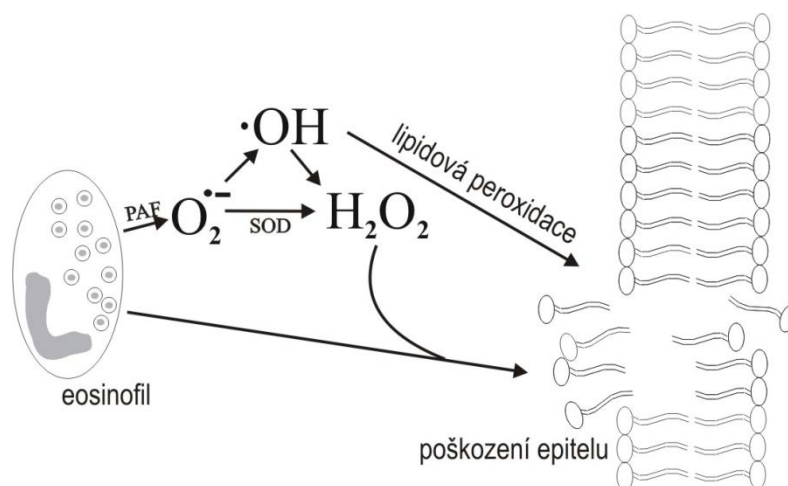
katalyzované oxidázami (zejména xanthinoxidázou) nebo kaskáda arachidonové kyseliny (Szalagatys 2003).

Důležitou součástí zánětlivé odpovědi proti mikrobiálním patogenům je vznik VR v polymorfonukleárech a makrofázích. Primárním zdrojem endogenních VR, produkovaných při rozpoznání mikroorganismů, je NADPH ve fagocytech. Tento proces se nazývá „oxidative burst“. V případě, že se přísně regulovaná tvorba VR vymkne kontrole, poškozují tyto buněčné noxy nejen patogeny samotné, ale i tkáň organismu vlastní. Příkladem může být ARDS, kdy pneumocyty vystavené bakteriálním toxinům či aktivované komplementem chemotakticky přivolávají aktivované neutrofilny a jimi produkované VR vedou k poškození a následnému zvýšení permeability buněčných kapilárních membrán. Je obecně známo, že eozinofily hrají důležitou roli u astmatu. Eozinofilní peroxidáza, která je obsažena v jejich granulích, uvolňuje VR po aktivaci specifickými stimuly (Barnes 1990). Agosti v souladu s Ayarsem potvrzují významný potenciál tohoto enzymu poškozovat alveolární pneumocyty 2. typu (Agosti 1987) jakož i respirační buňky nosního epitelu (Ayars 1989).

Dále nutno zmínit VR, které se dostávají do organismu ze zevního prostředí. V mnoha moderních městech se hladiny oxidačních látek v atmosféře díky industrializaci výrazně zvýšily. Nejvýznamnějšími oxidanty zevního prostředí jsou ozon a cigaretový kouř. Vykouření jedné cigarety představuje zatížení organismu až 10^{17} volných radikálů (Comhair 2000). Inhalované exogenní VR se dostávají do kontaktu s velkou plochou respiračního epitelu, čímž se plíce stávají OS nejvíce ohroženým orgánem. Exogenní VR jsou tvořeny rovněž vlivem alkoholu, ionizujícího záření, ultrafialového světla (např. v slunečním záření) či xenobiotik.

3.2.1.2 Poškození makromolekul oxidativním stresem

Na buněčné úrovni VR poškozují celou řadu buněčných struktur, například fosfolipidy buněčných membrán, nukleové kyseliny a bílkoviny. Nejzávažnější a nejlépe prostudována je lipidová peroxidace, při které vlivem VR dochází k neenzymové peroxidaci polynenasycených mastných kyselin membránových fosfolipidů (obr. 3).



Obr. 3. Schéma lipidové peroxidace.

Jediná molekula VR vyvolá vznik velkého množství molekul hydroperoxidů v buněčné membráně, čímž se zvyšuje její permeabilita. Tento stav vede k poruše základních buněčných funkcí či dokonce ke smrti buňky (Barnes 1990). Jedním z produktů lipidové peroxidace je i MDA, který tak slouží jako marker míry oxidativního poškození buňky.

Oxidační modifikace proteinů probíhá podobně jako u lipidů. Vznikající hydroperoxydy se vážou na kov v aktivním centru enzymů, např. na železo u katalázy, čímž je deaktivují. Na molekulární úrovni VR modulují zánětlivý proces stimulací uvolňování histaminu žírnými buňkami a aktivací kaskády arachidonové kyseliny. Na tkáňové úrovni zvyšují kontraktilitu hladkých svalů dýchacích cest, vyvolávají down regulaci β -adrenergických receptorů, zvyšují permeabilitu endotelu cév, způsobují produkci viskózního sekretu, bronchiální hyperreaktivitu a poruchu ciliárního transportu (Szalagatys 2003).

3.2.1.3 Antioxidativní ochranný systém

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel způsobit stres, který mohly přežít jen druhy, u nichž se vyvinuly mechanismy chránící před kyslíkem a jeho metabolity (Otto-Knapp 2003). Organismus se brání tvorbě nadměrného množství VR opravou a novotvorbou kyslíkovými radikály poškozených struktur, regulací exprese a aktivity enzymů tvořících VR nebo eliminací již vytvořených endogenních či exogenních VR v organismu tzv. scavengery. Například první linie obrany vycytává exogenní VR ještě v tracheobronchiálním sekretu, tedy dříve než mohou proniknout intracelulárně a způsobit poškození buněčných struktur.

3.2.1.4 Antioxidativní enzymy

Cu/ZnSOD (SOD1) - Měďnato-zinečnatá superoxiddismutáza se nachází v cytoplazmě prakticky všech buněk vyšších živočichů, zejména v erytrocytech, hepatocytech a neuronech. Gen pro Cu/ZnSOD je lokalizovaný na 21. chromozomu. Jeho mutace byla zjištěna u jedinců s familiární amyotrofickou laterální sklerózou (Štípek 2000). Stránka | 36

MnSOD (SOD2) – Superoxiddismutáza obsahující mangan se vyskytuje v mitochondriích, tedy v buněčné organelle, kde se tvoří většina VR. U savců vykazují její nejvyšší hladiny buňky srdečního svalu, mozku, ledvin a jater. Gen pro SOD2 je lokalizovaný na 6. chromozomu. Největší pozornost je zaměřená na záměnu nukleotidů na pozicích 47 a -9, podmiňující změny v pořadí aminokyselin (Ala/Tre a Ala/Val) a způsobující změnu aktivity exprimovaného proteinu (Chistyakov 2000). Podobnou změnu fenotypu způsobuje změna nukleotidů na pozici 245 (Ile/Tre). Varianta s isoleucinem má až 3x vyšší enzymovou aktivitu (Tombly 1998).

EC-SOD (SOD3) – Extracelulární forma superoxiddismutázy, obsahující rovněž měď a zinek, byla prokázána v plazmě a lymfě. Váže se na heparan sulfát a proteoglykany endotelu cév (12). Sandstrom zjistil u 2 % švédské populace až 10x vyšší plazmatickou hladinu tohoto enzymu, vyvolanou záměnou aminokyseliny Arg za Gly na pozici 213 (Sandström 1993). Uvedená změna pravděpodobně snižuje afinitu EC-SOD ke strukturám endotelových buněk. Incidence EC-SOD napovídá, že se s velkou pravděpodobností jedná o genetickou predispozici k vyšší hladině zmíněného enzymu.

GPx1 – Selen obsahující glutathionperoxidáza, kódovaná na 3. chromozomu, je exprimována u lidí zejména v cytoplazmě erytrocytů, buněk ledvin a jater. Několik známých mutací nemá vliv na její aktivitu. Ratnasinghe prokázal asociaci mezi jednou variantou polymorfizmu GPx1 na pozici 198 s rakovinou plic. Rovněž myši neschopné exprimovat GPx1 mají normální fenotyp, ale jsou citlivější na zvýšení OS vyvolaného paraquatem nebo H₂O₂. (Ratnasinghe 2000)

GPx2 – Cytoplazmatická glutathionperoxidáza obsahující selen je primárně syntetizována v gastrointestinálním traktu savců, který chrání před toxicitou požitých lipidových peroxidů. Její gen se nachází se na 14. chromozomu.

GPx3 – Extracelulární glutathionperoxidáza se tvoří zejména v plazmě a její gen je lokalizován na 5. chromozomu. Hlavním úkolem tohoto enzymu je redukovat hydroperoxydy komplexních lipidů, např. fosfatidylcholinu, v extracelulárních tekutinách.

CAT – Kataláza, jejíž molekula obsahuje porfyrinový kruh se železem, je tvořena v peroxizomech erytrocytů. CAT je jedním z neefektivnějších známých enzymů. Relevantní gen se nachází na 11. chromozomu. Hunt prokázal její up-regulaci při zvýšeném OS (Hunt 2003).

Glutathionový redoxní cyklus, zahrnující glutathion (GSH), GPx a glutathionreduktázu (GR), je pravděpodobně nejdůležitější buněčný antioxidantní systém. Podílí se nejen na vychytávání VR, ale i na regulaci intracelulární redoxní rovnováhy. GPx redukuje H_2O_2 za současné oxidace GSH na jeho oxidovanou formu s disulfidovým můstkem (GSSG). GSSG je následně zpětně regenerován glutathionreduktázou na GSH, opět připravený k vychytávání H_2O_2 . Schopnost buňky tvořit GSH, ať již novou syntézou nebo redukcí GSSG, je důležitým faktorem efektivnosti antioxidantní obrany (obr. 2).

3.2.1.5 Genetický podklad antioxidantních obranných mechanismů

Kapacita antioxidantních systémů buňky je závislá na genetické predispozici každého jedince. AOE u zdravého jedince musí zvládat neutralizaci jak fyziologicky tvořeného množství VR, tak i zvýšenou oxidativní zátěž např. při zánětu. Právě geneticky podmíněná schopnost adaptovat efektivitu antioxidantní obrany na zvýšenou oxidativní zátěž je pravděpodobně zodpovědná za interindividuální variabilitu a rozdílnou klinickou manifestaci OS.

V současnosti jsou známy lokusy většiny významných AOE. Genetická variabilita u lidí je z větší části podmíněna variantami nukleotidů na určité pozici řetězce DNA, tzv. polymorfizmy jediného nukleotidu (single nucleotide polymorphism, SNP). Většina SNP je němá, bez jakéhokoliv vlivu na funkci proteinů. Naopak některé SNP výrazně podmiňují fenotyp (Forsberg, Archives 2001).

Četné výzkumy se věnují sledování fenotypu různých polymorfizmů AOE. Forsbergová uvádí, že polymorfismus u CAT významně ovlivňuje její hladinu v buňkách, a tím i schopnost buňky bránit se OS (Forsberg, Free radical biology 2001). Fu uzavírá, že delece genů pro GPx1 u myši nevyvolá žádnou změnu fenotypu při běžné oxidativní zátěži, ale hepatocyty těchto myši se stanou senzitivnější k elevovanému OS (Fu 1999).

Předpoklad geneticky podmíněné schopnosti onkologického pacienta posílit antioxidantní obranu v situaci zvýšené tvorby VR nádorovou tkání byl publikován Genkingerem. Pozoroval nižší riziko vzniku rakoviny obecně u heterozygotů Ala/Val (Genkinger 2006) v souboru 6151 dárců krve.

