



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

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

MUDr. Jaroslav Betka

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Autor: MUDr. Jaroslav Betka

Školitel: Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc

Školitel konsultant: Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde
.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Abstrakt.....	4
Incidence nádorových onemocnění.....	6
Hypotézy a cíle dizertační práce.....	7
Vliv kouření na výskyt nádorů hlavy a krku.....	8
Role tzv. nádorových kmenových buněk.....	10
Možnosti léčby maligních onemocnění.....	11
• Polymerní léčiva v protinádorové léčbě	12
• Polymerní léčiva na bázi HPMa.....	13
Protinádorová imunita.....	15
Závěry a shrnutí výsledků dizertační práce.....	16
Literatura.....	18
Seznam publikací.....	19

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou 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.

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 cytostatických léčiv. 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.

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.

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 effect on the clinical course of cancer.

Incidence nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech. Počet nově diagnostikovaných pacientů se zhoubným nádorem neustále stoupá, mezi roky 1998 a 2010 narostl o 28% a jen za rok 2010 byl evidován nárůst o 4,9% případů při srovnání s rokem 2009. Nejčastějším zhoubným onemocněním u mužů je karcinom prostaty, dále karcinom tlustého střeva a konečníku, jehož výskyt se v posledních letech výrazně zvýšil, a karcinom plic, jehož výskyt v mužské populaci naopak mírně klesá. Nejčastějším zhoubným onemocněním u žen je karcinom prsu s rostoucí incidencí, ale klesající úmrtností. Varovný je výrazný nárůst nových případů karcinomu plic u žen, povzbuzující je naopak pokles výskytu karcinomu žaludku a nezvyšující se nálezy karcinomu děložního čípku - důvodem jsou pravděpodobně zdokonalené preventivní prohlídky. Incidence karcinomu hrtanu jako nejčastějšího zástupce zhoubných nádorů hlavy a krku celkově nestoupá, a tedy kopíruje trend karcinomu plic, se kterým má společné nejčastější rizikové faktory. Na druhou stranu výskyt druhého nejčastějšího karcinomu této oblasti - karcinomu orofaryngu - v posledních letech stoupá a to u obou pohlaví, více u žen. Tento trend se vysvětluje jednak nárůstem žen kuřaček, jednak vyšší incidencí HPV (nejčastěji typ HPV 16) dependentních karcinomů tonsily a kořene jazyka. HPV dependentní nádory se svými molekulárními charakteristikami výrazně liší od HPV negativních tumorů. U většiny spinocelulárních karcinomů hlavy a krku je prokázána dysfunkce onkosupresorového proteinu p53. 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. 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.

Hypotézy a cíle dizertační práce

- V minulosti byla na mnoha studiích prokázána spojitost mezi kouřením a vznikem spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. Většina těchto studií se v anamnestické části zaměřila pouze na celkové množství cigaret a dobu kouření. Cílem **publikace č. 1** bylo prokázat, 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. Současně byl u karcinomu hlavy a krku prokázán vliv epitelomezenchymové interakce mezi nádorovými kmenovými buňkami a jejich stromatem. 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 některé polymerní léčiva na bázi

poly[*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] (HPMA) jsou nejen neimunogenní, ale dokonce mají imunomodulační účinek. Cílem **publikace č. 3** bylo sledování imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí po léčbě HPMA konjugáty, které by mohlo pomoci porozumět mechanismu jejich imunogenního účinku.

- Prognostický význam T regulačních lymfocytů u nádorových onemocnění doposud nebyl dosud plně objasněn. 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.

Vliv kouření 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. Dalším charakteristickým rysem je invazivní šíření, kterým se nádorové buňky mohou propagovat do okolních tkání a šířit i do vzdálených tkání či orgánů (metastázování). Změna normální buňky na nádorovou je proces probíhající v několika krocích, typicky se odehrávající v premaligní lézi, která se následně změní na maligní proces. Tato změna je důsledkem interakce mezi genetickými a zevními faktory. 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. 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. Většina epidemiologických prací zabývajících se problematikou kouření, se v anamnestické části zaměřila především na celkové množství vykouřených cigaret a počet roků aktivního kouření. Některé studie se však zaměřují i na psychickou stránku pacienta - tedy zda stupeň závislosti na tabáku či alkoholu má vliv na vyšší riziko vzniku nádoru. V **publikaci č. 1** 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. 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. 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 by měl být doplněn o stupeň závislosti na nikotinu. To by pomohlo vybrat z kuřáků rizikové pacienty z hlediska výskytu rakoviny hlavy a krku, kteří by pak byli zařazeni do screeningových programů s cílem brzké diagnostiky a tedy výrazně vyšší šanci na vyléčení. 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.

