

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie

**MUDr. Jaroslav Betka**

**Směřovaná polymerní léčiva  
u karcinomů v oblasti hlavy a krku**

**Polymeric-drug Conjugates in Treatment  
of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**



Disertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.  
Školitel - konzultant: Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc.

Praha, 2014

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 8. 7. 2014

Jaroslav Betka

**Identifikační záznam:**

Betka, Jaroslav, Směřovaná polymerní léčiva u karcinomů v oblasti hlavy a krku [*Polymeric-drug Conjugates in Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*], Praha, 2014. 70 stran, 4 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze.

Školitel: Říhová, Blanka; Školitel - konzultant: Betka, Jan.

## Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech. Počet nově diagnostikovaných pacientů se zhoubným nádorem neustále stoupá, průměrně o 2,5% ročně. Tento trend se týká i spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, který je 6. nejčastější onkologické onemocnění. Jeho výskyt nejvíce ovlivňuje přítomnost dvou zevních rizikových faktorů: kouření a abusu alkoholu; poslední výzkumy naznačují, že pro vznik neoplazie je rozhodující nejen množství a délka užívání škodlivé látky, ale i doba jejího podání či psychická závislost na ní. V poslední době navíc roste incidence spinocelulárního karcinomu hlavy a krku u nekuřáků a mladších věkových skupin ve spojitosti s výskytem HPV infekce v nádoru.

Dosud nejčastěji používané formy protinádorové terapie (chirurgie, radioterapie, chemoterapie) i přes pokroky v posledních desetiletích vedou k významnému zlepšení přežívání pouze u některých typů rakoviny, ale například v případě spinocelulárního karcinomu hlavy a krku je celková pravděpodobnost pětiletého přežití stále nízká, přibližně 40%. Proto se pozornost obrací k novým formám terapie, například k cílené terapii s použitím monoklonálních protilátek nebo polymerních nosičů cytostatik. Dalším trendem současného výzkumu v této oblasti je možnost využít v boji proti nádorovým onemocněním imunitní systém.

V předložené práci je popisován jak současný stav poznání procesu karcinogeneze tak jsou zde diskutovány jednotlivé druhy protinádorové terapie se zaměřením na využití moderních terapeutických přístupů, které by mohly pozitivně ovlivnit klinický průběh nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** spinocelulární karcinom hlavy a krku, kouření, protinádorová imunita, regulace imunitní odpovědi, nádorové mikroprostředí, cílená léčba, biologická léčba, imunoterapie, syntetické nosiče léčiv

## **Abstract**

Malignant diseases are after cardiovascular diseases the second most common cause of death in the developed countries. The number of patients newly diagnosed with cancer is constantly rising, on average by 2.5% yearly. This trend also applies to squamous cell carcinoma of the head and neck, which is the sixth most common oncological disease. Its occurrence is most influenced by two external risk factors: smoking and abuse of alcohol; latest research indicates that for the emergence of neoplasia is crucial not only the amount of and duration of the use of a harmful substance but also the time of day when a harmful substance is used as well as psychological dependence on the substance. But recently, we are witnessing growth of the frequency of occurrence of the squamous cell carcinoma of the pharynx with non-smokers and younger age groups in connection with presence of the HPV infection in tumor.

The forms of so far most commonly used anticancer therapy (surgery, radiotherapy, chemotherapy) have, despite progressions over the last decades, lead to significant improvement only with some types of cancer but in the case of squamous cell carcinoma of the head and neck is the total probability of five-year survival still low, approximately 40%. Therefore we are turning our attention to the new forms of therapy, for example to the targeted therapy with the use of monoclonal antibody or polymeric carriers of cytostatic agents. Another current trend in this field of research is the possibility to utilize the immune system to fight tumor diseases.

This submitted work describes the current state of knowledge of individual types of anti-cancer treatment as well as a discussion of the possibilities of using modern therapeutic approaches which could have a significantly positive affect on the clinical course of cancer.

**Key words:** head and neck squamous cell carcinoma, smoking, T regulatory cells, anticancer immunity, regulation of immune system, cancer microenvironment, targeted therapy, immunotherapy, synthetic drug carriers

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval všem, kteří mě v průběhu mého studia ovlivnili, zejména svým dvěma školitelům:

**Prof. RNDr. Blance Říhové, DrSc.**

(Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.)

a

**Prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc.**

(Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole)

a mému kolegovi

**Mgr. Ondřeji Hovorkovi, PhD.**

(Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i. do roku 2010)

Dále patří můj dík celé Laboratoři nádorové imunologie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i., a to nejenom za poskytnutý materiál a praktickou pomoc, ale také za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě patří můj veliký dík mé ženě Jindřišce a celé mé rodině za trpělivost, podporu ve studiu a za vytvoření tolik potřebného zázemí.

V Praze 14.6.2014

MUDr. Jaroslav Betka

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	4
<b>Poděkování</b> .....	6
<b>Obsah</b> .....	7
<b>Incidence nádorových onemocnění</b> .....	8
<b>Hypotézy a cíle dizertační práce</b> .....	11
<b>Patogeneze nádorového onemocnění</b> .....	13
• Vliv kouření a alkoholu na výskyt nádorů hlavy a krku.....	13
• Publikace č.1.....	15
• Vliv virových agens na výskyt nádorů hlavy a krku.....	18
• Role tzv. nádorových kmenových buněk.....	19
• Publikace č.2.....	21
<b>Diagnostické metody používané při odhalování nádorů</b> .....	23
• Příklady využívaných nádorových markerů.....	23
<b>Možnosti léčby maligních onemocnění</b> .....	26
• Chirurgická léčba.....	26
• Radioterapie.....	26
• Chemoterapie.....	27
▪ Nežádoucí účinky chemoterapie.....	29
• Cílená protinádorová terapie.....	31
▪ Polymerní léčiva v protinádorové léčbě .....	35
○ Historie vývoje polymerních léčiv.....	39
○ Polymerní léčiva na bázi HPMA.....	41
○ Publikace č.3.....	46
<b>Protinádorová imunita</b> .....	49
• T regulační buňky.....	52
• Role T regulačních lymfocytů u maligních onemocnění.....	54
• Publikace č.4.....	56
<b>Závěry a shrnutí výsledků dizertační práce</b> .....	58
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	59
<b>Literatura</b> .....	61
<b>Přílohy</b> .....	71

## Incidence nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech. Vysoká incidence rakoviny se nevyhýbá ani České republice, např. v roce 2010 toto onemocnění postihlo 85 664 lidí (incidence 785 případů/100 000 obyvatel), z toho 27 834 lidí zemřelo. Počet nově diagnostikovaných pacientů se zhoubným nádorem neustále stoupá, mezi roky 1998 a 2010 narostl o 28%; jen za rok 2010 byl evidován nárůst o 4,9% případů při srovnání s rokem 2009 [1]. Věkové složení osob se zhoubným novotvarem je dlouhodobě stabilní a je charakteristické výraznou převahou osob vyššího věku. Incidence je diferencovaná i podle pohlaví - více než tři čtvrtiny nádorových onemocnění jsou diagnostikovány u mužů starších 60 let, u žen je výskyt nádorů ve věkové kategorii nad 60 let nižší (68,5%). Je to dáno tím, že některé časté malignity u žen (např. nádory prsu a některé gynekologické nádory) se vyskytují i v mladším věku. U dětí je výskyt tumorů ve srovnání s ostatními věkovými skupinami málo častý. Nejčastějším zhoubným onemocněním (kožní nádory zde nebyly pro vysokou incidenci a nízkou úmrtnost zařazeny) u mužů je karcinom prostaty (74 případů/100 000 obyvatel), následuje karcinom tlustého střeva a konečníku (54 případů/100 000 obyvatel), jehož výskyt se v posledních letech výrazně zvýšil, a karcinom plic (51 případů/100 000 obyvatel), jehož výskyt v mužské populaci naopak mírně klesá. Nicméně pro vysokou úmrtnost kvůli často pozdnímu stanovení diagnózy zůstává karcinom plic nejčastější příčinou úmrtí mužských pacientů s onkologickým onemocněním. Nádory plic, prostaty a kolorektální karcinom tvoří u mužů téměř polovinu všech nově zjištěných novotvarů. Dále zaznamenáváme vyšší výskyt nádorů jater, varlat a mnohočetného myelomu, naopak se snižuje výskyt karcinomu žaludku (7 případů /100 000 obyvatel). Nejčastějším zhoubným onemocněním u žen je karcinom prsu (72 případů /100 000 obyvatel) s rostoucí incidencí, ale klesající úmrtností. Varovný je výrazný nárůst nových případů karcinomu plic u žen (22 případů /100 000 obyvatel), povzbuzující je naopak pokles výskytu karcinomu žaludku a nezvyšující se nálezy karcinomu děložního čípku (17 případů/100 000 obyvatel) - důvodem jsou pravděpodobně zdokonalené preventivní prohlídky, zvláště v případě prsních a gynekologických nádorů. V ženské populaci však roste výskyt karcinomu kůže, ledvin, močového měchýře a štítné žlázy.



V oblasti nádorů hlavy a krku, které se tato publikace věnuje podrobněji, sledujeme v posledním desetiletí několik zajímavých trendů. Incidence karcinomu hrtanu jako nejčastějšího zástupce zhoubného nádoru hlavy a krku celkově nestoupá, a tedy kopíruje trend karcinomu plic, se kterým má společné nejčastější rizikové faktory [2]. Vysvětlení je nejspíše v snižujícím se počtu kuřáků v populaci [3]. Na druhou stranu výskyt druhého nejčastějšího zhoubného nádoru této oblasti - karcinomu orofaryngu - v posledních letech stoupá a to u obou pohlaví, u žen dokonce výrazně (0,63 případů/100 000 obyvatel v roce 2000 oproti 1,12 případů/100 000 obyvatel v roce 2010). Tento trend, který se vyskytuje i celosvětově, se vysvětluje jednak nárůstem žen kuřaček, jednak vyšší incidencí HPV dependentních karcinomů tonsily a kořene jazyka (více viz. kapitola Patogeneze nádorového onemocnění) [4, 5].

Ve srovnání se světovým výskytem nejčastějších nádorů z roku 2008 jsou čeští muži na 40. místě v počtu výskytu karcinomů prostaty (1. místo USA), na 3. místě v počtu výskytu karcinomů tlustého střeva a konečníku (1. místo Slovensko) a na 9. místě v počtu výskytu karcinomů průdušnice, průdušek a plic (1. místo Maďarsko). Česká ženská populace je na 30. místě v počtu výskytu karcinomů prsu (1. místo USA), na 9. místě v počtu výskytu karcinomů tlustého střeva a konečníku (1. místo Nový Zéland), na 3. místě v počtu výskytu karcinomů těla děložního (1. místo USA), na 106. místě v počtu výskytu karcinomů hrdla děložního (1. místo Haiti) a na 25. místě v počtu výskytu karcinomů průdušnice, průdušek a plic (1. místo USA) [6].

Pozitivním zjištěním je, že přes stále rostoucí incidenci úmrtnost na tyto onemocnění nestoupá [1, 6]. Příčinu lze hledat v častější detekci některých nádorů již v raném stádiu (např. u rakoviny prsu či prostaty), což umožňuje stále dostupnější a kvalitnější přístrojové vybavení (magnetická rezonance, endoskopické metody) a také nové možnosti diagnostiky a sledování průběhu nádorového onemocnění (např. využití nádorových markerů). Další snížení úmrtnosti na maligní onemocnění přináší zdokonalování léčebných postupů jak chirurgických (např. robotická technika), tak nechirurgických (např. kombinace chemoradioterapie a biologické léčby). Přes všechna tato opatření zůstává počet pacientů, kteří na nádorové onemocnění umírají, stále relativně vysoký, zvláště při srovnání s ostatními státy EÚ [7]. Z dostupných populačních dat Národního onkologického registru vyplývá, že v České republice je stále velmi vysoký podíl nádorů diagnostikován v pokročilém klinickém

stadiu, kdy je výrazně nižší naděje na dobrý výsledek léčby a na dlouhodobé přežití. Situace se v posledních desetiletích nelepšila a ani poslední dostupná data z roku 2010 nenaznačují pozitivní trend, spíše naopak [1]. Včasná detekce je založena zejména na edukaci celé společnosti k rozeznání časných příznaků a vyhledání odborné pomoci a dále na screeningových programech zachycujících časné příznaky onemocnění. Typickým a častým příkladem pro pozdně diagnostikovaný nádor je kolorektální karcinom, kde je více než 50 % nových pacientů diagnostikováno v klinickém stadiu III nebo vyšším [8]. To významně zhoršuje dosažitelné výsledky léčby a samozřejmě zvyšuje náklady spojené s léčbou. Dalším problémem v České republice je omezený program preventivních onkologických prohlídek a protinádorového očkování. Příkladem je situace u očkování proti HPV, které výrazně snižuje riziko karcinomu děložního čípku - v době publikace této práce je vakcinace hrazena jen ženám mezi 13. - 14. rokem, přičemž doba účinnosti vakcíny se odhaduje na 10-15 let [9, 10].

## Hypotézy a cíle dizertační práce

- V minulosti byla na mnoha studiích prokázána spojitost mezi kouřením a vznikem spinocelulárního karcinomu hlavy a krku [11]. Většina epidemiologických studií se v anamnestické části zaměřila na celkové množství cigaret a dobu kouření. Některé současné studie se však zaměřují i na psychickou stránku pacienta. Deheinzelin prokázal vztah mezi závislostí na tabáku a vyšším výskytem maligních onemocnění, nicméně tato epidemiologická studie probíhala bez rozlišení lokality nádorového onemocnění a pouze s 56 pacienty, resp. 85 kontrolami [12]. Cílem **publikace č. 1** bylo prokázat na jednom z největších vzorků pacientů z různých zemí, zda míra závislosti na kouření může být považována za nezávislý rizikový faktor při vzniku karcinomu hlavy a krku, který by měl být zohledněn například ve screeningových vyšetření nebo při volbě strategie léčby.
- Nádorové kmenové buňky jsou považovány za jednu z hlavních příčin neúspěchu klasické chemoterapie a relaps nádorového onemocnění [13]. Současně byl prokázán vliv epitel-mezenchymové interakce mezi nádorovými kmenovými buňkami a jejich stromatem [14]. Předpokládá se, že pochopení molekulárních procesů na ose stroma - basální lamina - epitel – přispěje ke zlepšení diagnostických a léčebných prostředků. Cílem **publikace č. 2** bylo bližší poznání interakcí mezi nádorovými kmenovými buňkami a okolním prostředím, které by bylo možné využít k přesnějšímu cílení terapie.
- Jednou z možností, jak zvýšit dávku léčiva a tím i účinnost protinádorového cytostatika při tolerovatelných nežádoucích účincích, je použití jejich makromolekulárních nosičů. Již bylo prokázáno, že některá polymerní léčiva na bázi poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] (HPMA) jsou nejen neimunogenní, ale dokonce mají imunomodulační účinek [15]. Mechanismus stimulace imunitního systému HPMA konjugáty není zatím zcela přesně objasněn, pravděpodobně je způsoben stimulací nádorově specifických T-lymfocytů a NK buněk (tvz. tumor infiltrující lymfocyty - TIL) [16, 17]. Cílem **publikace č. 3** bylo sledování imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí v různých časových odstupech od zahájení léčby HPMA konjugáty, které by mohlo pomoci porozumět mechanismu jejich imunomodulačního účinku.

- Prognostický význam T regulačních lymfocytů u nádorových onemocnění doposud nebyl dosud jednoznačně objasněn. Někteří autoři poukazují na korelaci mezi zvýšeným zastoupením Treg populace v periferní cirkulaci pacientů a jejich akumulace v nádorovém mikroprostředí s horší prognózou u některých typů malignit (u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu ovaria či prsu) [18-20]. Jiné studie však naopak prokázaly zvýšenou hladinu Treg populace u pacientů s lepší prognózou (folikulární a Hodginský lymfom nebo kolorektální karcinom), kde byla vyšší hodnota Treg asociována s delším časem do progrese onemocnění a delším celkovým přežitím [21]. Cílem **publikace č. 4** bylo určení prognostické hodnoty Treg populace a nádorových markerů v periferní krvi pro riziko recidivy u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku.

# Patogeneze nádorových onemocnění

## Vliv kouření a alkoholu na výskyt nádorů hlavy a krku

Maligní nádor je definován schopností rychle tvořit množství abnormálních buněk, které se chovají autonomně a nereagují na inhibiční signály. Dalšími charakteristickými rysy nádorových buněk jsou schopnost dosáhnout výrazně vyššího počtu dělení buněk (aktivitou telomeráz), dediferenciace a ztráta původní funkce, chromozomální nestabilita, schopnost vyhnout se imunitnímu dozoru a především invazivní šíření, kterým se nádorové buňky mohou propagovat do okolních tkání a šířit i do vzdálených tkání či orgánů (metastázování). Právě tvorba metastáz je pak hlavní příčinou většiny úmrtí na nádorová onemocnění. Podle monoklonální teorie začíná maligní transformace v jedné buňce. V té dochází k opakovaným mutacím v regulačních genech, které se podílejí na řízení buněčného cyklu (protoonkogeny, tumor supresorové geny, geny stabilizující genom). Postupnou kumulací mutací dochází k nekontrolovanému množení transformovaných buněk a infiltrace okolních tkání. Změna normální buňky na nádorovou je proces probíhající v několika krocích, typicky se odehrávající v premaligní lézi, která se následně změní na maligní proces [22, 23]. Tato změna je důsledkem interakce mezi genetickými a zevními faktory. Zevní faktory se dělí na tři kategorie: 1) fyzikální karcinogeny (UV záření, ionizující záření), 2) chemické karcinogeny (azbest, složky tabákového dýmu, aflatoxiny, arsen), 3) biologické karcinogeny (virové či bakteriální infekce). Zvláště zevním faktorům by měla být věnována zvýšená pozornost, neboť ty lze eliminovat nejsnáze. Například vyšší incidence spinocelulárního karcinomu hlavy a krku je prokazatelně spojena s kouřením tabáku a zvýšenou konzumací alkoholu [24, 25]. Vliv těchto dvou faktorů se neomezuje pouze na výskyt primárního nádoru, ale ovlivňuje i celou řadu léčebných aspektů, např. výskyt dceřiných nebo duplicitních nádorů, komplikace léčby nebo dobu rekonvalescence po chirurgickém zákroku. V jedné studii bylo prokázáno, že kouření i abúsus alkoholu podporují jak vznik primárního nádoru, tak častější výskyt metastatického rozsevu: v jedné studii byl zaznamenán výskyt metastáz v uzlinách a extrakapsulárního šíření u 100% kouřících pacientů i u bývalých kuřáků, ale jen u 54%, resp. 19% nekuřáků [26]. Vyšší výskyt uzlinových metastáz rovněž koreluje se zvýšenou konzumací alkoholu [27]. Při operativní léčbě těchto nádorů se u kuřáků častěji vyskytují různé komplikace při

hojení ran, podobně jako u jiných chirurgických výkonů [28]. Dvojnásobně až téměř čtyřnásobně vyšší riziko rakoviny hlavy a krku bylo nalezeno i u středně a silně exponovaných pasivních kuřáků [29].

Mechanismus účinků kouření na nádorové bujení v oblasti hlavy a krku není zcela přesně objasněn. Kuřáci jsou mnohem častěji postiženi tumory s mutacemi onkogenu p53 než nekuřáci, což naznačuje, že u kuřáků probíhá proces karcinogeneze jinak než u nekuřáků [30]. Za nejrizikovější karcinogeny obsažené v cigaretovém kouři jsou pokládány polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), N-nitrosaminy a aromatické aminy a těžké kovy [31]. Karcinogeny typu PAU se metabolizují různými biochemickými reakcemi: v první fázi transformace vznikají metabolity s různou biologickou aktivitou. Pokud se katalyticky zapojí cytochromy P450 (u PAU CYP 1A1), dochází k oxidačním reakcím, při nichž mohou vznikat jak méně reaktivní fenoly, tak aktivnější epoxidy a dioly. Tyto látky pak vytvářejí kovalentní vazby s DNA, pokládané za hlavní iniciační krok v patogenezi zhoubného bujení. Vzniklé mutagenní změny jsou sice opravovány v buněčné fázi reparace, tento proces však není dokonalý. Některé DNA addukty mohou perzistovat a být základem chybného kódování (např. s následnou možnou a nežádoucí konverzí baze G-C na bazi A-T). Přetrvávající mutace DNA mohou aktivovat onkogeny (např. třída Ras), nebo naopak inaktivovat tumor supresivní geny (např. p53) [32, 33]. Vedle PAU byl silný karcinogenní potenciál k plicní tkáni prokázán u nitrosaminového derivátu nikotinu NNK (4-metylnitrosamin-1-(3-pyridyl)-1-butanon), jehož zvýšená koncentrace v plicní tkáni korelovala se zvýšeným výskytem adenokarcinomu plic i karcinomem hlavy a krku [34-36]. Navíc při současném trendu poklesu obsahu dehtu a tím i PAU jeho množství v cigaretách stoupá [37].

Mechanismus působení alkoholu na vznik spinocelulárního karcinomu hlavy a krku není zcela jasný. Přímé dráždění sliznice jistě není rozhodující, protože rizikovost konzumace alkoholu nezávisí na koncentraci nápoje, ale na celkovém množství požitého ethylalkoholu. Vliv alkoholu se navíc projevuje i na místech, kde alkohol nepřichází do styku se sliznicí, například v laryngu. Nejvíce se uvažuje o vlivu meziproductů degradace ethanolu acetaldehydu a reaktivních kyslíkových radikálech [38].

## Publikace č.1

Lee YC<sup>1</sup>, Zugna D, Richiardi L, Merletti F, Marron M, Ahrens W, Pohlmann H, Laggiou P, Trichopoulos D, Agudo A, Castellsague X, Betka J, Holcatova I, Kjaerheim K, Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Talamini R, Barzan L, Canova C, Simonato L, Conway DI, McKinney PA, Thomson P, Znaor A, Healy CM, McCartan BE, Boffetta P, Brennan P, Hashibe M. *Smoking addiction and the risk of upper-aerodigestive-tract cancer in a multicenter case-control study*. Int J Cancer, 2013. 133(11):p.2688-95.

V minulosti byla na mnoha studiích prokázána spojitost mezi kouřením a užíváním alkoholu a vznikem spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. Například v multicentrické studii probíhající v 15 evropských státech na téměř 2000 pacientech s karcinomem hlavy a krku bylo zjištěno, že v 73% případů byla pozitivní anamnéza kouření či zvýšená konzumace alkoholu - z toho 29% pacientů byli jen kuřáci, méně než 1% byli pacienti pouze s abúzem alkoholu, 44% pacientů kuřáci se současným abúzem alkoholu [11]. Většina epidemiologických studií zabývajících se problematikou kouření a alkoholu, se v anamnestické části zaměřila na celkové množství a dobu působení těchto rizikových faktorů (počet vykouřených cigaret či množství požitého alkoholu, počet roků aktivního kouření nebo zvýšené konzumace alkoholu) [24]. Současné studie se však zaměřují i na psychickou stránku pacienta - tedy zda stupeň závislosti na tabáku či alkoholu má vliv na vyšší riziko vzniku nádoru. Například Muscat a Matsuo v nezávislých studiích potvrdili vyšší výskyt karcinomu hlavy a krku u pacientů, kteří vykouří svou první cigaretu do 30 minut po ranním probuzení [39, 40].

Jedním z nejčastěji používaných testů ke stanovení závislosti pacienta na nikotinu je Fagerstromův dotazník (obr. 1). Ten hodnotí stupeň pacientovi závislosti na tabáku sérií otázek, které mají zjistit pacientovi denní kuřácké návyky - např. čas první cigarety po probuzení, schopnost vydržet v nekuřáckých prostorech (nemocnice, letadlo) nebo nutnost kouřit i při zhoršení zdravotního stavu. Na základě tohoto dotazníku Deheinzelin prokázal vztah mezi závislostí na tabáku a vyšším výskytem maligních onemocnění, nicméně tato epidemiologická studie probíhala bez rozlišení lokality nádorového onemocnění a pouze s 56 pacienty, resp. 85 kontrolami [12].

	Point(s)
1. How many cigarettes do you smoke per day?	
a) 10 or less	0
b) 11 – 20	1
c) 21 – 30	2
d) 31 or more	3
2. How soon after you wake up do you smoke your first cigarette?	
a) 0 – 5 min	3
b) 30 min	2
c) 31 – 60 min	1
d) After 60 min	0
3. Do you find it difficult to refrain from smoking in places where smoking is not allowed (e.g. hospitals, government offices, cinemas, libraries etc)?	
a) Yes	1
b) No	0
4. Do you smoke more during the first hours after waking than during the rest of the day?	
a) Yes	1
b) No	0
5. Which cigarette would you be the most unwilling to give up?	
a) First in the morning	1
b) Any of the others	0
6. Do you smoke even when you are very ill?	
a) Yes	1
b) No	0

Total Point(s): \_\_\_\_\_

TOTAL SCORE	LEVEL OF DEPENDENCE
0 – 3 points	Low
4 – 6 points	Medium
7 – 10 points	High

Obr. 1 Fagerstromův dotazník závislosti na tabáku [41].

Prezentovaná mezinárodní studie probíhala ve specializovaných onkologických centrech ve 14 evropských zemích a zahrnovala 1586 pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku a 1260 kontrol. Soubor byl tvořen současnými i bývalými kuřáky, stupeň závislosti na tabáku byl určen na základě Fagerstromova dotazníku. Cílem této práce bylo prokázat na jednom z největších vzorků pacientů z různých zemí, zda míra závislosti na kouření může být považována za nezávislý rizikový faktor při vzniku karcinomu hlavy a krku, který by měl být zohledněn například ve screeningových vyšetřeních nebo při volbě strategie léčby.



V této práci byla prokázána signifikantní korelace mezi závislostí pacientů na tabáku a incidencí karcinomu hlavy a krku. Bylo zjištěno, že pacienti s vyšším stupněm závislosti mají 3,83x vyšší riziko výskytu rakoviny hlavy a krku než pacienti s nízkou či žádnou závislostí. Obzvláště rizikovým faktorem se zdá být dřívější doba vykouření první ranní cigarety - člověk, který vykouří svou první cigaretu do 60 minut od probuzení, má 2,22x vyšší riziko výskytu karcinomu hlavy a krku. Nicméně u další sledovaných faktorů jako neschopnost vydržet v nekuřáckých prostorech nebyl vliv na výskyt nádoru prokázán. Překvapivým zjištěním ale bylo, že u pacientů s vysokou závislostí na nikotinu nezáleží na množství vykouřených cigaret, toto riziko je přibližně stejně vysoké pro pacienty kouřící do 10 cigaret denně jako pro pacienty kouřící více než 20 cigaret za den. Nelze tedy odhadovat nebezpečí vzniku malignity jen na základě počtu vykouřených cigaret. Dalším zajímavým poznatkem bylo zjištění, že riziko vzniku nádoru hlavy a krku u pacientů, kteří přestali kouřit, je stejné jako u nekuřáků, a to i když dříve byli vysoce závislí na nikotinu.

Tyto poznatky by mohly pomoci rozšířit anamnestické preventivní dotazníky pacientů - kuřáků, kde údaj o počtu vykouřených cigaret denně a let kouření by měl být doplněn o stupeň závislosti na nikotinu (stanovený například právě Fagerstromovým testem). To by výrazně pomohlo vybrat z kuřáků rizikové pacienty z hlediska výskytu rakoviny hlavy a krku, kteří by pak mohli být zařazeni do screeningových programů s cílem brzké diagnostiky a tedy výrazně vyšší šancí na vyléčení. Stanovení závislosti na tabáku by bylo přínosem i u již léčených pacientů, například z hlediska stanovení častějších dispenzárních kontrol u vysoce závislých jedinců pro výrazně vyšší riziko recidivy či vzniku duplicitního nádoru. Nezanedbatelný je i ekonomický přínos - léčba raných stádií nádorového onemocnění je finančně výrazně levnější než u pacientů v pokročilých stádiích onemocnění, kde je často nutno kombinovat různé léčebné metody (chirurgie, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie). Dalším pozitivním závěrem této práce je, že riziko bývalých kuřáků se snižuje bez ohledu na předchozí stupeň závislosti. Tento fakt lze využít jako pozitivní motivaci pro pacienta při odvykání kouření.

## **Vliv virových agens na výskyt nádorů hlavy a krku**

Některé nádory vznikají v souvislosti s infekcí (ať již na podkladě přímého působení infektu či na podkladě infektem indukovaného chronického zánětu či oslabení imunitního systému), příkladů je zaznamenáno hojně: Human Papilloma Virus (HPV) a nádory čípku děložního nebo nádory v oblasti orofaryngu; virus Epstein-Barrové (EBV) a nádory nasofaryngu a B-buněčné lymfomy typu Hodgkinova lymfomu; virus hepatitidy B a hepatocelulární karcinom; human immunodeficiency virus (HIV) v kombinaci s lidským Herpes virem 8 (HHV 8) a Kaposiho sarkomem; Helicobacter pylori a nádory žaludku a lymfomy (MALT) [42-46]. Zajímavé je, že některé nádory třebaže stejného histopatologické typu a vznikající ve stejné lokalitě, mají odlišné biologické chování právě v závislosti na vyvolávající příčině. Příkladem může být dlaždicobuněčný karcinom orofaryngu, který byl dříve typicky spojen s vyšším věkem a anamnézou dlouhodobého kouření. V poslední době však sledujeme nárůst incidence tohoto nádoru u mužů i žen nekuřáků a v mladších věkových skupinách [47, 48]. V těchto nádorech je prokázána HPV infekce (především podtyp HPV 16) [49]. Jeho častější výskyt je spojován se změnami sexuálních praktik v posledních letech a tím častějším přenosem viru do orofaryngeální oblasti [50]. HPV asociované nádory se svými molekulárními charakteristikami výrazně liší od HPV negativních tumorů. U většiny spinocelulárních karcinomů hlavy a krku je prokázána dysfunkce jednoho z nejznámějších onkosupresorových proteinů p53 [51]. Zatímco u HPV negativních je ve více než 50% podmíněna mutací genu, u HPV pozitivních je naopak p53 vázán virovým onkoproteinem E6 a tím je spuštěna jeho degradace [44, 52]. Oba tyto nádory vykazují také odlišné biologické chování. Pacienti s HPV pozitivními nádory, přestože mají častěji regionální metastatické postižení lymfatických uzlin, lépe odpovídají na chemoterapii a radioterapii a navíc vykazují aktivaci imunitního systému proti HPV antigenům. Mají proto lepší prognózu než pacienti s HPV negativními tumory [53, 54]. Biologická podstata těchto rozdílů však zatím není jasná a je předmětem dalšího výzkumu.

## Role tzv. nádorových kmenových buněk

Na konci 20. století byla u některých nádorů (u hematologických malignit Johnem Dickem v roce 1994 [55], u nádoru prsu Michaelem Clarkem v roce 2001 [56]) identifikována skupina nádorových buněk označovaných jako tzv. *kmenové nádorové buňky* (cancer stem cells - CSC). Ty vykazovaly některé vlastnosti jak specificky nádorových tak i zdravých kmenových buněk. Původ nádorových kmenových buněk nebyl dosud zcela přesně objasněn. Jedna teorie předpokládá nádorovou transformaci zdravých kmenových buněk, což bylo potvrzeno především u hematologických malignit, ale i u střečních dysplázií [57, 58]. Druhá teorie naopak pracuje s hypotézou transformace diferencované buňky v nádorovou kmenovou buňku, která byla popsána u některých typů leukémií, kde zdrojem CSC není hematopoetická kmenová buňka, nýbrž některý z pokročilých stupňů progenitorové buňky [59]. Charakterizace nádorových kmenových buněk je založena na těchto schopnostech: sebeobnova, iniciace a potenciace nádorového růstu, diseminace z tkáně tumoru do krevního řečiště a také zvýšená schopnost odolávat radiačnímu záření a některým chemoterapeutikům. Tyto vlastnosti naznačují, že CSC mohou být hlavní buněčnou podskupinou zodpovědnou za nádorový růst a metastazování při selhání konvenční chemoterapie [13, 60]. Mechanismů, pomocí kterých jsou tyto buňky schopné potlačit cytostatické účinky protinádorových léčiv, je více. Často bývá zmiňována schopnost urychleného efluxu léčiva z buňky pomocí zvýšené exprese ABC transportérů (ABC B1, ABC C1 a ABC G2) ze skupiny multi-drug resistance (MDR) genů [61]. Této vlastnosti se používá i při identifikaci CSC jako tzv. side population (SP) na základě efluxu cytotoxického barviva Hoechst 33342 [62]. Další vlastností, která brání většímu protinádorovému účinku na CSC, je udržení nízkého proliferačního indexu a metabolického potenciálu [63]. K tomu napomáhá i interakce CSC s okolním prostředím, které je označováno jako hnízdo - *niche* [64, 65], které podporuje nádorový růst i invazi do okolí. Předpokládá se obdobná struktura *niche* jako u normálních kmenových buněk, tedy soustava stromálních fibroblastů, doplněných o imunokompetentní buňky, síť kapilár, extracelulární matrix a řadu signálních molekul. U dlaždicobuněčných nádorů, kam patří i spinocelulární karcinom hlavy a krku nádorů, probíhá komunikace mezi nádorem a stromatem i na základě *epitelo-mezenchymové interakce* (EMI), tedy parakrinní komunikace mezi odlišnými buněčnými typy [14, 66]. Tato vzájemná podpora nádorových a stromálních buněk

byla prokázána i experimentálně: indukce karcinomu prsu u myši byla jasně vyšší v případě implantace nádorových buněk společně s buňkami stromatu než v případě, že byly implantovány jen samotné nádorové buňky [67]. Dále byla prokázána vyšší nádorová rekurence v případech, kdy byl odstraněn pouze nádor, ale ponechána stromální buněčná komponenta [68]. Tyto příklady dokazují, že při léčbě malignit a snížení rizika recidivy je nutné se zaměřit nejen na samotný nádor ale i na jeho blízké okolí.

## Publikace č.2

Fík Z, Dvořánková B, Kodet O, Bouček J, Betka J.A., Betka J, André S, Gabius HJ, Šnajdr P, Smetana K Jr., Chovanec M. *Towards dissecting molecular routes of intercellular communication in the tumour microenvironment: phenotypic plasticity of stem cell-associated markers in coculture (carcinoma cell/fibroblast) systems.* *Fol Biol.* 2014; v tisku

Nádorové kmenové buňky jsou považovány za jednu z hlavních příčin neúspěchu klasické chemoterapie a relaps nádorového onemocnění. Současně byl prokázán vliv epitel-mezenchymové interakce mezi nádorovými kmenovými buňkami a jejich stromatem. Cílem práce bylo bližší poznání interakcí mezi CSC a okolním prostředím, které by bylo možné využít k přesnějšímu cílení terapie. V experimentu byly použity buněčné kultury samotné linie FaDu (spinocelulární karcinom hypofaryngu), linie FaDu kultivované společně s fibroblasty a linie FaDu kultivované s fibroblasty v insertním systému s vyloučením mezibuněčných spojů. Imunohistochemicky jsme prokazovali vybrané potenciální znaky CSC a nízké diferenciací tkání (CD29, CD44, K-8, K-19, jaderný Gal-1-BS). Z hlediska morfologie bylo zaznamenáno výrazné zvýšení počtu buněčných kolonií v případě současné kultivace linie FaDu společně s fibroblasty ve srovnání s izolovanou linií FaDu, tento rozdíl se ještě zvyšoval s rostoucím časem kultivace. Buňky podobné fibroblastům (považované za nízké diferencované/prekurzorové buňky) se nacházely na periferii kolonií a v případě linie FaDu se jejich zastoupení s prodlužující se délkou kultivace snižovalo, avšak při kultivaci s fibroblasty byla jejich denzita významně zvýšena. Při studiu možných CSC antigenů (CD29, CD44, K-8, K-19, jaderný Gal-1-BS) byly tyto znaky v případě samotné linie FaDu patrné pouze na začátku kultivace a jejich exprese se snižovala v čase. Naopak u linie FaDu s fibroblasty bylo v pozdějších fázích zastoupení buněk s CSC pozitivními antigeny významně vyšší, současně byly tyto buňky pozorovány na periferii kolonií v kontaktu s okolními fibroblasty. Nepřímá kultivace nepřinesla rozdíl ve velikosti a charakteru kolonií ve srovnání s přímou kultivací. Na rozdíl od přímé kultivace se ale buňky s pozitivními CSC antigeny nacházely i v centru kolonií.

Tato práce prokázala klíčovou úlohu epitelu-mezenchymové interakce v procesu karcinogeneze. Již v dřívějších pracích kolektivu z Anatomického ústavu 1. LF UK bylo potvrzeno, že vzájemná komunikace mezi stromatem a epitelem probíhá oběma směry nejen na podkladě mezibuněčných kontaktů, ale též za pomoci parakrinní signalizace [69]. V jiné publikaci stejného pracoviště byly klíčovými složkami parakrinní signalizace určeny interleukiny IL-6, IL-8 a chemokin CXCL-1, které v této kombinaci významně snižovaly diferenciaci keratinocytů [70]. Naše studie epitelu-mesenchymové komunikace potvrdila význam prostředí a délky vzájemného působení na konzervaci určitého *poolu* nádorových buněk ve stádiu blízkému kmenovému. Tato schopnost může být jednou z příčin nádorové resistance vůči iradiaci a systémové léčbě a předpokládá tak nutnost komplexního zásahu do nádorového prostředí spolu s cílenou eliminací CSC [71]. Zároveň ukázala jednu z možných cest k definici této zatím málo známé subpopulace.

## Diagnostické metody používané při odhalování nádorů

K diagnostice nádorového onemocnění slouží řada metod. Zásadní roli v minulosti sehrály a v současné době stále hrají zobrazovací metody. V první polovině minulého století se zdokonalovalo rentgenové vyšetření použitím nových kontrastních látek. Tato metoda však od 70. let 20. století byla nahrazována počítačovou tomografií a poté magnetickou rezonancí, které poskytují přesnější představu o celkovém rozsahu onemocnění. Také další neinvazivní metoda - ultrasonografie znamenala další zlepšení diagnostiky tumorů, především u parenchymatózních orgánů. Tato metoda je navíc často doplňována invazivní biopsií, která rychle, šetrně a s minimálním rizikem umožní odběr buněčného materiálu z léze podezřelé z maligní infiltrace a její následné cytologické vyšetření. Současně se k diagnostice začalo využívat i radioaktivního záření pocházejícího z radionuklidů (scintigrafie), které umožnilo přesnější diagnostiku diseminace onemocnění včetně kostního postižení nebo lymfatických uzlin [72]. Významným obohacením diagnostických možností byla také pozitronová emisní tomografie, jež umožňuje zobrazit metabolické a biochemické procesy v jednotlivých tkáních a orgánech. Proto je tato metoda přínosná především pro přesnější určení pokročilosti onemocnění, při pátrání po primárním nádorovém ložisku nebo při stanovení prognózy nemocných [73].

V oblasti biochemického vyšetření se zatím nepodařilo nalézt jednotný specifický test k odhalení zhoubného bujení. Pro určité druhy nádorů mohou být diagnosticky cenné některé antigeny, enzymy nebo hormony, které souhrnně označujeme jako nádorové markery. Ty mohou být přítomny přímo ve tkáni nádoru nebo jsou nádorem produkovány, popř. jsou produkovány hostitelem jako odpověď na přítomnost maligního onemocnění [74, 75].

### Příklady využívaných nádorových markerů:

**1. CEA (karcinoembryonální antigen)** je onkofetální glykoprotein. Za fyziologických podmínek je CEA produkován hlavně střevem, pankreatem a játry vyvíjejícího se embrya, a to zejména během prvních dvou trimestrů těhotenství. V dospělosti je omezeně syntetizován epitelíálními buňkami střevní sliznice, žaludku, bronchů a během kojení mléčnou žlázou. CEA patří do imunoglobulinové super rodiny; podílí se

pravděpodobně na procesu adheze a metastazování buněk. Je produkován karcinomy zažívacího traktu, pankreatu, plic, mléčné žlázy a dalšími.

**2. CA 19-9** se vyskytuje jako glykolipid ve tkáni nebo mucin v séru. Obsahuje determinanty lidské krevní skupiny Lewis. Kolem 5-10 % populace tento antigen netvoří. Je ve zvýšeném množství přítomen u karcinomu pankreatu, kolorektálního karcinomu a u dalších nádorů gastrointestinálního traktu.

**3. AFP ( $\alpha$ -1-fetoprotein)** je onkofetální glykoprotein, produkováný v embryonálním žloutkovém vaku a ve fetálních játrech. V dospělém zdravém organismu je syntéza AFP omezena na minimum a nahrazena albuminem. V séru matky, kam přechází přes placentu, je důležitým ukazatelem fyziologického vývoje těhotenství. Významná je především jeho role transportní (vazba steroidů, některých těžkých kovů, bilirubinu, mastných kyselin, retinoidů, drog, antibiotik apod.). V onkologii se využívá jako nádorový marker u hepatocelulárního karcinomu nebo u germinativních nádorů varlat (nonseminomy). Zvýšenou hladinu lze prokázat i u nádorů žaludku a pankreatu.

**4. hCG (lidský choriový gonadotropin)** je glykoprotein tvořený 2 podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$  ze skupiny gonadotropinů, biologickou specificitu podmiňuje především beta-podjednotka. Zpočátku je hCG produkován buňkami trofoblastu a v prvních 6 týdnech gravidity je nutný k udržení činnosti corpus luteum, které zajišťuje produkci progesteronu a estrogeneru, než dojde k plné produkci těchto hormonů placentou. Zvýšené hladiny v séru nacházíme tedy v těhotenství, dále při myomech a u ovariálních cyst, ale i u choriokarcinomu a nádorů testes.

**5. CA 15-3** je antigen polymorfního epiteliálního mucinu, nazývaný rovněž MUC1. V dospělosti je syntetizován v epiteliálních buňkách vývodů mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů. Je užíván pro monitorování průběhu progresu a účinnosti léčby u karcinomu prsu.