3.2.1.6 Oxidativní stres a nádory hlavy a krku

Bylo popsáno několik obecných úrovní vztahu oxidativní zátěže k riziku vzniku a prognóze rakoviny. Předpokládá se, že část nádorových onemocnění vzniká při dlouhodobé oxidativní zátěži v prostředí

chronického zánětu (např. kolorektální karcinom u *collitis ulcerosa*, hepatocelulární karcinom u virové hepatitis, atd.) (Dreher 1996). Dále byla prokázána role významných exogenních zdrojů VR (kouření, alkohol) v etiologii rakoviny (Bohn 2006). Ke kancerogenezi přispívá i akumulace mutagenního potenciálu v případě, že organismus nestíhá reparovat oxidativním stresem poškozenou DNA. Oxidativní zátěž se ještě posílí u již vytvořené malignity, protože většina jejích buněk postrádá kvůli změněné aktivitě AOE fyziologickou schopnost vypořádat se s OS (Bohn 2006). Dále někteří autoři popisují i samotnou nádorovou tkáň jako zdroj rostoucího množství VR (Szuster-Ciesielska 2004, Bhuvaramurthy 1996, Hrizostov 2001). Zatím není úplně objasněno, který zdroj oxidativní zátěže hraje nejdůležitější roli. Domníváme se, že *in vivo* se jedná spíše o kombinaci výše popsaných zdrojů VR, kdy její jednotlivé složky mohou v různých fázích kancerogeneze hrát více či méně důležitou roli.

Mnoha autory popsaná intenzivnější lipidová peroxidace a nižší aktivita AOE u pacientů s karcinomy hlavy a krku (Sabitha 1999, Korotkina 2002, Kaynar 2005, Seven 1999, Taysi 2003) odpovídá zvýšenému OS u onkologických nemocných. Ten může být navozen primárně dlouhodobou expozicí vysokým hladinám VR, nebo vzniknout až v důsledku jejich obrovského množství, uvolňovaného samotnou nádorovou tkání. Po chirurgické resekci nádoru dochází k poklesu lipidové peroxidace a zvýšení aktivity AOE (Szuster-Ciesielska 2004, Bhuvaramurthy 1996). Hrizostov 10-20 dní po resekci tumoru prokázal normalizaci hodnot MDA jako ukazatele oxidativní zátěže v plazmě (Hrizostov 2001). Naopak Samir popsal elevaci produktů lipoperoxidace 3 týdny po laryngektomii (Samir 1999). Szuster-Ciesielská zjistila pozitivní korelaci mezi hladinou VR a klinickým stádiem laryngeálního karcinomu (Szuster-Ciesielska 2004). Yigitbasi demonstroval nepřímou úměru mezi aktivitou SOD a stupněm diferenciací (Yigitbasi 2000). Je zajímavé, že Bohn nenaměřil rozdíly v hladině OS, měřené ihned a poté za dalších 6 týdnů po ukončení kurativního ozáření (Bohn 2006). Plazmatická hladina MDA jako produktu lipoperoxidace, korelující s expozicí buňky OS, se zvyšuje u recidivující nemoci (Sabitha 1999, Jaloszynski 2003).

V souladu s dostupnými literárními zdroji lze uzavřít, že nádorová tkáň je významným zdrojem VR. Nárůst jejího objemu, podmíněný vyšším klinickým stádiem tumoru či jeho recidivou, vede k eskalaci OS. Během destrukce nádorové tkáně radioterapií, jakož i po chirurgické resekci tumoru by mělo docházet k poklesu hladiny VR (25). Takováto redukce OS však nemusí nastat, protože samotná radioterapie je významným zdrojem VR.

Vzhledem k působení chemoterapie i ozáření na maligní buňky volnými radikály, a díky alteraci mechanismů neutralizujících jejich oxidativní zátěž, lze usuzovat i na význam OS pro citlivost nádoru k těmto léčebným modalitám. Zdá se, že rezistence k nim může být podmíněna schopností buňky vypořádat se s OS.

V onkologii hlavy a krku zatím nebyly žádné sérové nádorové markery s dostatečnou senzitivitou a specificitou zavedeny do rutinní praxe. Dle nejnovějších poznatků nabízejí velký potenciál právě markery OS.

V dostupné literatuře se nám nepodařilo najít teoretický podklad funkce VR při metastazování. Využití VR maligními buňkami se nabízí hned v několika fázích procesu jejich diseminace (intravazace, záchyt ve vzdálené tkáni, extravazace). Nejen v této oblasti je nutný další důkladný výzkum.

3.2.2 Vaskulární endoteliální růstové faktory

Tvorba nových krevních a lymfatických cév a jejich invaze představuje zásadní krok v nádorové diseminaci. Hlavním klinickým významem poznání přesného biologického mechanismu tohoto procesu je potenciální možnost jeho cílené blokády. Opomenout nelze ani možný prediktivní, prognostický a diferenciatně diagnostický význam detekovaných alterací relevantních genů a jimi exprimovaných onkoproteinů.

Experimentální práce potvrzují, že vyvíjející se nádor je do objemu několika mm³ živěn difuzí z okolí. Poté jsou další růst, lokální i vzdálené hematogenní šíření tumoru závislé na novotvorbě krevních kapilár, které vycházejí ze stávajícího řečiště. Tím jsou zajištěny zvýšené požadavky nádoru na přísun kyslíku a živin (Risau 1997). Neoangiogenetický proces je spouštěn (tzv. angiogenic switch) a dále řízen celou řadou faktorů. Hlavní roli mezi nimi hrají vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF (později označený jako VEGF-A) a VEGF-B. Ty spolu s VEGF-C, D, E, F a PlGF (homologní placentární růstový faktor) patří do rodiny regulátorů, odpovědných vedle vaskulogenezy v embryonálních i za neoangiogenezu v nádorových i nenádorových tkáních (např. růst skeletu, hojení ran, menstruační cyklus, atd.) (Yamazaki 2006). Novotvorba cév podmíněná VEGF může být spuštěna mnoha fyziologickými i patologickými vlivy a působky, např. hypoglykemií, kysličníkem dusnatým, některými růstovými faktory, cytokiny, hormony, onkogeny (Ras, Raf), mutovanými antionkogeny (např. p53) a především hypoxií (Ferrara 1997, Kieser 1994). Mechanismus působení VEGF je značně komplikovaný, závislý na dalších činitelích (Fujioka 2003, Siebenlist 1994, Xu 2002). Účinek těchto VEGF, které jsou vytvářeny normálními, jakož i nádorovými buňkami (Klener 2008), je iniciován prostřednictvím tyrosinkinázových endoteliálních receptorů VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3 (Gerwins 2000). První dva spouštějí po navázání VEGF-A, B, D a E intracelulární transdukční kaskádu, vedoucí k bloádě apoptózy, proliferaci a migraci endoteliálních buněk a ke zvýšené cévní permeabilitě. Stejným mechanismem navozují lymfangiogenezu VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E, jež aktivují pro endotelie lymfatických cév specifické VEGFR-3 receptory (Klener 2008). Normální slinná žláza produkuje VEGF-A, C a D, které jsou slinou dopraveny do dutiny ústní. Předpokládá se, že jimi vyvolaná tvorba krevních a lymfatických cév zde, stejně jako ve žláze samotné, slouží k hojení ran

a homeostáze (Saaristo 2004, Tang 2011). Stimulační vliv VEGF faktorů na růst nádorů se kromě cévní novotvorby uplatňuje i oslabením mechanismů protinádorové imunity (Klener 2008). Prokazují to klinické studie, potvrzující souvislost exprese těchto faktorů s denzitou intratumorálních krevních cév, metastazováním a prognózou některých karcinomů, např. kolorekta (Takahashi 1997), plic (Fontanini 1998), prsu (Linderholm 1998), dutiny ústní (Maeda 1998) a jícnu (Uchida 1998).

V současné době narůstají experimentální i klinické důkazy, že lymfogenní metastazování nádorů není způsobeno jen invazí jejich buněk do sítě stávajících, ale i do novotvořených, samotným tumorem indukovaných intra- a peritumorálních lymfatických kapilár (Matilla 2002, Nathanson 2003, Pepper 2003, Skobe 2001, Stacker 2001, Stacker 2002). Za tuto nádorovou lymfangioneogenezu je odpovědna celá řada působků (Cao 2005), včetně výše zmíněných VEGF-C a VEGF-D (Nathanson 2003), jež jsou považovány za její nejsilnější aktivátory. V mnoha klinických studiích byla prokázána souvislost exprese těchto faktorů s hustotou nádorových lymfatických cév, výskytem uzlinových metastáz a s prognózou některých humánních karcinomů (Hu 2007, Choi 2005, Lin 2011, Moehler 2008), včetně dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku (Audet 2005, Beasley 2002, Burian 1999, Inoue 1997, Kitadai 2001, Kyzas, J Pathol 2005, O-charoenrat 2001, Xu 2004). V širokém histopatologickém spektru salivárních karcinomů byla prokázána souvislost exprese VEGF s klinickým stádiem, perineurální a intravaskulární invazí, recidivami a celkovým přežitím (Lim 2003).

3.2.2.1 Význam VEGF pro hematogenní metastazování ACC.

Na rozdíl od ostatních salivárních karcinomů je pro ACC příznačný hematogenní rozsev (Umeda 2002). Není tedy překvapivé, že expresí VEGF u tohoto tumoru se – ve srovnání s ostatními nádory slinných žláz - zabývalo několik výzkumných týmů. V klinické studii zjistil Zhang (Zhang 2005) střední VEGF imunoreaktivitu ve 30 % a vysokou v 46,2 % z celkem 80 chirurgicky léčených ACC. Expese korelovala s denzitou krevních cév, velikostí tumoru, klinickým stádiem, histopatologickým stupněm malignity, vaskulární invazí, vzdálenými metastázami a přežitím. Stejný autor v pozdější experimentální práci (Zhang 2007) porovnal tvorbu VEGF ve dvou buněčných liniích ACC, z nichž první byla klonem nádoru, vedoucího v 96 %, a druhá v 18 % k plicním metastázám. Buňky první linie vykazovaly významně vyšší VEGF expresi, odrážející se ve významně větší schopnosti stimulovat proliferaci a migraci endotelií krevních cév, pěstovaných v gelové matrix, resp. ve tkáňových kulturách. Autor tak uzavírá, že tendence buněk ACC k šíření krevní cestou je dána jejich angiogenetickým potenciálem. Souvislost mezi expresí VEGF a šířením ACC krevní cestou potvrzuje dále Tang (Tang 2011), který zjistil v souboru 35 ACC signifikantně vyšší VEGF imunoreakci u hematogenních metastáz nežli u korespondujících primárních lézí. Li (Li 2010) zkoumal u 63 pacientů imunohistochemickou expresi VEGF a její vztah k některým parametrům tohoto tumoru. Pozitivní, cytoplazmatická a membránová reakce byla nalezena u 80 % případů, přičemž její

intenzita byla výrazně silnější než u buněk normální žlázy. Signifikantně vyšší imunoreakci vykazoval solidní histopatologický subtyp nádoru, jeho pokročilejší klinická stádia, recidivy a léze s perineurální invazí. Multivariační analýza potvrdila, že u ACC exprese VEGF je bez ohledu na grading, způsob terapie, klinické stádium a perineurální invazi nezávislým prognostickým činitelem.

3.2.2.2 Význam VEGF pro lymfogenní metastazování ACC

ACC jeví jen malý sklon k lymfatickým metastázám, jejich celková incidence nepřekračuje 10 %, a u okultní formy se blíží nule (Armstrong 1992, Chen 2007, Teymoortash 2002). U lézí s high grade transformací (Seethala 2007) však uzlinové postižení stoupá k 60 %. Woolger na základě vlastních zkušeností uvádí, že v důsledku minimální tvorby desmoplastického stromatu ACC zůstává objem jím postižených lymfatických uzlin velmi malý, a tyto zůstávají po dlouhou dobu nedetekovány (Woolger 2011). Je tudíž otázkou, zda jeho skutečný lymfogenní metastatický potenciál není vyšší, než by se zdálo z literárních zdrojů.

