

Molekulární prediktory u nádorů hlavy a krku

Molecular Predictors in Head and Neck Tumours

Smilek P.

Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny v Brně a LF MU, Brno

Souhrn

Článek přináší přehled o biologických nádorových markerech identifikovaných u zhoubných novotvarů v oblasti hlavy a krku, který vychází z moderních poznatků o molekulárních událostech karcinogeneze. Jde o markery monitorující získávání autonomních proliferčních signálů (např. EGFR), proliferční aktivitu (obsah DNA, Ki-67, mitotický index), inhibici růstových inhibičních signálů (p53), vyhnutí se programované buněčné smrti (bcl-2), imortalizaci (telomerasa), angiogenezi (CD34, VEGF) a metastazování (MMP-9, E-cadherin, I-CAM aj.). Vzhledem ke komplexnosti karcinogeneze je vhodné stanovit celý panel biomarkerů. Většina biomarkerů u nádorů hlavy a krku je ve stadiu preklinického výzkumu. Významného pokroku bylo dosaženo při aplikaci cílené léčby u HNSCC.

Klíčová slova

zhoubné nádory hlavy a krku – biologické markery – prognóza – cílená léčba

Summary

This review summarizes biological markers of head and neck cancer, which have emerged from recent developments in molecular changes during carcinogenesis. These markers could be evaluated in every step that is believed to be necessary for the development of a cancer: acquisition of autonomous proliferative signalling (EGFR), proliferative activity of tumour cells (DNA content, Ki-67, mitotic index), inhibition of growth inhibitory signals (Bcl-2), apoptosis (p53), immortalization (telomerase), angiogenesis (CD34, VEGF) and metastasis (MMP-9, E-cadherin, I-CAM aj.). Most of these biological markers are at the preclinical research stage. Significant progress has been achieved in the application of targeted therapy in head and neck cancer.

Key words

head and neck cancer – biological markers – prognosis – targeted therapy

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declare he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



doc. MUDr. Pavel Smilek, Ph.D.

Klinika otorinolaryngologie
a chirurgie hlavy a krku
FN u sv. Anny v Brně a LF MU
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: smilek@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 3. 2010

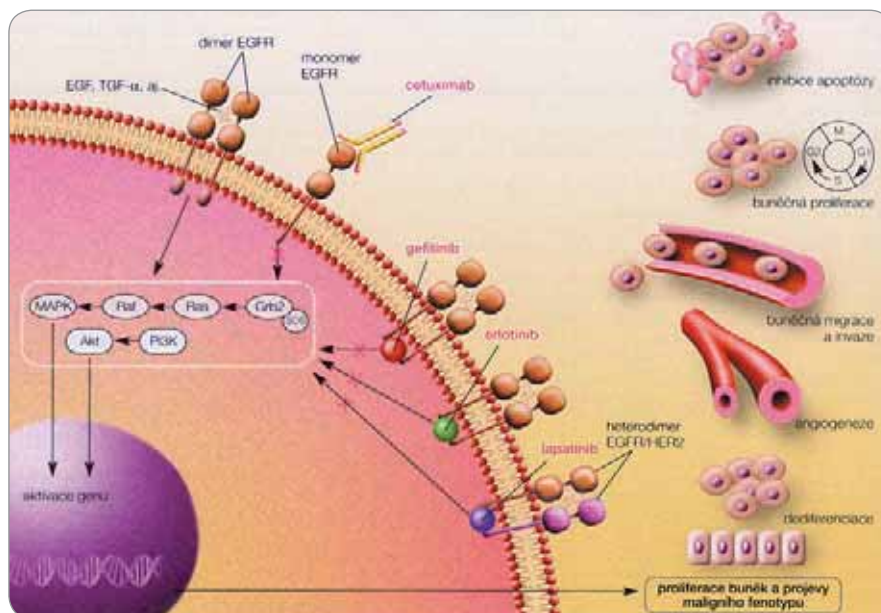
Přijato/Accepted: 1. 6. 2010

Úvod

Nalezení a uplatnění vhodných molekulárních prediktorů u karcinomů hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) má klíčový význam pro zlepšení nepříliš dobrých léčebných výsledků karcinomů této oblasti. Molekulární prediktory mají především význam při rozhodování o zařazení nemocných s pokročilým operabilním HNSCC do primární chirurgické léčby anebo do radio-chemoterapeutického režimu. Většina zkoumaných prediktorů u HNSCC se prozatím nachází ve fázi preklinického testování. Hanahan et al [1] popsali šest důležitých kroků, které jsou na buněčné úrovni považovány za nezbytné při rozvoji zhoubného nádoru: 1) získání autonomních proliferačních signálů, 2) inhibice růstových inhibičních signálů, 3) vyhnutí se programované buněčné smrti (apoptóze), 4) imortalizace, 5) získání cévního zásobení k výživě nádoru (angiogeneze), 6) tkáňová invaze a metastazování. Vzhledem ke komplexnosti karcinogeneze má izolované stanovení jednoho biologického nádorového markeru jen malý význam a většinou je vhodné stanovit celý panel biomarkerů.