**6. PSA (prostatický specifický antigen), fPSA (volná frakce PSA).** PSA je serinová proteináza umožňující zkapalnění seminální tekutiny, čímž usnadňuje pohyb spermií. Je využíván ve screeningu karcinomu prostaty, pro odlišení benigní hyperplasie od



karcinomu se stanovuje poměr volného a celkového PSA. Přetrvávající zvýšené koncentrace v séru po radikální prostatektomii znamenají buď nádorovou persistenci či lokální rekurenci. Monitorování má význam rovněž při terapii - pokles PSA obvykle koreluje s délkou přežití.

**7. CA 72-4**, epitop mucinu, užívá se k monitorování průběhu onemocnění především u karcinomu žaludku, jícnu a ovaria.

**8. S-100 beta**, je vhodný pro monitorování nemocných s maligním melanomem. Pozitivní hodnoty lze nalézt i u mozkových maligních nádorů ektodermálního původu.

**9. CYFRA 21-1**, využívá se především při monitorování průběhu onemocnění a při monitorovací úspěšnosti terapie u epidermoidních karcinomů plic, význam má rovněž pro sledování nemocných s karcinomem močového měchýře, u epidermoidních nádorů děložního hrdla a u nádorů oblasti hlavy a krku.

Protože však z hlediska primární diagnostiky nemá většina nádorových markerů dostatečnou specifitu (často bývají falešně pozitivní u akutních virových i chronických hepatitid, jaterních cirhóz nebo chronických zánětů gastrointestinálního traktu), slouží vyšetřování těchto parametrů zejména pro monitorování progresu choroby a efektivity terapie, pro časnou diagnózu relapsu choroby a k diferenciální diagnostice neznámého primárního tumoru. Pro screening a časný záchyt malignit jsou však využívány jen sporadicky [76]. V poslední době se jako nádorové markery začínají uplatňovat i některé genetické abnormality a to především pro specifikaci abnormality nádorových buněk, která může pomoci určit způsob léčby. Sleduje se např. přímá detekce mutací v DNA, proteinové produkty onkogenů (např. c-myc, c-fos, k-ras, src), změny v jejich posttranslačních modifikacích v maligní tkáni, nově vzniklé genetické změny v maligní buňce (např. chromosomální rearrangement bcr-abl) nebo detekce mutací v tumor supresorových genech (BRCA1, BRCA2, p53) [77, 78]. V současnosti je například jako marker prognózy a agresivity karcinomu prsu sledována zvýšená exprese transmembránového tyrosinkinázového receptoru Her2/neu. Ta je pozorována i u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, kde je spojena s kratší dobou do relapsu i kratším celkovým přežitím a exprese Her2/neu je zde potvrzena i jako nezávislý prognostický faktor [79, 80].

## **Možnosti léčby maligních onemocnění**

K léčbě nádorových onemocnění existuje několik druhů odlišných metod. Nejčastěji se používá chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. V klinické praxi se tyto metody samozřejmě vhodně kombinují tak, aby přinesly co největší léčebný efekt.

### **Chirurgická léčba**

Chirurgická léčba byla prakticky jedinou léčebnou metodou od starověku až do počátku 20. století, kdy byla postupně doplňována ozařováním. I dnes náleží chirurgické léčbě významné místo, zvláště pro léčbu solidních nádorů je stále často metodou první volby, i když se dnes prakticky u všech pokročilejších nálezů kombinuje s dalšími metodami, zejména s radioterapií nebo s chemoterapií. Její význam byl posílen zdokonalením operační techniky, která se dále rozvíjí i dnes, například využitím robotické operativy [81, 82]. Limitem chirurgické léčby však stále zůstává lokální rozsah onemocnění bez postižení pro život důležitých struktur (velké cévy, CNS). Svůj význam má i chirurgie paliativní, založená na cytoredukci nádorové masy, která zmírňuje pacientovi obtíže. Nověji se v onkologii stále více uplatňuje i chirurgie rekonstrukční, která umožňuje upravit i velké defekty způsobené radikální protinádorovou léčbou, například náhrada defektu spodiny dutiny ústní pomocí volného muskulokutánního laloku z předloktí [83].

### **Radioterapie**

Radioterapie pro léčbu rakoviny byla poprvé využita v roce 1930 Henrim Coutardem, který aplikací frakcionovaného záření dosáhl pětileté remise u značného množství pacientů s nádory dutiny ústní, hltanu a hrtanu. Později tato léčba nabyla na významu technickým pokrokem se zavedením vysokoenergetických zdrojů záření, které umožnily dosáhnout lepších léčebných výsledků. K vyššímu úspěchu radioterapie přispěly i nové způsoby plánování léčby, využívající počítačové techniky, simulátorů a zpřesnění dozimetrie. Moderní radioterapeutická technika zevního záření ve většině případů nahradila použití radionuklidů v intersticiální a intrakavitální brachyterapii, a tak aplikace zářiče přímo do tkáně nebo do tělní dutiny je dnes vyhrazena pro specifické případy, mezi které patří např. nádory pochvy, dělohy, žlučových cest či štítné žlázy. K účinné kurativní nebo paliativní léčbě většiny

nádorových onemocnění je zapotřebí vysokoenergetických zdrojů záření, které umožní podat vysokou dávku záření do nádorové tkáně uložené v hloubce, a to při podstatném omezení rizika poškození zdravých tkání. Pro ozařování bylo původně využíváno radium, v roce 1951 Harold E. Johns poprvé využil radioizotop kobaltu. Od 70. let 20. století byl kobalt nahrazován urychlovači částic (betatron, lineární urychlovače, kolimační systémy), které umožňují při vlastním ozařování co nejlépe sledovat tvar nádorového ložiska. Radioterapie se také začala podávat frakcionovaně, kdy ozařování je prováděno po jednotlivých dílčích dávkách, a to buď ve vyšších dávkách podaných méně často či naopak v malých dávkách aplikovaných několikrát denně [84]. Citlivost nádorové tkáně k ozáření lze zvýšit i fyzikálními vlivy (hypertermií, účinkem hyperbaroxie) či farmakologicky (podáním některých cytostatik). Další pokrok v radioterapii přineslo využití stereotaktické radiochirurgie založené na aplikaci malé dávky záření z mnoha zdrojů (Leksellův gama nůž, CyberKnife), které umožňuje velmi přesné podání dávky s minimálním poškozením okolní tkáně. Své využití nachází především u obtížně dosažitelných nádorů hlavy (například vestibulární schwannom nebo meningeom) [85]. Od 90. let minulého století byla do praxe zaváděna protonová terapie. Její princip spočívá v urychlení protonů v cyklotronu na polovinu rychlosti světla, jejich následné usměrnění do úzkého paprsku a přenesení do nádoru. Při zbrzdění v nádorové tkáni dojde k uvolnění energie, k ionizaci a poškození DNA a následné smrti zasažené buňky. V současné době je v ČR indikována pouze u specifických případů, nejčastěji u zhoubných nádorů oka, CNS, baze lební nebo prostaty [86]. Překážkou pro širší využití této modalitě zůstávají především vysoké pořizovací i provozní náklady [87].

## **Chemoterapie**

Počátky novodobé protinádorové chemoterapie na základě inhibice proliferace nádorových buněk mohou být nalezeny v 1. polovině 20. století, kdy byla pozorována hypoplasie lymfoidních a myeloidních buněk u jednoho z námořníků vystavených účinkům bojového plynu Yperit za 1. světové války. V roce 1959 Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) schválil k léčbě rakoviny cytostatikum cyklofosamid, které brzy získalo široké klinické využití a hojně se užívá dodnes. Obecným mechanismem účinku toho preparátu je alkylace s tvorbou zkřížených vazeb vedoucí k narušení buněčného cyklu. Jeho imunosupresivní účinek se využívá

i v léčbě autoimunitních onemocnění. Pro další vývoj cytostatik byl významný objev esenciální úlohy kyseliny listové v metabolismu DNA. V 50. letech 20. století Sidney Farber popsal léčivo metotrexát, které jako antagonist folátu má schopnost inhibice nádorového bujení a zpomalení progresu nemoci. Později bylo popsáno, že metotrexát zasahuje do biosyntézy DNA, při které blokuje enzym dihydrofolátreduktasu, který je zodpovědný za redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát. Následně byly objeveny a postupně zavedeny do praxe analogy purinů (merkaptopurin) a pyrimidinů (5-fluorouracil) inhibující syntézu DNA a RNA. V roce 1963 byla publikována společností Eli Lilly obsáhlá práce o více jak 30 alkaloidech, z nichž některé (např. vinblastin, vinleurosine, vinkristin) vykazovaly protinádorovou aktivitu. Jejich mechanismus účinku je založen na vazbě alkaloidu na tubulin dělicího vřeténka. Tato vazba blokuje schopnost polymerace, tím inhibuje mitózu během metafáze buněčného cyklu a nasměruje buňku k apoptóze (tzv. mitotická katastrofa). Navíc tyto preparáty ovlivňují i další buněčné systémy jako je syntéza RNA a DNA, lipidová biosyntéza a kalmodulindependentní  $Ca^{2+}$  transportní ATPasa. Obdobné působení vykazuje i později objevená skupina taxanů (paclitaxel, docetaxel). Na rozdíl od alkaloidů však taxany inhibují depolymeraci mikrotubulů dělicího vřeténka (stabilizují již vytvořené mikrotubuly a urychlují stavbu nových). Od 60. let se také začala do praxe dostávat skupina platinových antineoplastik (cisplatina, později karboplatina a oxaliplatina), které využívají schopnosti vázat se na DNA za vzniku interkalačních vazeb znemožňujících replikační a reparační pochody. V letech 1966 a 1967 byla syntetizována cytostatika etoposid a teniposid, patřící mezi epipodofylotoxiny, které jsou dodnes široce využívanými inhibitory DNA topoisomerasy II bránící štěpení vláken DNA při replikaci. Další nepostradatelnou skupinou chemoterapeutik jsou antracyklinová antibiotika. Jejich hlavní účinek spočívá v interkalaci antracyklinové části do DNA, chelaci kovových iontů a v inhibici topoizomerasy II při replikaci. Nejvýznamnějším představitelem této skupiny je doxorubicin, širokospektré antracyklinové antibiotikum, které je od 60. let 20. století využíváno v léčbě solidních tumorů i hematologických malignit. Další zástupci daunorubicin a idarubicin se používají k léčbě akutní myeloidní leukemie. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem antracyklinových ATB je jejich kardiotoxicita, ta je však u nových léčiv této skupiny (amrubicin) již značně snížena [88]. Cytostatická terapie nádorových onemocnění dosáhla největšího rozvoje v 70. letech minulého

století. Z původně doplňkové metody se stala jednou z metod základních. U některých nádorových onemocnění je možné touto metodou dosáhnout i vyléčení. Léčebné výsledky posílila i kombinace chemoterapie s dalšími léčebnými metodami, hlavně chirurgickými a radioterapeutickými [89-91].

## Nežádoucí účinky chemoterapie

Chemoterapie má neselektivní účinek, a proto vždy v určité míře poškozuje i zdravé tkáně. Zde je popsána toxicita cytostatik podle poškození cílové tkáně [91-94].

- **Hematologická** - myelosupresivní účinek cytostatik se projeví leukopenií, neutropenií a trombocytopenií nebo i anemií. Celkový stav může vyústit až do diseminované intravaskulární koagulace či jiných krvácivých poruch.
- **Gastrointestinální** - častý jevem po podání cytostatika je nauzea a zvracení, mukositida z inhibice proliferace epitelálních buněk a funkční poruchy střevní pasáže. U pacientů se současným jaterním onemocněním může dojít k akutnímu poškození jaterní tkáně.
- **Kardiální** - projeví se poruchami srdečního rytmu, ischemií až srdečním selháním.
- **Plicní** - změny v plicní tkáni mohou být charakteru pneumonie nebo intersticiální plicní fibrózy, výjimečně edému plic.
- **Nefro a urogení** - poškození ledvin vzniká nejčastěji precipitací cytostatika v tubulech nebo nekrózou distálních tubulů. Při rychlém rozpadu tumoru krystalizovaná kyselina močová blokuje tubuly a způsobuje urátovou nefropatii.
- **Neurogení** - jsou popisovány neuropatie s paresteziemi končetin, s dysfunkcí močového měchýře či hlavových nervů. Intratekální aplikace cytostatik může způsobit meningeální dráždění nebo vznik encefalopatie.
- **Poškození kůže a kožních adnex** - charakteristické jsou změny pigmentace, především alopecie po některých cytostatikách.
- **Poškození sluchového a vestibulárního aparátu** - poškození vláskových buněk Cortiho orgánu s poruchou sluchu i rovnovážného ústrojí je popisováno nejčastěji po léčbě platinovými deriváty.

- **Infekční komplikace** - nejčastěji se jedná o bakteriální infekce, vyskytují se hlavně u hematologických malignit.
- **Nespecifická** - poruchy imunity, mutagenní a kancerogenní účinky zvyšují riziko vzniku sekundárních zhoubných nádorů, převážně se jedná o hematologické malignity nejčastěji popisované po léčbě alkylačními cytostatiky.

## Cílená protinádorová terapie

Širšímu uplatnění klasické chemoterapie u většího spektra nádorových onemocnění tedy brání její značná toxicita, která často neumožňuje aplikaci dostatečně vysokých dávek cytostatik potřebných ke zničení všech nádorových buněk. Koncem 80. let 20. století molekulární a genetické přístupy pomohly lepšímu porozumění buněčné biologie a umožnily tak objev signálních sítí regulujících proliferaci a přežívání buněk. Bylo odhaleno, že tyto signální dráhy jsou značným způsobem změněny v nádorových buňkách [95]. Tento přelom v buněčné biologii předznamenal vzestup nového přístupu v protinádorové chemoterapii – cílenou léčbu. Ta je zaměřena na ovlivnění buněčného cyklu, neoangiogeneze nebo na stimulaci imunitního systému. Na rozdíl od klasických cytostatik tak nepoškozuje genetickou informaci buňky, ale zasahuje v oblasti proteinů s regulačními a signálními účinky [96]. Spektrum modalit cílené terapie je mimořádně široké. Zahrnuje inhibici růstových faktorů, inhibici membránových a cytoplazmatických receptorů, inhibici transdukční kaskády blokadou různých tyrosinkináz, inhibici regulačních proteinů buněčného cyklu, inhibici angiogeneze a metastazování nebo indukci apoptózy a diferenciací [97, 98]. Jiný směr výzkumu cílené terapie je zaměřen na přenos cytostatika v inaktivní formě přímo do místa nádoru. V experimentální i klinické praxi byla největší pozornost zaměřena na polymerní léčiva a monoklonální protilátky [99]. Monoklonální protilátky jsou produktem jediného klonu B lymfocytů; jsou naprosto homogenní a reagují proti stejným antigenním determinantám. Uměle připravené monoklonální protilátky jsou produktem B lymfocytárních hybridomů, vznikajících indukovanou fúzí jednoho B lymfocytu a jedné buňky připravených myelomů [100]. Tím dosahují schopnosti produkovat specifické protilátky (od B lymfocytů) i schopnosti trvalého růstu (od buněk myelomu) [101]. Příprava prvního hybridomu a celé hybridomové technologie byla poprvé popsána v roce 1975 Milsteinem a Köhlerem, kterým za to byla v roce 1984 udělena Nobelova cena. První monoklonální protilátkou pro klinické využití byl rituximab (Mabthera), chimérická myší-lidská monoklonální protilátka IgG1- $\kappa$  proti antigenu CD20, která se v roce 1997 stala první látkou tohoto druhu schválenou k použití v klinické praxi k terapii maligních onemocnění (B-NHL) [102]. V současnosti je do klinické praxe zaveden větší počet monoklonálních protilátek a několik desítek nově připravených je předmětem klinického testování [103]. Používají se protilátky čistě myší, chimerické, humanizované nebo čistě lidské.

Jejich názvosloví respektuje původ protilátky. Čistě myší protilátky se označují koncovkou –momab, chimérické koncovkou –ximab, humanizované koncovkou –zumab a čistě lidské koncovkou –mumab. Většina z nich je směřována proti povrchovým znakům nádorových buněk. Vazba protilátky na buňky exprimující příslušný povrchový antigen usnadní rozpoznání buňky imunologickými protinádorovými mechanismy (cytotoxickými NK buňkami, makrofágy). Tyto efektorové buňky pak ničí nádorové buňky, jde tedy o buněčnou cytotoxicitu zprostředkovanou protilátkami, tzv. ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity). Důležitá vlastnost těchto protilátek je i aktivace komplementu neboli CDC (complement dependent cytotoxicity) [104]. V jiných případech jsou protilátky cíleny na iniciální etapu transdukční kaskády, nejčastěji proti růstovým faktorům nebo proti extracelulární doméně membránových receptorů. Ty způsobují inhibici proliferace nádorových buněk zablokováním prorůstových signálů zprostředkovaných receptory s vnitřní tyrozinkinázovou aktivitou, které přenášejí mitogenní signály růstových faktorů [105]. Monoklonální protilátky se uplatňují jak v léčbě hematogenních tak i solidních nádorů, většinou jako doplňková léčba klasické chemoterapie nebo ozařování [106].

## **Příklady užívaných monoklonálních protilátek:**

### **1. monoklonální protilátky proti povrchovým znakům nádorů**

- *Rituximab* (Mabthera, Rituxan) – chimerická monoklonální protilátka anti-CD20, užívá se k léčbě nonhodgkinovských lymfomů (B-NHL) a chronické myeloidní leukemie.
- *Alemtuzumab* (MabCampath, Campath) – humanizovaná IgG1-κ lidská protilátka proti povrchovému glykoproteinu CD52, používána u pacientů s chronickou B-lymfocytární leukémií (B-CLL) nebo u T-prolymfocytární leukémie.
- *Gemtuzumab ozogamicin* (Mylotarg) - humanizovaná rekombinantní anti-CD33 protilátka spojenou s potentním antitumorózním antibiotikem kalicheamicinem, je užívána pro léčbu relapsu leukémie při selhání klasické chemoterapie.
- *Ofatumumab* (Arzerra) - čistě lidská IgG1 monoklonální protilátka anti-CD20, užívá se v léčbě CLL a B-NHL v relapsu.



- *Ibritumomab tiuxetan* (Zevalin) - myší IgG1 monoklonální protilátka anti-CD20 konjugovaná s radionuklidem (Yttrium <sup>90</sup>Yt), používá se i v ČR k léčbě NHL.
  - *Galiximab* (Primatized) - chimerická makak-lidská IgG1 monoklonální protilátka anti-CD80, jež se osvědčila v léčbě relabujících a rezistentních forem B-NHL (zejména u folikulárního lymfomu) i u relabujícího Hodgkinova lymfomu.
- Atlizumab* - protilátka proti receptoru pro IL-6, užívá se pro léčbu Castelmannovy choroby a mnohočetného myelomu.

## 2. monoklonální protilátky s přímým účinkem na transdukční kaskádu a apoptózu

- *Cetuximab* (Erbix) - rekombinantní chimerická protilátka cílená proti extracelulární doméně receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR/ErbB1/HER1), klinicky se užívá v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu, lokálně pokročilých forem spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, testuje se u nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu pankreatu a dalších EGFR pozitivních nádorů, často v kombinaci s cytostatiky.
- *Trastuzumab* (Herceptin) - humanizovaná rekombinantní protilátka proti receptoru ERBB2/HER-2/NEU, užívá se v terapii metastatického karcinomu prsu a to jak v monoterapii tak v kombinaci s taxany.
- *Bevacizumab* (Avastin) - neutralizační humanizovaná monoklonální protilátka proti endoteliálnímu růstovému faktoru VEGF, brání angioinvasi, užívá se u řady solidních nádorů (metastazující karcinom kolorekta, ledvin, prsu, metastazující nemalobuněčný karcinom plic).
- *Panitumumab* (Vectibix) - lidská monoklonální IgG2 protilátka s vysokou afinitou k receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR/ERBB1/HER 1), užívá se u při rezistenci na cetuximab při léčbě metastazujícího kolorektálního karcinomu, zkouší se u nemalobuněčného karcinomu karcinomu plic v kombinaci s paklitaxelem.
- *Ertumaxomab* (Rexomun) - bispecifická trifunkční monoklonální protilátka proti receptoru ERBB2/HER2/NEU a CD3. Zkouší se v léčbě metastatického karcinomu prsu.

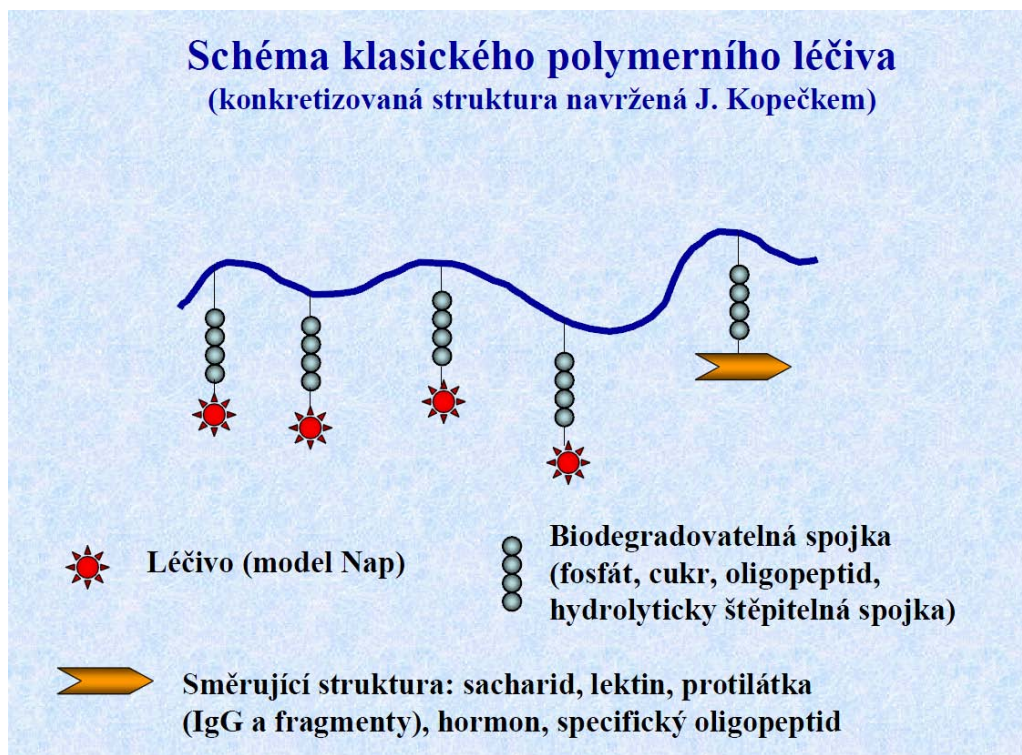
Dalším druhem léčiv používaných v cílené terapii jsou nízkomolekulární přírodní látky. Významnými zástupci této skupiny jsou retinoidy, přirozené nebo syntetické deriváty retinolu (vitaminu A), které ovlivňují proliferaci a diferenciaci nádorových buněk tím, že brzdí jejich proliferaci a směřují je do podoby diferencovaných buněk s malou či žádnou proliferační aktivitou a následně je jejich biologický cyklus zakončen klasickou apoptózou. Obecně mají účinky antiproliferační, diferenciační a proapoptotické. Do klinické praxe jsou již schváleny tretinoin (pro léčbu akutní promyelocytární leukemie) a bexaroten (pro léčbu kožní formy T buněčného lymfomu) [107, 108].

## **Polymerní léčiva v protinádorové léčbě**

Jednou z možností, jak zvýšit dávku léčiva a tím i účinnost protinádorového cytostatika při tolerovatelných nežádoucích účincích, je použití jejich polymerních (makromolekulárních) nosičů. Ty ve spojení s klasickými léčivy mohou odstranit řadu jejich nevýhodných vlastností nebo dát léčivům vlastnosti zcela nové. Základní charakteristiku ideálního léčiva, tzv. magické střely, které se polymerní léčiva snaží přiblížit, formuloval v roce 1906 Paul Erlich [109]:

- 1.** podání biologicky aktivní látky (léčiva) v neaktivní formě, bez jakéhokoliv vlivu na organizmus (buňky imunitního systému) a doprava specificky do místa požadovaného účinku.
- 2.** aktivace pouze v místě požadovaného účinku, působení v požadované koncentraci a po dobu optimální pro dosažení maximálního léčebného účinku
- 3.** léčivo, metabolity a všechny komponenty nosičového systému jsou po dosažení efektu eliminovány z organismu.

V roce 1975 navrhl Helmuth Ringsdorf obecný koncept polymerního systému umožňujícího cílený transport a řízené uvolňování léčiv (obr. 2). Ten se skládal ze syntetického polymeru, na který byly navázány molekuly účinné látky prostřednictvím spojky tak, aby kovalentní vazba mezi léčivem a spojkou byla štěpitelná pouze v cílové tj. nádorové buňce. Dále byly k polymernímu nosiči připojeny tzv. solubilizační skupiny (zajišťující dobrou rozpustnost systému ve vodě) a směřující jednotky zodpovědné za účinné cílení do místa požadovaného terapeutického působení [110].



Obr. 2 - Ringsdorfův obecný koncept polymerního systému - převzato z Kopečka 2010 [111].

Makromolekulární nosiče mohou být přírodního původu nebo na míru připravené syntetické polymery, které fungují na principu řízeného uvolňování a cíleného transportu léčiv (controlled drug release nebo targeted drug delivery systems - DDS). Polymer zde slouží jako nosič, který toxické léčivo dopraví v inaktivní formě až k cílové tkáni - nádoru, bez poškození zdravých tkání a orgánů. Optimálně teprve po internalizaci polymerního léčiva nádorovou buňkou dojde k uvolnění léčiva z polymerního komplexu a tím i aktivaci jeho cytostatického účinku [112]. Nelze ovšem vyloučit, že pokud se pro vazbu léčiva zvolí hydrazonová tzn. pH senzitivní vazba s optimem kolem pH = 5.0 – 5.5, může k jeho uvolnění obecně dojít v nádorové tkáni, která se vyznačuje nízkým pH. Jedním z prvních úkolů při vývoji těchto léčiv bylo zacílení jejich aktivity přednostně na nádorovou tkáň nebo dokonce na jednotlivé nádorové buňky. V 80. letech minulého století popsal Hiroshi Maeda schopnost tumoru pasivně akumulovat některé vysokomolekulární látky - tzv. EPR (Enhanced Permeability and Retention) efekt [113, 114]. Za účelem zásobení rostoucího nádoru kyslíkem a živinami dochází v neoplastické tkáni k silné neoangiogenezi. Tato nově vznikající cévní tkáň poměrně snadno propouští makromolekuly skrz dosud nedokonale utvořené cévní stěny do okolní nádorové tkáně. Zároveň v nádorech

zpravidla chybí nebo je defektní lymfatický systém, který by odváděl nahromaděné makromolekulární látky z nádoru. V důsledku EPR efektu tudíž dochází ke zvýšené akumulaci makromolekulárních látek v nádorové tkáni. Tento jev se označuje jako *pasivní směřování/akumulace* a je považován za nejdůležitější výhodu polymerních terapeutik oproti klasickým nízkomolekulárním cytostatikům [115].

Při *aktivním směřování* vhodně zvolená struktura polymerního nosiče umožňuje navázání směřující jednotky, schopné specifické interakce se strukturami, které se ve zvýšené míře vyskytují na povrchu nebo v okolí cílových nádorových buněk. Nejpřesnějšího cílení lze dosáhnout při klasické specifické imunitní reakci, kde jsou směřující strukturou navázanou na polymerní nosič protilátky (monoklonální nebo polyklonální) a receptorem některý z charakteristických povrchových znaků nádorových buněk [116]. Těmi mohou být jak tzv. tumor specifické antigeny (TSA) nebo antigeny vyskytující se na povrchu nádorových buněk ve výrazně vyšším množství, tzv. antigeny s nádorem asociované (TAA) - viz. kapitola Protinádorová imunita. Jako směřující jednotky byly testovány a používány kromě mono- i polyklonálních protilátek nebo jejich fragmentů [117, 118] také lektiny [119], růstové faktory [120], hormony [121], sacharidy [122], deriváty kyseliny listové [123] a peptidy.

Neméně důležitý problém představuje nalezení optimálního mechanismu uvolnění léčiva z polymeru v nádorové tkáni. V minulosti byly testovány různé varianty štěpení na základě fyzikálních a chemických vlastností. Na základě fyzikálních vlastností jsou aktivovány například termosensitivní polymery (např. poly(*N*-isopropylakrylamid), poly(*N*-isopropylmethakrylamid), které jsou rozpustné ve vodě při laboratorní teplotě a při překročení kritické rozpouštěcí teploty, která je blízká teplotě lidského těla, dojde k uvolnění léčiva [124]. V jiných případech bylo testováno uvolňování léčiva pomocí ultrazvukových vln [125, 126]. Při separaci léčiva na principu chemických reakcí je v současnosti využíváno nejčastěji štěpení vazby založené na změně pH (štěpení hydrazonové vazby) [127, 128] nebo působením lysozomálních enzymů (proteolytické štěpení) [129, 130]. Méně častou variantou je využití redukčně štěpitelné vazby, využívající redukční prostředí uvnitř buňky. Dosud nejčastěji používaným systémem tohoto druhu je disulfidová vazba, která je však omezena na úzkou skupinu léčiv obsahujících SH skupinu (disulfidová vazba). Experimentálně je však zkoumána sulfenamidová vazba, pomocí které by bylo možné díky vyššímu

výskytu funkčních skupin v molekule léčiva (např. aminoskupin) výrazně rozšířit množství používaných léčiv [131]. V současné době je také zkoumána možnost využití polymerních struktur při radioterapii, zde je na nosič místo cytostatika navázán radionuklid např.  $^{131}\text{I}$  nebo  $^{90}\text{Y}$ . Tento koncept má několik výhod: intravenózní podání (místo aplikace implantátu do nádoru nebo do jeho těsné blízkosti při brachyterapii) je pro pacienta méně zatěžující, protože léčivo je možné rozdělit do několika dávek, a protože i konjugovaný radionuklid indukuje v nádorové tkáni (kam se dostane díky EPR efektu) vznik volných radikálů, které poškozují buněčné struktury, není třeba řešit problém odštěpení od polymerního nosiče [132].

### **Výhody polymerních léčiv proti klasickým cytostatikám:**

- aktivní směřování (využitím směrovacích struktur)
- pasivní akumulace v solidních nádorech (díky EPR efektu)
- snížená imunogenicita
- zvýšená efektivita v porovnání s nízkomolekulárním léčivem
- vyšší maximální tolerovaná dávka
- prodloužená doba cirkulace v cévním řečišti
- snížená toxicita pro hematopoetický, kardiovaskulární, hepatální a renální systém
- možnost překonání mnohočetné rezistence nádorových buněk proti cytostatikům
- imunoprotektivní a imunomobilizační efekt polymerních léčiv
- zvýšená rozpustnost navazovaných léčiv, případně zajištění rozpustnosti ve vodě nerozpustných léčiv
- neaktivnost chemoterapeutika během transportu krevním řečištěm
- možnost chránit směřující molekuly, zejména protilátky, před inaktivací (na rozdíl od imunotoxinů)
- kontrolované uvolňování účinné složky až v cílové buňce

Výrazným benefitem polymerních léčiv je prodloužená doba cirkulace v krevním řečišti, která je dána jejich zvýšenou odolností k biodegradaci a proteolýze [133]. Další typickou vlastností je snížená imunogenicita navázané směřující struktury a biokompatibilita, protože ani dlouhodobé podávání polymerních léčiv neinhibuje

schopnost protilátkové odpovědi na T dependentní i T independentní antigeny ani fagocytární aktivitu monocytů a neutrofilů [15, 134]. Dále bylo opakovaně potvrzeno, že polymerní léčiva díky distribuci v neaktivní formě mají daleko nižší nespecifickou toxicitu, zejména pro imunitní systém, kostní dřeň, srdce, játra a ledviny [135, 136]. Díky EPR efektu dochází i u polymerních léčiv bez specifické směrovací struktury k pasivní akumulaci v solidních tumorech. Míra akumulace je závislá na molekulární hmotnosti, dávce i fyzikálně-chemickém charakteru makromolekuly [137].

## **Historie vývoje polymerních léčiv**

První polymerní konjugáty se objevily v 50. letech minulého století, kdy Jatzkewitz použil dipeptidickou vazbu pro spojení léčiva (mescalín) a polymerního nosiče (polyvinylpyrolidon) [138]. V 60. a 70. letech syntetizoval Ushakov několik polymerních konjugátů rozpustných ve vodě a Mathé prokázal možnost spojení konjugátu s imunoglobuliny a tím položil základy pro DDS [139]. Od 80. let byla postupně syntetizována a testována celá řada polymerních nosičů. V následujícím odstavci popisujeme několik nejvýznamnějších, které se dostaly do pokročilé fáze testování nebo přímo do klinické praxe.

Na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze byl vyvinut polymerní systém tvořený vodou rozpustnými kopolymerem poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] (HPMA), který byl původně navržen jako náhražka krevní plazmy s komerčním názvem Duxon [140]. V roce 1994 vstoupil HPMA konjugát s navázaným doxorubicinem jako vůbec první polymerní konjugát do 1. stádia klinických testů [141]. V 90. letech 20. století popsal v Japonsku Maeda EPR efekt u solidních nádorů a následně byl jeho pracovištěm vyvinut a pro léčbu hepatocelulárního karcinomu schválen polymerní konjugát s protinádorovým léčivem - kopolymer styrenu a maleinové kyseliny nesoucí cytostatikum neocarcinostatin (neocarcinostatin stimalamer – SMANCS) [142]. Jako další vhodné nosiče byly studovány lipozomy - partikule složené z vnější fosfolipidové dvojvrstvy a vnitřního hydrofilního jádra. Ty mohou inkorporovat jak lipofilní či amfifilní, tak hydrofilní léčiva (enkapsulované v hydrofilním jádře lipozomu). Výhody použití lipozomů jako nosičů jsou vyšší koncentrace lipofilního léčiva a lepší ochrana před biodegradací. Hlavní nevýhoda je krátký biologický poločas vzhledem k rychlé clearence

retikuloendoteliálními systémy jaterní tkáně a sleziny [143]. Jedna z možností, jak zvýšit biologický poločas lipozomů, byla konjugace se syntetickým polymerem polyethylenglykolem (PEG). Tento postup byl objeven a později patentován Frankem Davisem a Abrahamem Abuchowskim v 70. letech minulého století [144]. Tzv. pegylace vede k vytvoření hydrofilního obalu, který zabraňuje rozpoznání stealth lipozomu protilátkami a složkami komplementu. Výsledkem takového komplexu je zvýšená odolnost vůči proteolýze, snížení imunogenicity (stealth liposom není fagocytujícími buňkami prakticky rozpoznáván) a tedy i prodloužení doby cirkulace v krevním řečišti. [145, 146]. Prvním klinicky používaným lipozomálním cytostatikem byl pegylovaný lipozomální doxorubicin (Caelyx/Doxil), který byl v roce 1995 schválen k léčbě Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS po selhání systémové terapie, později i k terapii refrakterního karcinomu ovaria po selhání platinového režimu [147, 148]. Testuje se i u pacientek s metastatickým karcinomem prsu a u dalších malignit. Nepegylovaný lipozomální doxorubicin (Myocet, Zeneus) je v kombinaci s cyklofosfamidem schválen k primoterapii metastatického karcinomu prsu a lipozomální daunorubicin (DaunoXome, Diatos) k léčbě pokročilého Kaposiho sarkomu, akutní myeloidní leukemie a mnohočetného lymfomu [149, 150]. Dále je klinicky využíván lipozomální cytarabin (DepoCyte) - při meningeální infiltraci u lymfomů a leukémií) či lipozomální tretinoin (Atragen, Aronex) - ten je indikován při léčbě akutní promyelocytární leukemie a testován u karcinomu prostaty, refrakterního Hodgkinova lymfomu a metastatického karcinomu ledviny. Ve fázi klinických testů je řada dalších lipozomálních cytostatik, např. lipozomální cisplatina, paklitaxel nebo vinkristin [151-153].

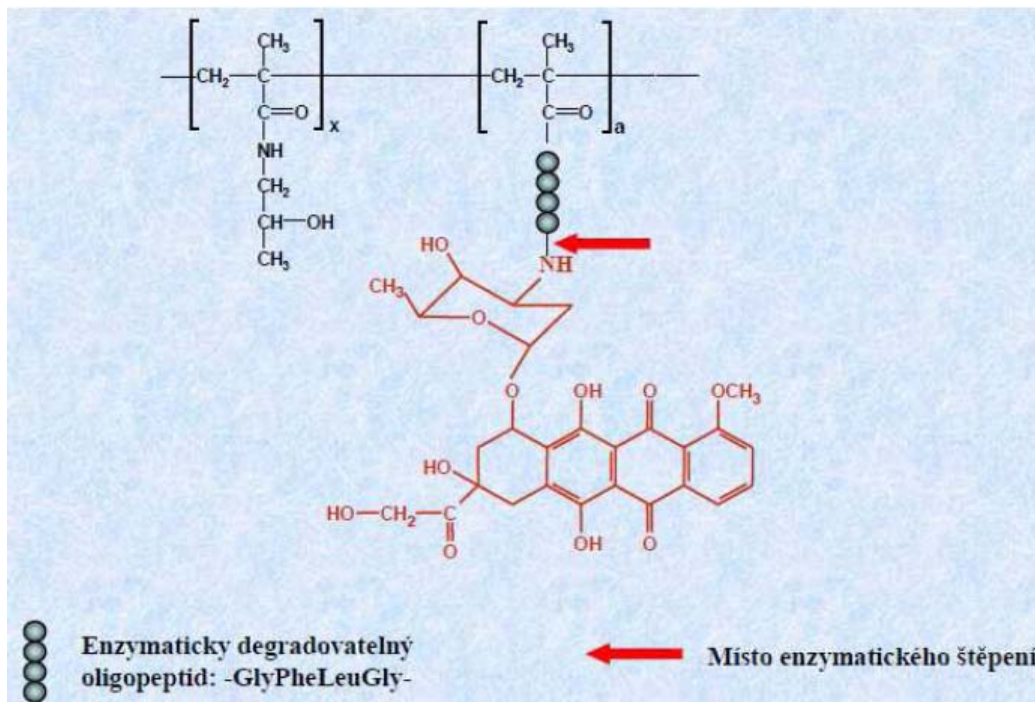
Jinou skupinou partikul s amfifilní strukturou, které jsou využívány jako nosiče hydrofobnějších léčiv (např. paklitaxel), jsou micely. Příkladem může být polyethylenoxid-block-polypropylenoxid-block-polyethylenoxid (Pluronic), u kterého je vedle výhod zmiňovaných u lipozomů popsána schopnost potlačit mnohočetnou rezistenci nádorových buněk proti kancerostatikům [154]. V jiných případech jsou jako nosiče léčiva využívány nanopartikelky. Prvním klinicky schváleným přípravkem tohoto druhu byl nab-paklitaxel (Abraxane), paklitaxel nekovalentně vázaný na albuminové částice o velikosti 130 nm. Používá se k léčbě nemalobuňčného karcinomu plic a pankreatu a u pacientek s metastatickým karcinomem prsu po



selhání kombinované chemoterapie nebo u časného relapsu během adjuvantní léčby. Zde se využívá zvýšené akumulace albuminu v nádorové tkáni, která je způsobena vyšší nádorovou produkcí proteinu SPARC, který váže albumin a usnadňuje transcytózu paklitaxelu skrze endotelové buňky do nitra nádoru [155, 156]. Podobný model struktury využívají dendrimery, kde jsou polymery s hydrofobním jádrem obklopeny hydrofilním obalem. Jádro zde slouží pro vazbu cytostatika a receptory na obalu pro vazbu ligandů za účelem aktivního směřování. Příkladem takového preparátu je dendrimerický docetaxel (Taxotere), který je v II. fázi klinického testování pro léčbu karcinomu prsu [157]. Dále může být využita vazba cytostatika na hormonální nosič, např. u estamustin fosfátu (Estracyt), využívaném pro léčbu karcinomu prostaty. Vyššího protinádorového efektu je zde dosaženo kombinací cytostatického účinku chlormethinu a inhibičního účinku estrogenu na produkci testosteronu [158].

### **Polymerní léčiva na bázi poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] (HPMA)**

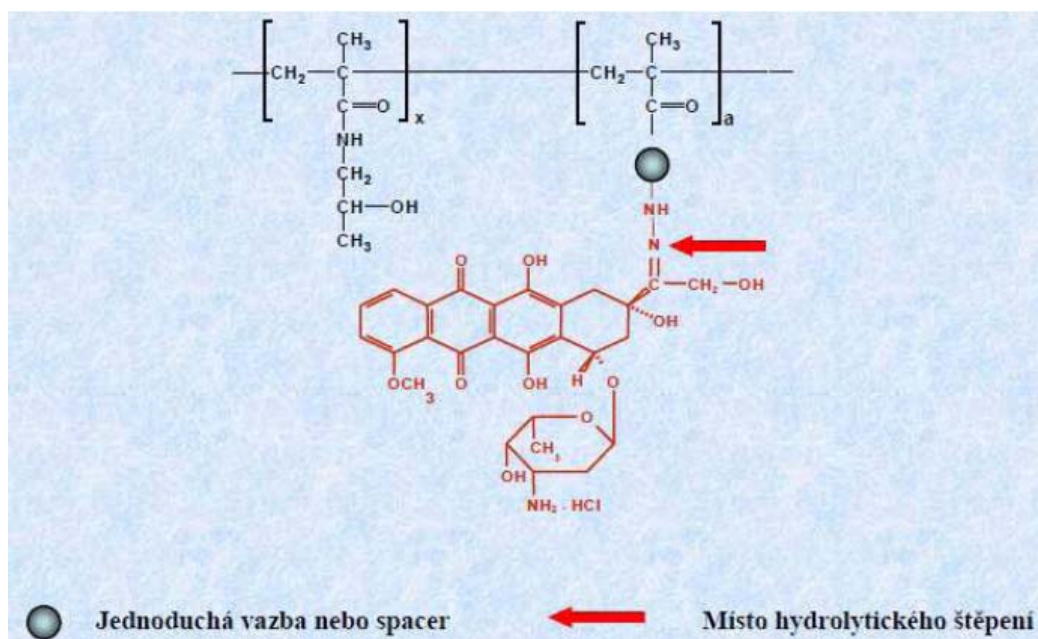
V našich studiích byl jako polymerní konjugát používán vodorozpustný HPMA. Polymerní léčiva na bázi HPMA byly objeveny koncem 70. let a na jejich vývoji se podílely vědecké týmy z Československa (Ústav makromolekulární chemie ČSAV pod vedením prof. Kopečka, který v roce 1988 odešel do USA), Velké Británie (pod vedením prof. Duncanové) a pražského Mikrobiologického ústavu ČSAV (pod vedením prof. Říhové). V roce 1985 získal HPMA konjugát českoanglický patent a od té doby bylo syntetizováno a následně zkoumáno více než 300 polymerních struktur na bázi HPMA [159, 160]. Kromě využití jako nosiče kancerostatik jsou HPMA konjugáty používány pro modifikaci terapeuticky významných proteinů (např. enzymu ribonukleasy či protilátek) nebo jako vektory pro přenos genů pro genovou terapii. Prvním polymerním léčivem s protinádorovým účinkem vyvinutým v naší laboratoři byl HPMA polymer s tetrapeptidem Gly-Phe-Leu-Gly nesoucím antracyklinové antibiotikum doxorubicin (označován jako PK1 - obr. 3) [111].



