

**Dizertačná práca**

**Význam kmeňových buniek v patogenéze spinocelulárneho  
karcinómu ústnej dutiny**

MUDr. Michal Krump

**Školiteľ: Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.**

**Ústav klinické a molekulárnej patológie LF UP**

**Laboratoř molekulárnej patológie LF UP**

**Študijný odbor: Patologická anatomie a soudní lékařství**

**Olomouc 2013**

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som dizertačnú prácu vypracoval samostatne, uviedol som všetku použitú literatúru a iné literárne pramene.

V Olomouci 10.4.2013

MUDr. Michal Krump

...lekárska veda neustále napreduje v boji proti chorobám. Viera a modlitba v spolupráci s medicínskym pokrokom pomáhajú premeniť a zošľachtiť utrpenie. Preto tu, na zemi, medicína zostane potrebou ľudského života.

Ján Pavol II. počas návštevy Domova  
úľavy pre trpiacich postaveného z iniciatívy sv. pátra Pia

## **Pod'akovanie**

Moje veľké pod'akovanie patrí školiteľovi Prof. MUDr. Jiřimu Ehrmannovi, Ph.D. a to najmä za jeho cenné pripomienky, rady a odborné vedenie počas celého štúdia. Ďalej by som sa chcel pod'akovať Mgr. Jane Zapletalovej, Dr. z Ústavu lekárskej biofyziky LF UP za štatistické spracovanie údajov, Mgr. Jarmile Potomkovej, Ph.D. z Knihovny LF UP za pomoc pri vyhľadávaní vedeckých publikácii a Mgr. Zdeňke Michalíkovej za vyhotovenie perokresieb. Veľká vďaka patrí aj celej mojej rodine za pochopenie a podporu počas štúdia.

# OBSAH

<b>SÚHRN</b> .....	<b>6</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Teoretický úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. Epidemiológia spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2. Etiológia a rizikové faktory spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. Alkohol.....	13
1.2.2. Tabak a tabakové splodiny.....	14
1.2.3. Betelová zmes (Betel quid).....	15
1.2.4. UV žiarenie a rizikové faktory životného prostredia.....	17
1.2.5. Infekčné ochorenia.....	18
1.2.5.1. Ľudský papilomavírus.....	18
1.2.5.2. Epstein-Barrovej vírus, HSV a HIV.....	22
1.2.5.3. Orálna kandidóza.....	23
1.2.6. Orálna submukózna fibróza.....	24
1.2.7. Orálny lichen planus a orálne lichenoidné lézie.....	27
1.2.8. Lupus erytematosus.....	29
1.2.9. Výživa.....	31
1.2.10. Rodinná anamnéza a genetická predispozícia.....	31
<b>1.3. Prekancerózne lézie</b> .....	<b>32</b>
1.3.1. Leukoplakia.....	33
1.3.2. Erytroplakia.....	40
1.3.3. Palatálna keratóza.....	41
<b>1.4. Spinocelulárny karcinóm dutiny ústnej (OSCC)</b> .....	<b>42</b>
1.4.1. Klinický obraz OSCC.....	42
1.4.2. Anatomické lokalizácie výskytu OSCC v dutine ústnej.....	43
1.4.2.1. Spinocelulárny karcinóm bukálnej sliznice.....	43
1.4.2.2. Spinocelulárny karcinóm jazyka.....	43
1.4.2.3. Spinocelulárny karcinóm ústnej spodiny.....	44
1.4.2.4. Spinocelulárny karcinóm alveolárneho výbežku mandibuly.....	44
1.4.2.5. Spinocelulárny karcinóm alveolárneho výbežku maxilly.....	44
1.4.2.6. Spinocelulárny karcinóm podnebia.....	45
1.4.3. Diagnostika a histopatologický obraz OSCC.....	45
1.4.4. Liečba OSCC.....	46
<b>1.5. Kmeňové bunky</b> .....	<b>46</b>
1.5.1. Kmeňové bunky v embryonálnom a fetálnom období.....	46
1.5.2. Kmeňové bunky v dospelom organizme.....	47
1.5.3. Lokalizácia a identifikácia kmeňových buniek v epiteli.....	49
1.5.4. Morfológické varianty epiteliálnych bunkových klonov.....	49
<b>1.6. Nádorové kmeňové bunky</b> .....	<b>51</b>
1.6.1. Aktivácia nádorových kmeňových buniek.....	52
1.6.1.1. Transformácia kmeňových buniek.....	52
1.6.1.2. Transformácia skorých progenitorových (TA) buniek.....	53
1.6.1.3. Dediferenciácia.....	53
1.6.1.4. Fúzia hematopoetických kmeňových buniek s bunkami tkaniva.....	53
1.6.2. Izolácia a identifikácia nádorových kmeňových buniek.....	54
<b>1.7. Adhezívne molekuly</b> .....	<b>55</b>
1.7.1. CD44.....	55

1.7.2. E-kadherín.....	57
<b>1.8. Princípy imunohistochemického vyšetrenia.....</b>	<b>58</b>
<b>2. Ciele dizertačnej práce.....</b>	<b>59</b>
<b>3. Materiál a metódy.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Súbor histopatologických vzoriek.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. Metodika detekcie adhezívnych molekúl CD44 a E-kadherínu.....</b>	<b>61</b>
3.2.1. Príprava histologických preparátov.....	61
3.2.2. Vyhodnotenie imunoreaktivity.....	61
<b>3.3. Štatistická analýza.....</b>	<b>62</b>
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. Anatomická lokalizácia tumoru (skupina A).....</b>	<b>63</b>
4.1.1. Expresia CD44 vo vzťahu k anatomickej lokalizácii tumoru.....	63
4.1.2. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k anatomickej lokalizácii tumoru.....	66
4.1.3. Reprezentatívne snímky vzoriek OSCC vo vzťahu anatomickej lokalizácii.....	68
<b>4.2. Diferenciácia tumoru (skupina B).....</b>	<b>73</b>
4.2.1. Expresia CD44 vo vzťahu k diferenciácii u vzoriek diagnostickej excízie.....	73
4.2.2. Expresia CD44 vo vzťahu k diferenciácii u vzoriek resektátu tumoru.....	75
4.2.3. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k diferenciácii u vzoriek diagnostickej excízie.....	77
4.2.4. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k diferenciácii u vzoriek resektátu tumoru.....	79
<b>4.3. pT štádium tumoru (skupina C).....</b>	<b>81</b>
4.3.1. Expresia CD44 vo vzťahu k objemu tumoru.....	81
4.3.2. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k objemu tumoru.....	83
<b>5. Diskusia a závery.....</b>	<b>85</b>
<b>6. Literatúra.....</b>	<b>94</b>
<b>7. Zoznam skratiek.....</b>	<b>111</b>
<b>8. Publikácie autora.....</b>	<b>113</b>

## Súhrn

Celosvetovo patria spinocelulárne karcinómy dutiny ústnej (OSCC) medzi 10 najčastejšie sa vyskytujúcich malignít. K hlavným rizikovým faktorom OSCC patrí abúzus alkoholu, tabaku a betelu. Rast a reparácia tkanív závisí na malej subpopulácii kmeňových buniek, ktorých základnou charakteristikou je schopnosť sebaobnovy a produkcie tzv. TA progenitorov (TA; *transit amplifying*), z ktorých vznikajú diferencované bunky. Prítomnosť týchto bunkových typov vyskytujúcich sa aj v malígnych nádoroch je základom pre koncept nádorových kmeňových buniek. Bolo zistené, že rovnako ako epitelové kmeňové bunky produkujú aj malígne bunky *in vitro* rozpoznateľne odlišné kolónie buniek nazývané *holoklony*. Tieto kolónie buniek vykazujú schopnosť sebaobnovy a pri ďalšom delení vytvárajú bunky exprimujúce markery diferencovaných buniek. V súvislosti s identifikáciou a izoláciou týchto nádorových buniek bolo zistené, že vykazujú vysoké hodnoty expresie určitých molekúl, ako napr. E-kadherínu,  $\beta$ -katenínu, CD44 a iné.

Cieľom dizertačnej práce bolo imunohistochemicky detekovať expresiu vybraných potenciálnych markerov nádorových kmeňových buniek (CD44, E-kadherín) vo vzorkách spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej a štatisticky analyzovať expresiu týchto molekúl vo vzťahu k anatomickej lokalizácii, diferenciacii a objemu tumoru (pT).

Do štúdie boli zahrnuté histopatologické vzorky diagnostickej excízie a resekátu spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej získané od 34 pacientov. Všetky vzorky boli na základe sledovaných údajov rozdelené do nasledujúcich skupín: A. *anatomická lokalizácia tumoru* (spodina dutiny ústnej / jazyk / gingíva / iné - zahŕňa oblasť tvrdého podnebia, tonzily, oro- a nazofaryngu), B. *diferenciácia tumoru* (G1 / G2-3), C. *objem tumoru-pT štádium* (pT1-2 / pT3-4). Detekcia expresie CD44 a E-kadherínu bola vykonaná imunohistochemicky pomocou špecifických protilátok a vyhodnotená prostredníctvom H-skóre. V každej skupine boli hodnoty H-skóre rozdelené do dvoch nasledujúcich skupín: negatívna expresia: H-skóre = 0; pozitívna expresia: H-skóre > 0.

Pri porovnávaní vzoriek anatomickej lokalizácie (skupina A) preukázal Fisherov presný test s Bonferroniho korekciou signifikantne vyšší podiel vzoriek s pozitivitou CD44 u lokality „*spodina dutiny ústnej*“ (84,6 %,  $P=0,003$ ) a lokality „*iné*“ (100 %,  $P=0,003$ ) v porovnaní s lokalitou „*jazyk*“ (0 %). Ďalej pri porovnávaní vzoriek skupiny C bola zistená signifikantná závislosť medzi objemom tumoru (pT štádium) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) CD44, pričom pozitivita korelovala s pT1-2 ( $P=0,022$ ). Medzi expresiou E-kadherínu, prípadne CD44 a diferenciaciou tumoru nebola zistená žiadna štatisticky signifikantná závislosť.

Výsledky dizertačnej práce naznačujú, že v pokročilejších nádoroch dochádza k zníženiu expresie štandardnej izoformy CD44. Výsledky ďalej odhalili regionálne rozdiely v expresii CD44 so signifikantne nižšou expresiou u tumorov jazyka v porovnaní s tumormi z ostatných anatomických lokalít dutiny ústnej. OSCC tvoria skupinu nádorov vychádzajúcich zo štrukturálne odlišných oblastí dutiny ústnej. Vzhľadom k tomu je dôležité, aby boli tieto regionálne rozdiely zohľadnené pri hodnotení prognostického významu CD44 u tejto heterogénnej skupiny nádorov.

**Kľúčové slová:** spinocelulárny karcinóm dutiny ústnej, nádorové kmeňové bunky, imunohistochemia, CD44, E-kadherín, anatomická lokalizácia, diferenciácia tumoru, pT štádium

## Summary

Oral squamous cell carcinomas (OSCC) are part of 10 the most common malignancies worldwide. Alcohol, tobacco and betel use are considered to be the major risk factors for OSCC. Tissue growth and reparation depends on a small subset of stem cells that share ability of self-renewal and production TA (*transit-amplifying*) progenitors which ultimately commit to terminal differentiation. The concept of cancer stem cells is based on the presence of these cells in malignant tumours. It has been reported that cancer cells, analogous to epithelial stem cells, form colonies with holoclone morphologies *in vitro*. These cells both possess the ability of self-renewal and produce the cells that express the differentiation markers. With regard to the identification and isolation of these cancer cells it has been reported that they show consistently higher levels of expression of stem-cell related molecules such as E-cadherin,  $\beta$ -catenin, CD44 and others.

The aim of the dissertation thesis was to investigate the expression of potential markers of cancer stem cells (CD44, E-cadherin) in OSCC tumour specimens and statistically analyse this expression in relation to the anatomic location, differentiation and pT stage of tumours.

Histopathological specimens of OSCC from 34 patients were included into the study.

The samples were classified by observed data in the groups: A. anatomic location of tumour (floor of the mouth / tongue / gingiva / other - included hard palate, tonsils, naso- and oropharynx); B. tumour differentiation (G1 / G2-3), C. pT stage of tumour (pT1-2 / pT3-4).

The expression of CD44 and E-cadherin was detected by immunohistochemistry with specific antibodies and analysed using H-score. The H-score values were divided into groups: negative expression: H-score = 0; positive expression: H-score > 0. Fischer's exact test with a Bonferroni correction revealed statistically significantly decreased expression in *tongue* tumour group (0%) when compared with that of the *floor of the mouth* (84,6%;  $P=0,003$ ) and *other* group (100%;  $P=0,003$ ). When compared specimens in group C statistically significant association between pT stage and positivity/negativity of CD44 was observed. CD44 positivity correlates with pT1-2 ( $P= 0,022$ ). While comparing tumour differentiation, no statistically significant differences in CD44 and E-cadherin expression were observed.

The results indicate the reduced CD44 expression in advanced pT stages of tumours. Moreover, the CD44 expression is strongly reduced in squamous cell carcinomas of the tongue when compared with other areas of the oral cavity. OSCC represent a tumour group, in which tumours arising from structurally different oral areas. This should therefore lead to take



different areas into consideration when analysing prognostic value of CD44 in this heterogenous tumour group.

**Key words:** oral squamous cell carcinoma, cancer stem cells, immunohistochemistry, CD44, E-cadherin, anatomic location, tumour differentiation, pT stage

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Epidemiológia spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej

Nádorové ochorenia predstavujú z globálneho hľadiska jeden z najzávažnejších zdravotných problémov. Podľa celosvetových odhadov bolo v roku 2002 diagnostikovaných okolo 10,9 milióna nových prípadov nádorových ochorení (Parkin et al. 2005).

Incidenca malígnych nádorov dutiny ústnej (MNDU) v jednotlivých oblastiach sveta značne kolísala. Incidenca spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej (OSCC) predstavovala v roku 1999 6,6/100 000 u mužov a 2,9/100 000 u žien (Reichart 2001). V roku 2002 bolo celosvetovo zaznamenaných cca 274 000 nových prípadov OSCC a v takmer dvoch tretinách prípadov sa jednalo o mužskú populáciu. Melanézia predstavovala v danom roku svetovú oblasť s najvyššou incidenciou OSCC (31,5/100 000 u mužov a 20,2/100 000 u žien). Jedná sa o súčasť Oceánie (obr. 1) a tvorí ju viacero ostrovov. Medzi najvýznamnejšie patrí Bismarckovo súostrovie, Fidži, Nová Kaledónia, Nová Guinea, Moluky, Šalamúnove ostrovy, Ostrovy Torresovho prielivu a Vanuatu.



**Obr. 1:** Melanézia nachádzajúca sa severne a severovýchodne od Austrálie.

Čo sa týka ženskej populácie relatívne vysoká incidencia OSCC bola zaznamenaná v južnej Ázii (8,3/100 000). Tieto štatistické údaje odrážajú vplyv rizikových faktorov OSCC, akými sú značne rozšírené žuvanie betela obyvateľmi južnej Ázie a Melanézie alebo vysoký výskyt karcinómu pery v Austrálii, pripisovaný najmä škodlivým účinkom slnečného žiarenia (Parkin et al. 2005). V USA v období rokov 2001-2005 činila incidencia malígnych nádorov dutiny ústnej (MNDU) cca 10,4/100.000 ročne. Vekový medián pacientov v dobe stanovenia diagnózy MNDU predstavoval 62 rokov (Ries et al. 2008). Vyššia incidencia bola zaznamenaná u Afroameričanov (12,4/100 000) v porovnaní s jedincami bielej rasy (9,7/100 000). Najvyššia incidencia sa vyskytovala u Afroameričanov mužského pohlavia (20,5/100 000) (Silverman 2001; Ries et al. 2008). Horšie štatistické výsledky vykazujú rozvojové krajiny Afriky, kde incidencia MNDU a pharyngu činí podľa údajov WHO približne 25/100 000. (World Health Organization 2001). V Českej republike predstavovala v r. 2005 incidencia MNDU cca 4 prípady na 100 000 obyvateľov, pričom u mužského pohlavia bola incidencia cca 3 krát vyššia ako u žien.

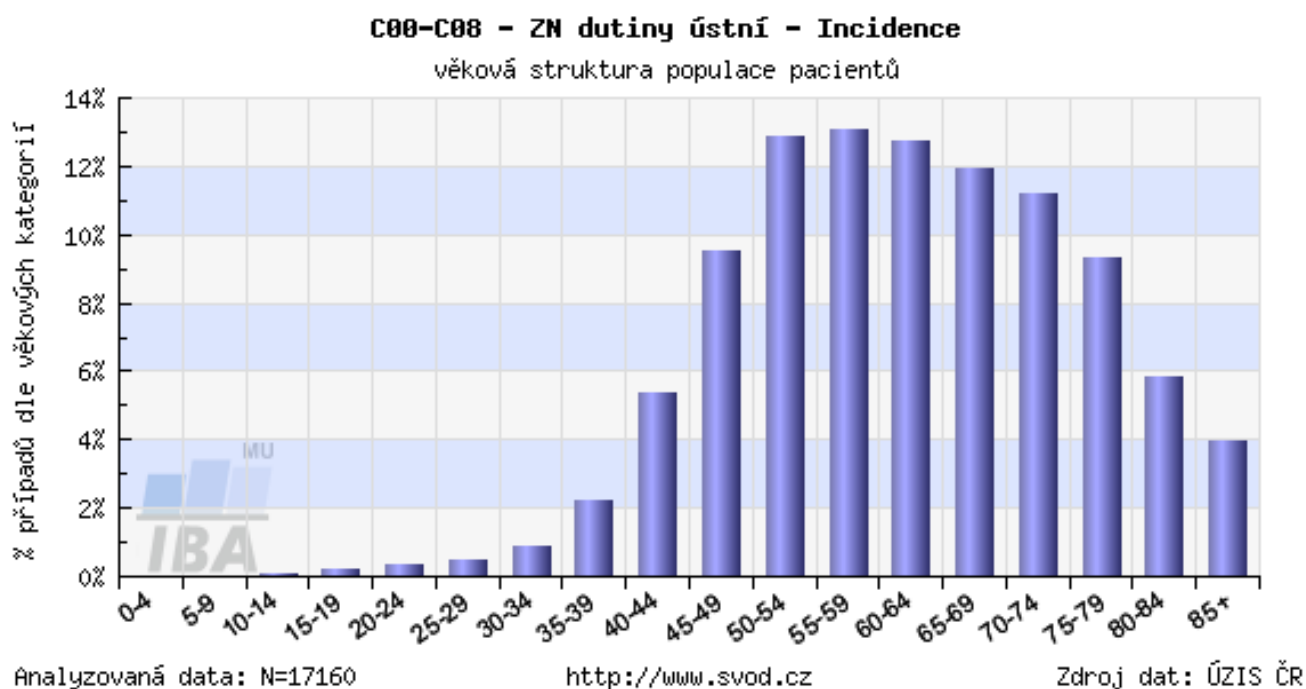
Od 80-tych rokov minulého storočia sa incidencia MNDU zvýšila o približne 0,5/100 000.

Incideniu MNDU (C00-C08) v časovom rozmedzí rokov 1977-2005 udáva tab. 1.

**Tab. 1:** Časový vývoj incidence MNDU (C00-C08) v Českej republike za obdobie rokov 1977-2005 (Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice 2005).

<b>Rok</b>	<b>1977</b>	<b>1978</b>	<b>1979</b>	<b>1980</b>	<b>1981</b>	<b>1982</b>	<b>1983</b>	<b>1984</b>	<b>1985</b>	<b>1986</b>
Incidenia	3,5	3,59	3,33	3,5	3,78	3,73	3,91	3,53	3,92	4,01
<b>Rok</b>	<b>1987</b>	<b>1988</b>	<b>1989</b>	<b>1990</b>	<b>1991</b>	<b>1992</b>	<b>1993</b>	<b>1994</b>	<b>1995</b>	<b>1996</b>
Incidenia	3,99	3,98	3,87	3,99	4,23	4,04	3,97	4,27	4,14	4,37
<b>Rok</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	
Incidenia	3,83	3,92	4,24	4,1	4,38	3,7	4,06	4,18	4,37	

Najohrozenejšiu vekovú skupinu predstavujú jedinci od 50 do 65 rokov. Veková štruktúra populácie pacientov v závislosti na incidencii MNDU (C00-C08) je znázornená na obr. 2. (Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice 2005).



**Obr. 2:** Graf znázorňující vekovú štruktúru populácie pacientov v závislosti na incidencii MNDU (C00-C08).

Prevalencia MNDU sa zvyšuje s vekom a je častejšia u mužov v porovnaní so ženami s pomerom cca 2:1. V posledných desaťročiach však bolo popísané zvýšenie výskytu OSCC u ženskej populácie, ktoré má na svedomí stieranie výraznejšieho rozdielu medzi mužským a ženským pohlavím (Reichart 2001; Silverman 1998; Chen et al. 1990). V rozvojových krajinách je OSCC šiestou najčastejšou malignitou u mužov a desiatou najčastejšou malignitou u žien (Landis et al. 1999). V USA predstavujú MNDU približne 3 % všetkých malignít u mužov a 2 % všetkých malignít u žien, pričom vo viac ako 90 % prípadov sa jedná o spinocelulárne karcinómy (Neville & Day 2002). Napriek tomu, že dutina ústna predstavuje lokalitu ľahko prístupnú klinickému vyšetreniu, je len približne jedna tretina OSCC diagnostikovaná v I. alebo II. štádiu ochorenia (Jemal et al. 2008).

## 1.2. Etiológia a rizikové faktory spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej

K hlavným rizikovým faktorom OSCC patrí abúzus alkoholu, tabaku a v ázijských krajinách značne rozšírené žuvanie betelovej zmesi. Predispozične môžu pôsobiť najmä vírusové (HPV, EBV, HSV) a mykotické infekcie (*Candida albicans*), orálna submukózna fibróza, diskoidný lupus erythematosus, orálny lichen planus a lichenoidné lézie dutiny ústnej.

K potenciálnym rizikovým faktorom sa ďalej radí pozitívna rodinná anamnéza OSCC, nízky socioekonomický status spojený so slabou úrovňou ústnej hygieny, nevyvážená diéta a získaný imunitný deficit (HIV) (Mehrotra & Yadav 2006; Franceschi et al. 2000). V prípade spinocelulárneho karcinómu pery zohráva v etiológii taktiež dôležitú úlohu nadmerná expozícia slnečnému žiareniu (Pukkala & Notkola 1997; Antoniadou et al. 1995). Spomenuté rizikové faktory vedú k malígnemu nádorovému ochoreniu najčastejšie cez prekancerózne lézie, ktoré sa v určitom percente prípadov malígne transformujú. Tieto prekancerózy môžeme rozdeliť na makroskopicky viditeľné a histopatologicky verifikované. V populácii sa navyše vyskytuje určité percento pacientov s diagnostikovaným OSCC bez prítomnosti typických rizikových faktorov v životospráve (nefajčiari, abstinenti), u ktorých sa môže vyskytnúť zvlášť agresívny priebeh ochorenia (Llewellyn et al. 2004). Etiopatogenéza ostáva u týchto pacientov nejasná, aj keď sa začína diskutovať o možnej kauzálnej súvislosti s perzistentnou vírusovou infekciou. Zdá sa, že určitú úlohu tu bude taktiež zohrávať genetická predispozícia (génový polymorfizmus). Zvláštne postavenie v epidemiológii OSCC predstavuje príslušnosť k určitej rasovej a etnickej skupine, ktorá výrazne ovplyvňuje prevalenciu ochorenia v závislosti na sociálnych a kultúrnych zvyklostiach. Potvrďuje to aj vysoká prevalencia ochorenia prítomná u komunít imigrantov, ktorí emigrovali zo svetovej oblasti s vysokou incidenciou OSCC (Ahluwalia 2005; Van Wyck et al. 1993).

### **1.2.1. Alkohol**

Mnohé epidemiologické štúdie potvrdili koreláciu medzi požívaním alkoholu a výskytom nádorových ochorení (Tuyns 1983; Seitz et al. 1998; Stickel et al. 2002). Chronická konzumácia alkoholu je výrazným rizikovým faktorom nádorových ochorení horného zažívacieho traktu (Seitz et al. 2004). Mechanizmov a príčin, ktoré sa podieľajú na vzniku nádorových ochorení v súvislosti s príjmom alkoholu je niekoľko. Patrí medzi ne účinok acetaldehydu, indukcia cytochrómu P4502E1 (CYP2E1) či lokálny vplyv alkoholu na epitel. Acetaldehyd (AA), prvý metabolit oxidácie alkoholu, pôsobí kancerogénne a mutagénne, deštruuje foláty a vyúsťuje v následnú hyperproliferáciu. AA je produkovaný tkanivovými alkoholdehydrogenázami, cytochrómom P4502E1 a taktiež pomocou bakteriálneho oxidatívneho metabolizmu v gastrointestinálnom trakte (Poschl & Seitz 2004). Bolo zistené, že AA interferuje s mechanizmom dôležitým pri reparácii DNA, cestou inhibície enzýmu O6 metyl-guanyltransferázy (Espina et al. 1988). Bruguere et al. v r. 1986 zistil, že relatívne riziko u ľudí denne požívajúcich 100-150 g alkoholu je 13,5 krát vyššie pre

výskyt karcinomu dutiny ústnej, 15,2 krát vyššie pre oropharyngeálne karcinomy a 28,6 krát vyššie pre hypopharyngeálne karcinomy (Bruguere et al. 1986). Ďalšia štúdia z Francúzska zistila, že jedinci s denným príjmom alkoholu nad 100 g vykazujú 30-násobne vyššie riziko vzniku spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej a oropharyngu (Andre et al. 1995). S ohľadom na synergistický účinok alkoholu a fajčenia bolo zistené, že jedinci s vysokým denným abúsom alkoholu a cigariet môžu vykazovať až 100-násobne vyššie riziko rozvoja malignity (Andre et al. 1995; Blot et al. 1988). Indukcia cytochrómu P4502E1 (CYP2E1) je spojená so zvýšenou tvorbou voľných radikálov a taktiež uľahčuje aktiváciu rôznych prokancerogénnych látok prítomných napríklad v alkoholických nápojoch (Poschl & Seitz 2004). V súvislosti so škodlivým lokálnym účinkom alkoholu, netreba zabúdať na fakt, že najmä koncentrovaný alkohol má priame toxické pôsobenie na epitel a súčasne pôsobí ako rozpúšťadlo, ktoré uľahčuje prienik ostatných kancerogénov do sliznice. Navyše chronický alkoholizmus vedie k atrofii a lipomatóznej metamorfóze parenchýmu slinných žliaz. Poškodenie parenchýmu vedie k funkčnému zníženiu salivácie a k zvýšenej viskozite sliny. Týmto sa slizničný povrch stáva neschopným samočistenia a je preto vystavený vyšším koncentráciám lokálne pôsobiacich kancerogénov, ktoré ostávajú dlhšiu dobu v kontakte so slizničným povrchom (Maier et al. 1986; Seitz et al. 1998).

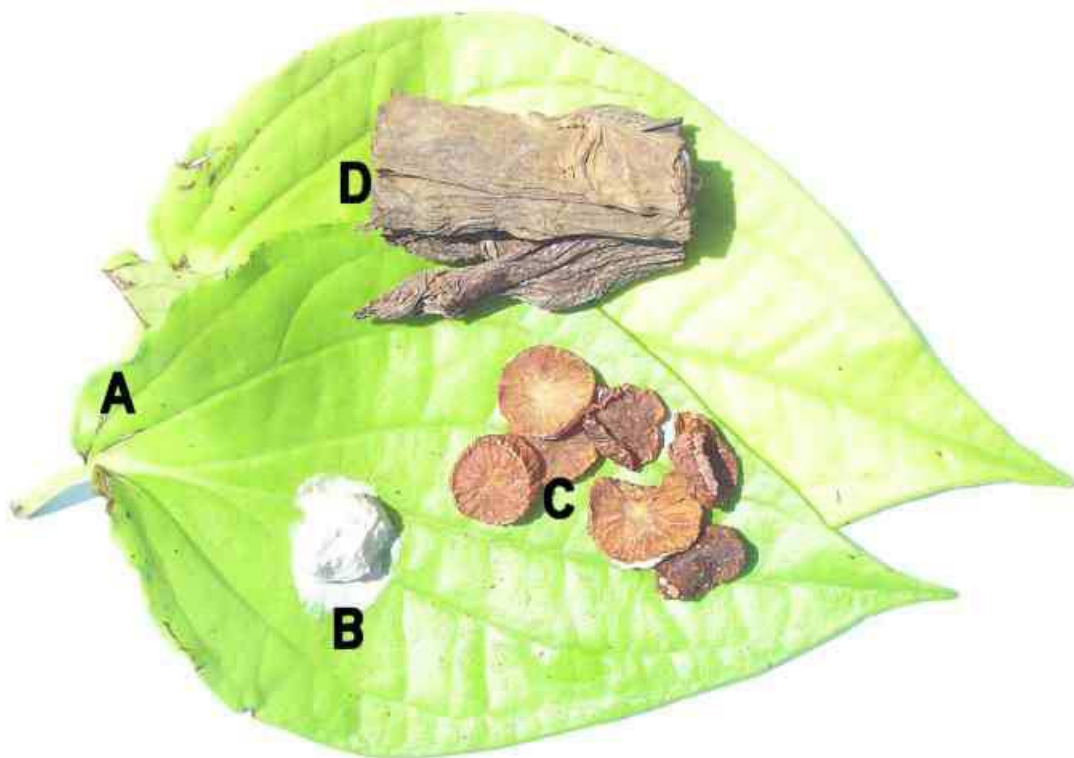
### **1.2.2. Tabak a tabakové splodiny**

Existujú dva spôsoby konzumácie, akými sa tabak a jeho splodiny dostávajú do organizmu. Buď je tabák spaľovaný a jeho produkty sú následne inhalované respiračným traktom alebo sa konzumuje bez spaľovania a dostáva sa do kontaktu so sliznicami, cez ktoré dochádza k absorpcii nikotínu (Daftary et al. 1991). Podľa epidemiologických štúdií bolo zistené, že riziko vzniku OSCC je 5-9 násobne vyššie u fajčiarov v porovnaní s nefajčiarmi. Pokiaľ ide o extrémnych fajčiarov (80 cigariet denne a viac), môže byť toto riziko až 17-násobne vyššie (Mashberg et al. 1993; Jovanovic et al. 1993; Andre et al. 1995; Lewin et al. 1998). K tabakovým produktom, ktoré k svojej konzumácii nepotrebujú spaľovanie patrí *šnúpací tabak*, *žuvací tabak* a tzv. *snuff* (švédsky *snus*). Zatiaľ čo šnúpací tabak je sypký výrobok z fermentovaných mletých tabakových listov určený k inhalácii nosom, žuvací tabak je tvorený sušenými tabakovými listami obvykle namočenými v sladkom roztoku. Snuff alebo snus je zvláštny typ tabaku, ktorý sa v podobe malej guľičky umiestňuje do ústneho vestibula medzi líce a alveol. Tento spôsob konzumácie tabaku je rozšírený najmä v škandinávskych krajinách. Žuvanie a "snuffing" tabaku je taktiež asociované so zvýšeným rizikom MNDU, aj

keď v menšej miere. Odhaduje sa približne 4-násobne vyššie riziko vzniku OSCC (Winn et al. 1981). Určité štúdií naznačujú, že konzumácia práve švédskeho snuffu (ktorý je nefermentovaný a má nižší obsah nitrosamínov) nie je spojená so zvýšeným rizikom OSCC (Lewin et al. 1998). Hlavný problém, týkajúci sa presného stanovenia rizika vzniku karcinómu hornej časti zažívacieho traktu, tkvie v jeho silnom synergizme s alkoholom (Johnson 2001). Určité štúdie naznačujú, že pri fajčení fajok a cigár existuje menšie riziko vzniku OSCC ako pri fajčení cigariet (Wynder et al. 1977). Na druhej strane iná štúdia zo severného Talianska potvrdzuje vyššie riziko vzniku OSCC v spojení s fajčením fajok a cigár v porovnaní s fajčením cigariet. (Franceschi et al. 1990). V tabakovom dyme (alebo vo vode rozpustných zložkách, ktoré sa extrahujú do sliny) bolo identifikovaných viac ako 300 kancerogénov (International Agency for Research on Cancer 1986). Medzi najviac študované patria polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), tabak-špecifické nitrosamíny, nitrosonornikotín (NNN), nitrosopyrolidín, nitrosodimetylamín a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK). NNN a NNK pôsobia lokálne na kmeňové bunky keratinocytov a po absorbovaní do organizmu taktiež na vzdialené tkanivá. Škodlivé pôsobenie týchto látok spočíva v tvorbe DNA aduktov, ktoré narušujú následnú replikáciu DNA (Johnson 2001). Metabolizmus spomenutých kancerogénov obvykle zahŕňa oxygenáciu cytochrómom p450 a následnú konjugáciu, pri ktorej je dôležitý enzým glutathion-S-transferáza. Zdá sa, že génový polymorfizmus týchto enzýmov je asociovaný s náchylnosťou k vzniku malígnit v rôznych lokalitách (Lafuente et al. 1998). V súvislosti s malígnymi nádormi hlavy a krku, tento polymorfizmus koreloval s klinickým štádiom, diferenciaciou a prognózou nádorového ochorenia (Matthias et al. 2002).

### **1.2.3 Betelová zmes (Betel quid)**

Žuvanie betelovej sústa alebo betelovej zmesi (angl. betel quid) je pradávny zvyk bežne praktikovaný v mnohých ázijských krajinách. Betelové sústo obvykle pozostáva z betelového listu, semien Palmy arekovej a haseného vápna (obr. 3). K týmto zložkám sa môžu pridávať ďalšie prísady, ako napríklad tabak (Warnakulasuriya et al. 2002; Lu et al. 1996).