Expresie lymfangiogenních faktorů, tvorba lymfatických cév a jejich význam pro uzlinové metastazování u salivárních tumorů nebyla dosud rozsáhleji studována. Teymoortash (Teymoortash 2007) porovnával hustotu intratumorózních mízních kapilár ve Warthinově tumoru a pleomorfním adenomu. Významně vyšší hodnoty u prvního z nich považoval za důkaz, že jeho onkocytární buňky podněcují lymfangiogenezu. Soares (Soares 2007) zkoumala denzitu lymfatických cév u běžných a kancerizovaných pleomorfních adenomů. Došla k závěru, že z těchto nádorů si vlastní lymfatické cévy vytváří pouze široce invazivní forma karcinomu z pleomorfního adenomu. Mello (Mello 2011) nezaznamenal signifikantní rozdíly v expresi VEGF-C a hustotě lymfatických cév mezi salivárními karcinomy s velkým a malým rizikem vzniku uzlinových metastáz. Proto se domnívá, že tyto tumory používají k šíření v lymfatických cestách jiné nežli VEGF-C asociované molekulární mechanismy. Naopak Lim (Lim 2003) v širokém histopatologickém spektru karcinomů slinných žláz prokázal pozitivní korelaci exprese VEGF s výskytem lymfogenních metastáz. V jeho souboru byly zastoupeny i tři ACC, které metastazovaly do krčních uzlin: ve všech těchto případech byla v primárních tumorech zjištěna velmi intenzivní VEGF imunoreakce. Dosud jedinou práci, zabývající se molekulárními aspekty lymfogenního metastazování ACC v samostatném souboru, publikoval Fujita (Fujita 2011). Dvacet devět vyšetřených nádorů exprimovalo slabě VEGFR-3, avšak vůbec ne VEGF-D a téměř ne VEGF-C. V žádném případě nebyly nalezeny intratumorózní lymfatické cévy a počet jen velmi chabě vytvořených cév na periférii nádorů nebyl vyšší než v parenchymu okolní žlázy. Z celého souboru metastazoval do regionálních uzlin jen jeden tumor, přičemž hustota jeho lymfatických cév byla stejná jako u ostatních, uzlinových metastáz prostých tumorů. Autor proto VEGF-C/D asociovanou tvorbu mízních cév u ACC zpochybňuje.

Dosavadní práce potvrzují, že hematogenní šíření adenoidně cystického karcinomu slinných žláz je podobně, jako u nádorů jiných orgánů, spojeno s novotvorbou krevních cév, stimulovanou expresí VEGF. Produkci VEGF-C a VEGF-D, jejich významu pro vznik lymfatických cév a uzlinových metastáz u ACC nebyla zatím věnována náležitá pozornost. Výsledky několika málo publikovaných prací si protičečí. K objasnění této problematiky bude nutný další výzkum.

4 Parametry oxid. stresu u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku

OS je definován jako výrazná nerovnováha mezi oxidativním a antioxidantním potenciálem buňky, způsobená nadprodukcí a/nebo nedostatečnou neutralizací VR, poškozujících buněčné struktury (Arikan 2005, Jaloszynki 2003). Teoretický úvod k roli OS a etiopatogeneze maligních nádorů je popsán v článku v roce 2007 (Salzman, Oxidativní stres 2007).

Role OS v tumorigeneze je dnes dobře doložená (Sanchez-Perez 2017, Valko 2006, Subapriya 2003, Seven 1999). Bylo popsáno několik úrovní tohoto vlivu. Prvořadá je schopnost VR oxidativně poškozovat DNA. Mutace v kritických místech genomu – protoonkogeny, supresorové a reparační geny – mají zjevný vliv na karcinogenezu. Oxidativní zátěž se ještě posílí u již vytvořené malignity, protože většina nádorových buněk postrádá fyziologickou schopnost vypořádat se s OS kvůli změnám v aktivitě antioxidantní obrany buňky (Bohn 2006). Nejen v oblasti hlavy a krku vznikají nádory při dlouhodobě oxidativní zátěži v prostředí chronického zánětu, například kolorektální karcinom při ulcerózní kolitidě a hepatocelulární karcinom při virové hepatitidě (Jaloszynki 2003).

U spinocelulárního karcinomu (SCC) hlavy a krku se předpokládá úzký vztah s OS, protože kouření a alkohol jako zdroje masivní oxidativní zátěže jsou všeobecně přijímány jako etiologické faktory této malignity (Bohn 2006). Zvýšený OS, intenzivnější lipidová peroxidace a nižší aktivity antioxidantních enzymů u SCC hlavy a krku (Kaynar 2005, Korotkina 2002, Sabitha 1999, Seven 1999, Taysi 2003) mohou být způsobeny dlouhodobou expozicí vysokým hladinám VR, jejichž zdrojem bývá i samotný tumor. Po chirurgické resekci nádoru popsali pokles markerů lipidové peroxidace Bhuvaramurthy a Szuster-Cieselska (2004). Hrizostov (2003) zjistil normalizaci hodnot malondialdehydu (MDA) dokonce za 10-20 dní po operačním odstranění tumoru. Tato látka je koncovým produktem lipidové peroxidace, užívaným jako marker oxidativní zátěže. Naopak Samir prokázal elevaci MDA 3 týdny po laryngektomii (1999). Szuster-Cieselska (2004) uvádí, že zvýšená hladina VR koreluje se stádiem u SCC hrtanu. Podobně Yigitbasi (2002) pozoroval souvislost mezi aktivitou AOE a stupněm

diferenciace. V tomto kontextu není překvapující, že Sabitha (1999) a Jalszynski (2003) našli zvýšený MDA i u recidivujícího SCC.

Pilotní studie zaměřená na roli plazmatické SOD u SCC hlavy a krku byla publikována v dalším článku (Salzman, Role superoxiddismutázy 2007). Práce potvrdila, že pacienti s tímto tumorem vykazují zvýšenou hladinu MDA u recidivujících nádorů. Hodnota MDA pod hranicí 0,25nmol/g signalizovala významně delší bezpříznakové období. Vysoká hladina MDA zvyšovala riziko rekurence 6-násobně (43% versus 8%). Podobně SOD by mohl sloužit jako diagnostický marker lokoregionálního šíření, protože vyšší hladiny tohoto enzymu mají pacienti s pozitivním uzlinovým nálezem. Nadhraniční hodnota SOD (>1,3kU/g) byla spojena s dvojnásobným rizikem postižení krčních uzlin. V práci jsme nepotvrdili rozdílnou distribuci jednotlivých variant genetického polymorfizmu Ala-9Val v pozici -9 pro SOD u pacientů s různými stádii SCC, odpovědí na léčbu, ani prognózou. Na základě těchto předběžných výsledků jsme pokračovali ve studii. Na větším souboru jsme potvrdili nejen zvýšenou aktivitu SOD u pokročilých SCC (T3/4) a u SCC s lokoregionálním šířením (N+), ale i prediktivní hodnotu MDA vypovídající o zvýšené oxidativní zátěži u pacientů, u nichž došlo významně dříve k recidivě. Na rozdíl od pilotní studie, až po zvětšení sledované kohorty a prodloužení doby sledování, jsme prokázali předpokládané rozdíly v hladinách SOD mezi nositeli jednotlivých variant sledovaného polymorfizmu. Pacienti s genotypem Ala/Ala měli horší prognózu (kratší bezpříznakový interval) (Salzman 2006).

V roce 2009 jsme se zaměřili na MDA u pacientů s orofaryngeálním karcinomem (Salzman 2009). I na této homogennější skupině jsme potvrdili vyšší oxidativní zátěž u pacientů s pokročilými SCC a elevaci OS s rostoucí dediferenciací nádorů. V souladu s výše uvedeným jsme zjistili, že hladina MDA byla před primární resekcí tumoru významně vyšší u pacientů, u nichž došlo ve sledovaném období k recidivě. Tento negativní vliv OS na prognózu jsme potvrdili Kaplan-Meierovou analýzou přežití jak u bezpříznakového intervalu (19,3 vs. 31,5 měsíce), tak u celkového přežití (22,5 vs 31,6 měsíce). Pacienti s $MDA < \text{medián}$ (medián=0,25nmol/g) měli později 3x vyšší riziko recidivy (48 % versus 16 %) a 2x vyšší riziko úmrtí (59 % versus 30 %) ve sledovaném období. Bimodální distribuce MDA v našem souboru, umožňující rozdělení pacientů na podskupiny s hodnotami nižšími a vyššími

jeho mediánu, vybízí k hypotéze, že existuje faktor, predeterminující schopnost onkologických pacientů vypořádat se se zvýšenou hladinou OS. Takovýto činitel se nám nepodařilo mezi vybranými genetickými polymorfizmy identifikovat.

Další klíčový enzym – GPx, jsme popsali v roce 2010 (Salzman 2010). Jeho nižší aktivita byla zjištěna u pacientů s pokročilými karcinomy. Plazmatická hladina GPx korelovala se stupněm diferenciaci nádorů pozitivně, zatímco MDA negativně. Tato studie tudíž potvrzuje, že předoperačně nízká hladina a aktivita antioxidantní obrany organismu je asociována s pokročilými a méně diferencovanými karcinomy, čemuž odpovídá vyšší míra OS (reprezentovaná hladinou MDA).

4.1 Souhrn výsledků

Všechny práce našeho týmu zaměřené na OS potvrzují jeho významnou roli v onkologii hlavy a krku. Pacienti s pokročilými a méně diferencovanými nádory jsou vystaveni vyššímu OS, spojenému s horší prognózou. Nejslibnější z parameterů OS se zdá být malondialdehyd, jehož stanovení je levné a rychlé. V uvedené onkologické skupině by se mohl stát dalším prognosticko-diagnostickým markerem.

5 Vaskulární endoteliální růstové faktory u salivárních nádorů

Neoangiogeneze je proces novotvorby krevních a lymfatických cév (Chang 2002). Vzhledem k vysokým nutričním nárokům nádorových buněk je neovaskularizace limitujícím faktorem pro jejich další růst a šíření (Lothaire 2006).

VEGF je rodinou velmi potentních cytokinů, regulujících nejen proliferaci, migraci a diferenciaci, ale i permeabilitu endotelových buněk (Lothaire 2006).

Doposud publikované práce se zaměřovaly na roli VEGF u spinocelulárních karcinomů hlavy a krku, u kterých byla ve srovnání se zdravou populací prokázána vyšší exprese VEGF (Teknos 2002). Dále byl zjištěn její přímý vztah k rozsahu lokoregionálních metastáz (Shang 2002) a k horší prognóze (Salven 1997, Smith 2000, Mineta 2000). Problematice VEGF u salivárních nádorů se věnuje jenom pár týmů na celém světě, a jejich role není doposud objasněná.

V jiné studii jsme nezjistili pozitivitu VEGF-C ani u primárních, ani u recidivujících pleomorfních adenomů (Salzman 2014). Naopak neoplastické, epitelální i myoepitelální buňky se barvily pozitivně na VEGF-D. Navíc jsme jako první popsali absenci nebo významně nižší počet lymfatických cév v centru nádoru než v jeho okolí nebo ve zdravém parenchymu slinných žláz. Uvedená hustota lymfatických cév byla stejná u primárních a recidivujících PA (tab. 9), což v souladu s předchozími pracemi (Soares 2009, Teymoortash 2007, Fujita 2011, Mello 2011) nepotvrzuje Stennertovu hypotézu, že vícečetné recidivy u pleomorfních adenomů jsou způsobeny migrací nádorových buněk přes existující a novotvořené lymfatické cévy (Stennert 2001).