Obr. 3 - Schéma HPMA konjugátu s navázaným doxorubicinem enzymaticky štěpitelnou vazbou.

Tetrapeptidová spojka mezi doxorubicinem a polymerním nosičem je zde během transportu v krevním řečišti stálá, avšak v přítomnosti lysosomálních proteáz (především katepsinů B, L, H) dochází uvnitř buňky k odštěpení volného doxorubicinu [129, 161, 162]. Detailní mechanismus účinku a intracelulární osud léčiva je stále předmětem intenzivního zkoumání. Pozdější, tentokrát aktivně směřovanou variantou HPMA konjugátu s navázaným doxorubicinem přes GFLG vazbu je polymerní léčivo PK2. To jako směřující molekulu obsahuje galaktosamin rozpoznávající N-asialoglykoproteinový receptor na hepatocytech umožňující záchyt a endocytózu glykoproteinů, a proto bylo navrženo pro léčbu hepatocelulárního karcinomu. Oba popsané polymerní konjugáty byly jedny z prvních polymerních kancerostatik na světě, které prošly první (v případě PK2) a dokonce druhou (v případě PK1) fází klinických zkoušek ve Velké Británii [141, 163]. Současně byly studovány HPMA polymerní konjugáty s doxorubicinem, směřované monoklonálními protilátkami. Bylo zjištěno, že po modifikaci polymerem sice protilátka ztrácí část své vazebné aktivity na antigen, ale zároveň jsou chráněny polymerem vůči proteolytické degradaci, mají sníženou imunogenicitu a svou vysokou molekulovou hmotností přispívají k EPR efektu. Díky tomu se HPMA konjugát s doxorubicinem směřovaný

IgG dostal až do stadia experimentálního testování u skupiny pacientek s generalizovaným nádorem prsu [164]. Kromě doxorubicinu byla u nás i v zahraničí použita pro navázání na kopolymery HPMA i řada dalších léčiv, např. melphalan, cyklosporin, paklitaxel, camptothecin, komplexy platiny nebo methotrexat [165-168]. Jiný mechanismus odštěpení účinné látky z polymeru v nádorových buňkách nebo v jejich bezprostřední blízkosti poskytuje pH senzitivní, hydrazonová vazba. Preparátem založeným na tomto mechanismu uvolnění cytostatika, který je používán na našem pracovišti, je HPMA konjugát s hydrazidem *N*-methakryloyl-6-aminohexanové kyseliny, na který je hydrazonovou vazbou navázán doxorubicin (obr. 4) [169]. Hydrazonová vazba mezi léčivem a polymerním nosičem je hydrolyticky poměrně stálá při pH 7,4, ale v mírně kyselém prostředí endosomů uvnitř nádorových buněk (cca pH 5) dochází k rychlému štěpení hydrazonové vazby a uvolnění doxorubicinu. Ten pak intracelulárně působí obdobně jako volný doxorubicin - narušuje DNA interkalací antracyklinové části, chelací kovových iontů nebo generováním volných radikálů, navíc inhibuje topoizomerázu II, která napomáhá separaci vláken dvojité šroubovice DNA při replikaci [162, 170, 171].



Obr. 4 - Schéma HPMA konjugátu s navázaným doxorubicinem hydrolyticky (pH senzitivní) štěpitelnou vazbou.

Další významnou vlastností je schopnost navodit tzv. imunogenní apoptózu. Při té umírající nádorové buňky translokují kalretikulín z endoplasmatického retikula na

plasmatickou membránu a uvolňují high mobility group box-1 (HMGB-1) alarmin a ATP. V nádorovém prostředí nezralé dendritické buňky váží a později fagocytují umírající nádorové buňky exprimující CRT pomocí CD 91 receptorem mediované endocytózy. Léčivem vyvolaný stres nádorové buňky vede také k tomu, že se z této buňky uvolňuje ATP a váže se na další z receptorů dendritických buněk – P2RX7. Tato vazba usnadňuje akumulaci dalších dendritických buněk v nádoru. A konečně se realizuje třetí, zcela zásadní vazba: HMGB-1 se váže na TLR4 dendritických buněk a zahajuje tak jejich vyžívání, protože pouze zralé dendritické buňky se uplatňují jako antigen-prezentující buňky a mohou tak zahájit protinádorovou reakci [17, 172-174]. Konjugát s hydrazonovou vazbou má o několik řádů vyšší cytotoxicitu *in vitro* než PK1, je však méně toxický v *in vivo* podmínkách, a tak může být podáván ve vyšších dávkách, jak bylo prokázáno na myších modelech [128, 130, 175].

V jiném experimentálním modelu byla testována kombinace podání polymerního léčiva a fotodynamické terapie. Principem je ozáření fotosenzitivních složek konjugátu (fotoaktivovatelné léčivo chlorin  $e_6$ ) v nádorové tkáni světlem určité vlnové délky, čímž tyto složky přecházejí do vysokoenergetického stavu, předávají svou energii molekulárnímu kyslíku a převádějí ho na vysokoenergetický singletový kyslík  $^1O_2$ . Ten poškozují buněčné membrány, buněčné organely, cytosol i buněčné jádro a vede nezvratnému poškození a následné smrti buňky. Směrování je v tomto případě dvojstupňové. V prvním stupni dochází k pasivní/aktivní akumulaci v nádorové tkáni, v druhém stupni je pouze tato určitá tkáň vystavena záření určité vlnové délky. Příkladem jsou konjugáty s OV-TL16 cíleným HPMA kopolymerem ve vazbě s doxorubicinem a HPMA kopolymerem ve vazbě s mesochlorinem, testované pro léčbu některých typů rezistentních karcinomů ovaria (OVCAR) [176-178].

Některé práce navíc poukazují na schopnost HPMA konjugátů částečně překonat mnohočetnou lékovou resistenci nádorových buněk (cancer multidrug resistance, MDR). Specifické membránové receptory (např. P-glykoprotein ze skupiny ABC receptorů) jsou zodpovědné za urychlené vypuzování xenobiotik z nádorové buňky a jejich zvýšená exprese je asociována s resistencí na řadu dosud využívaných cytostatik. Některá léčiva na bázi HPMA (např. P(GFLG)-DOX) odštěpují

cytostatickou substanci až uvnitř nádorových buněk (lysozomy) mimo dosah ABC receptorů a tím mohou předejít vyloučení z buňky [111, 179, 180].

Jednou z nejslibnějších vlastností HPMA polymerních léčiv je jejich vliv na imunitní systém pacienta. Bylo opakovaně prokázáno, že některé konjugáty tohoto druhu jsou nejen neimunogenní, ale dokonce mají imunomodulační účinek. Zpočátku byl jejich výrazný protinádorový účinek připisován pouze přímé cytotoxické aktivitě a snížené systémové toxicitě, která umožňovala podání vyšších dávek. V pozdějších studiích však byla prokázána jejich nesporná imunoprotektivní a imunostimulační aktivita, kterou se podařilo opakovaně kontrolovaně navozovat [15, 181]. U myších kmenů s omezenou funkcí imunitního systému (zejména T buněčných subpopulací) jako jsou nu/nu myši, nebylo nikdy po podání HPMA konjugátů dosaženo úplného vyléčení ale pouze delšího přežití. Už sám tento fakt potvrzuje důležitou spoluúčast imunitního systému při odstraňování nádorů [16].

### Publikace č.3

Betka J, Hovorka O, Boucek J, Ulbrich K, Etrych T, Rihova B. *Fine needle aspiration biopsy proves increased T-lymphocyte proliferation in tumor and decreased metastatic infiltration after treatment with doxorubicin bound to PHPMA copolymer carrier*. J Drug Target, 2013. 21(7): p. 648-61.

Bylo opakovaně prokázáno, že některé HPMA léčiva jsou nejen neimunogenní, ale dokonce mají imunomodulační účinek. Mechanismus stimulace imunitního systému HPMA konjugáty není zatím zcela přesně objasněn, pravděpodobně je způsoben stimulací nádorově specifických T-lymfocytů a NK buněk (tzv. tumor infiltrující lymfocyty - TIL), jejichž množství v tumoru je po podání léčiva zvýšeno u jedinců, u kterých poté dochází ke kompletní remisi onemocnění [16]. Zásadní je způsob zabíjení a následného umírání nádorových buněk. Polymerní léčiva na bázi HPMA navozují jejich imunogenní smrt, která je základním předpokladem zahájení imunitní reakce (173, 174). Tu pak realizuje zvýšený počet infiltrujících TIL. Sledování změn infiltrace lymfocytů v nádorovém mikroprostředí v různých časových odstupech od zahájení léčby HPMA konjugáty by mohlo pomoci porozumět mechanismu jejich imunogenního účinku.

V naší studii bylo pro odběr buněčného materiálu z nádoru *in vivo* použito aspirační biopsie tenkou jehlou (fine needle aspiration biopsy - FNAB), tedy metody široce využívané v klinické praxi při cytologických vyšetření parenchymatózních orgánů. V první fázi byla FNAB metoda porovnána se standardní excizí. Myším byly subkutánně podány buňky myšího T-lymfomu. V době, kdy nádor dosáhl velikosti 1cm v průměru, byl proveden odběr metodou FNAB a excizí a získaný materiál byl analyzován pomocí průtokové cytometrie. Zároveň bylo srovnáváno přežití myší a velikost nádoru po FNAB a u kontrolní (neodebírané) skupiny. Prokázali jsme, že použití FNAB neovlivní ani růst nádoru ani přežití experimentálních zvířat, a navíc získané buňky vykazovaly stejnou viabilitu a stejné zastoupení jednotlivých lymfocytárních populací jak po odběru metodou FNAB tak i standardní excizí po usmrcení zvířat. Díky tomu bylo možné odběr vzorků opakovat v různých časových intervalech (na totožných myších, u kterých byla zároveň makroskopicky hodnocena nádorová progresse či regrese) a tak monitorovat vývoj onemocnění, včetně průběžného hodnocení intratumorálních buněčných změn.

V druhé fázi našeho experimentu bylo myším s nádorem aplikováno léčivo (volný doxorubicin nebo HPMA konjugáty vázající cytostatikum doxorubicin jak amidickou tak i hydrazonovou vazbou). Materiál získaný pomocí FNAB v různých intervalech od zahájení léčby byl analyzován průtokovou cytometrií. Byla sledována infiltrace nádorového mikroprostředí jednotlivými lymfocytárními subpopulacemi (CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ a CD3+/NK1.1), která byly vyjádřena jako poměr detekovaných subpopulací a nádorových buněk. Obdobným způsobem byl analyzován počet infiltrujících nádorových buněk v lymfatických uzlinách a slezině inokulovaných myší pro posouzení protinádorového účinku HPMA konjugátů na metastatický rozsev.

Po léčbě HPMA konjugáty bylo zjištěno signifikantně vyšší zastoupení u všech sledovaných T-lymfocytárních subpopulací (CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ a CD3+/NK1.1) než po léčbě volným doxorubicinem. U některých skupin (CD3+/CD8+ and CD3+/NK1.1) byl tento nárůst o více než 50%. Navíc tyto rozdíly byly patrné již mezi 3-5. dnem po podání léčiva, tedy v době, kdy zatím nebylo možné makroskopicky určit, zda nádor roste či regreduje.

Stejně jako v předchozích studiích byl tedy potvrzen dvojitý protinádorový efekt HPMA léčiv: chemoterapeutický a současně imunoterapeutický. Podmínkou pro dosažení tohoto účinku konjugovaných preparátů na imunitní systém jedince je léčbou nepoškozený imunitní systém, který je vystaven po určitou dobu dostatečnému množství nádorových buněk tj. dostatečnému množství nádorových antigenů [182, 183]. V současnosti se zdá klíčové nalezení optimálního nastavení léčebného schématu tak, aby bylo možné monitorovat, zda podaná dávka byla dostatečná pro stimulaci imunitního systému jedince [181]. Právě závěry této práce ohledně stanovení doby odezvy imunitního systému na podané léčivo by mohly v tomto směru výrazně pomoci - například odběrem vzorku z nádoru před léčbou a mezi 3-5. dnem po podání léčiva by bylo možné na základě stanovení TIL přesně určit, zda došlo k adekvátní aktivaci imunitního systému a podle toho naplánovat další léčebný postup - u jedinců s nedostatečnou imunitní odezvou by mohla být podána další dávka léčiva a naopak pacienti s dostatečnou aktivací imunitního systému by nebyli zatěžováni opakovaným podáním léčiva.

Při sledování nádorové infiltrace ve spádových lymfatických uzlinách a ve slezině po léčbě HPMA konjugáty byla prokázána výrazně nižší infiltrace nádorovými buňkami v

lymfatických uzlinách i ve slezině jak proti kontrolám tak proti léčbě volným doxorubicinem. Bylo tedy prokázáno, že použitá HPMA léčiva nemají efekt pouze proti primárnímu nádoru, ale dokážou i zpomalit metastatický rozsev. Právě lokální a především vzdálená nádorová diseminace bývá v klinické praxi hlavní příčinou neúspěchu léčby.



## Protinádorová imunita

Imunoterapie je další metodou, jak bojovat proti maligním onemocněním. Jejím cílem je obnovit porušenou funkci protinádorové imunity a zapojit ji do léčby zhoubného onemocnění. Základním předpokladem je, že imunitní systém rozeznává antigeny na maligních buňkách jako cizí a snaží se je eliminovat. Tuto hypotézu tzv. imunitního dozoru, nebo-li „Cancer immunosurveillance“, vyslovil poprvé Frank MacFarlane Burnet v polovině minulého století [184]. Podle staršího dělení může imunitní systém rozeznat nádorové buňky dvěma způsoby - pomocí pro nádor specifických antigenů (TSA) anebo pomocí takzvaných s nádorem asociovaných antigenů (TAA) (tab. 1). Antigeny pro nádor specifické jsou produktem genů původně normálních buněk změněné nějakou unikátní mutací [185-187]. Moderní klasifikace nádorových antigenů vychází z jejich molekulární struktury a na tom, jak jsou exprimovány na nádorových buňkách a schopny stimulovat T-závislou nebo protilátkovou reakci [188].

<b>Antigeny specifické pro nádory (TSA):</b>
komplexy MHC gp I třídy s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (Bcr-Abl)
komplexy MHC gp s fragmenty proteinů onkogenních virů (polyoviry, SV 40, EBV)
abnormální formy glykoproteinů (glykosylace)
<b>Antigeny asociované s nádory (TAA):</b>
onkofetální antigeny (AFP, CEA), melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A), receptor růstového faktoru HER2/neu, prostatický specifický antigen PSA, adhezivní molekula epiteliálních buněk EPCAM, atd.

*Tab. 1 - Rozdělení nádorových antigenů - převzato z Hořejší V., Bartůňková J, 2013 [187].*

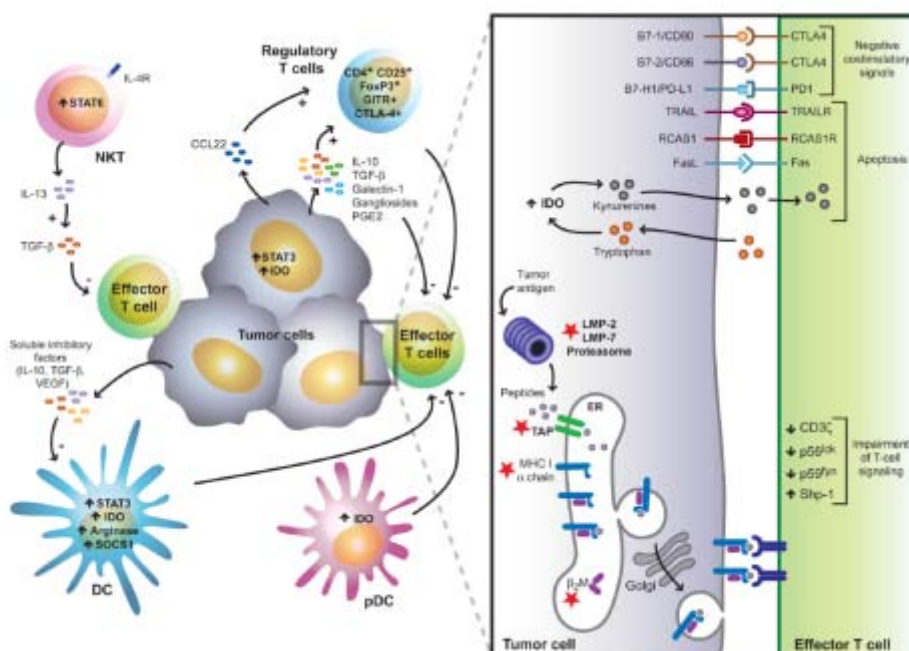
Nádorové antigeny jsou zpracovány profesionálními APC hostitele (zejména dendritickými buňkami) a prezentovány na svém povrchu ve vazbě s MHC gp I. třídy a MHC gp II. třídy. Pokud je tento podnět podpořen dalšími kostimulačními signály (např. z CD4+ lymfocytů), dojde k aktivaci cytotoxických T lymfocytů (CD8+; CTL). Ty pak usmrcejí nádorové buňky několika mechanismy: působením perforinu se vytvoří ve stěně nádorové buňky póry a intracelulárně pronikající proteázy granzymy aktivují kaspázy, které dále kaskádovitě aktivují intracelulární procesy vyúsťující v apoptózu

nádorové buňky. Dalším mechanismem je exprese Fas ligandů, které po vazbě na Fas receptor (CD95) T lymfocytů způsobí vznik death-inducing signaling komplexu a signalizací přes kaspázu 8 indukuje opět aktivaci apoptózy [189-191]. Dalšími efektorovými lymfocyty v boji proti nádorovým buňkám jsou NK buňky. Jejich mechanismus aktivace je jednak založen na vazbě Fc receptoru CD16 (FcγRIII) s buňkami opsonizovanými protilátkami třídy IgG (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), jednak na rozpoznávání buňky s nedostatečnou nebo defektní expresí MHC gp I. molekul. Důležitými aktivátory NK buněk jsou i interferony  $\alpha$  a  $\beta$ . Hlavními cytotoxickými nástroji NK buněk jsou stejně jako u CTL granule obsahující perforin a granzymy [192, 193]. Dalším prvkem v protinádorové obraně je interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), který dokáže stimulovat expresi MHC gp I. a tím podpořit vlastní cytotoxickou imunitní reakci. IFN- $\gamma$  je dnes často používán při léčbě vybraných nádorových onemocnění (např. u karcinomu prsu či ovaria) [194, 195]. Dalšími buňkami, které jsou zapojeny do procesu imunitní reakce proti nádorům, jsou makrofágy. Jejich role ve vztahu k malignitám není jednoznačně objasněna. Makrofágy vznikají v kostní dřeni, jako monocyty cirkulují v periferní krvi a dozrávají v tkáních, kam se dostávají extravazací. Mohou být aktivovány tzv. klasickou cestou typickou pro zánětlivou odpověď organismu (M1 fenotyp), která je charakterizovaná produkcí IL-12 a IL-23 a následnou aktivací pomocnými T buňkami (Th buňky). V nádorovém mikroprostředí však vlivem kortikoidů a interleukinů IL-4, IL-8, IL-10 a IL-13 dochází k alternativní aktivaci (M2 fenotyp), při které makrofágy (označovány zde jako TAM - tumor associated macrophages) naopak inhibují proliferaci i aktivaci T lymfocytů a zároveň velmi účinně stimulují neoangiogenezi, produkují imunosupresivní cytokiny IL-10 a TGF i cytokiny přímo stimulující růst nádorů, např. EGF. Bylo opakovaně prokázáno, že zvýšené zastoupení TAM často koreluje s horší prognózou pacienta [196-199].

Samotné nádorové buňky aktivně vyvíjejí mechanismy, jak zabránit imunitnímu systému v jejich odhalení a likvidaci [200, 201]. Nejznámější mechanismy obrany nádorových buněk jsou (obr. 5):

- Genetická nestabilita nádorových buněk, která vede ke vzniku mutací, které ztrácejí nádorový antigen.
- Snížení exprese povrchových MHC gp I. třídy. Tím zabrání rozpoznání a aktivaci CTL, ale zvyšují možnost rozpoznání NK buňkami.

- Nepřítomnost kostimulačních a adhezivních molekul (např. CD80 a CD86) a MHC gp II. třídy na nádorových buňkách. Naivní T lymfocyty jsou sice schopny rozpoznat nádorové antigeny, ale bez potřebného druhého signálu nejsou aktivovány nebo jejich aktivita může být dokonce utlumena.
- Produkce inhibujících cytotoxinů (IL-10, TGF- $\beta$ ) a dalších látek, které inhibují složky imunitního systému (např. oxid dusnatý indukující apoptózu dendritických buněk nebo enzym IDO - indolamin-2,3-dioxygenáza, který inhibuje aktivaci T lymfocytů).
- Indukce T-buněčné tolerance. Příkladem může být nádorem indukovaná degradace T lymfocytárního receptoru.
- Exprese molekul vyvolávajících apoptózu cytotoxických buněk. Nejznámější formou je Fas protiútok založený na zvýšené expresi Fas-ligandu, který po vazbě s Fas-receptorem aktivovaných T buněk způsobí jejich smrt stejnou cestou jakou působí oni sami na nádorové buňky.
- Indukce T-regulačních lymfocytů a aktivace jejich supresivního účinku na imunitní systém.
- Inhibice způsobená aktivací CTLA-4 a PD-1 receptorů.

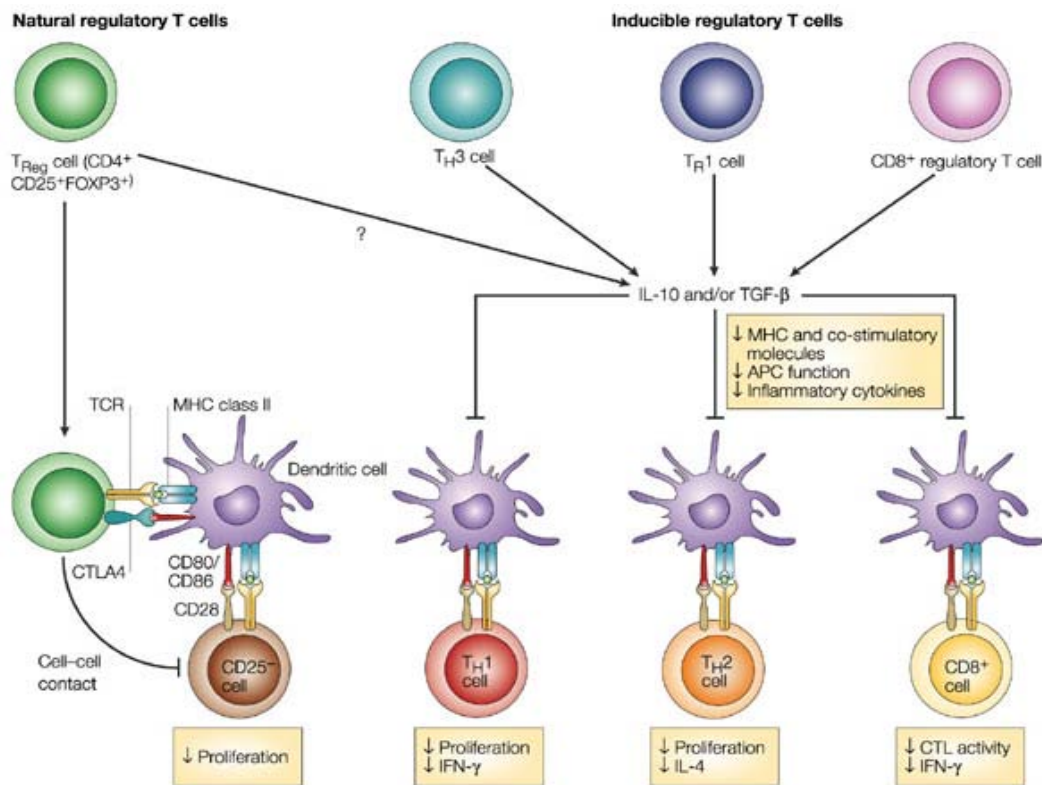


Obr. 5 - Mechanismy využívané nádory k úniku před imunitním dozorem - převzato z Rabinovich, 2007 [201].

## T regulační buňky

Subpopulace T-lymfocytů, která potlačuje aktivaci a proliferaci efektorových T buněk, je známa jako T regulační lymfocyty (Treg). Hlavní funkcí Treg buněk je udržování homeostázy v imunitním systému, kde poskytují imunitní toleranci potlačením mnoha imunitních odpovědí proti vlastním či cizorodým antigenům. Tato regulace hraje významnou roli v prevenci autoimunitních onemocnění, na druhou stranu má vliv na vznik a vývoj chronických infekčních onemocnění nebo nádorových onemocnění, kde potlačuje protinádorovou imunitu. Treg buňky se dělí do několika subpopulací. Nejlépe definovaná je podskupina CD4<sup>+</sup> T lymfocytů s fenotypem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, kde kromě vysoké exprese CD25 na svém povrchu je dalším rysem těchto buněk i exprese CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen) a GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene) [202]. CTLA-4 se na regulačních buňkách váže s B7 molekulami na APC, v důsledku toho pak B7 není schopen fungovat jako kostimulační signál. Navíc se tyto buňky vyznačují intracelulární expresí transkripčního faktoru FoxP3 (forkhead box P3), který je nezbytný pro jejich správný vývoj a funkci. V současné době se FoxP3 používá jako specifický marker sloužící k jejich identifikaci [203, 204]. Treg buňky tvoří přibližně 5-10 % z celkového počtu periferních CD4<sup>+</sup> buněk a vznikají jako důsledek rozpoznávání vlastních antigenů v thymu a rozpoznávání vlastních a cizích antigenů v periferních lymfatických orgánech. Dle Wang se dělí na přirozeně se vyskytující CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg buňky a indukované CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg buňky [205, 206]. Přirozené T (CD4<sup>+</sup>) regulační buňky vznikají v thymu pod přímým působením IL-2. Mají T lymfocytární receptor, ale na rozdíl od jiných autoreaktivních T-lymfocytů potlačují autoimunitní reakci a zajišťují periferní toleranci. Jejich hlavní efektorový mechanismus je vedle produkce TGF- $\beta$ , IL-10 a IL-35 i sekrece granzymů a perforinu obdobně jako u CTL a ke svému působení na jiné buňky (hlavně aktivované lymfocyty a APC) tedy potřebují přímý mezibuněčný kontakt - tzv. imunologickou synapsi [207, 208]. Vznik periferně indukovaných T regulačních buněk je podmíněn antigenní stimulací a dalšími molekulami jako jsou glukosteroidy, estrogen, TGF- $\beta$ , IL-2, ale i kostimulační molekuly jako CD80/CD86 a CD70 [209]. Indukované T regulační buňky vznikají v periferních tkáních při většině specifických imunitních reakcí. Rozdělují se na podskupiny Tr1 a Th3. Tr1 buňky jsou indukovány stimulací komplexem MHC/peptid za přítomnosti IL-10 a diferencují se z naivních prekurzorů CD4<sup>+</sup> T lymfocytů [210].

Produkují vysoké množství interleukinů IL-5, IL-10 a TGF- $\beta$ , exprimují molekuly CD4, CD25, ale na rozdíl od Th3 neexprimují transkripční faktor FoxP3. Tr1 buňky především omezují rozvoj autoimunitních reakcí zprostředkovaných Th1 buňkami. Kromě toho se vyznačují schopností potlačit imunitní reakce vůči patogenům, nádorům, alloantigenům a jsou důležité i v regulaci zánětů. Th3 buňky jsou mají CD4+CD25+ fenotyp a exprimují faktor FoxP3. Mechanismy, kterými T regulační buňky inhibičně působí na ostatní lymfocyty, jsou schematicky znázorněny na obr. 6. K nejvýznamnějším patří sekrece TGF- $\beta$  a IL-10. TGF- $\beta$  vykazuje řadu důležitých a často i protichůdných mechanismů působení. Kromě toho, že inhibuje proliferaci a efektorovou funkci T buněk a aktivaci makrofágů stimuluje produkci IgA a usnadňuje obnovu tkání po zánětu. Ve slizniční imunitě napomáhá navození tolerance. IL-10 inhibuje aktivované makrofágy a dendritické buňky tím, že inhibuje jejich produkci IL-12 a expresi MHC gp II třídy a kostimulátorů [211]. Dalším regulačním mechanismem Treg buněk je zvýšení exprese CD25, které vyvolává kompetitivní inhibici ligandu IL-2 pro efektorové T lymfocyty [212]. T regulační buňky působí i při modulaci dendritických buněk. Jejich receptor CTLA-4 se váže na CD80, CD86 receptory, na rozdíl od CD28 receptorů přítomných na APC však působí CTLA-4 po vazbě na APC inhibičně a indukuje produkci indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO) [213]. Výsledkem je katabolismus tryptofanu, jeho lokální deplece a negativní regulace imunitní odpovědi [214, 215]. Kromě CD4+ Treg buněk existuje i skupina CD8+ Treg lymfocytů, která je však zatím daleko méně prostudována. CD8+ T regulační buňky v thymu exprimují CD25, Foxp3, GITR a CTLA-4 a potlačují imunitní reakce i pomocí buněčného kontaktu. Účastní se imunitních pochodů při zánětlivých i autoimunitních onemocněních (diabetes I. typu, roztroušená skleróza), ale jejich zvýšené procento nacházíme i u pacientů s maligním onemocněním jako součást populace tumor-infiltrujících T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí [216]. Jejich význam v tumoru ani přesný mechanismus jejich účinku není zatím zcela objasněn, některé studie však ukazují na jejich supresivní vliv na imunitní protinádorovou odpověď zprostředkovanou jejich přímým kontaktem s lymfocyty [217, 218].



Obr. 6 - Mechanismus supresivního účinku T regulačních buněk - převzato z Kingston H. G. Mills, 2004 [219].

## Role T regulačních lymfocytů u maligních onemocnění

Mechanismus, kterým Treg lymfocyty inhibují imunitní protinádorovou odpověď, zatím není zcela objasněn a je v stále předmětem mnoha studií. Nejčastěji se usuzuje na potlačení imunitní odpovědi na přítomnost nádorových buněk prostřednictvím sekrece inhibičních cytokinů (IL-10 a TGF- $\beta$  a v poslední době i IL-35) a přímé působení kontaktem mezi efektorovou a supresorovou buňkou, samotný cytotoxický efekt je přisuzován zejména interakci granzymu A, B a perforinu s molekulou CD18. Tento mechanismus byl prokázán při ovlivnění funkce jak B lymfocytů, tak i NK buněk a cytotoxických T lymfocytů [220, 221]. Nově se také přikládá hlubší význam zvýšené expresi adenosinu enzymy CD39 a CD73, které jsou přítomny na povrchu Treg lymfocytů. Adenosin se váže na inhibiční A2A receptor aktivovaných efektorových T buněk a tlumí jejich aktivitu [222]. Zároveň bylo prokázáno, že Treg populace je hlavní překážkou pro imunoterapii a aktivní vakcinaci [223].

V některých pracích je naopak zmiňována pozitivní role Treg při vzniku maligních onemocnění, kde jejich vyšší zastoupení v periferní krvi koreluje s lepší prognózou. I zde přes existenci mnohých hypotéz jasné vysvětlení zatím chybí. Například u hematologických malignit se předpokládá, že inhibiční vliv této skupiny lymfocytů se neomezuje pouze na buňky specifické imunity, ale působí i na TAM a neutrofile, které v nádoru produkují prozánětlivé cytokiny, růstové faktory a pro-angiogenní molekuly a tak stimulují neoangiogenezi a nádorový růst [224, 225]. Experimentálně byla prokázána schopnost Treg potlačit zánětlivou odpověď iniciovanou mechanismy přirozené buněčné imunity [226]. Lze tedy předpokládat, že porozumění přesného významu a funkce T regulačních buněk napomůže i k lepšímu efektu protinádorové imunoterapie.

## Publikace č.4

Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V, Hladikova M, Betka J, Eckschlager T, Rihova B. *Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Cell Mol Med, 2010. 14(1-2): p. 426-33.

Prognostický význam Treg buněk u nádorových onemocnění doposud nebyl dosud jednoznačně objasněn. Někteří autoři poukazují na korelaci mezi zvýšeným zastoupením Treg populace v periferní cirkulaci pacientů a jejich akumulací v nádorovém mikroprostředí s horší prognózou u některých typů malignit (např. u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu ovaria či prsu) [18-20]. Jiné studie však naopak prokázaly zvýšenou hladinu Treg u pacientů s lepší prognózou - byl například zjištěn vysoký počet infiltrujících Treg lymfocytů u pacientů s folikulárním a Hodgkinským lymfomem nebo u pacientů s kolorektálním karcinomem, kde byla vyšší hodnota Treg asociována s delším časem do progresu onemocnění a delším celkovým přežitím [18, 21]. Přehled vybraných publikací zabývajících se prognostickým významem Treg lymfocytů pro různé nádorové oblasti je uveden v tabulce 2.

<b>Malignancy</b>	<b>N pts</b>	<b>Prognostic value</b>
Breast carcinoma (Bates <i>et al.</i> , 2006)	237	Unfavorable
Breast carcinoma (Gobert <i>et al.</i> , 2009)	191	Unfavorable
Colorectal carcinoma (Salama <i>et al.</i> , 2009)	967	Favorable
Cervix carcinoma (Jordanova <i>et al.</i> , 2008)	115	Unfavorable
Esophagus carcinoma (Yoshioka <i>et al.</i> , 2008)	122	Not significant
Gastric carcinoma (Mizukami <i>et al.</i> , 2008)	80	Unfavorable (*)
Head & neck carcinoma (Badoual <i>et al.</i> , 2006)	84	Favorable
Hepatocellular carcinoma (Gao <i>et al.</i> , 2007)	302	Unfavorable
Kidney carcinoma (Siddiqui <i>et al.</i> , 2007)	170	Not significant
Lymphoma (B cell) (Carreras <i>et al.</i> , 2006)	98	Favorable
Lymphoma (Hodgkin) (Alvaro <i>et al.</i> , 2005)	257	Favorable
Ovary carcinoma (Curiel <i>et al.</i> , 2004)	104	Unfavorable
Pancreatic carcinoma (Hiraoka <i>et al.</i> , 2006)	198	Unfavorable

Tab. 2 - Prognostická role Treg lymfocytů u různých druhů malignit. Převzato z Martin, 2010 [227].

V naší studii, která obsahovala 112 pacientů s verifikovaným spinocelulárním karcinomem v oblasti hlavy a krku, jsme sledovali změny v zastoupení jednotlivých



subpopulací lymfocytů a nádorových markerů v periferní krvi v době stanovení diagnózy a 1 rok po ukončení léčby. Ze vzorků periferní krve bylo provedeno biochemické vyšetření (IgG, IgA, IgM, IgE, CRP, SCC, AAT, CEA, Cyfra 21-1), vyšetření krevního obrazu s diferenciálním počtem a vyšetření základních lymfocytárních subpopulací, včetně Treg (CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD8+, CD4+/CD8+, CD14+, CD19+, CD45+, CD56+, CD4+CD45RA, CD3-CD56+).

Naše práce prokázala výrazné odchylky v absolutním počtu i procentuálním zastoupení CD8+ i CD4+ lymfocytů, počtu NK buněk i B lymfocytů u sledovaných skupin. Procento T regulačních lymfocytů bylo v periferní krvi pacientů se spinocelulárním karcinomem v oblasti hlavy a krku signifikantně zvýšené oproti zdravým kontrolám. Navíc se podařilo prokázat korelaci zvýšeného počtu Treg v periferní krvi pacientů v době stanovení diagnózy a časně recidivy onemocnění.

Tyto výsledky je však nutné ověřit i v širších souvislostech. Některé studie uvádějí jako mnohem důležitější parametr pro riziko recidivy poměr mezi CD8+ T lymfocyty a Treg buňkami než hodnotu samotných Treg [228]. Dále může hrát významnou roli i pokročilost onemocnění - u pacientek s ovariálním karcinomem je bez závislosti na stádiu onemocnění zastoupení Treg buněk asociováno s horší prognózou, ovšem u pacientů s pokročilým stádiem nebo v případě metastatického postižení je absolutní počet nádor infiltrujících Treg naopak nezávislým faktorem pro delší přežití [229].

V budoucnu by však naše výsledky mohly přispět k zpřesnění léčebné strategie i při následném sledování pacientů po ukončení léčby např. zařazením stanovení hladiny Treg lymfocytů v periferní krvi do pravidelných dispenzarizačních vyšetření.

## Závěry a shrnutí výsledků dizertační práce

- V **publikaci č. 1** bylo zjištěno, že pacienti s vyšším stupněm závislosti na tabáku mají vyšší riziko výskytu rakoviny hlavy a krku než pacienti s nízkou či žádnou závislostí. Přitom však není rozhodující množství vykouřených cigaret za den. Obzvláště rizikovým faktorem se zdá být dřívější doba vykouření první ranní cigarety. Dále bylo potvrzeno, že riziko vzniku nádoru hlavy a krku u pacientů, kteří přestali kouřit, je stejné jako u nekuřáků, a to i když dříve byli vysoce závislí na tabáku.
- V **publikaci č. 2** bylo potvrzeno, že stromální prostředí nádorových kolonií zvyšuje podíl nízce diferencovaných buněk svou charakteristikou přibližujících se CSC. Zároveň se v průběhu kultivace udržuje tento stav na konstantní úrovni. Studie tedy potvrdila význam prostředí a délky epitel-mesenchymální komunikace na konzervaci určitého *poolu* nádorových buněk ve stádiu blízkému kmenovému.
- V **publikaci č. 3** bylo prokázáno, že po léčbě HPMA konjugáty bylo v nádorovém mikroprostředí výrazně vyšší zastoupení u CD3+, CD4+ a CD8+ T-lymfocytárních subpopulací i u NK buněk než po léčbě volným doxorubicinem. Navíc tyto rozdíly byly patrné již mezi 3-5. dnem po podání léčiva, tedy v době, kdy zatím nebylo možné makroskopicky určit, zda nádor roste či regreduje. Byl tedy potvrzen chemoterapeutický a současně imunoterapeutický efekt HPMA léčiv. Dále byla po léčbě HPMA konjugáty zjištěna výrazně nižší infiltrace nádorovými buňkami ve spádových lymfatických uzlinách i ve slezině než po léčbě nekonjugovaným léčivem. Použitá HPMA léčiva tedy nemají efekt pouze proti primárnímu nádoru, ale dokážou i zpomalit metastatický rozsev.
- V **publikaci č. 4** byly zjištěny výrazné odchylky v absolutním počtu i v procentuálním zastoupení CD8+ i CD4+ lymfocytů, počtu NK buněk i B lymfocytů u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku proti kontrolní skupině, procentuální zastoupení Treg populace bylo v periferní krvi dokonce signifikantně zvýšené oproti zdravým jedincům. Navíc se podařilo prokázat korelaci zvýšeného počtu Treg lymfocytů v periferní krvi pacientů v době stanovení diagnózy a časně recidivy onemocnění.