Role tzv. nádorových kmenových buněk

Proces šíření nádorových buněk do okolí je často dáván do souvislosti s unikátní skupinou nádorových buněk označovaných jako tzv. *kmenové nádorové buňky* (cancer stem cells - CSC). Ty vykazují některé vlastnosti jak specificky nádorových tak i zdravých kmenových buněk: schopnost sebeobnovy, iniciace a potenciace nádorového růstu, diseminace z tkáně tumoru do krevního řečiště a zvýšená odolnost k 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. K výše zmíněným vlastnostem CSC napomáhá i jejich interakce s okolním prostředím, které je označováno jako hnízdo - *niche*, které podporuje nádorový růst i invazi do okolí. Struktura *niche* je obdobná jako u normálních kmenových buněk, tedy soustava stromálních fibroblastů, doplněných o imunokompetentní buňky, síť kapilár, extracelulární matrix a řadu signálních molekul. U dlaždicobuněčných nádorů probíhá komunikace mezi nádorem a stromatem i na základě *epitelo-mezenchymové interakce*, tedy parakrinní komunikace mezi odlišnými buněčnými typy. **Publikace č. 2** byla zaměřena na poznání interakcí mezi CSC a okolním prostředím na základě sledování morfologických a imunohistochemických změn u linie FaDu (hypofaryngeální karcinom) po kultivaci s lidskými fibroblasty. Bylo zaznamenáno výrazné zvýšení počtu buněčných nádorových 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 prekurzorové buňky) se nacházely na periférii kolonií a při kultivaci s fibroblasty byla jejich denzita významně zvýšena oproti kultivaci samotné linie FaDu. Tato práce potvrdila význam prostředí a délky vzájemného působení na konzervaci určitého *poolu* nádorových buněk ve stádiu blízkému kmenovému. Tato schopnost je nejspíše příčinou nádorové resistance vůči iradiaci a systémové léčbě a předpokládá tak nutnost komplexního zásahu do nádorového prostředí spolu s cílenou eliminací CSC. Zároveň ukázala jednu z možných cest k definici této zatím málo známé subpopulace.

Možnosti léčby maligních onemocnění

V léčbě nádorových onemocnění se nejčastěji používá chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. V klinické praxi se tyto metody vhodně kombinují tak, aby přinesly co největší léčebný efekt. Největšího pokroku v posledních desetiletí dosáhla chemoterapie, od 50. let minulého století byla vyvinuta řada cytostatik s různým mechanismem účinku, které u některých malignit (např. hematologických) výrazně zlepšily prognózu pacienta a mohou vést i k úplnému vyléčení. Jejím širšímu uplatnění u většího spektra nádorových onemocnění však brání značná toxicita, která komplikuje aplikaci dostatečně vysokých dávek cytostatik potřebných ke zničení všech nádorových buněk. Proto byly hledány nové cesty v boji proti nádorovému růstu, např. ovlivnění buněčného cyklu nebo neoangiogeneze, stimulace imunitního systému nebo přenos cytostatika v inaktivní formě přímo do místa nádoru prostřednictvím polymerních nosičů. V experimentální i klinické praxi

byla největší pozornost zaměřena na polymerní nosiče léčiv, monoklonální protilátky a inhibitory procesů podporujících proliferaci nebo bránících apoptóze. První monoklonální protilátkou pro klinické využití byl rituximab (Mabthera), chimérická myší-lidská monoklonální protilátka IgG1- κ 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). V současnosti je do klinické praxe zaveden větší počet monoklonálních protilátek a několik desítek nově připravených je předmětem klinického testování. Také někteří zástupci inhibitorů proliferace jsou již uvolněni do distribuce, např. imatinib mesylat (Glivec) pro chronickou myeloidní leukemii.

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. Obecný koncept polymerního systému se skládá ze syntetického polymeru, na který jsou 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. Jednou ze zásadních výhod makromolekulárních polymerů je schopnost pasivního i aktivního směřování. Pasivní směřování, fenomén nazývaný EPR efekt (Enhanced Permeability and Retention effect) se uplatňuje pouze u molekul s molekulovou hmotností větší než 40 kDa, nikoliv u

většiny běžně užívaných cytostatik. EPR vychází z vlastností nově vytvořených kapilár v okolí nádorové tkáně, kde je díky méněcennému endotelu zvýšená jejich prostupnost. Tím se mohou makromolekuly dostávat do mezibuněčného prostoru, odkud nejsou naopak drénovány díky nepřítomnosti odpovídající sítě lymfatických cév a tak se hromadí v nádorové tkáni. 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. Jako směřující struktury jsou využívány ligandy (karbohydráty, lektiny, hormony, peptidy) nebo mono- a polyklonální protilátky či jejich části. Dalším benefitem polymerních léčiv je prodloužená doba cirkulace v krevním řečišti, která je dána jejich zvýšenou odolností k biodegradaci a proteolýze. Důležitá je i 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. Navíc bylo potvrzeno, že polymerní léčiva díky distribuci v neaktivní formě mají daleko nižší nesespecifickou toxicitu, zejména pro imunitní systém, kostní dřeň, srdce, játra a ledviny.

