

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie

Studijní obor:
Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Natálie Dalewská

Detekce a charakterizace makrofágů v nádorech virové a nevirové etiologie

Detection and characterization of macrophages in the tumors of viral and non-viral etiology

Diplomová práce

Školitel:
RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Konzultanti:
RNDr. Jana Šmahelová
Mgr. Barbora Pokrývková

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2020

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Šmahelové za zaškolení v laboratorních metodách, konzultace při provádění experimentů a vstřícný přístup. Také děkuji Mgr. Barboře Pokrývkové za metodickou pomoc, praktické připomínky a věnovaný čas.

Mé poděkování patří též celému kolektivu Laboratoře molekulární a nádorové virologie BIOCEV a Národní referenční laboratoře pro papillomaviry a polyomaviry v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze za pomoc při laboratorní práci a získávání experimentálních dat.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i mé rodině a příteli, kteří mě v průběhu celého studia podporovali.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu GAUK 1502118 „Detekce a charakterizace makrofágů v nádorovém mikroprostředí karcinomů hlavy a krku“ a jako doplnění grantové studie AZV 17-28055A „Stanovení fenotypu a funkce imunitních buněk jakožto prediktorů odpovědi na léčbu u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku“.

Abstrakt

Nádory hlavy a krku jsou etiologicky spojené s kouřením a konzumací alkoholu. Část těchto nádorů je však iniciována HPV a jejich incidence v posledních letech významně roste. Pacienti s virově indukovanými nádory vykazují lepší prognózu, a to i přesto, že tyto nádory bývají diagnostikovány v pokročilejším stádiu. Jedním z vysvětlení může být lepší stimulace imunitního systému virovými antigeny.

Makrofágy jsou buňky vrozeného imunitního systému, které patří mezi profesionální fagocyty. Po infiltraci do nádoru jsou označovány jako TAM a představují heterogenní skupinu buněk, jejíž dva základní fenotypy jsou protinádorové M1 a pronádorové M2 makrofágy. U mnoha typů nádorů tvoří TAM hlavní složku nádorového mikroprostředí. Jedním z nich jsou i nádory hlavy a krku.

Ve své práci jsem se zaměřila na imunohistochemickou detekci populací M1 a M2 makrofágů v nádorech hlavy a krku virové a nevirové etiologie a současně jsem metodou RT-qPCR analyzovala expresi makrofágových a/nebo imunosupresivních genů *IDO1*, *ARG1*, *CD163*, *NOS2* a *PTGS2*. Ve studii jsem prokázala větší počet M2 makrofágů s typickými znaky CD163, ARG1 a PTGS2 u HPV negativních nádorů. Pacienti s těmito nádory mají horší prognózu onemocnění.

Znaky pro odlišení jednotlivých populací TAM, které jsou charakteristické vysokou plasticitou, jsou stále předmětem diskuzí. Vztah imunity, etiologie nádoru a prognózy pacientů s těmito nádory je v současnosti také intenzivně zkoumán. Tato studie přispívá k detailnímu porozumění dynamiky TAM v nádorech hlavy a krku různé etiologie.

Klíčová slova: makrofágy, makrofágy asociované s nádory, HPV, nádory hlavy a krku, nádorové mikroprostředí, imunohistochemie

Abstract

Head and neck cancers are etiologically associated with smoking and alcohol consumption. Part of these tumors is induced by HPV and their incidence is increasing in the last decade. Patients with virally induced tumors have better prognosis even though they are usually diagnosed with tumors in advanced stage. One of the possible explanations may be better stimulation of the immune system by viral antigens.

Macrophages are cells of the innate immune system which belong to professional phagocytes. They are called TAM upon infiltration to the tumor where they represent heterogeneous group of cells. Two main phenotypes are antitumor M1 and protumor M2 macrophages. TAMs are a major component of tumor microenvironment of many types of tumors, one of them are also head and neck cancers.

In my thesis I focused on the immunohistochemical detection of M1 and M2 macrophages in the head and neck tumors of viral and non-viral etiology and at the same time RT-qPCR analyses of gene expression of macrophage-associated and/or immunosuppressive genes *IDO1*, *ARG1*, *CD163*, *NOS2* and *PTGS2* was performed. My data showed that HPV-negative tumors had higher number of M2 macrophages with typical markers CD163, ARG1 and PTGS2. It is known that patients with these tumors have worse prognosis of the disease.

Due to high plasticity of macrophages, markers for determination of individual populations of TAM are still intensively discussed topic. Currently relation of immunity, etiology and prognosis of these tumors are intensively investigated. This study adds to understanding of the dynamics of TAM in head and neck cancer of different etiology.

Key words: macrophages, tumor-associated macrophages, HPV, head and neck cancer, tumor microenvironment, immunohistochemistry

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Přehled literatury.....	12
2.1	Makrofágy.....	12
2.1.1	Makrofágy asociované s nádory.....	16
2.1.2	Znaky typické pro makrofágy.....	18
2.2	Nádory hlavy a krku.....	21
2.2.1	Nádorové mikroprostředí u nádorů hlavy a krku.....	25
2.3	Lidský papilomavirus (HPV).....	28
2.3.1	Klasifikace a popis viru.....	28
2.3.2	Životní cyklus a mechanismy karcinogeneze vyvolané HPV.....	29
2.3.3	Onemocnění spojená s HPV.....	31
2.3.4	HPV a imunitní systém.....	33
3	Cíle práce.....	35
4	Materiál a metody.....	36
4.1	Vzorky pacientů a použité buněčné linie.....	36
4.2	Multispektrální imunohistochemie.....	38
4.2.1	Průběh detekce buněčných znaků.....	39
4.2.2	Kontroly pro multispektrální imunohistochemii.....	40
4.2.3	Tvorba multiplexového panelu.....	41
4.2.4	Analýza vzorků a tvorba algoritmu.....	42
4.2.5	Statistické vyhodnocení.....	45
4.3	Příprava nukleových kyselin.....	46
4.3.1	Izolace nukleových kyselin z FFPE.....	46
4.3.2	Izolace nukleových kyselin z buněk uchovaných v médiu RNeasy®.....	47
4.3.3	Určení koncentrace a kvality nukleových kyselin.....	48
4.4	Charakterizace vzorků.....	51
4.4.1	Detekce DNA HPV a určení typu HPV.....	51
4.4.2	Reverzní transkripce.....	54
4.4.3	Detekce aktivní virové infekce.....	55
4.5	Detekce exprese makrofágových a imunosupresivních znaků.....	56
4.5.1	Statistické vyhodnocení.....	58

5	Výsledky	59
5.1	Epidemiologické charakteristiky pacientů	59
5.2	Multispektrální imunohistochemie	60
5.2.1	Optimalizace protilátek a tvorba multiplexového panelu	60
5.2.2	Kontroly pro multispektrální imunohistochemii	65
5.2.3	Tvorba algoritmu a analýza vzorků	68
5.2.4	Statistické vyhodnocení	70
5.3	Příprava nukleových kyselin	75
5.3.1	Optimalizace metod a výběr typu klinického materiálu	75
5.3.2	Izolace nukleových kyselin	79
5.3.3	Určení koncentrace a kvality nukleových kyselin	80
5.4	Charakterizace vzorků	84
5.4.1	Detekce DNA HPV a určení typu HPV	84
5.4.2	Reverzní transkripce	86
5.4.3	Detekce aktivní virové infekce	87
5.5	Detekce exprese makrofágových a imunosupresivních znaků	90
5.5.1	Statistické vyhodnocení	96
5.6	Korelace výsledků IHC a qPCR	98
6	Diskuze	99
7	Souhrn	106
8	Seznam použité literatury	107

Seznam zkratek

zkratka	anglický název	český název
12PHH	primary human hepatocytes	primární lidské hepatocyty
Ab	antibody	protilátka
APC	antigen presenting cell	buňka prezentující antigen
AR	antigen retrieval	odhalení antigenů
ARG1	arginase 1	argináza 1
bio-BSGP6+	broad-spectrum primers 5' biotinylated targeting the GP6+ region	širokospektrální primery značeny na 5' konci biotinem cílící GP6+ region
BSGP5+	broad-spectrum primers targeting the GP5+ region	širokospektrální primery cílící na GP5+ region
CCL	chemokine C-C motif ligand	ligand chemokinu s C-C motivem
CD	cluster of differentiation	diferenciační skupina
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
COX-2	cyclooxygenase 2	cyklooxygenáza 2
Ct	cycle of threshold	cyklus prahové hodnoty
CXCL	chemokine C-X-C motif ligand	ligand chemokinu s C-X-C motivem
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidin-2-fenylindol
DC	dendritic cell	dendritická buňka
dH₂O	distilled water	destilovaná voda
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates	deoxynukleotid trifosfáty
E	early	časný
E2F	E2 factor	faktor E2
E6AP	E6-associated protein	protein asociovaný s proteinem E6
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EMT	epithelial-mesenchymal transition	epiteliálně-mezenchymální tranzice
EtOH	ethanol	etanol
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	fixováno formalínem a zalito do parafínu
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
FN	-	fakultní nemocnice
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GUSB	β-glucuronidase	β-glukuronidáza
hACTB	human actin cytoplasmic beta	lidský cytoplazmatický beta aktin
HIF-1-α	hypoxia-inducible factor 1-alfa	faktor 1-alfa indukovaný hypoxií
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus

HPV⁻	-	negativní na HPV
HPV⁺	-	pozitivní na HPV
HR-HPV	high-risk human papillomavirus	vysoce rizikový typ lidského papilomaviru
HRP	horseradish peroxidase	křenová peroxidáza
IDO1	indoleamine-2,3-dioxygenase 1	indolamin-2,3-dioxygenáza 1
IFN-γ	interferon gamma	interferon gama
IHC	immunohistochemistry	imunohistochemie
IL	interleukin	interleukin
JAK3	Janus kinase 3	Janusova kináza 3
L	late	pozdní
LC	Langerhans cell	Langerhansova buňka
LCR	long control region	dlouhá kontrolní oblast
LPS	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
LR-HPV	low-risk human papillomavirus	nízko rizikový typ lidského papilomaviru
M1	macrophages type 1	makrofágy typu 1
M2	macrophages type 2	makrofágy typu 2
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	faktor stimulující kolonie makrofágů
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
MIP-3	macrophage inflammatory protein 3	makrofágový zánětlivý protein 3
MMP	matrix metalloprotease	matrixová metaloproteáza
NaCl	sodium chloride	chlorid sodný
NaH₂PO₄	monosodium phosphate	dihydrogenfosforečnan sodný
NBF	neutral buffered formalin	neutrální pufrovaný formalín
NF-κB	nuclear factor kappa B	jaderný faktor kappa B
NK	natural killer cell	buňka přirozený zabiják
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
NOS2	nitric oxide synthase 2	syntáza 2 oxidu dusnatého
NRL PV	-	Národní referenční laboratoř pro papilomaviry a polyomaviry
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma	dlaždicobuněčný karcinom orofaryngu
ORL	otorhinolaryngology	otorinolaryngologie
OSCC	oral squamous cell carcinoma	dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní
OVN	over-night	přes noc
p16	protein 16	protein 16
p53	protein 53	protein o molekulové hmotnosti 53 kDa
pb	base pairs	páry bazí
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	periferní krevní mononukleární buňky
PBS	phosphate-buffered saline	fosfátový pufr
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PD-1	programmed death 1	receptor 1 programované buněčné smrti
PD-L1	programmed death-ligand 1	ligand 1 receptoru programované buněčné smrti

PIGF	placental growth factor	placentární růstový faktor
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	prostaglandin-endoperoxid syntáza 2
qPCR	quantitative PCR	kvantitativní PCR
RFU	relativní jednotky fluorescence	relative fluorescence units
RLB	reverse line blot assay	zpětná hybridizace produktů amplifikace na membránu
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	médium vyvinuté v Roswell Park Memorial Institutu
RQI	RNA quality indicator	indikátor kvality RNA
RT	room temperature	pokojová teplota
RT-qPCR	reverse transcription quantitative PCR	kvantitativní PCR s produktem reverzní transkripce
SSPE	saline-sodium phosphate-EDTA	chlorid sodný-dihydrogenfosforečnan sodný-EDTA
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	přenašeč signálu a aktivátor transkripce 1
TAM	tumor-associated macrophages	makrofágy asociované s nádorem
TBE	Tris - borate - EDTA	Tris - borát - EDTA
TBST	tris-buffered saline and polysorbate „Tween“	
TGF-β	transforming growth factor beta	transformující růstový faktor beta
Th	helper T lymphocyte	pomocný T lymfocyt
TIL	tumor infiltrating lymphocyte	lymfocyty infiltrující nádor
TLRs	toll-like receptors	receptory skupiny podobné toll
TNF-α	tumor necrosis factor alfa	faktor nádorové nekrózy alfa
TNM	tumor-node-metastasis classification	klasifikace nádoru, uzlin a metastáz
Treg	regulatory T lymphocyte	regulační T lymfocyt
Tu16T	-	tkáň tonsilárního karcinomu
ÚHKT	-	Ústav hematologie a krevní transfuze
URR	upstream regulatory region	předcházející regulační oblast
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor

1 Úvod

Makrofágy se řadí mezi profesionální fagocyty a jejich hlavní funkcí je fagocytóza vlastních odumřelých buněk a současně i likvidace cizích pohlcených mikroorganismů. Makrofágy pochází z myelomonocytické linie a přeměna monocytů na makrofágy je důležitou součástí obrany organismu před patogeny a při poškození tkáně. Makrofágy současně prezentací antigenů T lymfocytům propojují vrozenou a adaptivní imunitu.

Makrofágy infiltrující nádory, označované jako TAM (z angl. tumor-associated macrophages), představují jednu z nejdůležitějších komponent nádorového mikroprostředí a hrají roli při progresi různých typů pevných nádorů. Polarizace a funkce TAM jsou silně ovlivněny imunitními buňkami a jimi produkovanými cytokiny a faktory. Existují dva základní fenotypy TAM, a to M1 (z angl. macrophages type 1) a M2 (z angl. macrophages type 2) makrofágy, ale v závislosti na cytokinovém prostředí mohou mezi těmito fenotypy přecházet. TAM reprezentují heterogenní skupinu buněk, která může mít odlišný vliv na indukci a progresi nádoru. V posledních dekáдах se zájem o polarizaci makrofágů v nádorech výrazně zvýšil, protože mnoho studií prokázalo, že přítomnost TAM v mikroprostředí nádoru je důležitým znakem ovlivňujícím prognózu pacienta. Produkci cytokinů mohou TAM potlačovat funkce efektorových T buněk v nádorovém mikroprostředí, podporovat růst nádoru a rezistenci vůči terapii. Vliv jednotlivých populací TAM v nádorovém mikroprostředí je v současnosti intenzivně zkoumán.

Přítomnost TAM byla pozorována i v nádorovém mikroprostředí nádorů hlavy a krku, které je v naší laboratoři aktuálně studováno. Nádory hlavy a krku indukované lidským papilomavirem (HPV, z angl. human papillomavirus) mají lepší prognózu onemocnění než nádory nevirové etiologie, které bývají způsobeny rizikovými faktory jako je kouření a konzumace alkoholu. Lepší prognóza pacientů s virovou etiologií nádorů může souviset s nižší infiltrací TAM oproti nádorům HPV negativním, u kterých jsme detekovali více makrofágů M2, jenž napomáhají progresi nádoru. To, že polarizace a množství TAM v těchto nádorech souvisí s etiologií nádoru, bylo naznačeno již v předešlých studiích. Studie zaměřující se na HNSCC jsou však velmi heterogenní. Řada z nich zahrnuje nádory jakékoliv lokalizace, které se svým charakterem a etiologií velmi liší. U řady studií není etiologie nádoru zohledněna a dynamický vývoj metod a poznání o nádorovém mikroprostředí dále komplikuje porovnání výsledků jednotlivých studií.

Proto jsem ve své práci použila nádory hlavy a krku dvou lokalizací s přesným určením jejich etiologie. Pro přesnější určení fenotypu TAM jsem použila kombinace více znaků.

K identifikaci a lokalizaci makrofágů typu M1 a M2 jsem využila metodu multispektrální fluorescenční imunohistochemie. Dále jsem analyzovala expresi genů asociovaných s makrofágy a imunosupresivním prostředím nádoru metodou RT-qPCR (z angl. reverse transcription quantitative PCR).

2 Přehled literatury

2.1 Makrofágy

Makrofágy jsou fagocytující buňky patřící mezi leukocyty. Jedná se o mononukleáry (van Furth & Cohn, 1968), tedy buňky s jedním nesegmentovaným jádrem, které společně s nediferencovanými monocyty a dendritickými buňkami (DC, z angl. dendritic cell) tvoří komponenty mononukleárního fagocytárního systému (van Furth *et al.*, 1972).

Makrofágy vznikají z monocytů, které jsou tvořeny v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky. Monocyty po uvolnění z kostní dřene migrují krevním řečištěm do doby, než jsou atrahovány chemotaxí do tkáně. Hlavním chemoatraktantem monocytů je ligand chemokinu s C-C motivem CCL2 (CCL, z angl. chemokine C-C motif ligand) a migrace do tkáně je spojena se zánětlivým prostředím a/nebo s přítomností patogenů (Tsou *et al.*, 2007). Přichycením na stěnu cévy a průchodem mezi endoteliálními buňkami vstupují monocyty do tkáně, kde se mění na makrofágy pod vlivem faktoru stimulujícího kolonie makrofágů (M-CSF, z angl. macrophage colony-stimulating factor) a faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF, z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (Chen *et al.*, 1988). Přeměna monocytů na makrofágy zahrnuje několik kroků a je důležitou součástí obrany organismu před patogeny a při poškození tkáně (Varol *et al.*, 2015).

Dříve se myslelo, že se makrofágy pravidelně obnovují diferenciací z cirkulujících monocytů v periferní krvi, ale nedávné studie prokázaly, že většina tkáňově rezidentních makrofágů osidluje tkáň již před narozením během embryonálního vývoje nezávisle na monocytech. Zároveň každý orgán má vlastní unikátní kombinaci embryonálních makrofágů podílejících se na obnově tkáně a makrofágů získaných v dospělosti, které se primárně podílí na obraně hostitele (Hashimoto *et al.*, 2013). Tkáňově rezidentní makrofágy, které vznikají prenatálně, vykazují četnou fenotypovou heterogenitu a patří mezi ně například Kupfferovy buňky v játrech, osteoklasty v kostech, alveolární makrofágy v plicích nebo mikroglie v centrální nervové soustavě a další (Guilliams *et al.*, 2013; Gomez Perdiguero *et al.*, 2015).

Makrofágy se řadí mezi profesionální fagocyty a jejich hlavní funkcí je fagocytóza vlastních odumřelých buněk a současně i likvidace cizích pohlčených mikroorganismů. Degradované částice jsou makrofágy prezentované jako antigeny T lymfocytům, které pak ovlivňují další imunitní reakce a aktivují adaptivní imunitní odpověď. Makrofágy tak tvoří první obrannou linii vrozeného imunitního systému před patogeny a zároveň prezentací antigenů T lymfocytům propojují vrozenou a adaptivní imunitu (Gordon, 1998). Makrofágy také hrají důležitou roli při udržování tkáňové homeostáze a přispívají k iniciaci zánětu.

Přítomnost makrofágů prezentujících antigeny je pro T lymfocyty stěžejní, ale tato potřeba není pouze jednostranná, protože makrofágy se stávají plně funkční až po aktivaci signály ve formě cytokinů poskytnutými právě zmíněnými T lymfocyty (Stout & Suttles, 2004).

Makrofágy pochází z myelomonocytické linie, pro jejíž buňky je typická vysoká úroveň plasticity (Mantovani & Locati, 2013). Existuje několik typů makrofágů, z nichž dva základní jsou klasicky aktivované makrofágy odpovídající fenotypu M1 a alternativně aktivované makrofágy označované jako M2. Tyto fenotypy reprezentují dva protipóly širokého spektra polarizovaných makrofágů. V závislosti na kombinaci signálů z okolního prostředí vznikají různé aktivační stavy, makrofágy se mění a jsou schopné přecházet mezi jednotlivými fenotypy (Josephs *et al.*, 2015).

Klasicky aktivované makrofágy fenotypu M1 jsou stimulované prostřednictvím interferonu gama (IFN- γ , z angl. interferon gamma) (Stein *et al.*, 1992), lipopolysacharidu (LPS, z angl. lipopolysaccharide), faktoru nádorové nekrózy alfa (TNF- α , z angl. tumor necrosis factor alfa), GM-CSF a také receptorů skupiny podobné toll (TLRs, z angl. toll-like receptors) (Murray *et al.*, 2014). Makrofágy M1 exprimují větší množství MHC II (z angl. major histocompatibility complex) než makrofágy M2, vytváří reaktivní formy oxidu dusnatého (NO, z angl. nitric oxide) a uvolňují prozánětlivé faktory a imunitní stimulatory jako jsou interleukin 12 (IL, z angl. interleukin), IL-1 β , IL-6 a TNF- α (Biswas & Mantovani, 2010). Produkovaný IL-12 podporuje další rozvoj zánětu, protože stimuluje T lymfocyty a NK buňky (z angl. natural killer cell). Především fenotyp M1 představuje profesionální fagocyty pohlcující mrtvé mikroorganismy a poškozené buňky těla vlastní.

Alternativně aktivované makrofágy M2 diferencují pod vlivem IL-4 a IL-13 (Mantovani & Sica, 2010; Galdiero *et al.*, 2013). Fenotyp M2 je také indukován cytokinem IL-33, který podporuje produkci IL-13 (Kurowska-Stolarska *et al.*, 2009). Pro makrofágy M2 je typický protizánětlivý cytokinový profil charakterizovaný vysokou produkcí imunoregulačního cytokinu IL-10 a protizánětlivého transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β , z angl. transforming growth factor beta) a zároveň nízkou produkcí IL-12. Makrofágy M2 mají, na rozdíl od M1, vyšší angiogenní potenciál (Kodelja *et al.*, 1997) a sekrecí růstových faktorů podporujících angiogenezi a regeneraci tkáně slouží makrofágy typu M2 spíše k hojení poranění (Mantovani & Sica, 2010). Tato schopnost však může vést k chronické obnově tkáně, která přispívá k rozvoji nádoru.

Mills a kol. založili rozdělení makrofágů na fenotyp M1 a M2 na korelaci k imunitní odpovědi pomocných T lymfocytů (Th, z angl. helper T lymphocyte) (Mills *et al.*, 2000). Polarizace na M1 makrofágy koreluje s Th1 imunitní odpovědí vůči patogenům a podporuje ji

sekreci ligandů chemokinů s C-X-C motivem CXCL9 (CXCL, z angl. chemokine C-X-C motif ligand), CXCL10 a CXCL11. Naopak fenotyp M2 je zapojen při Th2 imunitní odpovědi při eliminaci parazitů, během které jsou produkcí CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 a CCL24 indukovány kromě Th2 lymfocytů i regulační T lymfocyty (Treg, z angl. regulatory T lymphocyte) (Mantovani *et al.*, 2004). Paradigma M1 a M2 je také odvozeno od kompetice o arginin, protože obě populace makrofágů mají odlišný metabolismus této biogenní aminokyseliny. Makrofágy M1 metabolizují arginin na molekulu NO, která způsobuje cytotoxicitu buněk, a M2 metabolizují arginin na aminokyselinu ornitin, která má široké spektrum funkcí. Ornitin slouží k syntéze polyaminů, které regulují replikaci DNA, translaci proteinů, růst a diferenciaci buňky. Současně může ornitin ovlivňovat remodelační procesy v tkáni, protože je prekurzorem syntézy prolinu, který je esenciální aminokyselinou pro tvorbu kolagenu (Rath *et al.*, 2014).

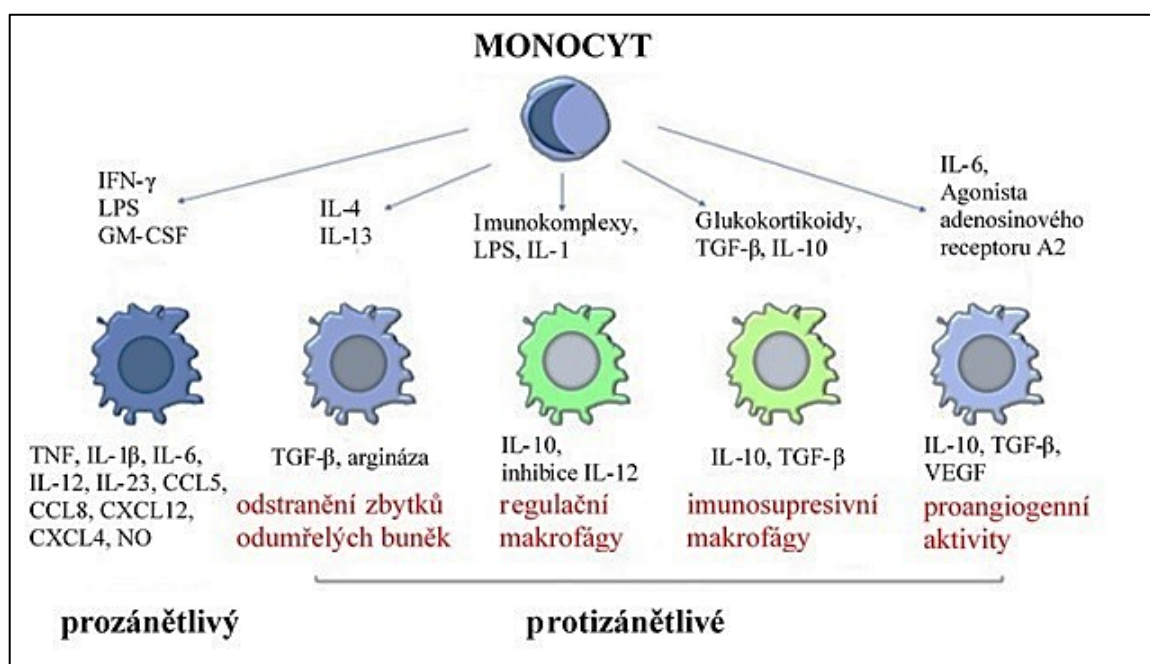
Ačkoliv Mills a kol. navrhuji rozdělení M1 a M2 dle Th1 a Th2, zároveň diskutují, že aktivace makrofágů může probíhat postupně, může tedy existovat řada přechodných fenotypů a proto tedy nemohou být makrofágy tak snadno rozděleny do definovaných skupin (Mills *et al.*, 2000; Stout & Suttles, 2004). Další způsob nomenklatury rozšiřuje klasifikaci M2 na typy M2a, M2b, M2c a M2d (Obr. č. 1). (Anderson & Mosser, 2002; Mantovani *et al.*, 2004). Tato klasifikace souvisí s odlišnými aktivačními signály makrofágů, s imunosupresivní odpovědí a interakcemi Treg a Th2 buněk (Sica & Mantovani, 2012).

Makrofágy M2a vznikají pod vlivem IL-4 a IL-13 a následně produkují TGF- β (Stein *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1994). V roce 2002 byl popsán druhý typ M2 makrofágů, které jsou indukovány LPS a kombinací imunokomplexů (Anderson & Mosser, 2002), ale byly pojmenované jako regulační M2b makrofágy v roce 2004 (Mantovani *et al.*, 2004). M2b podporují infekci a progresi nádoru tím, že inhibují mechanismy imunitní a zánětlivé odpovědi (Ito *et al.*, 2016).

K odlišení M2b od M1 a M2a je vhodný IL-10, který ale neodlišuje M2b od M2c a M2d (Edwards *et al.*, 2006), protože všechny tři subpopulace produkují vysokou hladinu IL-10 (Zizzo *et al.*, 2012). Makrofágy M2b však exprimují vysoké množství chemokinu CCL1 (Sironi *et al.*, 2006), jehož exprese byla prokázána jako esenciální pro udržení vlastností M2b makrofágů. Znak CCL1 tak může být využit jako specifický molekulární identifikátor k odlišení M2b subpopulace od ostatních subtypů makrofágů (Asai *et al.*, 2012).

Subpopulace M2c je indukována pod vlivem IL-10, TGF- β a glukokortikoidů (Zizzo *et al.*, 2012). Makrofágy M2c jsou imunosupresivní a zapojují se do remodelace extracelulární matrix, zatímco M2a a M2b jsou spíše imunoregulační a zprostředkovávají Th2 odpověď

(Mantovani *et al.*, 2004). Makrofágy M2a podporují angiogenezi signalizací přes fibroblastový růstový faktor (FGF, z angl. fibroblast growth factor) a M2c přes placentární růstový faktor (PlGF, z angl. placental growth factor) (Jetten *et al.*, 2014). Čtvrtá subpopulace M2d vyvolává především progresi nádoru a je indukována IL-6 nebo kostimulací ligandů TLRs a agonistů adenosinového receptoru A2 (Wang *et al.*, 2010). Efekt cytokinu IL-6 v místě zánětu v oblasti nádoru může být dvojitý a jeho zdrojem mohou být, kromě makrofágů, i nádorové buňky. Buď IL-6 působí jako zánětlivý cytokin a je spojený s fenotypem M1 a účastní se aktivace buněk vrozené imunity nebo, pokud je IL-6 produkovaný nádorovými buňkami, může přes jaderný faktor kappa B (NF- κ B, z angl. nuclear factor kappa B) regulovat přežívání makrofágů a ovlivňovat jejich pronádorovou polarizaci (Kamimura *et al.*, 2003; Kross *et al.*, 2007). Jednotlivé subpopulace je však složité odlišit, protože markery, které by je definovaly, jsou stále předmětem výzkumu a diskuzí. Zároveň se předpokládá, že tyto subpopulace se kontinuálně proměňují, aby byly schopny se lépe přizpůsobit prostředí a účinněji hojily poškození tkáně (Porcheray *et al.*, 2005).



Obr. č. 1: Přehled jednotlivých subpopulací makrofágů a jejich funkcí vznikajících z monocytů pod vlivem rozdílného imunitního prostředí. Převzato a upraveno (Di Benedetto *et al.*, 2019).

2.1.1 Makrofágy asociované s nádory

Specifickou skupinu makrofágů tvoří TAM, které jsou odvozeny z cirkulujících monocytů v periferní krvi a do oblasti nádoru jsou atrahovány chemotaktickými faktory jako jsou CCL2, M-CSF a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, z angl. vascular endothelial growth factor) (Mantovani *et al.*, 1992). V nádoru jsou TAM díky svým proangiogenním vlastnostem preferenčně lokalizovány v hypoxických oblastech (Talks *et al.*, 2000).

Makrofágy v nádorovém mikroprostředí vykazují dynamickou plasticitu, jejímž výsledkem je rozdílný vliv TAM na progresi a růst nádoru. Obecně mohou mít TAM dvojí účinek, buď pronádorový nebo protinádorový (Mantovani & Sica, 2010). Protinádorový efekt vykazují makrofágy typu M1, naopak makrofágy M2 jsou imunosupresivní a mají pronádorový charakter. Klinické a experimentální důkazy ukazují, že TAM ve většině případů podporují progresi nádoru a jsou pronádorové, takže TAM odpovídají fenotypu M2 (Qian & Pollard, 2010). Některé studie ale prokazují, že makrofágy mohou měnit svůj funkční fenotyp jako odpověď na změny v mikroprostředí (Stout *et al.*, 2005) a tudíž podskupina TAM může označovat smíšenou populaci buněk, která zahrnuje fenotypy M1 i M2 (Umemura *et al.*, 2008; Edin *et al.*, 2013; Karnevi *et al.*, 2014; Reinartz *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014).

V počátečních fázích vzniku nádoru mohou mít pronádorový efekt i makrofágy M1, protože způsobují destrukci tkáně, ničí její lokální architekturu a produkci prozánětlivých signálů mohou podporovat vznik nádorových buněk (Wang *et al.*, 2012). Některá pozorování poukazují na symbiotický vztah mezi nádorovými buňkami a makrofágy, které společně ovlivňují řadu aspektů rakovinného bujení (Ueno *et al.*, 2000; Kross *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2014).

Solubilní faktory nádorového mikroprostředí atrahují makrofágy do oblasti nádoru a polarizují je na pronádorový fenotyp M2. Následně makrofágy M2 podporují růst a progresi nádoru a zároveň i nádorové buňky produkci faktorů M-CSF a CCL2 podporují tento typ makrofágů (Lin *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2011). Vytváří se smyčka, během které nádorové mikroprostředí podporuje pronádorové makrofágy a ty následně přispívají k rozvoji nádoru a vzniku metastáz (Qian & Pollard, 2010).

Chemokin CCL2 působí zánětlivě a je produkován nádorovými buňkami i buňkami nádorového mikroprostředí jako jsou fibroblasty a T lymfocyty (Saji *et al.*, 2001; Silzle *et al.*, 2003; Owen *et al.*, 2005). Chemokin CCL2 má schopnost podporovat karcinogenezi a jeho zvýšená exprese byla pozorována u různých typů pevných nádorů jako je karcinom prostaty (Zhang *et al.*, 2010), prsu (Qian *et al.*, 2011) a pankreatu (Sanford *et al.*, 2013). Vlivem CCL2

jsou monocyty a makrofágy lákány do míst vzniku zánětu a nádorové tkáně, která jsou charakterizována nízkou hladinou kyslíku (Matsushima *et al.*, 1989). Hypoxie silně ovlivňuje chemokinový profil makrofágů a jejich migraci v prostředí a současně tím, že podporuje angiogenezi, je hypoxie důležitým znakem neoplastického růstu (Turner *et al.*, 1999).