## Seznam použitých zkratk

ABC	ATP binding cassette
ADDC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AFP	$\alpha$ -1-fetoprotein
APC	antigen presenting cells
BRCA 1-2	breast cancer type 1-2 susceptibility protein
CA 19-9, 15-3, 72-4	carbohydrate antigen
CD 1-300	cluster of differentiation
CDC	complement dependent cytotoxicity
CEA	carcinoembryonal antigen
CLL	chronic lymphocyte leukemia
CRT	Calreticulin
CSC	cancer stem cells
CTLA-4	cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXC	Chemokine
CYFRA 21-1	cytokeratin fragments
DDS	drug delivery systems
EBV	virus Epstein-Barr
EGFR/ErbB1/HER 1	epidermal growth factor receptor
EMI	epitel-mezenchymal interaction
EPR	enhanced permeability and retention effect
FaDu	spinocelular hypopharyngeal carcinoma cell line
FNAB	fine needle aspiration biopsy
Foxp3	forkhead box P3
Gal-1	Galactokinase
GFLG	GlyPheLeuGly peptidic spacer
GITR	glucocorticoid-induced TNFR family related gene
hCG	human chorionic gonadotropin
HHV	human herpes virus
HIV	human immunodeficiency virus
HMGB-1	high mobility group box-1
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid

HPV	human papillomavirus
IDO	indolamin-2,3-dioxygenase
IL	Interleukin
MALT	mucosa-associated lymphatic tissue
MDR	multi-drug resistance
MHC	major histocompatibility complex
NHL	non-Hodkgin lymphoma
NK	natural killer
NNK	4-metylnitrosamin-1-(3-pyridyl)-1-butanon
OVCAR	ovarial carcinoma cell line
P2RX7	P2X purinoceptor
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PD-1	programmed cell death protein 1
PEG	Polyethylenglykol
PSA	prostate specific antigen
S-100 beta	calcium binding protein B
SMANCS	neocarcinostatin stimalamer
SP	side population
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
TAA	tumor associated antigen
TAM	tumor associated macrophages
TGF	transforming growth factor
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TLR	toll like receptor
Treg	T regulatory lymphocyte
TSA	tumor specific antigen
VEGF	vascular endothelial growth factor

## Literatura

1. ÚZIS, Z.r.Č.r., *Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010*, 2013.
2. Dušek, L., Mužík, J., Abrahámová, J., Pavlík, T., Májek, O., Koptíková, J., Vyzula, R., Fínek, J., Vorlíček, J., *Epidemiologie solidních nádorů v ČR podle dat Národního onkologického registru za období 1977-2007*. ZDN, 2010. **12**(3).
3. Statistic, O.f.N. *Lung cancer incidence and mortality rates affected by changing smoking habits*. Part of Cancer Statistics Registrations, 2011. **42**.
4. Shiboski, C.H., B.L. Schmidt, and R.C. Jordan, *Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years*. *Cancer*, 2005. **103**(9): p. 1843-9.
5. Hammarstedt, L., et al., *Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(11): p. 2620-3.
6. Cancer, W.G.-I.A.f.R.o. *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. 2012; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
7. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
8. Dusek, L., et al., *[Epidemiology and treatment of colorectal carcinoma--Czech population data]*. *Rozhl Chir*, 2009. **88**(6): p. 295-302.
9. R., P., *HPV vakcinace - revoluce v prevenci nejen karcinomu děložního čípku?* *Postgraduální medicína*, 2011. **13**(8): p. 909-912.
10. Trottier, H., et al., *Type-specific duration of human papillomavirus infection: implications for human papillomavirus screening and vaccination*. *J Infect Dis*, 2008. **197**(10): p. 1436-47.
11. Lagiou, P., et al., *Alcohol-related cancers and genetic susceptibility in Europe: the ARCAGE project: study samples and data collection*. *Eur J Cancer Prev*, 2009. **18**(1): p. 76-84.
12. Deheinzelin, D., et al., *The level of nicotine dependence is an independent risk factor for cancer: a case control study*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2005. **60**(3): p. 221-6.
13. Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke, *Cancer stem cells: models and concepts*. *Annu Rev Med*, 2007. **58**: p. 267-84.
14. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
15. Rihova, B. and M. Kovar, *Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010. **62**(2): p. 184-91.
16. Rihova, B., et al., *Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data*. *J Control Release*, 2003. **91**(1-2): p. 1-16.
17. Kovar, L., et al., *Doxorubicin attached to HPMA copolymer via amide bond modifies the glycosylation pattern of EL4 cells*. *Tumour Biol*, 2010. **31**(4): p. 233-42.
18. Salama, P., et al., *Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(2): p. 186-92.
19. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 942-9.
20. Bates, G.J., et al., *Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(34): p. 5373-80.
21. Carreras, J., et al., *High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma*. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 2957-64.
22. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science*, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
23. Mendelsohn J, H.P., Israel MA, Liotta LA, *The Molecular Basis of Cancer*. 2001, Philadelphia: W. B. Saunders Comp.
24. Anantharaman, D., et al., *Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer*. *Oral Oncol*, 2011. **47**(8): p. 725-31.

25. Hashibe, M., et al., *Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(10): p. 777-89.
26. Mansour, O.I., C.H. Snyderman, and F. D'Amico, *Association between tobacco use and metastatic neck disease*. Laryngoscope, 2003. **113**(1): p. 161-6.
27. Moyses, R.A., et al., *Significant differences in demographic, clinical, and pathological features in relation to smoking and alcohol consumption among 1,633 head and neck cancer patients*. Clinics (Sao Paulo), 2013. **68**(6): p. 738-44.
28. Sorensen, L.T., *Wound healing and infection in surgery. The clinical impact of smoking and smoking cessation: a systematic review and meta-analysis*. Arch Surg, 2012. **147**(4): p. 373-83.
29. Zhang, Z.F., et al., *Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(10): p. 1043-9.
30. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
31. Hecht, S.S., *Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms*. Langenbecks Arch Surg, 2006. **391**(6): p. 603-13.
32. Shimada, T. and Y. Fujii-Kuriyama, *Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1*. Cancer Sci, 2004. **95**(1): p. 1-6.
33. Luch, A., *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. 2005, London: Imperial College Press.
34. Akopyan, G. and B. Bonavida, *Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis*. Int J Oncol, 2006. **29**(4): p. 745-52.
35. Hecht, S.S. and D. Hoffmann, *Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke*. Carcinogenesis, 1988. **9**(6): p. 875-84.
36. Hecht, S.S., et al., *Induction of oral cavity tumors in F344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff*. Cancer Res, 1986. **46**(8): p. 4162-6.
37. Hoffmann, D., M.V. Djordjevic, and I. Hoffmann, *The changing cigarette*. Prev Med, 1997. **26**(4): p. 427-34.
38. Hakenwerth, A.M., et al., *Effects of polymorphisms in alcohol metabolism and oxidative stress genes on survival from head and neck cancer*. Cancer Epidemiol, 2013. **37**(4): p. 479-91.
39. Muscat, J.E., et al., *Nicotine dependence phenotype, time to first cigarette, and risk of head and neck cancer*. Cancer, 2011. **117**(23): p. 5377-82.
40. Matsuo, K., et al., *Time to first cigarette and upper aerodigestive tract cancer risk in Japan*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(11): p. 1986-92.
41. Fagerstrom, K.O. and N.G. Schneider, *Measuring nicotine dependence: a review of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire*. J Behav Med, 1989. **12**(2): p. 159-82.
42. Chang, K.C., et al., *Pathogenesis of viruses-associated human cancers: Epstein-Barr virus and hepatitis B virus as two examples*. J Formos Med Assoc, 2013.
43. Furumoto, H. and M. Irahara, *Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer*. J Med Invest, 2002. **49**(3-4): p. 124-33.
44. Tran, N., B.R. Rose, and C.J. O'Brien, *Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer*. Head Neck, 2007. **29**(1): p. 64-70.
45. Wakisaka, N. and M. Furukawa, *[EBV and nasopharyngeal carcinoma]*. Nihon Rinsho, 2006. **64 Suppl 3**: p. 647-50.
46. Feller, L., et al., *HIV-associated oral Kaposi sarcoma and HHV-8: a review*. J Int Acad Periodontol, 2007. **9**(4): p. 129-36.
47. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.
48. Chaturvedi, A.K., et al., *Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States*. J Clin Oncol, 2008. **26**(4): p. 612-9.

49. Termine, N., et al., *HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007)*. *Ann Oncol*, 2008. **19**(10): p. 1681-90.
50. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(8): p. 781-9.
51. Hoque, M.O., et al., *Dysfunction of the p53 tumor suppressor pathway in head and neck cancer*. *Int J Oncol*, 2002. **21**(1): p. 119-26.
52. zur Hausen, H., *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(9): p. 690-8.
53. Vidal, L. and M.L. Gillison, *Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2008. **22**(6): p. 1125-42, vii.
54. Albers, A., et al., *Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 11146-55.
55. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
56. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
57. Huntly, B.J. and D.G. Gilliland, *Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 311-21.
58. Schepers, A.G., et al., *Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas*. *Science*, 2012. **337**(6095): p. 730-5.
59. Krivtsov, A.V., et al., *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9*. *Nature*, 2006. **442**(7104): p. 818-22.
60. Dingli, D. and F. Michor, *Successful therapy must eradicate cancer stem cells*. *Stem Cells*, 2006. **24**(12): p. 2603-10.
61. Dean, M., T. Fojo, and S. Bates, *Tumour stem cells and drug resistance*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 275-84.
62. Challen, G.A. and M.H. Little, *A side order of stem cells: the SP phenotype*. *Stem Cells*, 2006. **24**(1): p. 3-12.
63. Tsai, R.Y. and R.D. McKay, *A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells*. *Genes Dev*, 2002. **16**(23): p. 2991-3003.
64. Scadden, D.T., *The stem-cell niche as an entity of action*. *Nature*, 2006. **441**(7097): p. 1075-9.
65. Li, L. and T. Xie, *Stem cell niche: structure and function*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 605-31.
66. Elenbaas, B. and R.A. Weinberg, *Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation*. *Exp Cell Res*, 2001. **264**(1): p. 169-84.
67. Elenbaas, B., et al., *Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells*. *Genes Dev*, 2001. **15**(1): p. 50-65.
68. Costea, D.E., et al., *Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma*. *Oral Dis*, 2006. **12**(5): p. 443-54.
69. Lacina, L., et al., *Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture*. *Int J Radiat Biol*, 2007. **83**(11-12): p. 837-48.
70. Plzak, J., et al., *Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(2): p. 455-62.
71. Malanchi, I., et al., *Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization*. *Nature*, 2012. **481**(7379): p. 85-9.
72. Ferda, J., Mírka, H., Duras, P., Kreuzberg, B., *Diagnostické zobrazení Mikrosvětla a Makrosvětla nádorů*. *Ces Radiol*, 2010. **64**(Suppl. 1): p. 7-23.
73. Larson, S.M. and H. Schoder, *New PET tracers for evaluation of solid tumor response to therapy*. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2009. **53**(2): p. 158-66.

74. Springer, D., Valík, D., Topolčan, O., Nekulová, M., Zdražilová Dubská, L., Malbohan, I., Fuchsová, R., Svobodová, Š., Zima, T., *Nádorové markery v klinické praxi*. Postgraduální medicína, 2013. **15**: p. 40-50.
75. Wu, J., *Circulating Tumor Markers of the New Millennium. Target Therapy, Early Detection, and Prognosis*. 2002, Washington: AACR Press.
76. Machova, I., Brázdová, A., Fusek, M., Zídková, J., *Nádorové markery a jejich využití v klinické praxi*. Chemické listy, 2012(106): p. 16-19.
77. Primo, D., et al., *Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities*. Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1124-9.
78. Narod, S.A. and L. Salmena, *BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer*. Discov Med, 2011. **12**(66): p. 445-53.
79. Pegram, M.D., G. Pauletti, and D.J. Slamon, *HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52**(1-3): p. 65-77.
80. Knauer, S.K., *Prognostic and therapeutic potential of nuclear receptors in head and neck squamous cell carcinomas*. J Oncol, 2009. **2009**: p. 349205.
81. Shah, J.P. and Z. Gil, *Current concepts in management of oral cancer--surgery*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 394-401.
82. Marescaux, J., et al., *Transcontinental robot-assisted remote telesurgery: feasibility and potential applications*. Ann Surg, 2002. **235**(4): p. 487-92.
83. Rieger, J.M., et al., *Functional outcomes after surgical reconstruction of the base of tongue using the radial forearm free flap in patients with oropharyngeal carcinoma*. Head Neck, 2007. **29**(11): p. 1024-32.
84. Macháček, J., *Radioterapie - jedna ze základních léčebných metod v onkologii*. Postgraduální medicína, 2002(36).
85. Delaney, G., J. Matheson, and R. Smee, *Stereotactic radiosurgery: an alternative approach to the management of acoustic neuromas*. Med J Aust, 1992. **156**(6): p. 440.
86. Smith, A.R., *Vision 20/20: proton therapy*. Med Phys, 2009. **36**(2): p. 556-68.
87. Lundkvist, J., et al., *Proton therapy of cancer: potential clinical advantages and cost-effectiveness*. Acta Oncol, 2005. **44**(8): p. 850-61.
88. Ogawara, D., et al., *Efficacy and safety of amrubicin hydrochloride for treatment of relapsed small cell lung cancer*. Cancer Manag Res, 2010. **2**: p. 191-5.
89. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8643-53.
90. Saijo, N., *[History of cancer chemotherapy; from cytotoxic drugs to molecular targeted therapy]*. Nihon Rinsho, 2012. **70 Suppl 8**: p. 18-23.
91. Klener, P., *Klinická onkologie*. 2002, Praha: Galén.
92. Monsuez, J.J., et al., *Cardiac side-effects of cancer chemotherapy*. Int J Cardiol, 2010. **144**(1): p. 3-15.
93. Taguchi, T., *[Side effects of cancer chemotherapy and steps to deal with them]*. Gan To Kagaku Ryoho, 1995. **22**(14): p. 2017-28.
94. Dodd, M.J., *Side effects of cancer chemotherapy*. Annu Rev Nurs Res, 1993. **11**: p. 77-103.
95. Bianco, R., et al., *Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets*. Eur J Cancer, 2006. **42**(3): p. 290-4.
96. Klener, P., *Cílená terapie v onkologii*. Postgraduální medicína, 2007(8).
97. Adam, Z., Pour, L., Vorlíček, J., *Cílená léčba v onkologii*. Remedia, 2005. **15**: p. 390-404.
98. Labianca, R., N. La Verde, and M.C. Garassino, *Development and clinical indications of cetuximab*. Int J Biol Markers, 2007. **22**(1 Suppl 4): p. S40-6.
99. Sharkey, R.M. and D.M. Goldenberg, *Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(4): p. 226-43.



100. Yagami, H., et al., *Monoclonal antibodies based on hybridoma technology*. Pharm Pat Anal, 2013. **2**(2): p. 249-63.
101. Fanale, M.A. and A. Younes, *Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma*. Drugs, 2007. **67**(3): p. 333-50.
102. Farah, R.A., et al., *The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1998. **8**(3-4): p. 321-56.
103. Trněný M, K.P., *Deset let od úspěšného zavedení první monoklonální protilátky (rituximabu) do léčby lymfomů*. Čas. lék. čes., 2007(146): p. 578–585.
104. Dalle, S., et al., *Monoclonal antibodies in clinical oncology*. Anticancer Agents Med Chem, 2008. **8**(5): p. 523-32.
105. Zamri, N., et al., *Effects of two monoclonal antibodies, MLS128 against Tn-antigen and 1H7 against insulin-like growth factor-I receptor, on the growth of colon cancer cells*. Biosci Trends, 2012. **6**(6): p. 303-12.
106. Bhutani, D. and U.N. Vaishampayan, *Monoclonal antibodies in oncology therapeutics: present and future indications*. Expert Opin Biol Ther, 2013. **13**(2): p. 269-82.
107. Kamimura, T., et al., *Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia*. Cancer Sci, 2011. **102**(11): p. 1929-37.
108. Illidge, T., et al., *Phase II study of gemcitabine and bexarotene (GEMBEX) in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma*. Br J Cancer, 2013. **109**(10): p. 2566-73.
109. Ehrlich, P., *Studies in immunity*, in Plenum 1906: New York.
110. Ringdorf, H., *Structure and properties of pharmacologically active polymers*. J. Polym. Sci., 1975. **Part C: Polym. Symp**: p. 135-153.
111. Kopecek, J. and P. Kopeckova, *HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 122-49.
112. Kopecek, J., *Targetable polymeric anticancer drugs. Temporal control of drug activity*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **618**: p. 335-44.
113. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-84.
114. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul, 2001. **41**: p. 189-207.
115. Noguchi, Y., et al., *Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues*. Jpn J Cancer Res, 1998. **89**(3): p. 307-14.
116. Rihova, B., *Targeting of drugs to cell surface receptors*. Crit Rev Biotechnol, 1997. **17**(2): p. 149-69.
117. Jelinkova, M., et al., *Targeting of human and mouse T-lymphocytes by monoclonal antibody-HPMA copolymer-doxorubicin conjugates directed against different T-cell surface antigens*. J Control Release, 1998. **52**(3): p. 253-70.
118. Rihova, B., *Antibody-targeted polymer-bound drugs*. Folia Microbiol (Praha), 1995. **40**(4): p. 367-84.
119. Rihova, B., et al., *Antiproliferative effect of a lectin- and anti-Thy-1.2 antibody-targeted HPMA copolymer-bound doxorubicin on primary and metastatic human colorectal carcinoma and on human colorectal carcinoma transfected with the mouse Thy-1.2 gene*. Bioconjug Chem, 2000. **11**(5): p. 664-73.
120. Milane, L., Z. Duan, and M. Amiji, *Development of EGFR-targeted polymer blend nanocarriers for combination paclitaxel/lonidamine delivery to treat multi-drug resistance in human breast and ovarian tumor cells*. Mol Pharm, 2011. **8**(1): p. 185-203.
121. O'Hare, K.B., et al., *Polymeric drug-carriers containing doxorubicin and melanocyte-stimulating hormone: in vitro and in vivo evaluation against murine melanoma*. J Drug Target, 1993. **1**(3): p. 217-29.

122. Pimm, M.V., et al., *Targeting of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugate to the hepatocyte galactose-receptor in mice: visualisation and quantification by gamma scintigraphy as a basis for clinical targeting studies*. J Drug Target, 1993. **1**(2): p. 125-31.
123. Wu, W., et al., *Antitumor activity of folate-targeted, paclitaxel-loaded polymeric micelles on a human esophageal EC9706 cancer cell line*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 3487-502.
124. Chilkoti, A., et al., *Targeted drug delivery by thermally responsive polymers*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(5): p. 613-30.
125. Kinoshita, M., *Targeted drug delivery to the brain using focused ultrasound*. Top Magn Reson Imaging, 2006. **17**(3): p. 209-15.
126. Gasselhuber, A., et al., *Targeted drug delivery by high intensity focused ultrasound mediated hyperthermia combined with temperature-sensitive liposomes: computational modelling and preliminary in vivo validation*. Int J Hyperthermia, 2012. **28**(4): p. 337-48.
127. Etrych, T., et al., *New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties*. J Control Release, 2001. **73**(1): p. 89-102.
128. Rihova, B., et al., *Doxorubicin bound to a HPMA copolymer carrier through hydrazone bond is effective also in a cancer cell line with a limited content of lysosomes*. J Control Release, 2001. **74**(1-3): p. 225-32.
129. Rihova, B., et al., *Doxorubicin release is not a prerequisite for the in vitro cytotoxicity of HPMA-based pharmaceuticals: in vitro effect of extra drug-free GlyPheLeuGly sequences*. J Control Release, 2008. **127**(2): p. 110-20.
130. Mrkvan, T., et al., *Chemotherapy based on HPMA copolymer conjugates with pH-controlled release of doxorubicin triggers anti-tumor immunity*. J Control Release, 2005. **110**(1): p. 119-29.
131. D'Mello, S.R., et al., *Microparticles prepared from sulfenamide-based polymers*. J Microencapsul, 2014. **31**(2): p. 137-46.
132. Hruby, M., et al., *Thermoresponsive polymeric radionuclide delivery system--an injectable brachytherapy*. Eur J Pharm Sci, 2011. **42**(5): p. 484-8.
133. Duncan, R., *Polymer-anticancer drug conjugates*, in *Handbook of Anticancer Drug Development*. 2003, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. p. 239-260.
134. Rihova, B. and I. Riha, *Immunological problems of polymer-bound drugs*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1985. **1**(4): p. 311-74.
135. Rihova, B., et al., *Antibody-directed affinity therapy applied to the immune system: in vivo effectiveness and limited toxicity of daunomycin conjugated to HPMA copolymers and targeting antibody*. Clin Immunol Immunopathol, 1988. **46**(1): p. 100-14.
136. Rossmann, P., et al., *Morphology of rat kidney and thymus after native and antibody-coupled cyclosporin A application (reduced toxicity of targeted drug)*. Folia Microbiol (Praha), 1997. **42**(3): p. 277-87.
137. Seymour, L.W., et al., *Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(5): p. 766-70.
138. Jatzkewitz, H., *Peptamin (glycyl-L-leucyl-mescaline) bound to blood plasma expander (polyvinylpyrrolidone) as a new depot form of a biologically active primary amine (mescaline)*. Z. Naturforsch., 1955. **10b**: p. 27-31.
139. Mathé, G., Loc, T.B., Bernard, J., *Effect sur la leucémie L1210 de la souris d'une combinaison par diazotation d'a méthoptérine et de globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogrefe*. C. R. Acad. Sci. 3, 1958: p. 1626-1628.
140. Kopecek, J., Bazilova, H., *Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]—I. Radical polymerization and copolymerization*. 1973. **9**(1): p. 7-14.

141. Vasey, P.A., et al., *Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates*. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. Clin Cancer Res, 1999. **5**(1): p. 83-94.
142. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
143. Yokoyama, M., et al., *Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer*. Cancer Res, 1990. **50**(6): p. 1693-700.
144. Abuchowski, A., et al., *Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase*. J Biol Chem, 1977. **252**(11): p. 3582-6.
145. Milla, P., F. Dosio, and L. Cattel, *PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery*. Curr Drug Metab, 2012. **13**(1): p. 105-19.
146. Harris, J.M. and R.B. Chess, *Effect of pegylation on pharmaceuticals*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(3): p. 214-21.
147. Sharpe, M., et al., *Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin: a review of its use in the management of solid and haematological malignancies and AIDS-related Kaposi's sarcoma*. Drugs, 2002. **62**(14): p. 2089-126.
148. Green, A.E. and P.G. Rose, *Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**(3): p. 229-39.
149. Lao, J., et al., *Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review*. J Drug Deliv, 2013. **2013**: p. 456409.
150. Fassas, A. and A. Anagnostopoulos, *The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia*. Leuk Lymphoma, 2005. **46**(6): p. 795-802.
151. McClune, B., et al., *Intrathecal liposomal cytarabine for prevention of meningeal disease in patients with acute lymphocytic leukemia and high-grade lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**(9): p. 1849-51.
152. Huang, M.E., et al., *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1988. **72**(2): p. 567-72.
153. Stathopoulos, G.P., *Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation*. Anticancer Drugs, 2010. **21**(8): p. 732-6.
154. Lavasanifar, A., J. Samuel, and G.S. Kwon, *Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(2): p. 169-90.
155. O'Shaughnessy, J., et al., *Nab-paclitaxel for first-line treatment of patients with metastatic breast cancer and poor prognostic factors: a retrospective analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **138**(3): p. 829-37.
156. Von Hoff, D.D., et al., *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. N Engl J Med, 2013. **369**(18): p. 1691-703.
157. Lyseng-Williamson, K.A. and C. Fenton, *Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer*. Drugs, 2005. **65**(17): p. 2513-31.
158. Ravery, V., et al., *The use of estramustine phosphate in the modern management of advanced prostate cancer*. BJU Int, 2011. **108**(11): p. 1782-6.
159. Kopeček, J., Rejmanová, P., Strohalm, J., Ulbrich, K., Říhová, B., Chytrý, V., Duncan, R., Lloyd, JB, *Sythetic polymeric drugs*, in *Czech Patent Application*1985.
160. Duncan, R., et al., *Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12 Suppl 1**: p. S189-99.
161. Říhová, B., Kopeček, J., *Biological properties of targetable poly[N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide]-antibody conjugates*. J. Control. Rel., 1985. **2**: p. 289-310.

162. Kovar, L., et al., *The same drug but a different mechanism of action: comparison of free doxorubicin with two different N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-bound doxorubicin conjugates in EL-4 cancer cell line*. *Bioconjug Chem*, 2007. **18**(3): p. 894-902.
163. Julyan, P.J., et al., *Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine*. *J Control Release*, 1999. **57**(3): p. 281-90.
164. Rihova, B., *Clinical experience with anthracycline antibiotics-HPMA copolymer-human immunoglobulin conjugates*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(13): p. 1149-58.
165. Rihova, B.J., A.; Strohmalm, J.; Matha, V.; Rossmann, P.; Fornusek, L.; Ulbrich, K., *Antibody-targeted cyclosporin A*. *J. Control. Rel.*, 1992. **19**(1-3 March): p. 25-39.
166. Lu, Z.R., et al., *Design of novel bioconjugates for targeted drug delivery*. *J Control Release*, 2002. **78**(1-3): p. 165-73.
167. Duncan, R., *Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy*. *Anticancer Drugs*, 1992. **3**(3): p. 175-210.
168. Gianasi, E., et al., *HPMA copolymers platinates containing dicarboxylato ligands. Preparation, characterisation and in vitro and in vivo evaluation*. *J Drug Target*, 2002. **10**(7): p. 549-56.
169. Ulbrich, K., et al., *Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation*. *J Control Release*, 2000. **64**(1-3): p. 63-79.
170. Hovorka, O., et al., *HPMA based macromolecular therapeutics: internalization, intracellular pathway and cell death depend on the character of covalent bond between the drug and the peptidic spacer and also on spacer composition*. *J Drug Target*, 2006. **14**(6): p. 391-403.
171. Etrych, T., Mrkvan, T., Chytil, P., Konak, C., Rihova, B., Ulbrich, K., *N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin. I. New synthesis, physicochemical characterization and preliminary biological evaluation*. *J Applied Polymer Science*, 2008. **109**(5): p. 3050-3061.
172. Sirova, M., et al., *HPMA copolymer-bound doxorubicin induces immunogenic tumor cell death*. *Curr Med Chem*, 2013. **20**(38): p. 4815-26.
173. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 54-61.
174. Apetoh, L., et al., *Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies*. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4026-30.
175. Kovar, M., et al., *HPMA copolymers containing doxorubicin bound by a proteolytically or hydrolytically cleavable bond: comparison of biological properties in vitro*. *J Control Release*, 2004. **99**(2): p. 301-14.
176. Rihova B., K.N.L., Kopecek J., *Targetable Photoactivatable Drugs Journal of Material Science. Materials in Medicine*, 1991. **2**: p. 238-241.
177. Omelyanenko, V., et al., *HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. 1. influence of the method of synthesis on the binding affinity to OVCAR-3 ovarian carcinoma cells in vitro*. *J Drug Target*, 1996. **3**(5): p. 357-73.
178. Omelyanenko, V., et al., *HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(4): p. 600-8.
179. St'astny, M., et al., *A possibility to overcome P-glycoprotein (PGP)-mediated multidrug resistance by antibody-targeted drugs conjugated to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer carrier*. *Eur J Cancer*, 1999. **35**(3): p. 459-66.
180. Minko, T., P. Kopeckova, and J. Kopecek, *Chronic exposure to HPMA copolymer-bound adriamycin does not induce multidrug resistance in a human ovarian carcinoma cell line*. *J Control Release*, 1999. **59**(2): p. 133-48.
181. Rihova, B., et al., *Induction of systemic antitumour resistance with targeted polymers*. *Scand J Immunol*, 2005. **62 Suppl 1**: p. 100-5.

182. Rihova, B., et al., *Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 11-7.
183. Rihova, B., *Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(5): p. 653-74.
184. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
185. Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity*. Adv Immunol, 2006. **90**: p. 1-50.
186. Kawakami, Y., et al., *Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer*. Cancer Sci, 2004. **95**(10): p. 784-91.
187. Hořejší V., B.J., *Základy imunologie - V. vydání*. 2013, Praha: Triton.
188. Abbas, A.K.L., A.H.; Pillai, S., *Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition*. 2012, Philadelphia: Elsevier/Saunders, c2012.
189. Zitvogel, L., et al., *The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?* J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 1991-2001.
190. Green, D.R., et al., *Immunogenic and tolerogenic cell death*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 353-63.
191. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
192. Brutkiewicz, R.R. and V. Sriram, *Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **41**(3): p. 287-98.
193. Kirkwood, J., *Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience*. Semin Oncol, 2002. **29**(3 Suppl 7): p. 18-26.
194. Windbichler, G.H., et al., *Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial*. Br J Cancer, 2000. **82**(6): p. 1138-44.
195. Borden, E.C. and F.R. Balkwill, *Preclinical and clinical studies of interferons and interferon inducers in breast cancer*. Cancer, 1984. **53**(3 Suppl): p. 783-9.
196. Sica, A., P. Allavena, and A. Mantovani, *Cancer related inflammation: the macrophage connection*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 204-15.
197. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
198. Obeid, E., et al., *The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review)*. Int J Oncol, 2013. **43**(1): p. 5-12.
199. Behnes, C.L., et al., *Tumor-associated macrophages are involved in tumor progression in papillary renal cell carcinoma*. Virchows Arch, 2014. **464**(2): p. 191-6.
200. Ferrone, S. and T.L. Whiteside, *Tumor microenvironment and immune escape*. Surg Oncol Clin N Am, 2007. **16**(4): p. 755-74, viii.
201. Rabinovich, G.A., D. Gabilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
202. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
203. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
204. Martin, F., et al., *Human FOXP3 and cancer*. Oncogene, 2010. **29**(29): p. 4121-9.
205. Zheng, S.G., et al., *Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5213-21.
206. Chatenoud, L., *Natural and induced T CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells*. Methods Mol Biol, 2011. **677**: p. 3-13.
207. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.

208. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 801-5.
209. Tran, G.T., et al., *IL-5 promotes induction of antigen-specific CD4+CD25+ T regulatory cells that suppress autoimmunity*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4441-50.
210. Groux, H. and F. Cottrez, *The complex role of interleukin-10 in autoimmunity*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 281-5.
211. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 207-14.
212. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
213. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
214. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
215. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
216. Huang, Y., et al., *Tumor-infiltrating FoxP3+ Tregs and CD8+ T cells affect the prognosis of hepatocellular carcinoma patients*. Digestion, 2012. **86**(4): p. 329-37.
217. Pomie, C., I. Menager-Marcq, and J.P. van Meerwijk, *Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era*. Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 708-14.
218. Kapp, J.A., *Special regulatory T-cell review: Suppressors regulated but unsuppressed*. Immunology, 2008. **123**(1): p. 28-32.
219. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 841-55.
220. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
221. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
222. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
223. Whiteside, T.L., *Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(7): p. 633-42.
224. Venet, F., et al., *Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6540-7.
225. Mitchem, J.B., et al., *Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1128-41.
226. Maloy, K.J., et al., *CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 111-9.
227. Martin, F.e.a., *Human FOXP3 and cancer*. Oncogene, 2010. **49**(49): p. 4121-9.
228. Gao, Q., et al., *Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection*. J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2586-93.
229. Leffers, N., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(3): p. 449-59.

## **Přílohy**

- **Publikace č. 1**
- **Publikace č. 2**
- **Publikace č. 3**
- **Publikace č. 4**

# Smoking addiction and the risk of upper-aerodigestive-tract cancer in a multicenter case–control study

Yuan-Chin Amy Lee<sup>1</sup>, Daniela Zugna<sup>2</sup>, Lorenzo Richiardi<sup>2</sup>, Franco Merletti<sup>2</sup>, Manuela Marron<sup>3</sup>, Wolfgang Ahrens<sup>4</sup>, Hermann Pohlabein<sup>4</sup>, Pagona Lagiou<sup>5</sup>, Dimitrios Trichopoulos<sup>6</sup>, Antonio Agudo<sup>7</sup>, Xavier Castellsague<sup>7</sup>, Jaroslav Betka<sup>8</sup>, Ivana Holcatova<sup>8</sup>, Kristina Kjaerheim<sup>9</sup>, Gary J. Macfarlane<sup>10</sup>, Tatiana V. Macfarlane<sup>10</sup>, Renato Talamini<sup>11</sup>, Luigi Barzan<sup>12</sup>, Cristina Canova<sup>13</sup>, Lorenzo Simonato<sup>13</sup>, David I. Conway<sup>14,15</sup>, Patricia A. McKinney<sup>15,16</sup>, Peter Thomson<sup>17</sup>, Ariana Znaor<sup>18</sup>, Claire M. Healy<sup>19</sup>, Bernard E. McCartan<sup>19,20</sup>, Paolo Boffetta<sup>21,22</sup>, Paul Brennan<sup>23</sup> and Mia Hashibe<sup>1,24</sup>

<sup>1</sup> Division of Public Health, Department of Family and Preventive Medicine, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT

<sup>2</sup> Unit of Cancer Epidemiology, CeRMS and University of Turin, Turin, Italy

<sup>3</sup> Methods in Community Medicine, University Medicine of the Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald, Greifswald, Germany

<sup>4</sup> Bremen Institute for Prevention Research and Social Medicine, University Bremen, Bremen, Germany

<sup>5</sup> Department of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics, University of Athens Medical School, Athens, Greece

<sup>6</sup> Department of Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, MA

<sup>7</sup> Institut Català d'Oncologia, RTICC/CIBERESP, IDIBELL Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>8</sup> First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>9</sup> Cancer Registry of Norway, Oslo, Norway

<sup>10</sup> School of Medicine and Dentistry, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom

<sup>11</sup> Unit of Epidemiology and Biostatistics, IRCCS, Aviano, Italy

<sup>12</sup> Unit of Otolaryngology, Hospital "S. Maria degli Angeli", Pordenone, Italy

<sup>13</sup> Department of Environmental Medicine and Public Health, University of Padova, Padova, Italy

<sup>14</sup> Dental School, Faculty of Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

<sup>15</sup> NHS NSS, ISD, Edinburgh, United Kingdom

<sup>16</sup> Centre for Epidemiology and Biostatistics, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

<sup>17</sup> Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dental Sciences, Newcastle University, Newcastle, United Kingdom

<sup>18</sup> Croatian National Cancer Registry, Croatian National Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

<sup>19</sup> Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology, School of Dental Science, Trinity College, Dublin, Ireland

<sup>20</sup> Anatomy Department, School of Medicine, Royal College of Surgeons, Dublin, Ireland

<sup>21</sup> The Tisch Cancer Institute and Institute for Translational Epidemiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY

<sup>22</sup> International Prevention Research Institute, Lyon, France

<sup>23</sup> International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

<sup>24</sup> Huntsman Cancer Institute, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT

Although previous studies on tobacco and alcohol and the risk of upper-aerodigestive-tract (UADT) cancers have clearly shown dose-response relations with the frequency and duration of tobacco and alcohol, studies on addiction to tobacco smoking itself as a risk factor for UADT cancer have not been published, to our knowledge. The aim of this report is to assess whether smoking addiction is an independent risk factor or a refinement to smoking variables (intensity and duration) for UADT squamous cell carcinoma (SCC) risk in the multicenter case–control study (ARCAGE) in Western Europe. The analyses included 1,586 ever smoking UADT SCC cases and 1,260 ever smoking controls. Addiction was measured by a modified Fagerström score (first cigarette after waking up, difficulty refraining from smoking in places where it is forbidden and cigarettes per day). Adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) for UADT cancers with addiction variables were estimated with unconditional logistic regression. Among current smokers, the participants who smoked their first cigarette within 5 min of waking up were two times more likely to develop UADT SCC than those who smoked 60 min after waking up. Greater tobacco smoking addiction was associated with an increased risk of UADT SCC among current smokers (OR = 3.83, 95% CI: 2.56–5.73 for score of 3–7 vs. 0) but not among former smokers. These results may be consistent with a residual effect of

**Key words:** smoking addiction, Fagerström, upper-aerodigestive-tract cancer

**Grant sponsor:** European Community (5th Framework Programme); **Grant number:** QLK1-CT-2001-00182; **Grant sponsors:** University of Athens Medical School and Compagnia di San Paolo and Italian Association for Cancer Research

**DOI:** 10.1002/ijc.28288

**History:** Received 31 Jan 2013; Accepted 25 Apr 2013; Online 30 May 2013

**Correspondence to:** Yuan-Chin Amy Lee, PhD, Division of Public Health, Department of Family and Preventive Medicine, University of Utah School of Medicine, 375 Chipeta Way, Suite A, Salt Lake City, UT 84108, USA, Fax: +1-801-587-3353, E-mail: amy.lee@utah.edu



smoking that was not captured by the questionnaire responses (smoking intensity and smoking duration) alone, suggesting addiction a refinement to smoking variables.

#### What's new?

Previous studies have clearly shown dose-response relationships between tobacco/alcohol use and the risk of upper-aerodigestive-tract (UADT) cancers, but these studies have focused only on the variables of frequency and duration of use. In this study, the authors asked whether addiction to smoking might be an independent risk factor. They found that addiction was indeed associated with UADT cancer risk among current smokers. This addiction-cancer association suggests that it is important to include questions that elicit information regarding smoking addiction when accounting for smoking effect through questionnaire information.

The Fagerström test for nicotine dependence (FTND) is a short version with six questions of Fagerström Tolerance Questionnaire (FTQ),<sup>1</sup> including time to first cigarette after waking up, difficulty refraining from smoking in places where it is forbidden, hate giving up the first cigarette in the morning compared to all the other cigarettes, cigarettes smoked per day, more frequent smoking during the first hour after waking up than the rest of the day and smoking even when ill and in bed most of the day. This test has been widely used because it is convenient for clinical and research purposes as a self-administered measure.<sup>2</sup> To date, in the only published study on Fagerström scores and cancer risk, Deheinzeln *et al.* reported an association between Fagerström Tolerance Questionnaire score  $\geq 7$  and overall cancer risk [pack-year adjusted odds ratio (OR) = 3.45, 95% confidence interval (CI): 1.52–7.83] in a smoking cessation group.<sup>3</sup> A total of 54 cases with a variety of histology and cancer sites were included in the study. Recently, Muscat *et al.* reported an association (pack-year adjusted OR = 1.59, 95% CI: 1.19–2.11 for 1–30 min, compared to >60 min) between time to first cigarette after waking up (one component in Fagerström score) and oral and pharyngeal cancer risk among smokers in a case-control study.<sup>4</sup> Matsuo *et al.* also reported a similar association with adjustment by smoking quantity and duration for upper-aerodigestive-tract (UADT) cancer among ever smokers in Japan.<sup>5</sup>

Tobacco smoking and alcohol drinking behaviors often occur together.<sup>6</sup> Alcohol dependence and tobacco addiction are also correlated.<sup>7</sup> Tobacco smoking and alcohol drinking are well-established risk factors for UADT squamous cell carcinoma (SCC).<sup>8,9</sup> Although previous studies on tobacco and alcohol on the risk of UADT cancers have clearly shown dose-response relations with the frequency and duration of tobacco and alcohol, no studies on addiction to tobacco itself (beyond only one component of Fagerström test) as a risk factor for UADT cancer have been published, to our knowledge. In addition to tobacco smoking, it is likely that smoking addiction is correlated with alcohol drinking, and possibly with socioeconomic status, sex or risky sexual behaviors,<sup>10–12</sup> all of which could act as potential confounders for assessing the relationship between smoking addiction and UADT cancer risk. There is also evidence that questionnaire

information on smoking captures only a part of the relationship between smoking and cancer.<sup>13</sup> Smoking variables including intensity and duration may play a role of a mediator in the relationship between addiction and UADT cancer. We suspect that indicators of tobacco addiction may provide additional information on the smoking and UADT cancer relationship to the usual smoking questions in the surveys.

The aim of this report is to assess whether smoking addiction is a risk factor, independent of tobacco smoking, or a refinement to smoking variables (intensity and duration) for UADT SCC risk in a multicenter case-control study (ARCAGE) in Western Europe. This is the first study investigating the association between smoking addiction and UADT SCC risk with stratification by tobacco smoking. Furthermore, we analyzed whether smoking, including intensity and duration (pack-years), mediates the relationship between time to first cigarette after waking up and UADT SCC.

## Material and Methods

### Study population

Alcohol-Related Cancers and Genetic Susceptibility in Europe (ARCAGE) is a multicenter case-control study with recruitment in 14 centers from ten European countries (Czech Republic, Croatia, France, Germany, Greece, Ireland, Italy, Norway, Spain and United Kingdom). The study was approved by the ethical review board of IARC as well as the respective local boards in the participating centers. All subjects provided written informed consent for their participation in the study.

Details on the study design have been provided previously.<sup>14</sup> Briefly, incident cases were identified from participating hospitals and were histologically or cytologically confirmed. Eligible cases were classified under specific ICD-O codes (C00, C01, C02, C03, C04, C05, C06, C09, C10, C12, C13, C14.0, C14.8, C15.0, C15.3, C15.4, C15.5, C15.8, C15.9 and C32), including cancer of the oral cavity, pharynx (excluding nasopharynx), larynx and esophagus. Recruitment was conducted from 2002 to 2005 for all centers, except for the French center, where recruitment was conducted during 1987–1992. Cases were identified by participating hospitals within 6 months of diagnosis. Six cases were excluded from the analysis

because of missing information on age, sex or education. Among the 2,286 UADT cancer cases, 92.3% of the cases were SCC. We focused our analysis on cases with SCC histology, because the etiology of UADT cancer of other histologies may differ. We also included only ever tobacco smokers, because tobacco smoking addiction was assessed only in people who smoked. The Paris center data were not included because tobacco smoking addiction information was not collected at this center. Of the 1,586 ever smoking UADT SCC cases in the remaining centers, 761 were oral cavity/oropharyngeal cancers, 623 were hypopharyngeal/laryngeal cancer cases, 127 were esophageal cancer cases and 75 were overlapping oral cavity/pharyngeal cancer cases (Table 1).

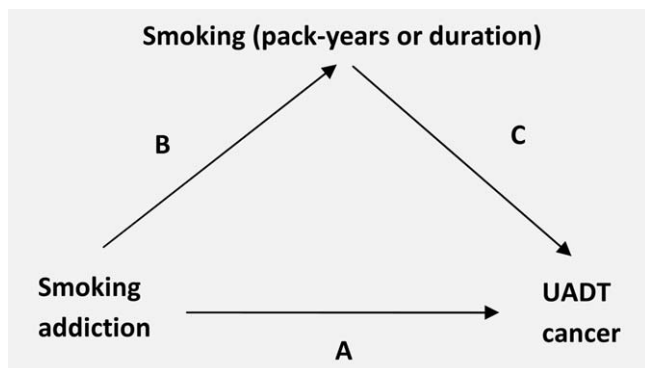
In each center, controls were frequency-matched to cases by sex, age and referral (or residence) area. In the UK centers, population controls were randomly chosen from the same family medical practice list as the corresponding cases. In the remaining centers, hospital controls with a recently diagnosed disease were used, and admission diagnoses related to alcohol, tobacco or dietary practices were excluded. Eligible control admission diagnosis included (i) endocrine and metabolic, (ii) genitourinary, (iii) skin, subcutaneous tissue and musculoskeletal, (iv) gastrointestinal, (v) circulatory, (vi) ear, eye and mastoid and (vii) nervous system diseases as well as (viii) plastic surgery cases and (ix) trauma patients. The proportion of controls within a specific diagnostic group did not exceed 33% of the total. In the UK centers, population controls were recruited from a randomly selected list of ten controls for every case, matched by age, sex and same family medical practice. After excluding six controls because of missing information on age, sex or education and including ever smokers only, 1,260 ever smoking controls were included in the analysis. In the Paris center, smoking addiction information was not collected, so the data were not included in the analysis.