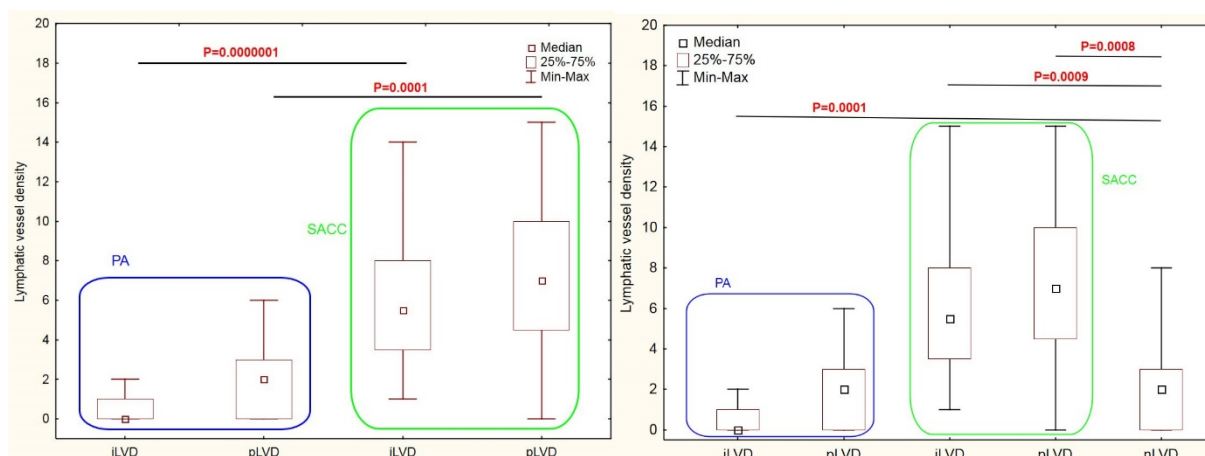
V dalších pracích jsme se zaměřili na roli VEGF-C/D u adenoidně cystického karcinomu slinných žláz. Přehled nepřilíš rozsáhlých, doposud známých faktů na toto téma jsme publikovali v přehledovém článku v roce 2014 (Hoza 2014).

Tabulka 9 Hustota lymfatických cév v primárním (bez recidivy po dobu sledování) a recidivujícím pleomorfním adenomu a jeho okolí

	primární	sekundární
intratumorálně	0,4±0,58	0,5±0,71
peritumorálně	2,4±2,30	1,4±1,58
zdravý parenchym	2,5±1,73	2,4±1,58

V navazující originální studii jsme zjistili, že imunoexprese VEGF-C a VEGF-D i počet lymfatik v samotném nádoru i kolem něj je výrazně vyšší než v okolním zdravém parenchymu (Stárek 2015). Intratumorální lymfatické cévy byly dokonce zjištěny ve všech vzorcích. Navíc jsme našli souvislost mezi vyšší hustotou intratumorálních lymfatik (více než 11 cév) a špatnou prognózou, což nabízí hypotézu, že se nádorové buňky šíří cestou lymfatických cév. Překvapivě jsme ale nepotvrdili asociaci mezi počtem lymfatických cév a výskytem krčních metastáz.

Pleomorfní adenomy jsou benigní nemetastazující léze. ACC je naopak všeobecně považován za tumor s velmi malým potenciálem k uzlinovým metastázám. Tento názor však byl zpochybněn Woolgerem (Woolger 2011).



Obr. 4. Srovnání hustoty lymfatických cév (LVD) v tumoru (iLVD), kolem něj (pLVD) a ve zdravém salivárním parenchymu (nLVD) mezi pleomorfním adenomem (PA) a salivárním adenoidně cystickým karcinomem (SACC)

Při srovnání obou uvedených tumorů (Stárek 2016) jsme zjistili, že intratumorální i peritumorální hustota lymfatických cév je významně vyšší u ACC než u PA a ve zdravém parenchymu žlázy (obr. 4), což odpovídá Woolgerovým závěrům. Z uvedených výsledků lze vyvodit, že na rozdíl od pleomorfního adenomu nepostrádá ACC, podobně jako další salivární karcinomy, schopnost stimulovat lymfangiogenezu. Takzvaný metastazující „benigní“ PA, který se může šířit krevní i lymfatickou cestou, zůstává po biologické stránce nedostatečně poznáný. V současnosti je řazen mezi karcinomy, a tedy se nejspíše jedná o zcela jinou biologickou jednotku. Pro jeho raritní výskyt jeho lymfangiogeneze nebyla doposud studována.

Rozdíly v metastatickém potenciálu benigních a maligních salivárních nádorů by se měly odrážet i v hustotě jejich lymfatických cév. Tomu odpovídají i výsledky naší další studie (Hoza 2018), která prokázala praktickou absenci intratumorálních lymfatických cév u onkocytomů. U Warthinových tumorů, složených taktéž z onkocytárních buněk duktálního charakteru, jsme naopak našli vysokou denzitu lymfatických cév, lokalizovaných výlučně v jeho stromatu. Rozdíl v hustotě lymfatických cév mezi oběma histopatologickými jednotkami je dán námi prokázanou produkcí VEGF-C/D imunokompetentními buňkami Warthinova tumoru.

5.1 Souhrn výsledků

Lymfatická síť uvnitř pleomorfního adenomu je chudá. Naopak hustota lymfatik v okolí nádoru a ve zdravé salivární tkáni se neliší. Z toho lze dovodit, že si pleomorfní adenom nevytváří nové lymfatické cévy ve svém okolí. Naše práce dále poukazuje na schopnost neoplastických buněk salivárního adenoidně cystického karcinomu exprimovat lymfangienní cytokiny a indukovat tak peri- i intratumorózní lymfangiogenezu. Oproti očekávání jsme neprokázali přímou souvislost exprese VEGF-C/D, ani hustoty lymfatické sítě s rozsahem metastatického postižení uzlin. Horší prognóza u pacientů s hustší sítí lymfatik však podporuje hypotézu, že tyto cévy se podílejí na nádorové diseminaci.

6 Závěr

Onkologické markery se staly standardem v diagnostice některých karcinomů, například prostaty, prsu a jiných. Tumory hlavy a krku prozatím zůstávají v tomto směru Popelkou. V nejbližších letech lze předpokládat, že výsledky bádání v této problematice přinesou další poznatky, které umožní jejich klinickou aplikaci i v této skupině nádorů.

V daném kontextu se jako velmi slibné zdají parametry oxidativního stresu. Tuto perspektivu podporují důkazy, že oxidativní stres sehrává významnou roli jak ve všech fázích vzniku a šíření nádorů, tak i v protinádorové obraně buňky. Pacienti s pokročilými a méně diferencovanými dlaždicobuněčnými karcinomy, jejichž prognóza je velmi závažná, jsou vystaveni vyšší oxidativní zátěži. Parametry oxidativního stresu se nabízejí nejen jako indikátory přítomnosti primárních i recidivujících karcinomů hlavy a krku, ale i jako diagnostické markery agresivnějších nádorů. Mohly by rovněž sloužit ke stanovení prognózy. Nejslibnější z parametrů oxidativního stresu se zdá být malondialdehyd, jehož laboratorní stanovení je dobře dostupné, rychlé a levné.

Naše současné chápání lymfangiogenezy u nádorů slinných žláz je dosud omezené. Zatím sbíráme střípky do mozaiky, která nám snad časem nabídne komplexnější a detailnější pohled na tvorbu a význam jimi indukovaných lymfatických cév. Na základě současných poznatků můžeme uzavřít, že pleomorfní adenom, vykazující pro benigní tumor nezvyklou schopnost zakládat mnohočetné recidivy někdy i daleko v chirurgem nedotčených tkáních, nepoužívá k šíření svých nádorových buněk novotvořené lymfatické kapiláry.

Naopak adenoidně cystický karcinom, jemuž je ve srovnání s jinými vysoce agresivními salivárními tumory připisován minimální výskyt uzlinových metastáz, tvoří působky neolymfangiogenezy, čímž indukuje vznik intra- i perinádorových lymfatik. Lymfangiogenní potenciál této histopatologické jednotky zasluhuje další pozornosti, neboť jeho ověření by znamenalo změnu v dosud negativních názorech na indikace ke krčním disekcím. Adenoidně cystický karcinom je řazen do skupiny tumorů s vysokým biologickým rizikem. Současné léčebné standardy proto vedle chirurgického odstranění doporučují i jeho následnou radioterapii. Pomineme-li prognosticky nejzávažnější solidní formy

tohoto nádoru, je průběh tubulární/kribriformní varianty typicky zdlouhavý, avšak individuálně nepředvídatelný. Nelze tudíž vyloučit, že zejména starší nemocní se letálního zakončení této své choroby nemusejí vůbec dožít, a radioterapie pro ně tedy znamená zbytečnou, kvalitu života významně snižující, zátěž. V tomto kontextu se jako potenciálně významné jeví zjištění, že nádory o nižší lymfatické intratumorózní denzitě mají lepší prognózu, a jejich nositelé by se tak mohli léčbě zářením vyhnout.

7 Literatura

- 1 Agosti JM, Altman LC, Ayars GH, et al. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxidase and halides on pneumocytes in vitro. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1987, 79, 496-504.
- 2 Alcedo JC, Fabrega JM, Arosemena JR et al. Imatinib mesylate as treatment for adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: report of two successfully treated cases. *Head Neck* 2004, 26, 829-831.
- 3 Andreadis D, Epivatianos A, Pouloupoulos A et al. Detection of C-KIT (CD117) molecule in benign and malignant salivary gland tumours. *Oral Oncology* 2006, 42, 57-65.
- 4 Andreasen S, Therkildsen MH, Bjørndal K et al. Pleomorphic adenoma of the parotid gland 1985–2010: a Danish nationwide study of incidence, recurrence rate, and malignant transformation. *Head & Neck* 2015, 38, S1.
- 5 Argiris A, Feinstein TM, Wang L. Phase I and pharmacokinetic study of dasatinib and cetuximab in patients with advanced solid malignancies. *Investigational new drugs* 2012, 30 (4), 1575-1584.
- 6 Argiris A, Karamouzis MV, Raben D et al. Head and neck cancer. *The Lancet* 2008, 371(9625), 1695-1709.
- 7 Arikan S, Akcay T, Konukoglu D et al. The relationship between antioxidant enzymes and bladder cancer. *Neoplasma* 2005, 52 (4), 314-317.
- 8 Armstrong JG, Harrison LB, Thaler HT et al. The indications for elective treatment of the neck in cancer of the major salivary glands. *Cancer* 1992, 69, 615-619.
- 9 Audet N, Beasley NJ, MacMillan C et al. Lymphatic vessel density, nodal metastasis, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 2005, 131, 1065-1070.
- 10 Ayars GH, Altman LC, McManus MM et al. The injurious effect of eosinophil peroxidase-halide system and major basic protein in human nasal epithelium in vitro. *American Review of Respiratory Disease* 1989, 140, 125-131.
- 11 Bankamp DG, Bierhoff E. Proliferative activity in recurrent and non-recurrent pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Laryngorhinotologie* 1999, 78, 77-80.
- 12 Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Biology & Medicine* 1990, 9, 235-243.
- 13 Beasley NJ, Prevo R, Banerji S et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Research* 2002, 62, 1315-1320.
- 14 Bell D, Roberts D, Karpowicz M et al. Clinical significance of Myb protein and downstream target genes in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 2011, 12 (7), 569-573.
- 15 Bell D, Roberts D, Kies M et al. Cell type dependent biomarker expression in adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2010, 116, 5749- 5056.
- 16 Bell RB, Dierks E, Homer L et al. Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2005, 63 (7), 917-928.
- 17 Bhavarahamurthy V, Balasubramanian N, Govindasamy S. Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1996, 158 (1), 17-23.