Makrofágy M2 sekretují proangiogenní faktory jako jsou VEGF, TNF- α , IL-1 a M-CSF (Salvesen & Akslen, 1999; Torisu *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2006) a prostřednictvím VEGF-A regulují nádorovou angiogenezi (Stockmann *et al.*, 2008). Dále mají makrofágy M2 v důsledku nižší exprese MHC II sníženou schopnost prezentovat antigeny T lymfocytům a tím tak potlačují jejich funkce a proliferaci (Wang *et al.*, 2012).

TAM se stejně jako ostatní komponenty nádorového mikroprostředí podílí na tvorbě metastatické niky, což je oblast sekundárního orgánu s vhodnými podmínkami mikroprostředí pro vznik metastáz, které jsou odvozené od primárního nádoru. Prometastatická funkce makrofágů spočívá v sekreci molekul podporujících angiogenezi a chemoatrakci nádorových buněk a naivních makrofágů do místa budoucí metastázy, kde pak makrofágy s pomocí cytokinu CCL2 ovlivňují metastatické nádorové buňky (Liu & Cao, 2016). U karcinomu prostaty (Mizutani *et al.*, 2009) a karcinomu prsu (Qian *et al.*, 2009) byla popsána další funkce TAM, která přispívá k tvorbě metastatické niky produkcí molekul ovlivňujících migraci neoplastických buněk. Neoplastické buňky po ruptuře bazální membrány invadují okolní tkáň a mají tak maligní potenciál (Duray *et al.*, 2010). Maligní buňky často osidlují sekundární metastatické niky ještě před tím, než se objeví klinické příznaky primárního nádoru (Valastyan & Weinberg, 2011). Terapie cílící proti primárnímu nádoru mohou být občas neefektivní vůči metastázám, protože způsob regulace karcinogeneze se může lišit mezi tkání primárního nádoru a metastatickou oblastí. Zároveň makrofágy mohou také přispívat k terapeutické rezistenci v místech metastáz, protože v maligních buňkách aktivují protiapoptotický program (Ruffell & Coussens, 2015).

Remodelace tkáně a migrace nádorových buněk je spojena s produkcí matrixových metaloproteáz (MMP, z angl. matrix metalloprotease) a epidermálního růstového faktoru (EGF, z angl. epidermal growth factor) makrofágy M2. TAM uvolňují EGF po stimulaci M-CSF, který je produkován nádorovými buňkami (Biswas & Mantovani, 2010). Faktor M-CSF podporuje vznik nádoru a zvyšuje jeho metastatický potenciál (Lin *et al.*, 2001). Současně TAM zvyšují migraci nádorových buněk modulací aktinového cytoskeletu (Qian & Pollard, 2010). Enzymy MMP patří do skupiny endopeptidáz, jejichž enzymatická aktivita je závislá na Ca^{2+} nebo Zn^{2+} iontech. Nejvýznamnější MMP9 rozrušuje extracelulární matrix degradací kolagenu a dalších proteinů (Legrand *et al.*, 1999; Van den Steen *et al.*, 2002). Výsledkem je migrace

nádorových buněk a zhoršená prognóza onemocnění, která byla prokázána u adenokarcinomu žaludku, karcinomu prsu a hepatocelulárního karcinomu (Huang *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

Některé studie také našly vztah mezi epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT, z angl. epithelial-mesenchymal transition) a chemokinem CCL18 (Su *et al.*, 2014), který indukuje maturaci monocytů na makrofágy typu M2 (Schraufstatter *et al.*, 2012). Makrofágy M2 podporují EMT a přispívají tak k tvorbě metastáz (She *et al.*, 2018), tudíž vysoká infiltrace TAM schopných indukovat EMT koreluje se špatnou prognózou onemocnění (Zhang *et al.*, 2016). Makrofágy považujeme za regulátory všech stádií metastatického procesu především díky pozitivní zpětné dráze zahrnující CCL2 a M-CSF (Joyce and Pollard, 2009).

2.1.2 Znaky typické pro makrofágy

Na povrchu plasmatické membrány makrofágů je široké spektrum membránových receptorů, které lze využít pro detekci jednotlivých typů makrofágů. Jako panmakrofágový znak se využívá diferenciační antigen CD68 (CD, z angl. cluster of differentiation), kterým detekujeme monocyty a makrofágy bez ohledu na jejich polarizaci (Cho *et al.*, 2013). Avšak Hu a kol. (2016) uvádí, že znak CD68 není specifický pouze pro makrofágy, ale je exprimován i fibroblasty a samotnými nádorovými buňkami. Nejpoužívanější znaky pro detekci M1 makrofágů jsou CD80, CD11c a MHC II a pro detekci M2 to jsou CD163, CD11b a CD206 (Alves *et al.*, 2018).

Znak CD11c se běžně používá k imunohistochemické vizualizaci M1 makrofágů (Fischer-Posovszky *et al.*, 2011), ale slouží i jako marker pro DC (Anzai *et al.*, 2012). Stejně tak znak CD80 se může kromě makrofágů nacházet i na jiných buňkách prezentujících antigeny (APC, z angl. antigen presenting cell) jako jsou DC, nediferencované monocyty a aktivované B buňky (Schultze *et al.*, 1996). Ambarus a kol. (2012) potvrdili, že znak CD80 je typický pro makrofágy aktivované pomocí IFN- γ , tedy klasicky aktivované makrofágy M1.

Exprese hemoglobinového „scavenger“ receptoru CD163 je charakteristická pro většinu subpopulací maturovaných tkáňových makrofágů, ale ve zvýšené míře především pro alternativně aktivované makrofágy M2 (Fabriek *et al.*, 2005). Receptor CD163 má homeostatickou funkci spojenou s vazbou komplexu hemoglobin-haptoglobin, jejímž výsledkem je snížení množství volného hemu a ochrana tkáně před oxidativním poškozením (Kristiansen *et al.*, 2001). Dále se CD163 podílí na regulaci zánětu a ve zdravé tkáni recykluje

komponenty starých a poškozených buněk (Van den Heuvel *et al.*, 1999). Pronádorové makrofágy M2 jsou mimo znaku CD163 (Kawamura *et al.*, 2009) obvykle identifikované dalším „scavenger“ receptorem, a to CD206 známým též pod názvem manózoový receptor 1.

Makrofágy M2 kromě povrchových znaků exprimují i imunosupresivní molekuly, jako jsou IL-10, TGF- β , indolamin-2,3-dioxygenáza 1 (IDO1, z angl. indoleamine-2,3-dioxygenase 1), indukibilní NO syntáza (NOS2, z angl. nitric oxide synthase 2) a argináza-1 (ARG1, z angl. arginase 1) (Galdiero 2013).

Jednou z hlavních aktivit TAM je schopnost potlačovat protinádorovou imunitu, například inhibují proliferaci T buněk skrze expresi IDO1 (Munn *et al.*, 1999). Enzym IDO1 je hemoprotein, který iniciuje katabolismus tryptofanu v kynureninové dráze a jeho hlavní funkcí je degradovat tryptofan na kynurenin (Carlin *et al.*, 1989). Sloučeniny kynureninu inhibují proliferaci aktivovaných T lymfocytů a NK buněk, u kterých vyvolávají i cytotoxický efekt (Frumento *et al.*, 2002). Dále je IDO1 exprimován při zánětlivé imunitní odpovědi, během které potlačuje funkci efektorových T lymfocytů (Mellor *et al.*, 2003; Uyttenhove *et al.*, 2003) nebo podporuje imunosupresivní aktivity Treg (Sharma *et al.*, 2007).

Enzym IDO1 může být v nádoru exprimován imunitními APC, jako jsou od monocytů odvozené makrofágy a DC, které produkují IDO1 v menším množství i ve zdravé tkáni (Hwu *et al.*, 2000), nebo přímo nádorovými buňkami (Uyttenhove *et al.*, 2003). Zároveň jeho exprese může být indukována nepřímo v důsledku produkce zánětlivých cytokinů buňkami nádorového mikroprostředí. Například cytokin IFN- γ , který koreluje s přítomností M1 makrofágů, stimuluje buňky k expresi IDO1 (Takikawa *et al.*, 1988) a jeho účinek je podpořen prozánětlivým cytokinem IL-1 a LPS (Hissong *et al.*, 1995). Enzym IDO1 přispívá k maligní transformaci buněk a vzniku nádoru a je součástí mechanismů inhibujících protinádorovou imunitní odpověď (Uyttenhove *et al.*, 2003).

Další inhibiční schopnosti M2 makrofágů jsou zprostředkovány skrze expresi NOS2 a ARG1. Oba tyto enzymy jsou zapojené do metabolismu aminokyseliny L-argininu a jejich indukce vede k tvorbě vysoce reaktivních forem kyslíku a dusíku, které mohou způsobovat defekty v signalizaci imunitních buněk (Bronte & Zanovello, 2005).

Enzym NOS2 obsahuje hem a z L-argininu katalyzuje syntézu NO a citrulinu. K indukci NOS2 dochází v přítomnosti prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β a IFN- γ) a endotoxinů, což má za následek zvýšenou tvorbu NO v tkáních. Různé typy imunitních buněk exprimují NOS2, jedním z nich jsou i klasicky aktivované makrofágy M1 (Mantovani *et al.*, 2004), u kterých exprese genu kódujícího NOS2 závisí na aktivaci transkripčními faktory jako je NF- κ B, STAT1 (z angl. signal transducer and activator of transcription 1) a JAK3 (z angl. Janus

kinase 3), avšak u různých typů nádorů může být funkce NOS2 protichůdná (Ganster *et al.*, 2001; Mozet *et al.*, 2009).

Enzym NOS2 je schopen regulovat expresi prostaglandin-endoperoxid syntázy 2 (PTGS2, z angl. prostaglandin-endoperoxide synthase 2) (Park *et al.*, 2003). PTGS2, též známý jako cyklooxygenáza 2 (COX-2, z angl. cyclooxygenase-2), katalyzuje tvorbu prostaglandinů z kyseliny arachidonové a je exprimován mnoha typy buněk, mezi nimi M2 makrofágy a nádorovými buňkami (Li *et al.*, 2015). Zdá se, že exprese PTGS2 je esenciální pro zachování M2 fenotypu makrofágů (Li *et al.*, 2015), protože inhibice jeho exprese vede k přeměně M2 na M1 makrofágy (Nakanishi *et al.*, 2011).

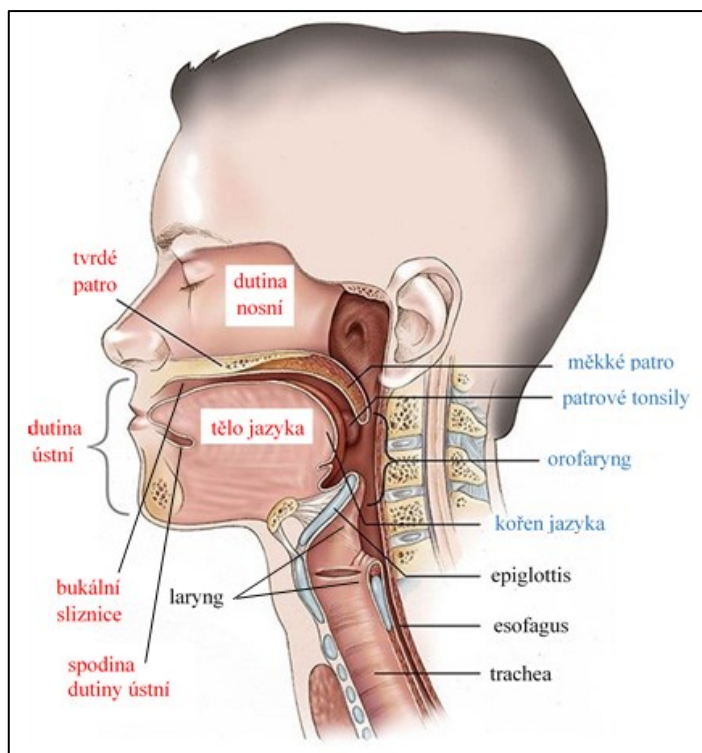
Enzym ARG1 je označován jako jaterní typ arginázy, protože se dominantně vyskytuje právě v hepatocytech (Mulhaupt *et al.*, 1987). ARG1 je metaloenzym a katalyzuje hydrolýzu L-argininu na močovinu a L-ornitin, který pozitivně ovlivňuje dráhy vedoucí k buněčné proliferaci a opravám tkáně. Exprese ARG1 v makrofázích může být podpořena hypoxií (Doedens *et al.*, 2010) a kyselinou mléčnou v závislosti na přítomnosti faktoru 1-alfa indukovaného hypoxií (HIF-1- α , z angl. hypoxia-inducible factor 1-alfa) (Colegio *et al.*, 2014). Aktivace HIF-1- α vede k funkčním změnám a adaptaci makrofágů na hypoxii díky posunu metabolických drah z oxidativní fosforylace na anaerobní glykolýzu. Makrofágy tak umožňují koordinovat odpovědi tkáně na proměnlivý gradient kyslíku a hypoxické podmínky (Biswas & Mantovani, 2012). Stabilizace HIF-1- α je důležitá pro pronádorové makrofágy, protože v solidních nádorech vede exprese tohoto faktoru společně s hypoxií k potlačení adaptivního imunitního systému vrozeným imunitním systémem (Doedens *et al.*, 2010). Na rozdíl od NOS2 je enzym ARG1 považován za jeden z typických znaků makrofágů typu M2 (Mantovani *et al.*, 2004) a rovnováha mezi NOS2 a ARG1 tak reguluje množství makrofágů definovaných jako M1 a M2 (Rath *et al.*, 2014).

Pro co nejpřesnější určení populace makrofágů se doporučuje použít více znaků. Současně je doporučeno používat takové kombinace znaků, které zahrnují nejenom znaky na povrchu buňky, ale i vnitrobuněčné transkripční faktory (Murray *et al.*, 2014).

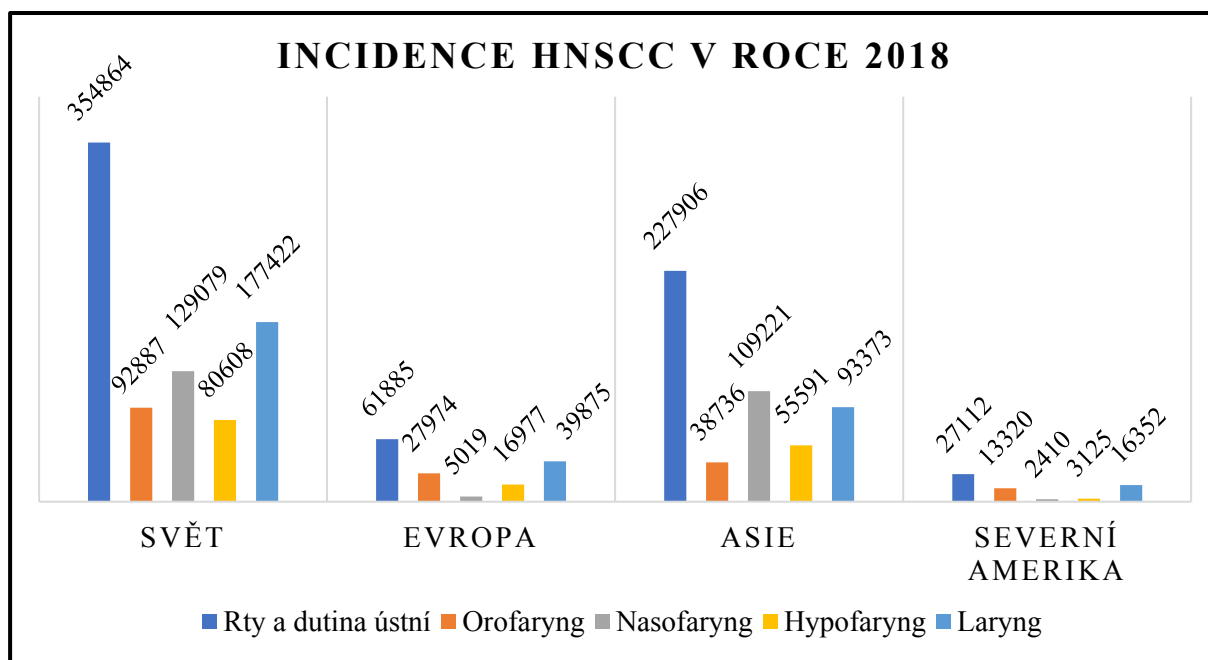
2.2 Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku vznikají z epiteliálních buněk a až u 90 % z nich se z histologického hlediska jedná o dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku (HNSCC, z angl. head and neck squamous cell carcinoma) (Argiris & Eng, 2003). HNSCC zahrnují karcinomy několika anatomických lokalizací, jako jsou rty, jazyk, dásně, bukální sliznice, spodina dutiny ústní, patro, příušní žláza, slinné žlázy, tonzily, orofaryng, nasofaryng, hypofaryng, faryng a laryng. Nejběžnějšími z nich jsou ty lokalizované na jazyku, tonsilách, dásních a spodině dutiny ústní. S výjimkou dásní, patří tyto karcinomy do oblasti dutiny ústní (OSCC, z angl. oral squamous cell carcinoma) nebo orofaryngu (OPSCC, z angl. oropharyngeal squamous cell carcinoma) a právě na tyto karcinomy se ve své práci zaměřuji (Obr. č. 2) (American Cancer Society, 2020).

Incidence HNSCC je více než dvakrát vyšší u mužů než u žen a u mužů představuje osmý nejčastější typ karcinomu (American Cancer Society, 2020). Ročně je diagnostikováno přes 830 000 nových případů HNSCC (Obr. č. 3) a 420 000 pacientů celosvětově na toto onemocnění každý rok zemře (Bray *et al.*, 2018).



Obr. č. 2: Schéma části dýchací a trávicí soustavy s označením míst, ve kterých dochází ke vzniku nádorů hlavy a krku. červeně – části dutiny ústní, modře – části orofaryngu, černě – ostatní oblasti. Převzato a upraveno podle American Society of Clinical Oncology, Robert Morreale - Visual Explanations, LLC (2005-2011). (<https://www.cancer.net/cancer-types/oral-and-oropharyngeal-cancer/medical-illustrations>)



Obr. č. 3: Incidence jednotlivých typů HNSCC u obou pohlaví v různých částech světa v roce 2018. Zdroj GLOBOCAN 2018 (<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>).

Hlavními rizikovými faktory vzniku HNSCC je kouření a nadměrná konzumace alkoholu (Blot *et al.*, 1988; Argiris & Eng, 2003; Olshan, 2010; Descamps *et al.*, 2016). V Evropě a USA představuje kombinace užívání tabáku a alkoholu příčinu nejméně 75 % všech HNSCC (Hashibe *et al.*, 2007). Zatím není prokázáno, jestli určité typy alkoholu jako je pivo, víno nebo lihoviny mají odlišný efekt na HNSCC (Warnakulasuriya, 2009). V USA bylo zaznamenáno, že i kouření marihuany může zvyšovat riziko vzniku HNSCC (Zhang *et al.*, 1999).

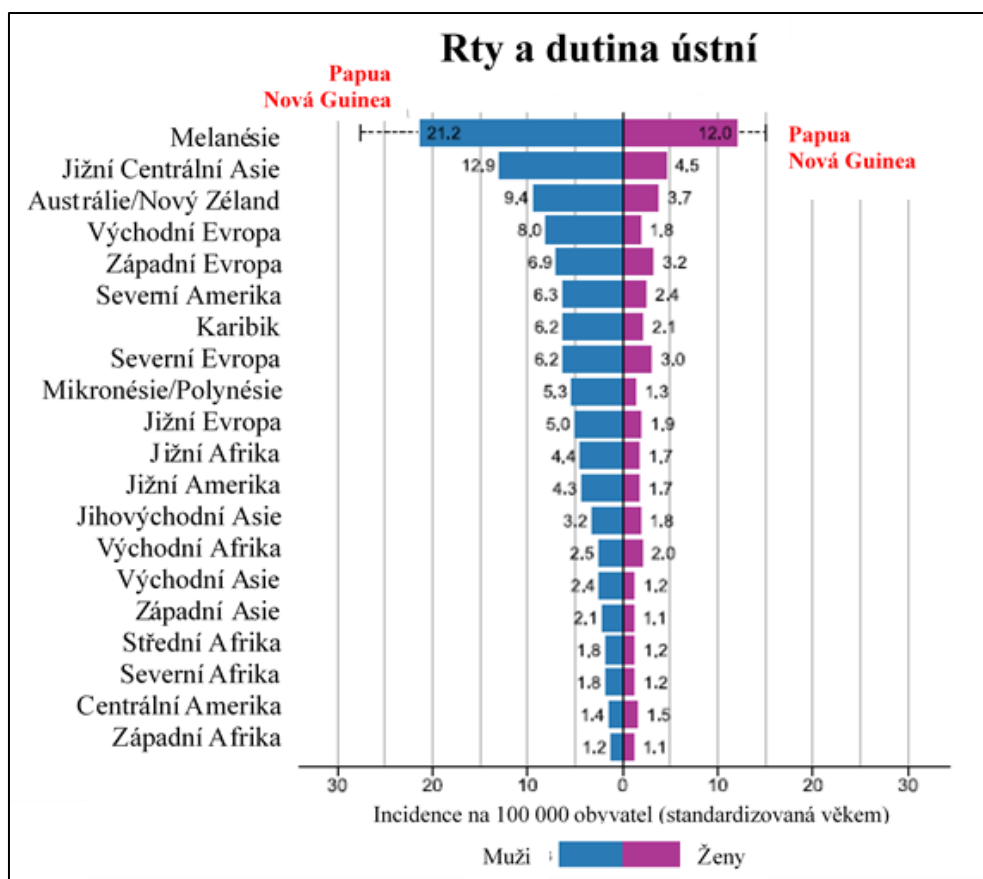
U chronických konzumentů alkoholu mohou mikroby a jimi tvořené biofilmy v dutině ústní usnadňovat metabolismus alkoholu a přispívat ke změně etanolu na acetaldehyd, což je potenciální karcinogen, který může zvyšovat oxidativní stres a indukovat vznik nádorových buněk v dutině ústní (Warnakulasuriya *et al.*, 2008). Těžcí kuřáci a uživatelé alkoholu s pokročilým stádiem OSCC měli častěji lokalizovaný nádor ve spodině dutiny ústní, naopak nádory nekuřáků a abstinentů častěji zasáhly tělo jazyka (Rikardsen *et al.*, 2014). Kuřáci měli také maligní léze v oblasti měkkého patra, užívání tabáku je však silně asociováno s HNSCC ve všech anatomických lokalizacích (Argiris *et al.*, 2008). Větší spotřebu alkoholu u pacientů s karcinomem spodiny dutiny ústní a karcinomem jazyka, než u pacientů s karcinomem v jiné oblasti, prokázala studie Boffetta a kol., která zároveň potvrdila, že karcinogenní efekt

alkoholických nápojů na sliznici dutiny ústní je způsoben přímým kontaktem (Boffetta *et al.*, 1992). Alkohol tedy představuje větší riziko vzniku karcinomů spodiny dutiny ústní a bukální sliznice (Dhar *et al.*, 2000) a je potenciálně rizikovějším faktorem pro vznik nádorů v těchto lokalizacích než kouření (Rikardsen *et al.*, 2014).

Ke vzniku HNSCC může přispívat i imunosuprese organismu, např. po transplantaci ledviny bylo zaznamenáno vyšší riziko karcinomu rtů (van Leeuwen *et al.*, 2009), dále bylo u pacientů se zánětlivým onemocněním, jako je Crohnova nemoc, signifikantně zvýšeno riziko karcinomu jazyka (Li *et al.*, 2003).

Na vznik HNSCC mají vliv i dietetické návyky a výživa. V evropské populaci byla zaznamenána korelace mezi nízkým příjmem ovoce a zeleniny a zvýšeným rizikem vzniku karcinomů (Petridou *et al.*, 2002). Dále bylo riziko HNSCC zvýšeno při nadměrné konzumaci masa a masných výrobků (Levi *et al.*, 1998).

Specifický rizikový faktor, a to arekové ořechy, byl zaznamenán v tropické Asii, kde jsou velmi časté karcinomy v oblasti rtů a dutiny ústní. Jedná se o oblast Jižní Asie a Oceánie, hlavně o ostrov Papua Nová Guinea, kde je celosvětově nejvyšší incidence těchto nádorů u obou pohlaví (Obr. č. 4) (Bray *et al.*, 2018). Arekové ořechy se s případnou příměsí tabáku balí do betelových listů a žvýkají pro své antidepresivní a psychotropní účinky, což zvyšuje riziko vzniku HNSCC v závislosti na míře expozice (Warnakulasuriya, 2009a; Guha *et al.*, 2014). Tato exotická pochutina je rizikovým faktorem především pro karcinomy bukální sliznice (Shenoi *et al.*, 2012).



Obr. č. 4: Incidence karcinomu rtů a dutiny ústní v různých částech světa. Červeně označena Papua Nová Guinea s celosvětově největší incidencí těchto nádorů u obou pohlaví. Převzato a upraveno (Bray *et al.*, 2018), zdroj GLOBOCAN 2018.

Vedle již zmíněných rizikových faktorů vzniku HNSCC je prokázáno, že část těchto karcinomů je také způsobena HPV (Gillison *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2003). V posledních dekádách se incidence HPV pozitivních (HPV⁺) HNSCC, v porovnání s HNSCC asociovanými s kouřením, zvyšuje (Chaturvedi *et al.*, 2013; Castellsagué *et al.*, 2016). HPV⁺ karcinomy jsou lokalizované především v orofaryngeální oblasti. V USA mezi lety 1988 a 2004 vzrostla incidence HPV⁺ OPSCC dokonce o 225 % (Chaturvedi *et al.*, 2011). Studie D'Souzy a kol. (2007) a Gillisonové a kol. (2000) prokázaly, že 72 % a 57 % OPSCC je indukováno HPV. V České republice byla taktéž zjištěna HPV pozitivita OPSCC až v 59,2 % (Koslabova *et al.*, 2013). Současné bylo zjištěno, že HPV⁺ HNSCC mají lepší prognózu onemocnění než pacienti s HNSCC asociovaným s kouřením a konzumací alkoholu (Fakhry *et al.*, 2008; Rotnáglová *et al.*, 2011). Lepší prognóza HPV⁺ OPSCC může být způsobena interakcemi mezi antigeny HPV

a hostitelským imunitním systémem a s tím související lepší imunitní odpovědi proti těmto nádorům (Ang *et al.*, 2010).

Pacienti s nádory způsobenými HPV se od pacientů s nádory spojenými s kouřením liší molekulárními, klinicko-patologickými a epidemiologickými parametry (Gillison *et al.*, 2008; Tachezy *et al.*, 2009; El-Naggar *et al.*, 2017). Studie zaměřené na tuto problematiku uvádějí, že HPV⁺ HNSCC vznikají u mladších jedinců mužského pohlaví s větší pravděpodobností v orofaryngeální oblasti a bývají diagnostikovány v pozdějších stádiích onemocnění (Gillison *et al.*, 2008; Chaturvedi *et al.*, 2013). Zlepšené celkové přežívání HPV⁺ pacientů HNSCC, které bylo ve většině případů pozorováno u OPSCC s nejvyšší prevalencí HPV16, podpořilo konsensus, že HPV status může sloužit jako nezávislý prognostický faktor přežití (Koslabova *et al.*, 2013; Salazar *et al.*, 2014).

2.2.1 Nádorové mikroprostředí u nádorů hlavy a krku

Nádorové mikroprostředí je tvořeno různorodými buněčnými komponentami, mezi kterými probíhají komplexní interakce, tzv. heterotypická signalizace. Hlavní komponentu představují nádorové buňky a buňky stromatu jako jsou fibroblasty, endoteliální buňky, pericyty a různé typy imunitních buněk. Významnou součástí je také extracelulární matrix. Buňky infiltrované v nádoru produkují široké spektrum molekul, které mají potenciál ovlivňovat proces tumorigeneze. Cytokiny a chemokiny sekretované v nádorovém mikroprostředí rekrutují normální buňky z okolních tkání do oblasti nádoru, kde jsou stimulovány k produkci růstových faktorů a dalších cytokinů podporujících progresi nádoru, invazi do okolních tkání a tvorbu metastáz (Alves *et al.*, 2018). Vliv nádorového mikroprostředí a infiltrovaných imunitních buněk na prognózu onemocnění byl zaznamenán u většiny typů nádorů, a to i u nádorů hlavy a krku.

Prognóza pacienta se v případě HNSCC tradičně odvozuje z TNM klasifikace (z angl. tumor-node-metastasis), která posuzuje velikost nádoru, šíření do regionálních lymfatických uzlin a přítomnost vzdálených metastáz (Rikardsen *et al.*, 2014). Thiele a kol. (2012) prokázali, že detekce metastáz v lokálních lymfatických uzlinách u OSCC představuje jeden z nejsilnějších prognostických faktorů. Klozar a kol. (2013) ukázali, že u HPV⁺ HNSCC jsou tradiční charakteristiky nádorů (TNM) daleko méně prognosticky významné, než u HPV⁻ HNSCC. Zhang a kol. (2012) prokázali, že v OSCC vyšší počet TAM koreloval s TNM klasifikací, stádiem nádoru a přítomností nodálních i vzdálených metastáz. Větší zastoupení CD68⁺ CD163⁺ M2 makrofágů bylo detekováno v nádorovém stromatu a infiltrace těmito

makrofágy byla spojena se sníženou schopností přežití pacientů s OSCC (Weber *et al.*, 2014; Wehrhan *et al.*, 2014).

Invaze do lymfatických uzlin bývá také spojena s vyšším stupněm vaskularity, který byl detekován v pokročilých stádiích nádoru HNSCC se zvýšeným počtem CD68⁺ TAM (Adel *et al.*, 2015). U karcinomu žaludku byl vyšší počet CD68⁺ makrofágů spojen s horším celkovým přežitím pacientů a zároveň exprese CD68 korelovala s vyšší expresí vimentinu a nižší expresí E-kadherinu důležitých pro EMT, ke které makrofágy přispívají (Zhang *et al.*, 2016). U karcinomu prsu byla přítomnost CD68⁺ makrofágů v intratumorální oblasti (Gwak *et al.*, 2015) a přítomnost CD163⁺ makrofágů ve stromatu spojena také se špatnou prognózou (Medrek *et al.*, 2012).

Ve studii Oguejiofora a kol. (2017) detekovali u OPSCC vyšší infiltraci CD68⁺ makrofágů v oblasti nádoru u HPV⁺ pacientů oproti HPV⁻, u kterých byla naopak zvýšená infiltrace CD68⁺ makrofágů zaznamenána ve stromatu a korelovala s lepším přežíváním. Pouze na základě detekce makrofágů pomocí znaku CD68 ale nelze rozlišit jednotlivé typy TAM. Ve studii Wanga a kol. (2014a) pozorovali u pacientů s OSCC znak CD163 v cytoplazmě imunitních buněk, které byly difúzně rozmístěny ve stromatu. Počet CD163⁺ buněk se zvyšoval s progresí nádoru a vysoká hladina CD163 a IL-10, v kombinaci s nízkou hladinou IFN- γ , byla spojena se špatným celkovým přežíváním těchto pacientů. Vysvětlením může být snížení cytotoxické imunitní odpovědi v důsledku absence stimulace diferenciací T buněk na Th1 lymfocyty a stimulace prezentace antigenů makrofágy, kterou podporuje za normálních okolností IFN- γ (Sica & Bronte, 2007). Dále byla zjištěna souvislost přítomnosti CD163⁺ buněk s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a znak CD163 byl určen jako spolehlivější marker celkového přežívání pacientů s OSCC než klinický stav a stav lymfatických uzlin (He *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014b). U 74,2 % pacientů OSCC s CD163⁺ TAM byl detekován faktor VEGF-C, kterým makrofágy podporují lymfoangiogenezi (Yamagata *et al.*, 2017). Lymfoangiogeneze hraje důležitou roli při úniku nádorových buněk z místa primárního nádoru do regionálních lymfatických uzlin, což přispívá k systémovému šíření nádoru pomocí oběhového systému (Corliss *et al.*, 2016).

Nádory s vysokou hladinou exprese IDO1 vykazují zvýšenou schopnost tvorby metastáz a zhoršenou prognózu onemocnění s nižší pravděpodobností přežití pacientů (Brandacher *et al.*, 2006). Exprese IDO1 byla ve zvýšené míře detekována u HPV⁺ HNSCC v porovnání s HPV⁻ (Krishna *et al.*, 2018). S horšími výsledky onemocnění korelovala i zvýšená exprese IDO1 v lokálních lymfatických uzlinách (Ryan *et al.*, 2014). Lokální deplece tryptofanu a produkce proapoptotických tryptofanových katabolitů způsobená enzymem IDO1

vedla u pacientů s kolorektálním karcinomem k neefektivní T buněčné odpovědi a tím k úniku nádoru před imunitním systémem (Brandacher *et al.*, 2006). Ve studii Inaby a kol. (2010) byl potvrzen negativní vliv IDO1 u karcinomu děložního hrdla a karcinomu vaječníků. Ze studie současně vyplynulo, že množství exprimovaného IDO1 by mohlo být u těchto nádorů využito k určení prognózy nádorového onemocnění.

Jako signifikantně negativní prognostický faktor se jevila vysoká exprese IDO1 u nádorů laryngu (Ye *et al.*, 2013). Enzym IDO1 je užitečný k předpovědi progresu primárního nádoru jazyka ve druhém nebo třetím stádiu (Seppälä *et al.*, 2016). Současně tato studie podpořila hypotézu, že enzym IDO1 přispívá k rozvoji nádoru. Ze současných studií není jasné, zda je pro rozvoj nádoru důležitější exprese IDO1 nádorovými buňkami nebo buňkami imunitního systému.