Cases and controls underwent identical interviews during which they completed a lifestyle questionnaire. The questionnaire included information on sociodemographic variables as well as detailed smoking and alcohol drinking histories. The participation rates ranged from 35 to 100% for cases and from 26 to 100% for controls. The UK centers with population-based recruitment had the lowest participation rates compared to the other centers.

Ever smokers were defined as individuals who ever smoked cigarettes, cigars, pipes or any tobacco products at least once a week for a year. Former smokers were defined as smokers who had stopped for at least 12 months. The different types of tobacco smoking were converted to cigarette equivalents (1 cigar = 4 cigarettes and 1 pipe = 3.5 cigarettes). Heatherton *et al.* modified the original Fagerström test (an eight-item questionnaire) to a six-item questionnaire and suggested that with limited resources it might be most effective to score only the time to first cigarette after waking up and number of cigarettes per day.<sup>1</sup> In our analysis, modified Fagerström scores (range 0–7) were calculated by summing the scores from the three variables available in ARCADE: time to first cigarette

**Table 1.** Demographic characteristics of the UADT SCC cases and controls (ever smokers only)

Total		Cases, n (%) 1,586	Controls, n (%) 1,260
Center	Prague	146 (9.21)	118 (9.37)
	Bremen	263 (16.58)	234 (18.57)
	Athens	187 (11.79)	134 (10.63)
	Aviano	119 (7.50)	83 (6.59)
	Padova	113 (7.12)	74 (5.87)
	Turin	125 (7.88)	130 (10.32)
	Dublin	29 (1.83)	13 (1.03)
	Oslo	116 (7.31)	115 (9.13)
	Edinburgh	82 (5.17)	47 (3.73)
	Manchester	130 (8.20)	118 (9.37)
	Newcastle	58 (3.66)	67 (5.32)
	Barcelona	172 (10.84)	95 (7.54)
Zagreb	46 (2.90)	32 (2.54)	
Age (years)			
	<40	25 (1.58)	52 (4.13)
	40–44	57 (3.59)	64 (5.08)
	45–49	157 (9.90)	98 (7.78)
	50–54	252 (15.89)	185 (14.68)
	55–59	327 (20.62)	238 (18.89)
	60–64	273 (17.21)	183 (14.52)
	65–69	232 (14.63)	188 (14.92)
	70–74	158 (9.96)	139 (11.03)
	75+	105 (6.62)	113 (8.97)
	p-value	<0.001	
Sex			
	Men	1,319 (83.17)	1,026 (81.43)
	Women	267 (16.83)	234 (18.57)
	p-value	0.227	
Education			
	Finished primary school/worker	584 (36.82)	312 (24.76)
	Finished further school/clerks	929 (58.58)	845 (67.06)
	University degree/manager	73 (4.60)	103 (8.17)
	p-value	<0.001	
Subsite			
	Controls	1,260 (100.00)	
	Oral/oropharynx	761 (47.98)	
	Hypopharynx/larynx	623 (39.28)	
	Esophagus	127 (8.01)	
	Overlapping	75 (4.73)	



**Figure 1.** Illustration of mediation with smoking addiction as exposure, smoking (pack-year or duration) as mediator and upper-aerodigestive-tract cancer as outcome.

after waking up (after 60 min = 0, within 31–60 min = 1, within 6–30 min = 2 and within 5 min = 3), difficulty to refrain from smoking in places where it is forbidden (no difficulties = 0 and difficulties = 1) and intensity of smoking (<10 cigarettes/day = 0, >10–20 cigarettes/day = 1, >20–30 cigarettes/day = 2 and >30 cigarettes/day = 3). Higher scores indicate more addiction, whereas lower scores suggest less addiction.

### Statistical analysis

For the assessment of main effects of smoking addiction, all ever smoking UADT cancer cases were analyzed both together and stratified by cancer subsite. The distribution of cases and controls by age, center, sex, education and histology was examined. ORs and 95% CIs for UADT cancers with addiction variables (time to first cigarette after waking and difficulty to refrain from smoking) were estimated with unconditional logistic regression, adjusting for center, age, sex, education level (categories shown in Table 1), alcohol consumption (intensity as a continuous variable and duration as a categorical variable) and tobacco smoking pack-years (continuous).

We introduced smoking-related variables (pack-years or duration of use) in the models (Fig. 1) to estimate the direct effect (line A) of addiction on UADT cancer (*i.e.*, the effect that is not mediated by pack-years or duration of use) under specific assumptions, including lack of interaction between addiction and the pack-years/duration of use in causing UADT cancer. We also followed the method suggested by Vanderweele and Vansteelandt<sup>15</sup> that requires testing for exposure–mediator interaction and then combining two regression models [(*i*) with UADT cancer as the outcome and (*ii*) with pack-years as the outcome] to estimate natural direct (line A) and indirect (line B + C) effects, as defined by Pearl.<sup>16</sup> In brief, we considered a framework in which smoking addiction is the exposure, pack-years or duration of use are the mediators and UADT is the outcome of interest. Then, the total effect (line A + line B + C) of smoking addiction on UADT cancer can be decomposed into two effects, a natural indirect effect that is mediated by measured

smoking variables and a natural direct effect that is unmediated by measured smoking variables.

Stratified analyses by cigarettes per day of smoking and cumulative alcohol drinking were performed to evaluate whether the associations observed with time to first cigarette after waking were modified by the amount of tobacco use. Statistical analyses were conducted using the SAS 9 statistical software. All *p*-values were two-sided.

### Results

In this analysis, we included 1,586 UADT SCC cases and 1,260 controls who ever smoked tobacco (Table 1). As expected, there was a higher proportion of the highly educated individuals among the controls (8.17%) than the cases (4.60%). In our initial assessment of the three components in the same regression model for the Fagerström test among current smokers, time to first cigarette after waking up (OR ~ 1.58–2.29) and number of cigarettes smoked per day (OR ~ 1.64–2.27) showed similar associations with UADT SCC risk, but stronger than difficulty to refrain from smoking at places where smoking is prohibited (OR ~ 0.74) (results not shown). Among current smokers, the mean three-item Fagerström scores ( $\pm$ standard deviation) were  $3.70 \pm 1.76$  for cases and  $2.77 \pm 1.90$  for controls; among former smokers, the mean scores were  $2.93 \pm 2.03$  for cases and  $2.35 \pm 2.03$  for controls (data not shown in table).

Among current smokers, an inverse dose-response trend was detected between time to first cigarette after waking up and UADT SCC risk ( $p < 0.001$ ) (Table 2). No association was observed with difficulties of refraining from smoking at a place where smoking is forbidden (results not shown). The participants who smoked the first cigarette within 5 min were two times more likely to develop UADT SCC (OR = 2.22, 95% CI: 1.57–3.15) than those who smoked 60 min after waking up. However, a dose-response trend between time to first cigarette and UADT SCC risk was not observed among former smokers ( $p = 0.998$ ). A higher score on the modified Fagerström test, reflecting greater tobacco smoking addiction, was associated with an increased risk of UADT SCC among current smokers, but not among former smokers. We did not observe any apparent differences across the UADT subsites for relationship between smoking addiction and cancer risk among the current smokers. The relationship between smoking addiction and UADT SCC remained similar with further adjustment by fruit and vegetable consumption (data not shown).

We did not find evidence of interaction between addiction variables and smoking variables. Table 3 shows the natural direct (Fig. 1, line A) and indirect effects (Fig. 1, line B + C) for UADT SCC. Consistently with the results shown in Table 2, we observed that among current smokers most, or the whole, effect was captured by natural direct effects, *i.e.*, effects unmediated by pack-years/duration of use, whereas among former smokers indirect effects, *i.e.*, effects mediated

Table 2. Smoking addiction and UADT SCC risk<sup>1</sup>

	UADT				Oral and oropharynx			Hypopharynx and larynx			Esophagus		
	Co	Ca	OR	95% CI	Ca	OR	95% CI	Ca	OR	95% CI	Ca	OR	95% CI
<b>Current smokers</b>													
First cigarette after waking up													
After 60 min	168	160	1.00		85	1.00		61	1.00		11	1.00	
31–60 min	98	168	1.65	(1.16–2.34)	84	1.68	(1.10–2.57)	60	1.56	(0.97–2.50)	12	2.40	(0.88–6.55)
6–30 min	180	449	2.11	(1.56–2.86)	209	1.94	(1.35–2.79)	178	2.10	(1.40–3.15)	43	4.74	(2.04–10.99)
Within 5 min	109	368	2.22	(1.57–3.15)	188	2.52	(1.68–3.78)	133	1.77	(1.11–2.81)	18	2.25	(0.83–6.06)
<i>p</i> trend				<0.001			<0.001			0.005			0.022
Modified Fagerström													
0	86	50	1.00		30	1.00		13	1.00		6	1.00	
1–2	165	219	2.06	(1.34–3.15)	108	1.72	(1.03–2.88)	83	2.72	(1.39–5.30)	17	1.96	(0.65–5.87)
3–7	303	874	3.83	(2.56–5.73)	427	3.42	(2.11–5.55)	335	4.72	(2.508.93)	61	3.41	(1.24–9.40)
<i>p</i> trend				<0.001			<0.001			<0.001			0.009
<b>Former smokers</b>													
First cigarette after waking up													
After 60 min	303	125	1.00		62	1.00		47	1.00		13	1.00	
31–60 min	114	88	1.54	(1.05–2.24)	42	1.56	(0.96–2.53)	35	1.48	(0.86–2.53)	8	2.09	(0.70–6.21)
6–30 min	153	96	0.97	(0.66–1.41)	44	0.94	(0.57–1.56)	41	1.06	(0.621.82)	8	0.75	(0.23–2.44)
Within 5 min	100	87	1.09	(0.71–1.68)	29	0.90	(0.50–1.62)	50	1.47	(0.83–2.59)	6	1.14	(0.32–4.04)
<i>p</i> trend				0.998			0.588			0.322			0.922
Modified Fagerström													
0	164	53	1.00		30	1.00		17	1.00		4	1.00	
1–2	216	125	1.31	(0.86–1.98)	64	1.35	(0.80–2.28)	44	1.15	(0.60–2.19)	15	3.80	(1.01–14.26)
3–7	286	217	1.23	(0.81–1.85)	83	0.93	(0.55–1.59)	111	1.53	(0.83–2.85)	16	2.51	(0.62–10.11)
<i>p</i> trend				0.482			0.517			0.112			0.404

<sup>1</sup>Adjusted for center, education, sex, age, alcohol drinking frequency and duration and pack-years of smoking (duration of smoking for the Fagerström estimates).

by pack-years/duration of use, were equally strong or larger than direct effects.

When stratified by sex, time to first cigarette after waking up was associated with the risk of UADT SCC among men (adjusted OR = 1.69, 95% CI: 1.26–2.25 for within 5 min), but not among women (adjusted OR = 1.38, 95% CI: 0.72–2.64 for within 5 min, *p* for trend = 0.086) (data not shown). Among women, an association with smoking 6–30 min after waking up (OR = 2.23, 95% CI: 1.30–3.83) was detected (data not shown). Overall, dose-response trends between modified Fagerström scores and UADT SCC risk were detected for both men (*p* < 0.001) and women (*p* = 0.006) (data not shown).

Among current smokers who smoked <10 cigarettes per day, smoking within a short time after waking up was associated with an increased risk of UADT SCC (Table 4). We did not show the results for esophageal cancer because of sparse data. For former smokers, after stratifying by smoking intensity, smoking within a short time after waking up was not associated with the risk of UADT SCC regardless of smoking intensity (data not shown). In addition to stratified analyses, interaction terms between modified Fagerström score and smoking intensity or cumulative alcohol drinking were

assessed but none were detected (*p* = 0.27 for cigarettes smoked per day and *p* = 0.78 for cumulative alcohol drinking among current smokers; data not shown).

When stratified by cumulative alcohol drinking, we detected an association between modified Fagerström scores and UADT SCC risk among current smokers even among individuals with low cumulative alcohol drinking (<1,000 drinks in lifetime) (OR = 21.17, 95% CI: 3.50–128.00 for a score of 3–7, *p* < 0.001) although the precision was low (Table 5). We were not able to examine never drinkers because of sparse data.

## Discussion

Our study showed that among current smokers, smoking addiction was associated with UADT SCC risk. Similar to the previous study on all cancers by Deheinzlin *et al.*,<sup>3</sup> in our study we found an effect size of 3.83 (95% CI = 2.56–5.73) for UADT SCC risk with a modified Fagerström score of 3–7. Furthermore, the ORs for UADT cancers ranged 1.65–2.22 for <60 min to first cigarette after waking up when compared to >60 min, which is similar to the associations reported by Muscat *et al.* for head and neck cancer.<sup>4</sup> The association between time to first cigarette after waking up

**Table 3.** Natural direct and indirect effects of addiction variables on UADT SCC

	Natural direct effects		Natural indirect effects	
	OR	95% CI <sup>1</sup>	OR	95% CI <sup>1</sup>
<b>Current smokers</b>				
First cigarette after waking up <sup>2</sup>				
After 60 min	1.00		1.00	
Within 31–60 min	1.64	(1.04–2.25)	1.09	(1.01–1.17)
Within 6–30 min	2.11	(1.44–2.79)	1.15	(1.04–1.26)
Within 5 min	2.22	(1.38–3.06)	1.27	(1.08–1.46)
Modified Fagerström <sup>3</sup>				
0	1.00		1.00	
1–2	2.06	(1.09–3.03)	1.00	(0.95–1.06)
3–7	3.83	(2.17–5.48)	1.01	(0.92–1.09)
<b>Former smokers</b>				
First cigarette after waking up				
After 60 min	1.00		1.00	
Within 31–60 min	1.54	(0.90–2.17)	1.16	(1.05–1.27)
Within 6–30 min	0.97	(0.59–1.36)	1.25	(1.08–1.41)
Within 5 min	1.11	(0.57–1.64)	1.37	(1.12–1.63)
Modified Fagerström				
0	1.00		1.00	
1–2	1.31	(0.73–1.88)	1.28	(1.11–1.44)
3–7	1.22	(0.69–1.76)	1.51	(1.25–1.77)

<sup>1</sup>Bootstrap estimation.

<sup>2</sup>Exposure: first cigarette after waking up; mediator: pack-years of smoking; confounders: education, sex, age, alcohol drinking frequency and duration.

<sup>3</sup>Exposure: Fagerström score; mediator: duration of smoking; confounders: education, sex, age, alcohol drinking frequency and duration.

and UADT SCC risk did not appear to be due to reported heavier smoking. The smoking addiction increased the risk of UADT SCC consistently regardless of the intensity of smoking. This may imply the misclassification of smoking *via* questionnaires or that number of pack-years is insufficient to capture all smoking characteristics that explain the association between addiction and UADT cancer risk. In our study, among current smokers we observed associations between time to first cigarette and UADT SCC risk regardless of the smoking intensity. Similarly, our stratified analysis by cumulative alcohol drinking supported the relationship between first cigarette after waking up and UADT SCC independent of cumulative alcohol drinking.

Although we observed strong direct associations between addiction measures and UADT SCC risk among current smokers, these associations were not observed among former smokers. It should be noted that both direct and indirect effects among former smokers were weak, and thus they are more prone to different sources of bias, including unmeasured mediator-outcome confounding.<sup>17</sup> We explored the possibility of attenuation of the direct effect of addiction, where perhaps the past smokers were individuals who were less

addicted to begin with and thus were able to quit successfully. Although the crude mean Fagerström scores among current smoking controls were slightly higher (2.77) compared to former smokers (2.35), the differences were small.

Based on our results, the questionnaire information on tobacco smoking and alcohol drinking could not fully explain the observed association between smoking addiction and UADT SCC risk. We observed correlation of addiction with education and with gender, both of which are potential confounding factors. However, we adjusted on these factors and the association between smoking addiction and UADT SCC was still observed. Although residual confounding from these factors is still a possibility, we do not expect that residual confounding can fully explain our observed addiction–UADT SCC risk association. Another possible pathway may be that smoking addiction might be related to risky sexual behavior *via* the human papillomavirus (HPV) pathway to UADT SCC. HPV is a risk factor mainly for oropharyngeal cancers,<sup>18</sup> and the interaction between HPV and tobacco smoking may vary by subsites.<sup>19</sup> However, we observed similar addiction–cancer associations with oral cavity/oropharynx, hypopharyngeal/laryngeal and esophageal cancers. Thus, we do not believe that the HPV pathway explains the observed association with smoking addiction. The detected addiction–cancer association may be an indication of the smoking–cancer association being stronger than that observed on questionnaire data on smoking intensity and duration. The most likely explanation for direct effects of addiction among current smokers is that pack-years do not capture all smoking characteristics (*e.g.*, type of tobacco and smoke inhalation patterns). In other words, pack-years or duration of use could be misclassified measures of smoking as the mediator of the addiction–UADT cancer risk association.

Our study had several limitations including potential recall bias, residual confounding and sparse data. The addiction and lifestyle information was self-reported in interviews. With the knowledge of their cancer status for the UADT cancer patients, the cases might have recalled various exposures differently from the controls. This limitation might have impact on the assessment of smoking intensity, but perhaps less so for time to first cigarette after waking up because a relationship between time to first cigarette after waking up and UADT SCC risk has not been established. There could also be residual confounding by tobacco smoking intensity and alcohol drinking because of inability to stratify by finer categories of low tobacco smoking and alcohol drinking intensity or lifetime amount. Although we performed stratified analyses, sparse data were a limitation for UADT subsites, especially for esophageal cancer and for finer strata of very low tobacco smoking or alcohol drinking. Finally, we used only three components of the FTND to assess smoking addiction in ARCAGE because the other three components were not available in our study. As mentioned earlier, the two items (time to first cigarette after waking up and number of cigarettes smoked per day) account for the majority of

**Table 4.** Time to first cigarette after waking up among current smokers and UADT SCC risk, stratified by smoking intensity<sup>1</sup>

	UADT overall				Oral and oropharynx				Hypopharynx and larynx			
	Ca	Co	OR	95% CI	Ca	Co	OR	95% CI	Ca	Co	OR	95% CI
<b>≤10 cigarettes/day</b>												
After 60 min	51	89	1.00		30	89	1.00		14	89	1.00	
Within 31–60 min	16	20	1.20	(0.50–2.91)	6	20	0.72	(0.21–2.45)	5	20	2.19	(0.52–9.25)
Within 6–30 min	44	24	2.65	(1.29–5.46)	22	24	2.56	(1.05–6.21)	13	24	4.64	(1.21–17.81)
Within 5 min	17	8	2.84	(0.98–8.22)	11	8	5.52	(1.58–19.25)	5	8	5.52	(0.61–49.81)
<i>p</i> trend				0.004				0.004				0.015
<b>11–20 cigarettes/day</b>												
After 60 min	79	60	1.00		37	60	1.00		36	60	1.00	
Within 31–60 min	95	63	1.23	(0.75–2.00)	50	63	1.41	(0.78–2.56)	31	63	0.92	(0.48–1.77)
Within 6–30 min	222	96	1.78	(1.14–2.77)	114	96	1.85	(1.08–3.16)	73	96	1.59	(0.90–2.82)
Within 5 min	122	47	1.76	(1.05–2.94)	64	47	2.05	(1.12–3.78)	37	47	1.23	(0.62–2.41)
<i>p</i> trend				0.009				0.012				0.209
<b>&gt;20 cigarettes/day</b>												
After 60 min	30	19	1.00		18	19	1.00		11	19	1.00	
Within 31–60 min	57	15	2.71	(1.13–6.48)	28	15	2.60	(0.93–7.32)	24	15	3.03	(1.01–9.12)
Within 6–30 min	183	60	2.21	(1.08–4.52)	73	60	1.56	(0.67–3.66)	92	60	2.97	(1.17–7.53)
Within 5 min	229	54	2.41	(1.15–5.02)	113	54	2.37	(1.00–5.66)	91	54	2.23	(0.86–5.79)
<i>p</i> trend				0.108				0.143				0.401

<sup>1</sup>Adjusted for center, education, sex, age, alcohol duration and alcohol frequency.

**Table 5.** Smoking addiction and UADT SCC risk, stratified by cumulative alcohol drinking<sup>1</sup>

	Current smokers				Former smokers			
	Ca	Co	OR	95% CI	Ca	Co	OR	95% CI
<b>&lt;1,000 drinks/lifetime</b>								
Modified Fagerström								
0	4	18	1.00		4	20	1.00	
1–2	14	21	10.92	(1.73–69.08)	8	31	1.65	(0.24–11.43)
3–7	47	39	21.17	(3.50–128.00)	10	22	3.43	(0.42–28.06)
<i>p</i> trend				<0.001				0.233
<b>≥1,000–&lt;10,000 drinks/lifetime</b>								
Modified Fagerström								
0	22	31	1.00		18	55	1.00	
1–2	57	53	1.31	(0.62–2.79)	29	62	1.32	(0.58–3.01)
3–7	128	71	2.90	(1.39–6.04)	30	67	0.99	(0.43–2.29)
<i>p</i> trend				<0.001				0.875
<b>≥10,000 drinks/lifetime</b>								
Modified Fagerström								
0	24	37	1.00		31	89	1.00	
1–2	148	91	2.32	(1.26–4.26)	88	123	1.39	(0.81–2.39)
3–7	699	193	4.39	(2.46–7.83)	177	197	1.25	(0.74–2.13)
<i>p</i> trend				<0.001				0.627

<sup>1</sup>Adjusted for center, education, sex, age, alcohol duration, alcohol frequency and duration of smoking.

variance for FTQ scores.<sup>1</sup> Furthermore, the Heavy Smoking Index, which includes the number of cigarettes per day and the time of the first cigarette of the day, has been shown to have a high concordance with the FTND.<sup>20</sup> Thus, we believe that our use of a modified Fagerström score was reasonable.

The possible mechanisms of an effect of the addiction score in addition to that of tobacco smoking as measured by questionnaire are complicated by the fact that cigarettes smoked per day is included in both approaches. Thus, we also attempted to focus on the other main component (time to first cigarette after waking up) of the score in our analysis. We observed that time to first cigarette after waking up was associated with UADT SCC risk regardless of the number of cigarettes smoked per day. The investigation may be whether the score corrects (at least in part) the misclassification of smoking (*i.e.*, weak smokers with strong dependence should in fact be classified as heavy smokers) or whether nicotine dependence is a marker of susceptibility to tobacco carcinogenesis (*i.e.*, more dependent smokers are at higher risk than less dependent smokers given the same amount of tobacco smoking). The latter can happen through metabolic pathways that are in common to nicotine and tobacco carcinogens, such as tobacco-specific nitrosamines (TSNs), which are derivatives of nicotine. The latter explanation might be explored through an analysis of *CYP2A6*, *CHRNA5-A3-B4*<sup>21</sup> and other genes involved in nicotine metabolism, in particular those involved in the formation of TSN.

## References

- Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, et al. The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *Br J Addict* 1991;86:1119-27.
- Etter JF. A comparison of the content-, construct- and predictive validity of the cigarette dependence scale and the Fagerstrom test for nicotine dependence. *Drug Alcohol Depend* 2005;77:259-68.
- Deheinzeln D, Lourenco MT, da Costa CL, et al. The level of nicotine dependence is an independent risk factor for cancer: a case control study. *Clinics (Sao Paulo)* 2005;60:221-6.
- Muscat JE, Ahn K, Richie JP, Jr, et al. Nicotine dependence phenotype, time to first cigarette, and risk of head and neck cancer. *Cancer* 2011;117:5377-82.
- Matsuo K, Gallus S, Negri E, et al. Time to first cigarette and upper aerodigestive tract cancer risk in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:1986-92.
- Kahler CW, Metrik J, LaChance HR, et al. Addressing heavy drinking in smoking cessation treatment: a randomized clinical trial. *J Consult Clin Psychol* 2008;76:852-62.
- Grant BF, Hasin DS, Chou SP, et al. Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:1107-15.
- Lee YC, Marron M, Benhamou S, et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:3353-61.
- Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2011;47:725-31.
- Hiscock R, Bauld L, Amos A, et al. Socioeconomic status and smoking: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1248:107-23.
- Van Voorhees EE, Mitchell JT, McClernon FJ, et al. Sex, ADHD symptoms, and smoking outcomes: an integrative model. *Med Hypotheses* 2012;78:585-93.
- Duncan SC, Strycker LA, Duncan TE. Exploring associations in developmental trends of adolescent substance use and risky sexual behavior in a high-risk population. *J Behav Med* 1999;22:21-34.
- Boffetta P, Clark S, Shen M, et al. Serum cotinine level as predictor of lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1184-8.
- Lagiou P, Georgila C, Minaki P, et al. Alcohol-related cancers and genetic susceptibility in Europe: the ARCAGE project: study samples and data collection. *Eur J Cancer Prev* 2009;18:76-84.
- Vanderweele TJ, Vansteelandt S. Odds ratios for mediation analysis for a dichotomous outcome. *Am J Epidemiol* 2010;172:1339-48.
- Pearl J. Direct and indirect effects. San Francisco, CA: Morgan Kaufmann, 2001. 411-20.
- Vanderweele TJ. Bias formulas for sensitivity analysis for direct and indirect effects. *Epidemiology* 2010;21:540-51.
- Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol* 2011;40:489-502.
- Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, et al. Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: a case for multifactor disease. *J Oncol* 2012;2012:571862.
- Chabrol H, Niezborala M, Chastan E, et al. Comparison of the Heavy Smoking Index and of the Fagerstrom Test for Nicotine Dependence in a sample of 749 cigarette smokers. *Addict Behav* 2005;30:1474-7.
- Wassenaar CA, Dong Q, Wei Q, et al. Relationship between *CYP2A6* and *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* variation and smoking behaviors and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1342-6.

# **Towards dissecting molecular routes of intercellular communication in the tumour microenvironment: phenotypic plasticity of stem cell-associated markers in coculture (carcinoma cell/fibroblast) systems**

Z. Fík<sup>1,2</sup>, B. Dvořánková<sup>1</sup>, O. Kodet<sup>1,3</sup>, J. Bouček<sup>2,4</sup>, J. A. Betka<sup>2,4</sup>, J. Betka<sup>2</sup>, S. André<sup>5</sup>, H.-J. Gabius<sup>5</sup>, P. Šnajdr<sup>1</sup>, K. Smetana Jr.<sup>1</sup>, M. Chovanec<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Anatomy, <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Faculty Hospital Motol, <sup>3</sup>Department of Dermatovenereology, General University Hospital, Charles University, 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic*

<sup>4</sup>*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic v.v.i., Department of Immunology and Gnotobiology, Prague, Czech Republic*

<sup>5</sup>*Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany*

**Corresponding author:** Martin Chovanec, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Faculty Hospital Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, Czech Republic. E-mail: Martin.Chovanec@lf1.cuni.cz

**Abbreviations:** ABC – ATP binding cassette, CAFs – cancer-associated fibroblasts, CCD – charge-coupled device, CD133 – cluster of differentiation 133, CD29 – cluster of differentiation 29, CD44 – cluster of differentiation 44, CSCs – cancer stem cells, DAPI – 4, 6-diaminidino-2-phenylindole diacetate, D-MEM – Dulbecco's modified Eagle's medium, EMEM – Minimum Essential Medium with Earle's salt, EMT – epithelial-mesenchymal transition, FACS – fluorescence-activated cell scanning, FaDu – hypopharyngeal carcinoma cell line, FBS – fetal bovine serum, FITC – fluorescein isothiocyanate, Gal-1-BS – galectin-1 binding sites, HF – human fibroblast, HNSCC – head and neck squamous cell carcinoma, K – keratin, K 10 – keratin 10, K 19 – keratin 19, K 8 – keratin 8, MDR1 – multidrug resistance receptor 1, PBS – phosphate-buffered saline, SCCF – squamous cell cancer fibroblast, SP – side population, Swam – swine anti-mouse, Swar – swine anti-rabbit, TRITC – tetramethylrhodamine isothiocyanate

**Abstract** Increasing evidence attributes tumour fates to a small population of cells (cancer stem cells) capable to survive therapeutic interventions. Investigation of their characteristics, especially in cross-talk with other cell types of the tumour microenvironment, can pave the way to innovative therapeutic concepts. The central issue of this study was to evaluate the impact of stroma on tumour cells with stem cell-like features in a squamous cell carcinoma model (FaDu). Six different experimental conditions were tested using distinct compositions of the culture system, and the tumour cells were subjected to analysis of morphologic and molecular features. In detail, FaDu cells alone were used as control, compared to tumour cells from coculture, with squamous cell cancer-derived stromal fibroblasts or normal skin human fibroblasts, both in the direct and the indirect systems, adding analysis of side population cells of FaDu culture. Measurements were taken at days 2, 7 and 9 of culture and immediately after preparation in the case of the side population. A panel of antibodies against keratins 8, 10, 19, the stem cell markers CD29, CD44, CD133 as well as the biotinylated adhesion/growth-regulatory galectin-1 served as toolbox for phenotypic characterization. Coculture with fibroblasts prepared from tumour stroma and with dermal fibroblasts affected marker presentation, maintaining an undifferentiated stage phenotypically related to stem cells. Side-population cells showed close relationship to cancer stem cells in these characteristics. In conclusion, normal and tumour stromal fibroblasts are capable to shift the marker expression profile of FaDu cells to a stem-cell-like phenotypic pattern in coculture.



## Introduction

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) have initially been solely considered as malignant tumours stemming from transformed squamous epithelial cells (Nagai, 1999). However, increasing attention is being paid to the mutual interplay with the other cell types in the tumour microenvironment (e.g. fibroblasts, endothelial cells, immune cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells) and constituents of the extracellular matrix (Borovski et al., 2011; Wels et al., 2008). In fact, all these components shape the specific conditions of the individual tumour. Despite remarkable progress in understanding of key genetic alterations and their role in establishing malignancy of squamous cell epithelia, the contribution of non-epithelial tumour components for both tumour origin and progression poses a current challenge of high biomedical relevance.

Stem cells are centrally responsible for maintaining proper viability of the squamous epithelium by enabling repair and renewal after damage or loss. By appearance, the stem cell is small and round in shape (Amit and Itskovitz-Eldor, 2012), and it is notably able to divide asymmetrically, keeping a small pluripotent subpopulation in relation to the bulk of tissue-forming cells. Two types of stem cells are recognized in the human body during ontogenesis: embryonic and adult stem cells, the latter induced to become specialized mature cells under the distinct conditions (Bhattacharyya and Khanduja, 2010; Knoblich, 2008; Vezzoni and Parmiani, 2008).

It is a reasonable assumption that tumour formation can be connected with genetic alterations of the stem cells. Principles of the cancer stem cell (CSC) theory were already shaped several decades ago. Since then, several markers had been supposed to indicate stem properties in HNSCC, among them CD44, keratin 8 (K8), keratin 19 (K19), CD29 ( $\beta_1$ -integrin), presence of nuclear binding sites for an endogenous adhesion/growth-regulatory lectin, i.e. galectin-1 (Gal-1; for details on this effector class, please see (Kaltner and Gabius, 2012; Smetana et al., 2013)) and aldehyde dehydrogenase activity (Facompre et al., 2012; Harper et al., 2007; Chen et al., 2009; Chovanec et al., 2004; Prince et al., 2007; Smetana et al., 2006; Yu et al., 2013). Proper functioning of adult stem cells appears to be regulated by the microenvironment, called „niche“ (Sujata and Chaudhuri, 2008; Watt and Hogan, 2000), as assumed for tumour-stroma cross-talk. Dysregulation at this level may affect stem cell behaviour, leading to tumorigenesis and tumour progression (Sneddon and Werb, 2007; Strnad et al., 2010). As noted above, the stem cell niche can also be regarded as a complex of different cell types including microvessels and also extracellular matrix components such as proteoglycans and adhesion molecules like fibronectin, all bearing glycans which serve as signals for cellular communication (for details on the concept of the sugar code, please see (Gabius et al., 2011); for model studies on orchestration of glycan/lectin expression for tumour or immune growth regulation, please see (Amano et al., 2012; Andre et al., 2007; Wu et al., 2011). Obviously, efforts to delineate rules of this interplay hold promise for opening the way to new therapeutic options (Sugihara and Saya, 2013; Walker et al., 2009). Within this long-term project line revealing particular properties and capabilities of stromal fibroblasts of tumours, which may not simply be bystanders, is one aim.

Thus, this study was designed to evaluate the impact of tumour stromal fibroblasts on stem cell phenotype of a representative squamous cell cancer line *in vitro* and to compare the results with the effect of normal fibroblasts. In detail, the two mentioned types of fibroblasts were cocultured with the cells of the hypopharyngeal FaDu line previously characterized especially with respect to galectin binding (Smetana et al., 2006). In addition, the side population was isolated from the FaDu cell line, and these cells were also studied for presence of the selected markers.

## Patients and Methods

### Cells and their cultivation

Three types of cells were used in this experiment, i.e. the FaDu cell line of epithelial cells originating from a tumour of the hypopharynx (ATCC® HTB-43™) (Rangan, 1972). Squamous

cell cancer-associated fibroblasts (SCCF) were isolated from the stroma of an oral squamous cell carcinoma surgically removed at the Charles University, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, following routine procedures (Dvorankova et al., 2012; Lacina et al., 2007). Normal human dermal fibroblasts (HF) were obtained from skin samples of a non-tumour patient, who had undergone aesthetic surgery at the Charles University, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Department of Plastic Surgery, using a standard protocol (Kodet et al., 2011; Kolar et al., 2012; Lacina et al., 2007). In all cases, tissue specimens were obtained with the patients' informed consent according to the Declaration of Helsinki and after the local Ethical Committee approval. FaDu cells were routinely cultured in Minimum Essential Medium with Earle's salt (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), sodium pyruvate and antibiotics (Biochrom, Berlin, Germany) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells from 5<sup>th</sup> subculture were seeded at a density of 2x10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> on coverslips placed in 6-well dishes (Corning, New York, NY, USA) and cultured for 2, 7 and 9 days.

In the second part of the experiment the FaDu cells were cocultured with SCCF or HF in a direct system enabling intercellular contacts. Initially, both SCCF and HF cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (Biochrom) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For coculture, HF from the 9<sup>th</sup> subculture or SCCF from the 7<sup>th</sup> subculture were seeded on coverslips (density at 500 cells/cm<sup>2</sup>) together with FaDu cells (density at 2x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>). Resulting preparations were co-cultured in EMEM with 10% FBS for 2, 7 and 9 days.

Part 3 of our study applied an indirect (insert) transwell system using a microporous membrane (Corning), which precluded direct intercellular contacts between the epithelial cells and either SCCF or HF. Experimentally, FaDu cells (5<sup>th</sup> subculture) were seeded on coverslips at a density of 5x10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>, then inserts were placed in the wells and SCCF or HF (density 1x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>) were positioned on them. Similar to the previous experiments, the period of time of coculture was 2, 7 and 9 days. After each period, adherent cancer cells were carefully washed three times with Dulbecco's PBS (Biochrom), the coverslips dried and stored at -20°C prior to immunocytochemical processing.

Finally, a side population was isolated from the culture of the FaDu cell in the exponential growth phase (after 72h of incubation under standard conditions). Cell suspensions were centrifuged for 5 min at 1200 rpm (300g), the pellets then washed twice with PBS and resuspended in 2 mL of Eagle's medium containing 2% bovine serum albumin, then solutions were pipetted to test tubes at the final concentration of 1 x 10<sup>6</sup> cell/ml, staining with 5 ug/mL of Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) done at 37°C for 120 min. After this incubation period, the cells were washed with cold Hanks' balanced salt solution. Thereafter, all test tubes with cells were maintained on ice and all solutions added were adjusted to this temperature. Five minutes before FACScan analyses (FACScan SE; BD Biosciences, Heidelberg, Germany), 2 ug/mL of propidium iodide was added for dead-cell identification. The obtained survived cells were seeded onto coverslips, immediately washed with PBS, coverslips then dried and kept frozen at -20°C. No experiment, focusing on interaction between side population and fibroblasts was made.

### **Characterisation of cell phenotype**

To facilitate the probes to reach their intracellular targets during immuno- and galectin cytochemical characterization, cells were treated by Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After fixation using 2% paraformaldehyde in PBS (pH 7.2), non-specific protein binding of probes was precluded by applying bovine serum albumin for saturating non-specific binding sites for proteins (Sigma-Aldrich). Cell phenotype was evaluated in technical triplicates for each evaluated marker.

Home-made biotinylated galectin-1 used as probe to visualize the presence of accessible binding sites (Gal-1-BS), were prepared and tested for maintained activity as described (Purkrabkova et al., 2003). A panel of mouse monoclonal antibodies as first-step reagents to detect keratin 8 (K8), keratin 10 (K10), keratin 19 (K19), (all from DAKO, Glostrup, Denmark), CD133 and CD44 (all from Abcam, Cambridge, United Kingdom), CD29 (Immunotech, Marseille, France) was used.

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled swine anti-mouse (Swam-FITC) and anti-rabbit (Swar-FITC) immunoglobulin fractions (AlSeVa, Prague, Czech Republic; DAKO) and tetramethylrhodamine isothiocyanate labelled ExtrAvidin - ExtrAvidin-TRITC (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) were used as second-step reagents for visualization of bound probes. Cell nuclei were counterstained with 4, 6-diaminidino-2-phenylindol dilactate (DAPI; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), thereafter mounting specimen on Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom) (the used reagents are summarised in table 1).

Controls of the specificity included assessment of antigen -independent staining with isotype-matched antibodies or by omission of the first -step reagents as well as demonstration of sugar-dependent inhibition of galectin binding. The specimens were monitored at the light microscopic level using an Eclipse fluorescence microscope (Nikon, Prague, Czech Republic) equipped with a Cool-1300Q CCD camera (Vosskühler, Osnabrück, Germany). Data were analysed by a LUCIA 5.1 computer-assisted image analysis system (Laboratory Imaging; Prague, Czech Republic).

## Results

### *Cell morphology*

At the early stage of FaDu culture (day 2 subculture), small colonies of cells were rarely observed (Fig. 1/A). Formation of contacts between cells with typical epithelial morphology spread in the monolayer was a prominent feature on day 7 of culture. At this stage, cells with blast-like morphology were observed on the periphery of cell colonies. Multilayered cell presentation was reached on the 9<sup>th</sup> day of subculture. Predominantly large spread cells were observed in this growth phase, with few regions of small cells being identified (Fig. 1/B). In the case of direct cocultivation (with both SCCF and HF), we observed larger colonies of subconfluent cells in the vicinity of fibroblasts on the 2<sup>nd</sup> day of the subcultures. Evidently, this feature was more prominent in coculture with SCCF than with HF (Fig. 1/C). Cell appearance was similar in cultures with insert and direct contacts. As seen for FaDu cell culture alone, formation of intercellular contacts (day 7) and multilayered growth at (day 9) was observed in the cocultures. Of note, a population of small cells with fibroblast-like morphology on the periphery of colonies in contact with fibroblasts (either SCCF or HF) was seen up to the 9<sup>th</sup> day of culture. These observations indicated a slight difference when using SCCF and HF as stromal component, the tumour-associated fibroblasts being more potent as stromal activator than normal fibroblasts (Fig. 1/C).

### *Cell phenotype*

During the 2<sup>nd</sup> day of culture of FaDu cells alone, there was strong expression of CD29, CD44, CD133, K8, K19 and Gal-1-BS in the nucleus (Fig. 1/A). CD29, CD44, CD133, K8 and K19 were still present at day 7, with a tendency for intensity decrease (Table 2). At day 9, only few cells were found to be positive for CD44, CD29 and K8. The level of presence of CD133 was strongly decreased, while no staining for K19 was observed (Table 2). During all stages, positive cells were present, either in the centre of the colonies, on their periphery or both.

Regarding marker expression in the samples of coculture, staining for K8, K19 and CD29 was present in cells on the periphery of the colonies at day 2. Staining intensity with an increase of the pool of positive cells, especially in the cases of K8, K19 and CD29 as well as for nuclear presence of Gal-1-BS, was maintained to the 7<sup>th</sup> day of culture. Positivity for K8 and K19 was mainly seen at the colonies' margins, while CD29 was detected also centrally. Gal-1-BS were observed in the cytoplasm of almost all cells. The cells on the periphery of colonies were consistently positive for K19 and K8 at day 9. In terms of staining intensity, the signal for Gal-1-BS in the nucleus was decreased and limited to particular cells without regional preference (Fig. 2).

Indirect FaDu + SCCF/HF coculture did not reveal any differences in the size of cell populations compared to direct coculture (not shown). Under this condition, strong positivity for K19 and K8

expression was seen on the periphery of colonies, with a few positive cells in the centre during the day 2 of culture, Gal-1-BS were observed mainly in the cytoplasm of cells, only a very few of them expressed Gal-1-BS in the nucleus. When monitoring the day 7 cocultures, the pool of K19/K8-positive cells was more numerous compared to isolated FaDu culture, seen either at the periphery or in the centre of the colonies. Cytoplasmic presence of Gal-1-BS was observed invariably. In the day 9 cultures, the number of cells in the colony increased but the proportion of K19/K8-positive cells was maintained. Interestingly, nuclear presence of Gal-1-BS was detected.

The side-population (SP) cells were examined after their isolation. These cells were small in size, round and formed small colonies. K8, K19, CD29 and nuclear Gal-1-BS were consistently present in these cells (Fig. 1/D).

## Discussion

The obtained results revealed a dependence of marker expression on conditions of culture. Fibroblasts from cancer (SCCF) and also normal cells (HF) were capable to maintain a rather high level of marker presence. These observations extend our previous analysis on effects of length of period in culture (Smetana et al., 2006).