- 18 Bohn SK, Smeland S, Sakhi AK. Post-radiotherapy plasma total glutathione is associated to outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 2006, 18 (2), 240-247.
- 19 Brieger J, Duesterhoeft A, Brochhausen C et al. Recurrence of pleomorphic adenoma of the parotid gland – predictive value of cadherin - 11 and fascin. *APMIS* 2008, 116, 1050-1057.
- 20 Brill L, Kanner W. Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusion in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. *Modern Pathology* 2011, 24, 1169-1176.
- 21 Brož M, Stárek I, Salzman R. Význam exprese C-kit a MYB gen pro diagnostiku, prognózu a léčbu adenoidně cystických karcinomů slinných žláz – současná úroveň výzkumu a jeho aplikace v praxi, *Otorinolaryngologie a Foniatrie* 2016, 65 (1), 53-57.
- 22 Burian M, Quint C, Neuchrist C. Angiogenic factors in laryngeal carcinomas: do they have prognostic relevance? *Acta Otolaryngologica* 1999, 119, 289-292.
- 23 Bussu F, Rigante M, Giglia V et al. Clinical history, prognostic factors, and management of facial nerve in malignant tumors of the parotid gland. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 2014, 7 (2), 126-132.
- 24 Cao Y. Opinion Emerging mechanism of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5, 735-743.
- 25 Coleman H. Intravascular tumour in intra-oral pleomorphic adenomas: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Histopathology* 1999, 35, 439-444.
- 26 Comhair S, Thomassen MJ, Erzurum SC. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxidesynthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% oxygen or cigarette smoke. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2000, 23, 350-354.
- 27 Cross RS, Malaterre J, Davenport AJ et al. Therapeutic DNA vaccination against colorectal cancer by targeting the MYB oncoprotein. *Clinical & Translational Immunology* 2015, 4 (1), e30.
- 28 Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 2002, 265, 49-72.
- 29 Dal Maso L, Torelli N, Biancotto E et al. Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case–control studies using bi-dimensional spline models. *European Journal of Epidemiology* 2015, 1-9.
- 30 Dasatinib in Treating Patients With Recurrent or Metastatic Malignant Salivary Gland Tumors. www.clinicaltrials.gov, cit. 25.3.2017
- 31 De Ru JA, Plantinga RF, Majoor MH et al. Warthin's tumour and smoking. *B-ENT* 2014, 1 (2), 63-66.
- 32 Di Nardo LJ, Kaylie DM, Isaacson J. Current treatment practices for early laryngeal carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1999, 120 (1), 30-37.
- 33 Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer* 1996, 32 (1), 30-38.
- 34 D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine* 2007, 356, 1944–56.
- 35 El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR et al. WHO classification of head and neck tumours. Ed. – 4th edition. IARC: Lyon 2017, ISBN 97892-832-2438-9.
- 36 El-Naggar AK, Huvos A. G. Adenoid cystic carcinoma. WHO classification of tumours: pathology & genetics. In: Barnes EL, Eveson JW, Reichart P. *Head and neck tumours*. Lyon, IARC Press, 2005, 222 s.

- 37 Faivre S, Raymond E, Casiraghi et al. Imatinib mesylate can induce objective response in progressing, highly expressing KIT adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23, 6271-6273.
- 38 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology Review*, 1997, 18, 4-25.
- 39 Fontanini G, Boldrini L, Vignati S et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *European Journal of Cancer* 1998, 34, 718-723.
- 40 Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001, 389 (1), 84-93.
- 41 Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U et al. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free radical biology&medicine* 2001, 30 (5), 500-5.
- 42 Frankenthaler RA, Luna Ma, Lee SS et al. Prognostic variables in parotid gland cancer. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1997, 117 (11), 1251-1256.
- 43 Frankenthaler RA, Byers RM, Luna MA et al. Predicting occult lymph node metastasis in parotid cancer. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 1993, 119(5), 517-520.
- 44 Fu Y, Cheng WH, Porres JM et al. Knock-out of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radical Biology&Medicine* 1999, 27 (5-6), 605-611.
- 45 Fujioka S, Sclabas GM, Schmidt C et al. Function of NF- κ B in pancreatic cancer metastasis. *Clinical Cancer Research* 2003, 9, 346-354.
- 46 Fujita G, Sato S, Kishino M et al. Lymphatic vessels and related factors in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Modern Pathology* 2011, 24 (7), 885-891.
- 47 Gallo O, Franchi A, Bottai GV et al. Risk factors for distant metastases from carcinoma of the parotid gland. *Cancer* 1997, 80 (5), 844-851.
- 48 Genkinger JM, Platz EA, Hoffman SC. C47T polymorphism in manganese superoxide dismutase, antioxidant intake and survival. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006, 127 (4), 371-377.
- 49 Gerwins P, Sköldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factor and vascular endothelial factors and their receptors in angiogenesis. *Hepatology* 2000, 34, 185-194.
- 50 Ghosal N, Mais K, Shenjere P et al. Phase II study of cisplatin and imatinib in advanced salivary adenoid cystic carcinoma. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2011, 49 (7), 510-515.
- 51 Glas AS, Hollema H, Nap RE et al. Expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and insulin-like growth factor receptor-1 and of MIB-1 in patients with recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer* 2002, 94, 2211-2216.
- 52 Gondivkar SM, Gadbail AR, Chole R et al. Adenoid cystic carcinoma: a rare clinical entity and literature review. *Oral Oncology* 2011, 47 (4), 231-236.
- 53 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 7, 100 (1), 57-70.
- 54 Heinrich M, Joensuu H, Demetri G et al. Phase II, Open-label study evaluating the activity of imatinib in treating Life-threatening malignancies known to be associated with Imatinib-sensitive tyrosine kinases. *Clinical Cancer* 2008, 14, 2717-2725.

- 55 Hotte S J, Winkquist E W, Lamont E et al. Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23, 585-590.
- 56 Hoza J, Salzman R, Stárek I et al. Comparison of lymphatic vessel density and expression of VEGF-C and VEGF-D lymphangiogenic factors in Warthin's tumours and oncocytic adenomas. *Biomedical Papers* 2017 odesláno
- 57 Hoza J, Stárek I, Brož M et al. Význam vaskulárního endotelového růstového faktoru pro metastazování adenoidně cystického karcinomu slinných žláz. *Otorinolaryngologie a Foniatrie* 2014, 63 (3), 188-192.
- 58 Hrizostov D, Gadjeva V, Vlaykova T et al. Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2001, 109 (4), 331-336.
- 59 Hu WG, Li JW, Feng B et al. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *European Surgical Research* 2007, 39, 229-238.
- 60 Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ et al. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Research* 2003, 58, 3986-3992.
- 61 Chang JT, Chen IH, Liao CT et al. A reverse transcription comparative real-time PCR method for quantitative detection of angiogenic growth factors in head and neck cancer patients. *Clinical Biochemistry* 2002, 35, 591-596.
- 62 Chau NG, Hotte SJ, Chen EX et al. A phase II study of sunitinib in recurrent and/or metastatic adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary glands: current progress and challenges in evaluating molecularly targeted agents in ACC. *Annals of Oncology* 2005, 23, 1562-1570.
- 63 Chen AM, Garcia J, Lee NY et al. Pattern of nodal relapse after surgery and postoperative radiation therapy for carcinomas of the major and minor salivary gland: what is the role of elective neck irradiation? *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2007, 67, 988-994.
- 64 Chistyakov DA, Savostanov KV, Zotova EV et al. Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type I diabetes mellitus. *BMC Medical Genetics* 2000, 2, 4-10.
- 65 Choi WW, Lewis MM, Lawson D et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Modern Pathology* 2005, 18, 143-152.
- 66 Inoue K, Ozeki Y, Sugunuma T et al. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer* 1997, 79, 206-213.
- 67 Iro H, Zenk J, Koch M et al. Follow-up of parotid pleomorphic adenomas treated by extracapsular dissection. *Head & Neck* 2013, 35 (6), 788-793.
- 68 Jaloszynski P, Jaruga O, Olinski R et al. Oxidative DNA base modifications and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in squamous cell carcinoma of larynx. *Free Radicals Research* 2003, 37, 3, s. 231-240.
- 69 Kaynar H, Meral M, Turhan H et al. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* 2005, 227 (2), 133-139.
- 70 Kieser A, Weich H, Brandner et al. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994, 9, 963-969.

- 71 Kitadai Y, Amioka T, Haruma K et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer* 2001, 93, 662-666.
- 72 Klener P. Nové možnosti využití bevacizumabu v protinádorové léčbě. *Remedia*, 18, 2008, s. 70–75.
- 73 Korotkina RN, Matskevitch GN, Devlikano AS et al. Activity of glutathione metabolizing and antioxidant enzymes in malignant and benign tumors of human lungs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002, 133 (6), 606-608.
- 74 Koyuncu M, Şeşen T, Akan H et al. Comparison of computed tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of parotid tumors. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 2003, 129 (6), 726-732.
- 75 Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A et al. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology* 2005, 206, 170-177.
- 76 Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical cancer research* 2005, 11 (4), 1434-1440.
- 77 Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Annals of Oncology* 2005, 16 (Supplement 6), vi7-vi12.
- 78 Li J, Nong X, Chen Q et al. Nerve growth factor and vascular endothelial growth factor: retrospective analysis of 63 patients with salivary adenoid cystic carcinoma. *International Journal of Oral Science* 2010, 2, 35-44.
- 79 Li W, Thompson CH, O'Brien CJ et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *International Journal of Cancer* 2003, 106 (4), 553-558.
- 80 Lim JJ, Kang S, Lee MR et al. Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, K-67 and prognosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2003, 32, 552-561.
- 81 Lima RA. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 2005, 133, 702-708.
- 82 Lin M, Lin HH, Ma SP et al. Vascular endothelial growth factor-A and -C: expression and correlations with lymphatic metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Medical Oncology* 2011, 28 (1), 151-158.
- 83 Lin H, Yen F et al. Unexpected rapid progression of metastatic adenoid cystic carcinoma during treatment with imatinib mesylate. *Head & Neck* 2005, 12, 1022.
- 84 Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K et al. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 1998, 16, 3121-3128.
- 85 Lothaire PA, Dequanter E, Lalami DY et al. A. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head & Neck* 2006, 28 (3), 256-269.
- 86 Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *Journal of Clinical Pathology* 1998, 51, 771-775.