Získání autonomních proliferačních signálů

V patogenezi HNSCC hraje významnou roli receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor – EGFR) a jeho ligandy (obr. 1). HNSCC se řadí k nádorům s vysokou expresí EGFR, jeho pozitivita je udávána ve 38–47%. Expze ostatních růstových receptorů je zjišťována v případech c-erbB2 ve 3–29%, c-erbB3 ve 21% a c-erbB 4 ve 26% [2]. Hladina EGFR se zvyšuje ve fázi přechodu z dysplazie do karcinomu, v pokročilejších stádiích nádorů a u nádorů špatně diferencovaných. Předpokládá se, že zevní vlivy, jako je kouření a nadužívání alkoholu, vedou ke zvýšené produkci EGF a zvýšené expresi EGFR a mohou hrát roli při vývoji nádoru. V našem klinickém souboru [3] byla nalezena expze EGFR u 45,4% pacientů (expze c-erbB2 jen u 1,0%) a bylo prokázáno vyšší riziko vzniku časné události v případech EGFR pozitivita pro všechny hodnocené léčebné režimy ($p = 0,003$).



Obr. 1. Schematické znázornění mechanismu účinku inhibitorů receptoru pro epidermální růstový faktor (převzato z [42]).

Signální cesta EGFR bývá sice poškozena ve velkém procentu HNSCC, ale pohled na prediktivní hodnotu EGFR je v literatuře rozporný. Například Scharfing et al [4] našli v souboru 129 pacientů s HNSCC zvýšenou expresi EGFR u 42,6% pacientů a zvýšenou expresi HER2 u 3,1% pacientů. Statistická analýza neprokázala vliv zvýšené expze EGFR na přežití. Naopak Ang et al [5] vyšetřovali imunohistochemicky EGFR u 155 nemocných s HNSCC. U nemocných s vyšší expresí EGFR bylo výrazně horší celkové přežití i doba bez příznaků onemocnění. Autor považuje EGFR za nezávislý prediktor lokoregionálního relapsu a navrhuje, aby nemocní s vyšší hodnotou EGFR byli léčeni intenzivnější kombinovanou léčbou.

Obecně lze říci, že s prognózou HNSCC lépe koreluje amplifikace genu pro EGFR než pouhá expze vyšetřená imunohistochemicky. HNSCC, u nichž se vyskytuje amplifikace genu pro EGFR, mají horší prognózu [6]. Kvantifikace hladiny proteinů EGFR a TGF- α může být užitečná k identifikaci podskupiny pacientů s vyšším rizikem recidivy a mohla by se stát vodítkem pro rozhodování o léčbě [7]. Několik klinických studií u HNSCC prokázalo, že nádory s nízkou expresí EGFR mají po léčbě zářením méně lokálních recidiv [8]. Bentzen et al [9] vyšet-

řovali imunohistochemicky přítomnost EGFR u 304 nemocných s HNSCC. Statisticky významně lepší lokoregionální kontroly nad nádorem bylo dosaženo u nemocných s prokázanou přítomností EGFR léčených hyperfrakcionovanou radioterapií. Uvedený autor navrhuje, aby výsledky imunohistochemického vyšetření EGFR byly použity k rozhodnutí o volbě frakcionačního režimu – konvenční frakcionace vs hyperfrakcionace. Nemocní s pozitivitou EGFR léčení hyperfrakcionovanou radioterapií mohou mít z tohoto postupu významný benefit. EGFR je považován za atraktivní cíl pro prevenci metastazování u HNSCC [10]. Hitt et al [11] vyšetřili imunohistochemicky vzorky nádorové tkáně u 46 nemocných s pokročilým HNSCC na přítomnost p53 a EGFR. Autoři nenašli při univariální analýze korelaci mezi vyšší expresí EGFR a odpovědí na indukční chemoterapii v režimu cisplatina + 5-FU + paclitaxel. Při vícerozměrné analýze bylo prokázáno, že kombinace pozitivní expze p53 a středně vysoké až vysoké expze EGFR byla sdružena se zkrácením doby do recidivy a pravděpodobně tato kombinace markerů vyjadřuje agresivnější nádorový fenotyp. Pacienti s amplifikací EGFR jsou považováni za vhodné kandidáty pro léčbu monoklonálními protilátkami