The cancer stem cell theory has been adopted from blood malignancies to solid tumours of different types (Eramo et al., 2008; Grichnik, 2006; O'Brien et al., 2007; Prince et al., 2007; Singh et al., 2003; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2006). Several proteins are supposed to be markers of stem cells in HNSCC and other solid tumours, among them CD44, a receptor for hyaluronan, as one of the most promising candidates (Cichy and Pure, 2003). Expression of intermediate filaments, especially keratins, is an indicator of the status of epithelial cell differentiation. Unfavourable prognosis of HNSCC negatively correlates with expression of K8 and K19 (Fillies et al., 2005). Normal oral mucosa of patients with tongue carcinoma harbors a high level of K19 in comparison to patients without cancer (Copper et al., 1993). CD29 ( $\beta_1$ -integrin) is strongly present in normal basal cells of the squamous epithelium and also in the colonies of small cells with marked proliferative activity (Harper et al., 2007). Its presence is associated with a low differentiation status of cancer epithelium, likely reflecting an early stage of tumour development, eventually to CSCs (Geng et al., 2010). Additionally,  $\beta_1$ -integrin expression is seen in mesenchymal stem cells (Semon et al., 2010). Co-expression of  $CD44^+/\alpha_2\beta_1$ -integrin $^+ / CD133^+$  in prostate cancer is supposed to be characteristic of these cancer stem cells (Collins et al., 2005). CD133 therefore appears also as a candidate to be a cancer stem cell marker in tumours of different origin (Gharagozloo et al., 2012; Zaidi et al., 2009). In addition, nuclear presence of Gal-1-BS served as marker for poorly differentiated cells, in characteristics close to stem cells, in different cell types including cells from hair follicle and interfollicular epidermis (Chovanec et al., 2004; Kodet et al., 2011).

CSCs have an ability to escape cell death during the radio- or chemotherapy (Tan et al., 2006). Appearing to mimic this ability, a part of the cancer cells under *in vitro* conditions is able to survive contact with the cytotoxic dye Hoechst 33342, called side population. This ability to exclude the Hoechst dye is due to the activity of the multidrug resistance transporter 1 (MDR1), a member of the ABC transporter-transmembrane proteins, which are discussed to account for resistance to chemotherapy (Hadnagy et al., 2006). At present, properties of CSCs and side population cells appear correlated in different kinds of cancer, namely gallbladder carcinoma, urinary bladder carcinoma and human oral cancer (Li et al., 2012; Yanamoto et al., 2011; Zhang et al., 2012). Herein, immunocytochemical characteristics of stem cells were detected in the side population.

The crucial point of this study was to observe tumor stroma influencing and preserving the cancer stem cell phenotype in the squamous cell carcinoma line (FaDu). Together with this finding, intercellular contacts between cancer and stromal cells didn't seem to be limiting for tumor growth. Logical implication shows the tumor stroma as responsible for cancer tolerance to systemic therapy and irradiation as well as a possible regulator of the cancer cell behaviour at the distant sites during

metastasis (Valastyan and Weinberg, 2011). Cancer-associated fibroblasts (CAFs) as part of bioactive cancer microenvironment influence cancer biological properties (Valach et al., 2012). The presented findings underscore the activity of stromal elements such as SCCF or even normal fibroblasts in the culture model. Hence, regarding to paper of Costea and coworkers (2006), therapeutic strategy can't focused on the cancer cells only, but may impact on their surrounding environment as well (Costea et al., 2006).

Improving our understanding of CSCs biology and the EMT as well as taking a step towards establishing a close-to-physiology model for side population research are expected to advance research with clinical perspective. Two approaches are suggested to be instrumental in this context: elimination of CSC and influencing the tumour stroma to bring down epithelial-mesenchymal signals responsible for CSCs renewal and promotion of the metastatic process (Costea et al., 2006; Malanchi et al., 2012). In conclusion, the tested culture conditions, with fibroblasts as a regular element of the tumour stroma introduced to the *in vitro* system, significantly influenced phenotypic pattern of FaDu cells. These data encourage further studies on coculture systems for *in vitro* modelling of intercellular communication in cancer stem cell research.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Marie Jindráková and Radana Kavková for excellent technical assistance, to Dr. B. Friday for valuable comments as well as for funding by the Charles University, projects No. GAUK 291811, PRVOUK/LF1/P27, Specific University Research 266513 and UNCE 204013, by the Ministry of Health of the Czech Republic IGA MZ CR 11542 and 134 88 and the project BIOCEV ("Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University in Vestec" (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), the European Regional Development Fund, the Verein zur Förderung des biologisch-technologischen Fortschritts in der Medizin e.V. and by the EC (ITN network GLYCOPHARM, contract no. 317297).

## References

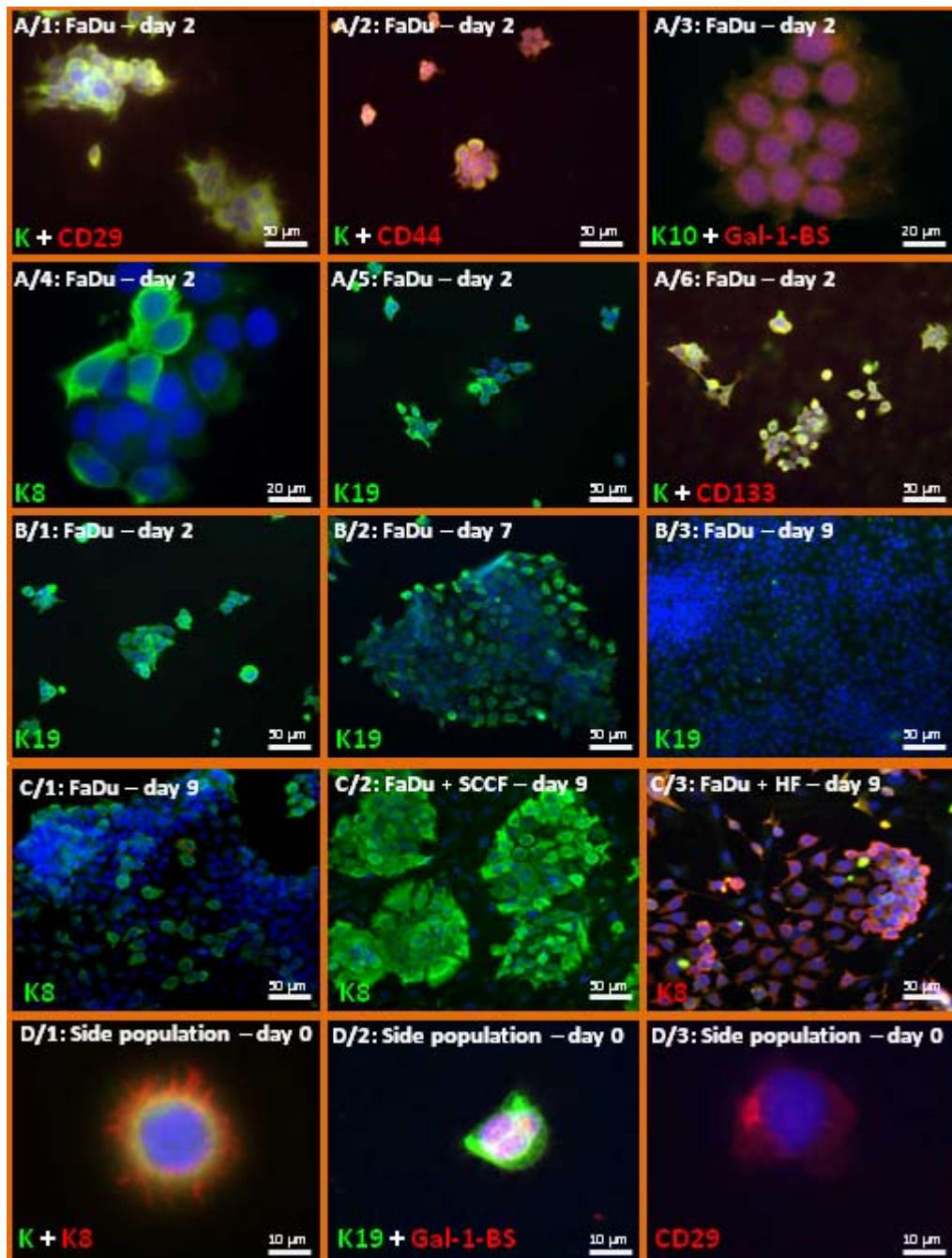
- Amano, M., Eriksson, H., Manning, J. C., Detjen, K. M., Andre, S., Nishimura, S., Lehtio, J., Gabius, H. J. (2012) Tumour suppressor p16(INK4a) - anoikis-favouring decrease in N/O-glycan/cell surface sialylation by down-regulation of enzymes in sialic acid biosynthesis in tandem in a pancreatic carcinoma model. *FEBS J* **279**, 4062-4080.
- Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. (2012) Morphology of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Colonies Cultured with Feeders. In *Atlas of Human Pluripotent Stem Cells*, eds. Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J., pp. 15-39, Humana Press, New York.
- Andre, S., Sanchez-Ruderisch, H., Nakagawa, H., Buchholz, M., Kopitz, J., Forberich, P., Kemmner, W., Bock, C., Deguchi, K., Detjen, K. M., Wiedenmann, B., von Knebel Doeberitz, M., Gress, T. M., Nishimura, S., Rosewicz, S., Gabius, H. J. (2007) Tumor suppressor p16INK4a--modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells. *FEBS J* **274**, 3233-3256.
- Bhattacharyya, S., Khanduja, K. L. (2010) New hope in the horizon: cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**, 237-242.
- Borovski, T., De Sousa, E. M. F., Vermeulen, L., Medema, J. P. (2011) Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res* **71**, 634-639.
- Cichy, J., Pure, E. (2003) The liberation of CD44. *J Cell Biol* **161**, 839-843.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., Maitland, N. J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* **65**, 10946-10951.
- Copper, M. P., Braakhuis, B. J., de Vries, N., van Dongen, G. A., Nauta, J. J., Snow, G. B. (1993) A panel of biomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate endpoints in chemoprevention trials. *Cancer* **71**, 825-830.

- Costea, D. E., Tsinkalovsky, O., Vintermyr, O. K., Johannessen, A. C., Mackenzie, I. C. (2006) Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* **12**, 443-454.
- Dvorankova, B., Szabo, P., Lacina, L., Kodet, O., Matouskova, E., Smetana, K., Jr. (2012) Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol* **137**, 679-685.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., De Maria, R. (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* **15**, 504-514.
- Facompre, N., Nakagawa, H., Herlyn, M., Basu, D. (2012) Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas. *Adv Pharmacol* **65**, 235-265.
- Fillies, T., Werkmeister, R., van Diest, P. J., Brandt, B., Joos, U., Buerger, H. (2005) HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* **5**, 84.
- Gabius, H. J., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., Solis, D. (2011) From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci* **36**, 298-313.
- Geng, S. M., Li, L., Wang, Q. Q., Zeng, W. H., Yan, H. L., Xiao, S. X. (2010) [Expression of integrin beta1 in squamous cell carcinoma]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **32**, 60-64.
- Gharagozloo, M., Mirzaei, H. R., Bagherpour, B., Rezaei, A., Kalantari, H., Sanei, M. H., Hosseini, M., Mohajeri, G., Tabatabai, A., Hashemi, M. (2012) Cell cycle analysis of the CD133(+) and CD133(-) cells isolated from human colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* **8**, 399-403.
- Grichnik, J. M. (2006) Genomic instability and tumor stem cells. *J Invest Dermatol* **126**, 1214-1216.
- Hadnagy, A., Gaboury, L., Beaulieu, R., Balicki, D. (2006) SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research* **312**, 3701-3710.
- Harper, L. J., Piper, K., Common, J., Fortune, F., Mackenzie, I. C. (2007) Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **36**, 594-603.
- Chen, Y. C., Chen, Y. W., Hsu, H. S., Tseng, L. M., Huang, P. I., Lu, K. H., Chen, D. T., Tai, L. K., Yung, M. C., Chang, S. C., Ku, H. H., Chiou, S. H., Lo, W. L. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 307-313.
- Chovanec, M., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Plzakova, Z., Andre, S., Gabius, H. J. (2004) Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectin-1 and -3. *Anat Histol Embryol* **33**, 348-354.
- Kaltner, H., Gabius, H. J. (2012) A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors. *Histol Histopathol* **27**, 397-416.
- Knoblich, J. A. (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583-597.
- Kodet, O., Dvorankova, B., Lacina, L., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H. J., Smetana, K., Jr. (2011) Comparative analysis of the nuclear presence of adhesion/growth-regulatory galectins and reactivity in the nuclei of interphasic and mitotic cells. *Folia Biol* **57**, 125-132.
- Kolar, M., Szabo, P., Dvorankova, B., Lacina, L., Gabius, H. J., Strnad, H., Sachova, J., Vlcek, C., Plzak, J., Chovanec, M., Cada, Z., Betka, J., Fik, Z., Paces, J., Kovarova, H., Motlik, J., Jarkovska, K., Smetana, K., Jr. (2012) Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell* **104**, 738-751.
- Lacina, L., Dvorankova, B., Smetana, K., Jr., Chovanec, M., Plzak, J., Tachezy, R., Kideryova, L., Kucerova, L., Cada, Z., Boucek, J., Kodet, R., Andre, S., Gabius, H. J. (2007) Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int J Radiat Biol* **83**, 837-848.
- Li, X. X., Wang, J., Wang, H. L., Wang, W., Yin, X. B., Li, Q. W., Chen, Y. Y., Yi, J. (2012) Characterization of cancer stem-like cells derived from a side population of a human gallbladder carcinoma cell line, SGC-996. *Biochem Biophys Res Commun* **419**, 728-734.

- Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H. A., Delaloye, J. F., Huelsken, J. (2012) Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* **481**, 85-89.
- Nagai, M. A. (1999) Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Braz J Med Biol Res* **32**, 897-904.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J. E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110.
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., Ailles, L. E. (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 973-978.
- Purkrabkova, T., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Holikova, Z., Bock, C., Lensch, M., Andre, S., Pytlik, R., Liu, F. T., Klima, J., Smetana, K., Motlik, J., Gabius, H. J. (2003) New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow stromal and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites. *Biol Cell* **95**, 535-545.
- Rangan, S. R. (1972) A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* **29**, 117-121.
- Semon, J. A., Nagy, L. H., Llamas, C. B., Tucker, H. A., Lee, R. H., Prockop, D. J. (2010) Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. *Cell Tissue Res* **341**, 147-158.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-5828.
- Smetana, K., Jr., Andre, S., Kaltner, H., Kopitz, J., Gabius, H. J. (2013) Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* **17**, 379-392.
- Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Chovanec, M., Boucek, J., Klima, J., Motlik, J., Lensch, M., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H. J. (2006) Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochem Cell Biol* **125**, 171-182.
- Sneddon, J. B., Werb, Z. (2007) Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell* **1**, 607-611.
- Strnad, H., Lacina, L., Kolar, M., Cada, Z., Vlcek, C., Dvorankova, B., Betka, J., Plzak, J., Chovanec, M., Sachova, J., Valach, J., Urbanova, M., Smetana, K., Jr. (2010) Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem Cell Biol* **133**, 201-211.
- Sugihara, E., Saya, H. (2013) Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* **132**, 1249-1259.
- Sujata, L., Chaudhuri, S. (2008) Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk. *Cell Mol Immunol* **5**, 107-112.
- Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E., Weissman, I. L. (2006) The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* **86**, 1203-1207.
- Valach, J., Fik, Z., Strnad, H., Chovanec, M., Plzak, J., Cada, Z., Szabo, P., Sachova, J., Hroudova, M., Urbanova, M., Steffl, M., Paces, J., Mazanek, J., Vlcek, C., Betka, J., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H. J., Kodet, R., Smetana, K., Jr., Gal, P., Kolar, M. (2012) Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer* **131**, 2499-2508.
- Valastyan, S., Weinberg, R. A. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275-292.
- Vezzoni, L., Parmiani, G. (2008) Limitations of the cancer stem cell theory. *Cytotechnology* **58**, 3-9.
- Walker, M. R., Patel, K. K., Stappenbeck, T. S. (2009) The stem cell niche. *J Pathol* **217**, 169-180.
- Wang, S., Garcia, A. J., Wu, M., Lawson, D. A., Witte, O. N., Wu, H. (2006) Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1480-1485.
- Watt, F. M., Hogan, B. L. (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-1430.

- Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., Lyden, D. (2008) Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev* **22**, 559-574.
- Wu, G., Lu, Z. H., Gabius, H. J., Ledeen, R. W., Bleich, D. (2011) Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression. *Diabetes* **60**, 2341-2349.
- Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S., Yoshitomi, I., Kawano, T., Yonezawa, H., Rokutanda, S., Naruse, T., Umeda, M. (2011) Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral Oncol* **47**, 855-860.
- Yu, F., Sim, A. C., Li, C., Li, Y., Zhao, X., Wang, D. Y., Loh, K. S. (2013) Identification of a subpopulation of nasopharyngeal carcinoma cells with cancer stem-like cell properties by high aldehyde dehydrogenase activity. *Laryngoscope*.
- Zaidi, H. A., Kosztowski, T., DiMeco, F., Quinones-Hinojosa, A. (2009) Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *J Neurooncol* **93**, 49-60.
- Zhang, P., Zuo, H., Ozaki, T., Nakagomi, N., Kakudo, K. (2006) Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer. *Pathol Int* **56**, 485-489.
- Zhang, Y., Wang, Z., Yu, J., Shi, J. Z., Wang, C., Fu, W. H., Chen, Z. W., Yang, J. (2012) Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett*.





**Figure 1.** A/1-6: Monitoring of FaDu cells in the course of 2<sup>nd</sup>-day culture. The cells are positive for stem cell markers (CD29, CD44, Gal-1-BS in the nucleus, K8, K19, CD133). There is no positivity for K10, marker of differentiated cells. K- pankeratin.

B/1-3: Monitoring of FaDu cells at day 2 (B/1, subconfluent growth), day 7 (B/2, growth as monolayer) and day 9 (B/3, multilayered growth) when K19 was detected. The panels illustrate the reduction of signal intensity in the course of cell culture down to negativity in cells forming multilayered colonies.

C/1-3: Effect of adding normal (HF) and cancer stromal (SCCF) fibroblasts to cultures of FaDu cells, significantly stimulating expression of K8 in cancer epithelium.

D/1-3: Cells of the side population on day 0 of cell culture. Profiles and intensities of signal for K8, K19, Gal-1-BS in the nucleus and for CD29.



## ORIGINAL ARTICLE

## Fine needle aspiration biopsy proves increased T-lymphocyte proliferation in tumor and decreased metastatic infiltration after treatment with doxorubicin bound to PHPMA copolymer carrier

Jaroslav Betka<sup>1,2</sup>, Ondrej Hovorka<sup>1</sup>, Jan Boucek<sup>1,2</sup>, Karel Ulbrich<sup>3</sup>, Tomas Etrych<sup>3</sup>, and Blanka Rihova<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology, ASCR, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Faculty Hospital Motol, Prague, Czech Republic, and <sup>3</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, ASCR, Prague, Czech Republic

## Abstract

**Introduction:** Fine needle aspiration biopsy (FNAB) is an easy method with an option of repetitive withdrawal of cell material.

**Methods:** First, mice were inoculated with mouse T-lymphoma, after 10 d the samples from tumor, lymph nodes and spleen gained by FNAB and excision were analyzed by flow cytometry. Tumor progression was compared to the control group simultaneously. Then, 10 d after tumor cell inoculation free doxorubicin (DOX) or different PHPMA DOX conjugates were injected. Cell material was analyzed to detect subpopulations of lymphocyte infiltrate, and levels of cytokines in correlation with progression or regression of the disease.

**Results:** FNAB has no influence on the tumor's growth or survival of experimental animals. After treatment with PHPMA conjugates there was a significant increase of T-lymphocyte subpopulations in tumor microenvironment compared to controls or free DOX, but only in mice with confirmed macroscopic regression of tumor within two weeks. Mice treated with conjugates showed significantly lower cancer infiltration of lymph nodes and spleen.

**Conclusion:** FNAB provides a great benefit to *in vivo* monitoring of cell changes directly in the tumor after treatment. The number of infiltrating T-lymphocytes increases in correlation with consecutive tumor eradication after treatment with PHPMA. This proves that not only direct cytotoxic but also immunostimulating effect are necessary for successful treatment.

## Keywords

Doxorubicin conjugates, drug targeting, fine needle aspiration biopsy, metastatic spread, tumor microenvironment

## History

Received 6 February 2013

Revised 30 March 2013

Accepted 1 April 2013

Published online 26 April 2013

## Introduction

Tumor excision after euthanasia or in anesthesia is a standard method to acquire samples from the body. However, this method has a significant influence on viability of the cells and also tumor progression cannot be measured on the same examined animal. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) is an easy, unpretentious method with minimal influence on tissues [1]. This makes it ideal for repetitive withdrawal of cell material for further analyses, e.g. cytology, *in-situ* hybridization, polymerase chain reaction, Southern blotting, gene microarrays or flow cytometry [2,3]. It is commonly used in clinic for the puncture of parenchyma organs, such as thyroid or salivary glands, lymph nodes or even primary tumors [4,5]. Because of minimal harm to the tissue it can be performed repetitively [6]. However, this method has not been widely used in animal experiments so far.

Anti-cancer chemotherapy in clinical practice is complicated because of the adverse side effects of

conventional therapeutics. Doxorubicin (DOX) is one of the most effective anthracycline antibiotics with a broad anti-tumor spectrum, unfortunately, numerous side effects such as cardiotoxicity or bone marrow suppression limits its use in daily clinical practice [7,8]. Drug delivery system (DDS) modifies its release profile, absorption, distribution and elimination for the benefit of improving product efficacy and safety, as well as patient convenience and compliance [9]. To eliminate mentioned side effects, many different carriers of DOX have been prepared. One of them is widely used, water-soluble, non-toxic copolymer based on *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA). Covalent conjugation of DOX to HPMA copolymer eliminates its adverse cytotoxicity, as this conjugate is biologically inactive when circulating in the bloodstream [10]. Enhanced and tumor-selective accumulation of HPMA conjugate within the solid tumor is achieved either passively due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect or actively by addition of a targeting moiety (e.g. antibodies, lectins, carbohydrates) [11]. The two carrier-based DDS we have used are non-targeted conjugates, where DOX is bound to a HPMA copolymer carrier (PHPMA) through a proteolytically cleavable oligopeptidic GlyPheLeuGly spacer (DOX<sup>AM</sup> - PHPMA) and the same

Address for correspondence: Jaroslav Betka, Department of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology, ASCR, v.v.i., Videnska 1083, 142 20, Prague 4, Czech Republic. Tel: +420 774 560787. E-mail: jara.betka@gmail.com

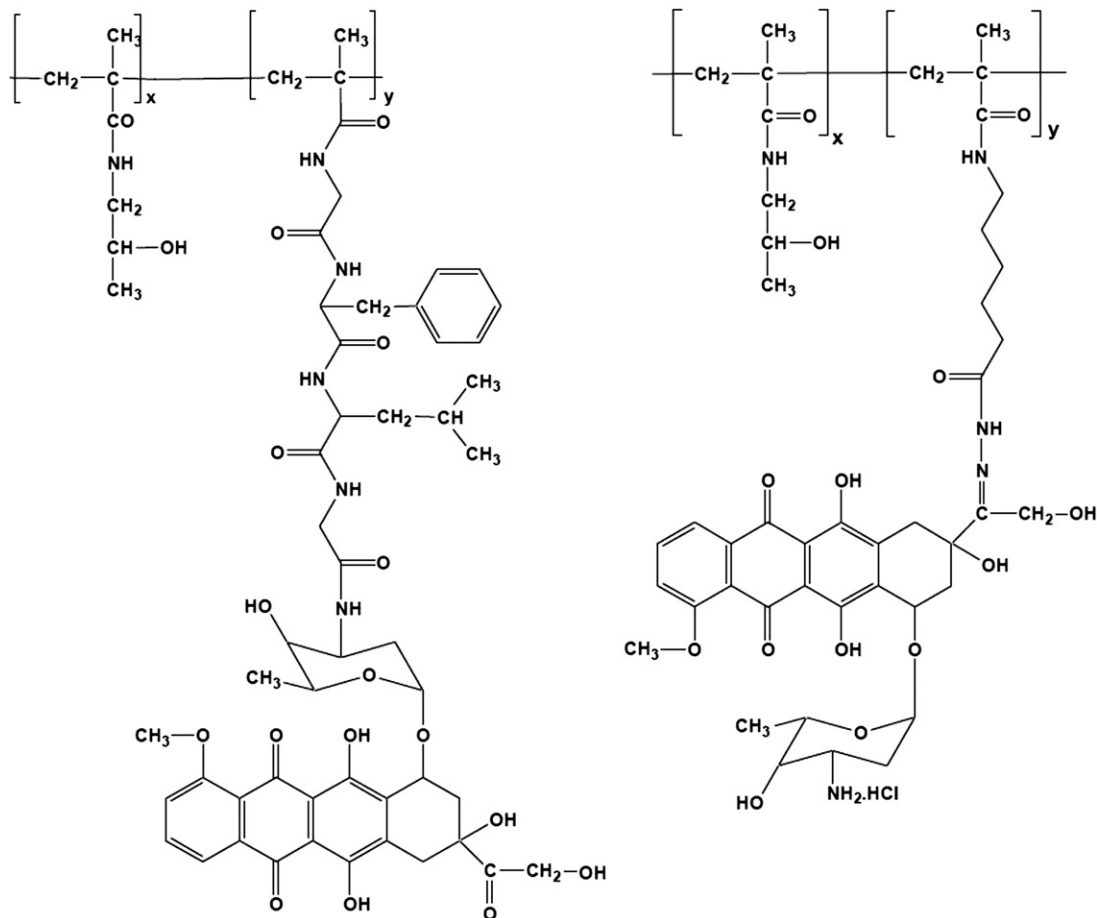


Figure 1. Chemical structure of DOX<sup>AM</sup> - PHPMA (left) and DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA (right) conjugates.

copolymer binding DOX through hydrolytically, pH sensitive bound (DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA) [12,13]. Besides their chemical structure (Figure 1), these two conjugates differ in drug release mechanism. DOX is released from the conjugate with hydrazone bond intracellularly by pH-sensitive hydrolysis at sites with low pH (endosomes, lysosomes), penetrates through cytoplasm and accumulates in the nuclei where it induces apoptosis [14,15]. In the case of DOX<sup>AM</sup> - PHPMA, the mechanism of cell affecting is not so clear, the cell death is most probably a consequence of accumulation of conjugate and its interaction with the cell membrane system causing a general blockage of cell transport and collapse of cell metabolism [16]. In contrast with treatment by other cytostatics, PHPMA conjugates are effectively eliminated from the body and their large doses do not significantly influence the basic immune defense reactions of experimental mice. It was also described that PHPMA conjugates possess the ability to reduce immunogenicity of pharmacologically active proteins similarly as documented for polyethylene glycol (PEG)-L-asparaginase [17,18], as well as the non-specific uptake of liposome/nanoparticle-based drugs and other therapeutic agents [19]. The most promising advantage of PHPMA polymer drugs is in the cumulative effect of their direct cytotoxicity and immunomobilizing activity. These conjugates do not even decrease bone marrow toxicity in mice, which leads to the fact that responding tumor-specific immune cells are able to eliminate minimal residual disease, but they have also augmentation effect on activity of some

immunocompetent cells. It means that DOX-bound HPMA copolymer (DOX - PHPMA) conjugates also possess, besides powerful direct anti-tumor effect, immunomobilization properties [20]. Till date, the mechanism of PHPMA influence to immunocompetent cells is not very well understood. It was already documented that treatment with PHPMA-based polymeric conjugates, significantly decreases FasL expression on tumor cells – increased FasL expression on surface cancer cells is a well-known defending mechanism, which can significantly attenuate or even eliminate any of the local anti-tumor response [21]. The role of cellular chaperone calreticulin (CRT) surface cell expression on cancer cells exposed to either of the conjugates was also published [22]. The aim of recent research of PHPMA conjugates is to understand more clearly how these conjugates affect the immune anti-tumor response. Our approach is to observe tumor microenvironment in different post-therapeutic intervals to find reliable changes.

## Material and methods

### Materials

Non-targeted HPMA copolymer conjugates with DOX are bound via an amide bond situated at the end of proteolytically cleavable GFLG spacer (DOX<sup>AM</sup> - PHPMA) or with a hydrolytically cleavable hydrazone bond at the end of aminocaproic acid spacer (DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA) (Figure 1). Hydrazine monohydrate, methacryloyl chloride,

1-aminopropan-2-ol, 4-nitrophenol, 6-aminohexanoic acid (ah), glycyl-L-phenylalanine, L-leucylglycine, 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN), N-ethyl-diisopropylamine, dimethylformamide, phthalaldehyde (OPA), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, 1-hydroxybenzotriazole, dimethyl sulfoxide (DMSO) and doxorubicin hydrochloride (DOX.HCl) were purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). 2,4,6-Trinitrobenzene-1-sulfonic acid was purchased from SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Germany). Specific fluorescently labeled antibodies PE-Cy7 anti-mouse CD45, PE anti-mouse CD3, Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD8a, APC anti-mouse NK1.1 (eBioscience Inc, San Diego, CA), PerCP Rat anti-mouse CD4 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), Hoechst 33342 dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) were used for the fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.

### Cell cultures

EL4 T-cell lymphoma cell line stably expressing Enhanced Green Fluorescent Protein (EL4-EGFP<sup>+</sup>) [23] and EL4 T-cell lymphoma cell line (TIB-39) were cultivated in a RPMI 1640 medium (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) without phenol red, supplemented with heat-inactivated 10% v/v fetal calf serum (FCS), 2 mmol L-glutamine (Gibco), 50 mmol 2-mercaptoethanol (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland), 4.5 g/L glucose, 1.0 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Rockville, MD), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>–95% air atmosphere for 48 h.

### In vivo experiments

All animal studies were performed in accordance with the Act on Experimental Work with Animals (Decrees No. 311/97; 117/87, and Act No. 246/96) of the Czech Republic. A total of  $2 \times 10^5$  EGFP<sup>+</sup> EL-4 T lymphoma cells were subcutaneously injected into the right flank of female C57BL/6 mice (from the breeding colony of the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.). The mice that developed palpable tumors reaching 80–100 mm<sup>2</sup> (measured and counted from two perpendicular diameters), within 10 d after the implantation were selected. At this size, tumors were free of visible necrosis. The cell material was obtained from the animal by FNAB and by standard excision (see more below). The mice were observed three times a week for signs of tumor progression and acute toxicity. The tumor size survival time and number of long-term survivors were determined. We have used at least eight animals per group.

### Methods of cell material withdrawal

#### Fine needle aspiration biopsy

A standard 10 ml aspirating syringe connected to a needle of 1.2 mm diameter (Chirana T. Injecta, Stara Tura, SK) was fixed in Cameco gun (Morton Medical, Cirencester, UK). The skin above the tumor was disinfected with ethanol and the needle was passed into the tumor mass in its widest diameter in approximately 60 degrees angle, moved inside the tumor forward and back in about 0.5 cm range and the cells were withdrawn by aspiration with a syringe. No severe bleeding after this procedure was noticed. Immediately after removing the needle, 1 ml of ice cold culture medium was aspirated and

all cell material was flushed into a 1.5 ml Eppendorf tube, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in culture medium and kept on ice until analyzed.

#### Excision

After euthanizing the mouse, the tumor sample was excised in size of at least  $5 \times 5 \times 5$  mm from the solid internal part of the tumor free of visible necrosis. The lymphatic nodes and spleen were identified and dissected according to standard procedures. Gained material was divided into two parts, first part of the tissue was homogenized in a glass homogenisator (Pyrex, Corning, NY) with 1 ml of PBS, washed in PBS three times, and resuspended in a culture medium and also kept on ice until analyzed. Second part of the tissue was used for standard histological analyses with hematoxylin-eosin staining.

### Visualization of frozen tumor tissue sections with confocal microscope

The tumor samples gained by excision on the 17th day after tumor inoculation was immediately frozen with liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C until ready for analyzing. With cryotome slices of 5–10 μm thickness were made from tumor blocks and placed onto glass slides suitable for immunohistochemistry. Immunohistochemical staining was performed as the next step – the glass with frozen tissue slices was fixed with paraffin, specific fluorescently labeled antibody anti-CD8 was dissolved in PBS and added to the samples according to manufacturers recommendations, and the samples were incubated for 30 min at 4 °C in a dark chamber. Finally, the slides were washed twice in PBS, 5 min each, and analyzed with Olympus FV1000 confocal microscope (Olympus FV1000, Tokyo, Japan).

### Flow cytometry

All cells to be analyzed were suspended at  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cells/ml in the culture medium in a 96 U-well microplate and strained through 70 μm filter to eliminate cell aggregates. EL-4 cells (TIB-39) and splenocytes from control C57BL/6 mouse were added as negative control for flow cytometry analysis. The samples were diluted to concentration  $1 \times 10^6$  cells and suspended in 100 μl of ice-cold culture medium. Specific fluorescently labeled antibodies anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45 and anti-NK1.1 were dissolved in ice-cold PBS and added to the samples according to manufacturers recommendations and then the samples were incubated with the stain for 20 min at 4 °C in a dark chamber. After staining cells were rinsed twice and resuspended in 100 μl of PBS per well before analysis. Twenty microliters of Hoechst 33258 for detecting of viability was added to each sample 5 min before flow cytometric analyzing, which was performed with LSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Before each session, machine settings were adjusted so that a cellular standard produced the same absolute fluorescence. Data were analyzed on the *FlowJo* software (TreeStar, Ashland, OR). The ratio of lymphocyte subpopulation was calculated as described in ‘‘Results’’ section. For detection of cytokine activity, the lysate from tumor was used with Mouse Th1/Th2/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (according to the manufacturer’s recommendations). Data were analyzed by FlowCytomix Pro 2.4 software (eBioscience Inc, San Diego,

CA). Presented flow cytometry scatter plots are representative of replicated experiments.

### Statistical analysis

The average or representative results of at least three independent experiments were presented. The significance of any differences between experimental groups was evaluated by Student's test. In all statistical analyses, significance was assessed at the  $p \leq 0.05$  level.

## Results

### Synthesis of polymer-DOX conjugates

Two types of HPMA copolymer conjugates with DOX differing in mechanism of drug release were synthesized using synthetic, purification and characterization procedures described earlier. DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA releases DOX in a mild acidic environment by pH-sensitive chemical hydrolysis of hydrazone bond, while DOX<sup>AM</sup> - PHPMA releases DOX by enzymolysis of the oligopeptide GlyPheLeuGly spacer by lysosomal enzymes. DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA conjugate contained 9.8 wt% of polymer-bound DOX (<0.1% of free DOX was present in the conjugate) and its molecular weight  $M_w$  was 27 000 g mol<sup>-1</sup> with polydispersity index  $I_n = 1.8$ , while content of DOX in DOX<sup>AM</sup> - PHPMA was 7.0 wt% (free DOX <0.05%),  $M_w$  was 52 000 g mol<sup>-1</sup> and  $I_n = 1.5$ . For chemical structure of the conjugates, see Figure 1.

### Comparison of the FNAB and excision parameters

In the first phase of the project, influence of FNAB on the tumor's size growth (Figure 2A) was analyzed and changes in animal survival were also studied (Figure 2B). The FNAB method was also compared with the standard excision in terms of subsequent usability for an analytical processing. Collection of biological samples by the FNAB method had neither any effect on the tumor's growth nor the survival of the experimental animals in comparison with the control group, and during sample collection no serious injury of the experimental animal was documented (massive bleeding, abscess in the injection area, extremity paresis). No differences in the microscopic environment of the tumor were detected during histological analysis of the frozen slices (increased inflammatory infiltration, cell necrosis in the injection area), which would show some effect on the tumor after needle puncture. When analyzing tumor material with flow cytometry, we have gained, at comparable viability, a significantly smaller proportion of debris, and better resolution of light scattering detectors in a sample acquired by the FNAB method rather than excision (Figure 2C). In determining the representation of CD3+, CD3+/CD4+ and CD3+/CD8+ T-cell populations in the tumor (calculated as a ratio of the lymphocyte number to the number of tumor cells in the collected sample), no statistically significant differences of both methods of collection were detected (Figure 2D).

### Immunomobilization effect of DOX-bound HPMA copolymer conjugates on the primary tumor

FNAB has the possibility of repeated sampling monitoring of correlation of changes in the number of infiltrating T-cells in

tumor tissues with the successive curing of experimental animals with free doxorubicin and PHPMA conjugates. Tenth day after subcutaneous inoculation of EL4-EGFP<sup>+</sup> cells, free DOX in a 1 × 5 mg/kg i.v. dosage was applied intravenously. Both DOX<sup>AM</sup> - PHPMA or DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA conjugates – for better visualization they are displayed in figures as DOX-HPMA(AM) and DOX-HPMA(HYD) – were applied i.v. in a 1 × 15 mg/kg equivalent of DOX dosage. The dosage of DOX was calculated in such a way so no damage was done to the non-malignant cells, and for the polymeric therapeutics it was calculated to cure approximately one half of mice inoculated with tumor cells so the possible effect of the immune system with the part of experimental group where tumor regression occurred, dose of conjugates was set as equitoxic. According to the effect of therapeutics, the mice were, after application of therapeutics, divided into groups according to the progression or regression of the tumor mass. The highest curative effects were registered after DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA treatment, where 14 mice out of 19 complete remission of the tumor took place within 40 d. In case of DOX<sup>AM</sup> - PHPMA the treatment was successful in 11 out of 19 observed cases. After treatment with free DOX, there was a tumor progression and consecutive death before day 40 with all experimental animals (Figure 3A,B). Changes in representation of individual lymphocytic subpopulations in the tumor lymphocytic infiltrate of the EL4 T-cell lymphoma, after application of free DOX and DOX - PHPMA conjugates, were measured with flow cytometry, after sample collection by the FNAB method on the 13th and 17th day after inoculation, meaning on the 3rd and 7th day after treatment. Using the FNAB method assured the possibility of tracking of the further fate of mice after sample collection. The highest lymphocytic infiltration was registered in the tumor tissue of mice treated with DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA but only in cases where complete tumor regression has taken place. Here, values of lymphocytes were approximately twice as high compared to control, compared to treatment with free DOX, and also after treatment with DOX<sup>AM</sup> - PHPMA after which however, tumor progression continued. With the CD3+, CD3+/CD8+ and CD3+/NK1.1 lymphocytic populations approximately twice as high values of infiltration were registered. With the CD3+/CD4+ population there was a growth of at least 50%. After application of DOX<sup>AM</sup> - PHPMA, where complete tumor remission took place, higher representation of all lymphocytic populations was also registered (with the CD3+/CD8+ and CD3+/NK1+ lymphocytic populations, there was growth of at least 50%) in comparison with the control, DOX treatment and unsuccessful DOX<sup>AM</sup> - PHPMA treatment. In all mice with progressing tumor, without dependence on the applied treatment, increased lymphocytic infiltration, compared to the control group, was not detected (Figure 4A–D). These results were qualitatively verified by analysis of microscopic excision incisions (on the 17th day after inoculation with tumor cells) using the Olympus FV1000 confocal microscope and higher representation of CD3+/CD8+ infiltrating lymphocytes in the tumor incision after a successful treatment with DOX<sup>AM</sup> - PHPMA and DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA was also documented (Figure 4E).

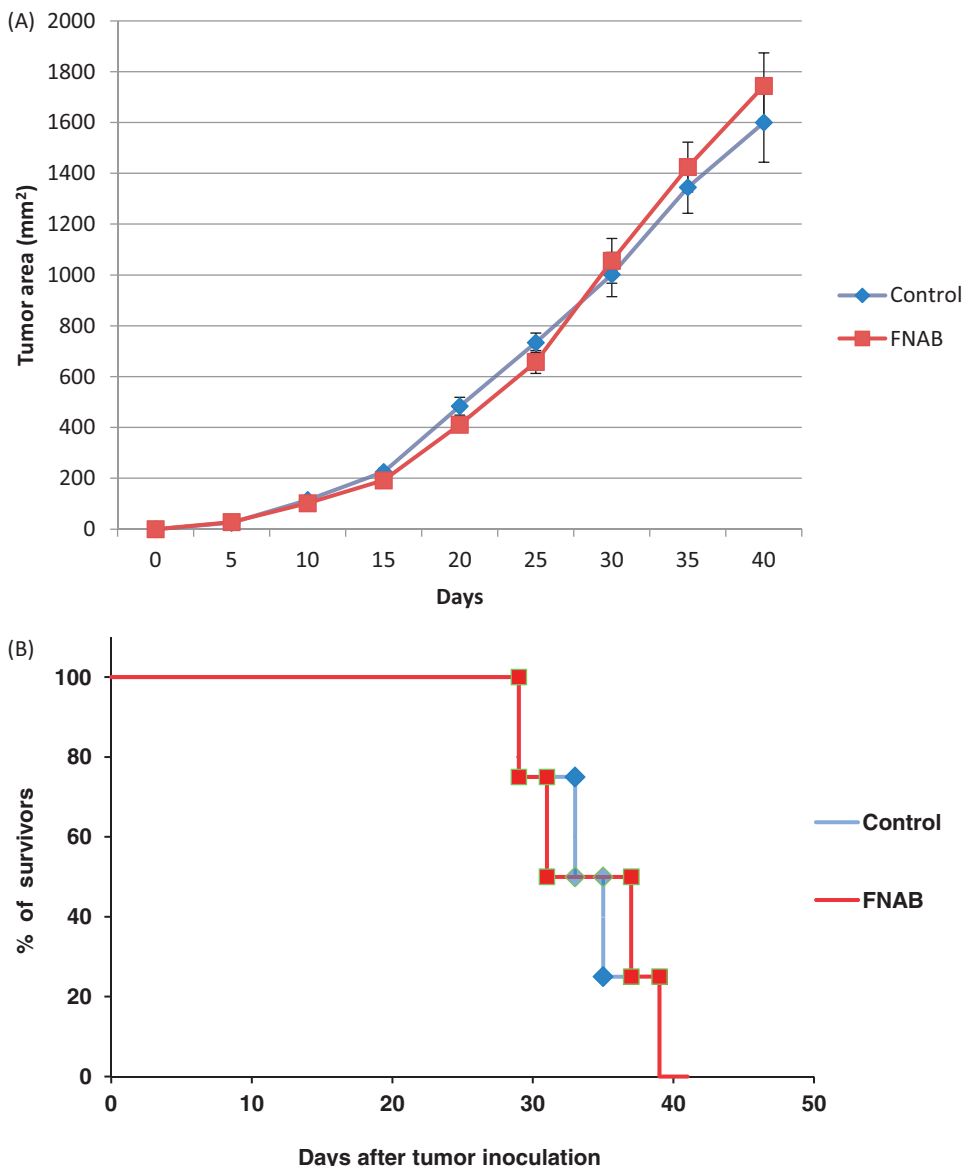


Figure 2. Comparison of tumor progression (A) and overall survival (B) after the FNAB of C57BL/6 mice bearing EL4 lymphoma. Mice were inoculated with  $2 \times 10^5$  EL4 - EGFP+ cells s.c. and the fine needle biopsy was performed on mice in FNAB group (red lines) on the 10th day since inoculation. The animals were observed three times a week for signs of tumor progression. The survival time, tumor size (counted as the tumor area) and the number of long-term survivors was determined. The cell material obtained by the FNAB method and standard excision after staining with anti-CD45 antibody and Hoechst 33342 for viability were analyzed by FACS. Representative data are shown, tumor cell population is gated (C). The ratio of CD3+, CD3+/CD4+ CD3+/CD8+ T-lymphocytes subpopulations gained by different methods (FNAB – red column, excision – blue column) were analyzed and compared (D). The ratio of each T-lymphocyte subpopulation was calculated as:  $ratio = \frac{[CD\ subtype\ cells] \times 10000}{[EGFP+cells]}$ .