Molekula NO produkovaná enzymem NOS2 podporuje angiogenezi a umožňuje progresi nádoru a jeho šíření do lymfatických uzlin. Několik studií prokázalo korelaci mezi přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a expresí NOS2 v primárních HNSCC (Gallo *et al.*, 1998; Brennan *et al.*, 2001). U nádorů laryngu vysoká koncentrace NO vedla ke zvýšené expresi VEGF podporujícího angiogenezi a korelovala s horším přežíváním pacientů (Shigyo *et al.*, 2007). Ve zvýšené míře byla NOS2 detekována u mnoha nádorových onemocnění a u nádorů hlavy a krku regulovala také množství PTGS2 a některých cytokinů (Park *et al.*, 2003).

Enzym PTGS2 má prozánětlivý charakter a je schopen inhibovat apoptózu a stimulovat proliferaci buňky (Cunha *et al.*, 2015). Ve zvýšené míře bývá přítomen v nádorovém mikroprostředí, protože je exprimován nádorovými buňkami i makrofágy (Li *et al.*, 2015). Exprese PTGS2 makrofágy M2 vedla u pacientek s karcinomem prsu k progresi nádoru a korelovala se špatnou prognózou (Li *et al.*, 2015). U pacientů s OSCC zvýšená exprese PTGS2 také korelovala s kratší dobou přežití (Wang *et al.*, 2014b). Negativní vliv PTGS2 na prognózu byl zaznamenán i u karcinomů laryngu (Weller *et al.*, 2014). Některé epidemiologické studie naznačují, že exprese PTGS2 by mohla být využita jako biomarker pro určení prognózy pacientů s OSCC (Li & Cui, 2013).

Nádorové buňky a TAM v HNSCC produkují ve velkém množství i pronádorový enzym ARG1, který indukuje EMT a aktivaci inflamazómu spouští další zánětlivé procesy v buňce. Enzym ARG1 se zvažuje u HNSCC jako terapeutický cíl (Momen-Heravi & Dubey, 2020).

2.3 Lidský papilomavirus (HPV)

2.3.1 Klasifikace a popis viru

Lidský papilomavirus je malý dvouvláknový DNA virus infikující epitelální buňky s velmi striktní druhovou a tkáňovou specificitou. Dnes je známo přes 220 typů HPV a dělí se do pěti základních evolučních rodů podle genotypu (α -, β -, γ -, μ - a ν -). Rod α zahrnuje více než 60 typů HPV, které infikují především slizniční epitel (Van Doorslaer *et al.*, 2017; Van Doorslaer *et al.*, 2020). Podle závažnosti onemocnění, která způsobují, se α -HPV dělí na vysoce rizikové typy (HR-HPV, z angl. high-risk) a nízko rizikové (LR-HPV, z angl. low-risk). HR-HPV obsahují 15 typů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) (IARC, 2012) (Graham, 2017) s onkogenním potenciálem způsobující intraepiteliální neoplázie a karcinomy, zatímco LR-HPV, jejíž hlavní zástupci jsou HPV6 a HPV11, vyvolávají převážně benigní onemocnění, jako jsou anogenitální bradavice nebo kondylomata (Stanley *et al.*, 2007).

Druhým rodem jsou β -HPV zahrnující přes 50 typů, z nichž nejvýznamnější jsou HPV5 a HPV8. Hlavním místem infekce je kožní epitel, ale některé typy mohou mít i slizniční tropismus. Několik typů HPV z rodu β je spojeno s karcinogenezí kůže a společně s UV zářením, jako kofaktorem, nejčastěji způsobují nemelanomový spinocelulární karcinom kůže (Tommasino, 2017). Zbývající tři rody HPV (γ -, μ - a ν -) jsou součástí běžné mikroflóry a způsobují ve většině případů pouze asymptomatické infekce (Graham, 2017).

Genom HPV obsahuje kruhovou DNA o velikosti 8 kpb (pb, z angl. base pairs), která se skládá ze tří domén: nekódující oblast LCR (z angl. long control region), také označovaná jako URR (z angl. upstream regulatory region), časná oblast (E, z angl. early) kódující geny *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7* a pozdní oblast (L, z angl. late) kódující dva geny a to pro majoritní kapsidový protein L1 a minoritní kapsidový protein L2 (Van Doorslaer *et al.*, 2017).

Protein E1 funguje jako helikáza a jedná se o jediný replikační enzym kódovaný HPV. Protein E2 funguje jako transkripční faktor, který reguluje transkripci a především časný virový promotor, z něhož probíhá exprese hlavních virových onkogenů *E6* a *E7* (Moody & Laimins, 2010). Protein E1 interaguje s proteinem E2 v místě iniciace virové replikace.

Protein E4 u HR-HPV reguluje zastavení buněčného cyklu v G2-fázi a tím podporuje amplifikaci virového genomu (Davy *et al.*, 2002). Nejdůležitější funkcí E4 je rozrušení filament cytokeratinu, které vede k destabilizaci struktury infikovaného keratinocyту a snadnějšímu uvolnění virionů (Doorbar *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2004). Protein E5 hraje roli při virovém replikačním cyklu a snižuje prezentaci virových peptidů prostřednictvím MHC I a podílí se tak na úniku viru před imunitním systémem (Ashrafi *et al.*, 2006). Protein E5 je hlavní

onkoprotein u bovinního papilomaviru (DiMaio *et al.*, 1986). V případě HPV E5 sám o sobě není schopen navodit maligní transformaci, ale pomáhá proteinům E6 a E7, které jsou hlavními onkoproteiny HPV (Bravo & Alonso, 2004; Schiffman *et al.*, 2005).

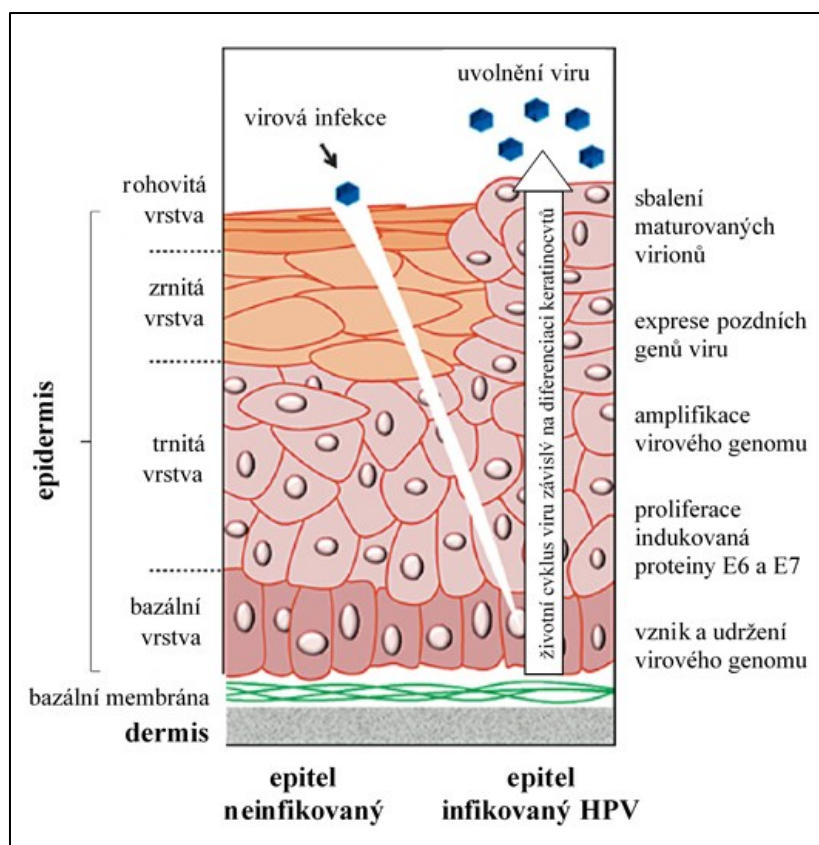
Nejdůležitější funkcí proteinů E6 a E7 je inhibice nádorových supresorů, která vede k transformaci buňky a karcinogenezi. Protein E6 váže protein o molekulové hmotnosti 53 kDa (p53, z angl. protein 53) (Huibregtse *et al.*, 1991) a protein E7 vyvazuje retinoblastomový protein (pRb, z angl. retinoblastoma protein), což vede k aktivaci buněčného cyklu infikovaných keratinocytů (Moody & Laimins, 2010).

Kapsida HPV je neobalená s ikosahedrální symetrií a měří přibližně 55 nm v průměru. Kapsidový protein L1 se sám uspořádává do pentamerních kapsomer (Nelson *et al.*, 2002), do jejichž centra je inkorporován protein L2, který pomáhá správnému sbalení DNA a sestavení virionu (Stauffer *et al.*, 1998).

2.3.2 Životní cyklus a mechanismy karcinogeneze vyvolané HPV

Životní cyklus HPV začíná infekcí buněk bazální vrstvy epitelu skrze mechanické poškození. Majoritní kapsidový protein L1 se váže na buněčné receptory, jako jsou nejčastěji integriny a heparansulfát proteoglykany, a navodí konformační změnu kapsidy. Poté dochází k interakci s dalším receptorem, jehož povaha není známá, a následně je umožněn vstup HPV do buňky pomocí endocytózy (Evander *et al.*, 1997; Surviladze *et al.*, 2012).

Po infekci se genom HPV replikuje nezávisle na buněčném cyklu pouze v nízkém počtu kopií a exprese virových genů je minimální, protože HPV je zcela závislý na buněčném replikačním aparátu a transkripčních faktorech, jejichž exprese se mění v průběhu diferenciaci keratinocytu. Produktivní životní cyklus viru je omezen na terminálně diferencované buňky vrstevnatého dlaždicového epitelu s aktivním buněčným cyklem. Probíhající buněčný cyklus v infikovaném keratinocytu spouští masivní expresi virových genů a replikaci virové DNA v mnoha kopiích, která je synchronizovaná s dělením buňky. Migrace keratinocytů na povrch epitelu a jejich diferenciaci zvyšuje expresi onkogenů *E6* a *E7*, což umožňuje amplifikaci epizomů HPV a expanzi buněk kompetentních k replikaci virové DNA. Na závěr probíhá exprese pozdních genů kódujících proteiny virové kapsidy, enkapsidace genomu HPV a šíření nových virionů z povrchu epitelu (Obr. č. 5) (Graham, 2017; Pan *et al.*, 2018).



Obr. č. 5: Životní cyklus HPV v diferencujících keratinocytech znázorněný na řezu epitelu.
Převzato a upraveno (Lehoux *et al.*, 2009).

HPV potřebuje ke své replikaci buněčnou DNA polymerázu a replikační faktory, které jsou produkovány pouze u mitoticky aktivních buněk, a proto kóduje proteiny, kterými reaktivuje syntézu DNA i u buněk, které neprocházejí buněčným cyklem. Virus vytvoří prostředí permissivní pro replikaci DNA, což může vést k deregulaci kontroly růstu v infikované buňce a k indukci proliferace (Stanley *et al.*, 2007).

Pro virus představuje karcinogeneze nechtěný vývoj životního cyklu, protože změny v infikovaných buňkách narušují replikační cyklus viru a viriony nemohou být produkovány. Predispozicí pro maligní transformaci je perzistující chronická infekce. Na premaligních děložních a cervikálních buňkách byl aktivně studován transformační proces iniciovaný infekcí HPV a vedl ke zjištění, že HPV karcinogeneze je kanonická. Podle tohoto modelu je iniciace infekce, vývoj a její udržení paralelní k normálnímu životnímu cyklu HPV, ale s perzistentní infekcí bazálních buněk se zvyšuje pravděpodobnost karcinogeneze (Hudelist *et al.*, 2004; Stanley *et al.*, 2007).

Transformační proces je ve většině případů spojen s integrací genomu HPV do genomu hostitelské buňky. Integrace vede k porušení genu *E2*, čímž dochází k odstranění negativního

regulátoru exprese onkogenů *E6* a *E7* a jejich zvýšené expresi (Hudelist *et al.*, 2004). Nekontrolované množství onkoproteinů HPV inaktivuje hlavní nádorové supresory p53 a pRb, což vede ke genomové nestabilitě, rezistenci vůči apoptóze a dysregulaci kontrol buněčného cyklu (Stanley *et al.*, 2007).

Protein 53 je považován za „strážce genomu“ (Lane, 1992), protože je aktivován jako odpověď na poškození DNA, aktivaci onkogenů, hypoxii apod. Před těmito nebezpečnými událostmi se snaží buňku chránit v podobě zastavení buněčného cyklu, navození senescence, apoptózy (Martinez-Zapien *et al.*, 2016). Protein p53 je vázán proteinem E6 v komplexu s hostitelskou ubiquitin ligázou E6AP (z angl. E6-associated protein), která ho označí polyubiquitinem a p53 je následně směřován k degradaci v proteazomu (Scheffner *et al.*, 1990; Scheffner *et al.*, 1993; Lechner & Laimins, 1994). Vazba p53 virovým onkoproteinem představuje hlavní mechanismus karcinogeneze nejen u nádorů vyvolaných HPV.

Dalším mechanismem přispívajícím ke vzniku nádorů HPV je inhibice pRb. Protein Rb společně s příbuznými proteiny reguluje aktivitu transkripčního faktoru E2F (z angl. E2 factor) a tím kontroluje přechod z G1 do S-fáze buněčného cyklu (Shirodkar *et al.*, 1992). Faktor E2F se váže do promotorů mnoha genů, které jsou zapojené do regulace buněčného cyklu, diferenciace, mitózy a apoptózy buňky (Morkel *et al.*, 1997). V normálních buňkách pRb vazbou na E2F potlačuje jeho transkripční aktivitu. V G1-fázi je pRb hyperfosforylován komplexem cyklin dependentních kináz, což vede k oddělení pRb a volný E2F stimuluje transkripci genů specifických pro S-fázi (Stevaux & Dyson, 2002). V infikovaných keratinocytech protein E7 porušuje vazbu hypofosforylovaného pRb a E2F i bez přítomnosti komplexu cyklin dependentních kináz, čímž dochází k vyvázání pRb z neaktivního komplexu s E2F, který se uvolní a spustí transkripci velkého počtu genů. Výsledkem je konstitutivní exprese genů regulovaných transkripčním faktorem E2F jako jsou geny pro cykliny A a E a také předčasný vstup do S-fáze a syntéza DNA (Zerfass *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2002).

2.3.3 Onemocnění spojená s HPV

Papilomavirus byl poprvé izolován z bradavic divokého králíka v roce 1933 (Shope & Hurst, 1933) a o dva roky později bylo zjištěno, že bradavice indukované papilomavirem mají potenciál maligní transformace (Rous & Beard, 1935). V roce 1956 bylo odhaleno, že HPV způsobuje cervikální léze dlaždicobuněčného epitelu (Koss & Durfee, 1956). Jedním z nejdůležitějších milníků byl rok 1983, kdy byl HPV poprvé izolován z karcinomu děložního

hrdla a byl popsán typ HPV16 (Durst *et al.*, 1983). V roce 1995 WHO definovala HPV16 a HPV18 jako lidské karcinogeny (IARC, 1995) a v roce 2008 za průkaz HPV jako agens vyvolávající karcinom děložního hrdla dostal Harald zur Hausen Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.

Počáteční objevy poloviny minulého století odstartovaly éru intenzivního výzkumu HPV, které vyvrcholily v roce 2006 uvedením první HPV vakcíny do rutinní praxe. HPV jsou velmi rozšířené viry, během svého života se 80 % populace infikuje α -HPV (Bruni *et al.*, 2019). I přesto, že téměř v 90 % případů se imunitní systém s infekcí do tří let od jejího vzniku vypořádá, přibližně 10 % HPV infekcí perzistuje a může vést k neoplastickým změnám a následně ke vzniku nádoru (Steenbergen *et al.*, 2014). Zpoždění mezi infekcí HPV a detekcí maligního onemocnění bývá několik dekád. Nejčastějším nádorem způsobeným infekcí HPV je karcinom děložního hrdla, který je v 99 % spojen s HR-HPV etiologií (Walboomers *et al.*, 1999; Alexander & Giuliano, 2012; World Health Organization[©], 2018) a představuje celosvětově čtvrtý nejčastější typ nádoru u žen (Arbyn *et al.*, 2020). Zároveň se jedná o nejběžnější příčinu smrti spojenou s rakovinným onemocněním u žen pod 35 let. Většina karcinomů děložního hrdla je však diagnostikována ženám ve věku 30-55 let s vrcholem incidence 49 let (Hammer *et al.*, 2016). Každoročně na karcinom děložního hrdla zemře přes 270 000 žen na celém světě a současně je diagnostikováno přes 500 000 nových případů (Bruni *et al.*, 2019).

Kromě karcinomu děložního hrdla a dalších karcinomů v anogenitální oblasti (vulvy, vagíny, anu a penisu) je HPV příčinou i části nádorů hlavy a krku. Dlaždicobuněčný karcinom v oblasti dutiny ústní byl studován, konkrétně na nádorech rtů, dutiny ústní a faryngu (Slaughter *et al.*, 1953), paralelně s výzkumem karcinomu děložního hrdla, ale spojení HPV s nádory hlavy a krku bylo zjištěno až později. Klinické a virologické podobnosti mezi genitálními kondylomaty a laryngeálními papilomy byly pozorovány začátkem 80. let 20. století (Quick *et al.*, 1980) (Syrjänen & Syrjänen, 1981) a o dva roky později v roce 1983 byla na základě IHC analýzy prokázána přítomnost HPV v karcinomech dutiny ústní (Syrjänen *et al.*, 1983).

Častější příčinou nádorů hlavy a krku je nadměrné kouření a konzumace alkoholu. V posledních 20 letech se však významně zvýšila, především u mladých mužů, incidence OPSCC indukovaného HPV. HPV je detekován ve vysoké míře u karcinomu tonsil a kořene jazyka, které jsou z 80–90 % způsobeny HPV16 (Gillison *et al.*, 2000; Gillison *et al.*, 2015).

2.3.4 HPV a imunitní systém

Životní cyklus HPV nezahrnuje fázi virémie a nedochází k cytolyze ani nekróze infikovaných buněk, a proto je pro hostitelský imunitní systém obtížné virus rozpoznat. Výsledkem je únik HPV před vrozeným imunitním systémem, přičemž HPV vyvinul několik strategií úniku imunitnímu systému jako je nízká produkce virových proteinů a virionů u produktivních lézí, interference s antigenní prezentací zprostředkovanou MHC, potlačení funkce T buněk, regulace zánětlivých odpovědí a modulace APC (Obr. č. 6) (Wang *et al.*, 2019). Klíčovou strategií HPV, jenž brání rozpoznání imunitním systémem, je nelytický cyklus bez uvolňování prozánětlivých signálů, který nevede k aktivaci APC a jejich migraci do lokálního prostředí (Wang *et al.*, 2019). Jako APC slouží především DC a Langerhansovy buňky (LC, z angl. Langerhans cell), které prezentují antigeny T lymfocytům. Výsledkem funkce APC je identifikace nebezpečných signálů v prostředí a iniciace antigenně specifické imunitní odpovědi.

Dendritické buňky mohou být aktivovány signály přes TLRs a jejich aktivace vede ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů a zvýšené antigenní prezentaci (Kupper & Fuhlbrigge, 2004). V přítomnosti HPV je aktivace DC přes TLRs inhibována, protože virový onkoprotein E7 potlačuje transkripci TLR9 (Hasan *et al.*, 2013).

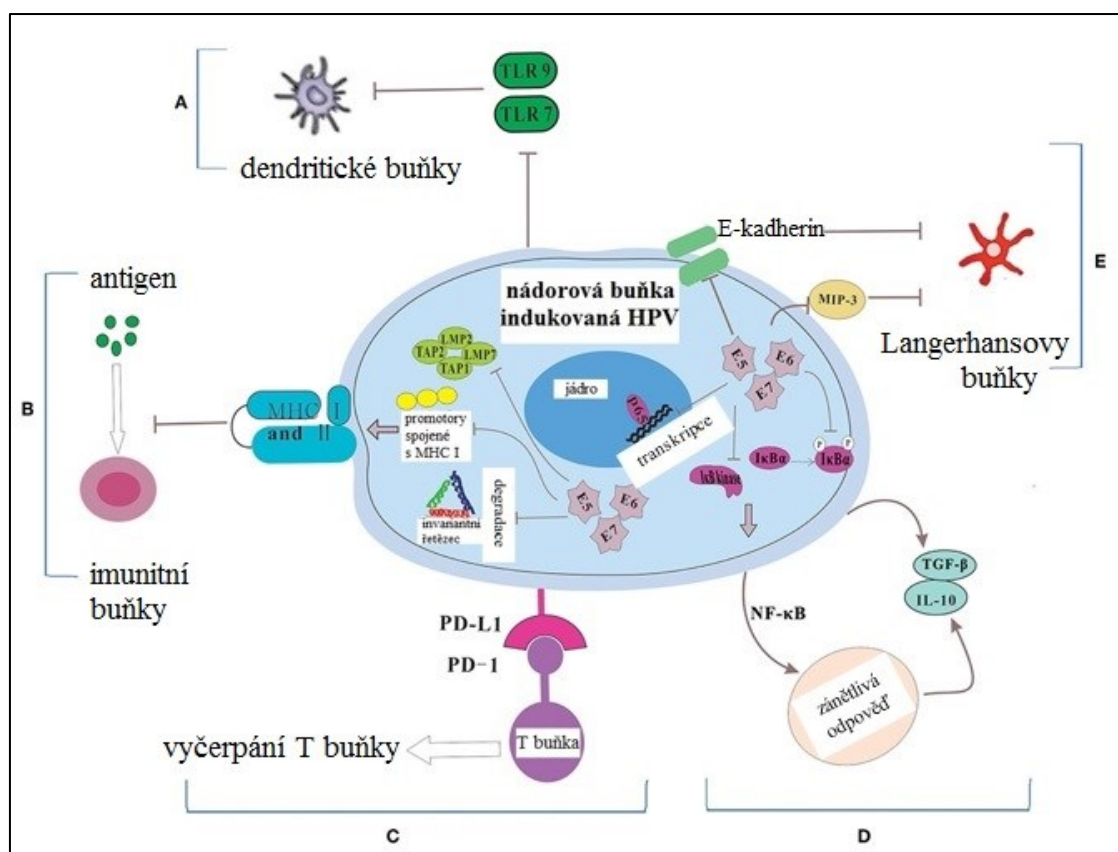
Onkoproteiny E6 a E7 HPV také regulují aktivitu a množství LC (Barros *et al.*, 2018). Protein E6 snižuje hladinu E-kadherinu, který je důležitý pro přilnutí keratinocytů a LC, což vede k redukci počtu LC v infikovaném epitelu (Matthews *et al.*, 2003). Protein E6, společně s E7, interferuje s transkripcí makrofágového zánětlivého proteinu 3 (MIP-3, z angl. macrophage inflammatory protein 3), což vede k menší migraci nematurovaných LC a k redukci imunitního dohledu v místě infekce HPV (Guess & McCance, 2005).

K eliminaci virové infekce se imunitní systém snaží využívat CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty, které jsou však funkční až po rozpoznání antigenů na MHC receptorech. HPV, konkrétně protein E5, narušuje funkci prezentace antigenů na MHC I a II a tím uniká imunitnímu dozoru T buněk a NK buněk (Georgopoulos *et al.*, 2000; Ashrafi *et al.*, 2006).

Infekce HPV může přejít do perzistentní a být predispozicí ke vzniku nádoru. Důležitou charakteristikou většiny chronických infekcí je chronický zánět, který má imunosupresivní funkci a podporuje progresi nádoru ve všech stádiích vývoje. Na rozdíl od řady chronických infekcí perzistence infekce HPV nevyvolává zánět (Munn, 2017). HPV ovlivňuje signalizaci NF- κ B a reguluje expresi kaskády zánětlivých cytokinů, což vede k regulaci zánětlivé odpovědi (Spitkovsky *et al.*, 2002). HPV v karcinomu děložního hrdla reguluje hladinu IL-10 a TGF- β ,

aby se vyhnul protinádorové imunitní odpovědi (Torres-Poveda *et al.*, 2014). Vyšší hladina IL-10 a TGF- β byla pozorována také u pacientů s HPV⁺ OPSCC než u zdravých jedinců (Polz-Dacewicz *et al.*, 2016).

K oslabení imunitního systému HPV také využívá interakce receptoru 1 programované buněčné smrti (PD-1, z angl. programmed death 1), což je klíčový kontrolní bod imunitního systému, a ligandu 1 programované buněčné smrti (PD-L1, z angl. programmed death-ligand 1). Receptor PD-1 je exprimován na maturovaných T a B buňkách a myeloidních buňkách a interakce s PD-L1 má imunosupresivní efekt, protože podporuje vyčerpání CD4⁺ a CD8⁺ T buněk (Blank & Mackensen, 2007). U HPV⁺ HNSCC bylo pozorováno, že nejenom nádorové buňky, ale i CD68⁺ makrofágy produkují velké množství proteinu PD-L1 (Concha-Benavente *et al.*, 2016).



Obr. č. 6: Schématické znázornění mechanismů úniku před imunitním systémem u nádorových buněk infikovaných HPV. A – inhibice TLR → neaktivace DC, B – snížená exprese MHC I a II → narušení prezentace antigenů, C – exprese „ligandu smrti“ PD-L1 → vyčerpání T buněk, D – regulace zánětu skrze NF- κ B signalizaci → uvolnění imunosupresivních zánětlivých mediátorů, E – snížení hladiny E-kadherinu → regulace počtu a aktivity LC. Převzato a upraveno (Wang *et al.*, 2019).

3 Cíle práce

Tato práce se snaží potvrdit či vyvrátit hypotézu, která zní: „U HPV negativních HNSCC detekujeme větší množství TAM typu M2 a zároveň i vyšší expresi imunosupresivních a makrofágových znaků M2 v porovnání s HPV pozitivními nádory stejné lokalizace.“ Pokud se hypotéza prokáže, lze znalosti o funkci a vlivu různých populací makrofágů na progresi HNSCC využít k identifikaci potenciálních imunoterapeutických cílů a k přesnějšímu zacílení léčby těchto nádorů.

Dílčí cíle práce jsou následující:

1. Izolace RNA a DNA z HNSCC různé etiologie a určení kvality nukleových kyselin. Stanovení přítomnosti a typu HPV ve vzorcích a ověření aktivní virové infekce.
2. Optimalizace metody multispektrální imunohistochemie a analýza vybraného souboru vzorků. Detekce TAM v HNSCC různé etiologie a stanovení fenotypu M1 nebo M2. Lokalizace a kvantifikace těchto populací v nádorovém mikroprostředí.
3. Detekce a kvantifikace vybraných imunosupresivních a makrofágových znaků (IDO1, ARG1, CD163, NOS2 a PTGS2) metodou RT-qPCR, jejichž exprese je ovlivňována přítomností různých populací makrofágů v nádorovém mikroprostředí. Analýza expresního profilu vybraných vzorků.
4. Korelace informací o TAM (výsledky imunohistochemické analýzy) s expresí vybraných imunosupresivních a makrofágových znaků. Porovnání výsledků HPV pozitivních a HPV negativních nádorů vzhledem k odlišné lokalizaci nádoru a k rizikovým faktorům karcinogeneze.

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky pacientů a použité buněčné linie

Ve své práci jsem použila vzorky pacientů ($n = 55$) s primárními nádory orofaryngu a dutiny ústní virové i nevirové etiologie poskytnuté Klinikou otorinolaryngologie (ORL, z angl. otorhinolaryngology) a chirurgie hlavy a krku 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice (FN) Motol. Vybrané vzorky byly shromažďovány v rámci souběžné studie v naší laboratoři (AZV 17-28055A „Stanovení fenotypu a funkce imunitních buněk jakožto prediktorů odpovědi na léčbu u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku“), která byla schválena etickou komisí FN Motol a Přírodovědecké fakulty UK. Všichni pacienti zařazení do studie podepsali informovaný souhlas a vyplnili dotazník týkající se rizikových faktorů pro infekci HPV a vzniku karcinomů hlavy a krku. Shromažďovány byly i klinické informace o pacientech. Tato práce byla zároveň součástí studie GAUK 1502118 „Detekce a charakterizace makrofágů v nádorovém mikroprostředí karcinomů hlavy a krku“.

Ve FN Motol byl z čerstvě chirurgicky odstraněné nádorové tkáně patologem odebrán nefixovaný vzorek, který byl ihned přenesen do zkumavky s RPMI médiem (Gibco, USA). Zároveň byl těmto onkologickým pacientům odebrán vzorek periferní srážlivé a nesrážlivé krve. Všechny vzorky byly okamžitě převezeny do Laboratoře molekulární a nádorové virologie v BIOCEVu, kde byly laborantkami pomocí rutinně používaného protokolu z nefixované tkáně izolovány nádorové buňky společně s TIL (z angl. tumor infiltrating lymphocyte) a ze vzorku krve byly izolovány mononukleární buňky periferní krve (PBMC, z angl. peripheral blood mononuclear cell). Pro zabránění degradace nukleových kyselin a zachování jejich kvality byla část vyizolovaných buněk z nádoru a krve uchována přes noc při 4 °C v médiu RNeasy[®] (Ambion, Invitrogen, USA). Druhý den bylo médium odstraněno a buňky byly zamrazeny při -80 °C do doby zpracování.

Na oddělení patologie FN Motol byla další část nádorové tkáně fixována formalínem a zalita do parafínu (FFPE, z angl. formalin-fixed paraffin-embedded). Z takto připravených vzorků byly patologem vyhotoveny řezy o síle 2 μm , které byly nanесeny na speciálně povrchově upravená podložní skla SuperFrost[®] Plus (VWR, Belgie), ke kterým má tkáň lepší adhezivitu. Pro každý vzorek byl připraven řez pro histologickou analýzu a detekci nádorové tkáně obarvený hematoxylinem a eosinem a FFPE řezy, které jsem využívala pro multispektrální imunohistochemii. Z části vzorků patolog nakrájel další řezy o síle 10 μm do sterilních mikrozku mávek pro izolaci nukleových kyselin.

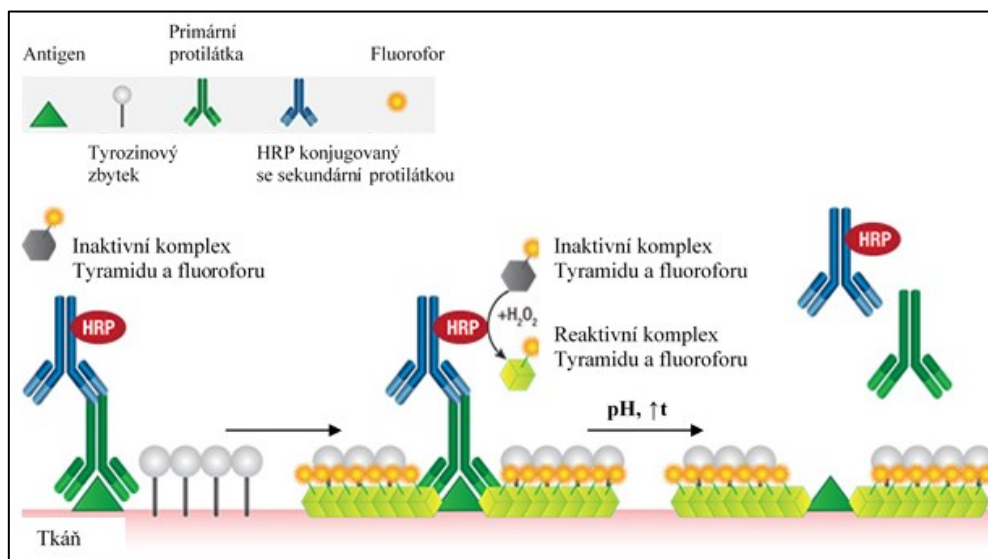
Jako pozitivní kontrolu polymerázových řetězových reakcí (PCR, z angl. polymerase chain reaction) jsem využívala dvě buněčné linie, a to HTB-35 (SiHa) a HaCaT, které jsou používané v Laboratoři molekulární a nádorové virologie (BIOCEV). Buněčná linie SiHa je odvozená od lidského karcinomu děložního hrdla s integrovanými 1–2 kopiemi HPV16 na buňku a buněčná linie HaCaT jsou HPV negativní imortalizované lidské keratinocyty. Pro tvorbu standardních křivek qPCR jsem používala buněčnou linii HTB-43 (FaDu) (ATCC, USA), která je odvozená od dlaždicobuněčného faryngeálního karcinomu a je negativní na HPV, a buněčnou linii CRL-3240 (UPCI:SCC152) (ATCC, USA), která je odvozená od dlaždicobuněčného hypofaryngeálního karcinomu a je pozitivní na HPV16. Využila jsem také nádorovou tkáň tonsilárního karcinomu (Tu16T) získanou z FN Motol, kterou zpracovala RNDr. Zuzana Vojtěchová, Ph.D., a primární lidské hepatocyty (12PHH) poskytnuté Institutem klinické a experimentální medicíny (IKEM), které izoloval ze vzorku jater Mgr. Václav Janovec.

4.2 Multispektrální imunohistochemie

Metoda multispektrální imunohistochemie (IHC, z angl. immunohistochemistry) se skládá z tříkrokového značení epitopů, nejprve primární protilátkou specifickou pro daný znak, dále sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP, z angl. horseradish peroxidase) a nakonec fluoroforem obsahujícím tyramidový substrát. Peroxidáza katalyzuje přeměnu neaktivního fluoroforu na fluorofor s aktivovanou formou tyramidu, který kovalentně reaguje s tyrosinovými residuy na nebo v těsném okolí detekovaného epitopu a umožní tak kovalentní připojení fluoroforu (Mason *et al.*, 2000) (Stack *et al.*, 2014).