**Obr. 3:** Zloženie betelového sústa: betelové listy (A), hasené vápno (B), semená Palmy arekovej (C) a tabak (D) (International Agency for Research on Cancer).

Semená Palmy arekovej obsahujú účinné látky- alkaloidy, medzi ktoré patrí arekolín, arekaidín, guvakolín, a guvacín (Giri et al. 2006). Efekt najviac zastúpeného alkaloidu arekolínu spočíva najmä v jeho pôsobení na cholinergné neuróny (Arjungi 1976).

Ďalšia zložka betelovej zmesi je hasené vápno, ktorého význam spočíva v rýchlejšom uvoľňovaní alkaloidov a v posilnení farmakologického účinku (Zain et al. 1997; Johnson 2001). Príprava betelovej zmesi spočíva v zavinutí časti semena areky, haseného vápna, prípadne ďalších prísad do betelového listu. Zavinutú betelovú zmes si konzument vkladá do úst a prežúva. Pravidelné žuvanie betelovej zmesi má viacero škodlivých účinkov na sliznicu dutiny ústnej a hornej časti zažívacieho traktu s možnosťou malígneho zvratu.

Betelové listy obsahujú značné množstvo kancerogénu nazývaného safrol, ktorý je v organizme metabolizovaný a vylučovaný močovými cestami ako dihydroxychavikol a eugenol (Chang et al. 2002). Žuvanie buď samotných semien Palmy arekovej alebo ako súčasť betelovej zmesi vedie k vzniku orálnej submukóznej fibrózy, potenciálne prekancerózneho postihnutia ústnej sliznice (Dava et al. 1992). Relatívne riziko vzniku OSCC



u jedincov pravidelne konzumujúcich semená palmy arekovej predstavovalo u taiwanskej populácie 58,4 (95% interval spoľahlivosti 7,6-447,6). Doba trvania konzumácie (roky) a frekvencia denného príjmu pozitívne korelovala so zvýšením rizika vzniku karcinómu (Lu et al. 1996). Prímes tabaku k týmto produktom toto riziko ešte viac zvyšuje (International Agency for Research on Cancer 1985). Navyše kombinácia fajčenia a žuvania betelovej zmesi (zloženého z betelového listu, semien palmy arekovej a tabaku) pôsobí synergisticky. Pomocou mikronukleus testu (detekcia chromozomálneho poškodenia) bol potvrdený zvýšený počet mikrojadierok v bunkách ústnej sliznice u fajčiarov pravidelne žuvajúcich betelovú zmes v porovnaní s nefajčiarmi žuvajúcimi betelovú zmes. Kontrolná skupina nefajčiarov, nekonzumujúcich betelovú zmes vykazovala najnižší počet mikrojadierok v bunkách ústnej sliznice a teda predstavovala najmenej rizikovú skupinu v súvislosti s možným vznikom karcinómu (Sellappa et al. 2009).

#### **1.2.4. UV žiarenie a rizikové faktory životného prostredia**

Rizikovú skupinu, s ohľadom na možný vznik spinocelulárneho karcinómu pery (SCCL), predstavujú hlavne ľudia pracujúci väčšinu dňa v prírode, ktorí sú vystavení dlhodobej expozícii slnečnému žiareniu (zamestnanci pracujúci v poľnohospodárskom odvetví). Väčšie riziko vzniku SCCL taktiež existuje u ľudí žijúcich buď v krajinách s vyššou zemepisnou šírkou, ktoré vykazujú zníženú koncentráciu ozónu v atmosfére (Pukkala & Notkola 1997) alebo v krajinách, ktoré sú položené bližšie k rovníku, s dlhším dňom a silnejšou intenzitou slnečného žiarenia (Antoniades et al. 1995). Štúdia prípadov a kontrol z Kalifornie potvrdila, že u žien výrazne koreluje čas života strávený na slnku s rizikom vzniku SCCL a že používanie rúžov na pery pôsobí v tomto smere ochrane (Pogoda & Preston-Martin 1996). Rozsiahla epidemiologická štúdia zo západnej Austrálie udáva percentuálny podiel SCCLs 49 % zo všetkých prípadov MNDU zahrnutých do štúdie, z čoho 82 % postihovalo dolnú peru (Abreu et al. 2009). Aj keď je výskyt SCCL výrazne koreluje s chronickou expozíciou slnečnému žiareniu, bolo zistené, že výskyt SCCL je taktiež asociovaný s miestom, kde fajčiar habituálne udržuje cigaru, či fajku (Silverman & Shillitoe 1998). Zdá sa, že dôležitú úlohu zohrávajú aj mestské versus vidiecke oblasti životného prostredia. V štúdií z Anglicka signifikantne koreloval stupeň znečistenia ovzdušia kysličníkom siričitým s výskytom spinocelulárneho karcinómu laryngu (Wake 1993). Zvýšené riziko karcinómu laryngu bolo zistené taktiež u pracovníkov v oceliarskom priemysle, ktorí vykazovali dlhodobú expozíciu výparom kyselín (Steenland 1997).

Rozsiahlejšia štúdia prípadov a kontrol z USA potvrdila nepriaznivý vplyv spaľovania fosílnych palív na zdravie, kde u skupín takto exponovaných zamestnancov bola zvýšená pravdepodobnosť vzniku karcinómu faryngu (Huebner et al. 1992).

## 1.2.5. Infekčné ochorenia

### 1.2.5.1. Ľudský papilomavírus (HPV)

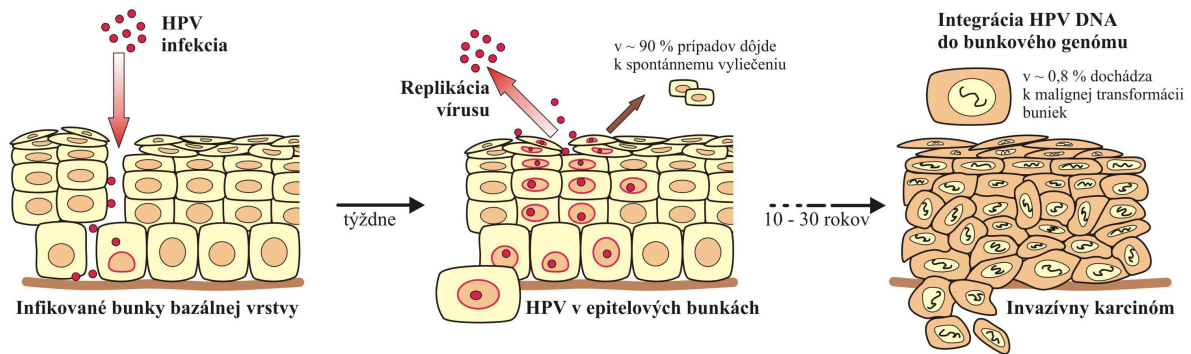
Ľudský papilomavírus je považovaný za možný etiologický faktor (prípadne kofaktor) pri vzniku OSCC. Podľa rizika vzniku malígnej epiteliálnej transformácie sa HPV rozdeľujú na tzv. vysokorizikové – „high-risk HPV“ (typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 ) s vyšším rizikom iniciovať malígnu bunkovú transformáciu a nízkorizikové – „low-risk HPV“ (typy 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, 81) s rizikom nižším.



**Obr. 4:** Papilóm na podnebí dutiny ústnej.

Najvýznamnejšie postavenie majú typy HPV 16 a HPV 18, ktoré bývajú najčastejšie asociované s HPV- pozitívnymi HNSCC (Kreimer et al. 2005). Vírusový genóm papilomavírusov obsahuje gény pre skoré funkcie (E-gény), gény pre neskoršie funkcie (L-gény) a gény pre štrukturálne vírusové proteíny (Altaner 2003). Mechanizmus onkogenézy spočíva v schopnosti HPV kódovať dva kľúčové onkoproteíny E6 a E7, ktoré cestou

inaktivácie tumor supresorových proteínov p53 a pRb narušujú reguláciu bunkového cyklu (obr. 5) (McLaughlin-Drubin & Münger 2009).



**Obr. 5:** Schéma znázorňujúca priebeh HPV infekcie v epitelových bunkách.

V súvislosti s hlavnými rizikovými faktormi pre vznik OSCC (t.j. konzumácia tabaku, alkoholu, betelu, slabá úroveň ústnej hygieny) je zaujímavé, že existuje určitá skupina, najmä mladších pacientov bez prítomnosti týchto „typických“ rizikových faktorov v životospráve (nefajčiari, abstinenti). U týchto pacientov sa na základe HPV-pozitivity začalo hypotetizovať o možnej etiologickej súvislosti s papilomavírusovou infekciou. Taktiež vlastnosti týchto HPV-pozitívnych nádorov vykazujú určité klinicko-patologické rozdiely. Jedná sa najmä o odlišnosti týkajúce sa rizikových faktorov, veku, histopatologického obrazu (nekeratinizujúca bazaloidná morfológia), diferenciácie či anatomickej lokalizácie nádoru (El-Mofty & Lu 2003; McHugh 2009). Bola zistená silná asociácia medzi pacientami s HPV16-pozitívnymi HNSCC, počtom orálnych sexuálnych partnerov a fajčením marihuany. Pacienti s HPV16-negatívnymi HNSCC súvislosť s týmito rizikovými faktormi nevykazovali a u týchto pacientov bola naopak potvrdená pozitívna asociácia s konzumáciou alkoholu, tabaku a malhygienou dutiny ústnej (Gillison et al. 2008). Výsledky niekoľkých štúdií odhalili signifikantne vyššiu prevalenciu najmä „high-risk HPV“ v OSCC v porovnaní so zdravým ústnym epitelom (Luo et al. 2007; Miller & White 1997). V štúdií obsahujúcej súbor 167 histopatologických vzoriek spinocelulárnych karcinómov hlavy, krku a pažeráku bol pri porovnaní výskytu HPV, v závislosti na lokalite v dutine ústnej, zistený vyšší výskyt HPV vo Waldereyovom lymfatickom okruhu (60 %), kým z 11 spinocelulárnych karcinómov pažeráku nebol vírus detekovaný ani v jednom prípade. Z celkového súboru bol HPV detekovaný v 25

prípadoch (Paz et al. 1997). Na druhej strane u spinocelulárneho karcinomu jazyka bol HPV detekovaný len v 1,96 % prípadov, čo naznačuje, že HPV pravdepodobne nezohráva významnú úlohu v etiológii a patogenéze spinocelulárneho karcinómu v tejto lokalite (Liang et al. 2008). Anatomickú lokalizáciu najčastejšie asociovanú s HPV-pozitívitou predstavuje oblasť oropharyngu. V systematickej review, ktorá zahŕňala celkovo 60 štúdií z celého sveta, bol zistený významne zvýšený celosvetový výskyt HPV-pozitívnych SCC v oblasti oropharyngu (35,6 %) v porovnaní s ostatnými anatomickými lokalitami (dutina ústna: 23,5 %, larynx: 24,0 %). Celková celosvetová HPV prevalencia v 5046 vzorkách HNSCC bola 25,9 % [95 % IS, 24,7-27,2 %]. Percentuálny podiel HPV-pozitívnych HNSCC v závislosti na anatomickej lokalizácii a geografických podmienkach zobrazuje tab. 2 (Kreimer et al. 2005).

**Tab. 2:** Percentuálny podiel HPV pozitívnych HNSCC v závislosti na anatomickej lokalizácii a geografických podmienkach (Kreimer et al. 2005).

	Oropharynx	Larynx*	Dutina ústna
Celkovo	35,6 %	24,0 %	23,5 %
Európa	28,2 %	21,3 %	16,0 %
Severná Amerika	47,0 %	13,8 %	16,1 %
Ázia	46,3 %	38,2 %	33,0 %
Ostatné <sup>e</sup>	36,6 %	48,5 %	18,1 %

\*Larynx - zahŕňa prípady SCC hypopharyngu

<sup>e</sup>Zahŕňa - Strednú a Južnú Ameriku, Austráliu a Afriku

Na základe citovanej literatúry je možné v študovaných vzorkách vidieť značné rozdiely týkajúce sa HPV prevalence. Tieto odlišné hodnoty v percentuálnom zastúpení HPV v jednotlivých štúdiách môžu byť mimo iné spôsobené:

- rozdielnou prevalenciou vírusu v rôznych svetových oblastiach (pravdepodobne spôsobenou rozdielnou distribúciou rizikových faktorov)
- často nepresným zadefinovaním skúmanej anatomickej oblasti (napr. spinocelulárne karcinómy hlavy a krku vs. spinocelulárne karcinómy oropharyngu)
- chybným určením anatomickej oblasti pôvodného miesta vzniku tumoru (na základe pokročilosti ochorenia)
- vznikom publikačného bias (skreslenie informácií, ktoré vzniká tendenciou publikovať len štatisticky významné výsledky, t.j. napr. na základe vysokej HPV prevalence)

- príliš nízkym počtom vzoriek zahrnutých do štúdie
- v rozdielnej senzitivite testov použitých na HPV detekciu. Najvyššia prevalencia vírusu bola zistená v štúdiách používajúcich vysoko senzitivne metódy detekcie (PCR) v porovnaní so štúdiami používajúcimi stredne (Southern blot) či nízko senzitivne metódy (imunohistochemická analýza, in situ hybridizácia).

HPV DNA bola taktiež signifikantne častejšie detekovaná v zmrazených bioptických vzorkách (51.6%) ako vo vzorkách parafínových (21.7%).

Na druhej strane treba podotknúť, že „high-risk HPV“ boli opakovane detekované aj v benígnych slizničných léziách a taktiež v klinicky a histologicky normálnej sliznici dutiny ústnej (Miller & White 1997; Sugerman & Shillitoe 1997). Otázka prečo len v určitých prípadoch dochádza k nádorovej transformácii HPV infikovaných buniek ostáva nezodpovedaná a v tomto smere bude nepochybne potreba ďalšieho výskumu. Jednou z možných príčin by mohol byť polymorfizmus kodónu 72 génu TP53, ktorý je polymorfný v tom, že kóduje buď arginín alebo prolín. Bolo zistené, že arginínový typ p53 vykazuje väčšiu vnímavosť k degradácii pomocou onkoproteínu E6, na rozdiel od formy prolínovej (Butel 2000). Ďalší faktor, ktorý prispieva k vyššiemu riziku malígnej transformácie je expozícia HPV infikovaných buniek chemickým kancerogénom životného prostredia (tzn. spolupôsobenie viacerých rizikových faktorov, v tomto prípade HPV infekcie a chemického kancerogénu). Pri porovnávaní schopnosti chemických kancerogénov nádorovo transformovať ľudské keratinocyty bolo zistené, že nádorová transformácia prebehla len v keratinocytoch imortalizovaných infekciou HPV, na rozdiel od keratinocytov zdravých (Park et al. 1991; Shin et al. 1996). Prepokladá sa vyššia schopnosť zdravých ústnych keratinocytov reparovať poškodenú DNA, na rozdiel od imortalizovaných keratinocytov.

Podobné výsledky boli získané po expozícii ľudských ústnych keratinocytov UV-žiareniu. Kým UV-žiarenie signifikantne zvýšilo stupeň intranukleárneho proteínu p53 v zdravých bunkách, nebolo u HPV-imortalizovaných a nádorových buniek po tejto expozícii pozorované zvýšenie tohto proteínu (Gujuluva et al. 1994). Na základe dostupných literárnych zdrojov sa zdá, že perzistentná HPV infekcia-sama o sebe-ešte nespĺňa požiadavky kompletného kancerogénu (samotná expresia onkoproteínov E6 a E7 nie je dostačujúca k tomu, aby došlo k bunkovej transformácii) (Chung & Gillison 2009). Pôsobenie HPV infekcie je pravdepodobne zahrnuté v komplexnejšom multifaktoriálnom procese, ktoré funguje na princípe akéhosi kofaktora. Vzhľadom k spomínaným rozdielom v prognóze HPV pozitívnych a HPV negatívnych tumorov ostáva otázne, či bude niekedy v budúcnosti

ovplyvňovať HPV status zmenu liečebných postupov a teda či bude možné (kvôli lepšej terapeutickému odpovedi) použiť pri liečbe HPV pozitívnych tumorov menej agresívne metódy onkologickej terapie. Taktiež potvrdená súvislosť medzi HPV infekciou a HNSCC ponúka príležitosť uplatniť určité princípy prevencie nádorových ochorení v oblasti dutiny ústnej a oropharyngu. Zaujímavým sa napríklad zdá byť génový polymorfizmus, ktorý môže vyselektovať jedincov so zvýšeným rizikom malígnej transformácie HPV infikovaných buniek. Ďalšiu možnosť predstavuje súčasná vakcinácia proti HPV zameraná na prevenciu cervikálneho karcinómu, ktorá môže teoreticky ovplyvňovať priebeh infekcie aj v iných anatomických lokalitách ako je dutina ústna či oropharynx. Epidemiologické údaje z USA naznačujú, že počet ročne diagnostikovaných HPV pozitívnych „necervikálnych karcinómov“ (t.j. anogenitálna oblasť a oropharynx) sa približuje počtu karcinómov cervikálnych. Navyše, kým v USA incidencia cervikálneho karcinómu klesá, incidencia anogenitálnych a oropharyngeálnych karcinómov (pre ktoré neexistuje efektívny skrínigový program) narastá. Ak vezmeme do úvahy fakt, že 70-90 % cervikálnych karcinómov a až cca 90 % „necervikálnych karcinómov“ má etiologickú súvislosť s typmi 16 a 18 (t.j. s typmi proti ktorým je zameraná súčasná profylaktická HPV vakcinácia), je teoreticky možné u jedincov, ktorí podstúpili vakcináciu očakávať podobný preventívny účinok a efektivitu v znižovaní incidence nádorových ochorení taktiež v týchto anatomických lokalitách (Gillison et al. 2008).

### **1.2.5.2. Epstein-Barrovej vírus (EBV), herpes simplex vírus (HSV) a HIV**

V r. 1958 popísal anglický lekár Denis Burkitt pracujúci v Ugande typ lymfómu bežne sa vyskytujúceho u detí žijúcich v oblasti rovníkovej Afriky. O 6 rokov neskôr Epstein, Achong a Barrová identifikovali v bunkových líniách získaných z tohto lymfómu herpesu-podobné vírové partikule. Neskôr bol EBV potvrdený ako etiologické agens infekčnej mononukleózy a taktiež bola zistená jeho asociácia s nediferencovaným nazofaryngeálnym karcinómom (NPC) (Lopes et al. 2003; Raab-Traub 2002; Escobar et al. 1970). Podľa najnovších výsledkov sa zdá, že je táto asociácia spojená najmä s progresiou NPC, ale nie s priamou nádorovou iniciáciou, nakoľko bolo zistené, že EBV je schopné infikovať jedine nazofaryngeálne neoplastické bunky, na rozdiel od buniek metaplastických (Lin 2009). Podobne pri OSCC, bola síce zistená jeho asociácia s EBV, ale priama etiologická úloha tohto vírusu v súvislosti s kancerogéznou OSCC potvrdená nebola. Značné rozdiely vo výskyte EBV vo vzokách OSCC jednotlivých štúdií svedčia snáď skôr o pridruženom- sekundárnom

výskytu tohto vírusu následkom celkovej imunodepresie, než o priamom etiologickom vzťahu (Cruz et al. 1997; Sand et al. 2002; Anwar et al. 2005). Medzi ďalšie vírusy, ktoré môžu v onkogenéze HNSCC zohrávať svoju úlohu, patrí *herpes simplex vírus (HSV)*. Výskum na zvieratách potvrdil, že HSV môže pôsobiť ako kokancerogén pri súčasnej expozícii tabaku a iným chemickým kancerogénom (Larsson et al. 1989). Navyše, aktívna imunizácia proti HSV viedla u škrečkov k inhibícii kokancerogénneho efektu HSV, ktorý bol navodený spolupôsobením dimetylbenzantracénu (Park et al. 1990). Rovnako jedinci, ktorí sú infikovaní *vírusom ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV)*, vykazujú vyšší výskyt nádorových ochorení dutiny ústnej. Zdá sa, že táto predispozícia k nádorovým ochoreniam nesúvisí len so znížením imunity organizmu, ale že sa tu taktiež môže uplatňovať priama interakcia vírusov HIV a HPV. Bolo zistené, že "HIV-1 Transaktivátor proteín", u ktorého sa predpokladajú onkogénne vlastnosti, zvyšuje expresiu HPV-16 E6 a E7 onkogénov v ľudských ústnych keratinocytoch obsahujúcich HPV 16 a taktiež zvyšuje proliferáciu buniek *in vitro* (Kim et al. 2008; Flaitz et al. 1995).

### 1.2.5.3. Orálna kandidóza

Jedná sa o infekčné zápalové postihnutie ústnej sliznice, ktoré najčastejšie vyvoláva saprofyt dutiny ústnej *Candida albicans*. Ochorenie vzniká na základe celej rady predisponujúcich faktorov, ktorých spoločným menovateľom je alterácia imunitného systému organizmu. Najčastejšie predisponujúce faktory popisuje tab. 3.

Orálna kandidóza sa v dutine ústnej vyskytuje vo viacerých klinicky odlišných formách. Jedná sa o akútnu pseudomembranóznu, akútnu erytematóznu, chronickú pseudomembranóznu, chronickú hyperplastickú, chronickú erytematóznu (atrofickú) a angulárnu kandidózu (Wotke 2001). Určité druhy mikroorganizmov nachádzajúcich sa v ústnej dutine (viridujúce streptokoky, kandidy) disponujú alkoholdehydrogenázou, enzýmom metabolizujúcim nekancerogénny etanol na kancerogénny acetaldehyd (pozn. niektoré samotné alkoholické nápoje už acetaldehyd obsahujú). Etanol je detekovateľný v prostredí dutiny ústnej ešte hodiny po konzumácii alkoholu. U pacientov, ktorí vykazujú malhygienu dutiny ústnej boli zistené vyššie koncentrácie acetaldehydu v slinách v porovnaní s pacientami s vyššou úrovňou ústnej hygieny (Meurman & Uittamo 2008; Poschl & Seitz 2004). Nieminen et al. popisujú u druhu *Candida glabrata* schopnosť produkovať acetaldehyd taktiež cestou fermentácie glukózy (Nieminen et al. 2009).

Tieto zistenia jasne definujú najrizikovejšiu skupinu z hľadiska možného vzniku OSCC. Jedná sa najmä o fajčiarov s kladným vzťahom k alkoholu a problematickou hygienou dutiny ústnej.

**Tab. 3:** Načastejšie predisponujúce faktory vedúce k postihnutiu ústnej sliznice kandidózou (Wotke 2001)..

<b>Traumatizácia</b>	chemické poškodenie sliznice
<b>Endokrinné poruchy</b>	diabetes mellitus
<b>Poruchy výživy</b>	malnutričný syndróm, malabsorbčný syndróm
<b>Poruchy krvotvorby</b>	agranulocytóza, aplastická anémia, leukémia
<b>Pooperačné stavy</b>	rozsiahle chirurgické zákroky dutiny brušnej
<b>Medikamentózna liečba</b>	širokospektré antibiotika, imunosupresíva, cytostatika
<b>Hormonálne zmeny</b>	gravidita

### 1.2.6. Orálna submukózna fibróza (OSF)

Jedná sa o chronické ochorenie ústnej sliznice charakterizované prítomnosťou zápalu a progresívnej fibrotizácie submukózneho väziva, ktoré vedie k strate elasticity, stuhnutiu sliznice a k následnému obmedzeniu otvárania úst. Aj keď sa ochorenie môže prejaviť v ktorejkoľvek časti ústnej dutiny, najčastejšie postihnutým miestom bývajú líca, pery a jazyk (Pindborg et al. 1968; WHO Meeting report 1984). Ochorenie sa najčastejšie vyskytuje v Indii a krajinách juhovýchodnej Ázie. Zvýšený výskyt bol rovnako pozorovaný aj v krajinách, ktoré vykazujú zvýšený počet ázijských imigrantov (Tang et al. 1997; Shah et al. 2001). Prevalencia OSF sa v inidickej populácii pohybuje od 0,2 do 1,2 % (Babu et al. 1996). Klinicky sa prejavuje ako matné, mramorové zblednutie ústnej sliznice (obr. 6). V počiatočných štádiách sa sa môžu na sliznici úst objaviť erytematózne ložiská, vezikuly,



pigmentácie, či petéchie. V pokročilejších štádiách je možné v submukóze palpačne zistiť fibrózne pruhy, najmä v oblasti líc a komisúry pier (International Agency for Research on Cancer).

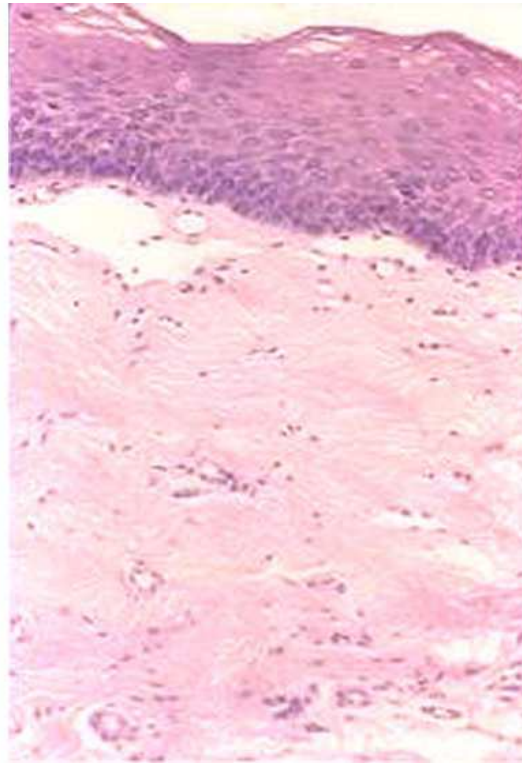


**Obr. 6:** Orálna submukózna fibróza. Difúzne zblednutie bukálnej sliznice a retromolárovej oblasti s tabakovými pigmentáciami zubov a jazyka (International Agency for Research on Cancer).

Subjektívne sa OSF prejavuje pálením ústnej sliznice, ktoré sa zhoršuje po príjme korenených jedál. V počiatočných štádiách ochorenia býva prítomná zvýšená salivácia, pričom v pokročilejšom štádiu dochádza k zníženiu produkcie slín s rozvojom xerostómie a intolerancie pikantných jedál. S rozvojom ochorenia dochádza k zníženiu elasticity sliznice a k obmedzenému otváraniu úst. Pokiaľ ochorenie postihuje jazyk, farynx, či oesophagus bývajú prítomné problémy s rečou a prehĺtaním.

V súčasnosti je všeobecne akceptovaný názor, že v etiológii tohto ochorenia zohráva kľúčovú úlohu žuvanie semien Palmy arekovej, buď samotných alebo ako súčasť betelovej zmesi (Babu et al. 1996; Thomas et al. 2003; Jacob et al. 2004; Tilakaratne et al. 2006). Medzi ďalšie faktory, ktoré môžu mať súvis s OSF patrí účinok kapsaicínu prítomného v chili papričkách a deficit zinku, železa, či iných vitamínov. V patogenéze ochorenia sa uplatňujú zložky semien Palmy arekovej, ktoré spôsobujú stimuláciu produkcie kolagénnych vlákien a taktiež ich robia menej vnímavé ku kolagenáze (Tilakaratne et al. 2006; Liao et al. 2001; Harvey et al. 1986). Taktiež sa predpokladá, že tieto zložky ovplyvňujú vo fibroblastoch

génovú expresiu, ktorá vedie k tvorbe väčšieho množstva kolagénu (Meghji et al. 1987). Bolo zistené, že semená Palmy arekovej obsahujú vysoký podiel medi a ich žuvanie po dobu 5-30 minút zvyšuje jej koncentráciu v slinách. To podporuje hypotézu, podľa ktorej meď pôsobí ako iniciálny faktor pri vzniku OSF a to stimuláciou fibrogenézy prostredníctvom zvýšenia aktivity lyzyl-oxidázy (Tilakaratne et al. 2006; Trivedy et al. 2000). Už spomínaný deficit železa, vitamínu B a celková malnutricia ovplyvňujú reparačné procesy chronicky zapálenej ústnej sliznice v zmysle defektného hojenia (Aziz 1997). Atrofická ústna sliznica je náchylnejšia k účinkom zložiek semien Palmy arekovej a alkoholu. U pacientov s OSF boli taktiež zaznamenané zvýšené hladiny prozápalových cytokínov a znížené hladiny antifibrotického interferónu gama (Haque et al. 2000). Chang et al. popísal cytotoxický efekt arekolínu (extrakt zo semien Palmy arekovej) na fibroblastoch pochádzajúcich z bukálnej sliznice, ktoré rovnako vykazovali zvýšenú syntézu kolagénu. Arekolín taktiež významne znižoval aktivitu bunkovej glutathion-S-transferázy a pridanie nikotínu pôsobilo synergisticky na arekolínom indukovanú cytotoxicitu (Chang et al. 2001). Riziko malígneho zvratu môže u pacientov s OSF dosahovať až okolo 7 % (Reichart 2003; Murti et al. 1985). U viac ako jednej štvrtiny pacientov sa vyskytuje taktiež leukoplakia. Klinická diagnostika by mala byť potvrdená biopsiou, ktorá vylúči alebo potvrdí prítomnosť dysplázie či karcinómu. V histopatologickom obraze nachádzame atrofiu epitelu a difúznu hyalinizáciu subepiteliálneho väziva. Ďalej je prítomný intercelulárny edém s prípadnou hyper, para či ortokeratózou. U iniciálnych štádií OSF vidíme epitelovú hyperpláziu, výrazný edém, zhrubnutie kolagénnych vlákien, mierny výskyt veľkých fibroblastov, vazodilatáciu a leukocytárnu infiltráciu. V pokročilých štádiách je prítomná atrofia epitelu, denzné kolagenové pruhy, mohutná subepiteliálna hyalinizácia zasahujúca až do submukózy a znížená vaskularizácia bez prítomnosti edému (obr. 7). V miestach, ktoré boli v habituálnom styku so škodlivinou vidíme chronickú zápalovú infiltráciu malých slinných žliaz a náhradu acinárných štruktúr hyalinizovaným väzivom. Približne v jednej štvrtine prípadov býva prítomný určitý stupeň dysplázie (International Agency for Research on Cancer).



**Obr. 7:** Pokročilá OSF s atrofiou epitelu a subepiteliálnou hyalinizáciou (International Agency for Research on Cancer).

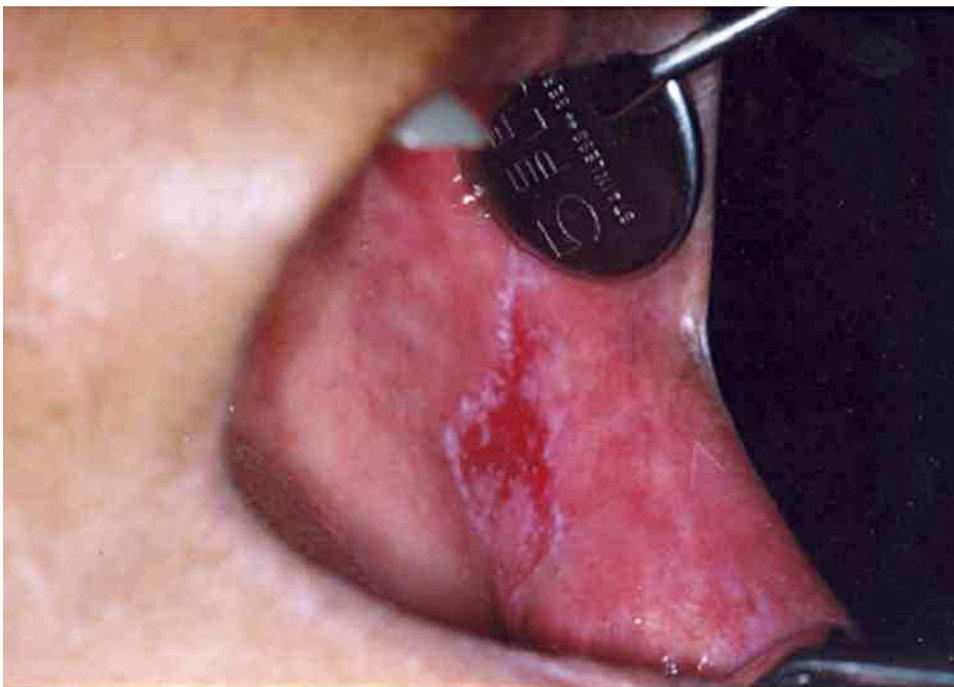
### 1.2.7. Orálny lichen planus (OLP) a orálne lichenoidné lézie (OLL)

OLP je chronické zápalové ochorenie s mikroskopickým obrazom hyperkeratózy, nepravidelnej akantózy, dystrofickými zmenami bazálnej vrstvy a chronickým zápalovým infiltrátom submukózy. Ochorenie má nejasný pôvod, ale je pravdepodobné že vzniká na imunologickom podklade. V patogenéze ochorenia sa uplatňujú cytotoxické T-lymfocyty, ktoré aktivujú apoptózu epitelových buniek vedúcu k chronickému zápalu. Taktiež bola zistená silná asociácia medzi výskytom OLP a hepatitídou C (Lodi et al. 2005; Gandolfo & Carrozzo 2002). U približne 50 % pacientov s kožnou manifestáciou ochorenia je postihnutá aj sliznica dutiny ústnej. K najčastejšie postihnutým oblastiam dutiny ústnej patrí bukálna sliznica, jazyk a gingíva. Prevalencia ochorenia sa pohybuje v rozmedzí 0,5–2,6%. Vzhľadom k rozdielnym klinickým prejavom sa OLP rozdeľuje na formu *retikulárnu*, *erozívnu*, *atrofickú*, *papulóznu*, *plakoidnú* a *bulóznu*. Retikulárna a erozívna forma patria k najčastejšie sa vyskytujúcim typom. Retikulárna forma sa makroskopicky prejavuje jemnými bielymi či šedobelavými papulami vytvárajúcimi sieťovitú kresbu - Wickhamove strie (obr. 8).