- 87 Matilla MMT, Ruohola JK, Karpanen T et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *International Journal of Cancer* 2002, 98, 946-951.
- 88 McGurk M, Thomas BL, Renehan AG. Extracapsular dissection for clinically benign parotid lumps: reduced morbidity without oncological compromise. *British Journal of Cancer* 2003, 89 (9), 1610-1613.
- 89 Mechl Z, Brančíková D. Aktuální problémy léčby nádorů oblasti hlavy a krku. *Head and Neck Cancer News* 2016, 1 (1), 4-9.
- 90 Mello MF, Costa AF, Freitas LL et al. Lymphatic vessel density and expressions of lymphangiogenic growth factors in salivary carcinomas. *Neoplasma* 2011, 58, 331-336.
- 91 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2006, 130 (10), 1466-1478.
- 92 Mineta H, Miura K, Ogino T et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *British Journal of Cancer* 2000, 83, 775-781.
- 93 Mino M, Pilch BZ, Faquin WC. Expression of KIT (CD117) in neoplasms of the head and neck: an ancillary marker for adenoid cystic carcinoma. *Modern Pathology* 2003, 16, 1224-1231.
- 94 Mitani Y, Li J, Rao H et al. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: incidence, variability and clinicopathological significance. *Clinical Cancer Research* 2010, 16, 4722-4731.
- 95 Moehler M, Frings C, Mueller A et al. VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. *World Journal of Gastroenterology* 2008, 14 (26), 4156-4167.
- 96 Myers E. *Operative Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, Saunders 2008, 1410 s.
- 97 Myers EN, Ferris RL. *Salivary Gland Disorders*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, 518 s.
- 98 Myung SK, Ju W, McDonnell DD et al. Mobile phone use and risk of tumors: a meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27 (33), 5565-5572.
- 99 Nadif R. Effect of TNF and LTA polymorphisms on biological markers of response to oxidative stimuli in coal miners. *Journal of Medical Genetics* 2003, 40, 96-103.
- 100 Narayan K, Crane CH, Kleid S et al. Planned neck dissection as an adjunct to the management of patients with advanced neck disease treated with definitive radiotherapy: for some or for all? *Head & Neck* 1999, 21 (7), 606-13.
- 101 Nathanson SD. Insights into the mechanism of lymph node metastasis. *Cancer* 2003, 98, 413-423.
- 102 National Comprehensive Cancer Network. *Head and Neck Cancer* (Version 2.201). www.nccn.org. Cit. 15. května 2017.
- 103 Nobis CP, Rohleder NH, Wolff KD et al. Head and neck salivary gland carcinomas—elective neck dissection, yes or no? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2014, 72 (1), 205-210.
- 104 O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001, 92, 556-568.
- 105 Obtulovicova K, Starek I, Salzman R et al. Recurrent salivary pleomorphic adenoma shows increased immunohistologic expression of bcl-2 oncoprotein. *Biomedical Papers* 2015, 159 (3), 460-465.

- 106 Obtulovičová K, Stárek I, Skálová A et al. Expresia Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) génu v primárnom pleomorfnom adenóme vo vzťahu k jeho histogeneze. *Otorinolaryngologie a Foniatrie /Prague/* 2014, 63 (3), 176-181.
- 107 Otto-Knapp R, Jurgovski K, Schierhorn K et al. Antioxidative enzymes in human nasal mucosa after exposure to ozone. Possible role of GSTM1 deficiency. *Inflammation Research* 2003, 52, 51-55.
- 108 Parkin DM, Global cancer statistics. *CA a Cancer Journal for Clinicians* 1999, 49, 33-64.
- 109 Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2005, 55, 74-108.
- 110 Pattabiraman DR, Gonda TJ. Role and potential for therapeutic targeting of MYB in leukemia. [Review] *Leukemia* 2013, 27 (2), 269-277.
- 111 Pepper MS, Tille JC, Nisato R et al. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Research* 2003, 314, 167-177.
- 112 Persson M, Andrén Y, Mark J et al. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, 106 (44), 18740-18744.
- 113 Pfeffer MR, Talmi Y, Catane R et al. A phase II study of imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands. *Oral Oncology* 2007, 43, 33-36.
- 114 Poorten VV, Hunt J, Bradley PJ et al. Recent trends in the management of minor salivary gland carcinoma. *Head & Neck* 2014, 36 (3), 444-455.
- 115 Pusztaszeri MP, Sadow PM, Ushiku A et al. MYB immunostaining is a useful ancillary test for distinguishing adenoid cystic carcinoma from pleomorphic adenoma in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer Cytopathology* 2014, 122 (4), 257-265.
- 116 Que Hee CG, Perry CF. Fine needle aspiration cytology of parotid tumours: Is it useful? *ANZ Journal of Surgery* 2001, 71 (6), 345-8.
- 117 Racek J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Praha: Galen, 2003, 90 s.
- 118 Ragin CC, Taiol E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* 2007, 121 (8), 1813-1820.
- 119 Ramsay RG, Barton AL, Gonda TJ. Targeting c-Myb expression in human disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2003, 7 (2), 235-248.
- 120 Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR et al. Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk. *Cancer research* 2000, 60, 6381-6383.
- 121 Renehan AG, Gleave EN, Slevin N et al. Clinico-pathological and treatment-related factors influencing survival in parotid cancer. *British Journal of Cancer* 1999, 80 (8), 1296.
- 122 Renehan A, Gleave EN, Hancock BD et al. Long-term follow-up of over 1000 patients with salivary gland tumours treated in a single centre. *British Journal of Surgery* 1996, 83 (12), 1750-1754.
- 123 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997, 386, 671-674.
- 124 Saaristo A, Tammela T, Timonen. et al. Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow accross incision wounds. *FASEB Journal* 2004, 18, 1707-1709.
- 125 Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncology* 1999, 35, 273-277.
- 126 Salven P, Heikkila P, Anttonen A et al. Vascular endothelial growth factor in squamous cell head and neck carcinoma: expression and prognostic significance. *Modern Pathology* 1997, 10, 1128-1133.

- 127 Salzman R, Stárek I, Kučerová L et al. Neither expression of VEGF-C/D nor lymph vessel density support lymphatic invasion as mechanism responsible for local spread of recurrent salivary pleomorphic adenoma. *Virchow's Archiv* 2014, 464 (1), 29-34.
- 128 Salzman R, Pácal L, Kaňková K et al. High perioperative level of oxidative stress as a prognostic tool for identifying patients with a high risk of recurrence of head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of clinical oncology* 2010, 15 (6), 565-570.
- 129 Salzman R, Pácal L, Tomandl J et al. Elevated malondialdehyde correlates with the extent of primary tumor and predicts poor prognosis of oropharyngeal cancer. *Anticancer research* 2009, 29 (10), 4227-4231.
- 130 Salzman R, Horáková Z, Kostřica R et al. Oxidativní stres a karcinogeneze – teoretický úvod, *Otorinolaryng. a Foniát. /Prague/* 2007, 56 (1), 39-44.
- 131 Salzman R, Kostřica R, Pácal L et al. Role superoxididismutázy u spinocelulárních karcinomů hlavy a krku - pilotní výsledky, *Otorinolaryng. a Foniát. /Prague/*, 56, 2007, 1: 24-30.
- 132 Salzman R, Kaňková K, Pácal L et al. Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasma* 2006, 54 (4), 321-325.
- 133 Samir M, el Kholy NM. Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer. *Clinical Otolaryngology and Allied Science* 1999, 24 (3), 232-234.
- 134 Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C et al. Oxidative stress in cancerogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* 2005, 217 (1), 25-32.
- 135 Sanderson RJ, Ironside JAD. Squamous cell carcinomas of the head and neck. *British Medical Journal* 2002, 325 (7368), 822.
- 136 Sandström J, Karlsson K, Edlund T et al. Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human lens. *J Clin Oncol* 2007, 25 (suppl 18), 6003.
- 137 Seethala RR. An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head and Neck Pathology* 2009, 3 (1), 69-77.
- 138 Seethala RR, Hunt JL, Baloch Z. et al. Adenoid cystic carcinoma with high grade transformation. A report of 11 cases and a review of the literature. *American Journal of Surgical Pathology* 2007, 31, 1686-1694.
- 139 Seven A, Civelek S, Inci E et al. Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma. *Clinical Biochemistry* 1999, 32 (5), 369-373.
- 140 Shah JP, Patel SG, Singh B. *Head and neck surgery and oncology*. 4. vydání, Elsevier Health Sciences, 2012, 856 s.
- 141 Shang ZJ, Li JR, Li ZB. Circulating levels of vascular endothelial growth factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 2002, 31, 495-498.
- 142 Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Review of Cellular Biology* 1994, 10, 405-455.
- 143 Skalova A, Altemani A, Di Palma S et al. Pleomorphic Adenoma of the Salivary Glands With Intravascular Tumor Deposits. A diagnostic pitfall. *American Journal of Surgical Pathology* 2012, 36, 1674-1682.
- 144 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Medicine* 2001, 2, 192-198.
- 145 Slamon DJ, Boone TC, Murdock DC et al. Studies of the human c-myc gene and its product in human acute leukemias. *Science*, 233, 1986, s. 347-351.

- 146 Smilek P, Kostřica R, Rottenberg J et al. Kvalita života nemocných s rakovinou hlavy a krku po rozsáhlých chirurgických výkonech - podklad pro rozhodnutí o léčebném postupu? *Otorinolaryngologie a Foniatrie /Prague/* 2004, 53 (4), 184-189.
- 147 Smith BD, Smith GL, Carter D et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2000, 18, 2046–2052.
- 148 Soares AB, Demasi AP, Tincani AJ et al. The increased PDGF-A, PDGF-B and FGF- 2 expression in recurrence of salivary gland pleomorphic adenoma. *Journal of Clinical Pathology* 2012, 65, 272-277.
- 149 Soares L, Souza A, Santos F et al. The increased p16 expression in recurrence of salivary gland pleomorphic adenoma. *Virchow Archives* 2011, 459, Suppl. 1, 118.
- 150 Soares AB, Demasi AP, Altemani A et al. Increased mucin 1 expression in recurrence and malignant transformation of salivary gland pleomorphic adenoma. *Histopathology* 2011, 58, 377-382.
- 151 Soares AB, De Araujo VC, Juliano PB et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2009, 38 (8), 623-629.
- 152 Soares AB, Juliano P B, Araújo V C et al. Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during tumor progression of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J. Clin. Pathol.*, 60, 2007, s. 995-1000.
- 153 Sørensen K, Godballe Ch, Stricker K et al. Parotid carcinoma: expression of kit protein and epidermal growth factor receptor. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2006, 35, 286-29.
- 154 Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral diseases* 2002, 8 (5), 229-240.
- 155 Spiro RH. Salivary neoplasms: Overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head & Neck Surgery* 1986, 8 (3), 177-184.
- 156 Stacker SA, Achen MG, Jussila L et al . Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2002, 2, 573-583.
- 157 Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Medicine* 2001, 7, 186-191.
- 158 Stárek I, Salzman R, Kučerová L et al. Differing lymphatic vessels density in salivary adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma. *Pathology and Oncology Research* 2017, 1-6.
- 159 Stárek I, Salzman R, Kučerová L et al. Expression of VEGF-C/–D and lymphangiogenesis in salivary adenoid cystic carcinoma, *Pathology Research Practice*, 2015, 211 (10),759-765.
- 160 Stárek I, Kučerová L, Skálová A. Imunohistochemická exprese C-kit onkoproteinu u karcinomů slinných žláz (pilotní studie). *Otorinolaryngologie a Foniatrie /Prague/* 2010, 3, 129-135.
- 161 Stárek I. *Nádory parafaryngu*, Tobiáš 2006, 147 s.
- 162 Stennert E, Wittekindt C, Klussmann JP et al. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: a prospective histopathological and immunohistochemical study. *The Laryngoscope* 2004, 114, 1538-1543.
- 163 Stennert E, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP et al. Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. *The Laryngoscope* 2001, 111 (12), 2195-2200.
- 164 Stenson KM, Brockstein BE, Ross ME. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer 2014, www.uptodate.com, cit. 6.1.2017
- 165 Stevens KL, Hobsley M. The treatment of pleomorphic adenomas by formal parotidectomy. *British Journal of Surgery* 1982, 69, 1–3.