proti EGFR. Pro predikci účinnosti léčby cetuximabem je ovšem třeba vyšetřovat více prediktorů. K pozitivním prediktorům patří vedle amplifikace genu pro EGFR také mutace tyrozinkinázové domény. K negativním prediktorům patří mutace EGFRVIII (chybí extracelulární doména receptoru EGFR), stat3 a K-ras (kontinuální aktivace signální cesty nezávisle na zevní aktivaci či inhibici proliferace). Rutinní vyšetření těchto prediktorů u HNSCC prozatím není zavedeno vzhledem k tomu, že léčba monoklonálními protilátkami je teprve v počátcích a frekvence mutací, např. K-ras, se u HNSCC obecně udává pod 5% (oproti např. karcinomům kolorekta, kde je frekvence udávána ve 32–57%).

Inhibice růstových inhibičních signálů

Dalším důležitým krokem nezbytným pro rozvoj nádoru je ztráta normálních protirůstových signálů. Jedním z nejvíce studovaných genů majících podíl na onkogenezi je tumor supresorický gen nazývaný *TP53* lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozomu [12–14]. K poškození genu *TP53* může dojít mutacemi, HPV infekcí a jinými mechanismy. Např. genová mutace (G a T transverze) může být způsobena interakcí DNA s benzyropyreny, které jsou součástí cigaretového kouře (častá koincidence u HNSCC). Také některé proteiny HPV se mohou vázat na *TP53* a inaktivovat jej. Výzkumníci Anderson Cancer Center v USA prokázali nárůst pozitivitu exprese proteinu p53 při progresi karcinomů hlavy a krku – 19% pozitivita byla u normálního epitelu, 29% pozitivita u hyperplastických lézí, 45% pozitivita u dysplastických lézí a 58% pozitivita u invazivního karcinomu. Potvrdili rovněž významnou korelaci mezi zvýšenou expresí p53 a genetickou nestabilitou [15]. Uvedené výsledky již vedly k uplatnění genové terapie: byly provedeny klinické studie fáze I a II u nemocných s pokročilou rakovinou hlavy a krku refrakterní na léčbu. K obnově funkčního genu *TP53* byl použit adenovirový vektor [16].

Vielba et al [14] vyšetřovali p53 u 62 pacientů s karcinomem laryngu, náhodně vybraných a léčených v letech

1989–1995. Kaplan-Meierova analýza přežití ukázala kratší přežití u nemocných, jejichž bioptický vzorek byl p53 pozitivní, ve srovnání s těmi, jejichž vzorek byl negativní ($p = 0,04$). Lavertu et al [12] vyšetřovali p53 a Ki-67 z archivních histologických vzorků 105 pacientů s HNSCC léčených chemoradioterapií. Kombinace negativity obou markerů byla sdružena s nižší incidencí recidivy tumoru ($p = 0,02$), s nižší incidencí lokoregionálních metastáz ($p = 0,01$), s nižším výskytem duplexních nádorů ($p = 0,04$) a s lepší šancí na záchranu orgánů. Autoři uzavírají, že další sledování p53 a Ki-67 u nemocných by mohlo potvrdit význam obou uvedených markerů při predikci časného relapsu.

K proteinům regulujícím buněčný cyklus patří také cykliny. Asi u 64% HNSCC byla zjištěna nadprodukce cyklinu D1. Tento cyklin by mohl být nezávislým prognostickým ukazatelem recidivy [14].

Rodina proteinů p21 patří k cyklin dependentním kinázám regulujícím buněčný cyklus. Některé studie u HNSCC potvrzují skutečnost, že zvýšená exprese tohoto proteinu koreluje se zvýšeným procentem recidiv a zkráceným přežitím [8]. V poslední době přibývá důkazů o prognostickém významu antionkogenu p16 zvláště ve spojení s lidským papiloma virem (HPV typ 16) u orofaryngeálního karcinomu (Gillison). Protein p16 je inhibitor cyklin dependentní kinázy a podílí se na regulaci buněčné proliferace. Orofaryngeální karcinomy HPV pozitivní a zároveň p16 pozitivní mají výrazně lepší prognózu a to umožňuje zmenšit intenzitu protinádorové léčby. Zároveň jsou testovány profylaktické a terapeutické vakcíny proti HPV 16.