Princip multispektrálního barvení spočívá v tom, že po obarvení je komplex primární a sekundární protilátky odstraněn vařením v pufru o vhodném pH, avšak kovalentně navázaný fluorofor zůstává připojený na daný epitop a tím je umožněno další kolo barvení s jinou protilátkou proti jinému znaku. Tento princip tak umožňuje najednou detekci více znaků na stejné tkáni (Obr. č. 7).

Poté jsou nabarvené vzorky tkáně vyfoceny fluorescenčním spektrálním mikroskopem s několika fluorescenčními filtry. Fluorescenční mikroskopie je metoda využívající světelný mikroskop k detekci a pozorování fluorescenčních látek ve vzorku. Fluorescenční látky, neboli fluorofory, po ozáření paprskem o dané vlnové délce vyžáří fotony světla, vzniká fluorescence a emitované světlo s delší vlnovou délkou je snímáno kamerou (Stack *et al.*, 2014). Nakonec je získán obraz tkáně, na kterém lze detekovat jednotlivé fluorofory, tedy jednotlivé epitopy. Problémem této metody mohou být spektrální překryvy jednotlivých fluoroforů a limity detekčních přístrojů.



Obr. č. 7: Princip multispektrální imunohistochemie. Převzato a upraveno podle aplikační poznámky „Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry with Tyramide Signal Amplification“ (Cell Signaling Technology, USA).

4.2.1 Průběh detekce buněčných znaků

Fluorescenční značení jsem prováděla na 2µm FFPE řezech s použitím Opal™ 7-color Manual IHC Kitu (Akoya Biosciences, USA). Řezy jsem deparafinizovala 2 h při 60 °C v hybridizační peci, projasnila 3× v xylenu po dobu 10 min a zavodnila v sestupné alkoholové řadě, ve 100% a 96% etanolu (EtOH) 5 min a v 70% EtOH 2 min. Poté jsem řezy promyla 2 min v destilované vodě (dH₂O, z angl. distilled water). Pro fixaci tkáně jsem preparáty inkubovala 20 min ve 4% neutrálním pufovaném formalínu (NBF, z angl. neutral buffered formalin) a poté promyla 2 min v dH₂O a 2 min v TBST (z angl. tris-buffered saline and polysorbate „Tween“). TBST bylo připraveno z 0,1M Tris-HCl (pH 7,5), 0,15M NaCl a 0,05% Tween® 20 a pH upraveno na 7,5.

K inaktivaci endogenní peroxidázy a k odhalení epitopů jsem využila pufr o různém pH, tzv. AR pufr (z angl. antigen retrieval), který napomáhá vrátit epitopy do nativní konformace, která byla narušena fixací v NBF. Řezy jsem ponořila do citrátového pufru „AR6 Buffer“ (Akoya Biosciences, USA) s pH 6,0 nebo do Tris-EDTA pufru „AR9 HIER T-EDTA Buffer“ pH 9,0 (Zytomed Systems, Německo) a vařila v mikrovlnné troubě po dobu 15 min. Následně jsem kyvetu s pufrem nechala vychladnout 20 min při pokojové teplotě (RT, z angl. room temperature) a preparáty promyla 2 min v dH₂O a 2 min v TBST.

Každý řez jsem ohraničila hydrofobním perem (Elite PAP Pen, Diagnostic BioSystems, USA), přidala 100 µl roztoku pro ředění protilátek a blokování, tzv. Ab diluent (z angl. antibody) (Antibody Diluent/Block, Akoya Biosciences, USA), a 10 min při RT ve vlhké komůrce blokovala volné Fc receptory na buňkách. Následně jsem roztok odstranila, nanasla 100 µl příslušné primární protilátky (Tab. č. 1), kterou jsem ředila v Ab diluentu, a v závislosti na použité protilátce inkubovala 1 h při RT nebo přes noc (OVN, z angl. over-night) při 4 °C ve vlhké komůrce.

Po inkubaci jsem protilátku odstranila a preparáty promyla třikrát po dobu 2 min v TBST. Na řezy jsem nanasla 100 µl sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (Opal™ Polymer HRP Ms+Rb, Akoya Biosciences, USA), která je specifická pro myši a králíčí primární protilátky. Následovala inkubace 10 min při RT ve vlhké komůrce a promývání 3× 2 min v TBST. Pro vizualizaci epitopu jsem nanasla 100 µl příslušného fluoroforu Opal™ ředěného Opal™ diluentem (oba Akoya Biosciences, USA), inkubovala 10 min při RT ve vlhké komůrce a promyla 3× 2 min v TBST. Od této chvíle byly vzorky zpracovávány a uchovávány ve tmě, aby se minimalizovala možnost vyzáření daného fluoroforu.

Poté jsem řezy opět vařila v pufru o daném pH pro odhalování epitopů, čímž došlo k odmytí komplexu primární a sekundární protilátky (tzv. stripování), ale fluorofor zůstal kovalentně navázan na daném epitopu. Kromě odmytí komplexu protilátek pufr odhalil epitopy pro následné kolo značení a mohla jsem tak detekovat další 4 různé epitopy stejným postupem s příslušnou primární a sekundární protilátkou a příslušným Opal™ fluoroforem.

Po označení všech daných epitopů jsem nakonec ke vzorkům přidala 100 µl roztoku fluoroforu pro detekci jader buněk DAPI (z angl. 4',6-diamidino-2-phenylindole) a inkubovala 5 min při RT ve vlhké komůrce ve tmě a promyla 3 × 2 min v TBST. DAPI jsem ředila dle pokynů výrobce, a to 2 kapky do 1 ml TBST. Na závěr jsem na sklíčka nanasla 2 kapky montovacího média Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich, USA) a přikryla krycím sklíčkem. Proti vysušení tkáně způsobené odparem montovacího média jsem okraje krycího sklíčka zafixovala lakem na nehty.

Tab. č. 1: Popis použitých protilátek. CD68 – panmakrofágový znak, CD163 – znak typický pro makrofágy typu M2, Arginase I – znak typický pro makrofágy typu M2, CD80 – znak typický pro makrofágy typu M1, cytokeratin – znak epiteliálních buněk

Název protilátky	klon	původ	izotyp	výrobce
CD68	KP1	myš	IgG1 kappa	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
CD163	10D6	myš	IgG1 kappa	ThermoFisher Scientific, USA
Arginase I	A-2	myš	IgG1 kappa	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
B7-1/CD80	62N3G8	myš	IgG1 kappa	Novus Biologicals, USA
Cytokeratin Pan Type I/II Antibody Cocktail	AE1/AE3	myš	IgG2b kappa	ThermoFisher Scientific, USA

4.2.2 Kontroly pro multispektrální imunohistochemii

Pro ověření specifity vazby sekundární protilátky jsem provedla tzv. „no primary“ kontrolu. Principem je nahrazení primární protilátky Ab diluentem, dále jsem pokračovala nezměněným postupem barvení sekundární protilátkou a příslušným fluoroforem. Protože bez primární protilátky nedochází k vazbě sekundární protilátky a fluoroforu, na tkáni nesmí být detekován žádný signál.

Izotypová kontrola zjišťuje míru specifity primární protilátky a ověřuje, zda se izotyp neváže na cílový epitop. Protilátky mohou být různých izotypů. Pro protilátky CD68, CD163 a ARG1 jsem použila izotyp IgG1 kappa (Sigma-Aldrich, USA). Protilátka CD80 má izotyp IgG2b kappa, který však nebyl v naší laboratoři dostupný, proto jsem využila směs myších IgG

izotypů (Upstate Cell Signaling Solutions, USA), jenž daný izotyp obsahuje. Pro určení specificity barvení jsem použila stejnou koncentraci izotypu jako je nejvyšší koncentrace příslušné primární protilátky.

Kontrolou odmytí protilátek, tzv. stripovací kontrolou, zjistím, zda dochází k úplnému odstranění komplexu primární a sekundární protilátky. Principem je, že po barvení primární a sekundární protilátkou s daným fluoroforem pokračuji vařením v AR pufru určeném pro následující protilátku. Druhou, následující protilátku však nepoužiji a ihned následuje značení pouze sekundární protilátkou a k ní příslušným fluoroforem. Pokud nedochází k úplnému odmytí první primární protilátky, je v daném místě možné pozorovat i signál druhého fluoroforu. Dojde tak k překryvu fluoroforů a v takovém případě se jedná o falešně pozitivní výsledek, což vyžaduje úpravu podmínek stripování s příslušným AR pufrem.

4.2.3 Tvorba multiplexového panelu

Metodu multispektrální imunohistochemie jsem optimalizovala na kontrolních FFPE vzorcích zdravé tkáně tonsil a nádorové tkáně nádorů hlavy a krku. Nejdříve jsem vybrala a optimalizovala jednotlivé klony primárních protilátek. Optimalizaci protilátek jsem započala podle parametrů uvedených ve vědeckých publikacích, přičemž jsem se zaměřila zejména na údaje o ředění primární protilátky a použitém AR pufru. Začala jsem barvením protilátkou v nejvyšší koncentraci s inkubací přes noc při 4 °C, abych zjistila, jestli daná protilátka funguje na vybraném typu tkáně. Následně jsem protilátku titrovala, případně vyzkoušela kratší inkubaci 1 h při RT.

V programu InForm 2.4.6. (Akoya Biosciences, USA) jsem sledovala hodnoty intenzity signálu fluoroforu dané protilátky. Signál fluoroforů je doporučeno držet v rozmezí 5-20, aby byl program schopen buňku vyhodnotit jako pozitivní. Současně je nutné intenzitu signálu v místě barvení fluoroforu hodnotit s nenabarveným pozadím v okolí, kde by měl daný fluorofor dosahovat nejméně 10× nižšího signálu. Protilátka byla validována tehdy, pokud se vážala specificky, signál fluoroforu byl dostatečný a současně všechny výše uvedené kontroly byly negativní.

Pro správné značení primární protilátkou je potřeba použít i odpovídající pufr pro odmaskování epitopů. Pro všechny protilátky jsem vyzkoušela pufr AR6 i AR9 a podle výsledků vybrala ten vhodný. Kromě typu pufru ovlivňuje kvalitu značení daného epitopu i délka vaření v pufru. Standardně inaktivace endogenní peroxidázy a odhalení epitopů probíhá 15 minut, ale s vícečetným AR může intenzita detekovaného signálu klesat nebo narůstat.

S tímto souvisí i sestavení pořadí protilátek v multiplexu. Některé znaky potřebují delší čas pro odhalení svých epitopů, tudíž tyto znaky jsem dala do pozdějších pozic při sestavení multiplexu. Zároveň epitop pro protilátku v první pozici sice potřebuje standardní čas pro odmaskování, ale bylo třeba brát v úvahu, že asociovaný fluorofor bude nejvíce exponován okolnímu světlu. Vlivem postupného vysvěcování tohoto fluoroforu může docházet ke ztrátě určitého procenta signálu daného znaku.

Při výběru fluoroforů jsem se řídila doporučením, že vysoce abundantním znakům je vhodné přiřadit méně svítivý fluorofor a naopak málo abundantní znaky by měly být značeny vysoce svítivým fluoroforem. Zároveň je při přiřazování fluoroforů v multiplexu nutné zvážit i očekávanou koexpresi znaků na jedné buňce a v takovém případě nepoužít fluorofory o blízké vlnové délce.

Po navržení vhodného pořadí protilátek v multiplexu jsem ke každé protilátce vhodně přiřadila fluorofor tak, aby signály fluoroforů byly v multiplexu vybalancovány a abych minimalizovala případný překryv spekter.

4.2.4 Analýza vzorků a tvorba algoritmu

Nabarvené vzorky tkáně ($n = 54$) jsem fotila systémem Mantra™ (Akoya Biosciences, USA), který se skládá z fluorescenčního spektrálního mikroskopu OLYMPUS BX43 (Olympus Life Science, USA), softwaru pro focení obrazu Mantra™ Snap 2.0.0. a programu InForm 2.4.6. pro analýzu obrazu (vše Akoya Biosciences, USA). Spektrální mikroskop obsahuje 5 filtrů (DAPI, FITC, Cy3, Texas Red a Cy5 filtr) (Obr. č. 8). Pro každý nabarvený řez jsem nastavila vhodný expoziční čas pro jednotlivé filtry snímající jednotlivé fluorofory a následně jsem řez vyfotila ve zvětšení 20×10 .

Správná detekce jednotlivých fluoroforů v programu InForm 2.4.6. vyžadovala vytvoření tzv. spektrálních knihoven, pro které bylo nutné vyrobit kontrolní preparáty nabarvené pouze jedním fluoroforem. Z takto připravených vzorků byla extrahována barevná spektra jednotlivých fluoroforů. Uložená spektra byla poté aplikována na surové fotografie (lineární unmixing) a získali jsme upravený obrázek, ve kterém jsme byli schopni detekovat jednotlivé fluorofory a tudíž i jednotlivé epitopy. Preparáty pro vytvoření spektrálních knihoven a současně i preparáty pro odstínění autofluorescence byly v naší laboratoři připraveny již dříve.

V programu InForm 2.4.6. jsem kontrolovala, zda fotografie neobsahovaly rozmazané oblasti, trhliny, vlákna nebo jinak mechanicky poškozenou tkáň, která by znemožňovala

budoucí analýzy. Pro každý vzorek nádoru jsem vybrala 5 reprezentativních oblastí pro následnou analýzu.

Pomocí několika strukturně odlišných fotografií nádorů jsem metodou opakovaného trénování v programu InForm 2.4.6. vytvořila algoritmus pro analýzu vzorků zahrnující lineární unmixing, segmentaci tkáně, segmentaci buněk a fenotypizaci. Lineární unmixing umožňoval oddělit smíšené fluorescenční signály podle jednotlivých fluoroforů a stanovit relativní přínos všech fluoroforů na každý pixel daného snímku (Zimmermann, 2005). Cílem bylo určení spektrálních profilů pro každý pixel a na závěr vytvoření spektra relativního ke spektrální knihovně standardů (Rainey & Davidson, 2015; National High Magnetic Field Laboratory, ZEISS, Německo).

Po lineárním unmixingu následovala segmentace tkáně na tři kategorie, a to nádorová tkáň, stroma a pozadí. Nádorová tkáň byla označena na základě barvení epiteliálních buněk pomocí cytokeratinu, stroma zahrnovalo buňky negativní na cytokeratin a pozadí neobsahovalo žádné buňky a bylo v místě mezer mezi tkáněmi. Aby byl program schopen různé typy tkáně rozpoznat, musela jsem pro každou kategorii ručně označit několik oblastí a tím ji definovat. Program na základě označených oblastí segmentoval další vzorky, a pokud segmentace neodpovídala mým požadavkům, mohla jsem označit další oblasti, program přetrénovat a tím lépe definovat kategorie pro jednotlivé typy tkáně.

Další krok zahrnoval segmentaci buněk na membránu, cytoplazmu a jádro. Nejprve program provedl segmentaci jader podle nastavené prahové hodnoty signálu DAPI barvícího jádra. Dále byla nastavena minimální velikost jader a citlivost pro jejich segmentaci. Systém ignoroval jádra, která byla menší než minimální stanovená velikost udávaná v pixelech, a zároveň nebyl schopen rozlišit dvě jádra blízko u sebe, pokud byla citlivost pro segmentaci jader příliš nízká. Zároveň u keratinizovaných buněk, kde došlo k degradaci jader a nízké vazbě DAPI, mohlo chybně docházet k násobné segmentaci jader, a proto bylo nutné vybalancovat hladinu citlivosti segmentace (Obr. č. 9).

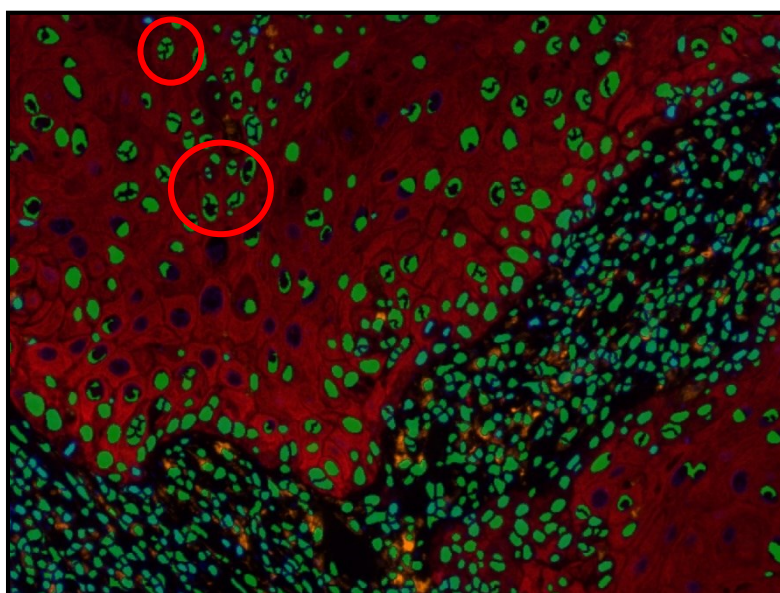
Velikost cytoplazmy bylo možné ovlivnit nastavením maximální vzdálenosti od jádra po membránu buňky. Segmentovaná membrána mohla být příliš nepravidelná, proto program umožňoval zjemnit a zakulatit okraje buňky, aby byla kompaktnější. Úpravou některých zmíněných parametrů jsem kontrolovala správnou segmentaci jednotlivých buněk do dalšího kroku tvorby algoritmu.

Posledním a nejdůležitějším krokem pro tvorbu algoritmu byla fenotypizace jednotlivých populací makrofágů. Podle kombinace fluoroforů jsem definovala šest subpopulací buněk: subpopulace M1 makrofágů, která byla pozitivní na protilátku CD68 a

CD80, dvě subpopulace M2 makrofágů, které byly obě pozitivní na CD68 a poté na protilátku CD163 nebo ARG1, dále populace značená protilátkou ARG1, která zahrnovala všechny buňky exprimující ARG1 kromě makrofágů, poté populace s protilátkou CD80, do které patřily všechny aktivované T a B buňky a DC, a nakonec ostatní buňky bez makrofágového znaku, které mohly i nemusely být pozitivní na protilátku barvící cytokeratin. Populace buněk jsem na snímcích tkáně označila a učila program je rozpoznávat. Kvůli jisté variabilitě mezi vzorky, která způsobovala rozdíly v intenzitách signálů fluoroforů, bylo nutné program opakovaně trénovat, aby správně analyzoval populace buněk ve všech typech nádorů. Vytvořený algoritmus jsem na zbývajících vzorky studie aplikovala hromadně.

Filter / Signal Band	DAPI	FITC	Cy3	Texas Red	Cy5
Fluorophore					
Spectral DAPI					
Opal 520					
Opal 540					
Opal 570					
Opal 620					
Opal 650					
Opal 670					
Opal 690					

Obr. č. 8: Seznam fluoroforů Opal™ s uvedenými vlnovými délkami a odpovídajících filtrů spektrálního mikroskopu. Převzato z manuálu Opal™ (Opal Assay Development Guide, Akoya Biosciences, USA).



Obr. č. 9: Násobná segmentace rozpadajících se jader (označena červenými kruhy) keratinizovaných buněk v programu InForm 2.4.6., kterou je nutné minimalizovat vybalancováním hladiny citlivosti pro segmentaci jader. zeleně – segmentovaná jádra podle DAPI, modře – DAPI, červeně – cytokeratin označující oblast nádoru

4.2.5 Statistické vyhodnocení

Po analýze všech vzorků ($n = 54$) optimalizovaným algoritmem v programu InForm 2.4.6. (Akoya Biosciences, USA) jsem pro každý vzorek na základě pěti vyfocených reprezentativních oblastí získala data o ploše jednotlivých kategorií (nádor a stroma) a fenotyp všech buněk nacházejících v těchto kategoriích. Fenotyp je buňce dán s určitou hodnotou spolehlivosti uvedenou v procentech. Lze říci, že tato hodnota vyjadřuje pravděpodobnost, že daná buňka má fenotyp přiřazený programem (InForm User Manual 2.4.1. Appendix C: Phenotype Classification by Multinomial Logistic Regression, Akoya Biosciences, USA). Do dalších analýz jsem zahrнула buňky s hodnotou spolehlivosti přiřazení fenotypu vyšší než 75 %, protože pod tuto hladinu nemůžeme zaručit spolehlivost určení správného fenotypu.

Pro statistické analýzy jsem používala počet buněk daného fenotypu vztažený na megapixel. Počet buněk určitého fenotypu jsem vydělila plochou tkáně (nádor nebo stroma) v pixelech a vynásobila číslem 1 048 576 pro přepočet na megapixel. Výsledná data jsem importovala do programu GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA). Nejprve jsem provedla Kolmogorov-Smirnovův a Shapiro-Wilkův test normality pro určení rozložení dat. Aplikací deskriptivní statistiky jsem zjistila minimální a maximální hodnoty, mediány a standardní odchylky pro daný soubor dat. Pro porovnání počtu makrofágů mezi pacienty HPV⁺ a HPV⁻ jsem použila nepárový Mann-Whitney test a pro porovnání počtu pozitivních buněk v nádoru a stromatu daného pacienta jsem použila párový Wilcoxon test. Na závěr jsme využila nepárový Mann-Whitney test pro zjištění rozdílů v množství a typech makrofágů v odlišných lokalizacích nádoru a u kuřáků a nekuřáků. Kouření v průběhu života bylo hodnocené binární hodnotou 0/1 (ne/ano). K interpretaci statistických testů jsem využila P hodnotu, která určuje signifikanci výsledků. Za signifikantní jsem považovala pozorované rozdíly s P hodnotou nižší než 0,05.

4.3 Příprava nukleových kyselin

Vzorky jsme vybrali na základě IHC detekce proteinu p16 provedené patologem ve FN Motol. Expres genu kódujícího protein p16 je obvykle vyšší u HPV⁺ nádorů v porovnání s HPV⁻, protože virový onkoprotein E7 inaktivuje tumor supresorový protein pRb a ztráta jeho funkce vede k významnému zvýšení hladiny p16 kvůli absenci negativní zpětné kontroly regulace exprese (Li *et al.*, 1994). Přítomnost p16, ve většině případů, tedy koreluje s HPV pozitivitou, a proto bylo naším záměrem vytvořit dvě přibližně stejně početné skupiny vzorků (pozitivní a negativní na přítomnost p16), u kterých jsme předpokládali HPV⁺ a HPV⁻ status. Ten jsme ověřili dalšími analýzami.

4.3.1 Izolace nukleových kyselin z FFPE

Nukleové kyseliny z FFPE tkáně (n = 7) jsem izolovala pomocí kitu Ambion Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues (Applied Bioscience, USA). Izolaci RNA a DNA předchází deparafinizace tkáně a lýze buněk. K FFPE vzorku jsem přidala 1 ml xylenu (Penta, Česká republika), promíchala a inkubovala 3 min při 50 °C. Poté jsem vzorky centrifugovala 2 min při RT 10 000 × g a odstranila supernatant. Promývání xylenem jsem provedla celkem 3×, aby došlo ke kompletnímu odstranění parafínu. Následně jsem k peletu přidala 1 ml 100% EtOH, promíchala a centrifugovala 2 min při RT na maximální rychlost (21 000 × g). Supernatant jsem odstranila a promývání provedla celkem 2×. Pro odstranění zbytkového EtOH jsem pelet nechala sušit 15 min na vzduchu při RT.

Ke vzorku jsem napipetovala 800 µl lyzačního pufru a 8 µl proteázy (Applied Bioscience, USA), reagentie promíchala a inkubovala 3 h při 50 °C. Poté jsem odebrala 400 µl pro izolaci RNA a zbytek vzorku inkubovala 48 h při stejné teplotě 50 °C pro izolaci DNA.

Pro izolaci RNA jsem k odebranému vzorku přidala 480 µl Isolation Additive, promíchala a přidala 1,1 ml 100% EtOH a opatrně promíchala pipetováním. Na kolonku jsem nanasla 700 µl vzorku a centrifugovala 1 min při 10 000 × g. Tekutinu ze sběrné zkumavky jsem slila, na kolonku nanasla zbytek vzorku a za stejných podmínek opět centrifugovala. Tento krok jsem opakovala do využití celého objemu vzorku. Kolonku jsem postupně promyla 700 µl Wash 1 a centrifugovala 1 min při 10 000 × g, dále 500 µl Wash 2/3 a pro úplné odstranění tekutiny jsem vzorek centrifugovala dvakrát po dobu 1 min při 10 000 × g. Pro odstranění reziduální DNA jsem na kolonku nanasla 60 µl DNázové směsi, kterou jsem připravila z 6 µl 10× koncentrovaného DNázového pufru, 4 µl DNázy a 50 µl vody prosté RNáz, a inkubovala 30 min při RT. Následně jsem kolonku opět promývala roztokem Wash 1 a Wash 2/3. Kolonku

jsem přenesla do nové zkumavky a nanasla 30 μ l elučního pufru, nechala 1 min stát při RT a centrifugovala 1 min na maximální rychlost ($21\,000 \times g$). Eluci jsem opakovala, aby výsledné množství vzorku bylo 60 μ l. Vyizolovanou RNA jsem uložila do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ze zbytku vzorku tkáně jsem následně provedla izolaci DNA, která probíhala podobně jako izolace RNA s tím rozdílem, že na kolonku jsem nanasla 60 μ l směsi, která se skládala z 10 μ l RNázy A a 50 μ l vody prosté RNáz, a inkubovala 30 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. K eluci jsem použila 30 μ l elučního pufru vytemperovaného na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugovala 1 min při maximální rychlosti ($21\,000 \times g$). Eluci jsem opakovala se stejným množstvím elučního pufru pro celkový objem vzorku 60 μ l. Vyizolovanou DNA jsem skladovala při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro průběžnou kontrolu, že nedošlo ke kontaminaci vzorků a roztoků během izolace, jsem ke každé sérii a minimálně za každý devátý vzorek zařadila negativní kontrolu izolace nukleových kyselin, která obsahovala pouze čisté roztoky a pufrы, a zpracovávala ji společně se vzorky.

4.3.2 Izolace nukleových kyselin z buněk uchovaných v médiu RNeasy[®]

Izolace nukleových kyselin z nádorových ($n = 55$) a krevních buněk ($n = 7$) uchovaných v RNeasy[®] (Ambion, Invitrogen, USA) probíhala s použitím kitu NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel, Německo) se soupravou DNA pufrů (NucleoSpin[®] RNA/DNA Buffer Set) pro izolaci RNA a DNA z buněk a tkání. Vzorky jsem po vyjmutí z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rozmrazila na ledu, přidala přibližně polovinu objemu daného vzorku chlazeného $1\times$ PBS (z angl. phosphate-buffered saline) a centrifugovala 1 min při RT $5\,000 \times g$. Supernatant jsem opatrně odstranila a k peletu přidala 350 μ l RA1 lyzačního pufru s 3,5 μ l β -merkaptoetanolu a promíchala. Při větším počtu buněk jsem lyzát několikrát homogenizovala nasátím a vysátím sterilní injekční stříkačkou s jehlou o průměru 0,9 mm. Na homogenizační kolonku jsem nanasla lyzát a filtrovala centrifugací 1 min při RT $11\,000 \times g$. K lyzátu jsem přidala 350 μ l 70% EtOH, pipetováním promíchala a přenesla do izolační kolonky. Vzorek jsem centrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$ a kolonku přenesla do nové sběrné zkumavky.

Nejprve jsem izolovala DNA, kolonku jsem dvakrát promyla 500 μ l DNA Wash a centrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$. Otevřela jsem víčko kolonky a inkubovala 3 min při RT pro úplné odstranění EtOH. DNA jsem eluovala přidáním 60–100 μ l DNA elučního pufru (podle vstupního množství vzorku) po 5 min inkubaci a centrifugaci 1 min při $11\,000 \times g$. Kolonku jsem přenesla do nové zkumavky pro izolaci RNA a vyizolovanou DNA jsem uložila do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro odstranění zbylé DNA jsem na kolonku nanasla 95 μ l reakční směsi, kterou jsem připravila z 10 μ l DNázy a 90 μ l reakčního pufru pro DNázu (Reaction Buffer for rDNase), a inkubovala 15 min při RT. Kolonku jsem promyla 200 μ l pufru RAW2, centrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$ a poté přenesla do nové sběrné zkumavky. Následně jsem kolonku promyla 600 μ l pufru RA3 a 250 μ l pufru RA3. Po centrifugaci 2 min při $11\,000 \times g$ jsem pro eluci RNA přidala na kolonku 30–60 μ l vody (podle vstupního množství vzorku) a centrifugovala 1 min při $11\,000 \times g$. Vyizolovanou RNA jsem uložila do $-80\,^{\circ}\text{C}$.

Pro potvrzení, že nedošlo ke kontaminaci vzorků nebo roztoků během izolace, jsem kontrolu izolace nukleových kyselin zařadila ke každé sérii a minimálně za každý devátý vzorek a zpracovávala ji stejně jako ostatní vzorky.

4.3.3 Určení koncentrace a kvality nukleových kyselin

Koncentraci a čistotu vyizolované DNA i RNA jsem měřila na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Nukleové kyseliny absorbují maximum UV záření v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, avšak při 260 nm absorbují UV záření i proteiny, jejichž absorpční maximum je při 280 nm. Čistotu vzorku nukleové kyseliny tak určuje poměr absorbancí při vlnové délce 260 nm a 280 nm (Manchester, 1996). Podle manuálu lze z buněk uchovaných v RNAlateru[®] získat RNA s čistotou 1,9 (měřeno při pH 7,5) a DNA s 1,7–2,0 (NucleoSpin[®] RNA/DNA Buffer Set, Macherey-Nagel, Německo). Nukleové kyseliny izolované z FFPE řezu by měly mít poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm v rozmezí 1,8–2,1 pro RNA a pro DNA 1,7–1,9 (Ambion Recover All[™] Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues, Applied Bioscience, USA).

Míru degradace RNA jsem zjišťovala elektroforetickým bioanalyzátozem Experion[™] Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, USA). Metoda spočívá v analýze celkové RNA, její integrity, čistoty a koncentrace pomocí mikrofluidního čipu s mikrokanálky, který pracuje na principu kapilární elektroforézy (Imbeaud *et al.*, 2005). Postupovala jsem podle firemního protokolu Experion[™] RNA StdSens Analysis Kitu a na čip pro 12 vzorků jsem nanasla 1 μ l RNA každého vzorku a 1 μ l žebříčku RNA optimalizovaného pro automatickou elektroforézu v tomto systému. Výsledkem analýzy byl elektroforetogram s dvěma hlavními vrcholy reprezentujícími 18S a 28S rRNA. Systém pro určení integrity a stupně degradace eukaryotické RNA využívá algoritmus označovaný jako RQI (z angl. RNA quality indicator), který nabývá hodnot od 1 do 10, přičemž číslo 1 označuje nejvíce degradovanou RNA (Schroeder *et al.*, 2006).

Pro zjištění míry degradace DNA izolované z FFPE materiálu jsem dále provedla multiplexovou PCR na DNA izolované ze dvou typů tkáně. Principem je amplifikace více různě dlouhých úseků referenčního genu *GAPDH* (z angl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), které mají velikost 100 pb, 200 pb, 300 pb a 400 pb. Reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala 1× koncentrovaný reakční pufr, 3mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM směsi nukleotidů (Promega, USA), 0,133µM směsi 4 různých párů primerů (Tab. č. 2) (Van Beers *et al.*, 2006), 0,5 U AmpliTaq Gold DNA polymerázy (Thermo Fisher Scientific, USA), 9,9 µl vody prosté RNáz a 5 µl DNA. Vzorky jsem amplifikovala v termocykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Program obsahoval iniciační fázi denaturace 10 min při 95 °C, dále 35 cyklů skládajících se z 1 min při 94 °C, 1 min při 56 °C a 3 min při 72 °C. Následovala závěrečná fáze 7 min při 72 °C. Kontroly PCR reakce obsahovaly reakční směs a DNA buněčné linie HaCaT nebo vodu prostou RNáz.

Produkty PCR reakce jsem analyzovala pomocí gelové elektroforézy. Připravila jsem 3% gel ze 40 ml TBE (z angl. Tris – borate – EDTA), 1,2 g agarózy NuSieve™ (Lonza, USA) a 2 µl barviva GelRed™ (Biotium, USA). Na gel jsem nanášela 3 µl žebříčku GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) a 10 µl vzorku smíchaného spolu se 3 µl 6× koncentrovaného nanášecího pufru loading buffer/dye (Thermo Fisher Scientific, USA). Analýza trvala 35 min při napětí 110 V a vizualizaci produktů jsem provedla přístrojem k detekci fluorescence InGenius³ (Syngene, UK).

Tab. č. 2: Seznam použitých primerů. HPRT – hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza; * β -globin prováděný v Národní referenční laboratoři pro papillomaviry a polyomaviry (NRL PV) v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze (ÚHK).