Polymerní léčiva na bázi HPMA

V autorově laboratoři je používán polymerní konjugát na bázi poly[*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu] (HPMA). Polymerní léčiva na bázi HPMA byly objeveny koncem 70. let. a na jejich vývoji se podílely vědecké týmy z Československa a Velké Británie. Prvním polymerním léčivem s protinádorovým účinkem vyvinutým v naší

laboratoři byl HPMA polymer, kde antracyklinové antibiotikum doxorubicin bylo navázáno enzymaticky štěpitelnou vazbou. Tento preparát prošel druhou fází klinických zkoušek ve Velké Británii. V jiném případě byla pro navázání doxorubicinu na HPMA nosič použita hydrazonová vazba, která je hydrolyticky poměrně stálá při pH 7,4, ale v mírně kyselém prostředí endosomů uvnitř nádorových buněk (cca pH 5) dochází k jejímu rychlému štěpení a uvolnění léčiva.

Hlavní výhody HPMA konjugátů proti klasickým cytostatikám spočívají především v lepších farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech, delší cirkulaci v krevním řečišti a snížení nespecifické toxicity. Další významnou vlastností polymerních léčiv na bázi HPMA je jejich vliv na imunitní systém pacienta. Bylo opakovaně prokázáno, že některé HPMA konjugáty 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 (tumor infiltrující lymfocyty - TIL). Zásadní je zřejmě způsob zabíjení a následného umírání nádorových buněk. Polymerní léčiva na bázi HPMA navozují jejich imunogenní smrt, která je základním předpokladem zahájení imunitní reakce. Tu pak realizuje zvýšený počet infiltrujících TIL.

Na sledování změn imunitní odpovědi v nádorovém prostředí po léčbě HPMA konjugáty je zaměřena **publikace č. 3**. Pro odběr buněčného materiálu z nádoru *in vivo* bylo použito aspirační biospie tenkou jehlou, díky které bylo možné odběr vzorků opakovat v různých časových intervalech a tak monitorovat vývoj onemocnění, včetně průběžného hodnocení

intratumorálních buněčných změn. Infiltrace nádorového mikroprostředí jednotlivými lymfocytárními subpopulacemi (CD3+, CD4+, CD8+ a NK1.1) v různých časových intervalech od začátku léčby byla analyzována pomocí průtokové cytometrie. Současně byla sledována i metastatická infiltrace ve spádových lymfatických uzlinách a slezině. Bylo zjištěno, že po léčbě HPMA konjugáty bylo v nádoru signifikantně vyšší zastoupení u všech sledovaných T-lymfocytárních subpopulací 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. Právě stanovení doby odezvy imunitního systému na podané léčivo by mohlo v budoucnu výrazně pomoci při plánování léčebné strategie - například odběrem vzorku z nádoru před léčbou a mezi 3-5. dnem po podání léčiva by bylo možné na základě stanovení TIL 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. Dále bylo v této práci prokázáno, že nádorová infiltrace ve spádových lymfatických uzlinách i ve slezině je po léčbě HPMA konjugáty výrazně nižší jak proti kontrolám tak proti léčbě volným doxorubicinem. HPMA léčiva tedy účinkují nejen 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

Základní předpoklad tzv. imunitního dozoru neboli „Cancer immunosurveillance“ je, že imunitní systém rozeznává antigeny na maligních buňkách jako cizí a snaží se je eliminovat. Mechanismy protinádorové imunitní reakce jsou různé: cytotoxický efekt CD8+ lymfocytů působením perforinu a granzymů, exprese Fas ligandů, přímý cytotoxický efekt NK buněk, exprese IFN- γ , atd. Nádorové buňky však sami mají schopnost ovlivňovat imunitní systém jak systémově, tak působením v nádorovém mikroprostředí a tím tlumit imunitní odpověď, např. působením TGF- β , interleukin 10 a Fas ligand na povrchu nádorových buněk či uvolňované do okolí tumoru. V nádorovém mikroprostředí hlavní imunoregulační působení zastávají Treg (T regulační lymfocyty), které inhibují efektorové T lymfocyty řadou různých mechanismů (produkce TGF- β či IL-10, přímý kontakt mezi efektorovou a supresorovou buňkou. Právě tyto imunosupresivní vlastnosti vedly k hypotéze, že zvýšené množství Treg buněk v nádoru či periferní krvi je spojeno s horší prognózou onkologických pacientů. V některých pracích je ale naopak zmiňována pozitivní role Treg u maligních onemocnění, kde jejich vyšší zastoupení v periferní krvi koreluje s lepší prognózou. 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 stimulující neoangiogenezi a nádorový růst.