**Obr. 8:** Orálny lichen reticularis, prejavujúci sa typickými belavými striami vytvárajúcimi sieťovitú kresbu.

Klinická manifestácia erozívnej formy je charakterizovaná erytémom a bolestivou ulceráciou ohraničenou belavými, radiálne usporiadanými striami (obr. 9).



**Obr. 9:** Erozívna forma lichen planus s červenou plochou ohraničenou belavými Wickhamovými striami (International Agency for Research on Cancer).

Táto forma sa taktiež môže manifestovať ako generalizovaný erytém s ulceráciami gingívy (deskvamatívna gingivitída). K predisponujúcim faktorom vedúcim k exacerbácii OLP patrí stres, potraviny, stomatologické ošetrenie, systémové ochorenia a nedostatočná ústna hygiena. Lokalizáciu výskytu eflorescencií v dutine ústnej s ohľadom na percentuálny výskyt popisuje tab. 4. Malígna transformácia je popisovaná u 2-3 % pacientov s OLP, iní autori dokonca uvádzajú výskyt ešte nižší na úrovni 0,6 – 0,8 % (Eisen 2002; Wotke 2001; Xue et al. 2005). Van der Meij et al. doporučuje sledovať najmä pacientov, ktorí vykazujú lichenoidné lézie dutiny ústnej. Na základe výsledkov ich kohortovej štúdie nebolo u pacientov s diagnózou OLP zistené zvýšené riziko malígneho zvratu, no u pacientov vykazujúcich OLL bolo toto riziko 142-násobne vyššie (van der Meij et al. 2007).

**Tab. 4:** Percentuálny podiel výskytu OLP v závislosti na lokalizácii v dutine ústnej.

Lokalizácia	Výskyt [%]
Bukálna sliznica	80
Jazyk	10
Pery	5

### 1.2.8. Lupus erythematosus

Toto autoimunitné ochorenie neznámej etiológie existuje v dvoch základných formách: *chronickej diskoidnej*, s lokalizovanými prejavmi v orofaciálnej oblasti a *akútnej systémovej*. Ochorenie postihuje predovšetkým ženy stredného veku. Klinické prejavy v dutine ústnej sa vyskytujú približne v 50 % prípadov s predispozičným postihnutím okrajov pier, bukálnej sliznice, jazyka a podnebia. Typická je prítomnosť motýlovitého exantému na tvári s centrálnym výskytom šupín. Neskôr dochádza k ložiskovým hyperpigmentáciám, či depigmentáciám s prípadným výskytom škvrnitých teleangiectázií. Mikroskopický obraz je charakterizovaný hyperkeratózou s centrálnou atrofiou a pseudoepiteliomatóznou hyperpláziou na periférii. Ďalej nachádzame hydropickú degeneráciu bazálnej vrstvy, fibrinoidnú nekrózu najmä subepiteliálneho väziva a lymfoplazmocytárnu infiltráciu

perivaskulárneho charakteru. V zóne bazálnej membrány nachádzame depozity sérových globulínov (najmä IgG protilátok) a zložiek komplementu (Wotke 2001).

Bolo zistené, že jedinci, ktorí sú postihnutí *systémovou formou lupus erytematosus (SLE)* vykazujú zvýšené riziko vzniku rozličných nádorových ochorení. Určité štúdie naznačujú, že pri vzniku nádorového ochorenia môže zohrávať významnú úlohu expozícia imunosupresívnym látkam, aj keď sa zdá, že onkogenézu ovplyvňujú ešte aj iné faktory (Gayed 2009). Taktiež lokalizovaná forma, *chronický diskoidný lupus erytematosus (CDLE)* sa vzhľadom k potenciálne vyššiemu riziku malígneho zvratu považuje za prekanceróznú léziu. Klinické príznaky sú charakterizované bledými keratinizovanými plakmi s vyvýšenými okrajmi, centrálnou atrofiou, radiálne usporiadanými belavými striami a teleangiektáziami. Lézie sú bezbolestné a najčastejšie postihujú bukálnu sliznicu, pery a podnebie (obr. 10).



**Obr. 10:** Diskoidný lupus erytematosus dolnej pery prejavujúci sa centrálnou eróziou obklopenou belavými radiálne usporiadanými striami (International Agency for Research on Cancer).

V literatúre je popísaných niekoľko prípadov výskytu spinocelulárneho karcinómu vychádzajúceho práve z miest postihnutých CDLE (El Euch et al. 2004; Ee et al. 2006; Caruso et al. 1987).

### 1.2.9. Výživa

Vo viacerých epidemiologických štúdiách bol potvrdený význam zdravej výživy v prevencii MNDU (McLaughlin et al. 1988; De Stefani et al. 1999). Pravidelný príjem ovocia a zeleniny vykazuje z hľadiska orálnej kancerogenézy protektívny účinok, zatiaľ čo vysoký prísun mäsitých jedál a jedál s vysokým obsahom chilli korenia sú považované za rizikové faktory.

Deficit železa vedie k epiteliálnej atrofii sliznice dutiny ústnej, ktorá sa taktiež v kombinácii s hypochrómnu anémiou a dysfagiou vyskytuje u *Plummer-Vinsonovho syndrómu* (obr. 11). Tento syndróm sa najčastejšie vyskytuje u žien stredného veku a v dutine ústnej je charakterizovaný atrofiou a rozbrázdnenosťou sliznice jazyka, dutiny ústnej a faryngu.

V ústnych kútikoch bývajú prítomné bolestivé fisúry. Na podklade týchto zmien môže dochádzať k vzniku spinocelulárneho karcinómu a preto sú tieto stavy taktiež považované za prekancerózne (Negri et al. 2000; Wotke 2001; Watts 1961; Larsson et al. 1975).



**Obr. 11:** Sideropenická dysfágia charakterizovaná vyhladenou, atrofickou sliznicou jazyka s rozbrázdneným povrchom (International Agency for Research on Cancer).

### 1.2.10. Rodinná anamnéza a genetická predispozícia

Štúdie prípadov a kontrol potvrdili, že pozitívna rodinná anamnéza karcinómu dutiny ústnej, pharyngu a laryngu je výrazne asociovaná s rizikom vzniku karcinómu v tejto lokalite a to nezávisle na konzumácii alkoholu a fajčení (Garavello et al. 2008). Čo sa týka genetickej

predispozície, bola zistená súvislosť medzi polymorfizmom niektorých génov a rizikom vzniku OSCC.

Metabolizmus alkoholu, hlavného rizikového faktoru OSCC, ovplyvňuje niekoľko enzýmov (alkoholdehydrogenáza, cytochróm P450, acetaldehyddehydrogenáza). Hladina toxického a kancerogénneho acetaldehydu je preto ovplyvňovaná metabolickou aktivitou týchto enzýmov. Určité štúdie zistili súvislosť medzi polymorfizmom génov kódujúcich tieto enzýmy (v súvislosti s ich väčšou či menšou metabolickou aktivitou) a rozdielnym rizikom vzniku OSCC (Marichalar-Mendia et al. 2010; Orywal et al. 2008).

Silná asociácia bola potvrdená medzi zvýšenou expresiou alel **tumor nekrotizujúceho faktoru** (TNF)- alfa A2 a TNF- beta B1 a zvýšeným rizikom OSCC. Tri TNF alfa/TNF beta genotypy (A2A2/B1B1, A1A2/B1B2, A1A2/B1B1) boli najčastejšie prítomné v skupine pacientov s OSCC v porovnaní s kontrolnou skupinou (Yapikakis et al. 2009). Súvislosť bola zistená aj s polymorfizmom ďalších génov, jedná sa napr. o inhibítor cyklin-dependentnej kinázy p21(Waf1/Cip1) či DNA reparačný gén Ku70 (konkrétne Ku70 promotor T-991C). Zistilo sa, že jedinci s genotypom T/C alebo C/C vykazujú 2,15 krát zvýšené riziko vzniku OSCC v porovnaní s genotypom T/T (Bau et al. 2008; Ralhan et al. 2000).

**Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF)** zohráva dôležitú úlohu v procese angiogenézy a vykazuje zvýšenú expresiu u viacerých malignít. Polymorfizmus génu tohto rastového faktoru môže pozmeniť expresiu výsledného proteínu, ktorý môže následne ovplyvňovať riziko vzniku nádorového ochorenia či jeho priebehu.

V nedávnej štúdií bola zistená pozitívna asociácia medzi zvýšeným rizikom vzniku OSCC a prítomnosťou určitého nukleotidu. Detekcia nukleotidového polymorfizmu VEGF (-1154 G/A, +405 G/C, +936 C/T, -2578 C/A and -460 C/T) potvrdila signifikantne častejšiu expresiu nukleotidov +936 a -2578 C/A u osôb s OSCC v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých jedincov (Kammerer et al. 2010).

### 1.3. Prekancerózne lézie

S ohľadom na riziko vzniku OSCC klasifikuje Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) jednotlivé prekancerózy na dve veľké skupiny – **prekancerózne lézie** (leukoplakia, erytroplakia, palatálna keratóza) a **prekancerózne stavy** (orálna submukózna fibróza, aktinická keratóza, orálny lichen planus, diskoidný lupus erytematosus) s nasledujúcou definíciou:



- *prekancerózna lézia* je morfológicky zmenená oblasť tkaniva, v ktorom je vyššia pravdepodobnosť výskytu karcinómu v porovnaní s tkanivom vyzerajúcim normálne
- *prekancerózný stav* je generalizovaný stav, ktorý je spojený so signifikantne vyšším rizikom vzniku karcinómu (World Health Organization 1973).

### 1.3.1 Leukoplakia

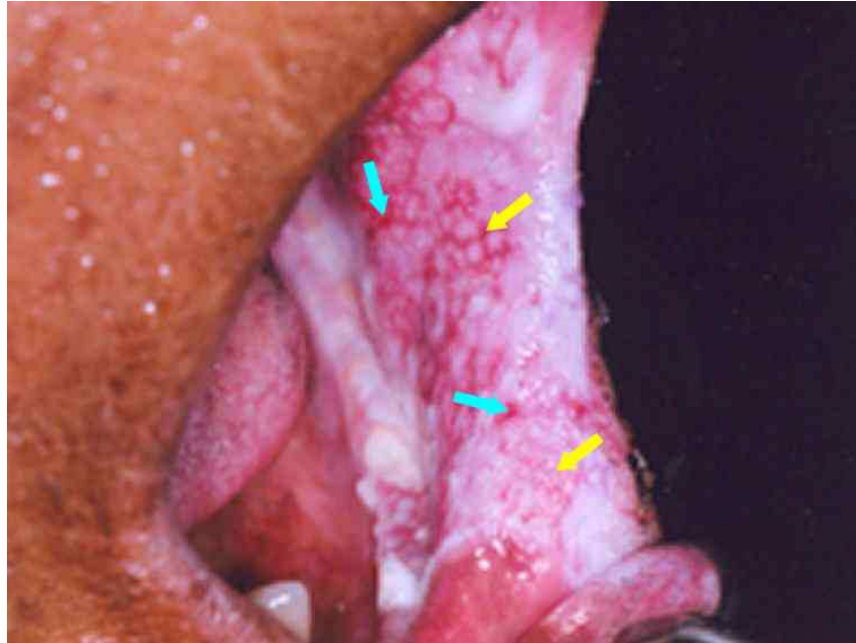
Termín *leukoplakia* prvý krát použil Schwimmer v r. 1877 na popis belavej lézie jazyka, ktorá v tej dobe pravdepodobne predstavovala syfilitickú glositídu (Schwimmer 1877). WHO v r. 1978 definovala leukoplakiu ako „bielu plochu, ktorá nemôže byť klinicky ani histopatologicky klasifikovaná ako iné známe ochorenie“, avšak presné znenie definície je predmetom diskusií a stále podlieha novým úpravám (Kramer et al. 1978). Leukoplakia je termín klinický, ktorý nie je charakterizovaný špecifickým histologickým obrazom, tzn. že môže a nemusí vykazovať známky dysplázie. Podobne dysplázia je termín histopatologický bez špecifického klinického obrazu a tento termín nemôže byť použitý na klinický popis makroskopickej lézie. Rozlišujú sa 2 hlavné typy leukoplakie a to leukoplakia **homogénna** a **nehomogénna**. Rozlíšenie týchto dvoch typov je výhradne klinické, založené na charakteristike povrchu lézie (morfológia, farba, atď.).

*Homogénna leukoplakia* je uniformná, plochá, hladká lézia vykazujúca plytké trhliny povrchového keratínu (obr. 12). Riziko malígneho zvratu je u tohto typu leukoplakie relatívne nízke.



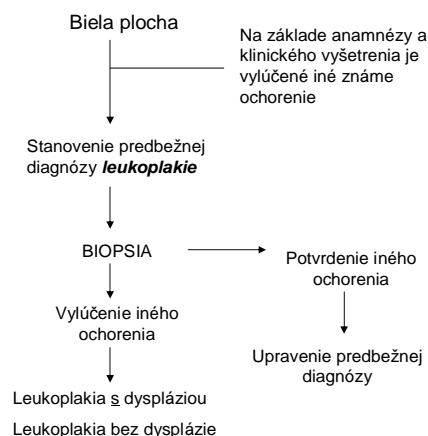
**Obr. 12:** Homogénna leukoplakia bukálnej sliznice.

*Nehomogénna leukoplakia* môže mať charakter bodkovaný, nodulárny alebo verukózný (obr. 13). Dôležité je, že tieto lézie vykazujú omhono vyššie riziko malígneho zvratu v porovnaní s leukoplakiou homogénnou.



**Obr. 13:** Nodulárna leukoplakia bukálnej sliznice. Prítomné sú biele noduly (žlté šípky) na červenom pozadí (modré šípky) (International Agency for Research on Cancer).

Postup pri diferenciálnej diagnostike leukoplakie znázorňuje obr. 14 a tab. 5 (Warnakulasuriya et al. 2007).



**Obr. 14:** Postup pri diferenciálnej diagnostike leukoplakie.

**Tab. 5:** Diferenciálna diagnostika leukoplakie.

Ochorenie	Diagnostické znaky	Biopsia
Naevus spongiosus albus	Prítomné v časnom veku, rodinná anamnéza, zahŕňa rozsiahle oblasti, môže byť postihnuté sliznice genitálu	Nie je indikovaná
Frikčná keratóza (obr. 15)	Zjavná etiologická príčina, po odstránení príčiny väčšinou reverzibilná	Biopsia indikovaná v prípadoch, keď aj po odstránení príčiny lézia perzistuje (najmä u fajčiarov)
Morsicatio buccarum (obr. 16)	Habituálne ohryzanie líc alebo pier, nepravidelné belavé šupinky s vrúbkovaným okrajom	Nie je indikovaná
Chemické poleptanie (obr. 17)	Známa príčina v anamnéze, lokalizácia lézie v mieste poleptania, bolestivosť	Nie je indikovaná
Akútna pseudomembranózna kandidóza	Možnosť odtrhnutia membrány zanechávajúce živo červený krvácajúci povrch	Ster na kultiváciu
Leukoedema (obr. 18, 19)	Obojstranný výskyt na bukálnej sliznici, charakteristické je vymiznutie pri napnutí sliznice	Nie je indikovaná
Orálny lichen planus (plakoidná forma)	Prítomné ďalšie známky lichenu (belavé strie)	Biopsia potvrdí diagnózu
Lichenoidná reakcia (obr. 20)	Pozitívna farmakologická anamnéza, často v tesnej blízkosti amalgámovej výplne	Biopsia zhodná s lichenom alebo lichenoidnou reakciou
Diskoidný lupus erytematosus	Ohraničená lézia s centrálnym erytémom a radiálne usporiadanými belavými striami	Biopsia v kombinácii s imunofluorescenciou potvrdí diagnózu
Hairy leukoplakia	Bilaterálna keratóza jazyka	Špecifický histopatologický obraz s koilocytózou, prítomnosť EBV
Palatálna keratóza	Fajčenie v anamnéze, šedobiele sfarbenie podnebia	Nie je indikovaná



**Obr. 15:** Biela plocha v mieste chýbajúceho zuba, podmienená chronickou traumatizáciou sliznice pri mastikácii.



**Obr. 16:** Morsicatio buccarum.



**Obr. 17:** Chemické poleptanie sliznice alkoholovým prípravkom.



**Obr. 18:** Leukoedema charakterizovaná belavým opalescentným vzhľadom sliznice a jemne vrásčitým povrchom. Jedná sa o anatomicke variáciu, ktorej klinický vzhľad je spôsobený zhrubnutím epitelu a intracelulárnym edémom stratum spinosum.



**Obr. 19:** Leukoedema. Charakteristickým diferenciálne diagnostickým znakom je vymiznutie belavého vzhľadu po napnutí sliznice.



**Obr. 20:** Lichenoidná reakcia ako prejav alergie na dentálne materiály.

Najčastejší výskyt leukoplakie je v strednom a vyššom veku s častejším zastúpením u mužov. Aj keď je výskyt leukoplakie u mužov do 30 rokov pod hodnotou jedného percenta, muži nad 70 rokov už vykazujú prevalenciu okolo 8 %. U žien, ktoré dosiahli vekovú hranicu 70 rokov sa pohybuje prevalencia okolo 2 % (Bouquot & Gorlin 1986). Rozsiahla retrospektívna štúdia

skúmajúca viac ako 3200 biopsií leukoplakií zistila, že 19,9 % leukoplakií vykazuje určitý stupeň epitelovej dysplázie. Z toho v 3,1 % prípadov bol potvrdený spinocelulárny karcinóm, v 4,6 % bola prítomná ťažká dysplázia alebo carcinoma in situ a v 12,2 % sa vyskytovala mierna až stredná epitelová dysplázia (Waldron & Shafer 1975). Leukoplakia prítomná na spodine dutiny ústnej je spojená s najvyšším rizikom prítomnosti epitelovej dysplázie alebo malignity (42,9 % leukoplakií). Nasleduje jazyk a pery (24,2 % a 24,0 % leukoplakií) (Waldron & Shafer 1975).

Vo všeobecnosti platí, že leukoplakia s hrubším profilom vykazuje vyššiu pravdepodobnosť výskytu dysplastických zmien. Preto je u verukózne leukoplakie viac pravdepodobné, že bude vykazovať dysplastické zmeny v porovnaní s plochou homogénnou leukoplakiou (Bouquot & Whitaker 1994). V súčasnosti, aj napriek rôznym molekulárne-biologickým a imunohistochemickým technikám, k najdôležitejším prognostickým faktorom leukoplakie patrí klinický vzhľad (homogénna vs. nehomogénna leukoplakia) a histopatologicky potvrdená absencia či prítomnosť dysplázie. Silverman et al. popisuje vo svojej štúdií malígnu transformáciu homogénnej leukoplakie v 6,5 %. No už v prípade bodkovanej (speckled) leukoplakie bola malígna transformácia prítomná až v 23,4 % (Silverman et al. 1984). Silverman a Gorsky zistili, že v skupine 54 pacientov s proliferatívnou verukóznou leukoplakiou sa následne vyvinul spinocelulárny karcinóm v 70,3 % (obr. 21) (Silverman & Gorsky 1997).



**Obr. 21:** Proliferatívna verukózna leukoplakia (International Agency for Research on Cancer).

Staršie literárne zdroje uvádzajú riziko malígnej transformácie orálnej leukoplakie v rozsahu 3,6–6,0 %, avšak výsledky novších štúdií zistili značne vyššie hodnoty v rozsahu 8,9 – 17,5 % (Bouquot & Whitaker 1994; Silverman et al. 1984; Lind 1987). Leukoplakie, ktoré navyše obsahujú červenú komponentu (nodulárna leukoplakia alebo erytroleukoplakia) predstavujú najvyššie riziko výskytu epitelovej dysplázie či karcinómu. Pindborg et al. popisuje výskyt karcinómu v 14 % a výskyt epitelovej dysplázie v 51 % prípadov takýchto lézií (Pindborg et al. 1963). V tejto súvislosti je nutné podotknúť, že dostatočnú pozornosť je potrebné venovať každej suspektnej lézii, nakoľko výskyt dysplastických či dokonca maligných zmien bol popísaný aj v malých a nenápadných léziách (Waldron & Shafer 1975; Silverman 1968).

### 1.3.2. Erytroplakia

Termín *erythroplasia* bol prvý krát použitý Queyratom na popis červenej, prekanceróznej lézie penisu (Queyrat 1911).

Termín *erythroplakia* sa používa na popis klinicky a histopatologicky podobnej lézie, ktorá sa vyskytuje na ústnej sliznici. Podobne ako u leukoplakie, sa aj u erytroplakie jedná o termín klinický, ktorý charakterizuje červenú slizničnú plochu, ktorú nemožno zaradiť klinicky ani histopatologicky pod iné známe ochorenie (obr. 22) (Kramer et al. 1978).



**Obr. 22:** Erytroplakia bukálnej sliznice, distálne výskyt leukoplakie (International Agency for Research on Cancer).



Pod tento termín nepatria ani rôzne zápalové stavy, ktoré môžu vyústiť v podobný klinický obraz. Orálna erytroplakia sa najčastejšie vyskytuje u starších jedincov v podobe červenej lézie s hladkým, zamatovým alebo granulovaným povrchom. Tieto lézie často vykazujú dobrú marginálnu ohraničenosť, ale u niektorých sa môže objaviť taktiež postupný prechod do okolitej sliznice. Ako už bolo spomenuté, niektoré lézie môžu byť kombinované s bielymi slizničnými plochami (erytroleukoplakia). Aj keď erytroplakia býva často asymptomatická, u niektorých pacientov sa môžu objaviť pocity pálenia a bolesti (Neville & Day 2002). Červený vzhľad lézie je podmienený prítomnosťou atrofického epitelu s prominujúcou subepiteliálnou vaskularizáciou a hyperémiou (International Agency for Research on Cancer). Shafer a Waldron vo svojej štúdii analyzovali biopsie 65 vzoriek erytroplakií. V študovanom súbore vykazovali všetky lézie určitý stupeň dysplázie, v 51 % prípadov sa nachádzal invazívny spinocelulárny karcinóm a v 40 % prípadov ťažká epitelová dysplázia alebo carcinoma in situ a v ostávajúcich 9 % sa jednalo o miernu až strednú dyspláziu (Shafer & Waldron 1975). Na základe týchto faktov je zrejmé, že u erytroplakie sa jedná o omnoho závažnejšie postihnutie ústnej sliznice v porovnaní s leukoplakiou (Mashberg & Samit 1995). Nakoľko tieto pravidlá platia aj v prípade erytroleukoplakií, je nutné v prípade indikovanej biopsie zvoliť miesto odberu tak, aby sa v ňom nachádzala hlavne červená komponenta lézie (Neville & Day 2002).

### **1.3.3. Palatálna keratóza**

Jedná sa o ochorenie vyskytujúce sa u populácií (najmä juhovýchodná Ázia, južná Amerika), ktoré praktikuju tzv. reverzné fajčenie (t.j. fajčenie cigár alebo cigariet otočených zapáleným koncom do dutiny ústnej). Tento spôsob fajčenia vedie k ťažkej tepelnej alterácii podnebnéj sliznice s pestrým klinickým obrazom a s možnosťou výskytu bielych, červených alebo kombinovaných (bielo-červených) lézií (obr. 23) (Gupta et al. 1980). Na povrchu sú často prítomné vyvýšené papulky s červeným stredom, ktoré predstavujú zapálené vývody malých slinných žliaz (Neville & Day 2002). Z prognostického hľadiska je dôležité, že prítomnosť palatálnej keratózy je spojená s významným rizikom malígnej transformácie (Pindborg et al. 1971; Ortiz et al. 1996).



**Obr. 23:** Palatálna keratóza ako následok reverzného fajčenia (International Agency for Research on Cancer).

## 1.4. Spinocelulárny karcinóm dutiny ústnej

### 1.4.1. Klinický obraz spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej

Karcinómy ústnej dutiny zahŕňajú nádory ústnej spodiny, jazyka, alveolárnych výbežkov sánky a čeľuste, sliznice líca a tvrdého podnebia. Jednotlivé predilekčné lokalizácie výskytu slizničných karcinómov dutiny ústnej a orofaryngu aj s percentuálnym zastúpením zobrazuje tab. 6 (Pazdera 2007).

**Tab. 6:** Predilekčné lokalizácie výskytu slizničných karcinómov dutiny ústnej a orofaryngu

Spodina dutiny ústnej	29 %
Jazyk	28 %
Orofarynx	19 %
Retromolárová oblasť	9 %
Podnebie	4 %
Bukálna sliznica	3 %
Alveol sánky	3 %
Alveol čeľuste	2 %

Typický klinický obraz začínajúceho karcinómu je charakterizovaný výskytom asymptomatického vředu pretrvávajúceho viac ako 2-3 týždne. Jedná sa o začervenanú, vyvýšenú léziu s infiltráciou spodiny, navalitymi okrajmi a občasným krvácaním. Subjektívne ťažkosti závisia od lokalizácie a rozsahu ochorenia, pričom najčastejšie sa vyskytuje pocit cudzieho telesa v ústach, obmedzená pohyblivosť postihnutej oblasti, poruchy artikulácie, mastikácie (čel'ustná kontraktúra), fonácie. Objavuje sa foetor ex ore, chronická purulentná sekrécia, krvácanie a v pokročilých štádiách bolesť zapríčinená iritáciou nervus trigeminus (Poruban & Bolješíková 2003).

## **1.4.2. Anatomické lokalizácie výskytu OSCC v dutine ústnej**

### **1.4.2.1. Spinocelulárny karcinóm bukálnej sliznice**

Karcinóm v tejto anatomickej oblasti vzniká najčastejšie na podklade leukoplakie s predilekčným výskytom v úrovni okluzálnej línie od komisúry pier až po retromolárovú oblasť. Spočiatku je nádor nebolestivý, v štádiu exulcerácie vyvoláva bolesti dráždivá strava, prípadne tabakový dym (Mazánek 1997). Tumor rastie exofyticky (verukózna forma) alebo infiltruje mäkké tkanivá (ulcerózna forma). Vyvolávajúcim momentom je väčšinou kombinácia chronickej okluzálnej traumatizácie s následnou sekundárnou infekciou a nepriaznivých účinkov fajčenia, či abúzu alkoholu. Liečba bukálnych karcinómov je spravidla kombinovaná, u pokročilých tumorov je nutné odstrániť líce v celej hrúbke a defekt rekonštruovať vhodnou lalokovou plastikou (Pazdera 2007).

### **1.4.2.2. Spinocelulárny karcinóm jazyka**

Karcinóm jazyka má medzi anatomickými lokalitami orofaciálnych karcinómov najzávažnejšiu prognózu. Karcinóm jazyka sa spravidla manifestuje ako vred s infiltráciou spodiny a navalitymi okrajmi. Menej častý je endofytický rast tumoru s infiltráciou spodiny. Najčastejší výskyt karcinómov jazyka je v strednej tretine jeho okraja. Táto skutočnosť je pravdepodobne daná tým, že jazyk je v tejto oblasti najčastejšie traumatizovaný ostrými okrajmi zubov alebo chybné zhotovenými fixnými alebo snímacími zubnými náhradami. Marginálna časť jazyka je taktiež častým sídlom leukoplakií, ktoré sú cca v 20 % prípadov príčinou vzniku karcinómu. V etiológii zohráva svoju úlohu fajčenie, abúzus destilátov, dráždiaca strava a malhygiena dutiny ústnej. Ďalšou anatomickou lokalizáciou karcinómu jazyka je jeho spodina, z ktorej sa nádor šíri až na alveolárny výbežok sánky. Klinický obraz

býva charakterizovaný obmedzenou pohyblivosťou jazyka so zmnoženým povlakom, bolesť, ktorá môže mať charakter neuralgie III. vetvy trigeminu a ktorá sa stupňuje pri jedle a prehltaní. Terapia závisí na štádiu nádorovej choroby. V prvom a druhom štádiu je na prvom mieste chirurgické odstránenie nádoru doplnené exstirpáciou regionálnych lymfatických uzlín. Chirurgické odstránenie karcinómu jazyka s propagáciou do orofaryngu niekedy vyžaduje čiastočnú resekciu mandibuly v oblasti uhlu a vetvy. Po zhojení operačnej rany nasleduje zaisťovacia rádioterapia (Pazdera 2007; Mazánek 1997).

#### **1.4.2.3. Spinocelulárny karcinóm ústnej spodiny**

Karcinóm ústnej spodiny vzniká často na podklade leukoplakie, pričom predilekčnou lokalizáciou sú frontálne partie ústnej spodiny. Klinická manifestácia je charakterizovaná prítomnosťou vredu s infiltrovanou spodinou. Nádor má tendenciu k rýchlemu šíreniu do tkanív jazyka, čo spôsobuje jeho bolesť, obmedzenú pohyblivosť a poruchy výslovnosti. Terapia spočíva v chirurgickom odstránení tumoru a regionálnych uzlín, v pokročilých prípadoch doplnená o parciálnu resekciu sánky (Pazdera 2007).

#### **1.4.2.4. Spinocelulárny karcinóm alveolárneho výbežku mandibuly**

Najčastejší výskyt karcinómu alveolárneho výbežku je oblasť dolných premolárov a molárov. Klinické príznaky sú v počiatocnom štádiu charakterizované prítomnosťou povrchnej ulcerácie slizničného krytu alveolárneho výbežku. Manifestácii tumoru môže predchádzať extrakcia zuba s následnou poruchou hojenia, prípadne sa môžu objaviť problémy s retenciou snímateľnej náhrady.

Liečba je prevážne chirurgická spojená s resekciou alveolárneho výbežku, prípadne až s parciálnou resekciou mandibuly a exenteráciou regionálnych lymfatických uzlín (Pazdera 2007).

#### **1.4.2.5. Spinocelulárny karcinóm alveolárneho výbežku maxilly**

Endofyticky rastúci karcinóm sa vo svojom počiatocnom štádiu prejavuje ako plytká, nebolestivá slizničná lézia s belavo povleklou spodinou. V ďalšom štádiu, ktorý býva väčšinou sprevádzaný veľmi rýchlym rastom sú už okraje vredu tuhé a navalitité. Objavuje sa spontánna aj dotyková bolestivosť. Pre exofytickú formu sú charakteristické prominujúce útvary, veľmi často zrnitého povrchu podobného nešpecifickému granulačnému tkanivu, ktoré majú rúžovú až belavo šedú farbu. Zuby sa v mieste rastu nádoru uvoľňujú, objavujú sa

bolesti pulpitického charakteru. Pri nerozpoznanom ochorení sa zuby často extrahujú, pričom subjektívne problémy pretrvávajú (Mazánek 1997).

#### 1.4.2.6. Spinocelulárny karcinóm podnebia

Vzniká spravidla na podklade leukoplakie, hyperkeratózy, prípadne slizničných papilómov. Subjektívne sú prítomné nepríjemné pocity až bolesti prítomné pri prijímaní potravy a pri prehĺtaní. Tumory v tejto oblasti rastú väčšinou endofyticky. Prvými príznakmi môžu byť u bezzubých pacientov problémy s retenciou snímateľnej náhrady v dôsledku deformácie protézneho lôžka.

Terapia spočíva v exstirpácii tumoru s resekciou kostného podkladu a zaist'ovacej rádioterapii (Pazdera 2007; Mazánek 1997).

#### 1.4.3. Diagnostika a histopatologický obraz spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej

Diagnózu slizničných karcinómov ústnej dutiny stanovíme na základe klinického a histopatologického vyšetrenia (najčastejšie odber tkaniva diagnostickou excíziou).

V histologickom obraze je pre diagnózu dôležitá tvorba keratínu alebo aspoň nález intercelulárnych mostíkov. Histologický nález v súvislosti so stupňom diferenciácie tumoru je znázornený v tab. 7 (Wotke 2001).

**Tab. 7:** Histologický obraz pri jednotlivých stupňoch diferenciácie tumoru

1. stupeň - dobre diferencovaný karcinóm	početné rohové perly, masívna keratinizácia so zreteľnou tvorbou medzibunkových mostíkov, minimálna bunková a jadrová polymorfia, malý počet mitóz (menej ako 2 na zorné pole)
2. stupeň – stredne diferencovaný karcinóm	menej zreteľná keratinizácia (monocelulárna keratinizácia) s občasou prítomnosťou rohových perál, prítomnosť medzibunkových mostíkov, značná bunková a jadrová polymorfia, 2-4 mitózy na zorné pole
3. stupeň – nízko diferencovaný karcinóm	absencia keratinizácie aj medzibunkových mostíkov, zreteľná bunková a jadrová polymorfia, viac ako 4 mitózy v zornom poli (z toho mnohé atypické), prítomnosť početných obrovských viacjadrových buniek

Na stanovenie štádia ochorenia sa okrem klinického vyšetrenia používa RTG vyšetrenie, sialografia, ultrasonografia, počítačová tomografia, magnetická rezonancia, prípadne pozitronová emisná tomografia.

#### **1.4.4. Liečba spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej**

Najdôležitejšou súčasťou komplexnej liečby karcinómov dutiny ústnej je chirurgické odstránenie tumoru s prípadnou exenteráciou regionálnych lymfatických uzlín (krčná disekcia). Nasleduje rádioterapia, ktorá býva zaradená do komplexnej liečby spravidla v pooperačnom období s cieľom minimalizovať riziko reziduálnej nádorovej choroby (zaistovacia rádioterapia). Mechanizmus účinku spočíva v letálnom poškodení DNA nádorových buniek a následnej bunkovej smrti.