- 166 Stoll Jr HL. Squamous cell carcinoma. *Gene Therapy of Cancer* 2012, 451, 51.
- 167 Subapriya R, Kumaraguruparan R, Nagini S et al. Oxidant-antioxidant status in oral precancer and oral cancer patients. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2003, 13, 77-81.
- 168 Sunardhi-Widyaputra S, Van Damme B. Immunohistochemical pattern of bcl-2 and PTHrP-positive cells in primary, in recurrent and in carcinoma in pleomorphic adenomas. *Pathology Research Practice* 1995, 191 (12), 1186-1191.
- 169 Szalagatys A, Korzon M. The role of oxidative stress in pathogenesis of asthma. *Medical Science Monitor* 2003, 9 (4), 89-93.
- 170 Szuster-Ciesielska A, Hryciuk-Umer E, Stepulak A et al. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncologica* 2004, 43 (3), 252-258.
- 171 Štípek S, Borovanský J, Čejková J et al. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada publishing, 2000, 320 s.
- 172 Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y et al. Vessels counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Archives of Surgery* 1997, 132, 541-546.
- 173 Taniguchi M, Nishida T, Sirota S et al. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research* 1999, 59, 4297-4300.
- 174 Tang QL, Chen WL, Tan XY et al. Expression and significance of Cyr61 in distant cells of human primary salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 2011, 112, 228-236.
- 175 Taysi S, Uslu C, Akcay F et al. Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer. *Surgery Today* 2003, 33 (9), 651-654.
- 176 Teknos TN, Cox C, Yoo S et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor and decreased survival in advanced laryngeal carcinoma. *Head and Neck* 2002, 24 (11), 1004-1011.
- 177 Teymoortash A, Schrader C, Shimoda H et al. Evidence of lymphangiogenesis in Warthin's tumor of the parotid gland. *Oral Oncology* 2007, 43, 614-618.
- 178 Teymoortash A, Werner JA. Value of neck dissection in patients with cancer of the parotid gland and a clinical N0 neck. *Onkologie* 2002, 25, 122-126.
- 179 Theriault C, Fitzpatrick PJ. Malignant parotid tumors. Prognostic factors and optimum treatment. *American Journal of Clinical Oncology* 1986, 9 (6), 510-516.
- 180 *TNM Klasifikace zhoubných novotvarů, 7. Vydání - originál* 2011, 246 s.
- 181 Tomblyn M, Kasarskis EJ, Xu Y et al. Distribution of MnSOD polymorphisms in sporadic ALS patients. *Journal of Molecular Neuroscience* 1998, 10, 65-66.
- 182 Uchida S, Shimada Y, Watanabe G et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *British Journal of Cancer* 1998, 77, 1704-1709.
- 183 Umeda M, Komatsubara H, Nishimatsu N et al. Establishment and characterization of a human adenoid cystic carcinoma line of the salivary gland which is serially transplantable and spontaneously metastases to the lung in nude mice. *Oral Oncology* 2002, 38, 30-34.
- 184 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006, 160 (1), 1-40.
- 185 Venook AP, Tseng Jr A, Meyers FJ et al. Cisplatin, doxorubicin, and 5-fluorouracil chemotherapy for salivary gland malignancies: a pilot study of the Northern California Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 1987, 5 (6), 951-955.

- 186 Vineis P, Alavanja M, Buffler P et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *Journal of the National Cancer Institute* 2004, 96, 99–106.
- 187 Walvekar RR, Pedro Filho AA, Seethala RR et al. Clinicopathologic features as stronger prognostic factors than histology or grade in risk stratification of primary parotid malignancies. *Head and Neck* 2011, 33 (2), 225-231.
- 188 Warnakulasuriya S. Areca nut use following migration and its consequences. *Addiction Biology* 2002, 7, 127–32.
- 189 Wenig MB. *Atlas of head and neck pathology*. 2. vydání, Saunders Elsevier Philadelphia, 2008, 1600 s.
- 190 West RB, Kong C, Clarke N et al. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *The American Journal of Surgical Pathology* 2011, 35 (1), 92-99.
- 191 Wilkins HR, Doucet K, Duke V et al. Estrogen prevents sustained COLO-205 human colon cancer cell growth by inducing apoptosis, decreasing c-myc protein and decreasing transcription of the antiapoptotic protein bcl-2. *Tumour Biology* 2010, 31, 16-22.
- 192 Williams D. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene* 2008, 27, S9-S18.
- 193 Witt RL, Iacocca M, Gerges F. Contemporary diagnosis and management of Warthin's tumor. *Delaware Medical Journal* 2015, 87 (1), 13-16.
- 194 Woolger JA, Triantafyllou A. Contemporary salivary clinical pathology. Facts and dilemmas. In: *Salivary gland disorders and diseases: Diagnosis and management*. Kapitola 4, s. 27-41. Eds. Bradley PJ, Guntinas-Lichius O. Thieme 2011, 504 s.
- 195 Xu WG, Ji XR, Zhou LX et al. Prognostic value of VEGF in primary oesophageal squamous cell carcinoma. *Chinese Journal of Cancer Research* 2004, 16, 85-89.
- 196 Xu W, Liu LZ, Loizidou M et al. The role of nitric oxide in cancer (review). *Cell Research* 2002, 12, 311-320.
- 197 Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular Diversity* 2006, 10, 515-52.
- 198 Yigitbasi OG, Guney E, Haghighi N et al. Oxidant and antioxidant status in larynx squamous cell carcinomas. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2000, 19 (4), 447-451.
- 199 Zbären P. Carcinoma of the parotid. *American Journal of Surgery* 2003, 186, 57-62.
- 200 Zbären P, Schär C, Hotz MA et al. Value of Fine-Needle Aspiration Cytology of Parotid Gland Masses. *The Laryngoscope* 2001, 111 (11), 1989-1992.
- 201 Zhang J, Peng B. In vitro angiogenesis and expression of nuclear factor κ B and VEGF in high and low metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *BMC Cancer* 2007, 7, 95-111.
- 202 Zhang J, Peng B, Xinming C. Expression of nuclear factor κ B, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland: correlation with angiogenesis and clinical outcome. *Clinical Cancer Research* 2005, 11 (20), 7334-7343.

8 Přílohy - soubor publikací autora k tématu habilitační práce

1. **R. Salzman**, K. Kaňková, L. Pácal, J. Tomandl, Z. Horáková, R. Kostřica. Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasma*; 2007, 54, p. 321-325, ISSN 0028-2685, [IF 1,247, citováno 25/18]
2. **R. Salzman**, R. Kostřica, L. Pácal, J. Tomandl, K. Kaňková, Z. Horáková. Role superoxiddismutázy u spinocelulárních karcinomů hlavy a krku – pilotní výsledky. *Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague)*, 2007, 56, 1, p. 24-30, ISSN 1210-7867
3. **R. Salzman**, J. Tomandl, L. Pácal, K. Kaňková, Z. Horáková, R. Kostřica. Oxidativní stres a karcinogeneze – teoretický úvod. *Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague)*, 2007, 56, 1, ISSN 1210-7867, p. 39-44, ISSN 1210-7867
4. **R. Salzman**, L. Pácal, J. Tomandl, K. Kaňková, E. Tóthová, B. Gál, R. Kostřica, P. Salzman. Elevated malondialdehyde correlates with the extent of primary tumor and predicts poor prognosis of oropharyngeal cancer. *Anticancer Research*; 2009, 29, p. 4227-4231, ISSN 0250-7005 [IF 1,414, citováno 18/12]
5. **R. Salzman**, L. Pácal, K. Kaňková, J. Tomandl, Z. Horáková, E. Tóthová, R. Kostřica. High perioperative level of oxidative stress as a prognostic tool for identification of patients with high risk of recurrence of head & neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*; 2010, vol. 15 (6), p. 565-570, ISSN 1341-9625 [IF 1,508, citováno 12/5]
6. **R. Salzman**, I. Stárek, L. Kučerová, A. Skálová, J. Hoza. Neither expression of VEGF-C/D nor lymph vessel density support lymphatic invasion as mechanism responsible for local spread of recurrent salivary pleomorphic adenoma. *Virchow's Archiv*, 2014, 464(1), p. 29-34, ISSN 1432-2307 [IF 2,676, citováno 6/5]
7. J. Hoza, I. Stárek, M. Brož, **R. Salzman**. Význam vaskulárního endotelového faktoru (VEGF) pro metastázování adenoidně cystického karcinomu slinných žláz. *Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague)*, 63, 2014, 3, p. 188-192, ISSN 1210-7867
8. I. Stárek^{1/2}, **R. Salzman**^{1/2}, L. Kučerová, A. Skálová, L. Hauer. Expression of VEGF-C/-D and lymphangiogenesis in salivary adenoid cystic carcinoma, *Pathology Research Practice*, 2015, 211 (10):759-765, [IF 1,397, citováno 2/1]
9. I. Stárek, **R. Salzman**, L. Kučerová, A. Skálová. Differing lymphatic vessels density in salivary adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma. *Pathology and Oncology Research*, 2017, 23 (3): 545-550 [IF 1,940]
10. J. Hoza, **R. Salzman**, T. Bakaj, L. Kučerová, I. Stárek. Comparison of lymphatic vessel density and expression of VEGF-C and VEGF-D lymphangiogenic factors in Warthin's tumours and oncocytic adenomas. *Biomedical papers* [0,924, přijato]

9 Přílohy - seznam všech prací autora

1. **R. Salzman**, J. Hemza, R. Kostřica, Z. Novák. Frontal sinus mucocele penetrating to anterior cranial fossa. *Otolaryng. a Foniatrie*. (Prague), 53, 2004, 4, p. 217-221, ISSN 1210-7867
2. **R. Salzman**, R. Kostřica, J. Rottenberg. Pyocele of nasolacrimal duct – a case report. *Otorinolaryng. a Foniatrie*. (Prague), 55, 2006, 1, p. 60-62, ISSN 1210-7867
3. **R. Salzman**, K. Kaňková, L. Pácal, J. Tomandl, Z. Horáková, R. Kostřica. Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasma*; 2007, 54, p. 321-325, ISSN 0028-2685, [IF 1,247, citováno 25/18]
4. **R. Salzman**, R. Kostřica, L. Pácal, J. Tomandl, K. Kaňková, Z. Horáková. A role of superoxiddismutase in squamous cell carcinoma in head and neck region – pilot results. *Otorinolaryng. a Foniatrie*. (Prague), 2007, 56, 1, p. 24-30, ISSN 1210-7867
5. **R. Salzman**, J. Tomandl, L. Pácal, K. Kaňková, Z. Horáková, R. Kostřica. Oxidative stress and cancerogenesis – theoretical overview. *Otorinolaryng. a Foniatrie*. (Prague), 2007, 56, 1, ISSN 1210-7867, p. 39-44, ISSN 1210-7867
6. Z. Horáková, E. Tóthová, H. Binková, **R. Salzman**, P. Smilek. Metallothionein and its general importance in cancerogenesis – part 1. *Otorinolaryng. a Foniatrie*. (Prague), 57, 2008, 2, p. 83-89, ISSN 1210-7867
7. Z. Horáková, E. Tóthová, **R. Salzman**, H. Binková, I. Fabrik, P. Smilek, R. Kizek. Importance of elevation of metallothionein blood levels in patients with head and neck tumors – part 2. *Otorinolaryng. a Foniatrie*. (Prague), 57, 2008, 2, p. 90-97, ISSN 1210-7867 [citováno 3/0]
8. **R. Salzman**, L. Pácal, J. Tomandl, K. Kaňková, E. Tóthová, B. Gál, R. Kostřica, P. Salzman. Elevated malondialdehyde correlates with the extent of primary tumor and predicts poor prognosis of oropharyngeal cancer. *Anticancer Research*; 2009, 29, p. 4227-4231, ISSN 0250-7005 [IF 1,414, citováno 18/12]
9. **R. Salzman**, L. Pácal, K. Kaňková, J. Tomandl, Z. Horáková, E. Tóthová, R. Kostřica. High perioperative level of oxidative stress as a prognostic tool for identification of patients with high risk of recurrence of head & neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*; 2010, vol. 15 (6), p. 565-570, ISSN 1341-9625 [IF 1,508, citováno 12/5]
10. **R. Salzman**, M. Buchanan, L. Berman, P. Jani. Ultrasound-guided core-needle biopsy and magnetic resonance imaging in the accurate diagnosis of intramuscular haemangiomas of the head and neck. *Journal of Laryngology and Otology*, 2012, 19:1-4, ISSN 0022-2151 [IF 0,6, citováno 5/3]
11. **R. Salzman**, I. Stárek, V. Tichá, A. Skálová, J. Kučera. Metastasizing middle ear carcinoid: an unusual case report, with focus on ultrastructural and immunohistochemical findings. *Otology&Neurotology*, 2012, 33(8):1418-21, ISSN: 15317129 [IF 2,065, citováno 6/3]
12. **R. Salzman**, J. Hoza, V. Peřina, I. Starek. Osteonecrosis of the external auditory canal associated with oral bisphosphonate therapy: case report and literature review. *Otology&Neurotology*, 2013, 34(2), p. 209–213, ISSN: 15317129 [IF 2,065, citováno 6/3] (Kutvirt's Award of the Czech Society for ENT and Head and Neck Surgery of J. E. Purkyně for the Best Czech Publication in 2013) [citováno 8/4]