### Analysis of cytokines in the tumor's microenvironment

The level of cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-27, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  in the tumor's microenvironment after treatment with free DOX, DOX<sup>AM</sup> - PHPMA or DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA was measured on the 17th day after inoculation (meaning on the 7th day after application of the therapeutic) using the FlowCytomix Multiple Analyte Detection System (eBioscience) and a following analysis with flow cytometry. From the spectrum of the observed cytokines, difference in the levels of IL-1 $\alpha$  was detected after treatment with both polymeric conjugates, DOX<sup>AM</sup> - PHPMA as well as DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA, which was twice as high as compared to the control. On the other hand, level of the anti-inflammatory

cytokine IL-6 was twice as high with the untreated animals, and animals treated with non-modified DOX compared to the animals treated with DOX<sup>AM</sup> - PHPMA as well as DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA conjugates (Figure 5).

### Interference of metastatic infiltration in the glands after treatment with free DOX and DOX-bound HPMA copolymer conjugates

To detect metastatic infiltration, dissection of inguinal, axilar, mesenteric and para-aortic nodes and the spleen was performed (Figure 6A). To determine the time necessary for metastatic infiltration, measuring took place in several different time intervals after inoculation. Collected material was analyzed with flow cytometry. The largest amount of

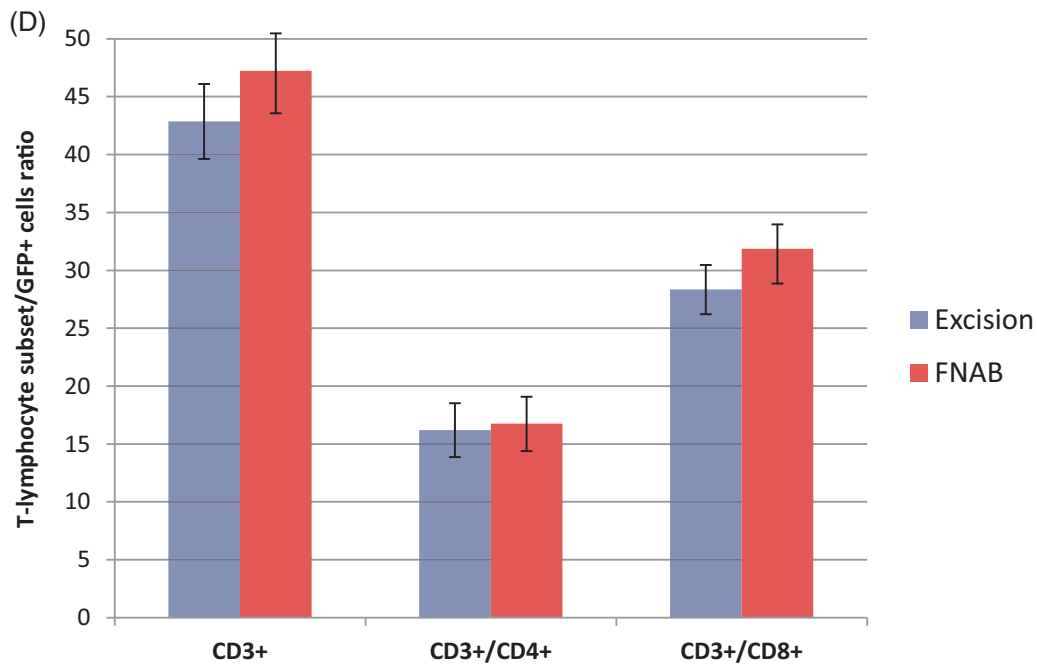
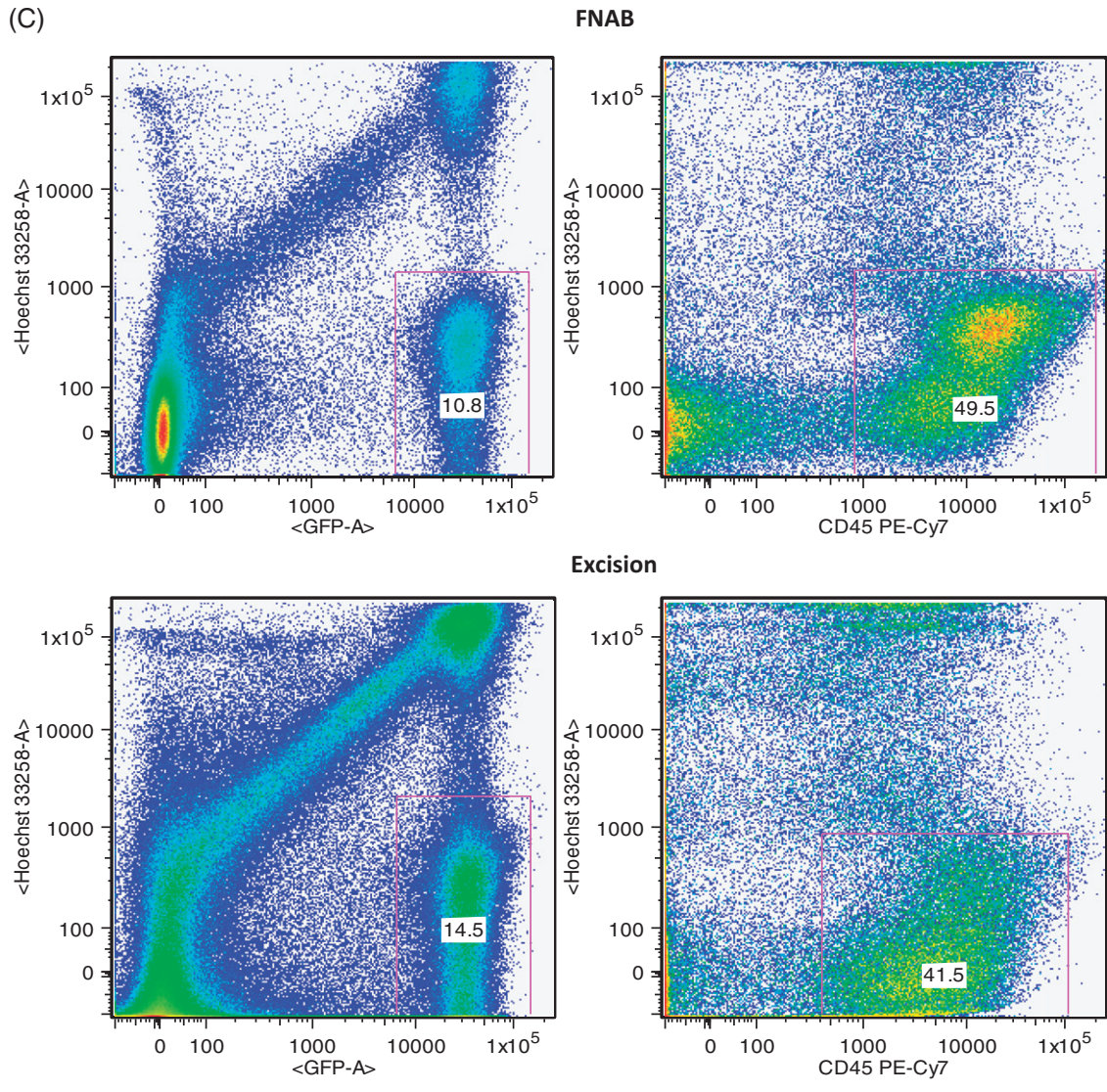


Figure 2. Continued.

Journal of Drug Targeting Downloaded from informahealthcare.com by Jaroslav Betka on 11/25/13  
For personal use only.



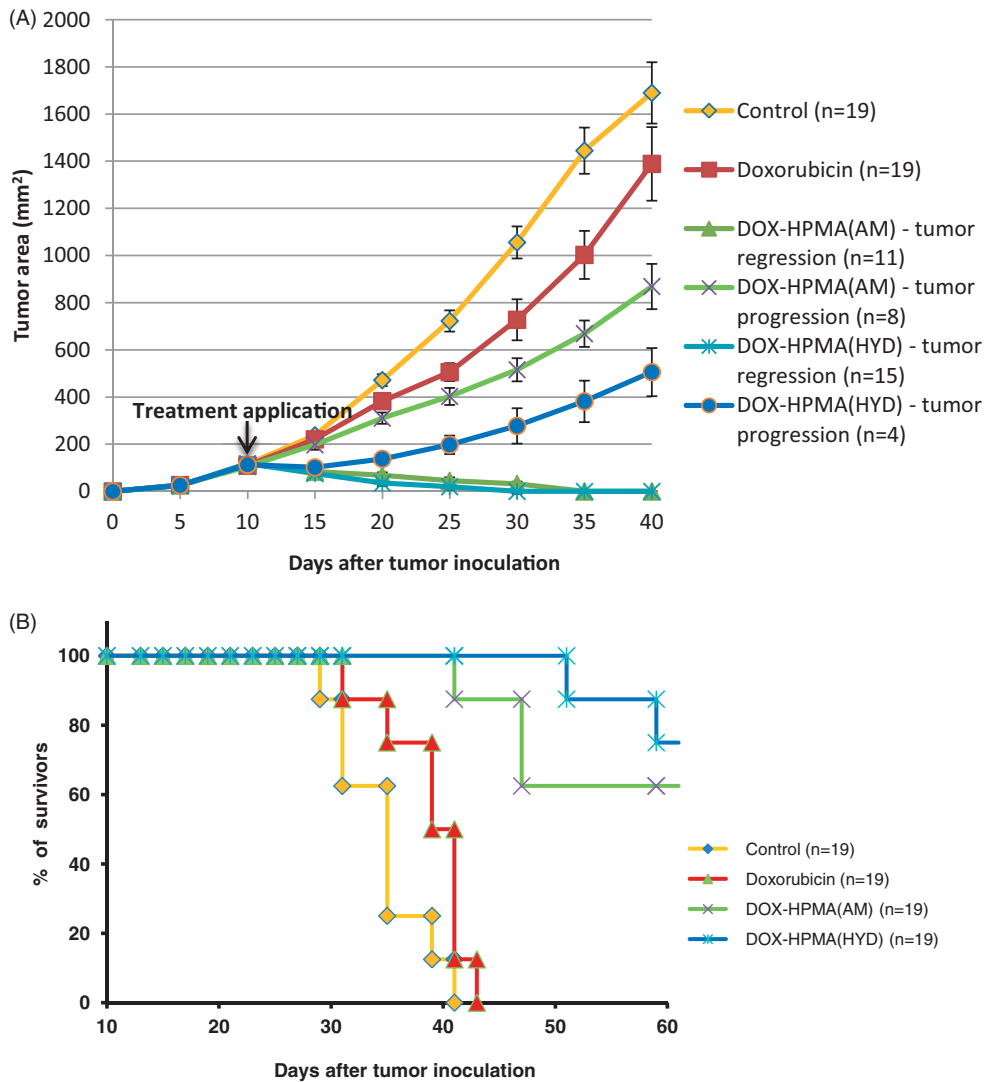


Figure 3. Comparison of tumor progression (A) and overall survival (B) after the treatment with free DOX and PHPMA conjugates. Mice were inoculated with EL4-EGFP<sup>+</sup> mouse T-cell lymphoma on day 0, DOX ( $1 \times 5$  mg/kg) or DOX<sup>AM</sup> - PHPMA and DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA ( $1 \times 15$  mg/kg) were applied 10 d after inoculation. The animals were observed at least three times a week and divided into groups according to tumor progression/regression in dependence on the used treatment, survival time and number of long-term survivors, were determined.

tumor cells (EL4-EGFP<sup>+</sup> T-cell lymphoma) was detected in the catchment inguinal nodes on the tumor's side (ipsilateral nodes), this was no sooner than after 14 d after inoculation, in earlier intervals where the findings of tumor cells in the nodes were statistically inconclusive. Smaller, but still well detectable amount of tumor cells were captured in the contralateral inguinal lymph nodes (Figure 6B). In case of the spleen, was the tumor infiltration detected on the 21st day after inoculation. To observe the effect of PHPMA conjugates on the metastatic dissemination the sentinel nodes were selected. Because the time necessary for tumor infiltration of the nodes and the spleen was longer than in case of the observation of changes in the primary tumor, it was also necessary to select longer time for the effect of the therapeutic (7 and 14 d). On the 14th day after subcutaneous inoculation of EL4 cells, free DOX and PHPMA conjugates (DOX<sup>AM</sup> - PHPMA or DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA) were intravenously applied. On the 21st and 28th day after inoculation with tumor cells, extirpation of sentinel lymphatic nodes and the spleen, was performed on the mice with palpation verified primary tumor,

after considerate euthanasia, collected materials were analyzed with flow cytometry. In all cases, infiltration of the lymphatic nodes as well as the spleen with tumor cells was proved, but the amount of infiltrating tumor cells was in both cases significantly lower with the mice, which were treated with DOX - PHPMA conjugates compared to the untreated mice or mice treated with free DOX – on the 21st day after inoculation, in the case of DOX<sup>AM</sup> - PHPMA, tumor infiltration of the nodes approximately 10 times lower compared to the control was detected, and in the case of DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA even more than 15 times lower, on the 28th day after treatment was the amount of tumor cells 3.5 times lower with DOX<sup>AM</sup> - PHPMA and 7 times lower with DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA (Figure 6C) compared to the control. In case of free DOX 3 times lower infiltration was detected on the 21st day, and 0.6 times lower on the 28th day. With the spleen, tumor infiltration was, after 28 d since inoculation, 3 times lower than with free DOX, 8 times lower with DOX<sup>AM</sup> - PHPMA, and 15 times lower with DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA (Figure 6D).

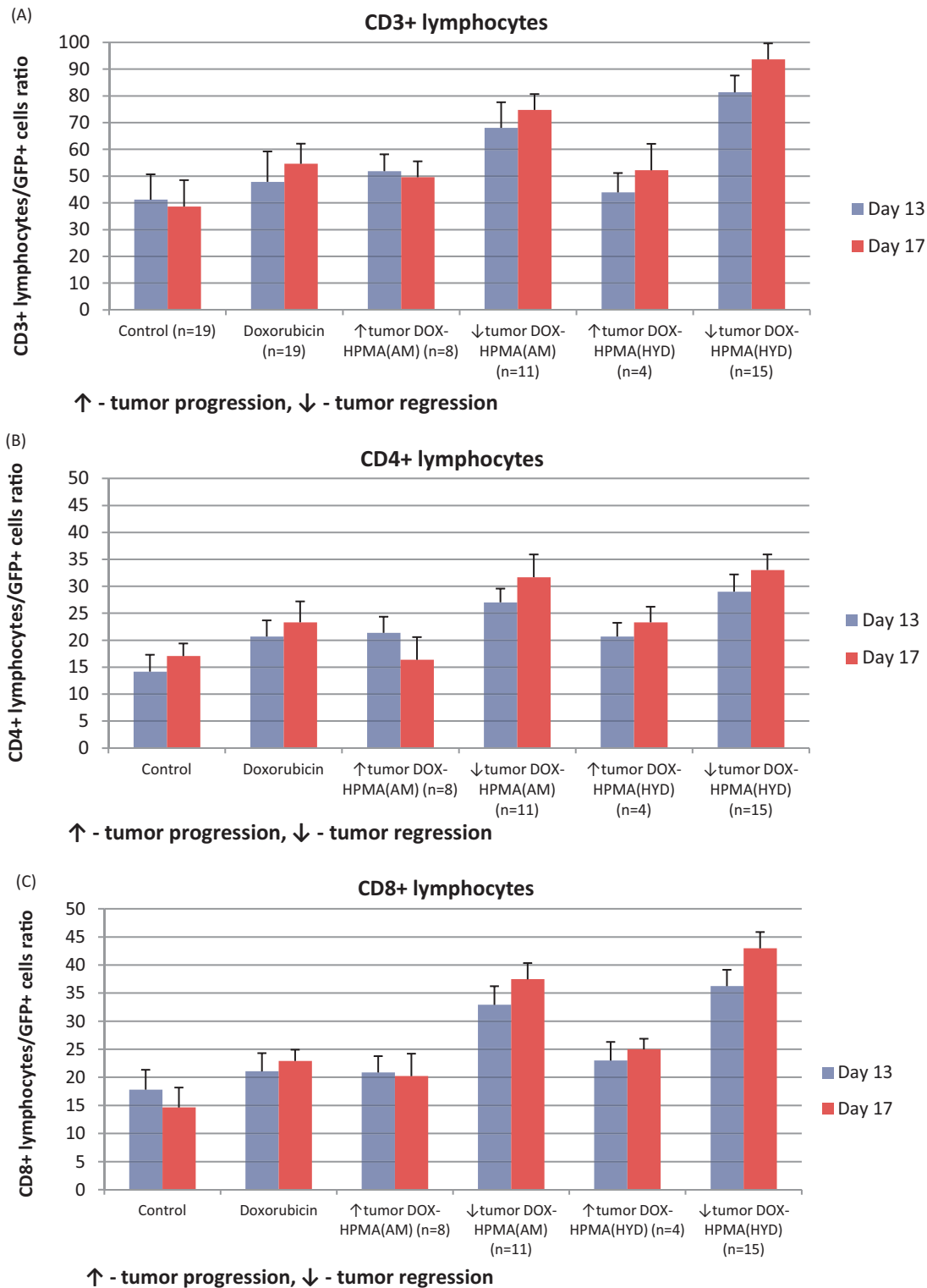


Figure 4. The distribution of T-lymphocyte subpopulations in EL4-EGFP<sup>+</sup> tumor microenvironment after treatment with free DOX or its PHPMA conjugates. Mice were inoculated with EL4-EGFP<sup>+</sup> mouse T-cell lymphoma, DOX (1 × 5 mg/kg) or DOX<sup>AM</sup> - PHPMA and DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA (1 × 15 mg/kg) were applied 10 d after inoculation and the cell material was obtained by the FNAB method on days 13 and 17 after inoculation. All samples gained by FNAB were stained by anti-CD45, anti-CD3 (A), anti-CD4 (B), anti-CD8 (C) and anti-NK1.1 (D) antibodies and analyzed by flow cytometry. In each subpopulation the ratio of T-lymphocyte cells was related to the used therapy and its efficiency noticed from the previous experiment. The ratio of each T-lymphocyte subpopulation was calculated as:  $ratio = \frac{[CD\ subtype\ cells] \times 10000}{[EGFP+cells]}$ . The results were confirmed by microscopic analysis of the tumor frozen tissue sections with Olympus FV1000 confocal microscope (E - green fluorescence represents EL4 GFP<sup>+</sup> tumor cells, red fluorescence represents CD8<sup>+</sup> lymphocytes). Slides were made from tumor excised on the 17th day since inoculation. Representative plots with magnification of 20× Z2 are presented.

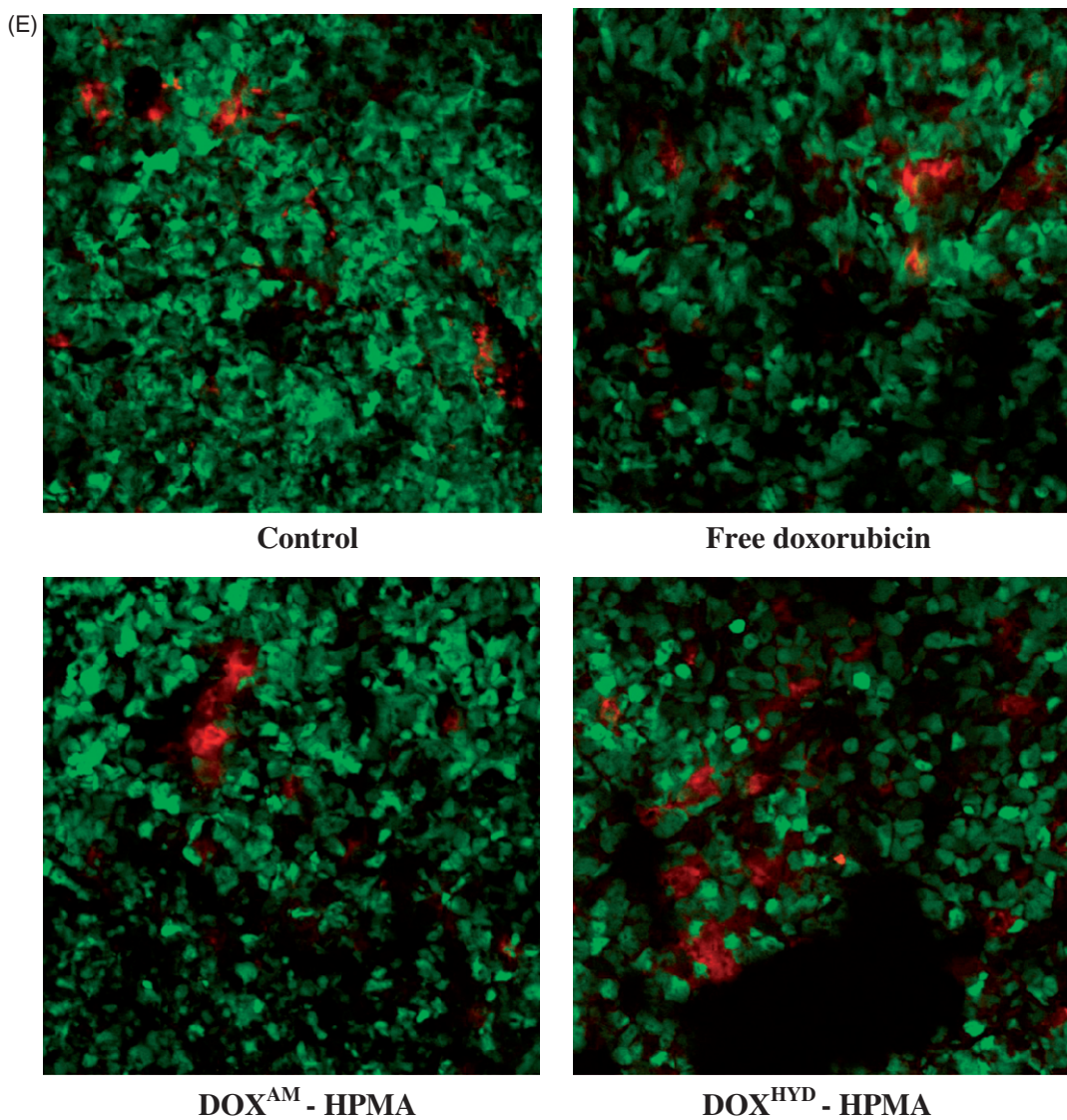
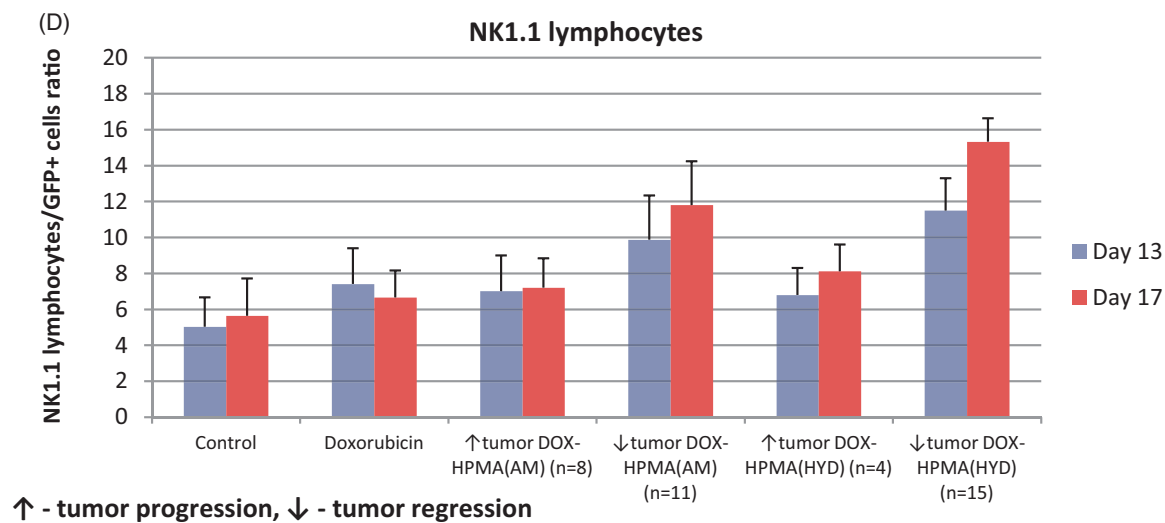


Figure 4. Continued.

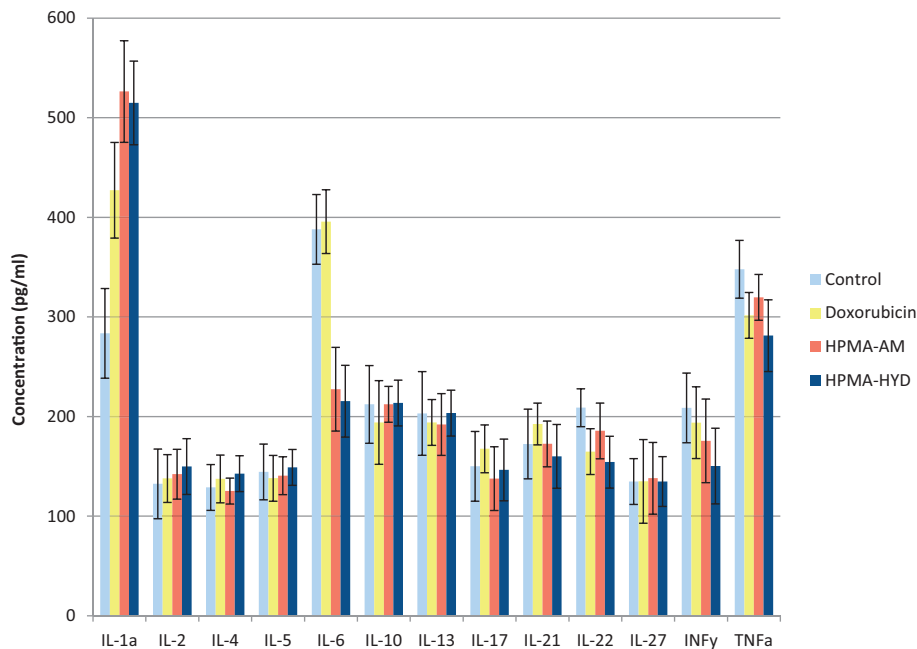


Figure 5. The production of cytokines IL-1a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-27, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  from the tumor samples gained by excision on day 17 was measured by flow cytometry, cell material was prepared with a FlowCytomix Multiple Analyte Detection System. In each subpopulation the ratio of T-lymphocyte cells was related to the used therapy and its efficiency noticed from the previous experiment.

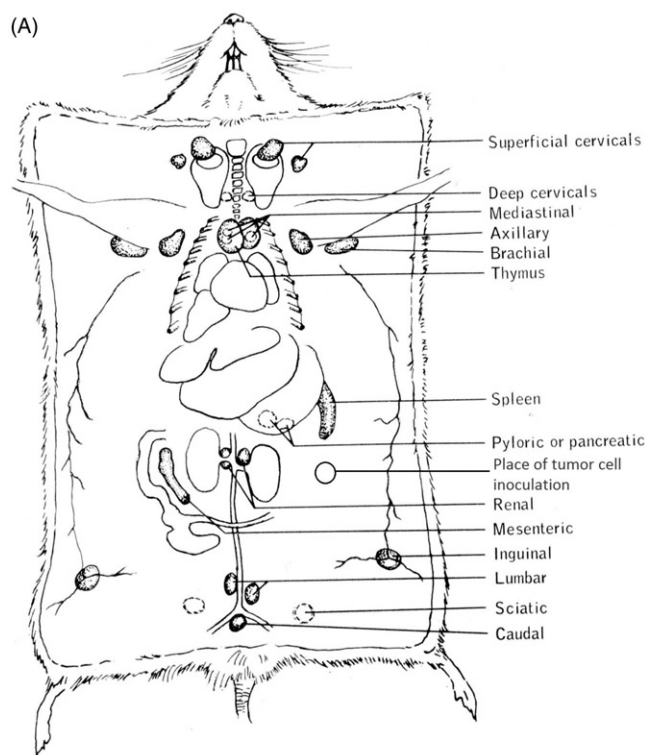


Figure 6. Metastatic infiltration to lymph nodes and the spleen was observed after treatment with free DOX and its PHPMA conjugates. To detect the specific lymphatic nodes with significant metastatic infiltration for further monitoring, EL4-EGFP<sup>+</sup> tumor cells were applied s.c. in the right flank of the mouse. After 17 d since inoculation, mice were euthanized and inguinal, axial, mesenteric and para-aortal lymph nodes were extirpated and homogenized (A). Cell material after staining with CD45 antibody and Hoechst 33342 for viability was analyzed by flow cytometry, red highlighted area represents positive EL 4 tumor cells (B). Further, the ipsilateral inguinal lymph nodes (as the region of the highest tumor cell infiltration) and the spleen were analyzed for monitoring of metastatic spread. Mice inoculated with EL4-EGFP<sup>+</sup> T-cell lymphoma were treated after 14 d since inoculation with free DOX (1  $\times$  5 mg/kg) or DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA and DOX<sup>AM</sup> - PHPMA (1  $\times$  15 mg/kg). Lymph nodes (C) and the spleen (D) were extirpated after 21 and 28 d, respectively, since the tumor inoculation, homogenized, stained with anti-CD45 antibody and Hoechst 33342, and analyzed by flow cytometry. The ratio of each GFP<sup>+</sup> tumor cells was calculated as:  $ratio = \frac{EGFP^+ \text{ cells} \times 100000}{[CD45^+ \text{ cells}]}$ .

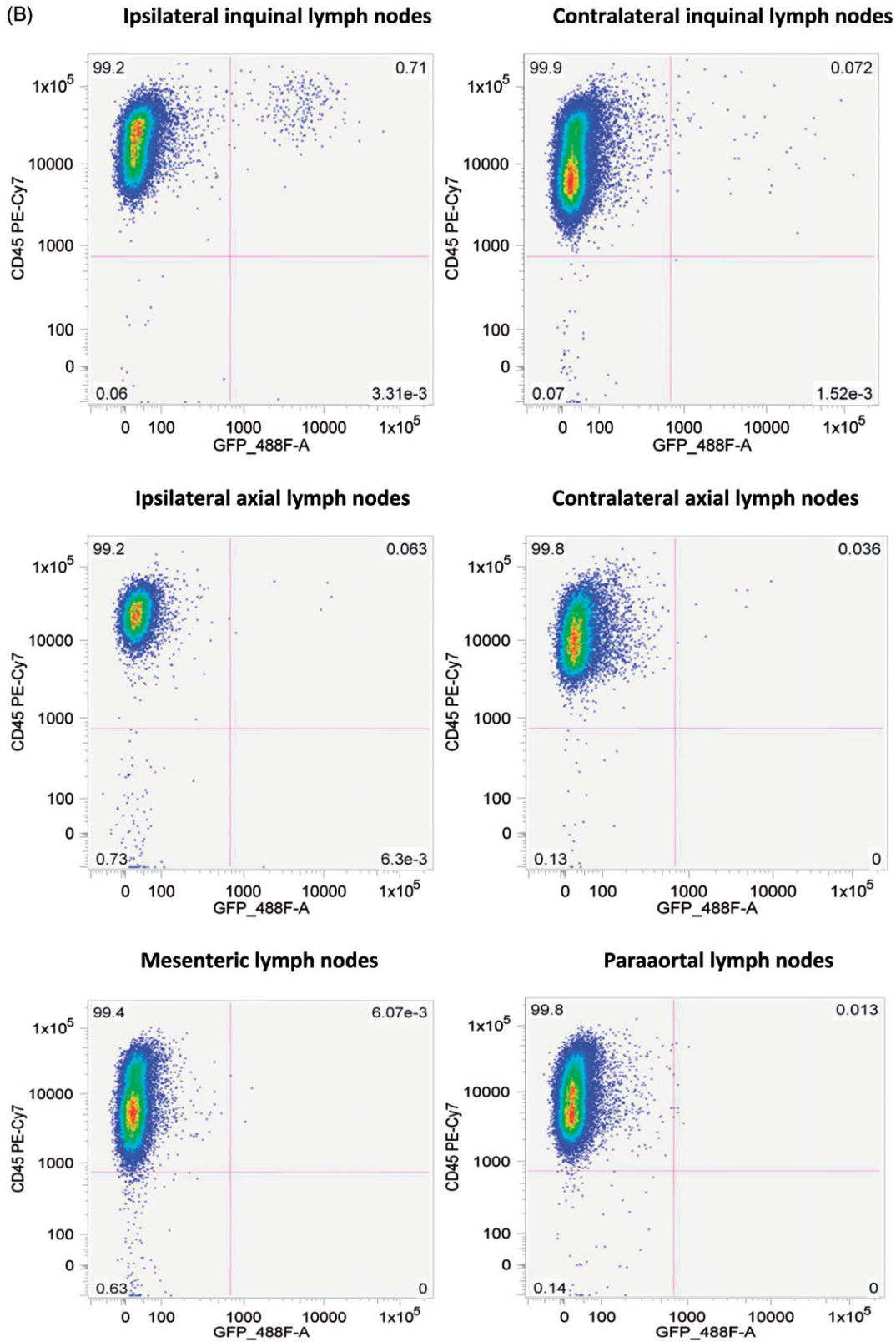


Figure 6. Continued.

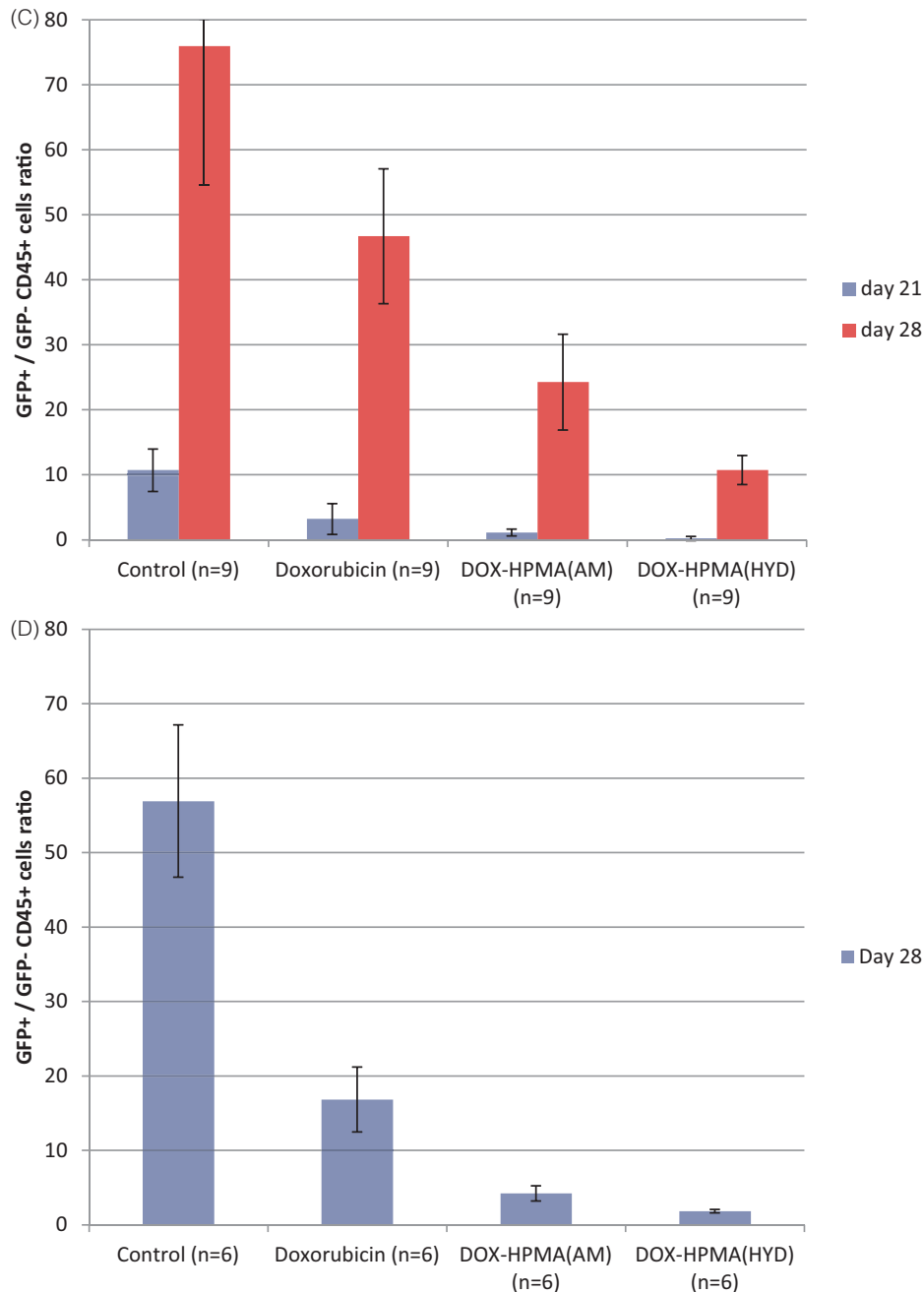


Figure 6. Continued.

## Discussion

Fine needle aspiration biopsy is a suitable method for diagnostic sampling of cell material from solid tumor in mice. Its advantages compared to the standardly used excision lie mainly in its simple and fast execution without significant damage to the recovered as well as the surrounding tissue [24,25]. Using this method it is even possible to recover samples repeatedly without the need to put the experimental animals to death. Therefore, it is possible to observe the development of disease simultaneously with the continuous evaluation of changes in the tumor's microenvironment on the very same experimental individual without the need of other control groups [26]. Material collected by the FNAB method has, for evaluation by flow cytometry, entirely comparable parameters with the standardly used excision; on the contrary,

it is possible to reach smaller proportion of debris and that way better differentiation of populations on the scatter detectors. This enables us to define exactly even distinctly minority cell populations, for example, lymphocytic infiltrate. Thanks to the use of FNAB we were able to detect changes in the tumor's microenvironment depending on the given therapeutic as soon as on the 3rd day since the beginning of treatment when it was not yet possible to determine, by objective measurement, whether regression or progression of tumor growth will take place after the treatment [27]. After treatment with polymeric conjugates based on HPMa copolymers, we have proved growth (of at least 50%) of lymphocytic populations of T cells – CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ and CD3+/NK1.1 in the tumor mass of mice which then have reached complete tumor regression, in contrast with the tumor microenvironment of mice not treated or treated

with free DOX (with these animals complete remission of the tumor after application of 5 mg/kg DOX equivalent was never proved) [28,29]. What is interesting is that there are animals even though treated with polymer conjugates, which have nevertheless suffered tumor progression and subsequent death but no higher number of T-lymphocytic subpopulations was detected in the tumor. So correlation of statistically significant growth of the number of infiltrating T-lymphocytes in the tumor tissue with the subsequent curing of experimental animals with PHPMA conjugates was proven. This result is in conformity with the finding of a higher level of IL-1a in the tumor environment after treatment with polymeric conjugates and at the same time growth of IL-6 and therefore pro-inflammatory environment with the untreated animals or animals treated with free DOX.

It has been published before [20] that the critical changes in the anti-tumor response take place since the 10th day after application of cytostatic treatment. Determination of the amount of T-cell subpopulations in the tumor microenvironment as soon as since the 3rd day after application of the therapeutic, seems to be a valuable prognostic marker of the immunocompetent cells' response because visual evaluation of the treatment's success is possible on about the 10th day of the therapy. But at that time application of another dose of the therapeutic is basically inactive [30]. When determining the immune response using FNAB as soon as on the 3rd day of treatment, it would be possible to apply the therapeutic again in a higher dosage to the group of mice whose activation of the immune system was not sufficient after the first application of the therapeutic, before significant tumor progression. On the contrary, the group of mice whose activation of the immunocompetent cells was sufficient, there is no need to burden the body with another dose of cytostatic.

It was reported that DOX in addition to its direct cytotoxic effect trigger dendritic cells activation [31]. The same combined mechanism was reported for polymeric conjugates based on HPMA copolymer carrying DOX is conditional upon successful treatment of oncological diseases [32]. Here we documented the experimental model immunological processes in the tumor EL4, which decide the cure takes place (and are statistically demonstrable) as soon as on the 3rd–7th day after application of the therapeutic.