Ďalšou liečebnou modalitou je chemoterapia, ktorá má pri liečbe slizničných karcinómov dutiny ústnej spravidla len doplnkový význam. Býva zaradená buď na úvod komplexnej liečby (neoadjuvantná chemoterapia) s cieľom zmenšiť objem tumoru a tým uľahčiť jeho chirurgické odstránenie alebo na jej záver k potenciácii účinkov rádioterapie ako tzv. simultánna chemorádioterapia. Chemoterapia v nižších dávkach má prevažne rádiosenzibilizujúci účinok, pri vyšších dávkach sa uplatňuje aj samotný cytotoxický efekt. Pri liečbe nádorov v orofaciálnej oblasti je možné využiť taktiež regionálnu intraarteriálnu chemoterapiu, pri ktorej sa cytostatikum aplikuje priamo do artérie zásobujúcej oblasť výskytu nádoru (arteria carotis externa). Výhoda tohto postupu spočíva v možnosti aplikovať do nádorového tkaniva vyššiu koncentráciu cytostatika s celkovo nižšou terapeutickou dávkou pre organizmus (obmedzenie rozsahu a intenzity nežiadúcich účinkov liečby) (Pazdera 2007; Poruban & Bolješiková 2003).

### **1.5. Kmeňové bunky**

#### **1.5.1. Kmeňové bunky v embryonálnom a fetálnom období**

Jednobunková zygota je v podstate prvá kmeňová bunka, ktorá na základe svojej totipotencie disponuje schopnosťou vytvoriť celý organizmus (Ralston & Rossant 2005). V priebehu ďalšieho embryonálneho vývoja dochádza k zníženiu regeneračného potenciálu a k následnej strate totipotencie. Tento postupne znižujúci sa regeneračný gradient je spôsobený jeho distribúciou do jednotlivých pluripotentných kmeňových buniek. Prvá rozpoznaná diferenciácia sa vyskytuje v neskorom štádiu morule, kedy vonkajšia bunková

vrstva nadobudne vlastnosti epitelu a iniciuje formáciu blastocysty, ktorá obsahuje dva bunkové typy *trofoektoderm* a *vnútornú bunkovú masu (inner cell mass, ICM)*. Z trofoektodermy následne vzniká *trofoblast*, zatiaľ čo pluripotentné bunky ICM podstupujú druhú diferenciáciu a formujú *epiblast* a *primitívny endoderm* (Tam & Loebel 2007; Hill 2007). Z epiblastu následne vzniká embryo, zatiaľ čo sa z primitívneho endodermy vyvinie endoderm extraembryonálny, ktorý zabezpečí vyvíjajúcemu sa embryu výživu a následne sa podieľa na vzniku žltkového vaku. Ďalší dôležitý moment v priebehu embryonálnej diferenciácie je *gastrulácia*, kedy je epiblast transformovaný na tri germinálne vrstvy *ektoderm, mesoderm a endoderm*. Nasledujúce obdobie je charakterizované viacerými zmenami, ktorých výsledkom je *organogenéza* založená na prítomnosti špecificky rozmiestnených kmeňových buniek, ktoré spoločne formujú dané orgány. Každá z týchto kmeňových buniek teda napokon podstúpi svoj naprogramovaný proces bunkového delenia, migrácie či apoptózy, aby daný orgán vznikol a to na svojom špecifickom mieste s ohľadom na ostatné embryonálne tkanivá a orgány (Bapat 2009).

### **1.5.2. Kmeňové bunky v dospelom organizme**

Jedna z najdôležitejších funkcií kmeňových buniek v postembryonálnom období je reparaovať a kompenzovať straty poškodených tkanív v organizme, pričom tento dynamický proces trvá počas celého života. Účinné udržanie zdravej populácie kmeňových buniek v príslušnom tkanive zahŕňa súbežnú činnosť viacerých genetických a epigenetických faktorov spolu s prísnu kontrolou, ktorá vytvára dokonalú rovnováhu medzi rozdielnymi bunkami viacerých orgánových systémov (Fuchs & Segre 2000). Dospelé kmeňové bunky teda zohrávajú ústrednú úlohu v udržiavaní homeostázy v príslušnom tkanive a sú charakterizované tromi odlišnými vlastnosťami:

1. Sebaobnova: schopnosť podstúpiť delenie a vytvoriť nové bunky s identickými vlastnosťami ako má bunka materská (McCulloch et al. 1964).
2. Diferenciácia: schopnosť vytvoriť heterogénnu hierarchicky usporiadanú populáciu buniek, ktorá doplní potrebné množstvo krátko žijúcich diferencovaných buniek.
3. Homeostáza: schopnosť regulovať proces diferenciácie a sebaobnovy buniek v orgánovom tkanive.

Schopnosť sebaobnovy zahŕňa asymetrické bunkové delenie na dva bunkové typy s rovnakou distribúciou genetického materiálu medzi dcérske bunky (Blau et al. 2001; Slack 2000).

Jedna z dcérskych buniek sa vráti späť do „hniezda“ kmeňových buniek, kde ostáva v neaktívnom stave až do chvíle, kým nedostane z okolitého mikroprostredia potrebné signály k deleniu. Druhá progenitorová bunka, nazývaná *transit-amplifying (TA) cell* podlieha procesu diferenciácie, čím vzniknú bunky potrebné pre príslušnú regeneráciu tkaniva (Raff 2003). Včlenenie populácie TA buniek do procesu diferenciácie umožňuje tkanivu potrebné bunkové pomnoženie, čím eliminuje nutnosť častého delenia buniek kmeňových, ktoré so sebou nesie riziko mutácií. Tzv. *skoré TA bunky* majú nižší proliferatívny potenciál a podstupujú len zopár bunkových delení, z ktorých niektoré môžu byť ešte asymetrické. Následne vznikajúce tzv. *neskoré TA bunky* podstupujú proces rýchlych bunkových delení, ktoré sú schopné efektívne vytvoriť potrebnú bunkovú masu nevyhnutnú pre ďalšiu diferenciáciu. Tento proces hierarchickej tkanivovej regenerácie zabezpečí kmeňovým bunkám dlhodobú regeneračnú kapacitu (Braun & Watt 2004), zatiaľ čo progenitorové bunky, charakterizované už obmedzenou proliferatívnou aktivitou, zastavia bunkové delenie, pokračujú v diferenciácii na zrelé bunkové typy a nakoniec po splnení svojej úlohy v organizme podstupia proces apoptózy (Bapat 2007). Práve tento popísaný hierarchický proces zaisťuje kmeňovým bunkám potrebnú dlhodobú genetickú stabilitu.

Delenie kmeňových buniek môže ale taktiež prebiehať symetricky, čo v prípade potreby umožní zväčšiť ich podiel v tkanive. Táto potreba sa vyskytuje v určitých obdobiach vývoja alebo pri regenerácii poškodeného tkaniva (Morrison & Kimble 2006). Tak napr. hematopoetické kmeňové bunky vykazujú relatívne vysokú intenzitu delenia kvôli nutnosti produkcie veľkého množstva rozličných krvných buniek potrebných pre ich obnovu. Kmeňové bunky iných tkanív, ako napr. pokožky či sliznice GIT, vykazujú síce pomalšiu, ale trvalú a stabilnú intenzitu delenia. A nakoniec kmeňové bunky orgánu ako je mozog zostávajú väčšinu času v kludovom stave, pričom k ich aktivácii dochádza len pri poškodení tkaniva alebo prostredníctvom hormonálnych zmien. Regulácia kmeňových buniek je teda v dospelom organizme prísne kontrolovaná, aby umožnila doplnenie chýbajúcich buniek, prípadne umožnila reparáciu poškodeného tkaniva. Porucha tohto homeostatického mechanizmu následne vedie k neregulovanému stavu bunkového delenia (Bapat 2009).



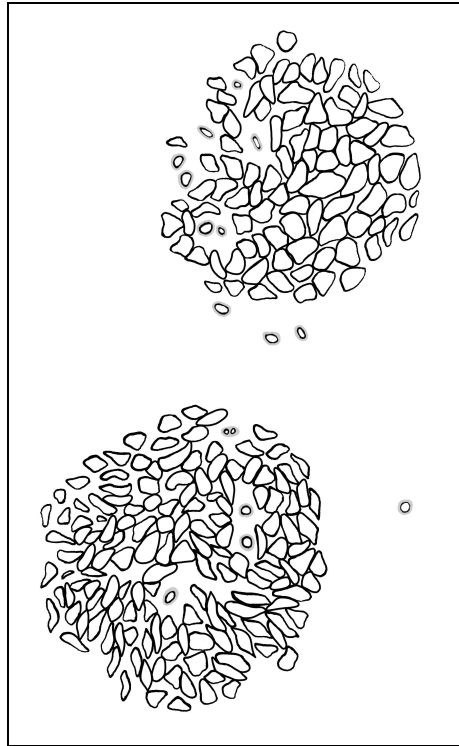
### 1.5.3. Lokalizácia a identifikácia kmeňových buniek epitelu

Vrstva buniek prítomných v *stratum basale*, tesne naliehajúca na bazálnu membránu, obsahuje bunky s vysokou proliferačnou aktivitou, ktoré ale vykazujú pomerne nízko diferencovaný charakter. Pri súčasnom zvyšovaní počtu buniek bazálnej vrstvy delením sa niektoré bunky uvoľnia od bazálnej membrány, postupne sa vzdávajú do vyšších epiteliálnych vrstiev až nakoniec dosiahnu povrchu epitelu (Fuchs & Cleveland 1998). Čo sa týka identifikácie kmeňových buniek, hlavný problém spočíva v tom, že pri mikroskopickom vyšetrení epitelu sa v *stratum basale* nenachádza žiadny morfológicky odlišný región, ktorý by naznačoval možný výskyt kmeňových buniek. Určité štúdie naznačujú, že kmeňové bunky môžu zahŕňať približne 2-7 % z celkového počtu buniek bazálnej vrstvy (Potten et al. 1979). Pri pokuse o identifikáciu bola taktiež použitá metóda využívajúca nukleotidové analógy bromodeoxyuridin a  $^3\text{H}$  thymidin. Princíp tejto metódy je založený na využití typickej vlastnosti kmeňovej bunky, akou je nízka frekvencia bunkového cyklu. Všetky deliace sa bunky inkorporujú do novo syntetizovanej DNA tieto nukleotidové analógy. V konečnom dôsledku, len tie bunky, ktoré sa delia zriedkavo a prebývajú v tkanive po dlhý čas, zadržujú daný nukleotidový analóg. Ukázalo sa, že tieto bunky, nazývané v zahraničnej literatúre „*label-retaining cells*“ (LR bunky) boli lokalizované v *stratum basale* (Bickenbach & Mackenzie 1984; Potten et al. 1974).

### 1.5.4. Morfológické varianty epiteliálnych bunkových klonov

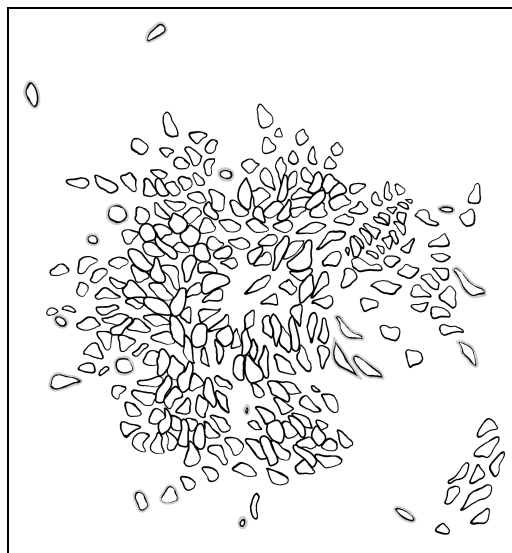
Analýzou rastového potenciálu ľudských epiteliálnych buniek boli odhalené tri rozdielne typy bunkových klonov, líšiacich sa svojou morfológiou (Barrandon & Green 1987). Jedná sa o tzv. ***holoklony, meroklony a paraklony***.

***Holoklony***, pozostávajú z malých, tesne pri sebe lokalizovaných buniek s veľkým proliferačným potenciálom (obr. 24). Takmer všetky tieto bunky (95%) vytvárajú pri pasážovaní ďalšie proliferujúce kolónie (Alonso & Fuchs 2003). Predpokladá sa, že práve tieto bunky zodpovedajú bunkám kmeňovým.



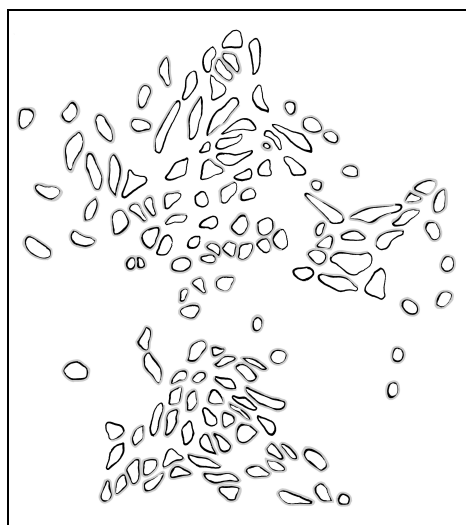
**Obr. 24:** Perokresba znázorňujúca tvar a usporiadanie buniek tvoriacich *holoklony*.

*Meroklony* majú stredný proliferačný potenciál, obsahujú väčšie bunky ako holoklony a nie sú schopné sebaobnovy (obr. 25). Zodpovedajú TA bunkám.



**Obr 25:** Perokresba znázorňujúca tvar a usporiadanie buniek tvoriacich *meroklony*.

**Paraklony** sú tvorené veľkými, ploškými bunkami, vykazujú nízky proliferačný potenciál a považujú sa za bunky diferencované (obr. 26) (Harper et al. 2007).



**Obr. 26:** Perokresba znázorňujúca tvar a usporiadanie buniek tvoriacich *paraklony*.

## 1.6. Nádorové kmeňové bunky

Podobne ako v zdravých tkanivách, je hierarchická bunková heterogenita prítomná aj v maligných nádoroch. Nádorové kmeňové bunky boli identifikované vo viacerých solídnych tumoroch. U karcinomov prsníka, jedine malá subpopulácia buniek s  $CD44^+ CD24^{-/low}$  fenotypom bola schopná vytvárať nové tumory v imunokompromitovaných myšiach a z týchto „tumor-iniciujúcich buniek“ vznikli všetky fenotypovo rozdielne bunky, prítomné v pôvodnom nádore (Al-Hajj et al. 2003). Rovnako v určitých nádoroch CNS jedine bunky exprimujúce CD133 mali sebaobnovujúce a diferenciačné schopnosti (Singh et al. 2004). V súvislosti so spinocelulárnym karcinomom dutiny ústnej (OSCC), boli prezentované výsledky štúdie, v ktorej boli nádorové bunkové línie získané z OSCC inkorporované do diferencovaných tkanivových kultúr, tvorených normálnymi ústnymi epiteliálnymi bunkami. Touto metódou sa podarilo, aj v tomto type nádoru, identifikovať malú skupinu buniek, ktorá vykazovala vlastnosti buniek kmeňových (Mackenzie 2004).

### 1.6.1. Aktivácia nádorových kmeňových buniek

*Tumor supresorové gény* sa uplatňujú pri regulácii bunkového delenia tým, že v prípade abnormálnej proliferácie či poškodenia genetickej informácie zastavia bunkový cyklus. Ich inaktivácia môže mať za následok únik buniek z kontrolných mechanizmov a prevahu faktorov podporujúcich rast a vývoj nádorov (Kolář 2003). Avšak, je nejasné, prečo mutácie génov ako RB a TP53, ktorých produkty sú exprimované v celom organizme majú najčastejšie za následok vznik určitých tkanivovo-špecifických nádorov. Zdá sa, že vplyv tumor supresorových génov môže byť vysvetlený rozdielnym účinkom na kmeňové bunky pochádzajúce z rozdielnych tkanív (Knudson et al. 1973). Navyše onkogénny potenciál rozličných kmeňových buniek môže byť rozdielny, rovnako ako sa genetické či epigenetické faktory odlišujú u jednotlivcov či dokonca v jednotlivých orgánoch toho istého organizmu. Otázkou ostáva, ako vznikajú nádorové kmeňové bunky (CSC) v tkanive. Hypotéz o ich pôvode v tkanive je niekoľko:

- **Transformácia kmeňových buniek** sídliačich v tkanive, ktorá vedie k alterácii proliferácie a diferenciačných vlastností
- **Transformácia tzv. skorých progenitorových buniek**, ktoré znova získajú seba-obnovujúcu schopnosť
- Séria účinných mutácií, ktoré navrátia TA neskorým progenitorom alebo už diferencovaným somatickým bunkám nesmrteľnosť (**dediferenciácia**)
- **Fúzia cirkulujúcich hematopoetických kmeňových buniek s bunkami príslušného tkaniva** (Bapat 2009).

#### 1.6.1.1. Transformácia kmeňových buniek

Vzhľadom k dlhodobému prežívaniu v tkanive môžu byť kmeňové bunky ohrozené viacerými alteráciami, ktoré povedú k vzniku CSC. Prevaha rast-stimulujúcich signálov v *niche* kmeňových buniek nad rast-inhibujúcimi signálmi vedie k následnej aktivácii kmeňových buniek. Takáto aktivácia sa môže objaviť pri hormonálnej stimulácii, rekurentných tkanivových poškodeniach, zápale, radiácii, expozícii chemických nox, infekcií, inaktivácii tumor supresorových génov a/alebo aktivácii onkogénov. Vzniká chronická aktivácia kmeňových buniek, ktorá má za následok ich dlhodobú proliferáciu.

Takto chronicky proliferujúce kmeňové bunky sa stávajú zraniteľnými k prípadným genetickým poškodeniam. Výsledkom takýchto poškodení môže byť vznik autonómneho rastu, strata regulácie bunkového cyklu či rezistencie k apoptóze (Beachy et al. 2004).

### **1.6.1.2. Transformácia skorých progenitorových (TA) buniek**

Nádorové kmeňové bunky nemusia vznikať len z normálnych kmeňových buniek, ale taktiež z tkanivovo špecifických skorých progenitorov (skoré TA bunky). K získaniu vlastností kmeňových buniek je potrebných minimum zmien, nakoľko priamo z týchto buniek vznikajú. Ďalšie mechanizmy vzniku CSC sú identické so zmenami popísanými vyššie (Bapat 2009).

### **1.6.1.3. Dediferenciácia**

Bolo zistené, že tzv. neskoré progenitory (neskoré TA bunky alebo diferencované bunky) môžu taktiež znovu získať vlastnosti buniek kmeňových. Tento fenomén nazývaný dediferenciácia je veľmi dobre popísaný u rastlín a nižších živočíchov. Nedávno, bol tento proces taktiež popísaný u myší, kde transfekcia aktivovaných onkogénov vyvolala transformáciu fibroblastov na bunky, ktoré disponovali vlastnosťami kmeňových buniek (Okita et al. 2007; Wernig et al. 2007; Takahashi & Yamanaka 2006).

### **1.6.1.4. Fúzia hematopoetických kmeňových buniek s bunkami tkaniva**

Zistenie, že fúziou cirkulujúcich hematopoetických kmeňových buniek s diferencovanými tkanivovými bunkami môžu vzniknúť bunky so seba-obnovujúcim potenciálom vedie k ďalším špekuláciám o pôvode nádorových kmeňových buniek (Houghton et al. 2004). Za prvý krok transformácie je považovaná mobilizácia hematopoetických kmeňových buniek a ich inkorporácia do iného tkaniva. Navyše, viaceré nádorové kmeňové bunky exprimujú markery pluripotencie či sebaobnovy typické pre hematopoetické kmeňové bunky. To či sa jedná len o náhodnú expresiu týchto markerov alebo je to výsledok spomínanej fúzie nie je zatiaľ príliš jasné. Nech už je pôvod týchto buniek akýkoľvek, dôležité sú ich vlastnosti charakteristické pre kmeňové bunky (tab. 8) (Bapat 2009).

**Tab. 8:** Charakteristické vlastnosti normálnych a nádorových kmeňových buniek

- Schopnosť asymetrického delenia (sebaobnovy)
- Regulácia sebaobnovy prostredníctvom podobných signálnych dráh (Wnt, Sonic Hedgehog, Notch) a na epigenetickej úrovni prostredníctvom génov polykombovej skupiny (BMI-1 a EZH2)
- Expresia Oct4, Nanog a Sox2 a tiež nodal and cancer testis-specific antigens (CTAs), ktoré podporujú pluripotenciu a nesmrteľnosť daných buniek
- Schopnosť vytvoriť hierarchiu rozdielnych bunkových typov od progenitorových až po diferencované bunky
- Predĺženie telomeráz a zvýšená telomerázová aktivita, ktoré predlžujú bunkovú životnosť
- Expresia ABC transportérov, ktoré prispievajú k bunkovej rezistencii na špecifické rastové inhibítory
- Predispozícia na nezávislosť k rastovým faktorom
- Stimulácia angiogenézy prostredníctvom sekrécie angiopoetických faktorov

### **1.6.2. Izolácia a identifikácia nádorových kmeňových buniek**

Koncept nádorových kmeňových buniek predpokladá, že všetky maligné nádory sú tvorené zmesou sebaobnovujúcich kmeňových buniek, TA progenitorov a diferencovaných buniek. Výzkum na poli biológie kmeňovej bunky, tradične zameraný na hematopoetický systém, objasnil vzťah medzi bunkovou hierarchiou a niektorými špecifickými markermi (Baum et al. 1992; Spangrude et al. 1988). Odhliadnuc od hematopoetického systému, prítomnosť kmeňových buniek bola značne študovaná v tkanivách s vysokou proliferačnou aktivitou (pokožka, GIT či respiračný systém), ale aj v solídnych tkanivách a orgánov s nižšou intenzitou bunkového delenia (Reya et al. 2001; Raff 2003). Prítomné paralely, medzi kmeňovými bunkami zdravých a nádorových tkanív, umožnili aplikovať biologické princípy kmeňových buniek aj na ich malígnych náprotivkov. A to najmä pri ich nožnej identifikácii (Pardal et al. 2003). Špecifická expresia povrchových molekúl (CXCR4, CD133, EPCAM, CD44) normálnymi kmeňovými bunkami poslúžila pri izolácii kmeňových buniek v nádorovej bunkovej mase. V súvislosti so solídnyimi tumormi, Al-Hajj et al. demonštrovali subpopuláciu nádorových buniek karcinómu prsníka, ktoré boli schopné u imunokompromitovaných myší indukovať vznik nádoru (Al-Hajj et al. 2003). Tieto

predpokladané nádorové kmeňové bunky boli imunofenotypizované ako CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> a boli schopné iniciovať vznik nádoru pri ich injikovaní o hustote len 200 buniek v porovnaní s netriedenými nádorovými bunkami pri ktorých bolo k iniciácii tumorigenézy potrebných minimálne 10<sup>6</sup> buniek. U mozgových nádorov boli bunky exprimujúce CD133 schopné taktiež iniciovať u myší tumorigenézu na základe nízkeho počtu buniek (cca 100 buniek) (Singh et al. 2004). Podobne, na základe expresie povrchových markerov, boli izolované a identifikované kmeňové bunky aj u iných nádorov ako napr. u karcinómu prostaty (CD133<sup>+</sup>, β-integrín), pankreasu (CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, ESA<sup>+</sup>) a hepatocelulárneho (CD133<sup>+</sup>) či kolorektálneho karcinómu (EpCAM<sup>high</sup>, CD44<sup>+</sup>) (Collins et al. 2005; Li et al. 2007; Suetsugu et al. 2006; Dalerba et al. 2007). Bolo zistené, že podobne ako epitelové kmeňové bunky produkujú aj malígne bunky *in vitro* rozpoznateľne odlišné kolónie buniek (*holoklony*). Tieto kolónie buniek vykazujú schopnosť sabaobnovy a pri ďalšom delení vytvárajú bunky exprimujúce markery diferencovaných buniek, čo sú vlastnosti typické pre kmeňové bunky. V súvislosti s identifikáciou a izoláciou týchto nádorových buniek bolo zistené, že vykazujú vysoké hodnoty expresie určitých molekúl, ako napr. E-kadherín, β-katenín, CD44 a iné (Harper et al. 2007; Locke et al. 2005; Mackenzie 2006).

## 1.7. Adhezívne molekuly

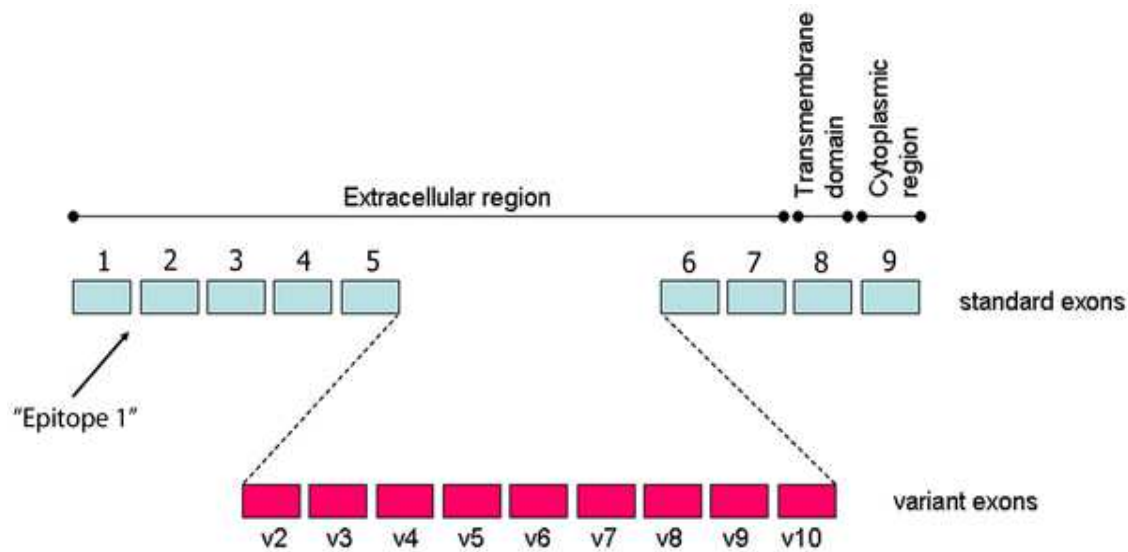
Proteíny súhrnne nazývané adhezívne molekuly sú štruktúry glykoproteínovej povahy exprimované na povrchu buniek. Názov adhezívne molekuly je založený na ich schopnosti pomerne silnej väzby na špecifické ligandy, ktorá zabezpečuje adhéziu medzi bunkami a extracelulárnou matrix ako aj medzi bunkami navzájom. Bolo zistené, že adhezívne molekuly majú taktiež významnú funkciu v procese bunkovej motility, migrácie, diferenciácii či génovej transkripcii (Goodison et al. 1999).

### 1.7.1. CD44

Adhezívne molekuly patriace do skupiny CD44 boli prvýkrát identifikované na lymfocytoch ako molekuly funkčne významné v procese bunkovej adhézie a usídľovaní (homingu) lymfocytov. CD44 proteín je kódovaný génom lokalizovaným na 11. chromozóme v lokuse 11p13 a obsahuje 2 skupiny exónov (Goodfellow et al. 1982).

Prvá skupina je zložená z exónov 1-5 a 16-20, ktoré po spoločnom zostrihu dávajú vzniknúť transkriptu, ktorý kóduje štandardnú izoformu CD44s. Druhá skupina tzv. variabilných exónov (6-15, označovaných tiež ako v1-v10) sa môže po alternatívnom zostrihu inzerovať medzi

štandardné exóny, čím vznikajú variabilné izoformy (obr. 27) (Dougherty et al. 1991; Tolg et al. 1993; Sreaton et al. 1992).



**Obr. 27:** Znáznorňujúci CD44 štandardné a variabilné exóny (Biddle et al. 2013).

Podľa typu zaradeného exónu sú variabilné izoformy označené číslom, napr. CD44v3, CD44v6, atď. (Kuncová et al. 2003). Zmeny štruktúry aj funkcie molekúl CD44 sú významne ovplyvňované posttranslačnými úpravami, predovšetkým N- a O- glykozyláciou, ktorá modifikuje väzbové charakteristiky rôznych CD44 izoforiem (Goodison et al. 1999). CD44s glykoproteín bol pôvodne izolovaný na hematopoetických bunkách, pričom s ďalším výskumom bolo zistené, že sa nachádza na väčšine buniek rôznych tkanív (Trowbridge et al. 1982). Jeho expresia bola zistená na napr. na bunkách CNS, epidermis, pečeni, pľúcach, pankreasu, atď. (Sneath & Mangham 1998; Goodison et al. 1999; Cooper et al. 1992; Fox et al. 1994; Mackay et al. 1994) a taktiež v embryonálnych tkanivách, kde sa účastní procesu organogenézy (Borland et al. 1998). Najvýznamnejším ligandom molekúl CD44 je kyselina hyaluronová (HA), glykosaminoglykan, ktorý je bežne zastúpený v extracelulárnej matrix (Aruffo et al. 1990). Všetky molekuly CD44 obsahujú najmenej 3 väzbové miesta pre hyaluronát, pričom schopnosť buniek viazať hyaluronát je podmienená aj existenciou ďalších mechanizmov. To vysvetľuje skutočnosť, že nie všetky bunky, ktoré exprimujú CD44 sú schopné hyaluronát viazať (Goodison et al. 1999). Ďalšími minoritnými ligandami CD44 sú osteopontín, serglycín, kolagén, fibronektín a laminín (Weber et al. 1996; Faassen et al. 1992; Jalkanen & Jalkanen 1992; Toyama-Sorimachi et al. 1995). Väzba CD44 na kyselinu hyaluronovú zabezpečuje bunkovú adhéziu k zložkám extracelulárnej matrix, pričom je taktiež zahrnutá do procesu bunkovej agregácie, proliferácie, migrácie a taktiež angiogenézy



(Bourguignon et al. 1998; Knudson 1998). Vo vzťahu k vrstevnatému dlaždicovému epitelu plní CD44 najmä funkciu regulátora proliferácie keratinocytov v odpovedi na externé stimuly a taktiež udržiavanie lokálnej homeostázy kyseliny hialurónovej (Kaya et al. 1997). Adhezívna molekula CD44 vykazuje v malígnych nádoroch aberantnú expresiu. Kým v niektorých typoch nádorov súvisí zvýšená expresia CD44 s horšími biologickými vlastnosťami (Choi et al. 2000; Isozaki et al. 1998), u iných typov nádorov boli horšie biologické vlastnosti spojené naopak s jej nižšou expresiou (De Marzo et al. 1998; Sugino et al. 1996). V súvislosti s hodnotením prognostického významu adhezívnej molekuly CD44 u nádorov hlavy a krku sú k dispozícii výsledky viacerých štúdií. Zatiaľ čo jedna skupina autorov považuje stratu expresie CD44 za nepriaznivý prognostický faktor (Esteban et al. 2005; Gonzalez-Moles et al. 2003; Stoll et al. 1999), iná skupina autorov identifikuje molekulu CD44 ako marker nádorovej kmeňovej bunky (Prince et al. 2007; Zhang et al. 2012) a zastáva názor, že práve subpopulácia buniek vykazujúca túto expresiu disponuje schopnosťou iniciovať nádorový rast (Ailles & Prince 2009).

### **1.7.2. E-kadherín**

Štruktúra kadherínov je tvorená extracelulárnou doménou, ktorá je zodpovedná za väzbu k ďalším kadherínom, transmembránovou a intracelulárnou doménou, ktorá je v spojení s cytoplazmatickými proteínmi nazývanými kateníny (Pyo et al. 2007). E-kadherín je kalcium dependentná adhezívna molekula, patriaca do tejto skupiny. Je to hlavný kadherín exprimovaný epitelovými bunkami a jeho typickou vlastnosťou je schopnosť väzby ku kadherínom prítomných na povrchu susedných buniek. E-kadheríny sú spojené s molekulami nazývanými kateníny, pomocou ktorých sú napojené na intermediálne filamenta cytoskeletu. Adhezívne molekuly zabezpečujú okrem medzibunkovej adhézie aj ďalšiu funkciu, ktorá je významná v súvislosti so vznikom a progresiou nádorov (Kolář 2003). V súvislosti so spinocelulárnym karcinómom dutiny ústnej bolo zistené, že rovnako ako u iných epitelových nádorov je zníženie expresie E-kadherínu spojené s vyššou invazitou tumoru (Shinohara et al. 1998). Signifikantne zvýšená expresia komplexu E-kadherín/ $\beta$ -katenín bola zistená v dysplastickom epiteli dutiny ústnej v porovnaní s epitelom zdravým, pričom v spinocelulárnom karcinóme dutiny ústnej bol už pozorovaný úbytok tejto molekuly (Bankfalvi et al. 2002). V súvislosti s potenciálnym využitím E-kadherínu ako markeru nádorovej kmeňovej bunky je zaujímavé, že v holoklonnej morfológii nádorových buniek *in vitro* boli zistené vyššie hodnoty expresie tejto adhezívnej molekuly (Locke et al. 2005).