13. J. Heřman, E. Maňásková, **R. Salzman**, T. Dorňák. Okulobulbární forma myastenie gravis: neobvyklá diagnóza v ORL ambulanci. *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 62, 2013, 4:214-217, ISSN 1210-7867
14. **R. Salzman**, I. Stárek, F. Hitari, T. Tichý. Pediatric parotidomasseteric pilomatrixoma in children. *Biomedical Papers*, 158 (4), 2014, p. 600-604, ISSN 1213-8118 [IF 0,990, citováno 4/1]
15. M. Waloszková, **R. Salzman**, R. Uher, P. Chrapková, I. Stárek. Pozdní postintubační pneumomediastinum a emfyzém krku – kazuistika. *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 2013, 62(3), p.132-135, ISSN 1210-7867
16. J. Hoza^{1/2}, **R. Salzman**^{1/2}, I. Stárek, P. Schalek, R. Kellnerová. Efficacy and safety of erdosteine in the Treatment of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis – a Pilot Study. *Rhinology*, 2013, 51(4), p. 323-327, ISSN 0300-0729 [IF 1,72, citováno 7/1]
17. **R. Salzman**, I. Stárek, L. Kučerová, A. Skálová, J. Hoza. Neither expression of VEGF-C/D nor lymph vessel density support lymphatic invasion as mechanism responsible for local spread of recurrent salivary pleomorphic adenoma. *Virchows Archiv*, 2014, 464(1), p. 29-34, ISSN 1432-2307 [IF 2,676, citováno 6/5]
18. **R. Salzman**, T. Gabrhelík, I. Stárek. Surgical treatment of superior laryngeal neuralgia: a case report and review of the literature, *ENT Journal*, 2016, ISSN 0145-5613 [accepted] [IF 1,03, citováno 1/0]
19. K. Obtulovičová^{1/2}, I. Stárek^{1/2}, **R. Salzman**, A. Kališ, J. Ehrmann, M. Sičák, J. Dvořáčková. Recurrent salivary pleomorphic adenoma shows increased immunohistologic expression of bcl-2 oncoprotein. *Biomedical Papers* 2014, 158, ISSN 1213-8118 [IF 0,990]
20. J. Hoza, I. Stárek, M. Brož, **R. Salzman**. Importance of vascular endothelial growth factor – VEGF in metastasizing of salivary adenoid cystic carcinoma. *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 63, 2014, 3, p. 188-192, ISSN 1210-7867
21. **R. Salzman**, I. Stárek, L. Červený. Czech translation of Glasgow Benefit Inventory. *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 63, 2014, 4, p. 265, ISSN 1210-7867 [citováno 0/0]
22. **R. Salzman**, M. Brož, I. Stárek. New calculation method of surgical drain outputs allows their early removal in head and neck surgery. *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 64, 2015, 1, p. 22-27, ISSN 1210-7867
23. **R. Salzman**, J. Vodička, K. Podhola, I. Stárek. Antral wash-out among Czech otorhinolaryngologists – survey report. *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 64, 2015, 2, p. 111-118, ISSN 1210-7867
24. L. Otruba, **R. Salzman**, R. Kellnerová, Z. Hornáčková, M. Uhrová. Erdosteine in Otitis media secretorica, *Otorinolaryng. a Foniatrie (Prague)*, 64, 2015, 2, p. 107-110, ISSN 1210-7867
25. J. Heřman, Z. Heřmanová, **R. Salzman**, J. Vomáčka, I. Stárek. Ultrasound elastography in head and neck. *Časopis lékařů českých*, 2015, 154:222-226 [citováno 2/0]
26. I. Stárek^{1/2}, **R. Salzman**^{1/2}, L. Kučerová, A. Skálová, L. Hauer. Expression of VEGF-C/–D and lymphangiogenesis in salivary adenoid cystic carcinoma. *Pathology Research Practice*, 2015, 211 (10):759-765, [IF 1,397, citováno 2/1]
27. M. Hobzová, **R. Salzman**, D. Stejskal, J. Zapletalová, V. Kolek. Serum adiponectin level in obstructive sleep apnea: relation of adiponectin to obesity and long-term continuous positive airway pressure therapy. *Advances in Medical Research*, 2016,61(1):130-134 [IF 1,105, citováno 2/2]

28. **R. Salzman**, T. Bakaj, J. Heřman, I. Stárek. Endoskopická ušní chirurgie – přehledový článek. Otorinolaryng. a Foniát. (Prague), 2016, 65, 3:184-187, ISSN 1210-7867
29. **R. Salzman**, T. Bakaj, J. Heřman, I. Stárek. Endoskopická ušní chirurgie: První zkušenosti. Otorinolaryng. a Foniát. (Prague), 2016, 65, 3:168-172, ISSN 1210-7867
30. T. Bakaj, L. Bakaj-Zbrožková, **R. Salzman**, J. Heřman, I. Stárek. Role zobrazovacích metod v diagnostickém a terapeutickém postupu u cholesteatomu spánkové kosti, Otorinolaryng. a Foniát. (Prague), 65, 2016, 3:173-178, ISSN 1210-7867
31. M. Brož, P. Steiner, **R. Salzman**, L. Hauer, I. Stárek. The Incidence of MYB Gene Breaks in Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Glands and its Prognostic Importance. Biomedical Papers, 2016, 160 (3):417-422 [IF 0,924]
32. M. Brož, I. Stárek, **R. Salzman**. Význam exprese C kit a MYB genu pro diagnostiku, prognózu a léčbu adenoidně cystických karcinomů slinných žláz – současná úroveň výzkumu a jeho aplikace v praxi. Otorinolaryng. a Foniát. (Prague), 65, 2016, 1:107-110, ISSN 1210-7867
- 33 T. Bakaj, L. Bakaj-Zbrožková, **R. Salzman**, M. Tedla, I. Stárek. Recidivous cholesteatoma: DWI MR after canal wall up and canal wall down mastoidectomy. Bratislavske lekárske listy, 117(9), 2016:515 [IF 0,68, citováno 1/0]
- 34 I. Stárek, **R. Salzman**, L. Kučerová, A. Skálová. Differing lymphatic vessels density in salivary adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma. Pathology and Oncology Research, 2017, 23 (3): 545-550 [IF 1,940]
35. **R. Salzman**, I. Stárek, V. Kamarád, M. Dobiáš. Chirurgická léčba Ménièrešské nemoci: Naše zkušenosti s dekompresí endolymfatického vaku. Otorinolaryng. a Foniát. (Prague), 65, 2016, 4:232-236, ISSN 1210-7867
36. **R. Salzman**, I. Stárek. Multiple cerebral venous thrombosis after endoscopic stapedotomy: a potential role of endoscope produced heat, Acta Otorinolaryngol Italica Case Reports, 2017, 2 (1):21-25
37. J. Heřman J. Heřman, Z. Sedláčková, J. Vachutka, T. Fürst, **R. Salzman**, J. Vomáčka. Shear Wave Elastography Parameters of Normal Soft Tissues of the Neck, Biomedical papers [IF 0,924, přijato]
38. J. Heřman, Z. Sedláčková, J. Vachutka, T. Fürst, **R. Salzman**, J. Vomáčka, M. Heřman. Differential Diagnosis of Parotid Gland Tumors: Role of Shear Wave Elastography. BioMed Research International Otolaryngology [IF 2,134, přijato]
39. J. Hoza, **R. Salzman**, T. Bakaj, L. Kučerová, I. Stárek. Comparison of lymphatic vessel density and expression of VEGF-C and VEGF-D lymphangiogenic factors in Warthin's tumours and oncocytic adenomas, Biomedical papers [IF 0,924, přijato]

9.1 Kapitoly v monografiích/Jiné tištěné publikace

1. **R. Salzman**. Vztah parametrů oxidativního stresu k onkologické charakteristice spinocelulárních karcinomů hlavy a krku. Disertační práce - Otolaryngologie. Masarykova universita Brno, 2007
2. **R. Salzman**. Bát se či nebát nádorů hlavy a krku. Brožura pro pacienty. KOCHK FN u sv. Anny, Brno, p. 4, 2006, ISBN 80-239-6940-4

3. V. Chrobok, J. Astl, P. Komínek, D. Dejdar, P. Matoušek, J. Chalupa, J. Kraus, J. Plánička, K. Ledovcová, Z. Horáková, D. Golembiovská, S. Shihadeh, **R. Salzman**. Tracheostomie a koniotomie, Maxdorf Jesenius, p. 170, 2004, ISBN 80-7345-031-3

4. **R. Salzman**. History of FEES, In: R. Lipina, P. Matoušek. Endoscopic Skull Base Surgery, Tobiaš, Havlíčkův Brod, p. 347, ISBN 978-80-7311-139-7, 2014

5. **R. Salzman**, Z. Hložek: Akustika, In: Kolářová, Lékařská fyzika, 2017 (v tisku)

6. **R. Salzman**, K. Skorkovská: Nastroje a jejich využití, In: Matoušek, Chirurgie očníce, Tobiaš (v přípravě)

7. **R. Salzman**, Endoskopická ušní chirurgie, In: Horký, Lékařské repetitorium, (v přípravě)

9.2 Dopisy redakci

1. **R. Salzman**. Zpráva z Weil Cornell semináře, Salzburg, Austria. Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague), 57, 2008, 2, .108, ISSN 1210-7867

2. J. Plzák, J. Mejzlík, **R. Salzman**. Zpráva z 12. Kongresu mladých otorinolaryngologů v Jablonném nad Orlicí, Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague), 57, 2008, 12, 248, ISSN 1210-7867

3. **R. Salzman**, I. Stárek. Zpráva z 53. Otologického dne, Olomouc, Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague), 63, 2014, 4, p. 265, ISSN 1210-7867

4. **R. Salzman**, V. Peřina, I. Stárek. Response to comment to: R. Salzman, J. Hoza, V. Peřina, I. Stárek. Osteonecrosis of the external auditory canal associated with oral bisphosphonate therapy: case report and literature review. *Otology&Neurotology*, 2015 [IF 2,065]

5. **R. Salzman**, I. Stárek. Zpráva z Kurzu chirurgie přeušní žlázy 2014, Olomouc, Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague), 64, 2015, 1, p. 66, ISSN 1210-7867

6. J. Heřman, **R. Salzman**. Zpráva z Kurzu chirurgie přeušní žlázy 2016, Olomouc, Otorinolaryng. a Foniatic. (Prague), 64, 2016, 4, p. 252, ISSN 1210-7867