Cílový gen	Název primeru	Délka PCR produktu	Sekvence 5' - 3'
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F 100	100 pb DNA	GTTCCAATATGATTCCACCC
	GAPDH-R 100		CTCCTGGAAGATGGTGATGG
	GAPDH-F 200	200 pb DNA	AGGTGGAGCGAGGCTAGC
	GAPDH-R 200		TTTGTGCGGTGGAAATGTCCT
	GAPDH-F 300	300 pb DNA	AGGTGAGACATTCTTGCTGG
	GAPDH-R 300		TCCACTAACCAGTCAGCGTC
	GAPDH-F 400	400 pb DNA	ACAGTCCATGCCATCACTGC
	GAPDH-R 400		GCTTGACAAAGTGGTCGTTG
<i>L1</i>	GP5+F	150 pb DNA	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
	BSGP5+-2F		TTTGTTACTGTTGTIGATACTAC
	BSGP5+-3F		TTTGTTACTGTTGTIGATAACCAC
	BSGP5+-4F		TTTGTTACTTGTGTIGATACTAC
	BSGP5+-5F		TTTTTAACTGTTGTIGATACTAC
	BSGP5+-6F		TTTGTTACTGTGGTAGACACTAC
	BSGP5+-7F		TTTGTTACAGTIGTAGACACTAC
	BSGP5+-8F		TTTGTTACAGTIGTAGATAACCAC
	BSGP5+-9F		TTTGTTACTGTGGTAGATAACCAC
	bio-GP6+R		GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
	bio-BSGP6+-bR		GAAAAATAAATTGTAAATCATACTC
	bio-BSGP6+-cR		GAAAAATAAATTGCAATTCATATTC
β -globin	PC03F	110 pb DNA	ACACAACGTGTGTTCACTAGC
	PC04R		CAACTTCATCCACGTTCCACC
* β -globin	MS3F	208 pb DNA	AATATATGTGTGCTTATTTG
	bio-MS10R		AGATTAGGGAAAGTATTAGA
<i>HPRT</i>	HPRT-F	117 pb cDNA	CACTGGCAAAACAATGCAGACT
	HPRT-R		GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT
<i>E6 HPV16</i>	E6fwSmeets	86 pb cDNA	TTACTGCGACGTGAGGTGTA
	E6rvSmeets	248 pb DNA	GGAATCTTTGCTTTTTGTCC
<i>E6 HPV35</i>	E6F	48 pb cDNA	AGAATTACAGCGGAGTGAGGTA
	E6R		CACAAATCATAGCATGCAAAGTC

4.4 Charakterizace vzorků

4.4.1 Detekce DNA HPV a určení typu HPV

Dostatečné množství DNA ve vzorcích a nepřítomnost inhibitorů PCR reakce jsem ověřila v Laboratoři molekulární a nádorové virologie v BIOCEVu detekcí genu lidského *β -globinu*, jehož oblast o délce 110 pb byla cílem amplifikace pomocí primerů PC 03/04 (Tab. č. 2) (Saiki *et al.*, 1985).

PCR reakce o objemu 30 μ l se skládala z 1 $\times$ koncentrovaného reakčního pufru AmpliTaq Gold s (NH₄)₂SO₄ (Thermo Fisher Scientific, USA), 4mM roztoku MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM směsi nukleotidů (Promega, USA), 0,5 μ M směsi primerů PC 03/04 (IDT, USA), 0,75 U AmpliTaq Gold DNA polymerázy (Thermo Fisher Scientific, USA), 17,5 μ l vody prosté RNáz a 1 μ l DNA vzorku. Jako pozitivní kontrolu jsem využila DNA buněčné linie HaCaT a jako negativní kontrolu vodu prostou RNáz.

DNA vzorků byla amplifikována v termocykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada). Program obsahoval iniciační fázi denaturace 5 min při 94 °C, dále 40 cyklů skládajících se z 1 min při 94 °C, 2 min při 55 °C a 2 min při 72 °C. Následovala závěrečná fáze 3 min při 72 °C. Produkty PCR reakce jsem analyzovala elektroforeticky na 3% gelu, jehož příprava byla popsána již výše (Kap. 4.3.3), při napětí 110 V po dobu 35 min. K vizualizaci DNA jsem použila přístroj k detekci fluorescence InGenius³ (Syngene, UK).

Určení statusu HPV jsem provedla v NRL PV v ÚHKT pomocí PCR se směsí primerů amplifikujících úsek dlouhý 150 pb konzervované sekvence virového genu *L1* (Tab. č. 2) (Snijders *et al.*, 1990), pomocí které zjišťujeme přítomnost DNA HPV u širokého spektra slizničních typů HPV (Schmitt *et al.*, 2008).

Reakční směs o objemu 50 μ l obsahovala 1 $\times$ koncentrovaný reakční pufr AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 3,5mM roztok MgCl₂, 0,2mM směs nukleotidů, 200nM směsi primerů GP5+ a 400nM směsi primerů GP6+bio (na 5' konci biotinylován), 1 U AmpliTaq Gold DNA polymerázy (Thermo Fisher Scientific, USA) a 4 μ l DNA vzorku.

Stejný rozpis reakční směsi jako u genu *L1* (150 pb) jsem použila i u PCR reakce pro detekci lidského genu *β -globinu* s primery MS₃ a MS₁₀ (Tab. č. 2) (Invitrogen, USA) amplifikujících úsek dlouhý 208 pb, jejichž koncentrace byla 300nM (Schmitt *et al.*, 2008).

Amplifikační program pro obě reakce obsahoval iniciační fázi denaturace 4 min při 94 °C, dále 40 cyklů skládajících se z denaturace 20 s při 94 °C, nasedání primerů 30 s při 38 °C a prodlužování řetězce 80 s při 71 °C. Následovala závěrečná fáze extenze 4 min při 71 °C.

Součástí každé reakce byla negativní kontrola obsahující vodu prostou RNáz a čtyři pozitivní kontroly, které byly dříve připraveny v ÚHKT, a to třikrát DNA buněčné linie SiHa s různým množstvím kopií HPV16 na reakci (32, 160 a 800) a DNA plazmid se zaklonovaným HPV (různé typy).

Produkty obou PCR reakcí jsem analyzovala elektroforeticky na 3% agarózovém gelu, který jsem si připravila ze 100 ml TBE (z angl. Tris – borate – EDTA), 3 g agarózy NuSieve™ (Lonza, USA) a 4 µl barviva GelRed™ (Biotium, USA). Na gel jsem nanášela 5 µl žebříčku pUC18 DNA/MspI (připravený v NRL PV v ÚHKT) a 10 µl vzorku smíchaného spolu se 3 µl 6× koncentrovaného nanášecího pufru loading buffer/dye (Thermo Fisher Scientific, USA). Analýza trvala 50 min při napětí 150 V a vizualizaci produktů jsem provedla přístrojem k detekci fluorescence UVP EC3 Imaging System (UVP, USA).

Dále jsem produkty PCR reakce detekující oblast genu *LI* (150 pb) použila pro určení konkrétního typu HPV vzorků metodou RLB (z angl. reverse line blot assay), jejímž principem je hybridizace produktů amplifikace ke kovalentně navázaným próbám na membráně specifickým pro 37 nejčastějších typů HPV (Van den Brule *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2006).

Použité zásobní roztoky

a) 20% SDS (w/v) (dodecylsírán sodný)

= 200 g SDS (Carl Roth, Německo) + 1000 ml ultra H₂O

b) 20× SSPE (chlorid sodný-dihydrogenfosforečnan sodný-EDTA)

= 3M NaCl (Penta, Česká republika) + 0,2M NaH₂PO₄ · 2H₂O (Carl Roth, Německo)

+ 20mM EDTA (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) + 1000 ml ultra H₂O

Použité roztoky pro RLB

a) 100 ml 2× koncentrovaného SSPE a 0,1% (w/v) SDS

= 10 ml 20x SSPE + 0,5 ml 20% SDS + 90 ml ultra H₂O

b) 600 ml 2× koncentrovaného SSPE a 0,5% (w/v) SDS

= 30 ml 20x SSPE + 10 ml 20% SDS + 260 ml ultra H₂O

c) 300 ml 2× koncentrovaného SSPE

= 30 ml 20% SSPE + 270 ml ultra H₂O

d) 1% SDS

= 15 ml 20% SDS + 285 ml ultra H₂O

e) 20mM EDTA

= 25 ml 500mM EDTA + 475 ml ultra H₂O

Pro hybridizaci jsem použila 10 μ l produktů PCR reakce detekující oblast genu *LI* (150 pb) (Kap. 4.4.1), které jsem ředila 20 $\times$ v konečném objemu 200 μ l 2 $\times$ koncentrovaného SSPE a 0,1% (w/v) SDS. Naředěné vzorky jsem denaturovala v termocykleru TC-18H (Bioer, Čína) 10 min při 98 °C a poté rychle přenesla na led. Membránu Biotodyne C (Pall Bio-Support, USA), která byla připravena v NRL PV v ÚHK, jsem inkubovala kýváním ve 100 ml roztoku 2 $\times$ koncentrovaného SSPE a 0,1% (w/v) SDS po dobu 5 min při RT. Membránu jsem vložila do miniblotteru (Obr. č. 10), do jednotlivých jamek nanasla 150 μ l ředěného PCR produktu vzorku a inkubovala ve tmě v hybridizační peci 60 min při 42 °C. Poté jsem vzorky odsála vakuovou odsávačkou, membránu vyjmula z miniblotteru, přenesla do hybridizační láhve a dvakrát promyla 150 ml 2 $\times$ koncentrovaného SSPE a 0,5% (w/v) SDS po dobu 10 min ve tmě v hybridizační peci při 51 °C. Následně jsem membránu inkubovala 60 minut při 42 °C v roztoku skládajícím se z 1 μ l streptavidinového konjugátu s HRP (1 : 30 000) a 10 ml 2 $\times$ koncentrovaného SSPE a 0,5% (w/v) SDS. Membránu jsem dvakrát promyla 150 ml 2 $\times$ koncentrovaného SSPE a 0,5% (w/v) SDS po dobu 15 min ve tmě v hybridizační peci při 42 °C a dále dvakrát 150 ml 2 $\times$ koncentrovaného SSPE po dobu 5 min při RT. Poté jsem membránu inkubovala při RT 5 min ve směsi 3 ml roztoku A a 3 ml roztoku B z kitu Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, USA). Na závěr jsem v temné komoře exponovala membránu na Lumifilm (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 30 s a 5 min. Snímky jsem vyvolala v přístroji KODAK Medical-X-ray-processor (Kodak, USA).

Membránu lze použít pro detekci produktů PCR opakovaně. Před dalším použitím bylo nutné odmyt hybridizované amplikony. Membránu jsem vložila do misky a inkubovala ve 150 ml 1% SDS 45 min při 80 °C. Následně jsem membránu kývala 15 min při RT ve 250 ml 20mM EDTA pH 8,0. Oba kroky jsem opakovala. Zabalenou membránu ve fólii jsem uchovávala ve 4 °C do dalšího použití.



Obr. č. 10: Fotografie miniblotteru 45 (Interchim, Francie). Převzato z manuálu „Interchim Innovations – Blotting products“.

4.4.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripci pomocí kitu M-MLV Reverse Transcriptase Buffer Pack (Promega, USA) jsem z RNA získané z FFPE vzorků a vzorků uchovaných v RNAlateru[®] syntetizovala komplementární DNA (cDNA, z angl. complementary DNA).

Reverzní transkripci předcházelo odstranění zbytkové DNA z RNA. Na ledu jsem připravila 8 µl směsi RNA vzorku a vody prosté RNáz, aby výsledné množství RNA v reakci bylo 500 ng. Pokud měla RNA příliš nízkou koncentraci, pro reverzní transkripci jsem použila maximální možné množství RNA, a to 8 µl. Pro odstranění DNA jsem ke směsi RNA a vody prosté RNáz přidala 2 µl DNázové směsi, která obsahovala 1× koncentrovaný pufr (Promega, USA) a 1 U DNázy (Promega, USA), a inkubovala 30 min při 37 °C. Ke každému vzorku jsem přidala 1 µl Stop Solution (Promega, USA) a inkubovala 10 min při 65 °C. Poté jsem vzorky přenesla na 5 min na led. Následně jsem ke vzorkům přidala 9 µl směsi pro reverzní transkripci, která se skládala z 1× koncentrovaného M-MLV pufru (Promega, USA), 1mM směsi nukleotidů, 11µM primeru Random Hexamer (Thermo Fisher Scientific, USA), 20 U inhibitoru RNáz myšího RNasinu (New England Biolabs, USA), 50 U reverzní transkriptázy M-MLV (Promega, USA) a 1,25 µl vody prosté RNáz. Vzorky jsem inkubovala 1 h při 37 °C a poté uložila do -20 °C do dalšího zpracování.

Negativní kontrola procesu DNázování se skládala z 8 µl vody prosté RNáz a 2 µl DNázové směsi. Jako negativní kontrola reverzní transkripce sloužilo 9 µl směsi pro reverzní transkripci s 11 µl vody prosté RNáz. Jako pozitivní kontrolu reverzní transkripce jsem využila RNA buněčné linie SiHa a zpracovala ji stejně jako ostatní vzorky.

Ověření proběhnutí reverzní transkripce a přítomnosti dostatečného množství cDNA ve vzorcích jsem provedla kontrolní amplifikací HPRT o délce 117 pb (Tab. č. 2) (Olthof *et al.*, 2015). Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala 1× koncentrovaný reakční pufr Standard Taq Reaction (New England Biolabs, USA), 0,2mM dNTPs (New England Biolabs, USA), 0,5µM obou primerů (IDT, USA), 0,5 U Hot Start Taq DNA polymerázy (New England Biolabs, USA) a 1 µl vzorku cDNA. Jako pozitivní kontrola sloužila cDNA připravená z RNA SiHa buněk a jako negativní kontrola voda prostá RNáz. Amplifikace proběhla v termocykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) za následujících podmínek: iniciační fáze denaturace při 95 °C po dobu 30 s, dále následovalo 39 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C 30 s, nasedání primerů při 64 °C 30 s a 30 s prodlužování řetězce při 68 °C. Závěrečná fáze extenze trvala 5 min při 68 °C.

Pro porovnání dvou typů polymeráz jsem provedla další PCR reakci s DNA polymerázou AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA). Reakční směs byla stejná, ale lišily se podmínky amplifikace: iniciační fáze denaturace probíhala 10 min při 95 °C, dále následovalo 39 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C 30 s, nasedání primerů při 64 °C 45 s a 30 s prodlužování řetězce při 72 °C. Závěrečná fáze extenze trvala 5 min při 72 °C. Produkty obou PCR reakcí jsem analyzovala pomocí gelové elektroforézy a vizualizovala pomocí detekčního systému (Kap. 4.3.3).

4.4.3 Detekce aktivní virové infekce

Přítomnost DNA HPV (Kap. 4.4.1) nemusí vždy znamenat, že se jedná o nádor vyvolaný HPV, proto je nutné potvrdit aktivní virovou infekci detekcí mRNA onkogenu *E6*. Většinou detekujeme mRNA onkogenu *E6* typu HPV16, protože HPV16 je nejrozšířenější typ HPV, a to především u nádorů orofaryngu. Další možností je IHC detekce proteinu p16, který slouží jako nepřímý marker aktivní infekce HPV (Deng *et al.*, 2014) a využívá se v kombinaci s průkazem DNA HPV.

Aktivní virovou infekci jsem ověřila detekcí přítomnosti mRNA *E6* HPV16 pomocí PCR reakce, pro kterou jsem využila specifické primery amplifikující úsek cDNA o délce 86 pb (Tab. č. 2) (Smeets *et al.*, 2007). Reakční směs o objemu 25 µl obsahovala 1× koncentrovaný pufr Standard Taq Reaction (New England Biolabs, USA), 0,5 µM obou primerů pro *E6* HPV16 (Invitrogen, USA), 0,2 mM směsi nukleotidů, 0,5 U Hot Start Taq DNA polymerázy (New England Biolabs, USA), 18,9 µl vody prosté RNáz a 2 µl cDNA. Jako pozitivní kontrola sloužila cDNA připravená z RNA SiHa buněk a jako negativní kontrola voda prostá RNáz.

PCR reakci jsem provedla v termocykleru Peltier Thermal Cycler 200 (PTC-200, MJ-Research, Kanada) při nastavení počáteční fáze 95 °C 30 s, dále 39 cyklů skládajících se z denaturace 30 s při 95 °C, nasedání primerů 30 s při 55 °C a syntézy řetězců 30 s při 68 °C. Závěrečné fáze trvala 5 min při 68 °C. Výsledek amplifikační reakce jsem ověřila elektroforeticky a vizualizovala pomocí detekčního systému (Kap. 4.3.3).

U vzorků s jiným detekovaným typem, než HPV16, je možné použít typově specifické primery pro mRNA *E6/E7*. V mém případě se jednalo o jeden vzorek, u kterého jsem zjišťovala přítomnost mRNA *E6* HPV35 s využitím primerů E6F a E6R (IDT, USA) amplifikující úsek cDNA o délce 48 pb (Tab. č. 2) (Gao *et al.*, 2012). Ostatní složky reakční směsi a podmínky reakce byly stejné, lišila se pouze teplota nasedání primerů, kterou jsem nastavila na 58 °C.

4.5 Detekce exprese makrofágových a imunosupresivních znaků

Ke zjištění exprese vybraných makrofágových a imunosupresivních znaků jsem použila metodu kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR, z angl. quantitative PCR), která umožňuje kontinuální kvantifikaci sledovaného úseku DNA v každém cyklu PCR reakce. Zvyšující se množství DNA ve vzorku je zaznamenáno jako přírůstek intenzity fluorescence. Pro detekci cílové DNA jsem využila technologii SYBR[®] Green, během které se fluorescenční barvička interkaluje nespecificky do jakékoliv dvouvláknové DNA a dochází k emisi fluorescence. Pro metodu qPCR byly komerčně navrženy (Gene Core, BIOCEV, Česká republika) a syntetizovány (GeneriBiotech, Česká republika) primery pro kvantifikaci vybraných makrofágových a imunosupresivních znaků IDO1, ARG1, CD163, NOS2 a PTGS2 (Tab. č. 3). Znaky byly vybrány na základě souvislosti s přítomností různých typů makrofágů v nádorovém mikroprostředí HNSCC, kde mohou působit imunosupresivně a mají buď pronádorový nebo protinádorový efekt. Všechny znaky nelze striktně přiřadit k jednotlivým fenotypům makrofágů, ale lze říci, že znak IDO1 je imunosupresivní, ARG1 s CD163 jsou typické pro M2 makrofágy, enzym NOS2 je pravděpodobně ve větším množství u M1 makrofágů a PTGS2 spíše u M2, ale je ovlivněn expresí NOS2 (Kap. 2.2.1).

Amplifikační reakci o objemu 10 μ l jsem připravovala na ledu v částečné tmě a skládala se z 1 $\times$ koncentrovaného reakčního pufru Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX (IAB, Česká republika), 0,4 μ M směsi obou primerů a 2 μ l 4 $\times$ ředěné cDNA vzorku. Jako negativní kontrolu jsem přidávala vodu prostou RNáz místo cDNA vzorku. Vzorky jsem pipetovala do jamek na 96-jamkové destičce Hard-Shell[®] PCR plates (Bio-Rad Laboratories, USA) v duplikátech. Kvantitativní PCR reakce probíhala v termocykleru CFX96[™] Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, USA) za následujících podmínek: iniciační fáze denaturace 3 min při 95 °C, 40 cyklů skládajících se z 10 s při 95 °C a 30 s při 60 °C, dále 10 s při 95 °C a na závěr byla pro kontrolu specifity vznikajících produktů PCR na konci každé PCR reakce zařazena analýza křivek tání (tzv. melting analýza).

Tab. č. 3: Seznam použitých primerů pro metodu qPCR. GUSB – β -glukuronidáza (z angl. glucuronidase beta); hACTB – lidský cytoplazmatický beta aktin (z angl. human actin cytoplasmic beta)

Cílový gen	Název primeru	Délka PCR produktu	Sekvence 5' - 3'
<i>IDO1</i>	IDO1_F1	121 pb cDNA	AAGAAACTGGAACTGCCTCCT
	IDO1_R1		CACGAAATGAGAACAAAACGTCC
<i>ARG1</i>	ARG1_F1	127 pb cDNA	GGCAGAAGTCAAGAAGAACGGA
	ARG1_R1		GTGAGCATCCACCCAGATGA
<i>CD163</i>	CD163_F1	120 pb cDNA	GCAATGGGGTGGACTTACCT
	CD163_R1		TGCTTCACTTCAACACGTCC
<i>NOS2</i>	NOS2_F1	137 pb cDNA	GCTGTGCTCCATAGTTTCCAG
	NOS2_R1		GGGACCAGCCAAATCCAGTC
<i>PTGS2</i>	PTGS2_F1	142 pb cDNA	GCATTCTTTGCCCAGCACTT
	PTGS2_R1		GGCGCAGTTTACGCTGTCT
<i>HPRT</i>	HPRT-F	117 pb cDNA	CACTGGCAAAACAATGCAGACT
	HPRT-R		GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT
<i>GUSB</i>	GUS-F	101 pb cDNA	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
	GUS-R		CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
<i>hACTB</i>	hACTB-F	132 pb cDNA	CCACGAACTACCTTCAACTCCA
	hACTB-R		GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC

Pro každý gen jsem nejprve na vhodné kontrolní cDNA provedla qPCR pro získání standardní křivky. Při této qPCR jsem používala ředící řadu kontrolní cDNA v pěti různých koncentracích, která se skládala z neředěné cDNA, 5 $\times$, 25 $\times$, 125 $\times$ a 625 $\times$ ředěné cDNA v triplikátech.

Standardní křivky jsem vygenerovala pomocí programu Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, USA), ve kterém jsem hodnotila i výsledné amplifikační křivky vzorků. Pomocí standardní křivky pro daný gen jsem stanovila hodnotu prahu detekce fluorescence (threshold), kterou jsem používala u výsledných amplifikačních křivek vzorků pro určení Ct (z angl. cycle of threshold) hodnoty vzorků.

Analýzu exprese vybraných genů u vzorků jsem provedla v duplikátech na 4 $\times$ ředěné cDNA vzorku, což se jevílo jako dostatečné množství DNA pro detekci exprese. Kvantifikaci exprese uvedených genů ve všech vybraných vzorcích jsem provedla pomocí metody relativní

kvantifikace $\Delta\Delta C_t$, při které je exprese genů našeho zájmu normalizována na expresi vybraných referenčních genů. Jako vhodné referenční geny byly, dle tkáňové lokalizace v databázi Genevestigator V3, zvoleny *HPRT*, *GUSB* a *hACTB* (Hruz *et al.*, 2008).

Pro vyhodnocení a kvantifikaci exprese jsem využívala software GenEx™ 6 (MultiD Analyses AB, Švédsko), ve kterém jsem nejdříve pomocí metod geNorm a NormFinder ověřila výběr nejvhodnějších referenčních genů pro normalizaci expresních dat. Metoda geNorm eliminuje geny s nejvyšší M-hodnotou, která koreluje s nejvyšší variabilitou exprese (Vandesompele *et al.*, 2002), a podle metody NormFinder je stabilita exprese genů reflektována standardní odchylkou (SD) biologických replikátů (Andersen *et al.*, 2004). Dále jsem v programu GenEx™ 6 (MultiD Analyses AB, Švédsko) data zpracovala postupnými kroky doporučenými pro analýzy a výsledné hodnoty, které vyjadřují $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (log2), jsem využila pro statistické analýzy.

4.5.1 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení jsem použila program GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA), ve kterém jsem porovnávala dvě skupiny vzorků HPV⁺ a HPV⁻. Nejprve jsem na data aplikovala deskriptivní statistiku, která podává obecné informace o daném souboru jako, jsou minimální a maximální hodnota, průměr, medián a standardní odchylky.

Pro další statistické analýzy jsem předpokládala, že moje výsledná qPCR data odpovídají Gaussovu rozdělení, podle kterého bývají qPCR data na logaritmické stupnici normálně rozložena. Pro normálně rozložená data se používají parametrické statistické testy.

Ke zjištění rozdílů exprese genů *IDO1*, *ARG1*, *CD163*, *NOS2* a *PTGS2* mezi skupinou HPV⁺ a HPV⁻ vzorků jsem provedla parametrický nepárový t-test a sledovala P hodnotu, která reprezentuje míru signifikance. Stejným způsobem jsem analyzovala i vzorky rozdělené podle lokalizace nádoru bez ohledu na HPV pozitivitu/negativitu.

5 Výsledky

5.1 Epidemiologické charakteristiky pacientů

Z dotazníků pacientů shromažďovaných v rámci studie AZV 17-28055A „Stanovení fenotypu a funkce imunitních buněk jakožto prediktorů odpovědi na léčbu u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku“ jsem získala epidemiologické charakteristiky pacientů (Tab. č. 4). Ve své studii jsem zpracovala soubor celkem 55 pacientů, který se skládal ze 43 mužů (78 %) a 12 žen (22 %). Nejmladšímu pacientovi bylo v době diagnózy 39 let a nejstaršímu 87 let, medián věku všech pacientů je 62 let a průměrný věk 62,24 let. V průběhu svého života kouřilo celkem 37 pacientů (67 %) a nikdy nekouřilo 18 (33 %), alkohol konzumovalo 38 pacientů (69 %) a nikdy 17 (31 %).

Nádory pacientů vznikly buď v orofaryngeální lokalizaci (lokalizace 1), kam řadíme kořen jazyka, tonsily, měkké patro a orofaryng, nebo v dutině ústní (lokalizace 2), která zahrnuje tělo jazyka, spodinu dutiny ústní, bukální sliznici a retromolární oblast za zuby moudrosti. Celkem 35 pacientů (64 %) mělo nádor v oblasti orofaryngu, což byla majoritní lokalizace HPV⁺ nádorů (100 %). V dutině ústní mělo lokalizováno nádor 20 pacientů (36 %), jejichž všechny nádory byly HPV⁻.

Tab. č. 4: Souhrn epidemiologických charakteristik pacientů.

Charakteristika	HPV ⁺	HPV ⁻	celkem
	n = 26	n = 29	n = 55
muži	25	18	43
ženy	1	11	12
kouření+	11	26	37
kouření-	15	3	18
alkohol+	16	22	38
alkohol-	10	7	17
orofaryng (lokalizace 1)	26	9	35
dutina ústní (lokalizace 2)	0	20	20

5.2 Multispektrální imunohistochemie

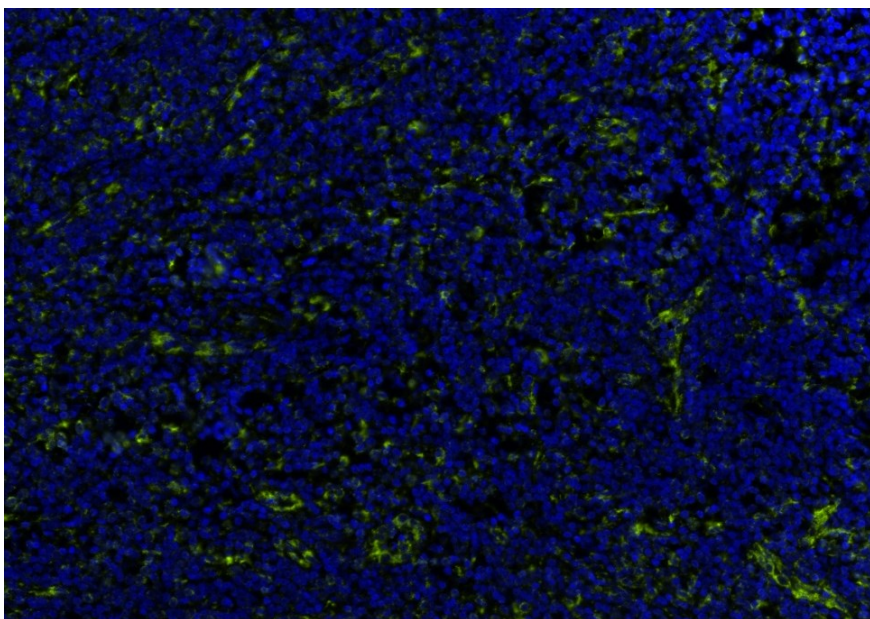
Připravila jsem optimalizovaný protokol s kombinací protilátek a fluoroforů k detekci a fenotypizaci jednotlivých subpopulací makrofágů v FFPE řezech HNSCC. Všechny vzorky (n = 54, protože od vzorku ORL 484 nebyl k dispozici řez tkáně) jsem vyšetřila metodou multispektrální imunohistochemie a barvila připraveným protokolem v sériích po cca 6 vzorcích.

5.2.1 Optimalizace protilátek a tvorba multiplexového panelu

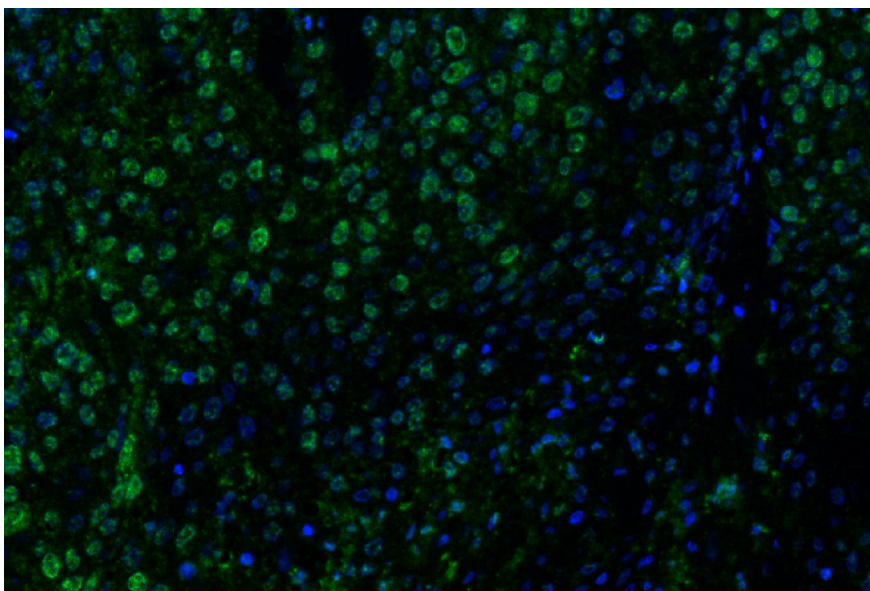
Pro metodu multispektrální imunohistochemie jsem nejprve vybrala a optimalizovala jednotlivé klony primárních protilátek a určila odpovídající pufr pro odmaskování epitopů.

Na základě vědecké literatury byla pro panmakrofágový znak CD68 vybrána protilátka klonu KP1 (Santa Cruz Biotechnology, USA), pro kterou je navrženo použití citrátového pufru AR6. Protilátka CD68 nevyžadovala další optimalizaci, protože při inkubaci 1 h při RT je dostatečně specifická a doporučený AR6 pufr je vhodný.

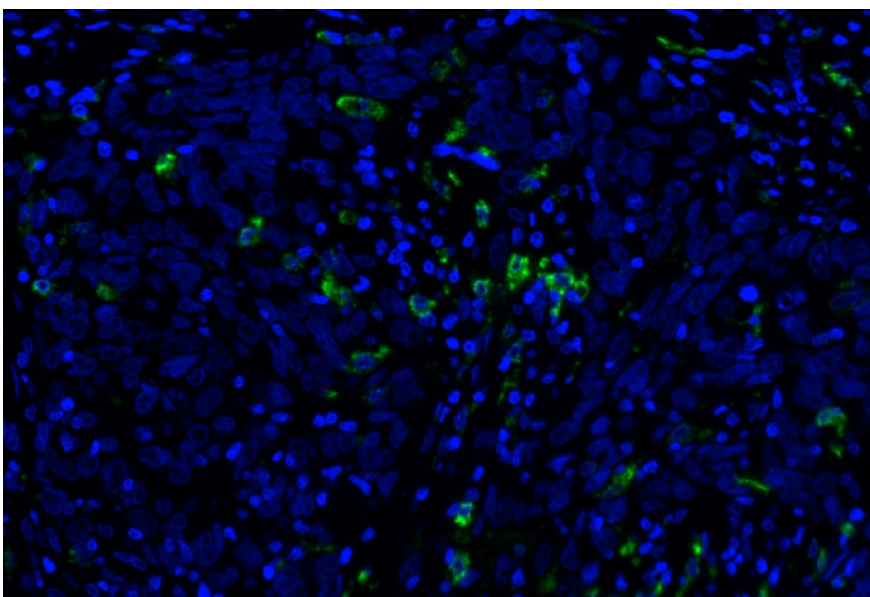
Nejvíce optimalizačních kroků jsem musela provést při výběru protilátky CD163, pro kterou jsem vyzkoušela celkem tři klony. Prvním klonem byl GHI/61 (Santa Cruz Biotechnology, USA), který při ředění 1:50, což je nejmenší možné ředění, značil nespecificky (Obr. č. 11). Zároveň je tento klon primárně určen pro leukemické buňky. Následně jsem od stejné společnosti vyzkoušela klon RM3/1 (Santa Cruz Biotechnology, USA), který je specifický pro monocyty. Ověřila jsem různé kombinace ředění a inkubace primární protilátky a oba druhy pufrů pro odhalení epitopů, přesto jsem nedosáhla požadovaného výsledku. Po vizualizaci měl klon RM3/1 po celém vzorku zrnitý signál a zároveň se znak CD163 jevil jako vnitrobuněčný, přičemž očekáváme signál především na membráně buněk (Obr. č. 12). Po nevyhovujících výsledcích s druhým klonem jsem se rozhodla pro klon od jiné společnosti, a to klon 10D6 (Thermo Fisher Scientific, USA), který se při ředění 1:50 jevil ze všech tří klonů jako nejvhodnější (Obr. č. 13). Po dalších pokusech s klonem 10D6 jsem snížila koncentraci protilátky CD163 na ředění 1:100 při inkubaci přes noc při 4 °C a pro odhalování epitopů použila citrátový pufr AR6.



Obr. č. 11: Protílátka CD163, klon GHI/61 (Santa Cruz Biotechnology, USA). modře – DAPI, zeleně – nespecifické barvení protílátkou CD163.



Obr. č. 12: Protílátka CD163, klon RM3/1 (Santa Cruz Biotechnology, USA). modře – DAPI, zeleně – zrnité barvení protílátkou CD163.