Vyhnutí se programované buněčné smrti

U člověka byla popsána bcl-2 rodina apoptózu regulujících proteinů, která je tvořena nejméně 17 homology proteinu CED-9. Některé proteiny z rodiny bcl-2 proteinů, např. samotný bcl-2, potlačují proces apoptózy stejným mechanismem jako CED-9. Byly nalezeny také pro-apoptotické proteiny patřící do bcl-2 rodiny (např. Bax), které mají podstatný vliv na indukci apoptózy [17]. Nerovnováha v poměru anti- a pro-apop-

totických proteinů rodiny bcl-2, která vychyluje rovnováhu směrem k přežívání, může učinit nádorové buňky více rezistentními k řadě stimulů vyvolávajících buněčnou smrt (všechna chemoterapeutika, záření, hypoxie, odstranění růstových faktorů a glukózy, antionkogen p53) [18]. Tato duální funkce je navíc zřejmě tkáňově specifická. Např. zvýšená exprese bcl-2 u karcinomu prostaty ukazuje na horší prognózu, zatímco u karcinomu kolorekta a prsu na lepší prognózu. U HNSCC jsou výsledky rozporné, i když se většina autorů kloní spíše k pozitivnímu prediktivnímu významu. Např. Jäckel et al [19] považují koincidence pozitivitu p53 a zvýšené hodnoty bcl-2 za výraz zhoršené prognózy, podobně Costa et al [18]. Naopak Leherdt et al [20] v souboru 133 pacientů s orofaryngeálním karcinomem uvádí signifikantní spojitost exprese bcl-2 s lepší lokoregionální kontrolou a delším přežitím.

Nejistá úloha bcl-2 může být způsobena chyběním standardizace procedur při přípravě a zpracování imunohistochemických vzorků: různý typ použité protilátky, metodiky používané při imunohistochemickém vyšetření a především nestandardizovanou preanalytickou fází vyšetření – použití různých fixačních roztoků (obyčejný formol, pufovaný formol, starý formol), různé fixační doby.

Imortalizace

Pojem imortalizace je označením pro skutečnost, že nádorové buňky získávají schopnost neomezeně se replikovat. Bylo prokázáno, že telomeráza je exprimována až v 90% lidských nádorů, zatímco v normálních somatických buňkách je nedetekovatelná [1,21]. Práce hodnotící prognostický význam telomerázy nejsou dosud uzavřeny, ale je pravděpodobné, že její vyšší aktivita koreluje s horší prognózou [22].

Dostupná data ukazují na její důležitost v patogenezi HNSCC a na její prognostickou hodnotu. Aktivita telomerázy je detekovatelná již v pozdních stádiích karcinogeneze (progredientní prekancerózy) a v časných stádiích HNSCC [23]. U některých karcinomů hlavy a krku ovšem v průběhu mnohastupňového procesu karcinogeneze ke změnám ve smyslu imortalizace nedochází.

Aktivita telomerázy je rovněž korelována se stupněm diferenciace tumoru a léčebnou odpovědí. Vyšší stadia nádorů mají významně vyšší aktivitu telomerázy než časná stadia karcinomu [24]. Výhodou kvantitativní analýzy aktivity telomerázy je možnost použití minimálního vzorku tkáně.

Získání cévního zásobení k výživě nádoru

Nedostatečné cévní zásobení nádoru má nejen vliv na jeho růst, ale také na léčbu. Solidní nádory často obsahují oblasti s intermitentním nebo perzistujícím deficitem perfuze. V nedostatečně prokrvených nádorech se nacházejí hypoxické buňky, které jsou radiorezistentní [25]. Většina nádorů je schopna stimulovat proliferaci endoteliálních buněk a tvorbu nových cév. Tento proces angiogeneze je složitě regulován stimulačními a inhibičními faktory. Jednou z možností hodnocení angiogeneze je měření „mikrovaskulární denzity“. Jako marker angiogeneze je používán CD34, antigen endoteliálních buněk. Protilátka proti CD34 se používá k označení kapilárních průsvitů, které jsou počítány v jednom zorném poli při 200násobném zvětšení.