## 1.8. Princípy imunohistochemického vyšetrenia

V súčasnosti najpoužívanjšou metódou imunohistochemického vyšetrenia (IHC) je metóda imúnneho komplexu peroxidázy-antiperoxidázy a avidín-biotínová imunoenzymatická technika, pri ktorej sa využíva vysoká afinita avidínu pre biotín na spojenie peroxidázovej značky k primárnej protilátke. Pre zvýšenie senzitivity boli vyvinuté viaceré metódy, ktoré pomáhajú odhaliť antigénové miesta (epitopy). Patrí medzi ne aplikácia rôznych proteolytických enzýmov, mikrovlnného žiarenia, prípadne kombinácia tlaku a tepla. Medzi výhody IHC patrí vysoká senzitivita a špecifickosť, použiteľnosť na rutinne spracovanom materiáli, atď. Tkanivo je pred histopatologickým vyšetrením nutné fixovať, pričom spôsob fixácie ovplyvňuje antigenicitu. Účel fixácie spočíva v inaktivácii autolytických mechanizmov pri zachovaní architektiky tkanív, imobilizácii molekúl zamedzujúcej ich arteficiálnemu premiestneniu do iných častí bunky alebo ich difúziu z tkanív a zvýšenie rigidity tkanív. Najbežnejšou metódou je fixácia 4% neutrálnym formaldehydom, prípadne fixácia zmrazením. Protilátky (imunoglobulíny) sú glykoproteíny, ktoré majú veľkú afinitu k antigénu a s veľkou špecifickosťou sa na tento antigén, resp. jeho aktívnu časť viažu. V IHC farbeniach sa používajú dva typy protilátok poly- a monoklonové. Polyklonové protilátky sa pripravujú cielenou imunizáciou zvierat určitým antigénom, pričom sa získajú protilátky s rôznou špecifickosťou a väzbovou schopnosťou. Monoklonové protilátky sú imunoglobulíny vylučované klonom jednej hybridnej plazmatickej bunky a takto získané protilátky disponujú identickou antigénovou špecifickosťou a väzbovou afinitou. Výhodou monoklonových protilátok je teda v tom, že vykazujú monošpecifickosť k jednému epitopu. Imunoenzymatické farbiace metódy spočívajú v premene bezfarebného chromogénu na farebný koncový produkt. Najčastejšími enzýmami využívanými na tento účel je peroxidáza a alkalická fosfatáza. Ako chromogény sa najčastejšie používajú 3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid a 3-amino-9-etylkarbazol. Na lokalizáciu primárnej protilátky slúžia viaceré detekčné systémy. Pri priamej metóde je primárna protilátka značená najčastejšie fluoresceínom. Na vizualizáciu antigénu sa používa fluorescenčný mikroskop. Pri nepriamej metóde je primárna protilátka, resp. imunokomplex antigén-primárna protilátka zviditeľnená značenou sekundárnou protilátkou, špecifickou pre primárny imunoglobulín (Hlavčák 2003).

## **2. Ciele dizertačnej práce**

Cieľom dizertačnej práce bolo imunohistochemicky detekovať expresiu vybraných potenciálnych markerov nádorových kmeňových buniek (CD44, E-kadherín) vo vzorkách spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej a štatisticky analyzovať expresiu týchto molekúl vo vzťahu k

- anatomickej lokalizácii výskytu nádoru v dutine ústnej
- diferenciacii tumoru
- objemu tumoru (pT)

## 3. Materiál a metódy

### 3.1. Súbor histopatologických vzoriek

Do štúdie boli zahrnuté histopatologické vzorky diagnostickej excízie a resekátu spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej získané od 34 pacientov, ktorí boli v rozmedzí rokov 1989 až 2006 liečení na Klinike ústní, čelistní a obličejové chirurgie FN Olomouc. Jednalo sa o 32 mužov a 2 ženy. Všetky vzorky boli na základe sledovaných údajov rozdelené do nasledujúcich skupín:

#### *A. anatomická lokalizácia tumoru*

#### *B. diferenciácia tumoru*

#### *C. objem tumoru (pT)*

Ad A.: V prvej skupine boli histologické preparáty rozdelené na základe anatomickej lokalizácie tumoru v dutine ústnej do nasledujúcich podskupín:

- 1. spodina dutiny ústnej*
- 2. jazyk*
- 3. gingíva*
- 4. iné (zahŕňa oblasť tvrdého podnebia, tonzily, oro- a nazofaryngu)*

Ad B: V druhej skupine bol súbor rozdelený na základe diferenciácie tumoru nasledovne:

- 1. dobre diferencované tumory (G1)*
- 2. stredne a nízko diferencované tumory (G2, G3)*

Ad C: V tretej skupine bolo rozdelenie vzoriek resekátu tumoru vykonané v súvislosti s jeho objemom (pT):

- 1. veľkosť tumoru od 0 do 4 cm (pT1-pT2)*
- 2. veľkosť tumoru nad 4 cm (pT3-pT4)*

U všetkých vzoriek bola imunohistochemicky detekovaná a štatisticky vyhodnotená expresia adhezívnych molekúl E-kadherínu a CD44.

## 3.2. Metodika detekcie adhezívnych molekúl CD44 a E-kadherín

### 3.2.1. Príprava histologických preparátov

Z parafinových bločkov vychladených na mraziacej doštičke boli na rotačnom mikrotome pripravené rezy o hrúbke 4  $\mu\text{m}$ . Takto pripravené rezy boli po položení na hladinu zahriatej destilovanej vody a prichytení na pozitívne nabitú sklú sušené v termostate a to do druhého dňa pri teplote 56 °C ( $\pm 2$  °C). Následne bola vykonaná deparafinizácia a rehydratácia preparátov (rozpustenie v xyléne 3x6 minút a ich ponáranie do zostupnej alkoholovej rady 96% / 80% / 70% alkohol po 5 minút). Po oplachu v destilovanej vode boli preparáty ponorené do citrátového pufru (pH 6,0-6,2) a zahrievané v mikrovlnnej rúre pri 120 °C po dobu 5 minút. Nasledovalo zrušenie aktivity endogénnej peroxidázy ponorením skiel na 15 minút do 6% roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oplach destilovanou vodou, oplach TRISom (hydroxymethyl aminomethan; pH 7,4-7,6) a ponorenie do roztoku TRIS pH 7,4-7,6/Tween po dobu 5 minút. Monoklonové myšie protilátky (CD44: NCL-CD44-2, clone DF1485, Visionbiosystems-Novocastra; E-kadherín: E-cadherin, clone NCH-38, Dako) boli nariedené do zeleného roztoku s azidom (ChemMate™ Antibody Diluent, DakoCytomation) v pomere 1:50 a inkubované pri izbovej teplote po dobu 60 minút. Po následnom oplachu preparátov v TRISe pH 7,4-7,6 a TRISe/Tween boli aplikované sekundárne protilátky (EnVision+Dual link system peroxidase, Dako) a inkubované pri izbovej teplote po dobu 60 minút. Nasledovalo opláchnutie v TRISe pH 7,4-7,6, vizualizácia pomocou chromogénu 3,3-diaminobenzidínu (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System), farbenie jadier kamencovým hematoxylínom, diferenciacia čpavkovou vodou, oplach pod tečúcou vodou, odvodnenie (96% alkohol, acetón, acetón-xylén, xylén) a montáž do pertexu.

Pre pozitívnu a negatívnu kontrolu bol použitý paracortex a germinálne centrum z ľudskej tonzily.

### 3.2.2. Vyhodnotenie imunoreaktivity

Vyhodnotenie stupňa a rozsahu imunoreaktivity bolo stanovené pomocou *H-skóre*. H-skóre je metóda, ktorá vyhodnocuje stupeň imunoreaktivity v závislosti na percente (0-100 %) a intenzite farbenia (1-slabá intenzita, 2-stredná intenzita, 3-vysoká intenzita) imunopozitívnych buniek tak, že súčin oboch hodnôt vyjadruje výsledné skóre (0-300).

V každej skupine boli hodnoty H-skóre rozdelené do dvoch nasledujúcich skupín:

- negatívna expresia: **H-skóre = 0**
- pozitívna expresia: **H-skóre > 0**

### **3.3. Štatistická analýza**

Na štatistickú analýzu dát bol použitý software SPSS v. 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Závislosť medzi expresiou a sledovanými údajmi bola posúdená pomocou Fischerovho presného testu (hladina signifikancie 0,05).

## 4. Výsledky

### 4.1. Anatomická lokalizácia tumoru (skupina A)

#### 4.1.1. Expresia CD44 vo vzťahu k anatomickej lokalizácii tumoru

Pri porovnávaní vzoriek diagnostickej excízie **skupiny A** (*anatomická lokalizácia*) preukázal Fisherov presný test s Bonferroniho korekciou signifikantne vyšší podiel vzoriek s pozitivitou CD44 u lokality „*spodina dutiny ústnej*“ (84,6 %) a lokality „*iné*“ (100 %) v porovnaní s lokalitou „*jazyk*“ (0 %),  $P=0,003$  v obidvoch testoch (tab. 9, 10, obr. 28, 29).

**Tab. 9:** Vyjadrujúca signifikantné výsledky Fischerovho presného testu vzoriek diagnostickej excízie skupiny A vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) CD44.

**Crosstab**

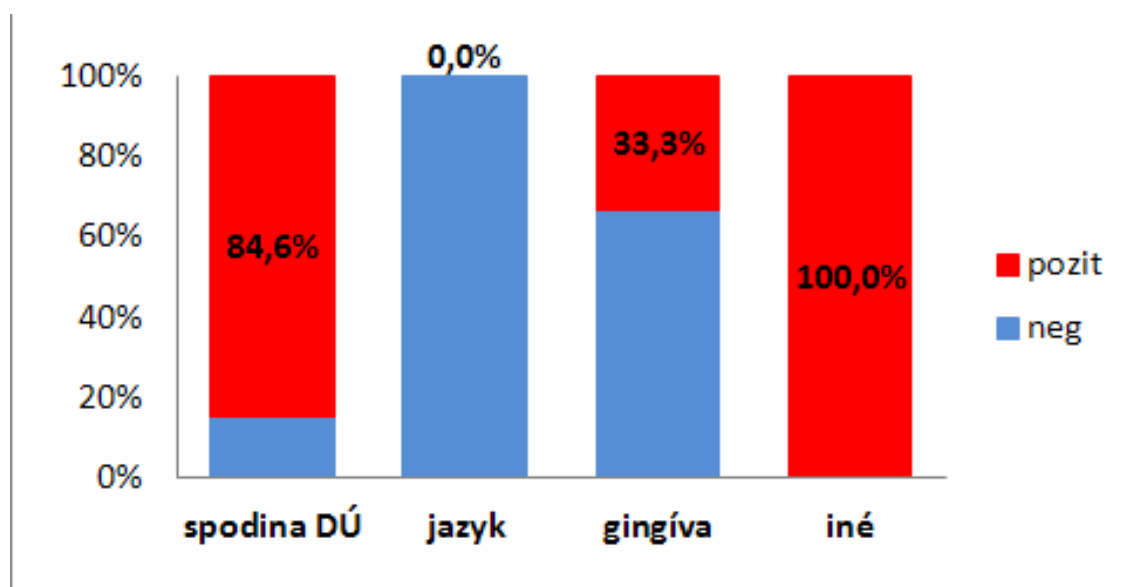
			CD44		Total
			=0	pozit (> 0)	
Locality	Floor of the Mouth	Count	2	11	13
		% within Locality	15,4%	84,6%	100,0%
	Tongue	Count	7	0	7
		% within Locality	100,0%	,0%	100,0%
	Gingiva	Count	2	1	3
		% within Locality	66,7%	33,3%	100,0%
	Other	Count	0	6	6
		% within Locality	,0%	100,0%	100,0%
Total	Count		11	18	29
	% within Locality		37,9%	62,1%	100,0%

**Fisher's Exact Test**

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test	18,599	,00004
N of Valid Cases	29	

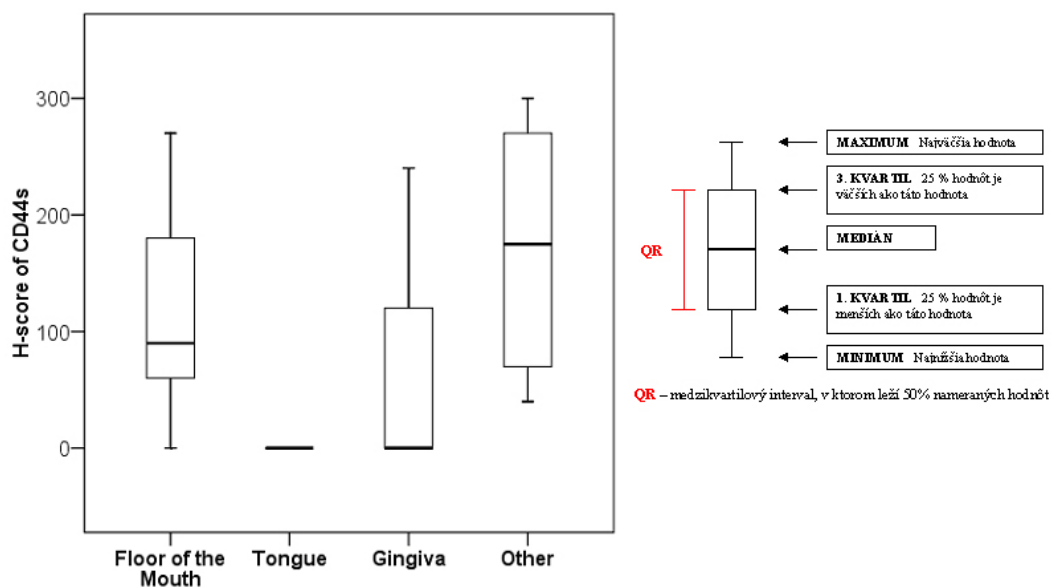
**Tab. 10:** Vyjadrujúca signifikanciu Fisherovho presného testu s Bonferroniho korekciou signifikancie pri porovnaní dvojíc skupín podľa lokalizácie:

	CD44
1 vs. 2 ( <i>spodina DÚ vs. jazyk</i> )	<b>0,003</b>
1 vs. 3	0,814
1 vs. 4	1,000
2 vs. 3	1,000
2 vs. 4 ( <i>jazyk vs. iné</i> )	<b>0,003</b>
3 vs. 4	0,500



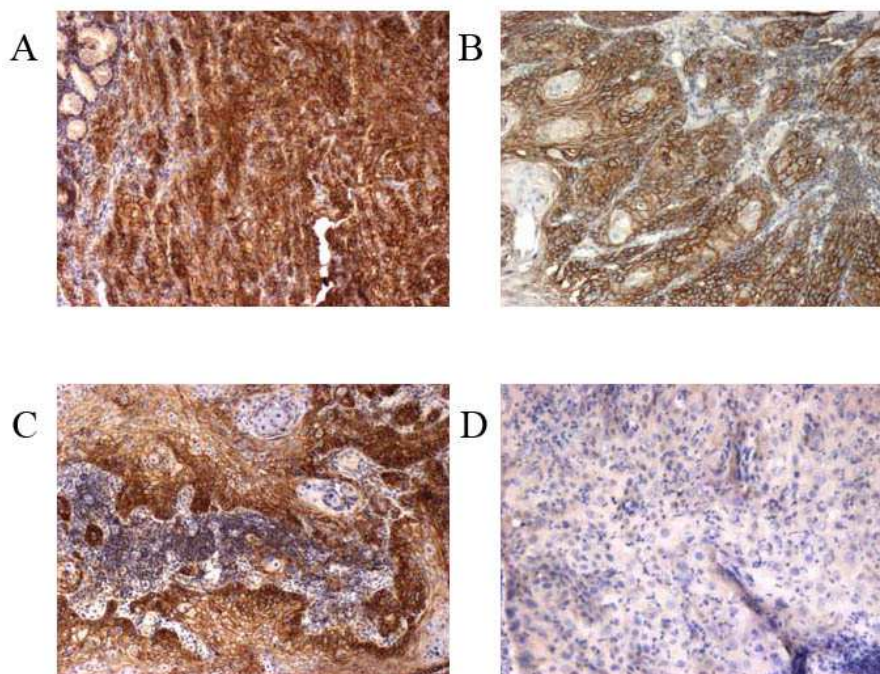
**Obr. 28:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel CD44 pozitívnych a negatívnych vzoriek diagnostickej excízie skupiny A.





**Obr. 29:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expície CD44 (H-skóre) u vzoriek diagnostickej excízie v závislosti od anatomickej lokalizácie tumoru.

Imunoreaktivitu CD44 vybraných histopatologických vzoriek spinocelulárneho karcinómu z rozdielnych oblastí dutiny ústnej znázorňuje obr. 30.



**Obr. 30:** Znázorňujúci imunoreaktivitu CD44 vybraných histopatologických vzoriek spinocelulárneho karcinómu z oblasti orofaryngu (A), tvrdého podnebia (B), spodiny dutiny ústnej (C) a jazyka (D) (Krump & Ehrmann 2012).

#### 4.1.2. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k anatomickej lokalizácii tumoru

Pri porovnávaní expresie E-kadherínu nebola u vzoriek diagnostickej excízie ( $P=0,689$ ) preukázaná signifikantná závislosť medzi lokalitou a pozitivitou/negativitou E-kadherínu, pričom v anatomickej lokalite *spodina dutiny ústnej* bolo 66,7%, v lokalite *jazyk* 42,9%, v lokalite *gingíva* 66,7% a v lokalite *iné* 80% imunopozitívnych vzoriek (tab. 11, obr. 31, 32).

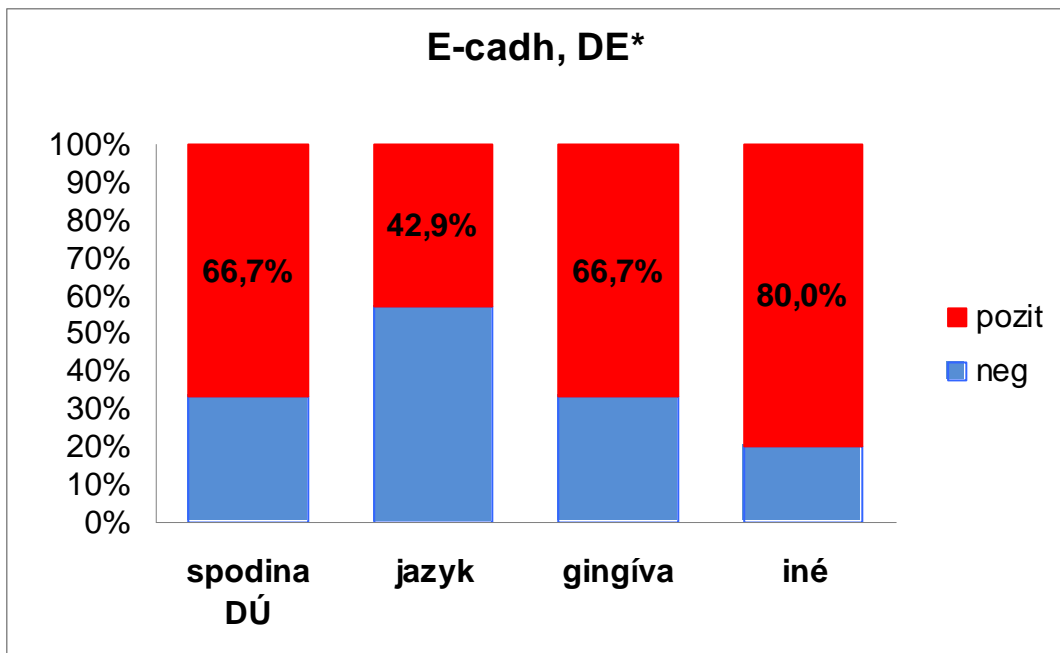
**Tab. 11:** Znázorňujúca výsledky Fisherovho presného testu vzoriek diagnostickej excízie skupiny A vo vzťahu k pozitivite ( $>0$ )/negativite ( $=0$ ) E-kadherínu.

**Crosstab**

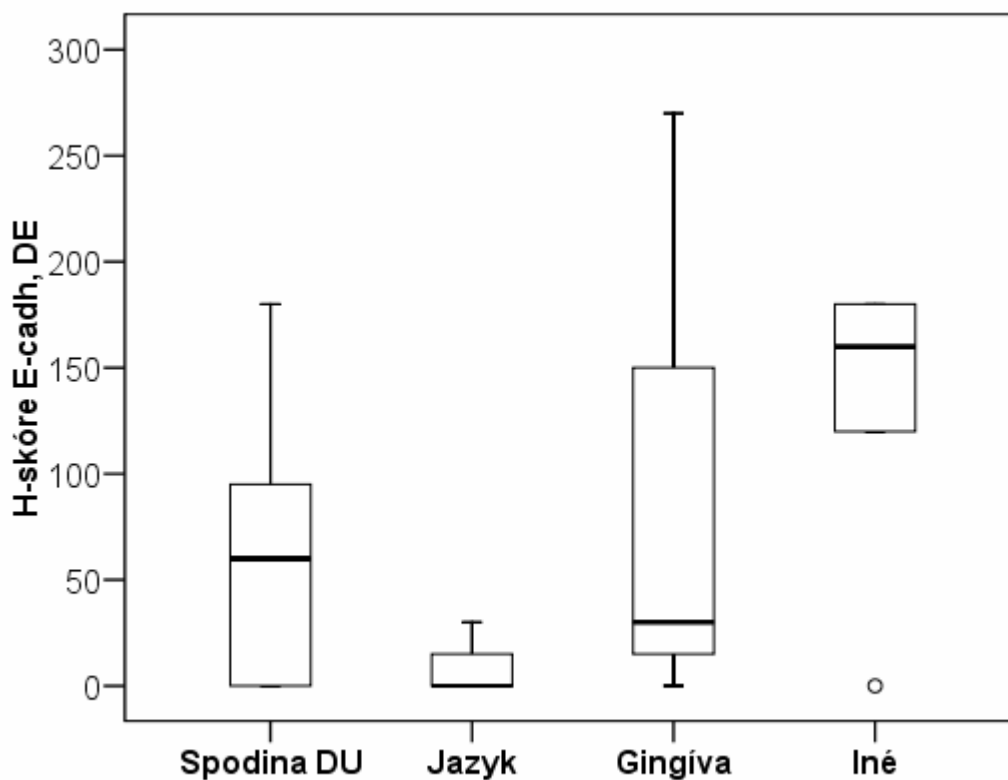
			E-cadh, DE*		Total
			0	pozit. ( $>0$ )	
Lokalizácia tumoru	spodina DU	Count	4	8	12
		%	33,3%	66,7%	100,0%
	jazyk	Count	4	3	7
		%	57,1%	42,9%	100,0%
	gingíva	Count	1	2	3
		%	33,3%	66,7%	100,0%
	iné	Count	1	4	5
		%	20,0%	80,0%	100,0%
Total	Count	10	17	27	
	%	37,0%	63,0%	100,0%	

**Fisher's Exact Test**

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test	1,971	,689
N of Valid Cases	27	



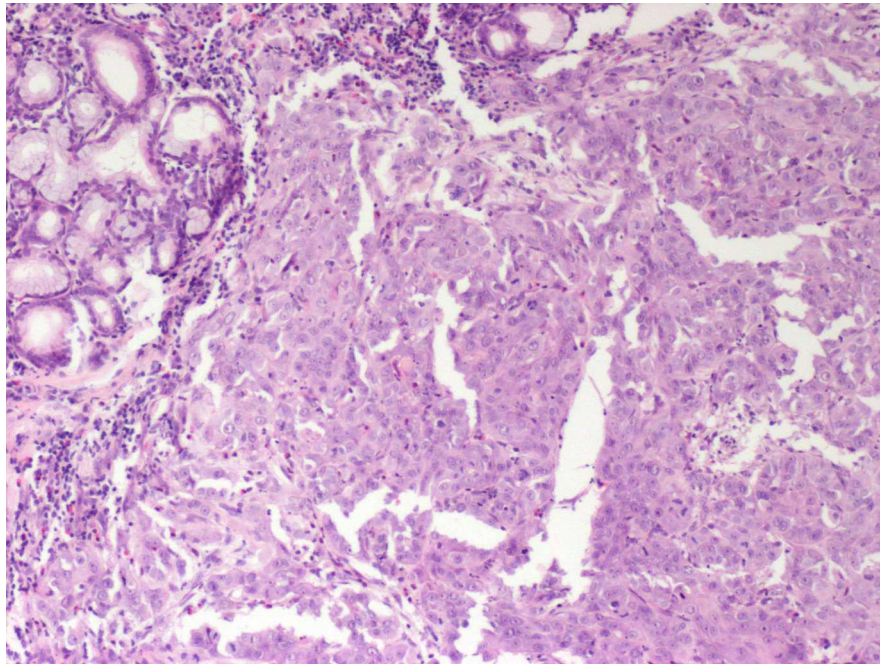
**Obr. 31:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel E-kadherín pozitívnych a negatívnych vzoriek diagnostickej excízie skupiny A.



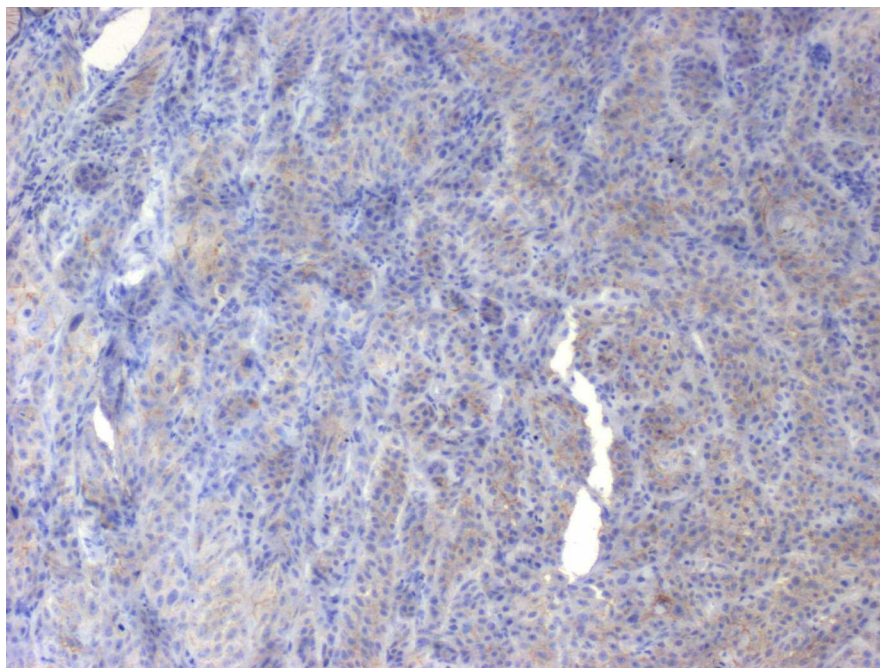
**Obr. 32:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie E-kadherínu (H-skóre) u vzoriek diagnostickej excízie v závislosti od anatomickej lokalizácie tumoru.

#### 4.1.3. Reprezentatívne snímky vzoriek OSCC vo vzťahu k anatomickej lokalizácii

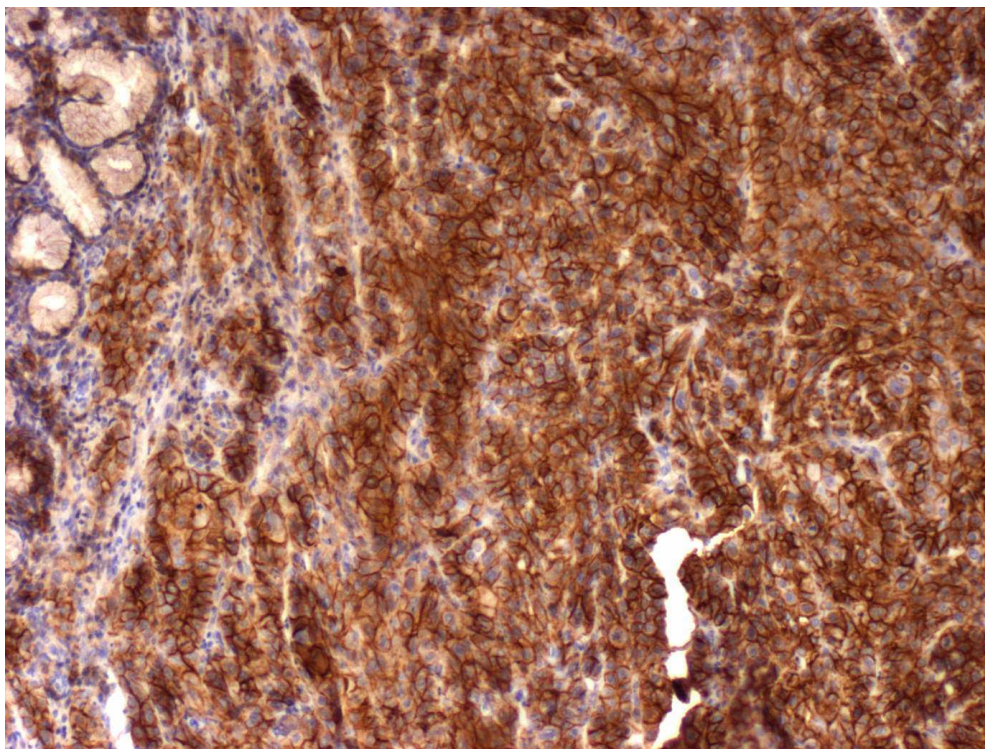
Reprezentatívne snímky vybraných histopatologických vzoriek spinocelulárneho karcinómu z rozdielnych oblastí dutiny ústnej vyjadrujúce rozdielnu imunoreaktivitu vybraných adhezívnych molekúl sú znázornené na obr. 33-41.



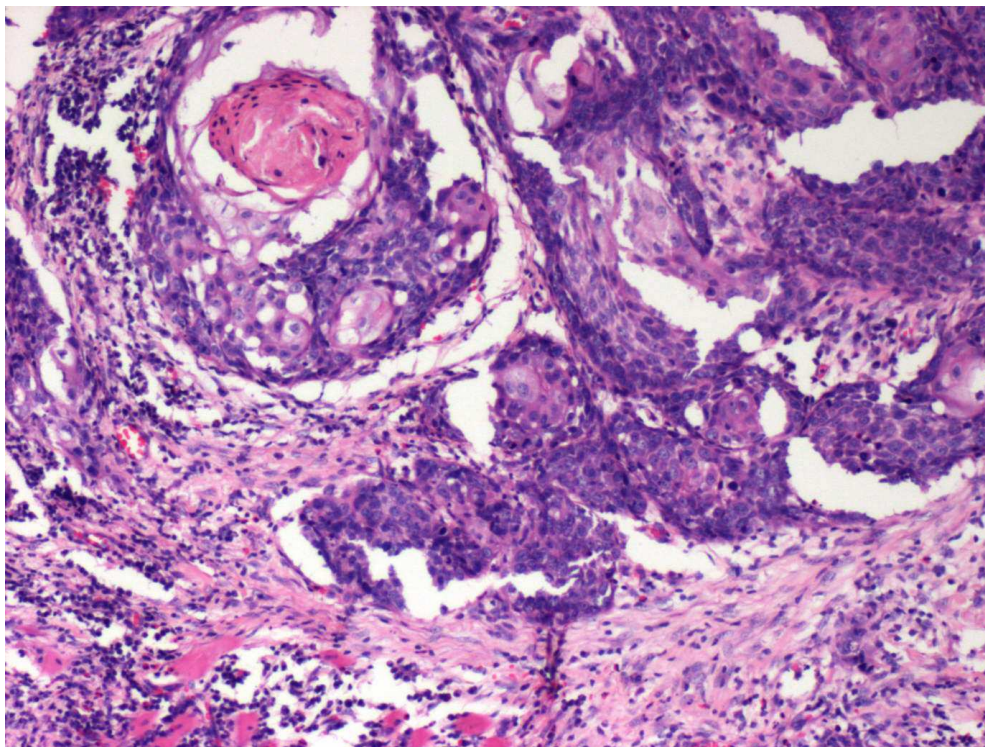
**Obr. 33:** Spinocelulárny karcinóm orofaryngu, farbenie hematoxylin-eozín, zväčšenie 100x.



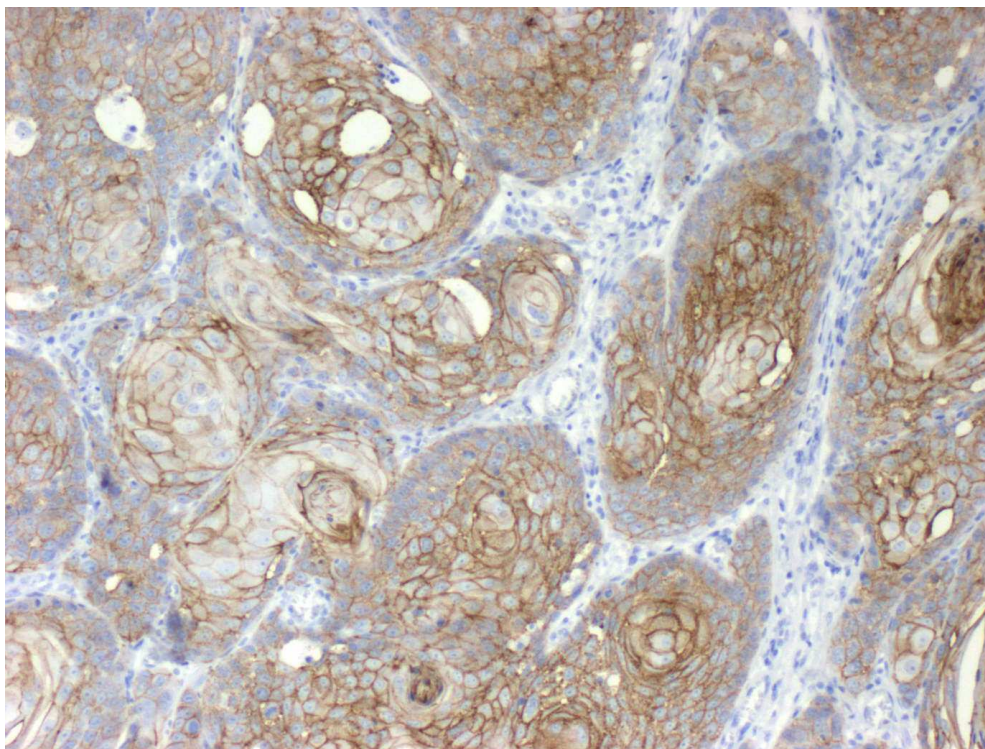
**Obr. 34:** Spinocelulárny karcinóm orofaryngu, farbenie protilátky- E-kadherín, zväčšenie 100x.