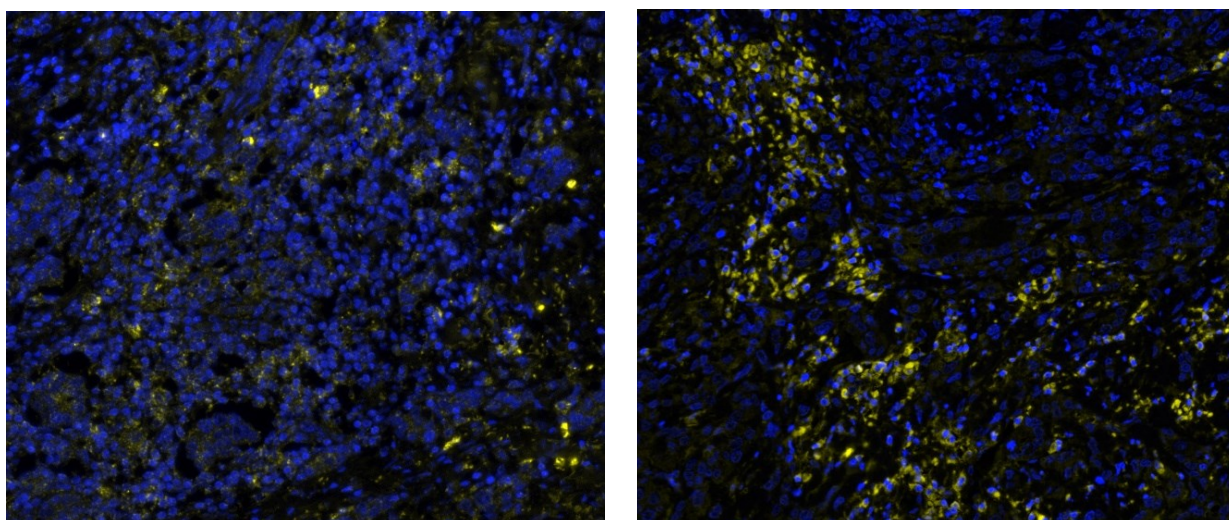


Obr. č. 13: Protílátka CD163, klon 10D6 (Thermo Fisher Scientific, USA). modře – DAPI, zeleně – specifické barvení protílátkou CD163.

Protilátka proti cytoplazmatickému znaku ARG1 (klon A-2, Santa Cruz Biotechnology, USA) se od počátečních pokusů vázala dostatečně specificky, proto jsem se rozhodla ji použít v ředění 1:200. Dalším důležitým kritériem barvení primární protilátkou jsou i podmínky odhalování epitopů a protilátka ARG1 vykazovala specifitější vzor signálu při zahřívání v Tris-EDTA pufru s pH 9,0.

Pro čtvrtou protilátku CD80, která sloužila k detekci makrofágů typu M1, jsem vybrala klon 62N3G8 (Novus Biologicals, USA). Při ředění 1:200 nebo 1:100 a inkubaci přes noc při 4 °C nenabýval signál fluoroforu hodnotu přibližně 10x vyšší než v okolí značené buňky. Současně jsem signál fluoroforu pozorovala výrazněji u buněk, které zároveň nebyly pozitivní na panmakrofágový znak CD68. Možným vysvětlením je fakt, že znak CD80 se vyskytuje na buňkách prezentujících antigeny, mezi které se ale kromě makrofágů řadí i DC a B lymfocyty, jejichž počet může být v nádoru vyšší než počet makrofágů typu M1. Pro detekci vyššího signálu fluoroforu i na makrofázích jsem snížila ředění protilátky CD80 i příslušného fluoroforu na 1:50. Dále jsem v případě protilátky CD80 pozorovala výrazný rozdíl v použití dvou typů pufrů, z nichž viditelně lepší podmínky vykazovala protilátka v Tris-EDTA pufru s pH 9,0 (Obr. č. 14).

Poslední protilátkou byla protilátka barvicí cytokeratin epiteliálních buněk (klon AE1/AE3, ThermoFisher Scientific, USA), která označuje oblast nádorových buněk a pomáhá ji odlišit od stromatu. Pro tuto protilátku bylo ředění 1:800 dostačující, protože barví velmi specificky. Pro odhalení epitopů jsem použila doporučený citrátový AR6 pufr s pH 6,0.



Obr. č. 14: Porovnání podmínek odhalování epitopů protilátky CD80.

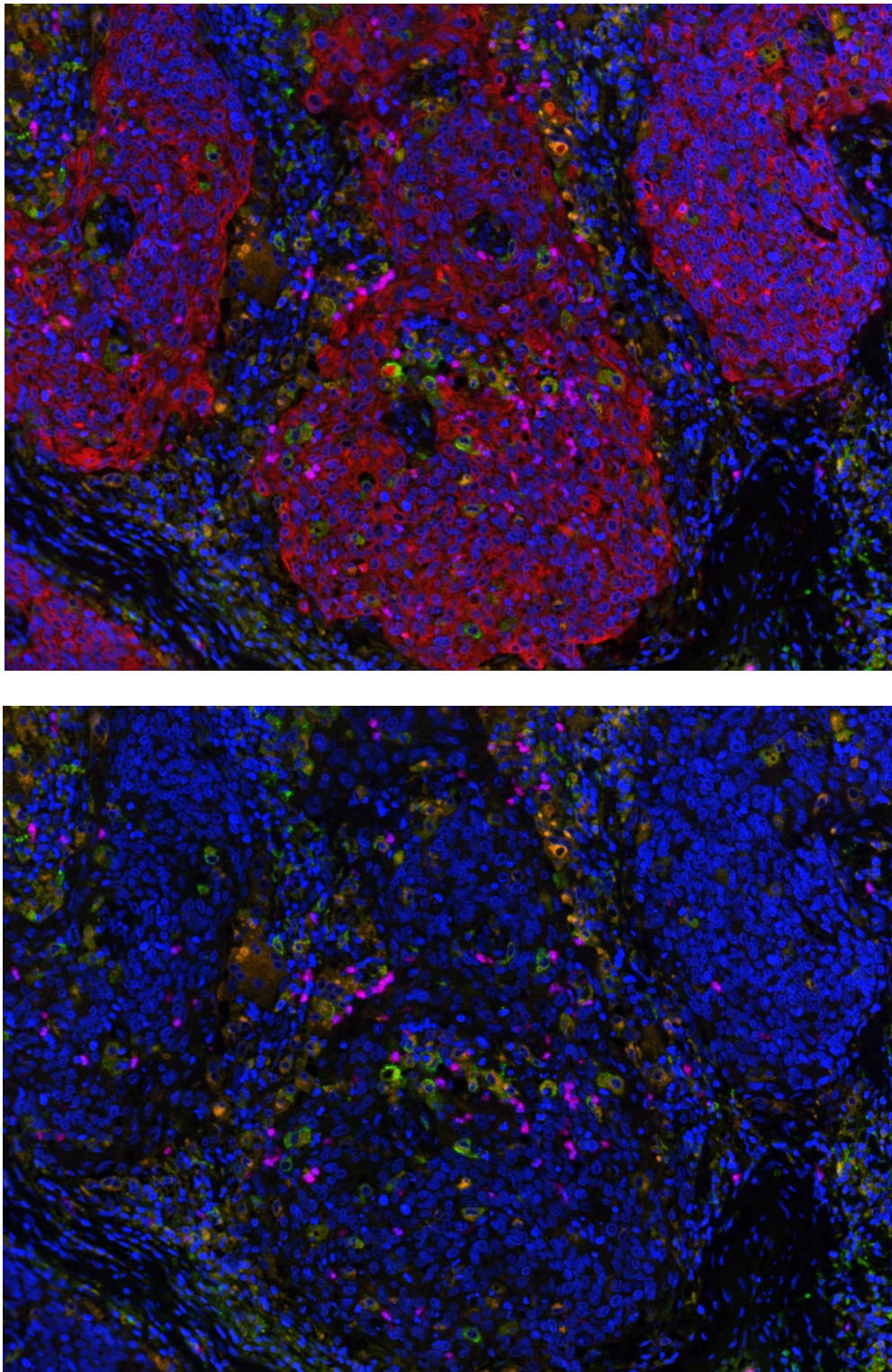
- a) Vlevo: v citrátovém pufru AR6 s pH 6,0 – nespecifické barvení, vysoký šum a zrnitý profil; modře – DAPI, žlutě – CD80
- b) Vpravo: v Tris-EDTA pufru s pH 9,0 – specifitější značení CD80; modře – DAPI, žlutě – CD80

Po výběru primárních protilátek a pufrů jsem pokračovala přiřazením vhodných fluoroforů, při kterém jsem se řídila doporučením, že málo časté znaky by měly být barveny vysoce svítivým fluoroforem a naopak vysoce abundantním znakům je vhodné přiřadit méně svítivý fluorofor. Na základě tohoto doporučení jsem protilátce pro znak CD80 (nejméně abundantní) přiřadila nejvíce svítivý fluorofor OPAL 520. V průběhu pokusů jsem protilátce CD163 nejprve přiřadila fluorofor OPAL 540, avšak po zvážení možného spektrálního překryvu s fluoroforem 520 jsem jej vyměnila za fluorofor OPAL 620. Fluorofor OPAL 620 protilátku CD163 měl tak na rozdíl od původního OPAL 540 vzdálenější vlnovou délku než fluorofor 520 pro protilátku CD80, což je výlučný znak pro M1 makrofágy. Protilátce CD68 jsem nakonec přiřadila OPAL 540. U protilátek ARG1 a CD163 očekávám koexpresi, neboť oba znaky jsou charakteristické pro makrofágy M2. Protilátce pro cytosolický znak ARG1 jsem přiřadila fluorofor OPAL 650. OPAL 650 je sice blízký vlnové délce OPALU 620, kterým barvím znak CD163, ale tento znak je na rozdíl od ARG1 výhradně membránový, tudíž případný spektrální překryv by byl odhalen. Dále jsem se rozhodla protilátce barvící cytokeratin přiřadit nejméně svítivý fluorofor OPAL 690.

Na závěr jsem sestavila pořadí protilátek v multiplexovém panelu (Tab. č. 5). Standardní doba vaření v AR pufru (15 min) byla optimální pro protilátku CD68, proto jsem ji zařadila do multiplexu na první pozici. Pro druhou pozici jsem vybrala protilátku barvící znak CD163 a následně jsem použila protilátku proti ARG1. Znak CD80 potřeboval delší čas pro odhalení epitopů, tudíž jsem ho dala při sestavení multiplexu na čtvrtou pozici pro jeho efektivní detekci. Pátou pozici jsem obsadila protilátkou barvící cytokeratin epiteliálních buněk. Protokol s optimalizovaným pořadím protilátek jsem použila k multiplexovému barvení (Obr. č. 15).

Tab. č. 5: Nastavení protokolu pro multiplexové barvení. panM – panmakrofágový znak, M1 – znak typický pro makrofágy typu M1, M2 – znak typický pro makrofágy typu M2, panCK – cytokeratin epiteliálních buněk

popis epitopu	pH pufru	Primární protilátka				Sekundární protilátka		OPAL fluorofor	
		typ	ředění	výsledná koncentrace	inkubace	typ	inkubace	typ	ředění
panM	AR6	CD68	1:200	1 ng/μl	1 h/RT	HRP-pol	10 min	540	1:200
M2 CD163 ⁺	AR6	CD163	1:100	2 ng/μl	OVN/4 °C	HRP-pol	10 min	620	1:100
M2 ARG1 ⁺	AR9	ARG1	1:200	1 ng/μl	1 h/RT	HRP-pol	10 min	650	1:200
M1	AR9	CD80	1:50	10 ng/μl	OVN/4 °C	HRP-pol	10 min	520	1:50
panCK	AR6	cytokeratin	1:800	0,25 ng/μl	1 h/RT	HRP-pol	10 min	690	1:200

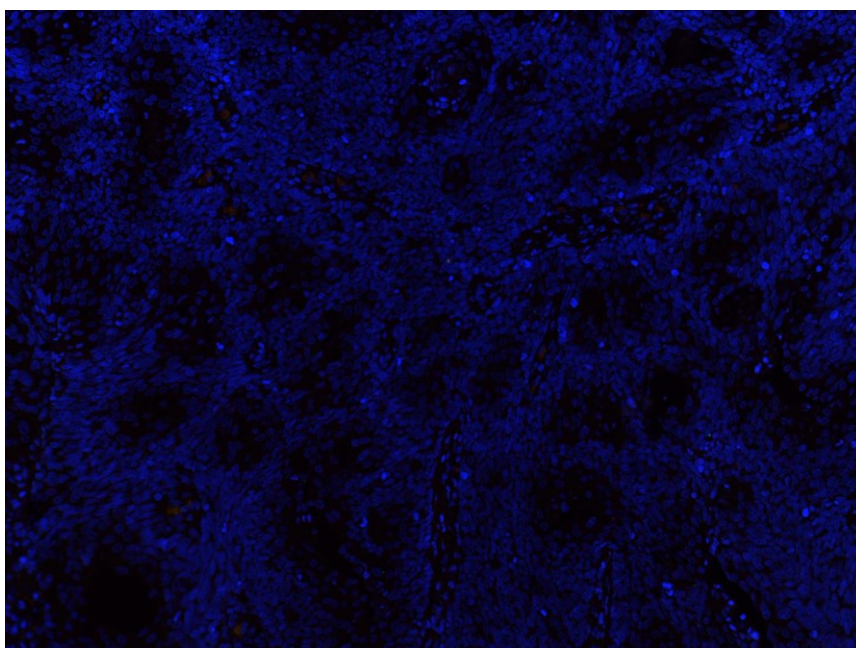


Obr. č. 15: Obrázek optimalizovaného multiplexu v programu InForm 2.4.6. Nahoře snímek s cytokeratinem (červeně) označujícím oblast nádoru a dole bez cytokeratinu. modře – jádra barvená DAPI, oranžově – znak CD68, zeleně – znak CD163, růžově – znak ARG1, žlutě – znak CD80, červeně – cytokeratin

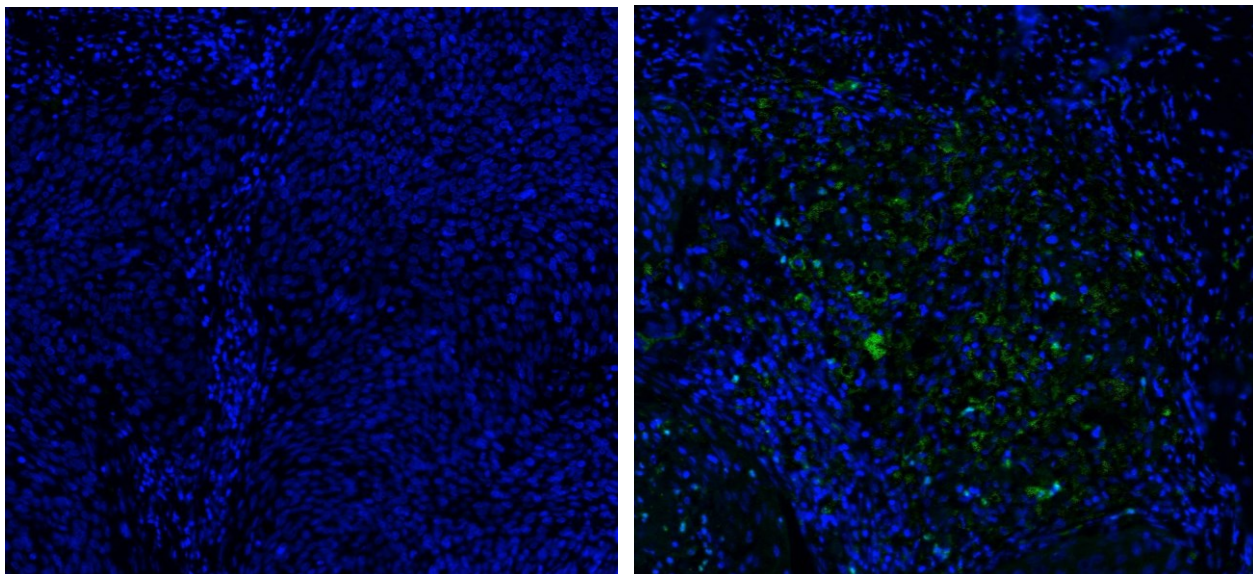
5.2.2 Kontroly pro multispektrální imunohistochemii

Pro protilátky CD68, CD163, ARG1 a CD80 jsem provedla „no primary“ kontrolu nahrazením primární protilátky Ab diluentem. U všech čtyřech protilátek nedošlo k obarvení daného epitopu příslušným fluoroforem, čímž jsem ověřila specifitu vazby sekundární protilátky. Na Obr. č. 16, kde je vyfocen snímek těchto kontrol, můžeme pozorovat pouze jádra obarvená DAPI, protože bez primárních protilátek nedošlo k vazbě sekundární protilátky a fluoroforu.

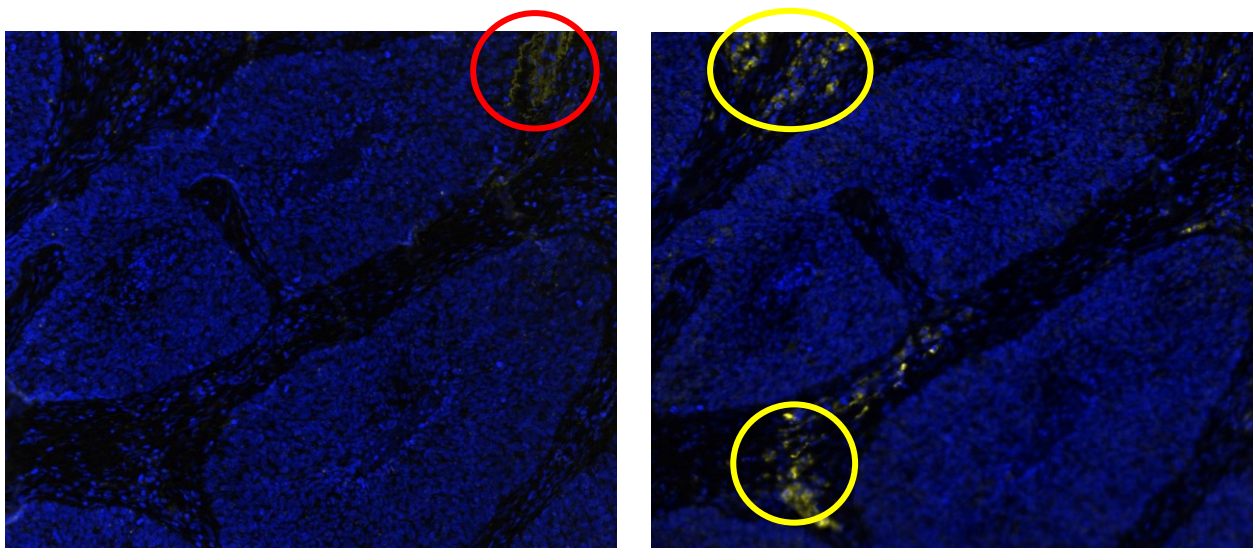
Dále jsem zpracovala izotypové kontroly s použitím izotypu IgG1 kappa (Sigma-Aldrich, USA) pro protilátky CD68, CD163 a ARG1 a s obecným myším IgG (Upstate Cell Signaling Solutions, USA) pro protilátku CD80. Izotyp IgG1 kappa se nevázal na cílové epitopy příslušných protilátek (Obr. č. 17), ale u izotypu IgG můžeme pozorovat částečnou vazbu, což může být vysvětleno přítomností směsi více izotypů. Izotyp IgG se však nenavázal na totožná místa jako protilátka CD80, takže i s použitím obecného izotypu IgG mohu potvrdit specifitu primární protilátky CD80 (Obr. č. 18).



Obr. č. 16: „No-primary“ kontrola primárních protilátek pro ověření specifity vazby sekundárních protilátek. modře – jádra barvená DAPI



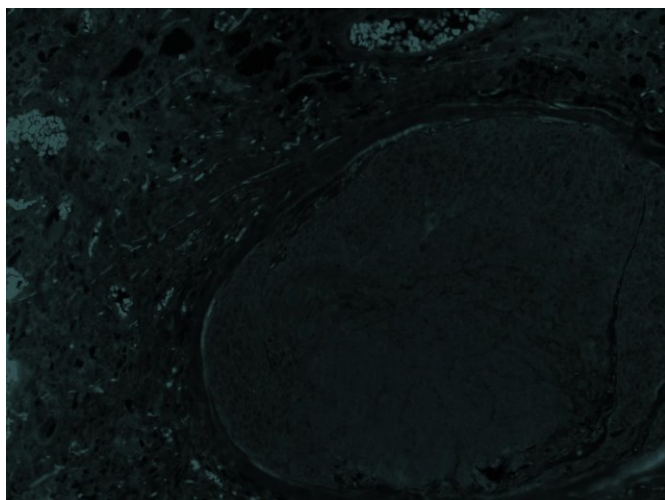
Obr. č. 17: Izotypová kontrola IgG1 kappa (Sigma-Aldrich, USA) pro protilátky CD68, CD163, ARG1. Vlevo – izotyp IgG1 kappa, vpravo – ilustrační snímek normálního barvení protilátkou CD163; modře – jádra barvená DAPI, zeleně – znak CD163



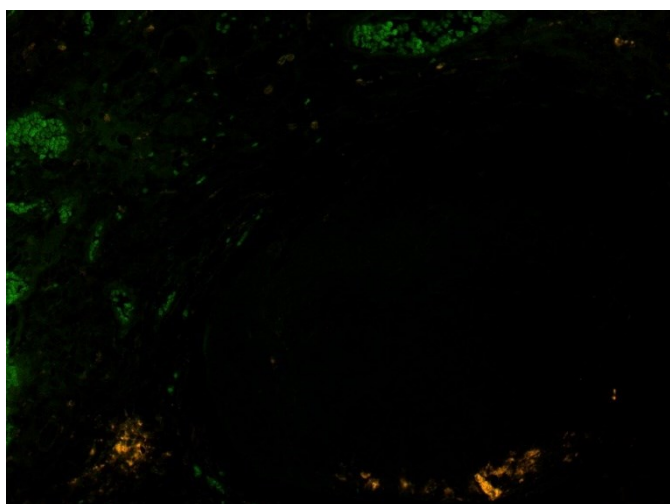
Obr. č. 18: Vlevo izotypová kontrola obecný IgG (Upstate Cell Signaling Solutions, USA) pro protilátku CD80 a vpravo snímek stejného řezu při multiplexovém barvení. modře – jádra barvená DAPI, žlutě – CD80; na snímku vpravo vidíme, že protilátka CD80 se váže do jiných míst (označeno žlutě) než obecný izotyp IgG, který je na snímku vlevo vidět jen nespecificky v pravém horním rohu (označeno červeně).

Kontrolu odmytí protilátek (tzv. stripovací kontrola) jsem provedla pro každou protilátku zvlášť s použitím sekundární protilátky a následujícího fluoroforu v multiplexu.

Signál druhého, následujícího, fluoroforu pozorují pouze jako artefakt v místech autofluorescence u protilátky CD68 (Obr. č. 19 b)).



a) stripovací kontrola CD68; šedě – autofluorescence



b) stripovací kontrola CD68; v místech autofluorescence vidíme pouze artefakt následného kontrolního fluoroforu OPAL 620 (zeleně); oranžově – znak CD68 (OPAL 540), zeleně – následný kontrolní fluorofor (OPAL 620)



c) ilustrační snímek stripovací kontroly CD68; vidíme jen nepatrné barevné tečky, což znamená, že dochází k dostatečnému odmytí komplexu primární a sekundární protilátky; oranžově – znak CD68 (OPAL 540), zeleně – následný kontrolní fluorofor (OPAL 620)

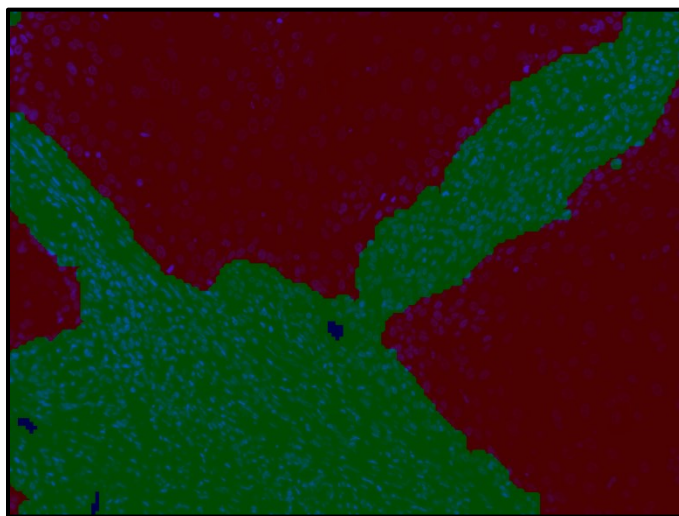
Obr. č. 19: Kontrola odmytí komplexu primární protilátky CD68 a sekundární protilátky (tzv. stripovací kontrola).

5.2.3 Tvorba algoritmu a analýza vzorků

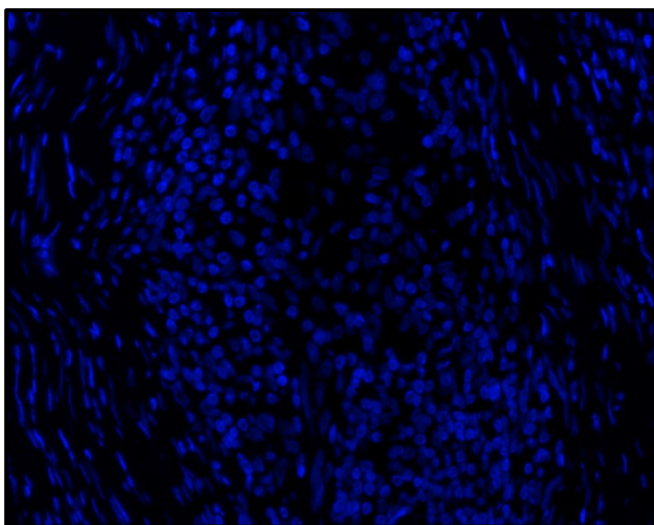
V programu InForm 2.4.6. jsem vytvořila algoritmus pro analýzu vzorků, který zahrnoval kroky lineárního unmixingu, segmentace tkáně (Obr. č. 20), segmentace buněk (Obr. č. 21) a fenotypizace (Obr. č. 22).

Podle detekovaných protilátek jsem definovala 6 různých fenotypů (Obr. č. 22). Makrofágy typu M1 byly značeny protilátkou CD68 a CD80, typ M2 byl určen dvěma fenotypy, které měly vždy panmakrofágový znak CD68 a poté byly značeny protilátkou CD163 nebo ARG1. Čtvrtý fenotyp zahrnoval všechny buňky pozitivní pro znak ARG1 kromě makrofágů a pátý buňky značené protilátkou pro znak CD80, kam patří všechny aktivované T a B buňky a DC. Poslední fenotyp nazvaný jako „ostatní“ označoval buňky, na kterých nebyl detekován žádný makrofágový znak.

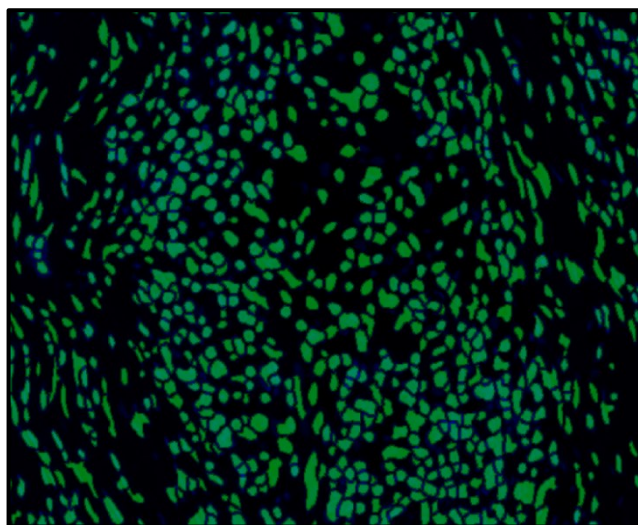
Na základě vytvořeného algoritmu jsem mohla jednotlivé populace makrofágů v nádorovém mikrostředí detekovat, lokalizovat a kvantifikovat v různých kompartmentech. Metodou multispektrální imunohistochemie jsem analyzovala celkem 54 vzorků, na které jsem hromadně aplikovala optimalizovaný algoritmus.



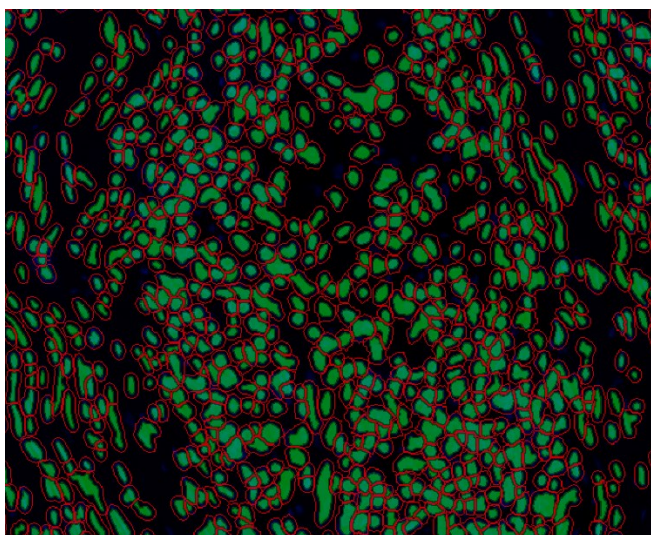
Obr. č. 20: Segmentace tkáně v programu InForm 2.4.6. červeně – nádor, zeleně – stroma, tmavě modře – pozadí; pod označenými oblastmi svítí světle modře jádra barvená DAPI



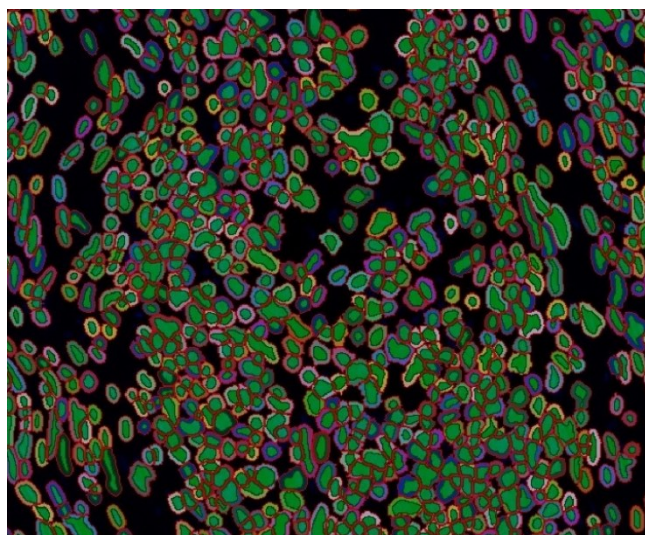
a) snímek před segmentací



b) segmentace jader



c) segmentace jader a membrány



d) segmentace jader, membrány
a cytoplazmy

Obr. č. 21: Segmentace buněk v programu InForm 2.4.6. na jádro, cytoplazmu a membránu.
modře – jádra značená DAPI, zeleně – segmentovaná jádra podle DAPI, červeně – membrána buňky,
barevně – cytoplazma



Obr. č. 22: Tvorba algoritmu v programu InForm 2.4.6. – fenotypizace buněk na šest definovaných fenotypů. Na snímku vidíme buňku s fenotypem **M2 CD68⁺ CD163⁺**, kterou program určil s konfidencí 98 % (označeno červeným kruhem). oranžově – **M1 CD68⁺ CD80⁺**, zeleně – **M2 CD68⁺ CD163⁺**, červeně – **M2 CD68⁺ ARG1⁺**, růžově – **ARG1**, žlutě – **CD80**, bíle – ostatní buňky bez žádného fenotypu

5.2.4 Statistické vyhodnocení

Ze segmentačních a fenotypizačních dat z programu InForm 2.4.6. (Akoya Biosciences, USA) jsem vybrala buňky se spolehlivostí určení fenotypu nad 75 % a provedla výpočet udávající plochu daného fenotypu na megapixel. Ve statistickém programu GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA) jsem provedla dva testy normality, a to Kolmogorov-Smirnovův a Shapiro-Wilkův, které prokázaly, že všechna data v mém souboru nemají normální Gaussovo rozložení, a proto je vhodné pro jejich vyhodnocení použít neparametrické testy.

K základnímu popsání mého souboru dat jsem využila deskriptivní statistiku uvádějící minimální a maximální hodnoty, medián a standardní odchylky. Podle souvislosti

porovnávaných dat jsem aplikovala buď neparametrický párový Wilcoxon test, při kterém jsou skupiny dat navzájem ovlivněny, nebo neparametrický nepárový Mann-Whitney test.

Výsledky párových Wilcoxon testů u nádoru a stromatu s i bez ohledu na HPV pozitivitu/negativitu vždy prokázaly signifikantní rozdíly v zastoupení různých typů makrofágů. Při porovnání mediánů bylo vždy ve stromatu detekováno více makrofágů než v oblasti nádoru.

Zjišťovala jsem rozdíl zastoupení makrofágů v nádoru a stromatu bez ohledu na HPV status (Tab. č. 6 a)), a naopak podle HPV positivity a negativity bez ohledu na typ tkáně (Tab. č. 6 b)). Dále jsem porovnávala výsledky pouze v nádoru (Tab. č. 6 c)) nebo ve stromatu podle HPV statusu (Tab. č. 6 d)). Také jsem porovnávala množství a typ makrofágů u kuřáků a nekuřáků (Tab. č. 6 f)) a v odlišných lokalizacích nádoru (Tab. č. 6 e)).