Měření mikrovaskulární denzity pomocí CD34 je považováno za nezávislý prognostický faktor u karcinomu prsu, vaječníků, prostaty a žaludku. Výsledky studií u HNSCC jsou nejednoznačné. Některé studie zjistily souvislost mezi vyšší mikrovaskulární denzitou a metastazováním [26], v jiné studii [27] byla naopak vyšší denzita sdružena s lepší prognózou, další studie nenašly korelaci mezi mikrovaskulární denzitou a klinickým výsledkem vůbec [28]. Lopez-Graniel et al [29] v souboru 33 pacientů s karcinomem dutiny ústní našli průměrnou hodnotu mikrovaskulární denzity 32,5. Nejistili korelaci s přežitím, ale předpokládají, že toto vyšetření by mohlo být nezávislým prognostickým faktorem lokální recidivy. Japonští autoři [25] vyšetřovali kromě běžných klinicko-patologických faktorů i p53, bax, bcl-2, Ki-67, AI, EGFR a CD34 u 31 nemocných s karcinomem hrtanu T1–T2, kteří byli léčeni kurativní radioterapií. U 11 nemocných došlo k recidivě onemocnění. Vyšší ra-

diosenzitivita byla v univariční analýze spojena s vyšší mikrovaskulární denzitou a slabě i s vyšší expresí Ki-67. Při multivariční analýze byl prokázán pouze vliv mikrovaskulární denzity na radiosenzitivitu. Autoři uzavírají, že u malých laryngeálních karcinomů má na radiosenzitivitu vliv především mikrovaskulární denzita (oxygenace), nikoliv proliferací a apoptotické markery.

Vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF) má vliv na mitózu endoteliálních buněk, jejich motilitu, organizaci a rovněž na permeabilitu endotelu. VEGF je v některých studiích korelován s metastazováním do krčních uzlin, angiogeneze a přežitím. Ve studiích zabývajících se VEGF u HNSCC jsou výsledky rozpačité, jeho vyšší exprese je spíše považována za prognostický faktor horší prognózy [30]. V naší klinické studii [3] byla zjištěna hodnota mediánu CD34 57,5 kapilárních průsvitů/3,14 mm² a statisticky bylo prokázáno ($p = 0,002$), že vyšší hodnota CD34 – zvláště vyšší než 85 – přispívala ke vzniku vyššího rizika zkrácení doby do recidivy či progresu ve všech léčebných režimech.

Tkáňová invaze a metastazování

Důležitou součástí progresu nádoru je invaze nádorových buněk a metastazování. V této fázi nádorového růstu se uplatňuje řada proteinů. Pro invazi nádorových epiteliálních buněk jsou nutné tři kroky: přichycení buňky k bazální membráně, proteolýza extracelulární matrix a migrace nádorových buněk. Na přichycení nádorových buněk k bazální membráně se podílejí některé integriny, E-cadherin a skupina cytoplasmatických proteinů (cateniny). Cadheriny jsou transmembránové proteiny zajišťující spojení mezi buňkami ve tkáni. Ke své funkci potřebují ionty Ca²⁺, z toho je odvozen jejich název. Snížené hladiny E-cadherinu byly sdruženy s metastatickým genotypem u HNSCC [31].

Kritickou fází invaze nádorových buněk je proteolýza extracelulární matrix. Na tomto kroku se podílí skupina proteináz, které ke své aktivitě vyžadují přítomnost kovových iontů, a proto jsou označovány jako matrix metaloproteinázy (MMP). Zvláštní pozornost zaslu-

huje MMP-2 a MMP-9, známá též jako kolagenáza typ IV o molekulové hmotnosti 92 kDa. Obě proteinázy byly prokázány u invazivních forem HNSCC [32].

Přítomnost zvýšené aktivity MMP-9 byla sdružena s vyšší invazivitou karcinomu dutiny ústní [8]. Bylo také zjištěno, že barvení na MMP-9 korelovalo se zvýšenou mikrovaskulární denzitou a VEGF, což ukazuje na možnou spolupráci obou faktorů při nádorové angiogenezi.

Invaze nádorových buněk do okolních tkání je závislá na přítomnosti povrchových markerů (adhezních molekul) a schopnosti nádorových buněk vázat mimobuněčné proteiny. V některých studiích s prognózou rakoviny hlavy a krku korelovala přítomnost markerů buněčného povrchu: CD 44, E-cadherin, I-CAM [30]. Při vícerozměrné analýze byl v naší studii [3] prokázán vliv positivity MMP-9 ($p = 0,01$) na zvýšení rizika vzniku časné události choroby (recidiva, progresu, úmrtí), nikoliv na celkové přežití.