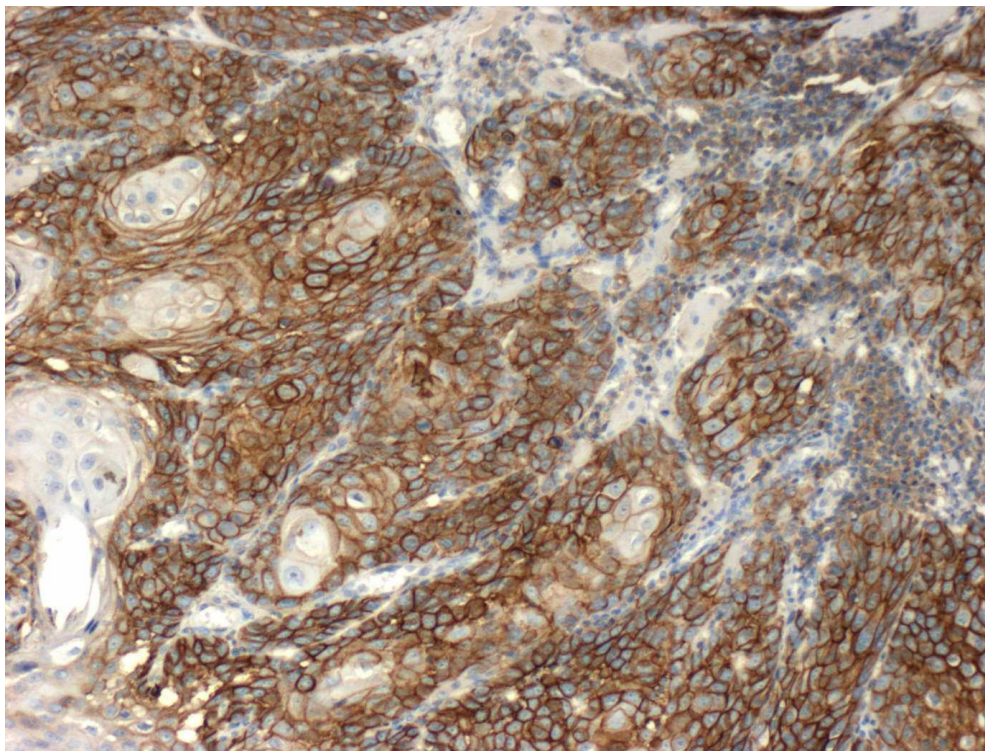
**Obr. 35:** Spinocelulárny karcinóm orofaryngu, farbenie protilátky- CD44, zväčšenie 200x.



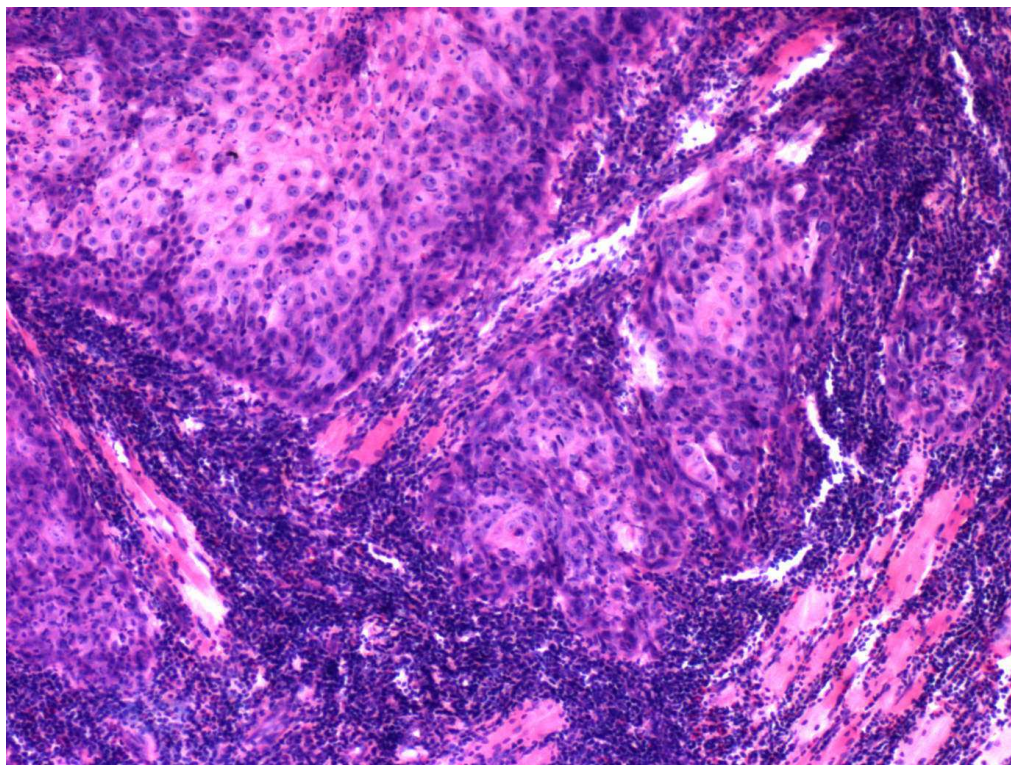
**Obr. 36:** Spinocelulárny karcinóm tvrdého podnebia, farbenie hematoxylin-eozín, zväčšenie 100x.



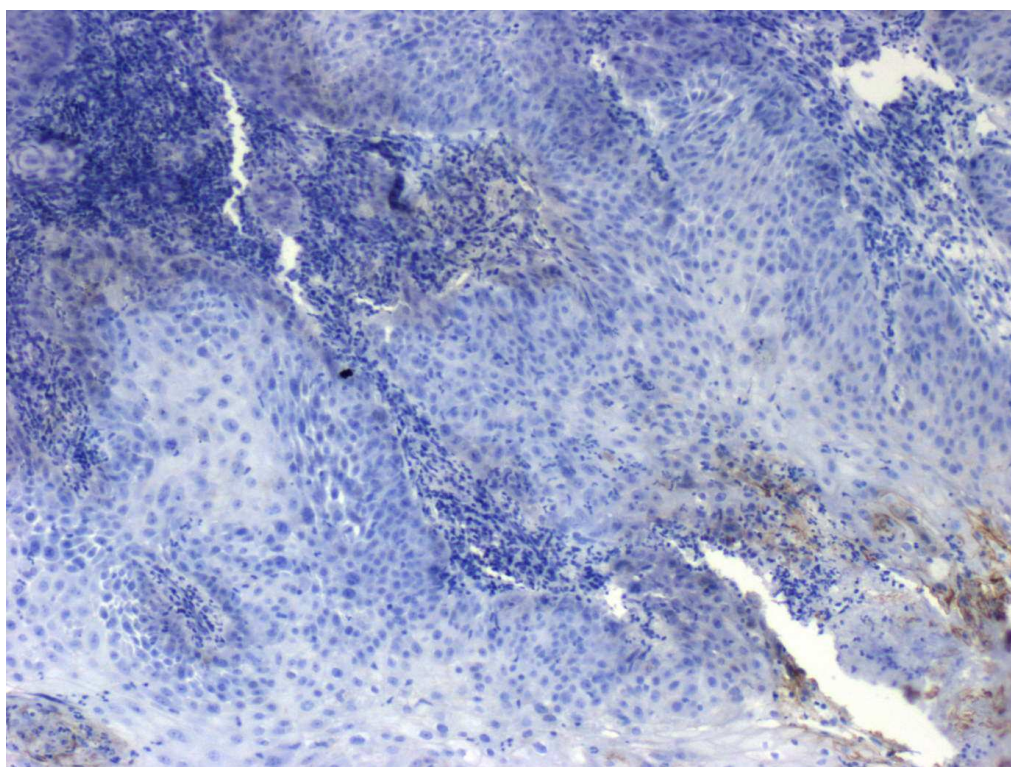
**Obr. 37:** Spinoceleulárny karcinóm tvrdého podnebia, farbenie protilátky- E-kadherín, zväčšenie 100x.



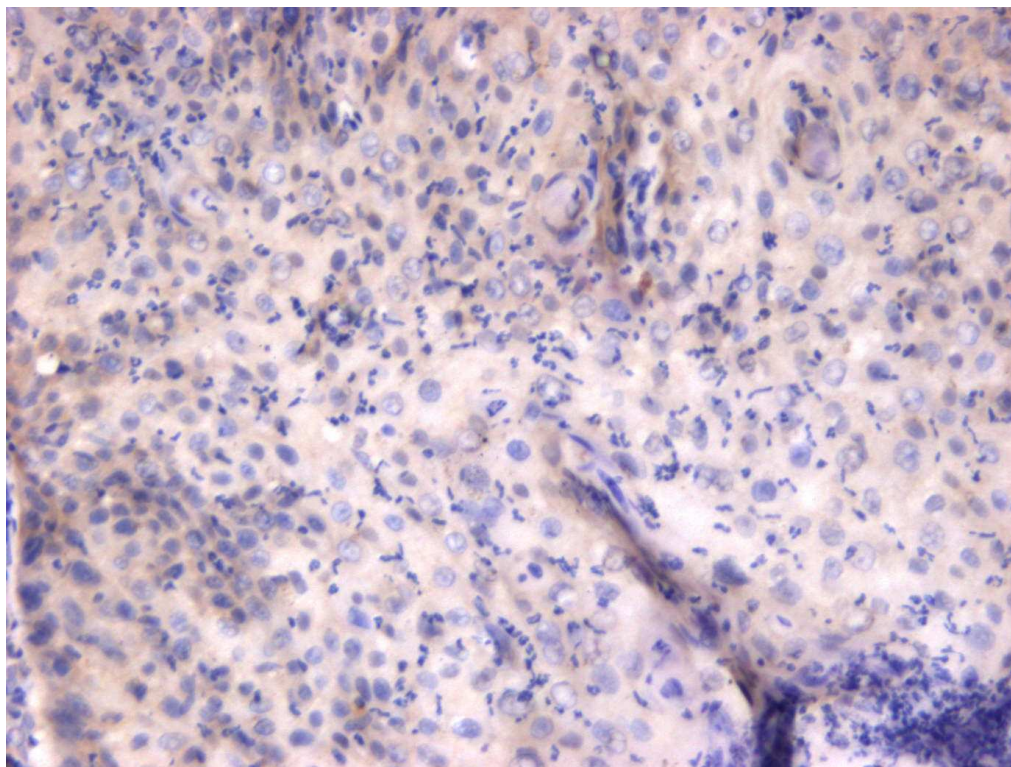
**Obr. 38:** Spinoceleulárny karcinóm tvrdého podnebia, farbenie protilátky- CD44, zväčšenie 100x.



**Obr. 39:** Spinocelulárny karcinóm jazyka, farbenie hematoxylin-eozín, zväčšenie 100x.



**Obr. 40:** Spinocelulárny karcinóm jazyka, farbenie protilátky- E-kadherín, zväčšenie 100x.



**Obr. 41:** Spinocelulárny karcinóm jazyka, farbenie protilátky- CD44, zväčšenie 200x.



## 4.2. Diferenciácia tumoru (skupina B)

### 4.2.1. Expresia CD44 vo vzťahu k diferenciácii u vzoriek diagnostickej excízie

Pri porovnávaní vzoriek diagnostickej excízie nepreukázal Fisherov presný test signifikantnú závislosť medzi diferenciáciou tumoru (G1 versus G2/G3) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) CD44 ( $P=0,615$ ). Konkrétne v skupine dobre diferencovaných spinocelulárnych karcinómov dutiny ústnej (grade 1) bolo 50% imunopozitívnych vzoriek a v skupine stredne a nízko diferencovaných karcinómov (grade 2 a 3) bolo 65% imunopozitívnych vzoriek (tab. 12, obr. 42, 43).

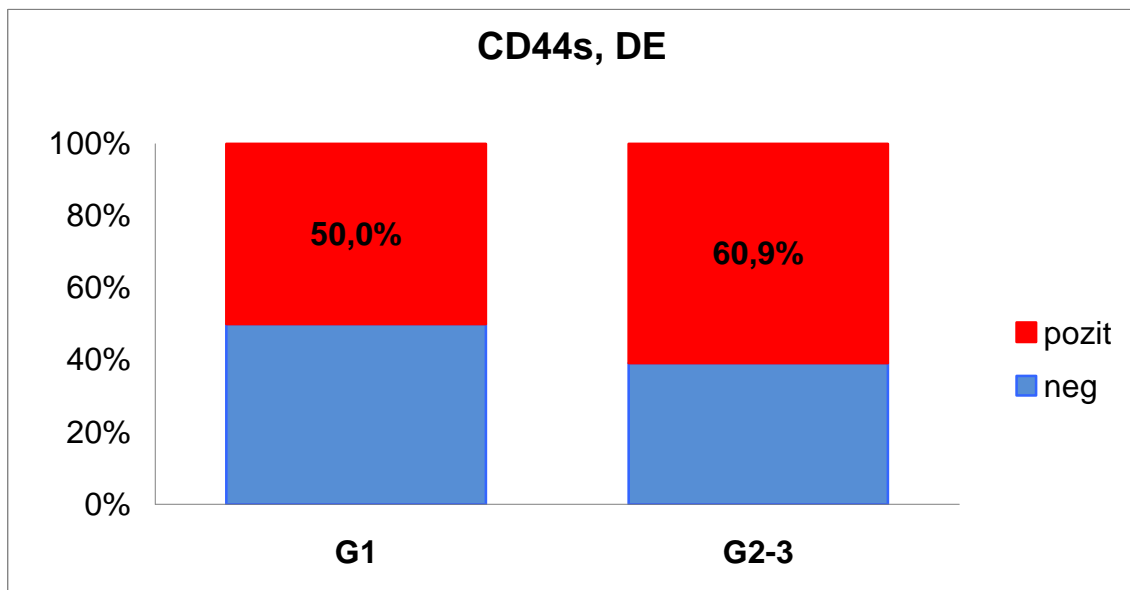
**Tab. 12:** Znázorňujúca výsledky Fisherovho presného testu vzoriek diagnostickej excízie skupiny B vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) CD44.

#### Crosstabulation

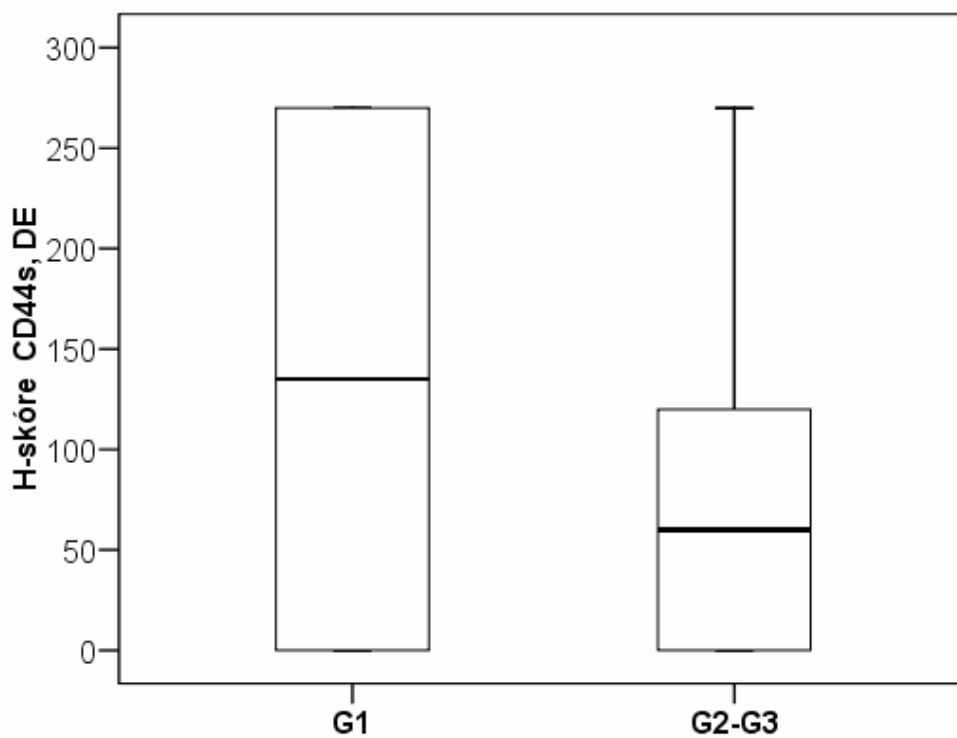
			CD44s, DE		Total
			0	> 0	
Grading	G1	Count	2	2	4
		% within Grading	50,0%	50,0%	100,0%
	G2-G3	Count	9	14	23
		% within Grading	39,1%	60,9%	100,0%
Total		Count	11	16	27
		% within Grading	40,7%	59,3%	100,0%

#### Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		1,000
N of Valid Cases	27	



**Obr. 42:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel CD44 pozitívnych a negatívnych vzoriek diagnostickej excízie skupiny B.



**Obr. 43:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie CD44 (H-skóre) u vzoriek diagnostickej excízie v závislosti od jeho diferenciácie.

#### 4.2.2. Expresia CD44 vo vzťahu k diferenciacii u vzoriek resekatu tumoru

Pri porovnávaní vzoriek resekatu tumoru nepreukázal Fisherov presný test signifikantnú závislosť medzi diferenciáciou tumorov (G1 versus G2/G3) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) CD44 ( $P=0,423$ ). Konkrétne v skupine dobre diferencovaných spinocelulárnych karcinómov dutiny ústnej (grade 1) bolo 66,7% imunopozitívnych vzoriek a v skupine stredne a nízko diferencovaných karcinómov (grade 2 a 3) bolo 90% imunopozitívnych vzoriek (tab. 13, obr. 44, 45).

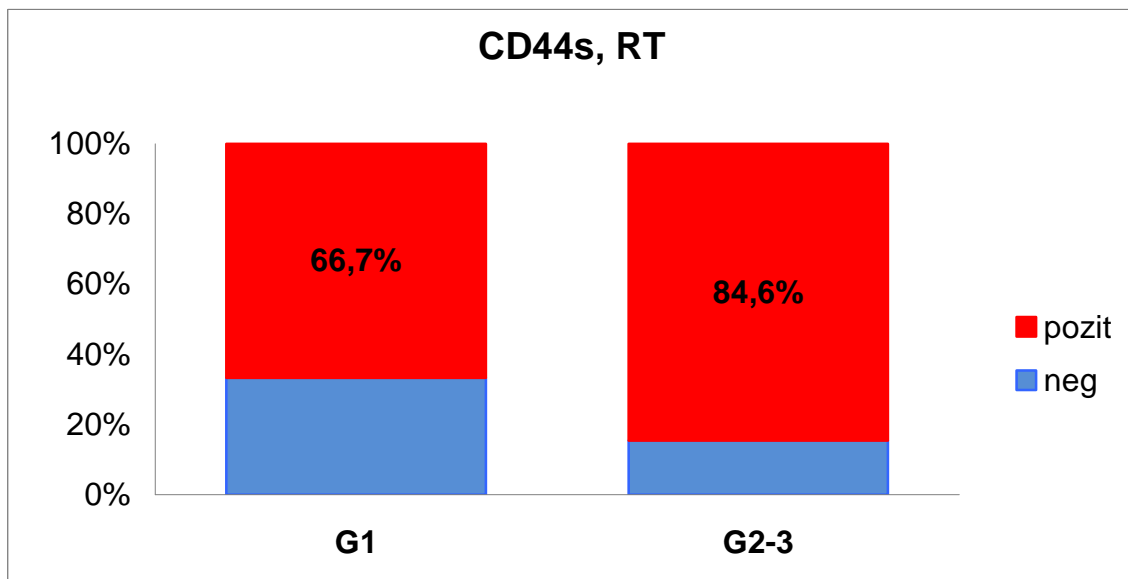
**Tab. 13:** Znázorňujúca výsledky Fisherovho presného testu vzoriek resekatu tumoru skupiny B vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) CD44.

#### Crosstabulation

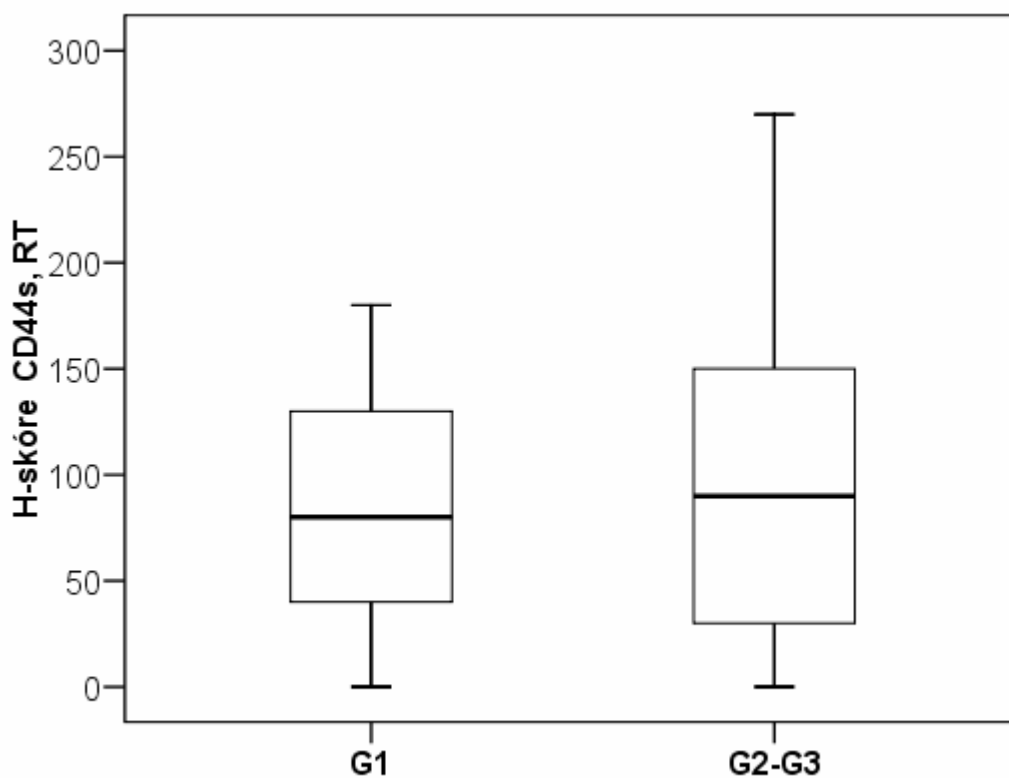
			CD44s, RT		Total
			0	> 0	
Grading	G1	Count	1	2	3
		% within Grading	33,3%	66,7%	100,0%
	G2-G3	Count	2	11	13
		% within Grading	15,4%	84,6%	100,0%
Total		Count	3	13	16
		% within Grading	18,8%	81,3%	100,0%

#### Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		,489
N of Valid Cases	16	



**Obr. 44:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel CD44 pozitívnych a negatívnych vzoriek resekátu tumoru skupiny B.



**Obr. 45:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie CD44 (H-skóre) u vzoriek resekátu tumoru v závislosti od jeho diferenciácie.

#### 4.2.3. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k diferenciacii u vzoriek diagnostickej excízie

Pri porovnávaní vzoriek diagnostickej excízie nepreukázal Fisherov presný test signifikantnú závislosť medzi diferenciáciou tumoru (G1 versus G2/G3) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) E-cadherínu ( $P=0,571$ ). Konkrétne v skupine dobre diferencovaných spinocelulárnych karcinómov dutiny ústnej (grade 1) bolo 33,3% imunopozitívnych vzoriek a v skupine stredne a nízko diferencovaných karcinómov (grade 2 a 3) bolo 57,9% imunopozitívnych vzoriek (tab. 14, obr. 46, 47).

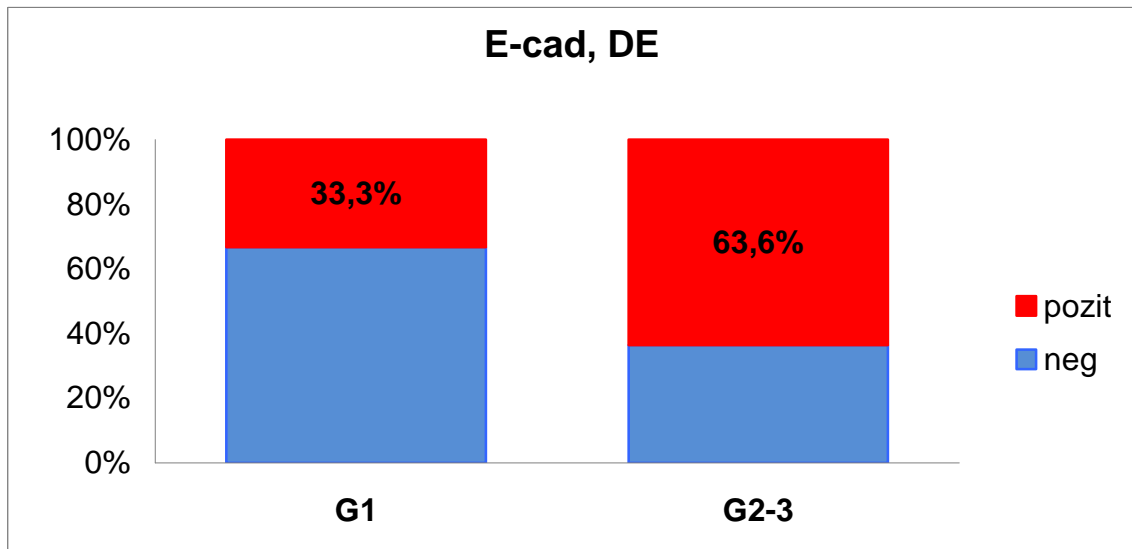
**Tab. 14:** Znázorňujúca výsledky Fisherovho presného testu vzoriek diagnostickej excízie skupiny B vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) E-kadherínu.

#### Crosstabulation

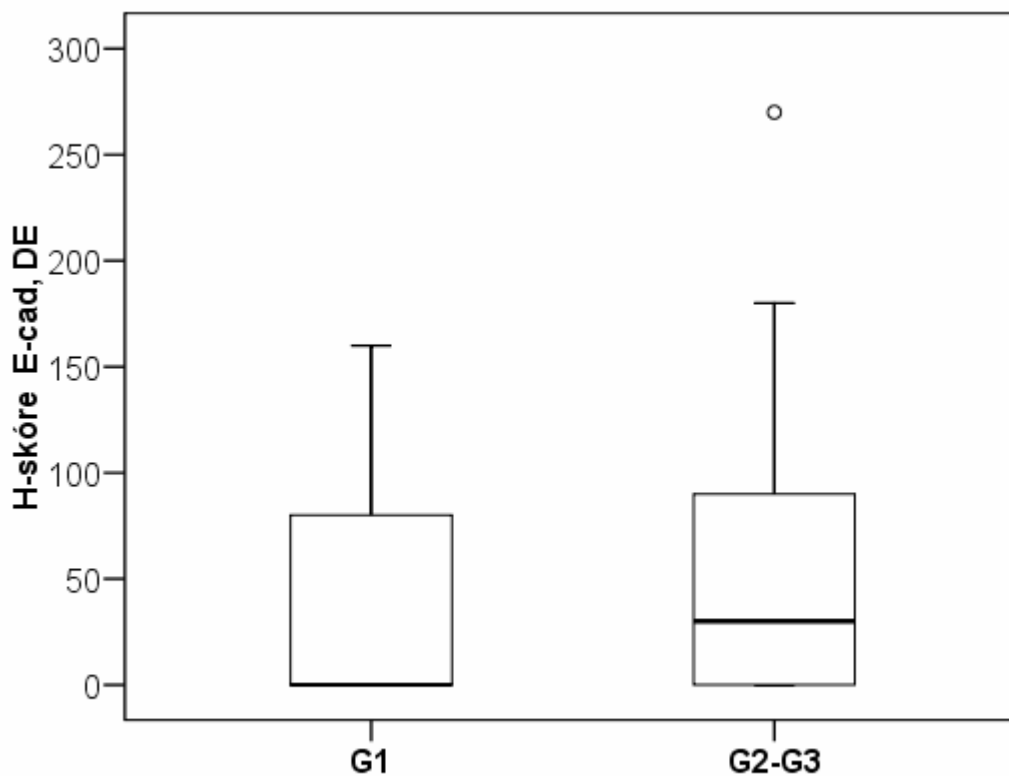
		E-cad, DE		Total
		0	> 0	
Grading G1	Count	2	1	3
	% within Grading	66,7%	33,3%	100,0%
G2-G3	Count	8	14	22
	% within Grading	36,4%	63,6%	100,0%
Total	Count	10	15	25
	% within Grading	40,0%	60,0%	100,0%

#### Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		,543
N of Valid Cases	25	



**Obr. 46:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel E-kadherín pozitívnych a negatívnych vzoriek diagnostickej excízie skupiny B.



**Obr. 47:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie E-kadherínu (H-skóre) u vzoriek diagnostickej excízie v závislosti od diferenciacie tumoru.

#### 4.2.4. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k diferenciacii u vzoriek resekatu tumoru

Pri porovnávaní vzoriek resekatu tumoru nepreukázal Fisherov presný test signifikantnú závislosť medzi diferenciáciou tumoru (G1 versus G2/G3) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) E-cadherínu ( $P=1,000$ ). Konkrétne v skupine dobre diferencovaných spinocelulárnych karcinómov dutiny ústnej (grade 1) bolo 50% imunopozitívnych vzoriek a v skupine stredne a nízko diferencovaných karcinómov (grade 2 a 3) bolo 45,5% imunopozitívnych vzoriek (tab. 15, obr. 48, 49).

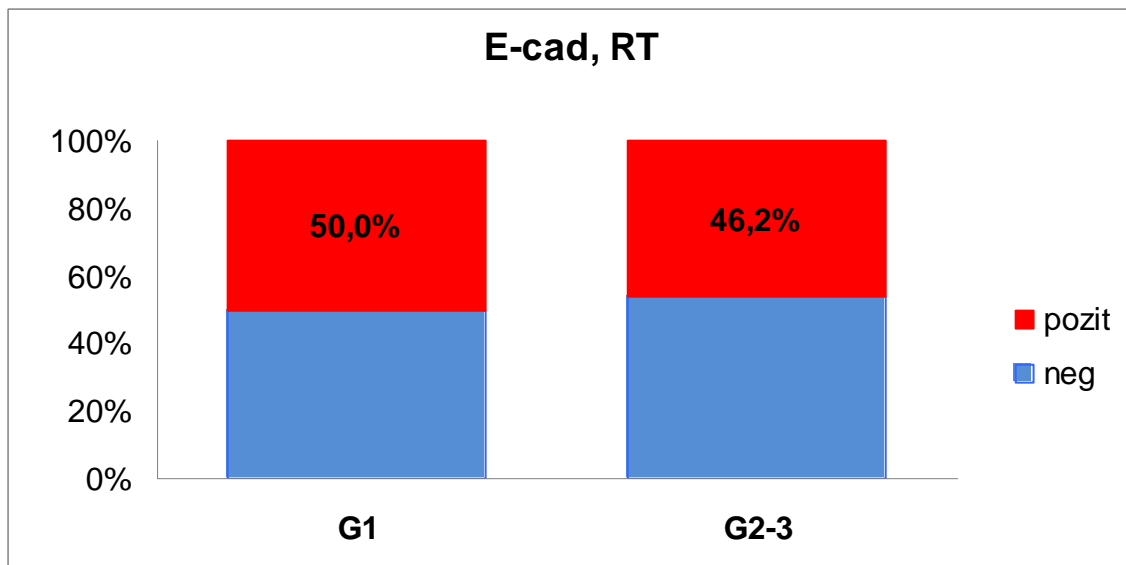
**Tab. 15:** Znázorňujúca výsledky Fisherovho presného testu vzoriek resekatu tumoru skupiny B vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) E-kadherínu.

#### Crosstabulation

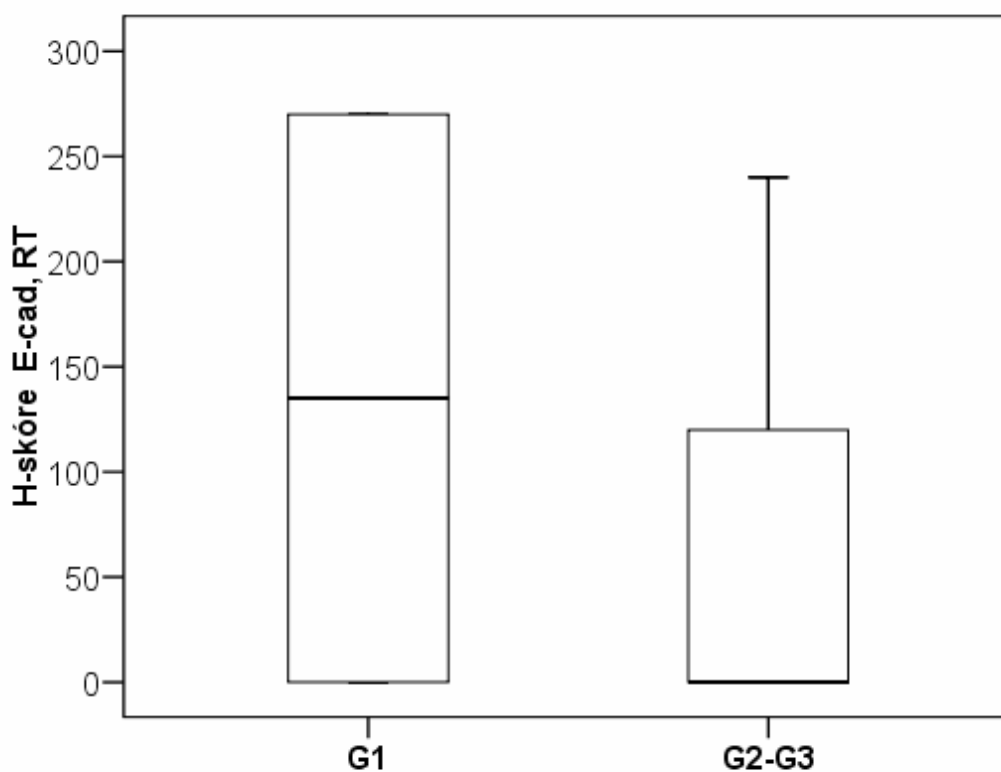
			E-cad, RT		Total
			0	> 0	
Grading	G1	Count	1	1	2
		% within Grading	50,0%	50,0%	100,0%
	G2-G3	Count	7	6	13
		% within Grading	53,8%	46,2%	100,0%
Total		Count	8	7	15
		% within Grading	53,3%	46,7%	100,0%

#### Fisher's Exact Test

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		1,000
N of Valid Cases	15	



**Obr. 48:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel E-kadherín pozitívnych a negatívnych vzoriek resektátu tumoru skupiny B.