U dvou fenotypů, a to M2 CD68⁺ARG1⁺ a fenotypu ARG1, klesla P hodnota pod hladinu signifikance 0,05 u většiny aplikovaných testů. Větší množství buněk s těmito fenotypy bylo detekováno v HPV⁻ vzorcích v porovnání s HPV⁺ nádory. Zároveň s ohledem na kategorii tkáně bylo více buněk M2 CD68⁺ARG1⁺ a ARG1 zaznamenáno ve stromatu než v oblasti nádoru (Tab. č. 6 a)) (Obr. č. 23). Při hodnocení lokalizace nádorů byla tato populace více zastoupena v dutině ústní (lokalizace 2) než v oblasti orofaryngu (lokalizace 1) (Tab. č. 6 e)). Žádný signifikantní rozdíl v rozložení fenotypů nebyl zjištěn při porovnání výsledků u kuřáků a nekuřáků.

Na závěr jsem definovala dva souhrnné fenotypy, a to všechny makrofágy CD68⁺ a pouze pronádorové M2. CD68⁺ zahrnoval celkem tři fenotypy: M1 (CD68⁺CD80⁺), M2 (CD68⁺CD163⁺) a M2 (CD68⁺ARG1⁺) a fenotyp M2 označoval dohromady M2 (CD68⁺CD163⁺) a M2 (CD68⁺ARG1⁺). Oba fenotypy CD68⁺ a M2 se podle Wilcoxon testu vyskytovaly signifikantně více ve stromatu než v nádoru (Tab. č. 6 b) a d)). Mann-Whitney test prokázal signifikantně více CD68⁺ makrofágů a nesignifikantně více M2 makrofágů u HPV⁻ vzorků v porovnání s HPV⁺ vzorky (Tab. č. 6 a) a c)).

Tab. č. 6: Porovnání výsledků statistických testů v programu GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA). ns – není signifikantní (p hodnota $\geq 0,05$), * – signifikantní (p hodnota 0,01–0,05), ** – velmi signifikantní (p hodnota 0,001–0,01), *** – extrémně signifikantní (p hodnota 0,0001–0,001), **** – extrémně signifikantní (p hodnota $< 0,0001$), zelené stínování – signifikantní výsledek

Tab. č. 6: a) nádor vs. stroma – bez ohledu na HPV status (Wilcoxon test)

fenotyp	HPV status	medián	p hodnota
M1 CD68⁺ CD80⁺	nádor	1,46	$< 0,0001$
	stroma	11,76	****
M2 CD68⁺ CD163⁺	nádor	0,515	$< 0,0001$
	stroma	10,26	****
M2 CD68⁺ ARG1⁺	nádor	0,215	$< 0,0001$
	stroma	0,878	****
ARG1	nádor	3,635	$< 0,0001$
	stroma	17,15	****
CD80	nádor	0,2485	$< 0,0001$
	stroma	22,7	****
M2 CD68⁺ CD163⁺/ARG1⁺	nádor	0,271	$< 0,0001$
	stroma	3,518	****
CD68⁺	nádor	0,476	$< 0,0001$
	stroma	5,427	****

Tab. č. 6: b) HPV⁺ vs. HPV⁻ (Mann-Whitney test)

fenotyp	HPV status	medián	p hodnota
M1 CD68⁺ CD80⁺	HPV ⁺	1,341	0,0788
	HPV ⁻	7,17	ns
M2 CD68⁺ CD163⁺	HPV ⁺	5,581	0,9375
	HPV ⁻	3,038	ns
M2 CD68⁺ ARG1⁺	HPV ⁺	0,000	0,0033
	HPV ⁻	0,878	**
ARG1	HPV ⁺	3,731	0,0004
	HPV ⁻	25,36	***
CD80	HPV ⁺	6,602	0,3866
	HPV ⁻	1,74	ns
M2 CD68⁺ CD163⁺/ARG1⁺	HPV ⁺	0,554	0,1365
	HPV ⁻	1,336	ns
CD68⁺	HPV ⁺	0,745	0,0157
	HPV ⁻	2,083	*

Tab. č. 6: c) nádor HPV⁺ vs. nádor HPV⁻
(Mann-Whitney test)

fenotyp	tkáň HPV status	medián	p hodnota
M1 CD68⁺ CD80⁺	nádor HPV ⁺	0,5555	0,0699
	nádor HPV ⁻	2,101	ns
M2 CD68⁺ CD163⁺	nádor HPV ⁺	1,21	0,2593
	nádor HPV ⁻	0,271	ns
M2 CD68⁺ ARG1⁺	nádor HPV ⁺	0,0795	0,1677
	nádor HPV ⁻	0,2585	ns
ARG1	nádor HPV ⁺	1,225	0,0435
	nádor HPV ⁻	12,21	*
CD80	nádor HPV ⁺	0,525	0,4464
	nádor HPV ⁻	0,2145	ns

Tab. č. 6: d) stroma HPV⁺ vs. stroma HPV⁻
(Mann-Whitney test)

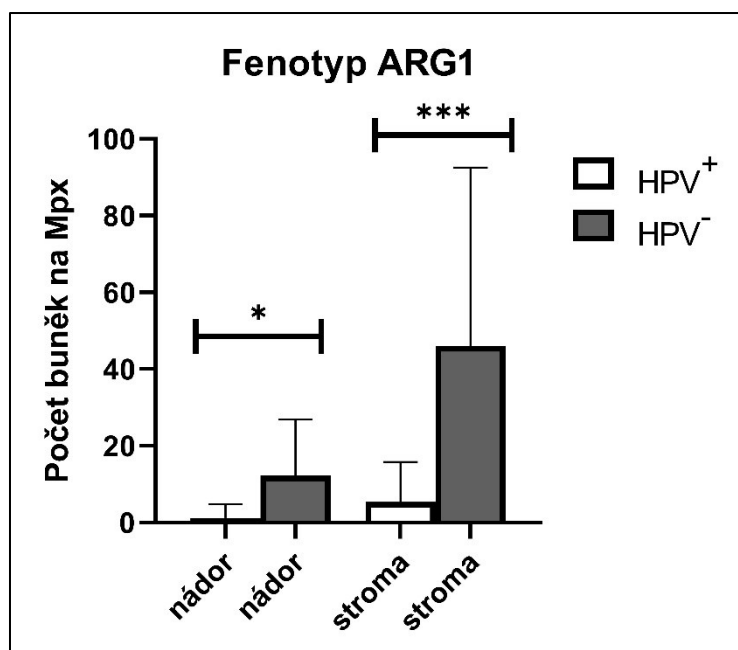
fenotyp	tkáň HPV status	medián	p hodnota
M1 CD68⁺ CD80⁺	stroma HPV ⁺	7,04	0,4852
	stroma HPV ⁻	12,77	ns
M2 CD68⁺ CD163⁺	stroma HPV ⁺	9,727	0,4779
	stroma HPV ⁻	11,21	ns
M2 CD68⁺ ARG1⁺	stroma HPV ⁺	0	0,0098
	stroma HPV ⁻	2,317	**
ARG1	stroma HPV ⁺	5,372	0,0010
	stroma HPV ⁻	46,03	***
CD80	stroma HPV ⁺	21,48	0,6003
	stroma HPV ⁻	35,43	ns

Tab. č. 6: e) lokalizace 1 (orofaryngeální oblast)
vs. lokalizace 2 (dutina ústní)
(Mann-Whitney test)

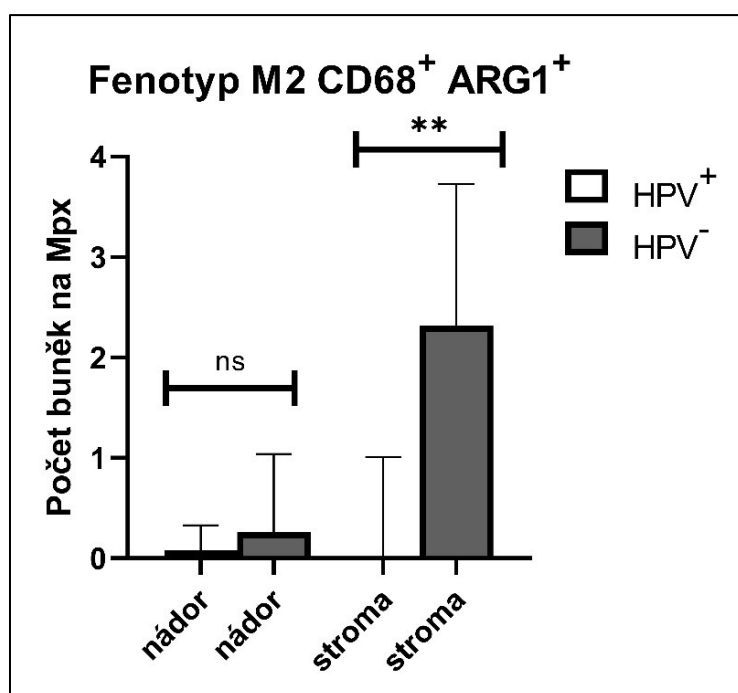
fenotyp	lokalizace	medián	p hodnota
M1 CD68⁺ CD80⁺	1	1,889	0,3294
	2	5,268	ns
M2 CD68⁺ CD163⁺	1	4,986	0,8484
	2	3,894	ns
M2 CD68⁺ ARG1⁺	1	0,163	0,0065
	2	1,081	**
ARG1	1	5,101	0,0182
	2	25,36	*
CD80	1	6,602	0,1648
	2	1,107	ns

Tab. č. 6: f) kouření⁺ vs. kouření⁻ celkově
v průběhu celého života
(Mann-Whitney test)

fenotyp	kouření	medián	p hodnota
M1 CD68⁺ CD80⁺	+	5,501	0,4079
	-	1,636	ns
M2 CD68⁺ CD163⁺	+	5,012	0,418
	-	3,804	ns
M2 CD68⁺ ARG1⁺	+	0,3685	0,0831
	-	0,000	ns
ARG1	+	16,34	0,0616
	-	3,731	ns
CD80	+	2,035	0,261
	-	9,217	ns



a) fenotyp ARG1



b) fenotyp M2 CD68⁺ ARG1⁺

Obr. č. 23: Srovnání počtu buněk na megapixel v nádoru a stromatu s ohledem na HPV status. Fenotyp ARG1 (a) a fenotyp M2 CD68⁺ ARG1⁺ (b). Mpx – megapixel, chybová úsečka – 95% interval spolehlivosti, ns – není signifikantní (p hodnota ≥ 0,05), * – signifikantní (p hodnota 0,01–0,05), ** – velmi signifikantní (p hodnota 0,001–0,01), *** – extrémně signifikantní (p hodnota 0,0001–0,001)

5.3 Příprava nukleových kyselin

5.3.1 Optimalizace metod a výběr typu klinického materiálu

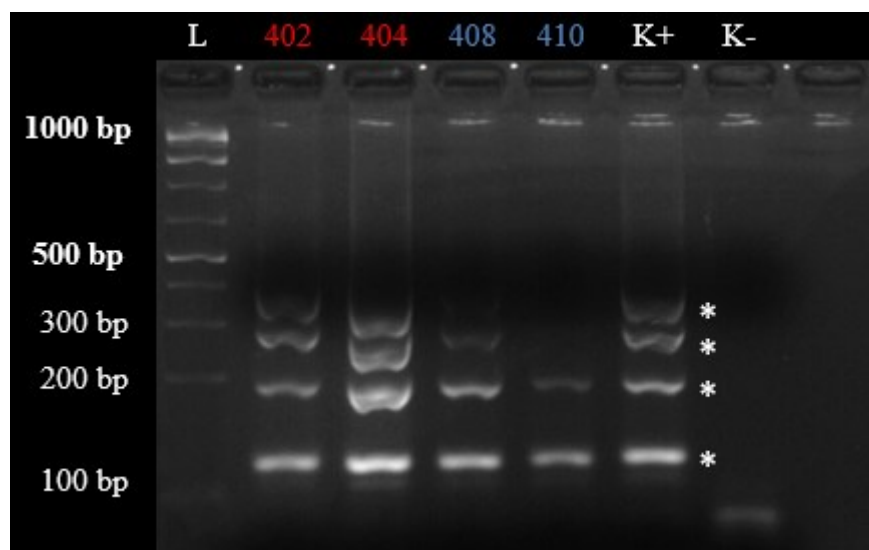
Pro určení nejvhodnějšího typu tkáně k získání co největšího množství DNA i RNA v co nejlepší kvalitě pro expresní analýzy jsem otestovala tři různé typy vzorků – FFPE, buňky izolované z nádoru uchované v médiu *RNAlater*[®] a PBMC izolované z krve uchované také v médiu *RNAlater*[®]. Pro počáteční analýzy jsem srovnávala vzorky celkem 9 pacientů, z toho od 5 z nich jsem měla všechny tři typy vzorků, u dvou pacientů (ORL 410 a ORL 426) nebyly k dispozici buňky izolované z nádoru uchované v *RNAlateru*[®], a naopak u dalších dvou (ORL 402 a ORL 404) jsem získala pouze buňky izolované z nádoru uchované ve formě suchého peletu bez *RNAlateru*[®]. Současně od pacienta ORL 408 jsem ze vzorku buněk z nádoru a PBMC z krve vyizolovala pouze RNA, protože zpočátku jsem izolovala nukleové kyseliny bez použití sady pro izolaci DNA.

Nejprve jsem spektrofotometrem a elektroforetickým bioanalyzátozem zjistila základní charakteristiky vyizolovaných nukleových kyselin (Kap. 4.3.1 a 4.3.2) jako je koncentrace, čistota vyjádřená poměrem absorbancí 260 nm a 280 nm a kvalita udávaná číslem RQI (Tab. č. 7). Nízké RQI u vzorků ORL 402 a ORL 404 mohlo být způsobeno uchováním RNA bez média *RNAlater*[®], které může vést k větší degradaci a horší kvalitě RNA. Proto jsme k dalším analýzám vždy používali vzorky v *RNAlateru*[®]. I přes nízkou hodnotu RQI některých vzorků (Tab. č. 7 – červené stínování), vykazovaly vzorky dostatečnou koncentraci RNA, a proto jsem se rozhodla do dalších analýz použít všechny vzorky buněk z nádoru uchovaných v *RNAlateru*[®].

Míru degradace DNA jsem zjistila multiplexovou PCR (Kap. 4.3.3) na DNA izolované ze dvou typů vzorků, z buněk izolovaných z nádoru (ORL 402 a ORL 404) a z FFPE (ORL 408 a ORL 410), během které se amplifikovaly úseky genu *GAPDH* dlouhé 100 pb, 200 pb, 300 pb a 400 pb. V FFPE tkáni jsem detekovala pouze kratší fragmenty DNA, a to v délce 100 pb a 200 pb, u ORL 408 i slabě 300 pb (Obr. č. 24), protože v FFPE materiálu dochází ve větší míře k degradaci nukleových kyselin. V buňkách izolovaných z nádoru jsem detekovala fragmenty o délce až 400 pb.

Tab. č. 7: Tabulka koncentrací RNA a DNA a poměrů absorbancí A260/280 naměřených spektrofotometrem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) a hodnot RQI získaných systémem Experion™ (Bio-Rad Laboratories, USA). konc. – koncentrace; * ze vzorku ORL 408 jsem izolovala pouze RNA, DNA není k dispozici; zelené stínování – RQI 10-7,0; žluté stínování – RQI 6,9-4,0; červené stínování – RQI 3,9-1,0; - - nelze změřit RQI; n – analýza neprovedena

ID vzorku	typ materiálu	DNA		RNA		
		konc. (ng/ul)	A260/280	konc. (ng/ul)	A260/280	RQI Experion
402	b. z nádoru	126,1	1,75	143,9	2,08	2,6
404	b. z nádoru	109,5	1,86	365,1	2,07	3,3
408	FFPE	68,8	1,92	22,5	2,14	-
408	b. z nádoru	*	*	22,2	2,22	8,0
408	PBMC z krve	*	*	31,9	2,17	9,2
410	FFPE	45,7	1,9	31,6	1,95	2,2
410	PBMC z krve	n	n	84,3	2,15	9,5
413	FFPE	78,3	1,93	25,7	2,2	n
413	b. z nádoru	138,7	1,85	111,9	2,04	8,5
413	PBMC z krve	8,0	2,27	10,8	1,86	8,5
418	FFPE	220,7	1,89	45,6	2,11	n
418	b. z nádoru	10,3	2,21	12,1	1,91	2,7
418	PBMC z krve	91,5	1,87	258,5	2,08	5,1
422	FFPE	196,2	1,85	19,3	2,19	n
422	b. z nádoru	69,9	1,91	331,1	2,08	3,5
422	PBMC z krve	2,5	1,82	3,8	1,6	-
424	FFPE	285,7	1,87	36,0	2,06	n
424	b. z nádoru	24,6	1,95	29,2	2,2	3,5
424	PBMC z krve	193,8	1,86	160,4	2,08	3,4
426	FFPE	192,3	1,84	8,2	2,92	n
426	PBMC z krve	4,3	2,55	24,9	2,2	4,9



Obr. č. 24: Vizualizace produktů multiplexové PCR s primery amplifikujícími čtyři různé úseky genu *GAPDH* (100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb). L – žebříček GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), červeně – vzorky buněk izolovaných z nádoru, modře – FFPE vzorky, K+ – pozitivní kontrola PCR, K- – negativní kontrola PCR, * – požadované produkty

Dále jsem provedla amplifikaci kontrolního genu *β -globinu* (208 pb) pro ověření dostatečného množství DNA ve vzorcích a nepřítomnosti inhibitorů PCR reakce a dále amplifikaci genu *L1* (150 pb), který se využívá pro určení HPV statusu vzorků (Kap. 5.4.1).

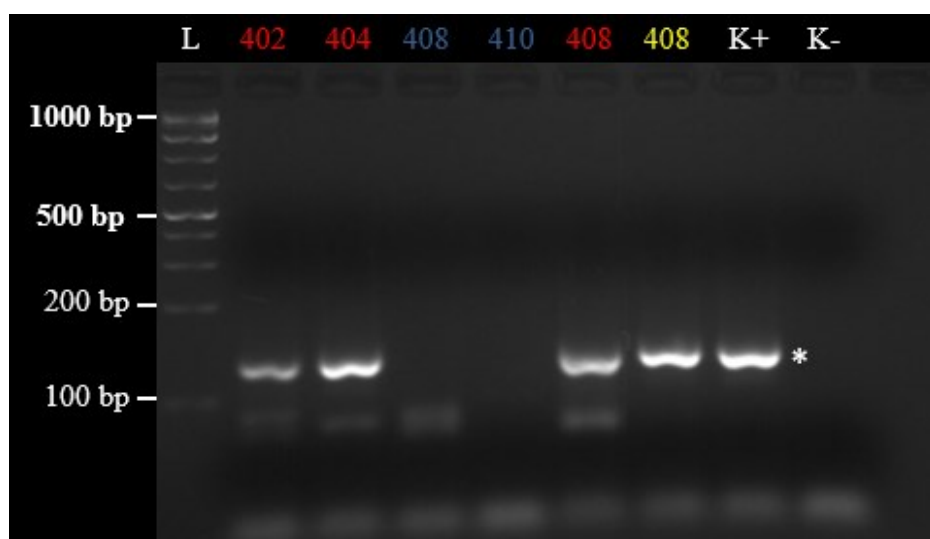
Detekce DNA HPV se provádí rutinně z FFPE řezu nádoru a jeho okolí a i přesto, že DNA z tohoto typu materiálu je více degradovaná, je vhodná k typizaci HPV. Ve své práci jsem měla k dispozici i vzorky buněk z nádoru uložených v *RNAlateru*[®], které obsahují především TIL buňky a v menším množství nádorové buňky, a proto jsem zjišťovala, zda z obou typů vzorků (FFPE a *RNAlateru*[®]) získám stejné informace o HPV statusu vzorků.

Kontrolní gen *β -globin* jsem detekovala ve všech typech vzorků (buňky izolované z nádoru a PBMC izolované z krve uložené v *RNAlateru*[®] a FFPE) a gen *L1* ve vzorcích buněk nádoru a FFPE (Tab. č. 8). Ve všech FFPE vzorcích a vzorcích buněk nádoru, které byly pozitivní na přítomnost proteinu p16 a předpokládali jsme u nich HPV pozitivitu (Kap. 4.3), jsem gen *L1* detekovala a tím prokázala, že ze vzorků buněk nádoru uložených v *RNAlateru*[®] lze detekovat DNA HPV a oba materiály (FFPE a buňky izolované z nádoru v *RNAlateru*[®]) jsou tak vhodné k určování HPV statusu vzorků.

Dále jsem provedla reverzní transkripci a na cDNA vzorků udělala kontrolní PCR reakci s primery pro HPRT (117 pb) (Kap. 4.4.2) pro ověření schopnosti detekovat cDNA tohoto referenčního genu ve všech typech vzorků. Produkty PCR reakce jsem nebyla schopna detekovat u FFPE vzorků (ORL 408 a ORL 410), a to pravděpodobně kvůli špatné kvalitě RNA,

protože u FFPE vzorku ORL 408 jsem na cDNA nedetekovala ani kontrolní *β-globin* (110 pb) (Obr. č. 25). Reakci jsem neopakovala, protože jsem se pro budoucí analýzy rozhodla FFPE materiál nepoužívat.

Výsledky multiplexové PCR, amplifikace kontrolního genu *β-globinu* (208 pb) a *L1* (150 pb) a výsledky detekce *HPRT* (117 pb) (Tab. č. 8) prokázaly, že z FFPE materiálu i buněk uchovaných v *RNAlateru*[®] jsem schopna získat stejné informace o charakteristikách vzorků, a proto jsem se rozhodla, že nukleové kyseliny budu izolovat pouze ze vzorků buněk izolovaných z nádoru uložených v *RNAlateru*[®]. A to i z důvodu, že je izolace z buněk v *RNAlateru*[®] snazší a časově méně náročná než z FFPE vzorků a nejsou limitace s ohledem na využití nukleových kyselin v dalších analýzách.



Obr. č. 25: Vizualizace produktů kontrolní PCR po reverzní transkripci pro *HPRT* (117 pb). L – žebříček GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), červeně – vzorky buněk izolovaných z nádoru, modře – FFPE vzorky, žlutě – vzorky PBMC izolovaných z krve, K+ – pozitivní kontrola PCR, K- – negativní kontrola PCR, * – požadovaný produkt

Tab. č. 8: Porovnání analýz u různých typů vzorků, podle kterého jsem se rozhodla pro zpracování pouze buněk izolovaných z nádoru uložených v RNAlateru®.

+ – pozitivní, +* – slabě pozitivní, - – negativní, n – analýza neprovedena, 0 – žádný typ HPV

ID vzorku	typ materiálu	DNA				RNA	
		<i>GAPDH</i> žebříček (100, 200, 300 a 400 pb)	<i>β-globin</i> (208 pb)	<i>L1</i> (150 pb)	typ HPV	<i>HPRT</i> (117 pb)	<i>E6 HPV16</i> (86 pb)
402	b. z nádoru	+, +, +, +	+	-	0	+	n
404	b. z nádoru	+, +, +, +	+	+	HPV16	+	n
408	FFPE	+, +, +*, -	+	+	HPV16	-	n
408	b. z nádoru	n	n	n	n	+	n
408	PBMC z krve	n	n	n	n	+	n
410	FFPE	+, +, -, -	+	-	0	-	n
410	PBMC z krve	n	n	n	n	+	n
413	FFPE	n	+	+	HPV16	+	+
413	b. z nádoru	n	+	+	HPV16	+	+
413	PBMC z krve	n	+	-	0	n	n
418	FFPE	n	+	-	0	+	-
418	b. z nádoru	n	+	-	0	+	-
418	PBMC z krve	n	+	-	0	n	n
422	FFPE	n	+	+	HPV16	+	+
422	b. z nádoru	n	+	+	HPV16	+	+
422	PBMC z krve	n	+	-	0	n	n
424	FFPE	n	+	+	HPV16	+	+
424	b. z nádoru	n	+	+	HPV16	+	+
424	PBMC z krve	n	+	-	0	n	n
426	FFPE	n	+	+	HPV16	+	+
426	PBMC z krve	n	+	-	0	n	n

5.3.2 Izolace nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsem izolovala z celkem 71 vzorků od 59 pacientů (57 vzorků buněk izolovaných z nádoru, 7 vzorků buněk izolovaných z krve a 7 FFPE vzorků). Pro počáteční vyhodnocení vhodného typu klinického materiálu jsem využila 21 vzorků (Kap. 5.3.1), z nichž jsem pak 5 vzorků buněk izolovaných z nádoru (ORL 408, ORL 413, ORL 418, ORL 422 a ORL 424) použila do dalších analýz. V mé studii je tedy zahrnuto celkem 55 vzorků buněk izolovaných z nádoru uložených v RNAlateru® (Kap. 4.3.2) od 55 různých pacientů.

5.3.3 Určení koncentrace a kvality nukleových kyselin

Koncentraci získané DNA i RNA jsem měřila spektrofotometrem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) a naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Tab. č. 9 a) a b): Tabulka koncentrací RNA a DNA a poměrů absorbancí A260/280 naměřených spektrofotometrem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) a hodnot RQI získaných systémem Experion™ (Bio-Rad Laboratories, USA). konc. – koncentrace; * ze vzorku ORL 408 jsem izolovala pouze RNA, DNA není k dispozici; zelené stínování – RQI 10-7,0; žluté stínování – RQI 6,9-4,0; červené stínování – RQI 3,9-1,0; - - nelze změřit RQI; n – analýza neprovedena

Tab. č. 9 a)

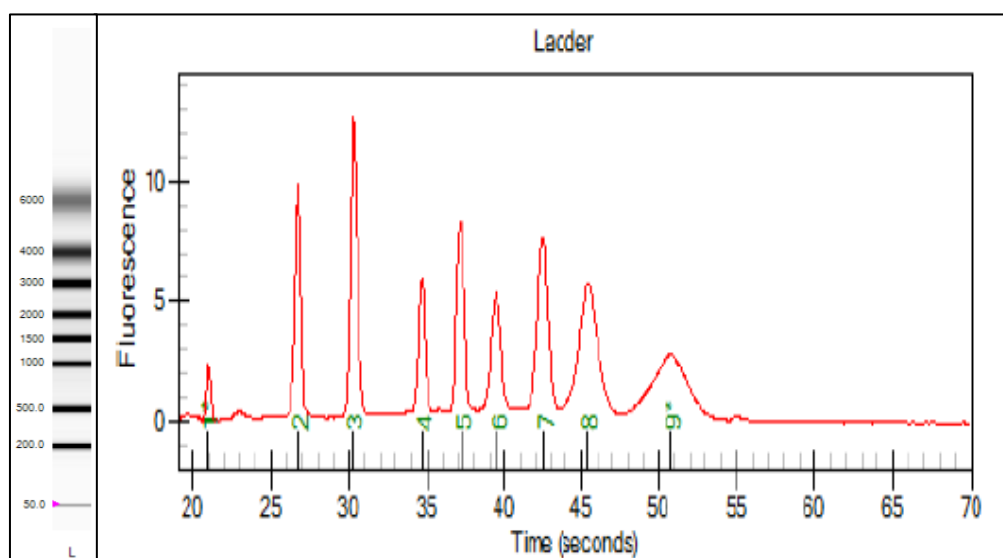
ID vzorku	DNA		RNA		
	konc. (ng/ul)	A260/280	konc. (ng/ul)	A260/280	RQI Experion
406	78,4	1,90	174,7	2,08	-
407	89,1	1,86	159,8	2,10	9,6
408	*_	*_	22,2	2,22	8,0
411	65,3	1,87	1055,4	2,09	6,7
412	32,9	1,96	891,9	2,08	4,0
413	138,7	1,85	111,9	2,04	8,5
416	1,6	6,04	11,4	2,21	6
417	3,0	3,30	3,2	2,94	-
418	10,3	2,21	12,1	1,91	2,7
419	4,3	3,44	7,6	2,25	-
420	23,8	1,95	21,6	2,16	3,0
422	69,9	1,91	331,1	2,08	3,5
423	100,6	1,85	151,8	2,10	3,4
424	24,6	1,95	29,2	2,20	3,5
425	4,2	2,55	6,0	1,82	-
427	2,6	2,97	5,3	1,96	-
430	29,9	1,89	64,5	2,04	2,4
431	365,7	1,85	449,6	2,09	9,0
433	62,7	1,88	791,3	2,10	6,6
434	17,1	2,01	14,4	2,28	8,0
435	2,5	2,25	11,4	2,40	-
437	12,0	1,87	13,1	2,21	8,4
439	20,0	1,98	134,5	2,08	-
440	2,8	2,23	3,2	3,13	-
441	128,3	1,86	150,5	2,12	7,9

Tab. č. 9 b)

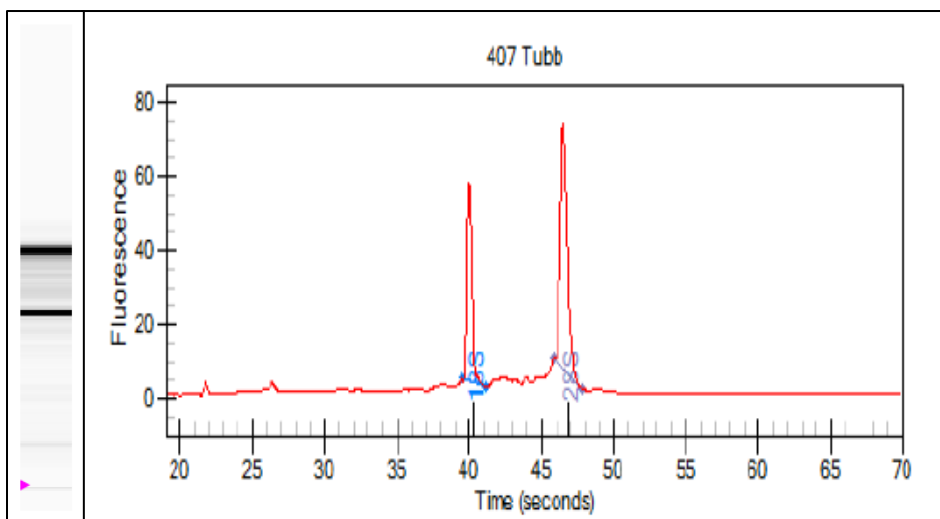
ID vzorku	DNA		RNA		
	konc. (ng/ul)	A260/280	konc. (ng/ul)	A260/280	RQI Experion
442	2,6	2,84	6,7	2,23	-
443	69,7	1,90	120,9	2,09	7,6
444	79,8	1,89	82,3	2,11	8,2
445	37,5	1,98	255,5	2,08	3,1
446	44,7	1,93	107,9	2,08	3,0
447	83,3	1,89	50,3	2,12	4,5
448	92,2	1,87	491,0	2,10	8,4
449	41,0	1,86	430,2	2,08	5,9
450	47,4	1,91	74,2	2,10	3,6
451	38,0	1,90	174,0	2,07	2,7
452	79,0	1,87	86,9	2,04	3,4
453	13,4	2,05	10,3	2,02	4,6
455	44,0	1,90	13,2	2,08	3,0
456	29,8	1,96	40,8	2,11	-
457	67,0	1,88	46,4	2,15	2,9
458	7,0	2,16	8,5	2,42	3,5
463	8,1	2,44	14,2	2,12	2,8
465	54,6	1,91	52,0	2,12	2,5
466	33,9	2,16	6,3	2,23	-
468	4,1	2,32	13,4	2,27	4,4
469	12,8	2,08	4,9	1,89	-
471	64,4	1,90	36,8	2,08	3,1
473	5,7	1,89	3,2	2,18	-
474	61,6	1,90	92,3	2,10	7,0
476	5,1	2,62	1,6	3,27	n
477	19,8	1,95	4,1	2,01	-
479	3,1	2,98	0,8	1,38	n
482	19,6	2,04	19,4	2,15	-
484	29,6	1,99	10,0	2,15	-
489	4,3	2,57	5,9	2,25	-

Dále jsem ověřovala integritu a kvalitu celkové RNA elektroforetickým bioanalyzátozem Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, USA) (Kap. 4.3.3), jehož výstupem bylo číslo RQI (Tab. č. 9) a elektroforetogram (Obr. č. 26 – ukázka elektroforetogramu žebříčku RNA). Analýzu kvality RNA jsem neprováděla u 2 vzorků (ORL 476 a ORL 479) z celkového souboru 55 vzorků (Tab. č. 9), protože jsem u nich nebyla

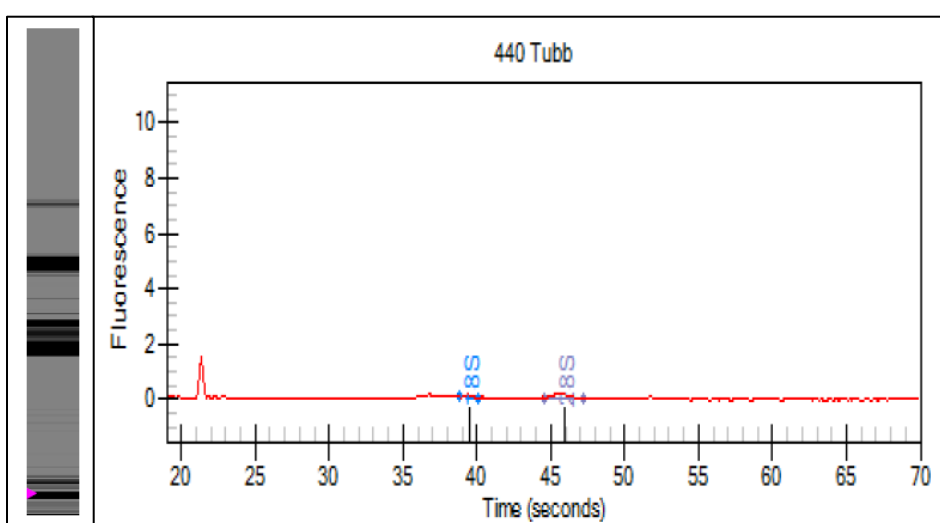
schopna detekovat cDNA referenčního genu *HPRT*. Tyto vzorky jsem vyřadila z analýzy exprese genů metodou qPCR. Nejvyšší kvalitu RNA vykazují vzorky s RQI v rozmezí 10-7,0, takových vzorků jsem detekovala celkem 10 (Obr. č. 27 a)). Hodnotu od 6,9 do 4,0, která odpovídá průměrné kvalitě RNA, mělo 8 vzorků a špatnou kvalitu RNA mělo 18 vzorků, jejichž RQI se pohybovalo v rozmezí 3,9-1,0. U 17 vzorků nebylo možné RQI změřit většinou kvůli příliš nízké koncentraci RNA (<10 ng/μl) (Obr. č. 27 b)). Analýzu jsem u vzorků ORL 406 a ORL 439 opakovala, ale stále jsem nebyla schopna změřit požadované RQI, proto jsem zkontrolovala elektroforetogram a zjistila, že RNA měla velikost cca 500 pb. Do dalších analýz jsem se tedy rozhodla použít všechny vzorky z důvodu jejich nenahraditelnosti s tím, že pro detekci exprese genů jsem používala velmi krátké amplikony (délka do 142 pb) a současně koncentrace RNA byla dostatečná (Obr. č. 27 c)).