Růst buněčné nádorové populace

Růst buněčné populace v nádoru je ovlivněn především rovnováhou mezi buněčnou proliferací a zánikem nádorových buněk. Mitotický a apoptotický index je počítán z rutinních řezů (barvených hematoxylin-eozinem). Mitotický index se stanoví jako procento nádorových buněk v mitóze na 1 000 nádorových jader, apoptotický index jako procento nádorových buněk v apoptóze na 1 000 nádorových jader.

Stupeň proliferace nádorové populace lze stanovit i imunohistochemicky. U HNSCC mají význam zvláště dva proliferací markery: Ki-67 (stanovený pomocí protilátky MIB 1) a PCNA. Ki-67 je protein s molekulovou hmotností 345 kDa, je vyjádřen ve všech fázích buněčného cyklu proliferující buňky (G1, S, G2, M) a nedá se detekovat u buněk ve stavu proliferací klidu (G0). Protein má podstatný význam pro buněčnou proliferaci [12]. Ki-67 pozitivní frakce buněk je proto označována jako růstová frakce. Stanovení proteinu Ki-67 je poměrně jednoduché, a proto se stalo široce užívaným ukazatelem proliferací aktivity buněk. Procento imunohistochemicky značených buněk z hodnocených 1 000 buněk se označuje jako skóre

Ki-67. Podle některých studií nemocní s HNSCC se skóre Ki-67 menším než 30 % měli pravděpodobnost přežití 25 měsíců od stanovení diagnózy v 90 %, zatímco nemocní s procentem pozitivivity Ki-67 vyšším než 50 % měli pravděpodobnost tohoto přežití jen v 10 % [33].

PCNA je nukleární protein s molekulovou váhou 36 kDa. Je identický s DNA polymerázou-delta-auxiliárním proteinem, který je nezbytný pro DNA syntézu, resp. pro reparaci během DNA syntézy. Proto se PCNA užívá jako proliferační marker [33]. PCNA je považován za užitečný marker buněčné proliferace korelující se stupněm malignity tumorů slinných žláz [8]. V některých studiích vysoká incidence PCNA signifikantně korelovala s kratším DFI a OS [34]. PCNA bývá označován jako „tanečník s mnoha partnery“, poněvadž koordinuje úlohu řady proteinů regulujících DNA. PCNA má delší poločas života než Ki-67 a na rozdíl od Ki-67, který je exprimován pouze u proliferačních buněk, může být vyjádřen i u neproliferačních buněk. PCNA proto může vyjadřovat nejen stupeň proliferace, ale i závažnost alterace DNA nádorových buněk. Nádory s vysokou expresí PCNA a zároveň nízkou hodnotou Ki-67 a SPF mohou být pomalu rostoucími nádory, které jsou bohaté na genetické aberace způsobující zvýšenou agresivitu nádoru [35].

Analýzu růstu buněčné populace lze též provádět pomocí flow cytometrie. Obsah DNA se jeví jako významný nezávislý prognostický faktor [36]. Mnoho nádorových buněk má abnormální množství DNA v jádře (tzv. aneuploidie). Většinou jde o zmnožení DNA, multiklonalitu. U HNSCC bývá vysoký stupeň aneuploidie v 5–70 % případů. Aneuploidie je spojena se špatnou prognózou [33] a je výsledkem selhání kontroly mitózy [37]. Analýza buněčného cyklu nádorových buněk, zvláště stanovení S fáze buněčného cyklu (synthesis phase fraction – SPF), je důležitým ukazatelem proliferační aktivity nádoru. Das et al [38] našli významnou korelaci mezi aneuploidií a vyšší SPF u metastatických uzlin a časnou recidivou karcinomu dutiny ústní, zatímco obsah DNA primárního nádoru s DFI koreloval nebyl.