V **publikaci č. 4** byla řešena otázka prognostického významu Treg lymfocytů u pacientů s karcinomem hlavy a krku. Bylo zjištěno, že procento T regulačních

lymfocytů je v periferní krvi u nemocných pacientů signifikantně zvýšené oproti zdravým kontrolám. Navíc se podařilo prokázat korelaci zvýšeného počtu Treg v periferní krvi pacientů v době stanovení diagnózy a časné recidivy onemocnění. Tyto výsledky je nutné ověřit i v širších souvislostech, nicméně v budoucnu by 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. 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 v průběhu kultivace udržuje tento stav na konstantní úrovni.

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. Dále byla po léčbě HPMa konjugáty zjištěna výrazně nižší infiltrace nádorovými buňkami ve

spádových lymfatických uzlinách i ve slezině než po léčbě nekonjugovaným léčivem.

V **publikaci č. 4** byly zjištěny výrazné odchylky v absolutním počtu i procentuálního zastoupení CD8+ i CD4+ lymfocytů, počtu NK buněk i B lymfocytů u pacientů se spinocelulárních 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 časné recidivy onemocnění.

Literatura

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.

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.

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.

Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1420-8.

Kopecek, J. and P. Kopeckova, *HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. 62(2): p. 122-49.

Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme 2001;41:189-207.

O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and*

mechanisms of immune system control. Nat Med, 2004. 10(8): p. 801-5.

Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. 414(6859): p. 105-11.

Rihova, B. and M. Kovar, *Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. 62(2): p. 184-91.

Rihova, B., et al., *Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics*. Trends Biotechnol, 2009. 27(1): p. 11-7.

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.

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.

Seznam publikací:

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace a) s IF

Lee YC¹, Zugna D, Richiardi L, Merletti F, Marron M, Ahrens W, Pohlabein H, Lagiou 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. **IF: 6,198**

Fik Z, Dvorankova B, Kodet O, Boucek J, **Betka JA.**, Betka J, André S, Gabius HJ, Snajdr 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; in press **IF: 1,219**

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. **IF: 2,768**

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.**IF: 5,228**

b) bez IF

0

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

Leoncini E¹, Ricciardi W, Cadoni G, Arzani D, Petrelli L, Paludetti G, Brennan P, Luce D, Stucker I, Matsuo K, Talamini R, La Vecchia C, Olshan AF, Winn DM, Herrero R, Franceschi S, Castellsague X, Muscat J, Morgenstern H, Zhang ZF, Levi F, Dal Maso L, Kelsey K, McClean M, Vaughan TL, Lazarus P, Purdue MP, Hayes RB, Chen C, Schwartz SM, Shangina O, Koifman S, Ahrens W, Matos E, Lagiou P, Lissowska J, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Menezes

A, Agudo A, Daudt AW, Richiardi L, Kjaerheim K, Mates D, **Betka J**, Yu GP, Schantz S, Simonato L, Brenner H, Conway DI, Macfarlane TV, Thomson P, Fabianova E, Znaor A, Rudnai P, Healy C, Boffetta P, Chuang SC, Lee YC, Hashibe M, Boccia S. *Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE Consortium*. Eur J Epidemiol. 2014 Jan;29(1):35-48. **IF: 5,12**

Plzak J, Zabrodsky M, Kastner J, **Betka J**, Klozar J. *Combined bipolar radiofrequency surgery of the tongue base and uvulopalatopharyngoplasty for obstructive sleep apnea*. Arch Med Sci. 2013 Dec 30;9(6):1097-101. **IF: 2,079**

Lukes P, Zabrodsky M, Lukesova E, Chovanec M, Astl J, **Betka JA**, Plzak J. *The Role of NBI HDTV Magnifying Endoscopy in the Prehistologic Diagnosis of Laryngeal Papillomatosis and Spinocellular Cancer*, J Biomed Biotechnol , 2014 Article ID 285486, 7 pages. **IF: 2,88**

b) bez IF

Betka J, Klozar J, Kuchař M, Kastner J, Plzák J. *Obstrukční syndrom spánkové apnoe - srovnání efektivity různých chirurgických přístupů*. ČS ORL, roč. 63, č. 1 (2014), s. 3-9

Betka J, Lukes P, Cada Z, **Betka JA**. *Neck Dissection for Thyroid Cancer, Atlas of Procedures in Surgical Oncology (chapter)*, editor: Riccardo A. Audisio, 2010 World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Betka J., Klozar J., Plzak J. *Syndrom spánkové apnoe - současné možnosti diagnostiky a léčby (přehledový článek)*, Lékařské listy E15, 10/2012.