**Obr. 49:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie E-kadherínu (H-skóre) u vzoriek resektátu tumoru v závislosti od jeho diferenciácie.



### 4.3. pT štádium tumoru (skupina C)

#### 4.3.1. Expresia CD44 vo vzťahu k objemu tumoru

Pri porovnávaní vzoriek resekátu tumoru preukázal Fisherov presný test signifikantnú závislosť medzi objemom tumoru (pT) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) CD44 ( $P=0,022$ ). Konkrétne v skupine tumorov o veľkosti do 4 cm (pT 1-2) bolo 100% imunopozitívnych vzoriek a v skupine tumorov nad 4cm (pT 3-4) bolo 40% imunopozitívnych vzoriek (tab. 16, obr. 50, 51).

**Tab. 16:** Znázorňujúca signifikantné výsledky Fisherovho presného vzoriek resekátu tumoru skupiny C vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) CD44.

**Crosstab**

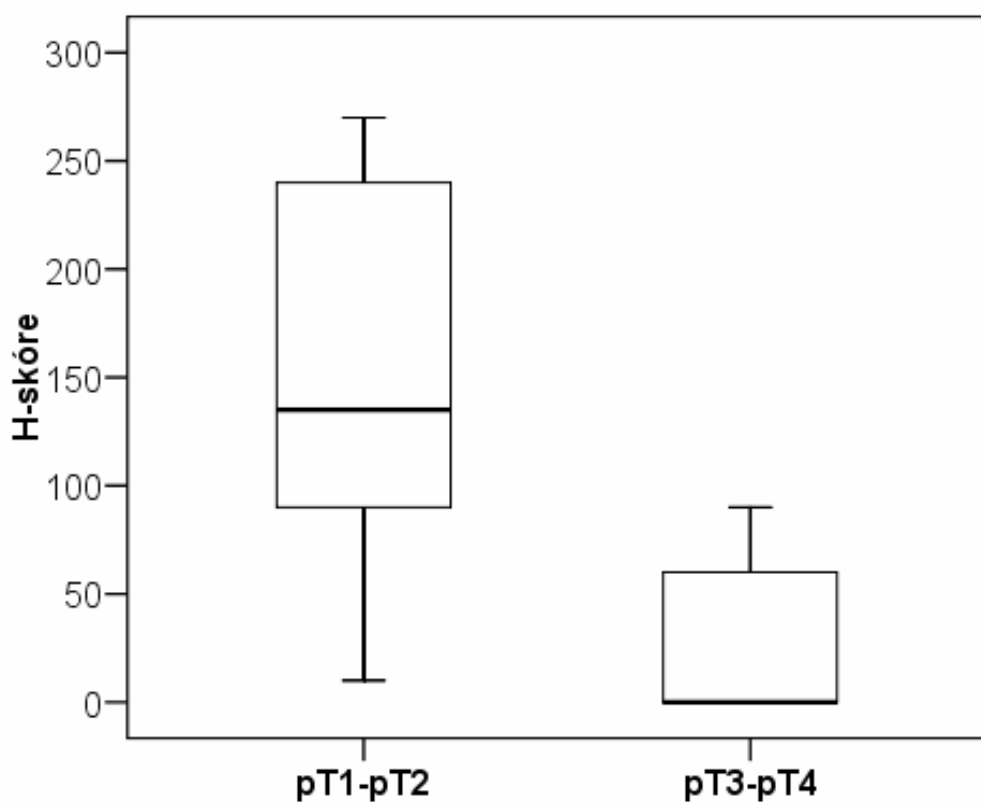
			CD44, po		Total
			0	> 0	
Staging	pT 1-2	Count	0	10	10
		% within Staging	,0%	100,0%	100,0%
	pT 3-4	Count	3	2	5
		% within Staging	60,0%	40,0%	100,0%
Total		Count	3	12	15
		% within Staging	20,0%	80,0%	100,0%

**Fisher's Exact Test**

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		<b>,022</b>
N of Valid Cases	15	



**Obr. 50:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel CD44 pozitívnych a negatívnych vzoriek resektátu tumoru skupiny C.



**Obr. 51:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie CD44 (H-skóre) u vzoriek resektátu tumoru v závislosti od pT štádia.

### 4.3.2. Expresia E-kadherínu vo vzťahu k objemu tumoru

Porovnávaním vzoriek resekátu tumoru nebola zistená signifikantná závislosť medzi objemom tumoru (pT) a pozitivitou (>0)/negativitou (=0) E-kadherínu ( $P=0,138$ ). Konkrétne v skupine tumorov o veľkosti do 4 cm (pT 1-2) bolo 62,5% imunopozitívnych vzoriek a v skupine tumorov nad 4cm (pT 3-4) bolo 16,7% imunopozitívnych vzoriek (tab. 17, obr. 52, 53).

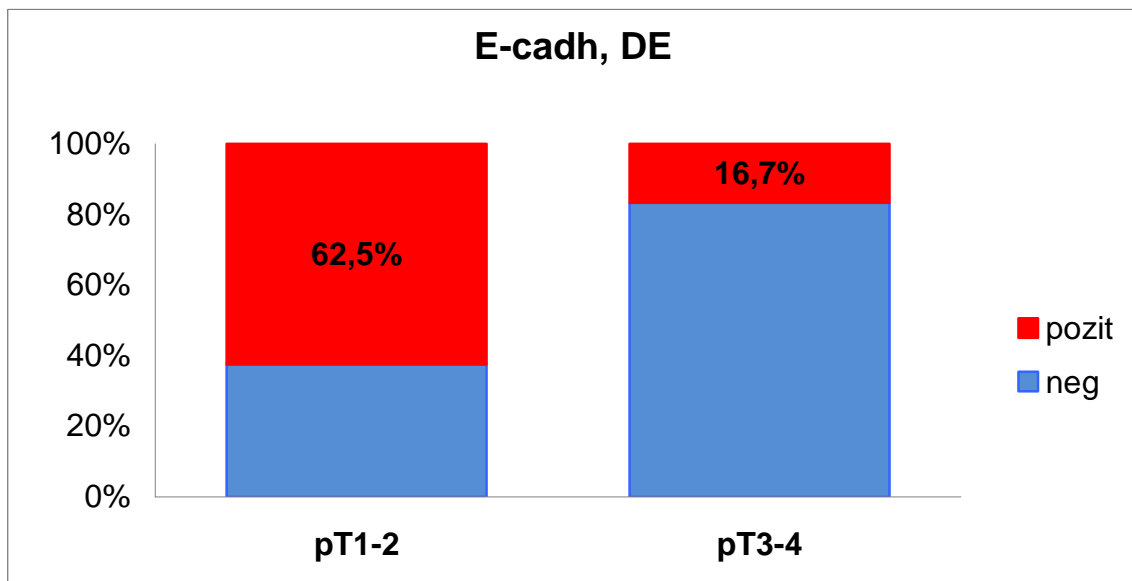
**Tab. 17:** Znázorňujúca výsledky Fisherovho presného testu vzoriek resekátu tumoru skupiny C vo vzťahu k pozitivite (>0)/negativite (=0) E-kadherínu.

**Crosstab**

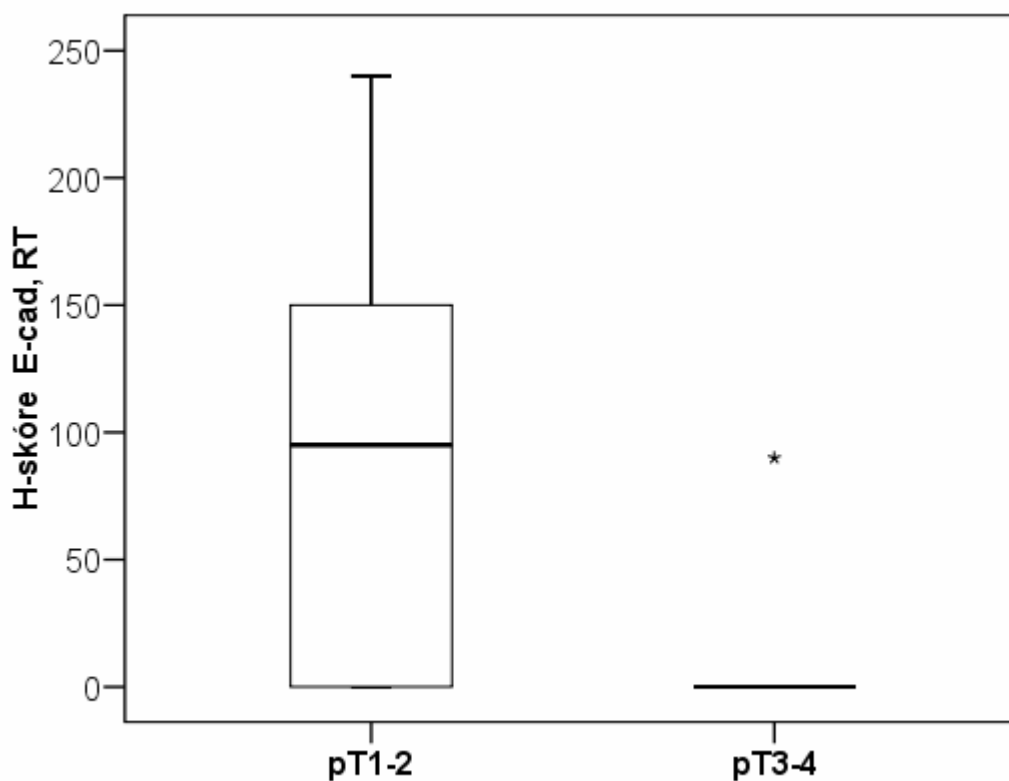
			E-cadh, po		Total
			0	> 0	
Staging	pT 1-2	Count	3	5	8
		% within Staging	37,5%	62,5%	100,0%
	pT 3-4	Count	5	1	6
		% within Staging	83,3%	16,7%	100,0%
Total		Count	8	6	14
		% within Staging	57,1%	42,9%	100,0%

**Fisher's Exact Test**

	Value	Exact Sig. (2-sided)
Fisher's Exact Test		,138
N of Valid Cases	14	



**Obr. 52:** Stĺpcový graf vyjadrujúci percentuálny podiel E-kadherín pozitívnych a negatívnych vzoriek resektátu tumoru skupiny C.



**Obr. 53:** Kvartilový box graf vyjadrujúci hodnoty expresie E-kadherínu (H-skóre) u vzoriek resektátu tumoru v závislosti od pT štádia.

## 5. Diskusia a závery

CD44 expresia bola v normálnom ústnom epiteli potvrdená imunohistochemickými analýzami používajúcimi monoklonové protilátky proti štandardnej ako aj proti variabilným izoformám CD44. Tak napr. expresia izoformami CD44v4, v6 a v9 bola popísaná v epiteli tonzily (Salmi et al. 1993; Mackay et al. 1994) a izoformami CD44v5, v6, v7, v8 a v10 v epiteli dutiny ústnej a faryngu (Herold-Mende et al. 1996). V podobnej štúdií, ktorá sa zaoberala imunohistochemickou analýzou CD44s a jej variabilných izoformami v histopatologických vzorkách z oblasti pery, bukálnej sliznice, jazyka, spodiny dutiny ústnej, gingívy a tvrdého podnebia bola zistená silná imunopozitivita v bazálnych a suprabazálnych vrstvách s výnimkou najpovrchovej vrstvy epitelu, ktorá vykazovala negatívnu expresiu. V tejto štúdií neboli napriek štruktúrálnej heterogenite orálneho epitelu zistené žiadne regionálne rozdiely v expresii sledovaných izoformami (Oliveira & Odell 1997). V ďalšej štúdií bola silná expresia CD44s a jej niektorých izoformami (v6, v7, v8) taktiež detekovaná v tkanivách z oblasti gingívy, jazyka a laryngu a stredne silná expresia bola potvrdená v submandibulárnej a parotickéj slinnej žľaze (Higashikawa et al. 1996). Z týchto štúdií je zjavné, že normálny epitel dutiny ústnej, faryngu a laryngu vykazuje výraznú expresiu CD44s a tiež niektorých jej variabilných izoformami.

S ohľadom na expresiu CD44 v malígnych nádoroch bolo zistené, že táto adhezívna molekula v nich vykazuje aberantnú expresiu. Kým v niektorých typoch nádorov súvisí zvýšená expresia CD44 s horšími biologickými vlastnosťami (Choi et al. 2000; Isozaki et al. 1998), u iných typov nádorov boli horšie biologické vlastnosti spojené naopak s jej nižšou expresiou (De Marzo et al. 1998; Sugino et al. 1996).

Výsledky dizertačnej práce odhalili u vzoriek diagnostickej excízie karcinómov jazyka (*skupina A: anatomická lokalizácia tumoru*) signifikantne nižšiu expresiu CD44s v porovnaní s ostatnými lokalitami dutiny ústnej, čo je v súlade s výsledkami iných autorov.

Imunohistochemická analýza 38 vzoriek spinocelulárneho karcinómu jazyka taktiež preukázala zníženú expresiu CD44s v tejto anatomickej lokalite (Masuda et al. 2000).

Podobne, González-Moles et al. vo svojej práci zastáva názor, že strata expresie CD44 môže byť u peritumorózneho tkaniva karcinómu jazyka považovaná za dôležitý moment v procese kancerogenézy (González-Moles et al. 2004). V ďalšej štúdií bolo zistené, že izoformy proteínu deltaNp63 indukujú expresiu CD44, pričom deltaNp63-β vykazovala najsilnejšiu indukciu tejto adhezívnej molekuly. Proteín p63 je transkripčný faktor, ktorý má významnú funkciu vo vývoji a diferenciacii epidermálnych štruktúr a taktiež v procese kancerogenézy.

Je členom rodiny nádorového supresoru p53 a vyskytuje sa minimálne v šiestich izoformách (TAp63  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ; deltaNp63  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ) (Boldrup et al. 2007). Boli zaznamenané rozdiely v expresii proteínu p63 v jednotlivých anatomických lokalitách spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej, čo je taktiež v súlade s našimi výsledkami. Konkrétne sa jednalo o signifikantné zníženie expresie tohto proteínu u karcinómov jazyka v porovnaní s normálnym tkanivom tejto lokality (Boldrup et al. 2011). Zníženie alebo strata expresie CD44s bola taktiež potvrdená aj v tumoroch z ďalších anatomických oblastí hlavy a krku.

Pri imunohistochemickom porovnávaní sinonazálnych invertovaných papilómov (SIP) s a bez prítomnosti spinocelulárneho karcinómu bolo zistené, že zatiaľ čo všetky SIP exprimovali CD44s, 60 % malígne transformovaných papilómov vykazovalo kompletnú stratu expresie a ostávajúcich 40 % vykazovalo len slabú expresiu CD44s (Ingle et al. 1998). U histopatologických vzoriek spinocelulárneho karcinómu z oblasti laryngu bola taktiež zistená znížená expresia štandardnej izoformy CD44 (Spafford et al. 1996).

Aj keď expresia E-kadherínu nevykazovala v našich výsledkoch štatisticky významné rozdiely vo vzťahu k anatomickej lokalizácii, je vidieť u tumorov jazyka zníženú expresiu tejto adhezívnej molekuly najmä v porovnaní s tumorami spodiny dutiny ústnej a tumorami z oblasti tvrdého podnebia, oro- a nazofaryngu (viď reprezentatívne histopatologické vzorky- str. 68-72, obr. 33-41).

V súvislosti s rozdielnym biologickým chovaním karcinómu pery v porovnaní s karcinómom jazyka bola vyhotovená zaujímavá štúdia porovnávajúca imunohistochemickú expresiu E-kadherínu a CD44v6 v týchto dvoch anatomických lokalitách. Výsledky tejto štúdie prekvapujúco zistili, že spinocelulárne karcinómy dolnej pery a jazyka nevykazujú signifikantné rozdiely v expresii týchto dvoch sledovaných molekúl (Cruz et al. 2009).

Ďalším sledovaným údajom bolo porovnanie diferenciácie tumoru vo vzťahu k expresii daných adhezívnych molekúl (skupina B). Pri porovnávaní vzoriek diagnostickej excízie a resekátu tumoru nebol v našej štúdii preukázaný štatisticky významný rozdiel medzi diferenciáciou tumoru (G1 versus G2/G3) a pozitivitou ( $>0$ )/negativitou ( $=0$ ) E-kadherínu, resp. CD44. Toto je v súlade so štúdiou Shinohara et al., v ktorej taktiež nebola pozorovaná korelácia medzi zníženou expresiou E-kadherínu a nižšou diferenciáciou tumoru v 54 vzorkách OSCC (Shinohara et al. 1998). Podobne v ďalšej imunohistochemickej štúdii so 71 vzorkami OSCC nebola zistená korelácia medzi diferenciáciou tumoru a expresiou tejto adhezívnej molekuly (Pyo et al. 2007). Na druhú stranu Yamada et al. popisuje signifikantnú asociáciu medzi nádorovou diferenciáciou a expresiou E-kadherínu. Kým v normálnom ústnom epiteli bola prítomná silná expresia tejto adhezívnej molekuly, u vzoriek OSCC

expresia E-kadherínu postupne klesala so znižujúcou sa diferenciáciou tumoru (Yamada et al. 1997). V ďalšej štúdií bola taktiež zistená korelácia medzi expresiou E-kadherínu a stupňom diferenciácie v OSCC (Simionescu et al. 2008). Podobne Kaur et al. pri imunohistochemickej analýze 37 histopatologických vzoriek OSCC zistil, že strata expresie E-kadherínu súvisí s nižšou diferenciáciou tumoru (Kaur et al. 2009) a rovnaká korelácia bola taktiež potvrdená vo vzorkách SCC z oblasti gingívy (Sakaki et al. 1994), pery či jazyka (Cruz et al. 2009). V súvislosti s adhezívnou molekulou CD44 a jej vzťahu k diferenciácii OSCC bola síce zistená korelácia medzi expresiou určitých variabilných izoforiem CD44 a stupňom diferenciácie, avšak korelácia medzi expresiou štandardnej izoformy CD44 a diferenciáciou tumoru v týchto štúdiách taktiež potvrdená nebola. Fonseca et al. vo svojej štúdií vyhodnocoval stupeň expresie izoforiem CD44v3, v4-5, v6 u vzoriek SCC jazyka pomocou imunohistochemických metód. Vo výsledkoch tejto štúdie bolo zistené zníženie expresie CD44v3 v 37,5% prípadov, v4-5 v 67,9% prípadov a v6 v 33,9% prípadov, pričom znížená expresia týchto variabilných izoforiem korelovala s diferenciáciou tumoru (Fonseca et al. 2001). V ďalšej štúdií bola zistená znížená expresia CD44v6 vo vzorkách HNSCC v porovnaní s benignými tumormi, či zdravým vrstevnatým dlaždicovým epitelom (Soukka et al. 1997). Bahar et al. popísal u ťažkých dysplázií orálneho epitelu zníženú expresiu tejto variabilnej izoformy v porovnaní s benignými hyperplastickými léziami (papilómy), ktoré vykazovali podobnú expresiu ako zdravý epitel (Bahar et al. 1997). Podobne, pri skúmaní variabilnej izoformy CD44v2 bola pri imunohistochemickej analýze histopatologických vzoriek HNSCC zistená významná korelácia medzi jej zníženou expresiou a diferenciáciou tumoru (Kanke et al. 2000).

Prehľad expresie jednotlivých izoforiem adhezívnej molekuly CD44 podľa výsledkov jednotlivých štúdií je znázornený v tab. 18.

**Tab. 18:** Znázorňujúca prehľad expresie adhezívnej molekuly CD44 a jej variabilných izoformiem v orofaciálnych karcinómoch podľa jednotlivých štúdií

CD44	Počet vzoriek	Tkanivo	Použitá metóda	Expresia	Referencie
CD44s	38	SCC jazyka	Imunohistochemia	Znížená v 38/38	Masuda et al. 2000
CD44 v3	13	OSCC (jazyk, tonzily, antrum)	Imunohistochemia	Silná až stredná v 12/13	Hudson et al. 1996
v4-v5				znížená v 13/13 s úplnou stratou expresie u nízko diferencovaných OSCC a v 50% stredne a dobre diferencovaných OSCC	
v6				nulová alebo veľmi slabá v 7/13	
v8				nulová alebo veľmi slabá v 5/13	
v3	56	SCC jazyka	Imunohistochemia	Nulová alebo veľmi slabá v 9/13	Fonesca et al. 2001
v4-5				Znížená v 37,5% prípadov	
v6				Znížená v 67,9% prípadov	
v6	100	OSCC	Imunohistochemia	Znížená v 33,9% prípadov	Bahar et al. 1997; Soukka et al. 1997
CD44s	89	HNSCC	Imunohistochemia	Zníženie alebo strata, ktorá korelovala s nižšou diferenciáciou tumoru	Kanke et al. 2000
v2				Bez zmeny	
V6				Znížená, ktorá korelovala s nižšou diferenciáciou tumoru	
V4	100	OSCC	Imunohistochemia	Bez zmeny	Piffko et al. 1996; Piffko et al. 1999
V5				Znížená	
V6				Bez zmeny	
V9				Bez zmeny	
CD44	27, 172	DEL, LSCC	Imunohistochemia pan-CD44	Znížená	Hirvikoski et al. 1999
CD44	34, 13, 35, 10, 17	LSCC, in situ karcinómy, dysplastické tkanivo, papilómy,	Imunohistochemia pan-CD44	Bez zmeny v DEL v porovnaní s normálnym epitelom, fokálne zníženie v LSCC, ktoré korelovalo s nižšou diferenciáciou tumoru	Ioachim et al. 1999
CD44				Progresívne zvýšenie v priebehu karcinogenézy laryngu	



		keratózy			
v6	277	HNSCC	Imunohistochemia	Bez zmeny alebo alebo marginálne zníženie v 268/277 tumorov	Van Hal et al. 1999
v5	55	OSCC	Imunohistochemia	Bez zmeny	Herold-Mende et al. 1996
v6				Bez zmeny	
v7				Znížená	
v8				Znížená	
v10				Znížená	
v9	40	OSCC	Imunohistochemia	Znížená v 47,5% prípadov, ktorá korelovala s diferenciáciou tumoru	Ue et al. 1998
CD44	66, 67	LSCC, keratózy	Imunohistochemia pan-CD44	Progresívne zvýšenie v priebehu karcinogenézy laryngu	Sugar et al. 1997

SCC- spinocelulárny karcinóm; OSCC- spinocelulárny karcinóm dutiny ústnej; HNSCC- spinocelulárny karcinóm hlavy a krku; DEL – dysplastický epitel laryngu; LSCC – spinocelulárny karcinóm laryngu

Zhrnutie výsledkov štúdií vo vzťahu k expresii konkrétnej variabilnej izoformy CD44 detekovanej imunohistochemickými metódami popisuje tab. 19.

**Tab. 19:** Expressia jednotlivých izoforiem CD44 vo vzorkách spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej.

<b>CD44</b>	<b>Tkanivo</b>	<b>Expressia</b>	<b>Referencie</b>
CD44	OSCC	silná až stredná v cca 90% prípadov	Hudson et al. 1996
CD44s	OSCC	bez zmeny v 100% prípadov	Kanke et al. 2000
CD44s	SCC jazyka	znížená v 100% prípadov	Masuda et al. 2000
v2	OSCC	znížená v 100% prípadov	Kanke et al. 2000
V3	OSCC	Znížená cca v 50% prípadov	Hudson et al. 1996; Fonseca et al. 2001
V4	OSCC	Znížená vo väčšine prípadov	Piffko et al. 1996; Stoll et al. 1998; Stoll et al. 1999
V4-5	OSCC	Znížená cca v 70% prípadov	Hudson et al. 1996; Fonseca et al. 2001; Kanke et al. 2000
V5	OSCC	Bez zmeny v 100% prípadov	Herold-Mende et al. 1996; Piffko et al. 1996; Piffko et al. 1999; Kuo et al. 1998
V6	OSCC	Zníženie cca v 60% prípadov	Hudson et al. 1996; Bahar et al. 1997; Kunichi et al. 1997; Stoll et al. 1998; Stoll et al. 1999
		Bez zmeny v 100% prípadov	Herold-Mende et al. 1996; Piffko et al. 1996; Piffko et al. 1999; Kuo et al. 1998; Kanke et al. 2000
V7	OSCC	Zníženie v cca 60% prípadov	Herold-Mende et al. 1996; Stoll et al. 1999
V7-8	OSCC	Zníženie v cca 35% prípadov	Kuo et al. 1998
V8	OSCC	Zníženie v cca 90% prípadov	Herold-Mende et al. 1996; Hudson et al. 1996
V9	OSCC	Zníženie v cca 60% prípadov	Piffko et al. 1996; Piffko et al. 1999; Ue et al. 1998
V10	OSCC	Zníženie v 100% prípadov	Herold-Mende et al. 1996

S ohľadom na predkladané štúdie je možné usudzovať, že zatiaľ čo zmeny v expresii niektorých variabilných izoforiem preukázateľne zohrávajú svoju úlohu v kancerogenéze v oblasti dutiny ústnej, iné nevykazujú v tejto súvislosti žiadne zmeny expresie. Piffko et al. vo svojej štúdií vyhodnocoval stupeň expresie CD44 variabilných izoforiem u 100 histopatologických vzoriek spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej a príbľého peritumorózneho tkaniva. Výsledky odhalili, že kým expresia izoforiem CD44v4 a v9 je u karcinómov dutiny ústnej silne potlačená, izoformy v5 a v6 vykazovali v tumore naopak silnú expresiu v porovnaní s normálnym ústnym epitelom (Piffko et al. 1999).

Nekonzistentné výsledky štúdií zaoberajúcich sa vzťahom medzi expresiou týchto adhezívnych molekúl a diferenciaciou OSSC môžu byť zapríčinené rozdielmi v expresii týchto molekúl v tumoroch z rozdielnych anatomických oblastí dutiny ústnej zistenými v dizertačnej práci.

Analýza vzťahu expresie CD44 k veľkosti tumoru (skupina C) preukázala signifikantnú závislosť medzi expresiou CD44 a objemom tumoru (pT), pričom strata expresie korelovala s pokročilejším pT štádiom. Tieto výsledky sú konzistentné s prácou González-Molesa et al., ktorý preukázal, že expresia CD44 koreluje u karcinómov jazyka s pT štádiom ochorenia (González-Moles et al. 2004).

Pri sledovaní expresie E-kadherínu bolo zistené zníženie expresie E-kadherínu (aj keď nie štatisticky významné) v súvislosti so zväčšujúcim sa objemom tumoru (pT), čo je taktiež v súlade s dostupnou literatúrou (Yamada et al. 1997).

Koncept nádorových kmeňových buniek predpokladá v nádorovej bunkovej populácii prítomnosť buniek, ktoré majú vlastnosti podobné bunkám kmeňovým. Nádorové kmeňové bunky sú definované ako subpopulácia nádorových buniek, ktoré majú jednak tumor-iniciujúce schopnosti a jednak schopnosti vytvoriť populáciu heterogénnych bunkových typov, ktorá sa vyskytovala v pôvodnom nádore (Clarke et al. 2006). Aj keď pôvodné zistenia naznačovali, že sa jedná o malú frakciu buniek nachádzajúcich sa v nádorovej bunkovej mase, nasledujúce štúdie zistili, že ich množstvo môže v nádorovej populácii buniek kolísat (Ishizawa et al. 2010). Taktiež bolo zistené, že množstvo týchto buniek koreluje u spinocelulárneho karcinómu hlavy a krku s jeho agresivitou (Joshua et al. 2012).

Bolo zistené, že malígne bunky *in vitro* vytvárajú rozpoznateľne odlišné kolónie buniek nazývané *holoklony*, ktoré vykazujú vlastnosti kmeňových buniek, ako je schopnosť sabaobnovy a produkcie diferencovaných buniek. V súvislosti s identifikáciou a izoláciou týchto nádorových buniek bolo zistené, že vykazujú vysoké hodnoty expresie určitých molekúl, ako napr. E-kadherínu a CD44 (Harper et al. 2007; Locke et al. 2005; Mackenzie

2006). Prince et al. popísali u CD44 pozitívnych buniek HNSCC schopnosť iniciovať aj v malom množstve rast tumoru v imunodeficientných myšiach, pričom CD44 negatívne bunky exprimujúce marker bunkovej diferenciácie Involucrin túto schopnosť nemali (Prince 2007). Na druhú stranu autori viacerých štúdií zistili, že strata expresie CD44 je u HNSCC nepriaznivým prognostickým faktorom (Esteban et al. 2005; Gonzalez-Moles et al. 2003; Stoll et al. 1999). Vzhľadom k týmto faktom ako aj výsledkom našej práce sa javí využitie adhezívnej molekuly CD44 ako potenciálneho markeru nádorovej kmeňovej bunky v OSCC ako problematické. Výsledky dizertačnej práce odhalili úplnú stratu expresie CD44 u všetkých histopatologických vzoriek karcinómu jazyka, čo by podľa predkladaného konceptu znamenalo úplnú absenciu nádorových kmeňových buniek v príslušnom tumore.

Toto tvrdenie podporuje aj štúdia skúmajúca expresiu CD44 u 32 karcinómov jazyka a príľahlého peritumorózneho tkaniva. Výsledky odhalili, že u tých karcinómov, ktoré vykazovali zníženú expresiu CD44, bola táto expresia znížená aj v okolitom peritumoróznom tkanive. Toto zníženie sa týkalo dysplastického ale aj histologicky normálne vyzerajúceho peritumorózneho tkaniva. Vzhľadom k tomu, že zdravý epitel dutiny ústnej vykazuje v bazálnych a suprabazálnych vrstvách epitelu dutiny ústnej výraznú expresiu CD44 (Oliveira & Odell 1997; Higashikawa et al. 1996), považujú autori štúdie zníženie tejto expresie za dôležitý moment v procese kancerogenézy jazyka (González-Moles et al. 2004).

V ďalšej štúdií bolo zase zistené, že aj CD44 negatívne bunky HNSCC vykazujú vlastnosti kmeňových buniek a rovnako sú schopné iniciovať rast tumoru v imunodeficientných myšiach (Oh et al. 2013).

V poslednej dobe pribúdajú stále nové molekuly využiteľné pri izolácii nádorových kmeňových buniek. Tak napr. Clay et al. popísali u buniek s vysokou aktivitou aldehyd dehydrogenázy (ALDH/high) omnoho väčšie tumor-iniciujúce schopnosti v porovnaní s bunkami s nízkou aktivitou tohto enzýmu. Konkrétne, v tejto štúdií zaberali bunky ALDH/high frakciu len 1 - 7,8% všetkých nádorových buniek (Clay et al. 2010; Hay 2005). Ďalej bolo nedávno popísané, že frakcia nádorových kmeňových buniek bunkových línií získaných zo spinocelulárneho karcinómu hlavy a krku, ktorá vykazuje vysokú expresiu CD44 existuje prinajmenšom v dvoch fenotypovo rozdielnych formách, ktoré sa líšia v expresii povrchových molekúl (Biddle et al. 2011). Pre tieto fenotypovo odlišné nádorové kmeňové bunky je charakteristické, že oba typy vykazujú vysokú expresiu CD44, ale odlišujú sa rozdielnou expresiou epitelového špecifického antigénu (angl. epithelial specific antigen, ESA). Nádorové kmeňové bunky s vysokým stupňom expresie CD44 a vysokým stupňom expresie ESA predstavujú epitelový fenotyp, zatiaľ čo nádorové kmeňové bunky s vysokým

stupňom expresie CD44 a nízkou expresiou ESA sú bunky, ktoré podstúpili proces nazývaný epitelovo-mezenchymálny prechod (angl. epithelial-mesenchymal transition, EMT) a získali schopnosť motility. Popísaný proces zmeny fenotypu môže prebiehať aj v opačnom smere tzv. mezenchymálno-epitelovým prechodom (angl. mesenchymal-epithelial transition, MET) (Brabletz et al. 2005; Mani et al. 2008).

Tieto nové zistenia snád' v budúcnosti prispesjú k lepšiemu pochopeniu patobiológie nádorových kmeňových buniek a ich úlohe v patogenéze malignít.

V dizertačnej práci predstavoval analyzovaný súbor 34 vzoriek OSCC, čo by mohlo byť vnímané ako nedostatočný počet pre vyvodenie štatisticky platných záverov. Na druhej strane v literatúre nachádzame množstvo rešpektovaných štúdií podobného alebo dokonca menšieho rozsahu zaoberajúce sa imunohistochemickou analýzou expresie adhezívnej molekuly CD44 a E-kadherínu vo vzorkách orofaciálnych karcinómov (Cruz et al. 2009; Yamada et al. 1997; Kaur et al. 2009; Sakaki 1994).

Výsledky dizertačnej práce odhalili zmeny v expresii adhezívnej molekuly CD44 v histopatologických vzorkách OSCC vo vzťahu k pT štádiu tumoru a taktiež výrazné regionálne rozdiely v expresii CD44 so signifikantne nižšou expresiou u tumorov jazyka v porovnaní s tumormi z ostatných anatomických lokalít dutiny ústnej.

Záverom je vhodné doporučiť zohľadnenie spomínaných regionálnych rozdielov pri hodnotení prognostického významu CD44 u tejto heterogénnej skupiny nádorov.