Vztah mezi zvýšenou proliferací a nízkou apoptózou považují za důležitý prediktivní marker i Raybaud-Diogené et al [39]. Autoři zjišťovali faktory radiorezistence u souboru 101 pacientů s HNSCC. Z imunohistochemicky zjištěných prediktorů – Ki-67, p53, T stadia, heat-shock protein-27 a glutathione S transferáza – prokázala multivariační analýza pouze vliv p53, Ki-67 a T stadia. Silnou pravděpodobnost dobré odpovědi na radioterapii vykazovala kombinace snížené exprese p53 a vyšší proliferace (Ki-67 > 20 %). Při poškozené apoptóze dochází k akcelerované repopulaci nádorových buněk po radioterapii, zvláště při konvenčním dávkování. Je-li použita akcelerovaná radioterapie, k této repopulaci nedochází a prediktivní hodnota p53 je potom nevýznamná. Nádory s vysokou proliferační aktivitou (Ki-67 > 20 %) odpovídaly na ozáření lépe ($p = 0,0028$). Tento závěr je konzistentní s klinickou zkušeností, že rychle rostoucí nádory odpovídají zpravidla na léčbu zářením lépe než nádory rostoucí pomalu. Nedostatečné krevní zásobení tumoru zapříčiňující hypoxii nádorových buněk rovněž vysvětluje souvislost mezi radiorezistencí a nízkou proliferační aktivitou. Couture et al [40] studovali homogenní soubor 304 nemocných s HNSCC, kteří byli léčeni pouze radioterapií. Imunohistochemicky byly stanoveny hodnoty p53 a Ki-67 a bylo zjištěno, že akumulace proteinu p53 je výrazně sdružená s lokálním selháním u nemocných, kteří byli primárně léčeni radioterapií. Zvýšená exprese p53 by mohla být markerem radiorezistence.

Nemocní s nízkou proliferací (Ki-67 < 20 %) odpovídají na radioterapii hůře než nemocní s vyšší proliferační aktivitou. Kombinace pozitivivity p53 a nižší exprese Ki-67 (< 20 %) předpovídá horší odpověď na radioterapii, zvláště u nemocných s nižšími T stadii. Vliv markeru Ki-67 vysvětluje uvedení autoři skutečností, že v hypoxickém prostředí, které je samo o sobě faktorem radiorezistence, se nacházejí nádorové buňky především ve fázi G0. Nízká exprese Ki-67 proto odráží též hypoxii a predikuje radiorezistenci. Uvedení autoři doporučují imunohistochemické vyšetření Ki-67 a p53 i proto, že je dostupné, jednoduché a poměrně laciné.

V naší studii [3] se prostřednictvím vícerozměrné analýzy podařilo prokázat významný vliv realizované proliferace jak na celkové přežití, tak na riziko vzniku časné události. Míra realizované proliferace je vyjádřena jako zvýšený podíl nádorových buněk ve fázi G2M buněčného cyklu, kombinace G2M +M1 anebo M1/A1. Kontrastní index G2M +M1/A1 je v podstatě univerzálním prediktorem, a to ve všech léčebných režimech, u léčby poškozující genom o to více. Pacienti s nádory s vyšší mírou realizované proliferace mají horší prognózu a jsou ohroženi rizikem přímé progresy.

Galektin 3

Sacharidy nesou informace pro řadu důležitých buněčných dějů. Během procesu maligní transformace je rovněž ovlivněna struktura sacharidů i jejich receptorových molekul. Nižší hladina exprese galektinu 3 byla nalezena u epidermálních karcinomů ve srovnání se zdravou epidermis. Expres vazebných míst pro galektin 3 může u pokročilých karcinomů hlavy a krku významně korelovat s výsledky léčby [41].

Závěr

Poslední dekády přinesly explozi informací o karcinogenezi HNSCC. Otázka možnosti predikce léčebných výsledků HNSCC a možnosti využití prediktivních biologických markerů k plánování léčby jsou předmětem řady publikovaných prací, ale prediktivní hodnotu většiny zkoumaných markerů se nepodařilo určit jednoznačně. Většina biomarkerů se nachází ve fázi preklinického hodnocení, v dostupné literatuře autoři uvádějí „možnost“ či „doporučení“ ohledně biomarkerů určujících volbu léčby. Pro uplatnění těchto biomarkerů v diagnostice a léčbě bude nutný větší počet studií korelujících klinické výsledky s molekulárními změnami HNSCC. Významného pokroku bylo dosaženo při aplikaci cílené léčby u HNSCC.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70.
2. Überall I, Kolář Z. Receptory pro epidermální růstové faktory a jejich význam pro maligní transformaci solidních nádorů. *Klin Farmakol Farm* 2006; 20: 190–196.