The differences in tumor accumulation and pharmacological efficacy of linear polymeric systems in size-category up to 70 000 g/mol were not documented. Enhanced *in-vivo* efficacy, based on longer blood circulation times and higher tumor accumulation, was documented for the conjugates with significantly higher molecular weight (Mw 130 000 g/mol) [33].

During observation of the metastatic dissemination, tumor infiltration of the catchment lymph nodes as well as the spleen, was proven on the 21st and 28th day, respectively, after inoculation with the EL4 EGFP+ lymphoma. After treatment with PHPMA conjugates, the amount of tumor cells in the lymphatic as well as the distant metastasis was significantly lower than with free DOX and with control animals. Metastatic spread of tumor cells is therefore reduced significantly after treatment with PHPMA conjugates. Combination of the direct cytotoxic effect of PHPMA conjugates carrying DOX-bound via amidic (enzymatically

fissile)-bound (DOX<sup>AM</sup> - PHPMA) or using hydrazone bound (DOX<sup>HYD</sup> - PHPMA) and their immunomodulating abilities cause not only directly against the primary tumor but also at the same time reduces metastatic dissemination and that way significantly slows down the progression of the disease [19]. This would be very helpful in the treatment of cancer in advanced stage.

## Conclusion

We have proved the functionality and usability of the method for biological sampling using FNAB. Using this method it is possible to repeatedly collect biological material from one animal without any effect on the tumor's growth. Cells collected in such a way can be analyzed without any problem by the flow cytometer in multicolor experiments and they provide compact and repeatable results, as well as usable lymph for analysis of cytokine concentration in the tumor microenvironment.

We have proved the data published in the previous publications and we have also proved that an integral part of a successful anti-cancer therapy is the immune reaction and cooperation of therapeutics with mechanisms of the immune system. With animals treated with polymeric conjugates, which subsequently had a total tumor regression, there was a growth of effector subpopulations of T-cell demonstrable as an early marker as soon as on the third day after therapeutic application, growth of IL-1a was demonstrated 7 d after application and metastatic dissemination of the tumor in the nodes and the spleen was, contrary to the control, significantly reduced. On the other hand, with animals treated with polymeric conjugates, free DOX or untreated animals which suffered tumor growth and finally death, growth of any of the observed populations of immunocompetent cells in the tumor microenvironment has never proved. Significant growth of concentration of IL-6 and metastatic dissemination in these animals was comparable to the untreated control.

Screening of tumor microenvironment by FNAB proved to be an excellent diagnostic and prognostic tool for quick and effective verification of efficacy of tested anti-tumor therapy. It enables to monitor the reaction of the tumor immune microenvironment to chemotherapy simultaneously with response to the treatment. In the future this could be an important tool for personalized medicine.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Grant of Czech Science Foundation P301/12/1254 is kindly acknowledged.

## References

1. Frible WJ. Fine-needle aspiration biopsy: a review. *Hum Pathol* 1983;14:9–28.
2. Zbieranowski I, Le Riche JC, Jackson SM, Olivotto I. The use of sequential fine-needle aspiration biopsy with flow cytometry to monitor radiation induced changes in breast carcinoma. *Anal Cell Pathol* 1992;4:13–24.
3. Krishnamurthy S. Applications of molecular techniques to fine-needle aspiration biopsy. *Cancer* 2007;111:106–22.

4. Stewart CJ, Mackenzie K, McGarry GW, Mowat A. Fine-needle aspiration cytology of salivary gland: a review of 341 cases. *Diagn Cytopathol* 2000;22:139–46.
5. Berner A, Lund-Iversen M, Nesland JM. Fine needle aspirations in oncology. *Arkh Patol* 2011;73:21–6.
6. Boeddinghaus I, Johnson SR. Serial biopsies/fine-needle aspirates and their assessment. *Meth Mol Med* 2006;120:29–41.
7. Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2231–47.
8. Gastineau DA, Hoagland HC. Hematologic effects of chemotherapy. *Semin Oncol* 1992;19:543–50.
9. Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;53:285–305.
10. Rihova B, Bilej M, Vetvicka V, et al. Biocompatibility of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers containing adriamycin. Immunogenicity, and effect on haematopoietic stem cells in bone marrow in vivo and mouse splenocytes and human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomaterials* 1989;10:335–42.
11. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* 2001;41:189–207.
12. Ulbrich K, Subr V, Strohalm J, et al. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation. *J Control Release* 2000;64:63–79.
13. Etrych T, Jelinkova M, Rihova B, Ulbrich K. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. *J Control Release* 2001;73:89–102.
14. Hovorka O, Etrych T, Subr V, et al. HPMA based macromolecular therapeutics: internalization, intracellular pathway and cell death depend on the character of covalent bond between the drug and the peptidic spacer and also on spacer composition. *J Drug Target* 2006;14:391–403.
15. Etrych T, Mrkvan T, Chytil P, et al. HPMA-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin: I. new synthesis, physicochemical characterization and preliminary biological evaluation. *J Appl Polym Sci* 2008;109:3050–61.
16. Hovorka O, Subr V, Vetvicka D, et al. Spectral analysis of doxorubicin accumulation and the indirect quantification of its DNA intercalation. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;76:514–24.
17. Rihova B. Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:653–74.
18. Rihova B, Kovar L, Kovar M, Hovorka O. Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics. *Trends Biotechnol* 2009;27:11–17.
19. Rihova B, Kovar M. Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:184–91.
20. Rihova B. Clinical experience with anthracycline antibiotics-HPMA copolymer-human immunoglobulin conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:1149–58.
21. Malugin A, Kopeckova P, Kopecek J. HPMA copolymer-bound doxorubicin induces apoptosis in human ovarian carcinoma cells by a Fas-independent pathway. *Mol Pharm* 2004;1:174–82.
22. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54–61.
23. Vetvicka D, Hovorka O, Kovar L, Rihova B. Establishment of imageable model of T-cell lymphoma growing in syngenic mice. *Anticancer Res* 2009;29:4513–17.
24. Eriksson O, Hagmar B, Ryd W. Effects of fine-needle aspiration and other biopsy procedures on tumor dissemination in mice. *Cancer* 1984;54:73–8.
25. Lieu D. Fine-needle aspiration: technique and smear preparation. *Am Fam Physician* 1997;55:839–46, 853–4.
26. Hagemann AR, Cadungog M, Hagemann IS, et al. Tissue-based immune monitoring I: tumor core needle biopsies allow in-depth interrogation of the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2011;2:357–66.
27. Ma X, Liu Z, Yang X, et al. Dual-modality monitoring of tumor response to cyclophosphamide therapy in mice with bioluminescence imaging and small-animal positron emission tomography. *Mol Imaging* 2011;10:278–83.
28. Kovar M, Strohalm J, Etrych T, et al. Star structure of antibody-targeted HPMA copolymer-bound doxorubicin: a novel type of polymeric conjugate for targeted drug delivery with potent antitumor effect. *Bioconjug Chem* 2002;13:206–15.
29. Mrkvan T, Sirova M, Etrych T, et al. Chemotherapy based on HPMA copolymer conjugates with pH-controlled release of doxorubicin triggers anti-tumor immunity. *J Control Release* 2005;110:119–29.
30. Rihova B, Strohalm J, Prausova J, et al. Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data. *J Control Release* 2003;91:1–16.
31. Rihova B, Strohalm J, Kovar M, et al. Induction of systemic antitumor resistance with targeted polymers. *Scand J Immunol* 2005;62:100–5.
32. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* 2010;70:855–8.
33. Etrych T, Subr V, Strohalm J, et al. HPMA copolymer-doxorubicin conjugates: the effects of molecular weight and architecture on biodistribution and in vivo activity. *J Control Release* 2012;164:346–54.



## Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck

Jan Boucek<sup>a, b, \*</sup>, Tomas Mrkvan<sup>b</sup>, Martin Chovanec<sup>a, g, h</sup>, Martin Kuchar<sup>a</sup>, Jaroslav Betka<sup>a, b</sup>, Vladimir Boucek<sup>f</sup>, Marie Hladikova<sup>d</sup>, Jan Betka<sup>a</sup>, Tomas Eckschlager<sup>c</sup>, Blanka Rihova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Charles University, 1st Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, University Hospital Motol, V Uvalu, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Microbiology ASCR, v.v.i., Videnska, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University, V Uvalu, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Medical Informatics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Uvalu, Prague, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Haematology and Blood transfusion, Hospital of Rudolf and Stepania Benesov, Machova, Benesov, Czech Republic

<sup>g</sup> Institute of Anatomy, 1st Faculty of Medicine, Charles University, U Nemocnice, Prague, Czech Republic

<sup>h</sup> Center of Cell Therapy and Tissue Repair, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Motol, V Uvalu, Prague, Czech Republic

Received: August 29, 2008; Accepted: November 10, 2008

### Abstract

Regulatory T cells (Treg) are important regulators of anti-cancer immune responses, and an increase in Treg frequency was observed in the blood of cancer patients. Blood samples from 112 patients with head and neck squamous cell carcinoma antigen (HNSCC) were obtained at the time of tumour diagnosis, and lymphocyte subpopulations (CD3<sup>+</sup>; CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>; CD19<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) with emphasis on Treg counts (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), complete blood count and tumour markers (squamous cell carcinoma [SCC]; CEA;  $\alpha$ -1-antitrypsin [AAT]; Cyfra 21-1; C-reactive protein [CRP]) were analysed. The data were grouped according to TNM classification, and their significance for the course of the disease at an interval of 1 year after the end of the therapy was determined. The percentage of CD8<sup>+</sup> cells increased and the CD4/CD8 ratio decreased with tumour grade. The ratio of B lymphocytes decreased in patients with locoregional metastases (11.25% versus 9.22%). Treg (15.2%) and CD4<sup>+</sup> cells (45.3%) increased, while NK cells (11.8%) decreased in HNSCC patients compared to controls (9.0%, 38.1% and 15.8%, respectively). The data obtained at time of diagnosis were used to assess the significance of tumour markers (SCC, Cyfra 21-1 and AAT) for evaluation of prognosis. The erythrocyte counts ( $4.64 \times 10^{12}/l$  versus  $4.45 \times 10^{12}/l$ ) and haemoglobin levels (14.58 g/dl versus 14.05 g/dl) decreased, while Treg counts (8.91% versus 15.70%) increased in patients with early recurrence. Our results show that examination of these parameters could be helpful for prognostication in HNSCC patients and aid improvement of treatment strategy.

**Keywords:** regulatory T cells • head and neck squamous cell carcinoma • tumour markers • early recurrence • lymphocyte subpopulations

### Introduction

Regulatory T lymphocytes (Treg) represent one of the most important mechanisms of peripheral immune tolerance,

which is employed to safeguard any over-activations of the immune system. It has been shown that interleukin (IL)-2 is vital for growth and differentiation of Treg [1]. It is worth noting that surface expression of the IL-2 receptor  $\alpha$ , CD25, is not unique for Treg, and that activated conventional T cells also express CD25. Nonetheless, Treg represent a major population within the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells repertoire in healthy individuals.

Transcriptional factor forkhead box P3 (Foxp3) is absolutely essential for Treg development. It is also the 'master regulator' of their regulatory functions. Furthermore, high levels of Foxp3

\*Correspondence to: Jan BOUCEK, MD,  
Department of Otorhinolaryngology,  
Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine,  
Charles University, University Hospital Motol,  
V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic.  
Tel.: +420224434301  
Fax: +420224434319  
E-mail: jboucek99@seznam.cz

expression were found almost exclusively amidst the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> compartment of thymocytes and peripheral Treg [2–6].

It is now known that Tregs play a critical role in the induction of tolerance to self-antigens, including those expressed by tumours. Recently, published findings have shown that immune regulation mediated by Treg, which is vital for preventing autoimmunity, represents a mechanism whereby the efficient antitumour response is inhibited [4,7].

It was described that Treg frequency is increased in the peripheral circulation of patients with different types of tumours, and their accumulation in the tumour microenvironment may be a negative prognostic factor for some types of malignancies [8–11]. An increase in the number of T-regulatory lymphocytes in the peripheral circulation and at the tumour site has also been shown to correlate with progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [12–14].

Not only does increase in T-regulatory cell number interfere with the antitumour immune response, but at the same time, Treg cells may be the main obstacle undermining anti-cancer immunotherapy and active vaccination [15, 16].

Although significant advances in the treatment regimen for patients with HNSCC have been documented within the last 20 years, regrettably, survival rates for this disease have not improved for many years [17].

Thus, the development of new molecular markers, which could help to describe the biological and immunological status of patients and predict disease progression, may help with selecting the appropriate treatment modalities for individual patients [18–21].

## Patients and methods

### HNSCC patients

All patients diagnosed at the Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Motol with HNSCC without any previous oncological treatment between 2004 and 2006, and who were willing to participate in the study and sign the informed consent, were included in the study (n = 112; 97 males; 15 females; a median age of 59 years; range of 23–87 years). Samples of peripheral blood were obtained from each patient at the time of diagnosis. No other selection criteria in addition to those given above were applied. Patients subsequently underwent therapy with curative intent. Details of patient characteristics are shown in Table 1.

### Healthy volunteers – blood donors

Control samples of peripheral blood were obtained from 20 healthy volunteers (blood donors) comprising 12 males and 8 females with a median age of 58 years (range 23–68 years). All controls were examined at the Department of Hematology and Blood transfusion, Hospital of Rudolf and Stephania, Benesov.

**Table 1** Patient characteristics

Age	[Years]
Median age	59
Range	23–87
Sex	[n]
Male	97
Female	15
Total	112
<b>Tumour site</b>	
Oropharynx – base of tongue	24 (21%)
Oropharynx – tonsillar region*	41 (37%)
Hypopharynx	13 (12%)
Larynx	19 (17%)
Others **	15 (13%)
<b>Tumour differentiation</b>	
Poor (G 3–4)	39 (35%)
Moderate (G 2)	39 (35%)
Well (G 1)	25 (22%)
Not determined	9 (8%)
<b>Tumour stage</b>	
T1	17 (15%)
T2	37 (33%)
T3	34 (30%)
T4	21 (19%)
Unstaged	3 (3%)
<b>Nodal status</b>	
N0	38 (34%)
N1	17 (15%)
N2	50 (45%)
N3	7 (6%)
<b>M stage</b>	
M0	112
M1	0
Unstaged	0
<b>Therapy after blood draw</b>	
Surgery	14 (13%)
Surgery + radiotherapy	63 (56%)
Radiotherapy	27 (24%)
Radiochemotherapy	8 (7%)

Continued

**Table 1** Continued

<b>Smoking history</b>	
Non-smoker	18 (16%)
With history of smoking	94 (84%)
Active (still smoking)	52 (46%)
Former (denied smoking at time of diagnosis)	42 (38%)
<b>Alcohol history</b>	
Total abstinence	0 (0%)
Daily alcohol consumption	31 (28%)

\*Oropharynx – tonsillar region: tumours involving tonsillar region alone or with spread to the tonsillar pillars, soft palate or posterior wall of oropharynx

\*\*Others: heterogeneous group of tumour localization – 4× carcinoma of the nasopharynx, 3× carcinoma of the nasal cavity, 3× carcinoma of the paranasal sinuses, 3× metastatic carcinoma with unknown primary localization, 2× carcinoma of the external auditory canal

All participants signed the informed consent approved by the Ethics Committee of the 2nd Medical Faculty of Charles University and University Hospital Motol.

## Flow cytometry

Samples of peripheral blood were analysed by flow cytometry (FACSCalibur, BD, San Jose, CA, USA) after lysis of erythrocytes by FACS Lysing Solution (BD, San Jose, CA, USA) and staining with antibody-fluorochrome conjugates. We strictly adhered to instructions in the manufacturer's protocol for respective reagents. Antibodies anti-CD45 FITC/CD14 PE (to correctly set the gates for lymphocytes), anti-CD3 FITC/CD19 PE, anti-CD3 FITC/ CD16CD56 PE, anti-CD4 FITC/ CD8 PE, anti-CD45RA FITC/anti-CD4 PE and anti-CD3 FITC/ CD4 PE/CD25 APC (Beckmann Coulter, Nyon, Switzerland) were used. A total of 10,000 cells in the lymphocyte gate were acquired for analysis and the data were analysed with CellQuest software. Results are expressed as the percentage of respective cell subpopulations of all lymphocytes.

Total blood count and biochemical and tumour makers were examined in the Department of Clinical Haematology and Institute for Clinical Biochemistry and Pathological Biochemistry, University Hospital Motol, according to standard protocols.

## Statistical analysis

In order to analyse the relationship between the different categories studied, the data were evaluated using a frequency  $2 \times 2$  table chi-square test with Danderar's correction. All numerical data were presented as mean  $\pm$  S.D., and were analysed statistically using Student's t-test. The correlations between immunological parameters and early recurrence of disease were evaluated by nonparametric Spearman's coefficient. *P*-values of less than 0.05 were considered significant. SPSS Software version 10.1 was used for all statistical calculations.

## Results

We examined the peripheral blood of 112 patients with HNSCC. Blood samples were taken before the commencement of antitumour therapy. We focused on evaluation of lymphocyte subpopulations (CD3<sup>+</sup>; CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>; CD19<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>; CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), complete blood count and several tumour markers (SCC; CEA; AAT; Cyfra 21–1; CRP).

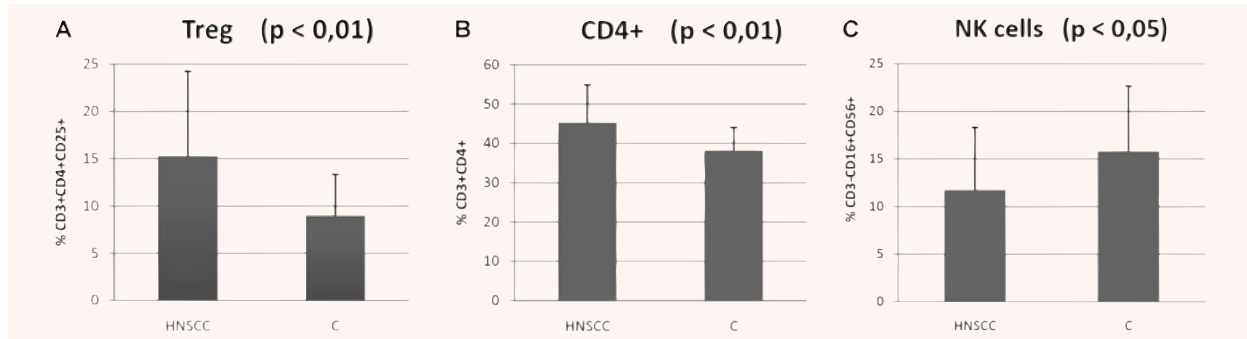
The levels of Treg and other lymphocyte populations were compared between HNSCC patients and those of healthy blood donors.

The absolute number of CD3<sup>+</sup> lymphocytes in the group of HNSCC patients was  $2.02 \times 10^9/l \pm 0.67$ . The percentage of circulating CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> (Fig. 1A and B) cells significantly increased (both *P* < 0.01) in patients with HNSCC ( $15.2\% \pm 8.9$  and  $45.3 \pm 9.6$ , respectively) in comparison with values from the control group ( $9.0 \pm 4.3$  and  $38.1 \pm 5.9$ , respectively) at time of diagnosis. There was no significant difference (*P* = 0.05) in ratios of either total T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>; 72.1% versus 65.8%) or effector T lymphocytes (CD8<sup>+</sup>; 28.0% versus 28.4%). On the other hand, naïve T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>45RA<sup>+</sup>; 14.7% versus 18.0%), B lymphocytes (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>; 9.8% versus 11.1%) and NK cells decreased in HNSCC patients, but only the decrease of NK cells was statistically significant (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>;  $11.8\% \pm 6.5$  versus  $15.8\% \pm 6.8$ ; *P* < 0.05) (Fig. 1C).

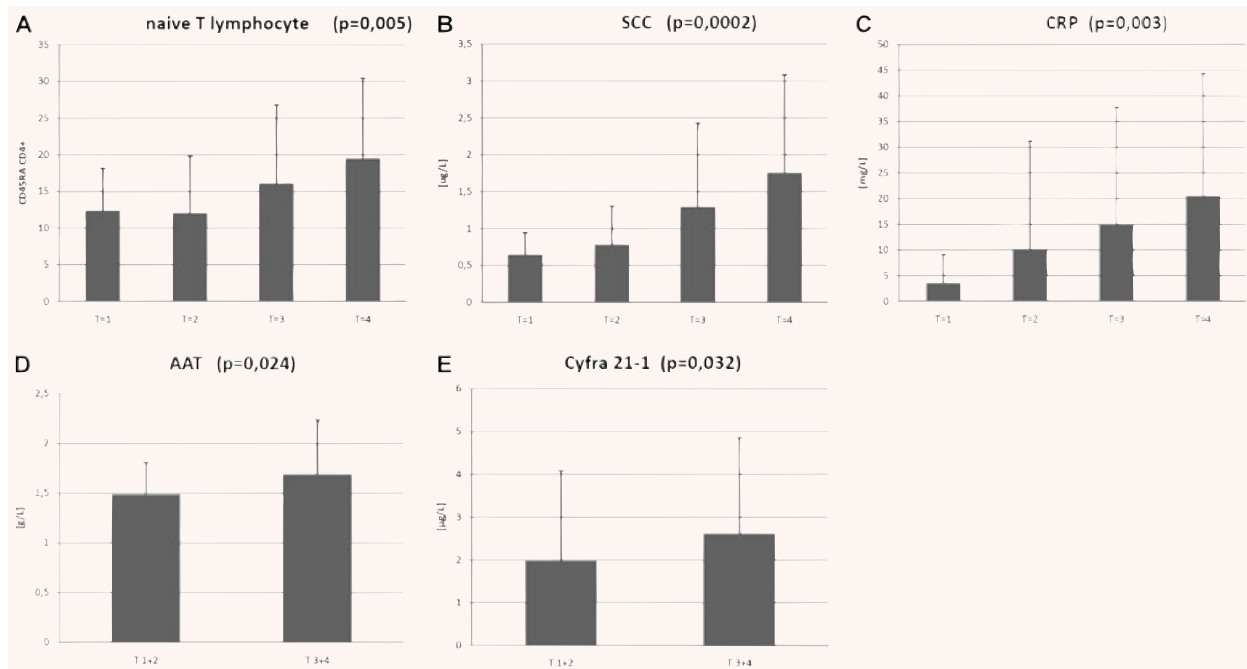
The study included patients with tumours localized in different regions of the head and neck (Table 1). Despite the fact that all patients showed uniformly increased levels of Treg, we were able to provide further evidence for differences within patient groups based on the localization of primary tumour (oropharynx – tonsillar region 16.2% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; oropharynx – base of the tongue 15.2% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; hypopharynx 15.2% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; larynx 15.0% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; other localizations 12.9% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). The differences between patients with tumours of the oropharynx – base of tongue and hypopharynx were statistically significant in several variables. The levels of tumour marker  $\alpha$ -1-antitrypsin (AAT;  $1.45 \pm 0.32$  g/l versus  $1.8 \pm 0.35$  g/l; *P* = 0.008) and levels of platelets (PLT;  $225.4 \pm 61.54$  versus  $317.1 \pm 93.95 \times 10^9/l$ ; *P* = 0.047) in patients with tumours of the hypopharynx were higher. (There was no statistically significant difference between T- and N stages, and tumour differentiation grading, but there was a difference in distribution by gender: no females presented with tumour of the oropharynx – base of tongue, while three females presented with tumour of the hypopharynx.)

Relevance of Treg levels in relation to the stage of TNM classification was also evaluated. Patient groups were divided according to the size of the primary tumour (T1 to T4 stage), and the spread of tumour to the regional lymphatic nodes (N stage; N<sup>o</sup> versus N<sup>+</sup>) according to the standards of International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O-3, 2000).

All stages (T1 – T4) were individually compared, and no significant differences in Treg were observed ( $14.77\%$  versus  $17.16\%$  versus  $13.91\%$  versus  $14.91\%$ ). There was however a statistically



**Fig. 1** Comparison of Treg and other lymphocyte subpopulations in patients with HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) with those of healthy blood donors (C). (A) – regulatory T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>); (B) – Th cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>); (C) – natural killers (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).



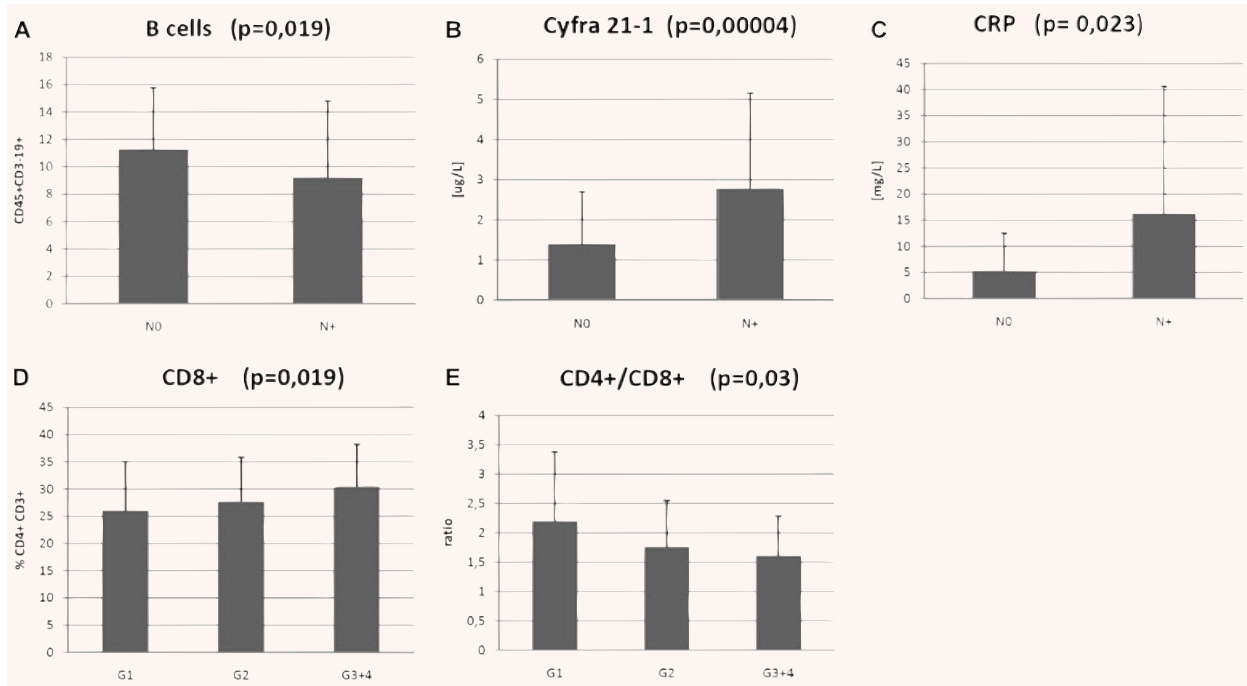
**Fig. 2** Statistically significant parameters that are in a positive correlation with the size of the tumour (T stage). (A) – naïve T lymphocytes (CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>); (B) – SCC = squamous cell carcinoma antigen; (C) – CRP = C-reactive protein; (D) – AAT = α-1-antitrypsin; (E) – Cyfra 21-1.

significant increase in the tumor marker SCC (SCC; 0.65 μg/l versus 0.78 μg/l versus 1.29 μg/l versus 1.76 μg/l;  $P = 0.0002$ ); the ratio of naïve T lymphocytes (12.38% versus 12.05% versus 16.08% versus 19.49%) and the levels of C-reactive protein (CRP; 3.56 mg/l versus 10.18 mg/l versus 14.93 mg/l versus 20.49 mg/l;  $P = 0.008$ ) (Fig. 2).

When we combined results for both T1 and T2 stages, and T3 plus T4 stages, and compared T1/2 versus T3/4, we found an increase of other two tumour markers in advanced stage patients, in particular, AAT (1.49 g/l versus 1.69 g/l;  $P = 0.024$ ) and Cyfra-21-1 (1.99 μg/l versus 2.62 μg/l;  $P = 0.032$ ) (Fig. 2).

The levels of tumour marker Cyfra-21-1 and CRP were higher in the N<sup>+</sup> group than in the N0 group (1.39 μg/l versus 2.78 μg/l;  $P = 0.00004$ , respectively, 5.29 versus 16.18;  $P = 0.023$ ). The percentage of B cells (CD3-19+) was significantly lower in the group of patients with locoregional metastases than in those patients with N0 stage disease (11.25% versus 9.22%;  $P = 0.019$ ) (Fig. 3).

Levels of Treg were evaluated based on differentiation of tumour cells according to histological grading (G stage, G1 versus G2 versus G3+4). There were no significant differences in levels of Treg (14.85% versus 15.84% versus 14.25%). In other subgroups of lymphocytes, differences in levels of cytotoxic T lymphocytes



**Fig. 3** Statistically significant parameters that are in a correlation with the spread of tumour to the regional lymphatic nodes (N stage) and with differentiation of tumour cells (Grade). (A) – B cells (CD45+CD3-CD19+); (B) – Cyfra 21-1; (C) – CRP = C-reactive protein; (D) – Tc cells (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>); (E) – ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

(CD8<sup>+</sup>; 26.04% versus 27.69% versus 30.41%;  $P = 0.019$ ) and in CD4/CD8 ratio were observed (2.20 versus 1.76 versus 1.61;  $P = 0.03$ ) (Fig. 3).

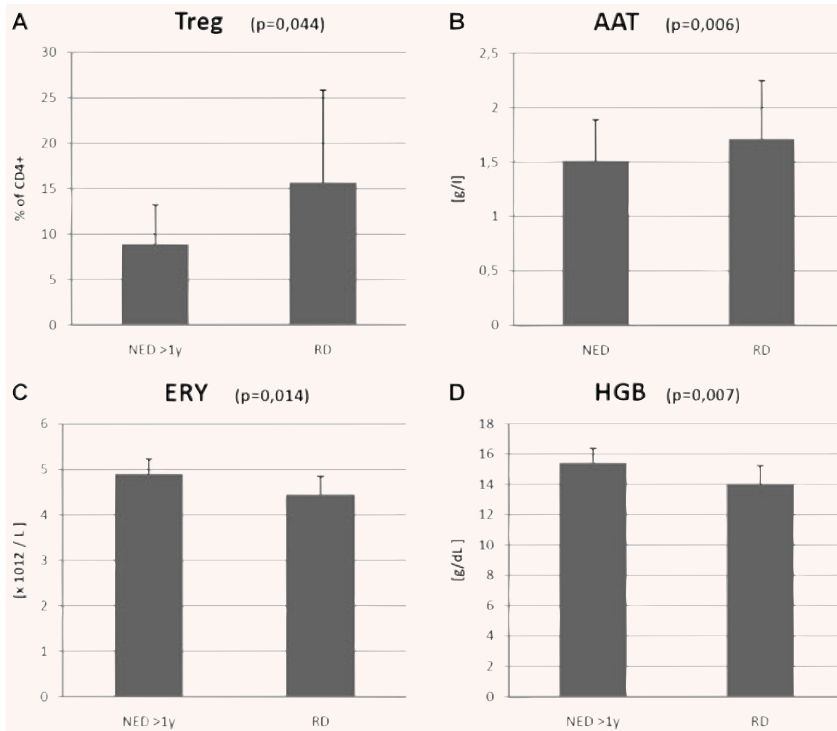
The group of patients with recurrent disease was compared with the group without evidence of the disease at an interval of 1 year after the end of the therapy. All of the following results were statistically significant: increase in levels of Treg (8.91% versus 15.70%;  $P = 0.044$ ); increase in AAT (1.51 g/l versus 1.71 g/l;  $P = 0.006$ ); decrease of erythrocyte count ( $4.64 \times 10^{12}/l$  versus  $4.45 \times 10^{12}/l$ ;  $P = 0.038$ ) and increase in haemoglobin levels (14.58 g/dl versus 14.05 g/dl;  $P = 0.022$ ) (Fig. 4).

## Discussion

It has been published that clinical prognosis of oncological patients is correlated with numerous changes in the peripheral blood. Furthermore, it has been proven that the poor prognosis of HNSCC patients is associated with cancer cachexia, T status, increased C-reactive protein and decreased haemoglobin levels [22]. In agreement with these findings, we have demonstrated a statistically significant difference in haemoglobin level and erythrocyte count between the group of patients without evidence of disease, and the group with cancer relapse.

The advantages of examining tumour markers for improvement of the clinical management of HNSCC have been discussed for many years, yet none of these markers have been found to be exclusively predictive. Hepatocyte growth factor, which correlates highly with tumour progression, and may be a strong predictor of HNSCC recurrence, has recently been reported as being quite promising [23]. It has been published that combined analysis of SCC and CEA leads to both a markedly increased sensitivity at primary diagnosis, and as a predictor of tumour relapse [24]. Our study demonstrates that serum levels of SCC, CRP, Cyfra 21-1 and AAT correlate with T stage of disease, and that serum levels of Cyfra 21-1 and CRP correlate with N stage.

Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), which are a subset of CD4<sup>+</sup> cells, have considerable importance within the immunological homeostatic network. These cells possess suppressive activity against CD8<sup>+</sup> effector and CD4<sup>+</sup> helper T cells. The mechanism of suppression is still unclear and the subject of controversial debate [25–27]. An increase in T-regulatory cells in the peripheral circulation and at the tumour site was previously reported in patients with HNSCC, and these results seem to be in agreement with the majority of published data for other human cancers [8, 12, 28–30]. In addition, a positive association with infiltration by Treg and better locoregional control of the tumour or longer disease-free interval was also reported [31].



**Fig. 4** Comparison between groups of patients with recurrent disease (RD) and those without evidence of disease (NED) over a follow-up interval longer than 1 year. (A) – regulatory T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>); (B) – AAT =  $\alpha$ -1-antitrypsin; (C) – ERY = count of erythrocyte; (D) – HGB = haemoglobin level.

The data for this study were collected over more than 3 years, and initially, there was no readily available monoclonal antibody against Foxp3. We have therefore analysed the CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell population, which consists predominantly of regulatory T-cells.

Previous studies have indicated that patients with HNSCC have altered lymphocyte homeostasis, which persists for months or years after curative therapies [32, 33].

NK cells play one of the pivotal roles in antitumour immunity. Recently, it was published that NK cell numbers are reduced in the peripheral blood of cancer patients, and that a severe deficiency in circulating NK cells was related to the poor clinical outcome in HNSCC patients [34]. Our data confirmed these results. We found a significantly decreased proportion of NK cells in HNSCC patients compared with controls.

Other studies have reported that patients with HNSCC have significantly lower absolute numbers of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, but no differences in the percentages of T-cell subsets between patients and controls were observed [33, 35]. We did not observe any significant differences either in the absolute number of CD3<sup>+</sup>T cells or in percentages of T-cell subsets. Furthermore, Kuss *et al.* [32] described a decrease in absolute numbers of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> ( $P = 0.06$ ), and an increase in absolute numbers of CD8<sup>+</sup> ( $P = 0.95$ ) in the peripheral circulation of patients with recurrent HNSCC within 2 years after therapy. Kim *et al.* suggested that such altered homeostasis in CD8<sup>+</sup> T cells in these patients is prevented as a consequence of cancer induced functional abnormalities and abnormal lymphocyte turnover [36]. Our data indicate that this alteration, which was first reported in patients who com-

pleted the course of therapy [32], could be inherent for HNSCC patients, as a significant increase of CD8<sup>+</sup> T cells in patients with recurrent HNSCC (compared to NED patients) was demonstrated as early as at the time of diagnosis.

Moreover, we found that the significant increase in CD8<sup>+</sup> subsets in patients directly correlated with the level of tumour cell differentiation, *i.e.* histological grading (Grading, G1 *versus* G2 *versus* G3+4). Similarly, a decrease in the CD4/CD8 ratio was found.

However, the exact relationship of elevated CD8<sup>+</sup> cells (and changes in CD4/CD8 homeostasis, respectively) with disease progression is still not clear, and should be investigated in future studies.

Excessive peritumoural infiltration of B cells (CD19<sup>+</sup>) has been recently described, and a higher percentage of CD19<sup>+</sup> cells were predictive of poor survival in patients with ovarian carcinoma [37]. We identified a lower level of B cells (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) in the group of patients with locoregional metastases compared with patients in the NO stage. The explanation for this could be that the B cells are chemotactically attracted to the microenvironment of the tumour and metastases [38].

Tumour production of growth factors and the immunological reaction within the tumour microenvironment causes mobilization of precursor cells with subsequent migration to the periphery and tumour site [39]. In agreement with the previously published data we found a statistically significant positive correlation with the T stage and percentage of naïve T lymphocytes.

In this study, we focused on the quantity of Treg in the peripheral blood of patients with head and neck cancer, and compared

this data with controls in an effort to assess their prognostic importance for early recurrence of disease.

First, an increased percentage of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood in patients with HNSCC was observed, which is in agreement with previously reported data [8, 9, 12–14]. All hitherto published data have shown that the total amount of Treg in the peripheral circulation of HNSCC is two-fold higher than in controls, although the exact numbers are slightly different among the different laboratories [12, 13].

In the 2-year long follow-up interval, we compared the group of patients with early recurrence of disease with the disease-free group. We found a striking difference in the levels of Treg at the time of primary diagnosis between patients in remission and in recurrence. The levels of Treg in the peripheral blood correlate with a higher probability of early recurrence of HNSCC. This finding helped us to select patients eligible for more extensive therapy and more meticulous follow-up.

In conclusion, it was observed that the percentage of CD8<sup>+</sup> cells increased and CD4/CD8 ratio decreased with tumour grade. B lymphocyte proportion decreased in patients with

locoregional metastases (N<sup>+</sup> stage). Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) and CD4<sup>+</sup> cells increased, while NK cells decreased in HNSCC patients compared to healthy controls. Based on the data obtained at the time of primary diagnoses, we assessed the significance of tumour markers (SCC, Cyfra 21–1 and AAT) for evaluation of prognosis of HNSCC patients. The erythrocyte count and haemoglobin level decreased, while the Treg increased in the group of patients with early recurrence of the disease. One may speculate that erythrocyte count, haemoglobin level and regulatory T-cell proportion may be useful as predictive factors in HNSCC.

## Acknowledgements

The research was supported by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (grant NR 8883–3), by the Ministry of Education, Youth and Sports of The Czech Republic (Grant MSM 0021620813 and No. 1M0505) and by Institutional Research Concept AV0Z50200510.

## References

1. **Groux H.** Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation.* 2003; 75: 8S–12S.
2. **Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, et al.** Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 2007; 178: 179–85.
3. **Ladi E, Yin X, Chtanova T, et al.** Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature Immunol.* 2006; 7: 338–43.
4. **Randolph DA, Fathman CG.** CD4 + CD25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Ann Rev Med.* 2006; 57: 381–402.
5. **Sakaguchi S.** Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* 2005; 6: 345–52.
6. **Campbell DJ, Ziegler SF.** FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Rev.* 2007; 7: 305–10.
7. **Gallimore A, Godkin A.** Regulatory T cells and tumour immunity – observations in mice and men. *Immunology.* 2008; 123: 157–63.
8. **Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al.** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Med.* 2004; 10: 942–9.
9. **Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al.** Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 606–12.
10. **Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al.** Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 4766–72.
11. **Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL.** Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer. *Int J Cancer.* 2007; 121: 2473–83.
12. **Schaefer C, Kim GG, Albers A, et al.** Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2005; 92: 913–20.
13. **Strauss L, Bergmann C, Gooding W, et al.** The frequency and suppressor function of CD4+ CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 6301–11.
14. **Alhamarneh O, Amarnath SM, Stafford ND, et al.** Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head Neck.* 2008; 30: 251–61.
15. **Whiteside TL.** Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007; 7: 633–42.
16. **Karcher J, Dyckhoff G, Beckhove P, et al.** Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 8057–61.
17. **Forastiere A, Koch W, Trotti A, et al.** Head and neck cancer. *N Eng J Med.* 2001; 345: 1890–900.
18. **Plzak 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: 2324–30.
19. **Nestor M, Ekberg T, Dring J, et al.** Quantification of CD44v6 and EGFR expression in head and neck squamous cell carcinomas using a single-dose radioimmunoassay. *Tumour Biol.* 2007; 28: 253–63.
20. **Harper LJ, Piper K, Common J, et al.** Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 594–603.
21. **Cada Z, Boucek J, Dvorankova B, et al.** Nucleostemin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.* 2007; 27: 3279–84.

22. **Richey LM, George JR, Couch ME, et al.** Defining cancer cachexia in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 6561–7.
23. **Kim CH, Lee JS, Kang SO, et al.** Serum hepatocyte growth factor as a marker of tumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2007; 43: 1021–5.
24. **Wollenberg B, Jan V, Schmit UM, et al.** Cyfra 21–1 is not superior to SCC antigen and CEA in head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16: 3117–24.
25. **Scheffold A, Murphy KM, Hofer T.** Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nature Immunol.* 2007; 8: 1285–7.
26. **Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al.** Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007; 204: 1257–65.
27. **Bopp T, Jonuleit H, Schmitt E.** Regulatory T cells—the renaissance of the suppressor T cells. *Ann Med.* 2007; 39: 322–34.
28. **Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al.** Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002; 169: 2756–61.
29. **Albers AE, Ferris RL, Kim GG, et al.** Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 1072–81.
30. **Shevach EM.** Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2721–4.
31. **Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al.** Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 465–72.
32. **Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, et al.** Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 3755–62.
33. **Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, et al.** Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol.* 2005; 62: 161–72.
34. **Molling JW, Langius JA, Langendijk JA, et al.** Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 862–8.
35. **Chikamatsu K, Sakakura K, Whiteside TL, et al.** Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2007; 29: 120–7.
36. **Kim JW, Tsukishiro T, Johnson JT, et al.** Expression of pro- and antiapoptotic proteins in circulating CD8+ T cells of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5101–10.
37. **Dong HP, Elstrand MB, Holth A, et al.** NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125: 451–8.
38. **Palmesino E, Moepps B, Gierschik P, et al.** Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells. *Immunobiology.* 2006; 211: 377–89.
39. **Lathers DM, Lubbers E, Beal NM, et al.** Cultures derived from peripheral blood CD34+ progenitor cells of head and neck cancer patients and from cord blood are functionally different. *Hum Immunol.* 1999; 60: 1207–15.