## 6. Literatúra

1. Abreu L, Kruger E, Tennant M. Lip cancer in Western Australia, 1982-2006: a 25-year retrospective epidemiological study. *Aust Dent J.* 2009;54(2):130-5.
2. Ahluwalia KP. Assessing the oral cancer risk of South-Asian immigrants in New York City. *Cancer.* 2005;104(12 Suppl):2959-61.
3. Ailles L, Prince M. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods Mol Biol.* 2009;568:175-93.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983-8.
5. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(Suppl 1):11830-5.
6. Altaner Ć. Biologické aspekty nádorového ochorenia. In: Kaušitz J, Altaner Ć, editors. *Onkológia.* Bratislava: VEDA; 2003. p. 38.
7. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol, Eur J Cancer.* 1995;31B:301-309.
8. Antoniadis DZ, Styaniadis K, Papanayotou P, Trigonidis G. Squamous cell carcinoma of the lips in a northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate--I. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31B(5):333-9.
9. Anwar M, Koriyama C, Naveed IA, Hamid S, Ahmad M, Itoh T, Minakami Y, Eizuru Y, Akiba S. Epstein-barr virus detection in tumors of upper gastrointestinal tract. An in situ hybridization study in Pakistan. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24(3):379-85.
10. Arjungi KN. Areca nut: a review. *Arzneimittelforschung.* 1976;26(5):951-6.
11. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990;61(7):1303-13.
12. Aziz SR. Oral submucous fibrosis: an unusual disease. *J N J Dent Assoc.* 1997;68(2):17-9.
13. Babu S, Bhat RV, Kumar PU, Sesikaran B, Rao KV, Aruna P et al. A comparative clinico-pathological study of oral submucous fibrosis in habitual chewers of pan masala and betelquid. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1996;34(3):317-22.
14. Bahar R, Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997;26(6):443-6.
15. Bankfalvi A, Krassort M, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(8):450-7.

16. Bapat SA. Cancer stem cells. Identification and targets. 1st. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2009.
17. Bapat SA. Evolution of cancer stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(3):204-13.
18. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:2302-6.
19. Bau DT, Tseng HC, Wang CH, Chiu CF, Hua CH, Wu CN et al. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncol.* 2008;44(11):1047-51.
20. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(7):2804-8.
21. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature.* 2004;432(7015):324-31.
22. Bickenbach JR, Mackenzie IC. Identification and localization of label-retaining cells in hamster epithelia. *J Invest Dermatol.* 1984;82(6):618-22.
23. Biddle A, Gammon L, Fazil B, Mackenzie IC. CD44 Staining of Cancer Stem-Like Cells Is Influenced by Down-Regulation of CD44 Variant Isoforms and Up-Regulation of the Standard CD44 Isoform in the Population of Cells That Have Undergone Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One.* 2013;8(2):e57314.
24. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res.* 2011;71(15):5317-26.
25. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001;105(7):829-41.
26. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282–3287.
27. Boldrup L, Coates PJ, Gu X, Nylander K. DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Pathol.* 2007;213:384-91.
28. Boldrup L, Coates PJ, Laurell G, Nylander K. Differences in p63 expression in SCCHN tumours of different sub-sites within the oral cavity. *Oral Oncol.* 2011;47:861-5.
29. Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44. *Immunology.* 1998;93(2):139-48
30. Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986;61:373–381.
31. Bouquot JE, Whitaker SB. Oral leukoplakia— Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases." *Quintessence Int.* 1994;25:133–140.
32. Bourguignon LY, Zhu D, Zhu H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci.* 1998;3:d637-49.

33. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):744-9.
34. Braun KM, Watt FM. Epidermal label-retaining cells: background and recent applications. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9(3):196-201.
35. Bruguere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tabacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer*. 1986;57, 391-397.
36. Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):405-26.
37. Caruso WR, Stewart ML, Nanda VK, Quismorio FP Jr. Squamous cell carcinoma of the skin in black patients with discoid lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1987;14(1):156-9.
38. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(19):9339-44.
39. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010;32(9):1195-201.
40. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946-51.
41. Cooper DL, Dougherty G, Harn HJ, Jackson S, Baptist EW, Byers J et al. The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;182(2):569-78.
42. Cruz I, Van den Brule AJ, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, Snow GB, Van der Waal I. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa-a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol*. 1997;33(3):182-8.
43. Cruz MC, Pereira AL, Lopes FF, Nonaka CF, Silva RR, Freitas Rde A et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin and CD44v6 in squamous cell carcinomas of the lower lip and tongue. *Braz Dent J*. 2009;20(1):64-9.
44. Daftary DK, Murti PR, Bhonsle RB, Gupty PC, Mehta FS, Pindborg JJ. Risk factors and risk markers for oral cancer in high incidence areas of the world. In: Johnson NW, ed. *Risk markers for oral diseases*. Vol 1. Oral cancer. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p. 29-63.
45. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(24):10158-63.
46. Dava BJ, Trivedi AH, Adhvarya SG. Role of areca nut consumption in the cause of oral cancers. A cytogenetic assessment. *Cancer*. 1992;70:1017-1023.
47. De Marzo AM, Bradshaw C, Sauvageot J, Epstein JI, Miller GJ. CD44 and CD44v6 downregulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture. *Prostate*. 1998;34(3):162-168.



48. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-I. *Foods. Oral Oncol.* 1999;35:17-21.
49. Dougherty GJ, Landorp PM, Cooper DL, Humphries RK. Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J Exp Med.* 1991;174(1):1-5.
50. Ee HL, Ng PP, Tan SH, Goh CL. Squamous cell carcinoma developing in two Chinese patients with chronic discoid lupus erythematosus: the need for continued surveillance. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(4):542-4.
51. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(2):207-14.
52. El Euch D, Zakraoui H, Ben Jannet S, Cherif F, Mokni M, Ben Tekaya N et al. Squamous cell carcinoma and discoid lupus erythematosus. Report of 2 cases. *Tunis Med.* 2004;82(10):980-3.
53. El-Mofty SK, Lu DW: Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(11):1463-70.
54. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2013-4-20]. Available from: <http://www.svod.cz>.
55. Escobar MR, Allison MJ, Dalton HP. Etiology and laboratory diagnosis of infectious mononucleosis: I. Epstein-Barr virus (EBV) mononucleosis. *Va Med Mon (1918).* 1970;97(2):138-9.
56. Espina N, Lima V, Lieber CS, Garro AJ. In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis.* 1988;9(5):761-6.
57. Esteban F, Bravo JJ, González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA et al. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Anticancer Res.* 2005;25(2A):1115-21.
58. Faassen AE, Schragar JA, Klein DJ, Oegema TR, Couchman JR, McCarthy JB. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol.* 1992;116(2):521-31.
59. Flaitz CM, Nichols CM, Adler-Storhiz K, et al. Intraoral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency syndrome virus infection. A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80:55–62.
60. Fonseca I, Pereira T, Rosa-Santos J, Soares J. Expression of CD44 isoforms in squamous cell carcinoma of the border of the tongue: A correlation with histological grade, pattern of stromal invasion, and cell differentiation. *J Surg Oncol.* 2001;76(2):115-20.
61. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Hariis AL et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res.* 1994;54(16):4539-46.
62. Franceschi S, Bidoli P, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx world wide:etiologiical clues. *Oral Oncol.* 2000;36:106-15.

63. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.* 1990;50(20):6502-7.
64. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 1998;279(5350):514-9.
65. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000;100(1):143-55.
66. Gandolfo S, Carrozzo M. Lichen planus and hepatitis C virus infection. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2002;48(2):89.
67. Garavello W, Foschi R, Talamini R, La Vecchia C, Rossi M, Dal Maso L, Tavani A, Levi F, Barzan L, Ramazzotti V, Franceschi S, Negri E. Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2008;122(8):1827-31.
68. Gayed M, Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Clarke A, Gordon C. Lupus and cancer. *Lupus.* 2009;18(6):479-85.
69. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(6):407-20.
70. Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer.* 2008;113(10 Suppl):3036-46.
71. Giri S, Idle JR, Chen C, Zabriskie TM, Krausz KW, Gonzalez FJ. A metabolomic approach to the metabolism of the areca nut alkaloids arecoline and arecaidine in the mouse. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(6):818-27.
72. Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Esteban F, Bascones-Martínez A, González-Moles S. Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncol.* 2004;40(3):281-6.
73. Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Gonzalez-Moles S et al. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in tongue cancer. *Anticancer Res.* 2003;23(6D):5197-202.
74. Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV, Tunnacliffe A, Parkar M, Solomon E et al. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur J Immunol.* 1982;12(8):659-63.
75. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 1999;52(4):189-96.
76. Gujuluva CN, Baek JH, Shin KH, Cherrick HM, Park NH. Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene.* 1994;9(7):1819-27.
77. Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jalnawalla PN et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1980;8(6):283-333.

78. Haque MF, Meghji S, Khitab U, Harris M. Oral submucous fibrosis patients have altered levels of cytokine production. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(3):123-8.
79. Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):594-603.
80. Harvey W, Scutt A, Meghji S, Canniff JP. Stimulation of human buccal mucosa fibroblasts in vitro by betel-nut alkaloids. *Arch Oral Biol.* 1986;31(1):45-9.
81. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 2005;233(3):706-20.
82. Herold-Mende C, Seiter S, Born AI, Patzelt E, Schupp M, Zöller J et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol.* 1996;179(1):66-73.
83. Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, Taniyama K, Ishikawa T, Tarin D et al. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues. *Int J Cancer.* 1996;66(1):11-7.
84. Hill MA. Early human development. *Clin Obstet Gynecol.* 2007;50(1):2-9.
85. Hirvikoski P, Tammi R, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Parkkinen JJ, Tammi M et al. Irregular expression of hyaluronan and its CD44 receptor is associated with metastatic phenotype in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 1999;434(1):37-44.
86. Hlavčák P. Imunohistochemia v diagnostike nádorov. In: Kaušitz J, Altaner Č, editors. *Onkológia.* Bratislava: VEDA; 2003. p. 313-14.
87. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science.* 2004;306(5701):1568-71.
88. Hudson DL, Speight PM, Watt FM. Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. *Int J Cancer.* 1996;66(4):457-63.
89. Huebner WW, Schoenberg JB, Kelsey JL, Wilcox HB, McLaughlin JK, Greenberg RS, Preston-Martin S, Austin DF, Stemhagen A, Blot WJ, et al. Oral and pharyngeal cancer and occupation: a case-control study. *Epidemiology.* 1992;3(4):300-9.
90. Chang MJW, Lin RF, Hsieh LL. Biological monitoring of environmental exposure to Safrole and the Taiwanese betel quid chewing. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2002;43: 432-437.
91. Chang YC, Hu CC, Tseng TH, Tai KW, Lii CK, Chou MY: Synergistic effects of nicotine on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30:458-464.
92. Chen JK, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer.* 1990;66:1288–1296.
93. Choi SH, Takahashi K, Eto H, Yoon SS, Tanabe KK. CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. *Int J Cancer.* 2000;85(4):523-526.
94. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):6758-62.

95. Ingle R, Jennings TA, Goodman ML, Pilch BZ, Bergman S, Ross JS. CD44 expression in sinonasal inverted papillomas and associated squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1998;109(3):309-14.
96. International Agency for Research on Cancer. Available from: [http://screening.iarc.fr/atlasoral\\_list.php](http://screening.iarc.fr/atlasoral_list.php)
97. International Agency for Research on Cancer. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Tobacco habits other than smoking; betel quid and areca-nut chewing; and some related nitrosamines. Lyons: IARC, 1985.
98. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 38. Lyon: IARC, 1986.
99. Ioachim E, Assimakopoulos D, Goussia AC, Peschos D, Skevas A, Agnantis NJ. Glycoprotein CD44 expression in benign, premalignant and malignant epithelial lesions of the larynx: an immunohistochemical study including correlation with Rb, p53, Ki-67 and PCNA. *Histol Histopathol.* 1999;14(4):1113-8.
100. Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R, Wang Q, Kowalski J, Susky E et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell.* 2010;7(3):279-82.
101. Isozaki H, Ohyama T, Mabuchi H. Expression of cell adhesion molecule CD44 and sialyl Lewis A in gastric carcinoma and colorectal carcinoma in association with hepatic metastasis. *Int J Oncol.* 1998;13(5):935-942.
102. Jacob BJ, Straif K, Thomas G, Ramadas K, Mathew B, Zhang ZF, Sankaranarayanan R, Hashibe M. Betel quid without tobacco as a risk factor for oral precancers. *Oral Oncol.* 2004;40(7):697-704.
103. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol.* 1992;116(3):817-25.
104. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71-96.
105. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001;65(4):328-39.
106. Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck.* 2012;34(1):42-9.
107. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:459-462.
108. Kammerer PW, Toyoshima T, Eletr S, Kammerer P, Kuhr K, Al-Nawas B, Brieger J. Single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene associated with incidence of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(10):786-792.
109. Kanke M, Fujii M, Kameyama K, Kanzaki J, Tokumaru Y, Imanishi Y et al. Clinicopathological significance of expression of CD44 variants in head and neck squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2000;91(4):410-5.

110. Kaur G, Carnelio S, Rao N, Rao L. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res.* 2009;20(1):71-6.
111. Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Vassalli P, Stamenkovic I. Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev.* 1997;11(8):996-1007.
112. Kim RH, Yochim JM, Kang MK, Shin KH, Christensen R, Park NH. HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. *Int J Oncol.* 2008;33(4):777-82.
113. Knudson AG Jr, Strong LC, Anderson DE. Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet.* 1973;9:113-58.
114. Knudson W. The role of CD44 as a cell surface hyaluronan receptor during tumor invasion of connective tissue. *Front Biosci.* 1998;3:d604-15.
115. Kolář Z et al. *Molekulární patologie nádorů. Vydání první.* Olomouc: EPAVA; 2003.
116. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg, JJ, Sobin LH. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46:518–539.
117. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.
118. Krump M, Ehrmann J. Differences in CD44s expression in HNSCC tumours of different areas within the oral cavity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012; doi: 10.5507/bp.2012.107. [Epub ahead of print]
119. Kuncová J, Mandys V, Heráček J, Lukeš M, Zchoval R, Urban M. Význam alterací adhezivních molekul CD44 v maligním chování nádorů. *Klinická onkologie.* 2003;16(4):171-7.
120. Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997;26(4):280-3.
121. Kuo MY, Cheng SJ, Chen HM, Kok SH, Hahn LJ, Chiang CP. Expression of CD44s, CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in betel quid chewing-associated oral premalignant lesions and squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(9):428-33.
122. Lafuente A, Maristany M, Arias C, Cuchi A, Lafuente MJ, Molina R, Ballesta A, Trasserra J. Glutathione and glutathione S-transferases in human squamous cell carcinomas of the larynx and GSTM1 dependent risk. *Anticancer Res.* 1998;18(1A):107-11.
123. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999;49:8-31.
124. Larsson LG, Sandström A, Westling P. Relationship of Plummer-Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden. *Cancer Res.* 1975;35:3308–3316.

125. Larsson PA, Johansson SL, Vahlne A, Hirsch JM. Snuff tumorigenesis: effects of long-term snuff administration after initiation with 4-nitroquinoline-N-oxide and herpes simplex virus type 1. *J Oral Pathol Med.* 1989;18(4):187-92.
126. Lewin F, Norell SE, Johansson H, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case-referent study in Sweden. *Cancer.* 1998;82:1367–1375.
127. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007;67(3):1030-7.
128. Liang XH, Lewis J, Foote R, Smith D, Kademani D. Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(9):1875-80.
129. Liao PH, Lee TL, Yang LC, Yang SH, Chen SL, Chou MY. Adenomatous polyposis coli gene mutation and decreased wild-type p53 protein expression in oral submucous fibrosis: a preliminary investigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(2):202-7.
130. Lin CT. Relationship between Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma pathogenesis. *Ai Zheng.* 2009;28(8):791-804.
131. Lind PO. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res.* 1987;95:449–455.
132. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(9):525-32.
133. Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005;65(19):8944-50.
134. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(2):164-78.
135. Lopes V, Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus-associated cancers: aetiology and treatment. *Herpes.* 2003;10(3):78-82.
136. Lu CT, Yen YY, Ho CS, Ko YC, Tsai CC, Hsieh CC et al. A case-control study of oral cancer in Changhua County, Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(5):245-8.
137. Luo CW, Roan CH, Liu CJ. Luo CW, Roan CH, Liu CJ. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(2):153-8.
138. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):71-82.
139. Mackenzie IC. Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(2):71-8.
140. Mackenzie IC. Stem cell properties and epithelial malignancies. *Eur J Cancer.* 2006;42(9):1204-12.

141. Maier H, Born IA, Veith S, Adler D, Seitz HK. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1986;10(4):425-7.
142. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-15.
143. Marichalar-Mendia X, Rodriguez-Tojo MJ, Acha-Sagredo A, Rey-Barja N, Aguirre-Urizar JM. Oral cancer and polymorphism of ethanol metabolising genes. *Oral Oncol.* 2010;46(1):9-13.
144. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer.* 1993;72:1369–1375.
145. Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin.* 1995;45:328–351.
146. Masuda M, Kuratomi Y, Shiratsuchi H, Nakashima T, Naonobu K, Komiyama S. Decreased CD44H expression in early-stage tongue carcinoma associates with late nodal metastases following interstitial brachytherapy. *Head Neck.* 2000;22(7):662-5.
147. Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC. Influence of glutathione s-transferase and cytochrome p450 polymorphisms on prognosis of head and neck cancer. *Laryngorhinootologie.* 2002;81(6):406-12.
148. Mazánek J. *Nádory orofaciální oblasti.* 1. vydání. Praha: EAST PUBLISHING a.s., VICTORIA PUBLISHING a.s.; 1997.
149. McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE. Spleen-colony formation in anemic mice of genotype WW. *Science.* 1964;144(3620):844-6.
150. McHugh JB. Association of cystic neck metastases and human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(11):1798-803.
151. McLaughlin JK, Gridley G, Block G, Winn DM, Preston-Martin S, Schoenberg JB, et al . Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:1237-43.
152. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 2009;143(2):195-208.
153. Meghji S, Scutt A, Harvey W, Canniff JP. An in-vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. *Arch Oral Biol.* 1987;32(3):213-5.
154. Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer.* 2006;43:60-6).
155. Meurman JH, Uittamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontol Scand.* 2008;66(6):321-6.
156. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;83(2):187-8.

157. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74.
158. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FS. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1985;13:340–341.
159. Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, et al . Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2000;86:122-7.
160. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(4):195-215.
161. Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. *Oral Oncol*. 2009;45(12):e245-8.
162. Oh SY, Kang HJ, Kim YS, Kim H, Lim YC. CD44-negative cells in head and neck squamous carcinoma also have stem-cell like traits. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):272-80.
163. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-7.
164. Oliveira DT, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by normal oral epithelia. *Oral Oncol*. 1997;33(4):260-2.
165. Ortiz GM, Pierce AM, Wilson DF. Palatal changes associated with reverse smoking in Filipino women. *Oral Dis*. 1996;2:232–237.
166. Orywal K, Jelski W, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in malignant diseases-part I. *Pol Merkur Lekarski*. 2008;24(144):565-7.
167. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(12):895-902).
168. Park K, Cherrick HM, Min BM, Park NH. Active HSV-1 immunization prevents the cocarcinogenic activity of HSV-1 in the oral cavity of hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;70(2):186-91.
169. Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis*. 1991;12(9):1627-31.
170. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.
171. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer*. 1997;79(3):595-604.
172. Pazdera J. Základy ústní a čelistní chirurgie. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci; 2007.



173. Piffkò J, Bàngkfalvi A, Joos U, Ofner D, Krassort M, Schmid KW. Immunophenotypic analysis of normal mucosa and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Detect Prev.* 1999;23(1):45-56.
174. Piffkò J, Bàngkfalvi A, Klauke K, Dreier R, Joos U, Böcker W et al. Unaltered strong immunohistochemical expression of CD44-v6 and -v5 isoforms during development and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(9):502-6.
175. Pindborg JJ, Barmes D, Roed-Peterson B. Epidemiology and histology of oral leukoplakia and leukoedema among Papuans and New Guineans. *Cancer.* 1968;22:379-84.
176. Pindborg JJ, Mehta FS, Gupta PC, et al. Reverse smoking in Andhra Pradesh, India: A study of palatal lesions among 10,169 villagers. *Br J Cancer.* 1971;25:10-20.
177. Pindborg JJ, Renstrup G, Poulsen HE, et al. Studies in oral leukoplakia.V. Clinical and histologic signs of malignancy. *Acta Odont Scand.* 1963;21:407-414.
178. Pogoda JM, Preston-Martin S. Solar radiation, lip protection, and lip cancer risk in Los Angeles County women (California, United States).*Cancer Causes Control.* 1996;7(4):458-63.
179. Poruban D, Bolješiková E. Karcinómy pery a ústnej dutiny, slinných žliaz, faryngu a laryngu. In: Kaušitz J, Altaner Č, editors. *Onkológia.* Bratislava: VEDA; 2003. p. 313.
180. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 2004;39(3):155-65.
181. Potten CS, Kovacs L, Hamilton E. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet.* 1974;7(3):271-83.
182. Potten, CS, Schofield R, Lajtha, LG. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979;560:281-99.
183. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P et al. 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.* 2007;104(3):973-8.
184. Pukkala E, Notkola V. Cancer incidence among Finnish farmers, 1979-93. *Cancer Causes Control.* 1997;8(1):25-33.
185. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007;35(1):1-9.
186. Queyrat L. Erythroplasie de gland. *Bull Soc Franc Derm Syph.* 1911;22:378-382.
187. Raab-Traub N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(6):431-41.
188. Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:1-22.
189. Ralhan R, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B, Srivastava A. Association between polymorphism in p21(Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene and human oral cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2440-7.

190. Ralston A, Rossant J. Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin Genet.* 2005;68(2):106-12.
191. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Investig.* 2001;5(4):207-13.
192. Reichart PA. Oral precancerous conditions-an overview. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2003;7(4):201-7.
193. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-11.
194. Ries LAG, Hankey BF, Miller BA, Hartman AM, Edwards BK. *Cancer Statistics Review 1973-1988.* National Cancer Institute, NIH Publication. 1991;91-2789.
195. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ et al. editors. *SEER cancer statistics review, 1975-2005.* National Cancer Institute. Available from: URL:[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005). Accessed May 15, 2008.
196. Sakaki T, Wato M, Kaji R, Mushimoto K, Shirasu R, Tanaka A. Correlation of E- and P-cadherin expression with differentiation grade and mode of invasion in gingival carcinoma. *Pathol Int.* 1994;44(4):280-6.
197. Salmi M, Grön-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol.* 1993;122(2):431-42.
198. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(5):586-92.
199. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):12160-4.
200. Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol.* 1998;14:67-95.
201. Seitz HK, Stickel F, Homann N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Int J Cancer.* 2004;108(4):483-7.
202. Sellappa S, Balakrishnan M, Raman S, Palanisamy S. Induction of micronuclei in buccal mucosa on chewing a mixture of betel leaf, areca nut and tobacco. *J Oral Sci.* 2009;51(2):289-92.
203. Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer.* 1975;36:1021–1028.
204. Shah B, Lewis MA, Bedi R. Oral submucous fibrosis 11 year-old Bangladeshi girl living in United Kingdom. *Br Dent J.* 2001;191:130-2.
205. Shin KH, Tannyhill RJ, Liu X, Park NH. Oncogenic transformation of HPV-immortalized human oral keratinocytes is associated with the genetic instability of cells. *Oncogene.* 1996;12(5):1089-96.

206. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol.* 1998;184(4):369-81.
207. Schwimmer E. Die idiopathischen Schleim-hautplaques der Mundhöhle (Leukoplakia buccalis). *Arch Dermat Syph.* 1877;9:570–611.
208. Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc.* 2001;132:7S–11S.
209. Silverman S Jr. Epidemiology. In: Silverman S Jr ed. *Oral Cancer.* 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc; 1998. p. 1-6.
210. Silverman S Jr. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J Am Dent Assoc.* 1968;76:772–777.
211. Silverman S Jr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia. A follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;84:154–157.
212. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: A follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984;53:563–568.
213. Silverman S Jr, Shillitoe EF. Etiology and Predisposing Factors. In: Silverman S Jr ed. *Oral Cancer,* 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc;1998. p. 7-24.
214. Simionescu C, Mărgăritescu C, Surpățeanu M, Mogoantă L, Zăvoi R, Ciurea R et al. The study of E-cadherine and CD44 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;49(2):189-93.
215. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401.
216. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science.* 2000;287(5457):1431-3.
217. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol.* 1998;51(4):191-200.
218. Soukka T, Salmi M, Joensuu H, Häkkinen L, Sointu P, Koulu L et al. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res.* 1997;57(11):2281-9.
219. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;122(6):627-32.
220. Spangrude GJ, Aihara Y, Weissman IL, Klein J. The stem cell antigens Sca-1 and Sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets. *J Immunol.* 1988;141(11):3697-707.
221. Steenland K. Laryngeal cancer incidence among workers exposed to acid mists (United States). *Cancer Causes Control.* 1997;8(1):34-8.

222. Stickel F, Schuppan D, Hahn EG, Seitz HK. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut*. 2002;51(1):132-9.
223. Stoll C, Baretton G, Soost F, Löhrs U. The influence of CD44 splice variants to the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 1998;451:51-5.
224. Stoll C, Baretton G, Soost F, Terpe HJ, Domide P, Löhrs U. Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 1999;35(5):484-9.
225. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(4):820-4.
226. Sugár J, Vereczkey I, Tóth J, Péter I, Bánhidly F. New aspects in the pathology of the preneoplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1997;527:52-6.
227. Sugeran PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis*. 1997;3(3):130-47.
228. Sugino T, Gorham H, Yoshida K, Bolodeoku J, Nargund V, Cranston D et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol*. 1996;149(3):873-882.
229. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
230. Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):368-81.
231. Tang JG, Jian XF, Gao ML, Ling TY, Zhang KH. Epidemiological survey of oral submucous fibrosis in Xiangtan city, Hunan Province, China. *Commun Dentist Oral Epidemiol*. 1997;25:177-80.
232. Thomas G, Hashibe M, Jacob BJ, Ramadas K, Mathew B, Sankaranarayanan R, Zhang ZF. Risk factors for multiple oral premalignant lesions. *Int J Cancer*. 2003;107(2):285-91.
233. Tilakaratne WM, Klinikowski MF, Saku T, Peters TJ, Warnakulasuriya S. Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis. *Oral Oncol*. 2006;42(6):561-8.
234. Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(5):1225-9.
235. Toyama-Sorimachi N, Sorimachi H, Tobita Y, Kitamura F, Yagita H, Suzuki K, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7437-44.
236. Trivedy CR, Warnakulasuriya KA, Peters TJ, Senkus R, Hazarey VK, Johnson NW. Raised tissue copper levels in oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(6):241-8.
237. Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R, Hyman R, Trotter J. Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. *Immunogenetics*. 1982;15(3):299-312.

238. Tuyns AJ. Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinking smokers. *Int J Cancer*. 1983;32(4):443-4.
239. Ue T, Yokozaki H, Kagai K, Higashikawa K, Yasui W, Sugiyama M et al. Reduced expression of the CD44 variant exons in oral squamous cell carcinoma and its relationship to metastasis. *J Oral Pathol Med*. 1998;27(5):197-201.
240. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol*. 2007;43(8):742-8.
241. van Hal NL, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Snow GB, Brakenhoff RH. Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;82(6):837-45.
242. Van Wyck CW, Stander I, Padayachee A, Grobler-Rabie AF. The areca nut chewing habit and oral squamous cell carcinoma in South African Indians. *S Afr Med J*. 1993;83:425-429.
243. Wake M. The urban/rural divide in head and neck cancer-the effect of atmospheric pollution. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1993;18(4):298-302.
244. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited: A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer*. 1975;36:1386-1392.
245. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-80.
246. Warnakulasuriya S, Trivedy C, Peters TJ. Areca nut use: an independent risk factor for oral cancer. *BMJ*. 2002;324(7341):799-800.
247. Watts JM. The importance of the Plummer-Vinson syndrome in the etiology of carcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Postgrad Med J*. 1961;37:523-533.
248. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 1996;271(5248):509-12.
249. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007;448(7151):318-24.
250. WHO. Meeting report. Control of oral cancer in developing countries. *WHO Bull* 1984;62:617.
251. Winn DM, Blot WJ, Shy CM, Pickle LW, Toledo A, Fraumeni JF Jr. Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. *N Engl J Med* 1981;304:745-749.
252. World Health Organization. Oral Health Epidemiology (2001). Available from: <http://www.afro.who.int/oralhealth/epidemiology.html>
253. World Health Organization. Report of a meeting of investigators on the histological definition of precancerous lesions. Geneva: World Health Organization, 1973, Can/731.
254. Wotke J. Patologie orofaciální oblasti. 1. vydanie. Praha: Grada Publishing spol. s. r. o.; 2001.

255. Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer*. 1977;40(4 Suppl):1872-8.
256. Xue JL, Fan MW, Wang SZ, Chen XM, Li Y, Wang L. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(8):467-72.
257. Yamada K, Jordan R, Mori M, Speight PM. The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 1997;3(2):82-5.
258. Yapijakis C, Serefoglou Z, Vylliotis A, Nkenke E, Derka S, Vassiliou S et al. Association of polymorphisms in Tumor Necrosis Factor Alpha and Beta genes with increased risk for oral cancer. *Anticancer Res*. 2009;29(6):2379-86.
259. Zain RB, Gupta PC, Warnakulasuriya S, Shrestha P, Ikeda N, Axell T. Oral lesions associated with betel quid and tobacco chewing habits. *Oral Dis*. 1997;3(3):204-5.
260. Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012;48(1):1-9.

## 7. Zoznam skratiek

AA	acetaldehyd
ABC	transportný proteín (ATP binding cassette)
ALDH	aldehyd dehydrogenáza
BMI- 1	onkogén (polycomb ring finger oncogene)
CDLE	chronický diskoidný lupus erythematosus
CD	adhezívna molekula (cluster of differentiation)
CNS	centrálny nervový systém
CSC	nádorové kmeňové bunky
CTAs	cancer testis antigens
CYP2E1	cytochróm P450 2E1
CXCR4	chemokínový receptor typ 4
DAB	3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid
DE	diagnostická excízia
DEL	dysplastický epitel laryngu
deltaNp63	izoforma proteínu p63
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barrovej vírus
E-cad	E-kadherín, adhezívna molekula
EMT	epitelovo-mezenchymálny prechod
EpCAM	epitelová adhezívna molekula
ESA	epitelový špecifický antigén
EZH 2	gén kódujúci enzým histón-lyzín-N-metyltransferáza
E6	onkoproteín kódovaný ľudským papilomavírusom
E7	onkoproteín kódovaný ľudským papilomavírusom
G	grading, diferenciácia tumoru
GIT	gastrointestinálny trakt
HA	kyselina hyaluronová
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti
HNSCC	spinocelulárny karcinóm hlavy a krku
HPV	ľudský papilomavírus
HSV	herpes simplex vírus
ICM	vnútorná bunková masa
IHC	imunohistochemia
Ku70	proteín (Lupus Ku autoantigen protein p70)
LR	značku zadržávajúce
LSCC	spinocelulárny karcinóm laryngu
MET	mezenchymálno-epitelový prechod
MNDU	malígne nádory dutiny ústnej

NNK	4-(methylnitrosamino)- 1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	nitrosonornikotín
NPC	nazofaryngeálny karcinóm
Oct 4	transkripčný faktor, octamer-binding transcription factor 4
OLL	orálne lichenoidné lézie
OLP	orálny lichen planus
OSF	orálna submukózna fibróza
OSCC	spinocelulárny karcinóm dutiny ústnej
PAU	polycyklické aromatické uhľovodíky
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pRb	proteín Rb génu
p21	inhibítor cyklín-dependentnej kinázy
p53	proteín génu TP53
RB	gén retinoblastomu, nádorový supresor
RT	resekát tumoru
RTG	röntgen
SCC	spinocelulárny karcinóm
SCCL	spinocelulárny karcinóm pery
SIP	sinonazálne invertované papilómy
SLE	systémový lupus erythematosus
Sox2	transkripčný faktor
TA	transit-amplifying
TAp63	izoforma proteínu p63
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TP53	tumor supresorový gén
TRIS	tris (hydroxymetyl) aminometán
UV	ultrafialové žiarenie
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
Wnt	transkripčný faktor (wingless type)



## 8. Publikácie autora

### **Pôvodné práce súvisiace s témou uverejnené v časopise s IF:**

**Krump M.**, Ehrmann J.: Differences in CD44s expression in HNSCC tumours of different areas within the oral cavity. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2012, doi: 10.5507/bp.2012.107. [Epub ahead of print]; IF: 0,702.

### **Pôvodné práce súvisiace s témou uverejnené v recenzovanom časopise:**

**Krump M.**, Ehrmann J.: Expresia adhezívnych molekúl CD44 a E-kadherínu vo vzťahu k diferenciácii a pT štádiu spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej. Prijatie publikácie do časopisu STOMATOLÓG č. 1/2013.

### **Prehľadové práce súvisiace s témou uverejnené v recenzovanom časopise:**

**Krump M.**, Ehrmann J.: Nádorové kmeňové bunky spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej. Identifikácia a klinický význam. Stomatológ 2009; XIX(2): 31-35.

**Krump M.**, Ehrmann J.: Ľudské papilomavírusy v patogenéze spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej a orofaryngu. LKS 2010; 20(11): 229-233.

### **Ostatné prehľadové práce uverejnené v recenzovanom časopise:**

**Krump M.:** Angina bullosa hemorrhagica. Diferenciálna diagnostika. Stomatológ 2009; XIX (3): 49-53.

### **Publikované abstrakty prezentácií súvisiace s témou:**

1. **Krump M.:** Nádorové kmeňové bunky spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej. XII. Olomoucké onkologické dni; 5.-6. 2. 2009

2. **Krump M.**, Ehrmann J.: Ľudské papilomavírusy v patogenéze spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej a orofaryngu. XIII. Olomoucké onkologické dni; 4.-5. 2. 2010
3. **Krump M.**, Ehrmann J.: Prekancerózne lézie – klinicky a histopatologicky. XIV. Olomoucké onkologické dni; 10. -11. 2. 2011
4. **Krump M.**, Ehrmann J., Šimek J., Pazdera J.: Regionálne rozdiely v expresii adhezívnej molekuly CD44s vo vzorkách spinocelulárneho karcinómu dutiny ústnej. XV. Olomoucké onkologické dni; 9.- 10.2. 2012