3. Smilek P. Prognostické a prediktivní parametry dlaždicobuněčných karcinomů vybraných lokalizací hlavy a krku. Habilitační práce. Brno: LF MU 2009.
4. Scharntinger VH, Kacani L, Andrlé J et al. Pharmacodiagnostic Value of the HER Family in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66(1): 21–26.
5. Ang KK, Berkey BA, Tu X et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(24): 7350–7356.
6. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(16): 2152–2155.
7. Grandis JR, Melhelm MF, Holding WE et al. Levels of TGF- α and EGF-R protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 824–832.
8. Myers EN, Suen JY, Myers JN et al. *Cancer of the head and neck*. 4th ed. Elsevier Science 2003.
9. Bentzen SM, Atasoy BM, Daley FM et al. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2005; 23(24): 5437–5439.
10. Wells A. *Cell Motility in Cancer Invasion and Metastasis*. Netherlands: Springer 2006.
11. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML et al. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer* 2005; 41(3): 453–456.
12. Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J et al. P53 and Ki-67 as Outcome Predictors for Advanced Squamous Cell Cancers of the Head and Neck Treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 2001; 111: 1878–1892.
13. Shin DM, Charuruks N, Lippman SM et al. P53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(6): 603–609.
14. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A et al. P53 and Cyclin D1 as Prognostic Factors in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *Laryngoscope* 2003; 113: 167–172.
15. Shin DM, Charuruks N, Lippman SM et al. P53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 603–609.
16. Clayman GL, El-Naggar AK, Roth JA et al. In vivo molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55(1): 1–6.
17. Rejthar A, Vojtěšek B. *Obecná patologie nádorového růstu*. 1. vyd. Praha: Grada 2002.
18. Costa A, Licitra L, Veneroni S et al. Biological markers as indicators of pathological response to primary chemotherapy in oral-cavity cancers. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998; 79(6): 619–623.
19. Jäckel MC, Sellmann L, Dorudian MA et al. Prognostic significance of p53/bcl-2 co-expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2000; 110(8): 1339–1345.
20. Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A et al. The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938 C > A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2009; 20(6): 1094–1099.
21. Mao L, El-Naggar AK, Fan YH et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996; 56(24): 5600–5604.
22. El Samny T, El Halaby H, El Fiky L et al. Prognostic value of telomerase and DNA ploidy in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262(10): 799–803.
23. Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekepan S et al. Telomerase Activity in Oral Leukoplakia and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(15): 3530–3533.
24. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9(7): 3088–3092.
25. Kamijo T, Yokose T, Hasebe T et al. Potential role of microvessel density in predicting radiosensitivity of T1 and T2 stage laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2000; 6(8): 3159–3165.
26. Shpitzer T, Chaimaoff M, Gal R et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122(8): 865–868.
27. Zätterström UK, Brun E, Willén R et al. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1995; 17(4): 312–318.
28. Dray TG, Hardin NJ, Sofferan RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(9 Pt 1): 724–729.
29. Lopéz-Graniel CM, Tamez de León D et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20(4): 463–468.
30. Smith BD, Haffty BG, Sasaki CT. Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110(3): 221–228.
31. Georgiolos A, Batistatou A, Manolopoulos L. Role and Expression Patterns of E-Cadherin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25(1): 5–14.
32. Do NY, Lim SC, Im TS. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep* 2004; 12(2): 229–237.
33. Welkoborski HJ, Hinni M, Dienes HP et al. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(7): 503–510.
34. Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 16): 3051–3060.
35. Liu M, Lawson G, Delos M et al. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260(1): 28–34.
36. Yip TT, Lau WH, Chan JKC et al. Prognostic Significance of DNA Flow Cytometric Analysis in Patients with nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer* 1998; 83(11): 2284–2292.
37. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, van Blommestein R et al. DNA ploidy status as a prognostic marker and predictor of lymph node metastasis in laryngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(11): 1015–1020.
38. Das SN, Khare P, Patil A et al. Association of DNA pattern of metastatic lymph node with disease free survival in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res* 2005; 122(3): 216–223.
39. Raybaud-Diogenè H, Fortin A, Morency R et al. Markers of radioresistance in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study. *J Clin Oncol* 1997; 15(3): 1030–1038.
40. Couture C, Raybaud-Diogenè H, Têtu B et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 2002; 94(3): 713–722.
41. Plzák J, Betka J, Smetana K jr et al. Galectin-3 – an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer* 2004; 40(15): 2324–2330.
42. Neuwirthová J, Mechl Z, Smilek P et al. Integrace nových biologických přípravků do léčby spinocelulárních karcinomů hlavy a krku. *Remedia* 2007; 17(2): 181–187.
43. Gillison ML. HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45(Suppl 1): 383–385.