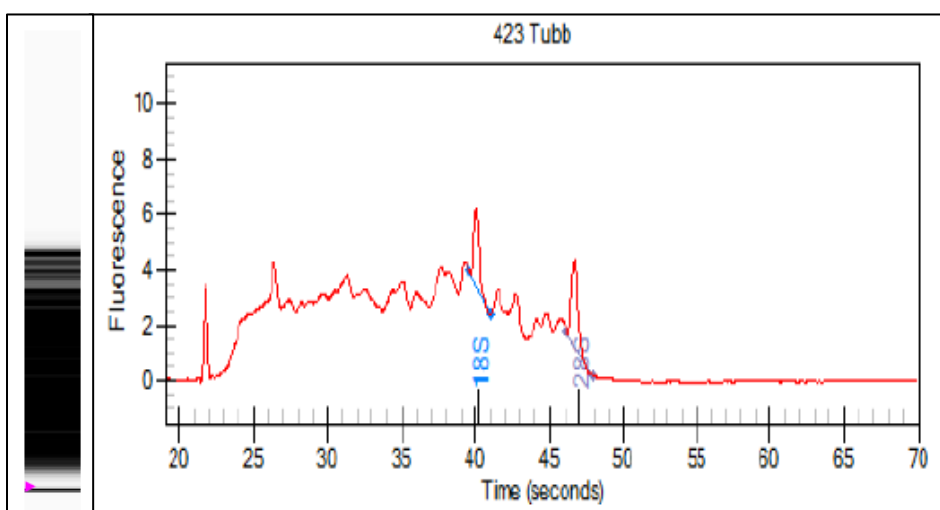
Obr. č. 26: Elektroforetogram žebříčku RNA (ladder) pro systém Experion™.



a) ORL 407



b) ORL 440



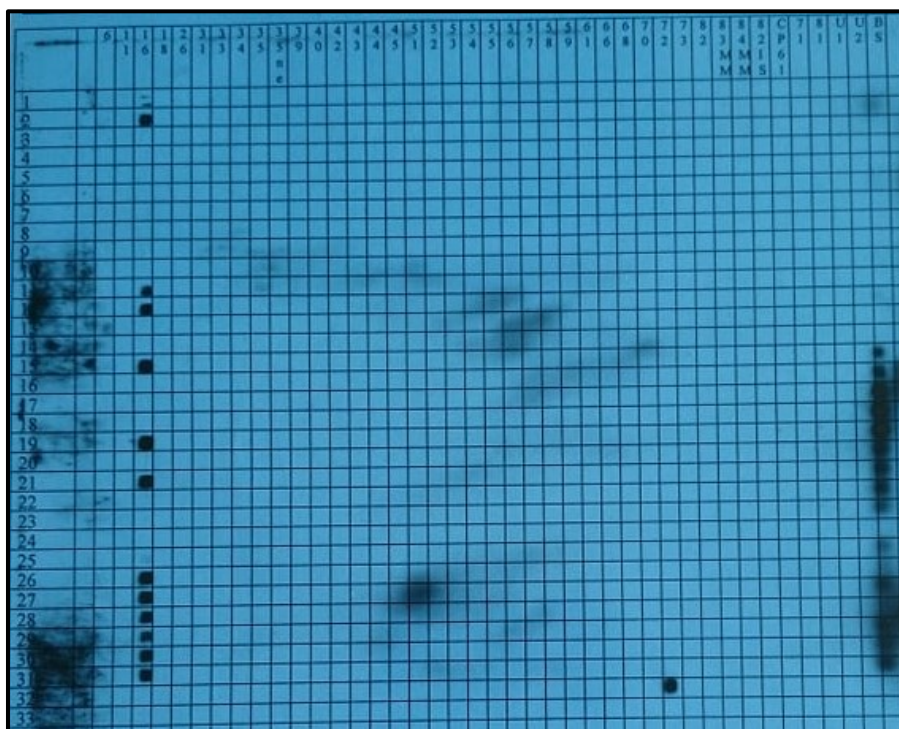
c) ORL 423

Obr. č. 27: Elektroforetogramy: a) vzorek ORL 407, který měl koncentraci 89,1 ng/μl a nejvyšší RQI a to 9,6; b) vzorek ORL 440, u kterého systém Experion™ nezměřil RQI kvůli nízké koncentraci RNA (<10 ng/μl), konkrétně 2,8 ng/μl; c) vzorek ORL 423, který měl nízké RQI 3,4, ale koncentrace RNA byla dostatečná (100,6 ng/μl). Dva označené vrcholy reprezentují 18S a 28S subtypy rRNA.

5.4 Charakterizace vzorků

5.4.1 Detekce DNA HPV a určení typu HPV

Pro ověření nepřítomnosti inhibitorů PCR reakce jsem provedla amplifikaci referenčního genu β -globinu (110 pb nebo 208 pb u vzorků ORL 413, ORL 416, ORL 418, ORL 419, ORL 422, ORL 424, ORL 425, ORL 427 a ORL 457), který jsem detekovala u všech 55 vzorků nádorů hlavy a krku. Dále jsem amplifikovala oblast genu *L1* (150 pb), která je specifická pro různé typy papilomavirů, a proto se používá pro stanovení positivity HPV a určení genotypu HPV vzorků. Výsledky obou PCR reakcí (Tab. č. 10) jsem zkontrolovala na agarózovém gelu a jejich produkty jsem využila pro metodu RLB, která umožňuje identifikovat celkem 37 typů HPV (Obr. č. 28). U všech 31 vzorků, které byly pozitivní na elektroforéze pomocí PCR reakce genu *L1* (150 pb), byl prokázán určitý typ HPV. Majoritním typem HPV byl typ HPV16, který jsem detekovala u 30 vzorků, z toho v jednom případě byl typ HPV16 detekován v koinfekci s HPV53 (ORL 435). Dále byl jeden vzorek pozitivní na typ HPV35 (ORL 437) (Tab. č. 10).



Obr. č. 28: Výsledek metody RLB, lumifilm (Sigma-Aldrich, USA) exponovaný 30 s.

řádky – pořadí vzorků nanesených na membránu; sloupce – seznam typů HPV, které lze detekovat; pozice 32 – kontrolní klon HPV72; pozice 2, 11, 12, 15, 19, 21, 26-31 – vzorky pozitivní na HPV16; poslední sloupeček BS – detekce β -globinu

Tab. č. 10 a) a b): Přehledová tabulka výsledků detekce genu *β-globinu* (110 pb nebo 208 pb) a genu *L1* (150 pb) spolu s typem HPV určeným metodou RLB. + – pozitivní, - – negativní, 0 – žádný typ HPV, červeně – jiný typ HPV než HPV16, * – ze vzorku ORL 408 jsem izolovala pouze RNA, DNA není k dispozici, ** – vzorky, u kterých byl detekován *β-globin* s délkou 208 pb v ÚHKT

Tab. č. 10 a)

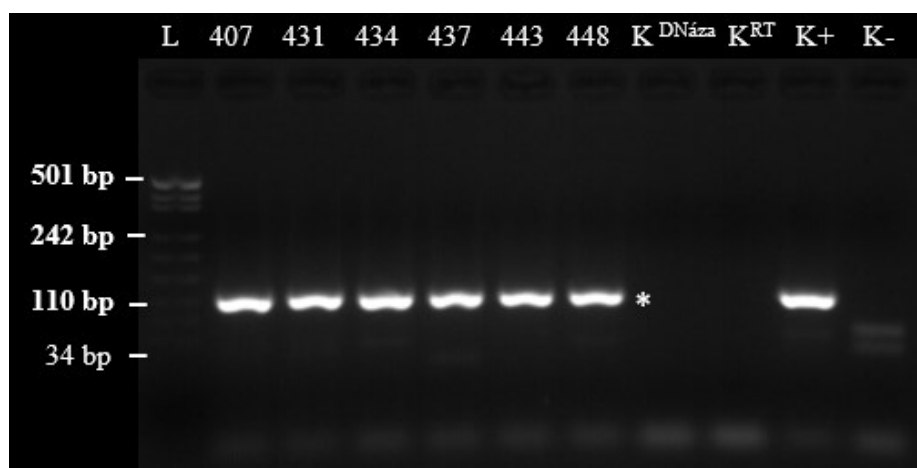
ID vzorku	β-globin (110 pb nebo **208 pb)	L1 (150 pb)	RLB typ HPV
406	+	-	0
407	+	+	HPV16
408	*	*	*
411	+	+	HPV16
412	+	+	HPV16
413	***	+	HPV16
416	***	-	0
417	+	+	HPV16
418	***	-	0
419	***	-	0
420	+	+	HPV16
422	***	+	HPV16
423	+	+	HPV16
424	***	+	HPV16
425	***	-	0
427	***	-	0
430	+	+	HPV16
431	+	+	HPV16
433	+	+	HPV16
434	+	+	HPV16
435	+	+	HPV16, 53
437	+	+	HPV35
439	+	+	HPV16
440	+	+	HPV16
441	+	+	HPV16
442	+	-	0
443	+	+	HPV16

Tab. č. 10 b)

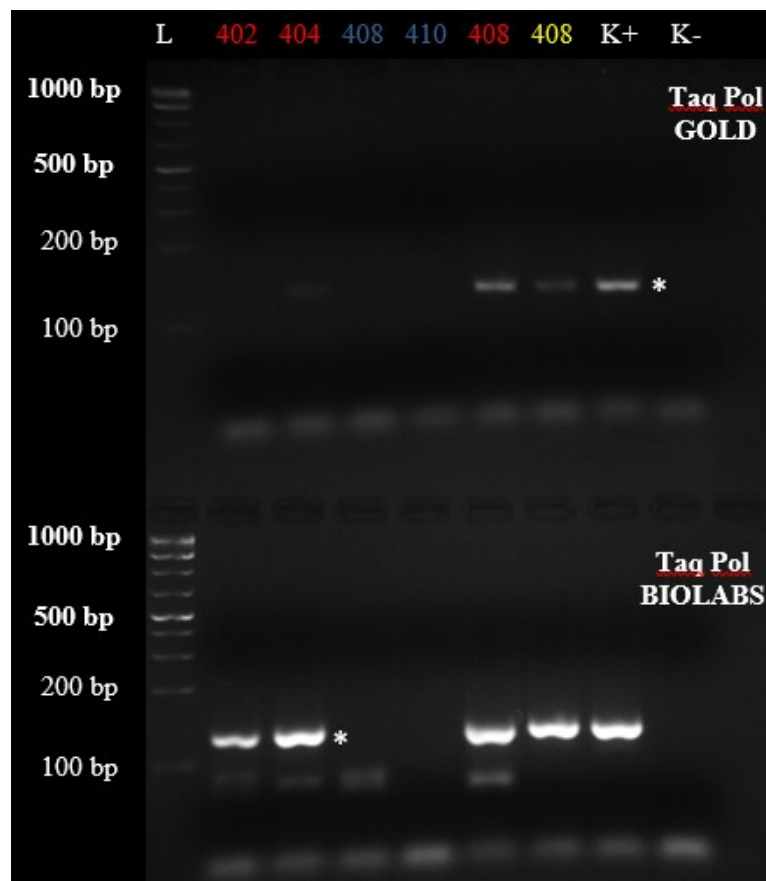
ID vzorku	β-globin (110 pb nebo **208 pb)	L1 (150 pb)	RLB typ HPV
444	+	+	HPV16
445	+	+	HPV16
446	+	+	HPV16
447	+	+	HPV16
448	+	+	HPV16
449	+	+	HPV16
450	+	-	0
451	+	+	HPV16
452	+	+	HPV16
453	+	+	HPV16
455	+	+	HPV16
456	+	-	0
457	***	-	0
458	+	-	0
463	+	-	0
465	+	-	0
466	+	+	HPV16
468	+	+	HPV16
469	+	-	0
471	+	-	0
473	+	-	0
474	+	-	0
476	+	-	0
477	+	-	0
479	+	-	0
482	+	-	0
484	+	-	0
489	+	-	0

5.4.2 Reverzní transkripce

Z RNA vzorků jsem reverzní transkripcí syntetizovala cDNA a pro ověření proběhnutí reverzní transkripce a přítomnosti dostatečného množství cDNA ve vzorcích jsem provedla PCR reakci s primery pro HPRT (117 pb) (Obr. č. 29) pomocí Hot Start Taq DNA polymerázy (New England Biolabs, USA) a s DNA polymerázou AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), abych porovнала efektivitu dvou typů polymeráz. Amplifikace probíhaly za odlišných podmínek (Kap. 4.4.2), produkty obou PCR reakcí jsem analyzovala pomocí gelové elektroforézy. Po vizualizaci jsem na agarózovém gelu detekovala více specifických produktů u více vzorků, které jsem amplifikovala Hot Start Taq DNA polymerázou (New England Biolabs, USA) a na základě tohoto zjištění jsem se rozhodla ji využít pro další amplifikace (Obr. č. 30).



Obr. č. 29: Vizualizace produktů kontrolní PCR po reverzní transkripci na cDNA s primery pro HPRT (117 pb). L – žebříček pUC18 DNA/MspI, K^{DNáza} – negativní kontrola procesu DNázování, K^{RT} – negativní kontrola reverzní transkripce, K+ – pozitivní kontrola PCR (cDNA buněk SiHa), K- – negativní kontrola PCR, * – požadovaný produkt



Obr. č. 30: Porovnání dvou typů DNA polymerázy při vizualizaci produktů PCR s primery pro HPRT (117 pb). V horní polovině gelu jsem k amplifikaci použila AmpliTaq Gold DNA polymerázu (Thermo Fisher Scientific, USA) a v dolní polovině Hot Start Taq DNA polymerázu (New England Biolabs, USA), L – žebříček GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), červeně – vzorky buněk izolovaných z nádoru, modře – FFPE vzorky, žlutě – vzorek PBMC izolovaných z krve, K+ – pozitivní kontrola PCR, K- – negativní kontrola PCR, * – požadované produkty

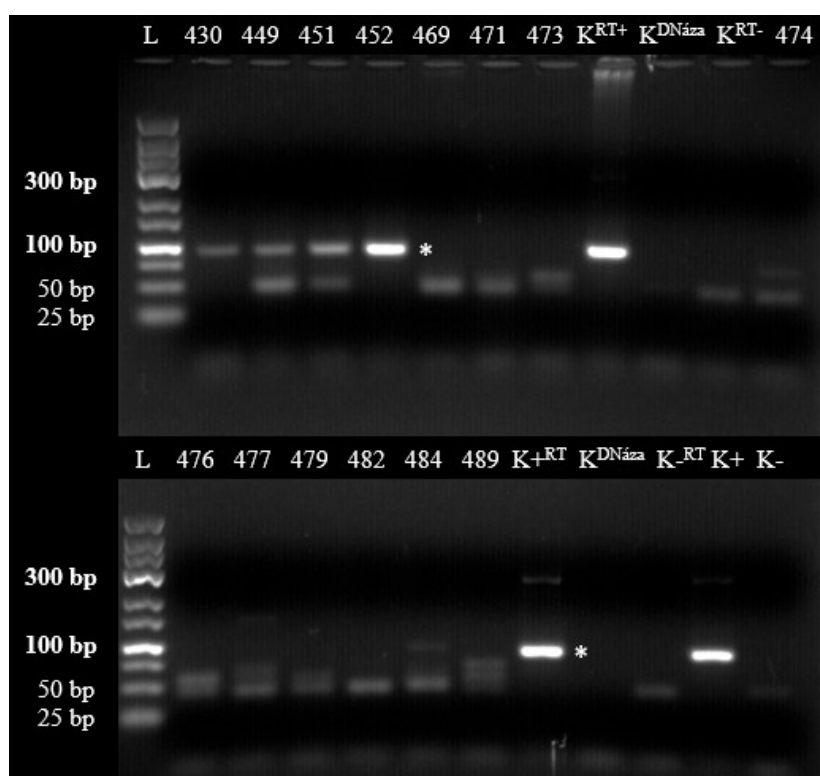
5.4.3 Detekce aktivní virové infekce

Aktivní virovou infekci jsem u vzorků ověřila detekcí mRNA E6 HPV16 (86 pb) (Obr. č. 31). Z celkového počtu 55 vzorků jsem mRNA pro gen *E6* HPV16 detekovala u 25 vzorků včetně vzorku ORL 435, u kterého byla prokázána koinfekce HPV16 a HPV53 (Kap. 5.4.1). U vzorku ORL 437 byl jako u jediného zjištěn jiný typ HPV než 16 a to typ 35, proto jsem k detekci mRNA E6 využila primery E6F a E6R specifické pro HPV35 (48 pb). I u tohoto vzorku jsem prokázala aktivní virovou infekci a celkový počet vzorků pozitivních na mRNA onkogenu *E6* byl 26 vzorků.

Z celkem 25 vzorků, které byly pozitivní na přítomnost proteinu p16, jsem u 24 detekovala i mRNA E6 HPV16. U jednoho vzorku (ORL 437) pozitivního na p16 jsem detekovala mRNA E6 HPV35. Zbylých 30 vzorků negativních na p16 na IHC bylo negativních i na přítomnost mRNA E6 HPV16, kromě jednoho vzorku (ORL 412), který byl negativní na přítomnost p16, a i přesto u něj byla detekována mRNA E6 HPV16 (Tab. č. 11). V jednom případě tedy status p16 nekoreloval s přítomností mRNA E6.

U 7 vzorků (ORL 420, ORL 435, ORL 440, ORL 453, ORL 455, ORL 466 a ORL 468), u kterých byla zjištěna přítomnost DNA HPV, nebyla detekována mRNA E6, což se dle současné nomenklatury vykládá tak, že se nejedná o aktivní virovou infekci a vznik nádoru nepřisuzujeme virové etiologii.

Při posouzení HPV statusu podle přítomnosti mRNA onkogenu *E6* jsem z celkového souboru 55 vzorků detekovala celkem 26 HPV⁺ vzorků a 29 HPV⁻ vzorků (Tab. č. 12).



Obr. č. 31: Vizualizace produktů PCR reakce na cDNA amplifikující E6 HPV16 (86 pb).

L – žebříček GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), K^{RT+} – pozitivní kontrola reverzní transkripce, K^{DNáza} – negativní kontrola procesu DNázování, K^{RT-} – negativní kontrola reverzní transkripce, K⁺ – pozitivní kontrola PCR (cDNA buněk SiHa), K⁻ – negativní kontrola PCR, * – požadované produkty

Tab. č. 11: Přehledová tabulka srovnání detekce proteinu p16, mRNA onkogenu E6 HPV16 a typu HPV s uvedením konečného HPV statusu HPV⁺ (a) a HPV⁻ (b). + – pozitivní, - – negativní, * – ze vzorku ORL 408 jsem izolovala pouze RNA, DNA není k dispozici; 0 – žádný typ HPV; červeně – jiný typ HPV než HPV16; šedé stínování – diskrepantní vzorek

Tab. č. 11 a)

HPV ⁺ vzorky			
ID vzorku	p16	E6 mRNA	HPV DNA
406	+	+	0
407	+	+	HPV16
408	+	+	*–
411	+	+	HPV16
412	-	+	HPV16
413	+	+	HPV16
417	+	+	HPV16
422	+	+	HPV16
423	+	+	HPV16
424	+	+	HPV16
430	+	+	HPV16
431	+	+	HPV16
433	+	+	HPV16
434	+	+	HPV16
437	+	+	HPV35
439	+	+	HPV16
441	+	+	HPV16
443	+	+	HPV16
444	+	+	HPV16
445	+	+	HPV16
446	+	+	HPV16
447	+	+	HPV16
448	+	+	HPV16
449	+	+	HPV16
451	+	+	HPV16
452	+	+	HPV16

Tab. č. 11 b)

HPV ⁻ vzorky			
ID vzorku	p16	E6 mRNA	HPV DNA
416	-	-	0
418	-	-	0
419	-	-	0
420	-	-	HPV16
425	-	-	0
427	-	-	0
435	-	-	HPV16, 53
440	-	-	HPV16
442	-	-	0
450	-	-	0
453	-	-	HPV16
455	-	-	HPV16
456	-	-	0
457	-	-	0
458	-	-	0
463	-	-	0
465	-	-	0
466	-	-	HPV16
468	-	-	HPV16
469	-	-	0
471	-	-	0
473	-	-	0
474	-	-	0
476	-	-	0
477	-	-	0
479	-	-	0
482	-	-	0
484	-	-	0
489	-	-	0

Tab. č. 12: Přehled počtu vzorků podle HPV statusu. + – pozitivní, - – negativní,
* – ze vzorku ORL 408 jsem izolovala pouze RNA, DNA není k dispozici

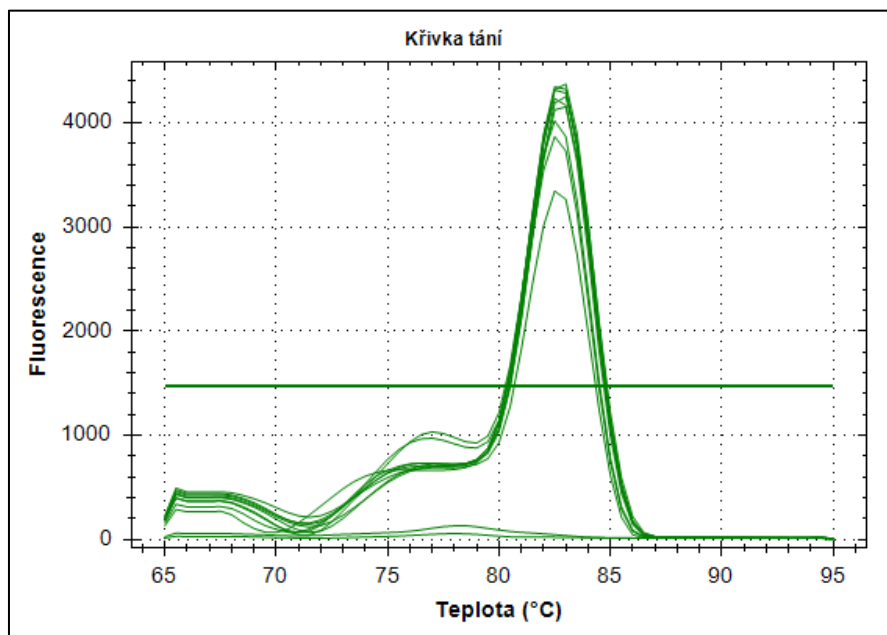
		HPV mRNA E6		
		+	-	celkem
HPV DNA	+	24+1*	7	32
	-	1	22	23
	celkem	26	29	55

5.5 Detekce exprese makrofágových a imunosupresivních znaků

Detekci exprese genů *IDO1*, *ARG1*, *CD163*, *NOS2* a *PTGS2* jsem provedla metodou qPCR, kterou jsem optimalizovala na cDNA kontrolních buněčných linií (SiHa, CRL3240, HTB43) a na cDNA izolované z tonsilárního karcinomu (Tu16T) a z primárních lidských hepatocytů (12PHH).

S komerčně navrženými primery jsem provedla qPCR amplifikující cDNA všech genů na všech vytipovaných buněčných liniích (SiHa, CRL3240, HTB43) nebo cDNA tonsilární a hepatocytární tkáně (Tu16T, 12PHH), abych zjistila, ve kterém materiálu lze určitý gen detekovat. Specificitu amplifikovaného produktu jsem ověřila teplotou tání na křivce tání (Obr. č. 32). Pro každý gen jsem jako kontrolu vybrala tu cDNA, ve které se amplifikoval specifický produkt v největším množství, a tedy s nejnižší hodnotou Ct. Pro referenční geny (*HPRT*, *GUSB* a *hACTB*) jsem jako kontrolu vybrala cDNA buněčné linie SiHa.

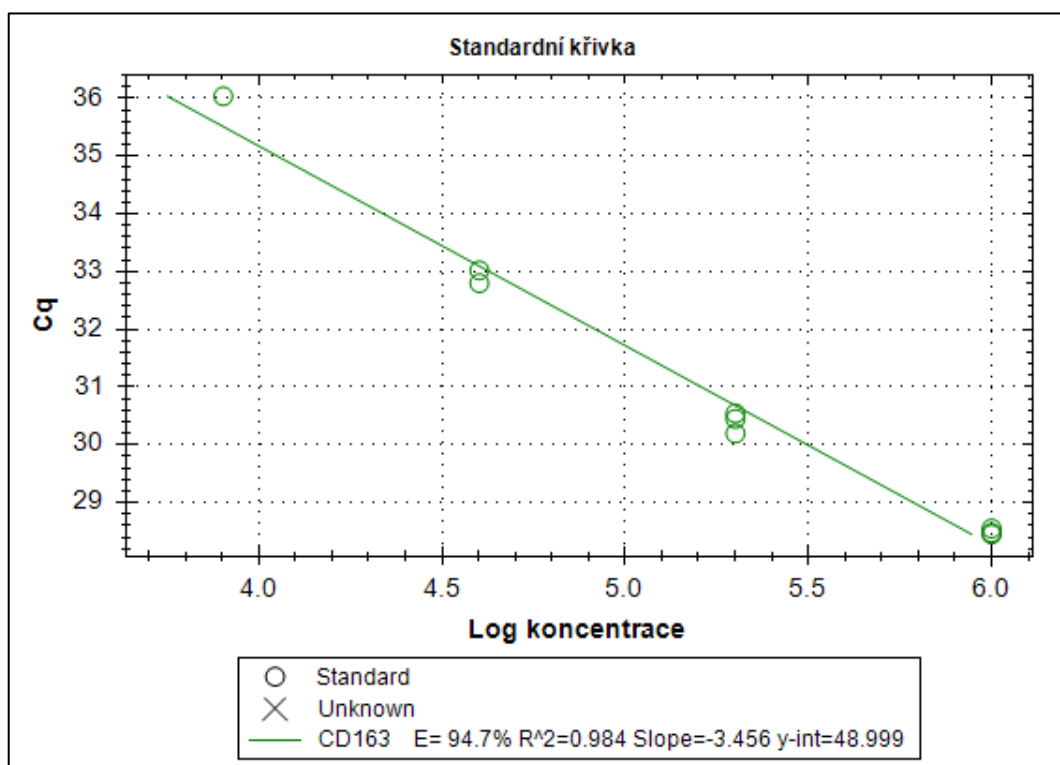
Následně jsem na vybraných kontrolních cDNA pro všechny geny provedla qPCR v ředící řadě 1×, 5×, 25×, 125× a 625× ředěné cDNA, abych získala standardní křivky (Obr. č. 33 a Obr. č. 34). Z nich jsem určila účinnost amplifikace qPCR reakcí, která by ideálně měla být v rozmezí 90–110 % (Applied Biosystems, 2006), a hodnotu prahu detekce fluorescence (threshold) důležitou pro analýzu výsledných amplifikačních křivek vzorků (Tab. č. 13).



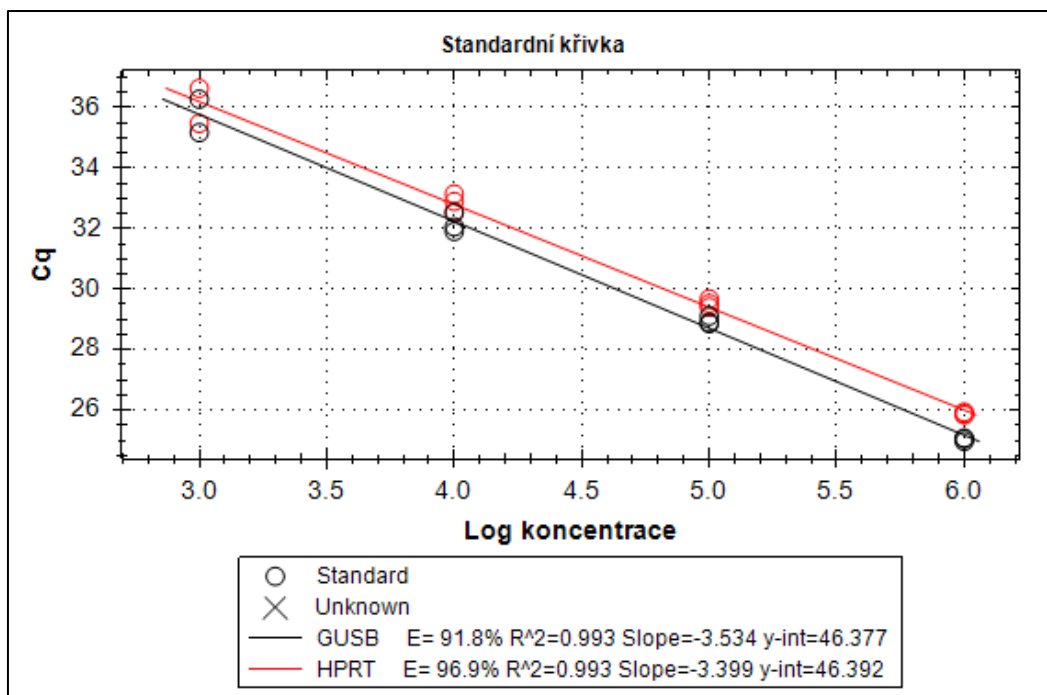
Obr. č. 32: Příklad křivky tání pro produkty qPCR reakce pro *CD163* detekovaný na nádorové tkáni tonsilárního karcinomu (Tu16T). osa x – teplota (°C), osa y – fluorescence

Tab. č. 13: Charakteristiky standardních křivek jednotlivých reakcí v mých experimentálních podmínkách. RFU – relativní jednotky fluorescence (z angl. relative fluorescence units)

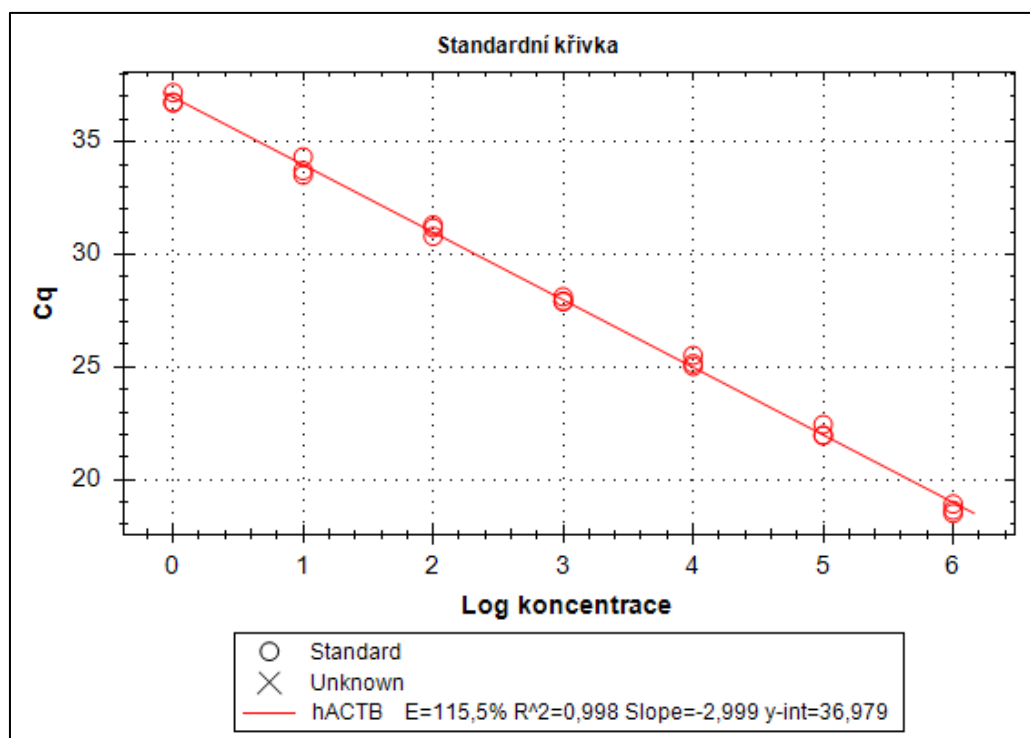
Gen	Teplota tání	Kontrolní cDNA	Práh detekce (RFU)	Účinnost (%)	R ²	Sklon křivky
<i>IDO1</i>	80 °C	Tu16T	3974,53	95,3	0,978	-3,440
<i>ARG1</i>	85 °C	12PHH	125,017	102,4	0,919	-3,265
<i>CD163</i>	83 °C	Tu16T	4255,27	94,7	0,984	-3,456
<i>NOS2</i>	84,5 °C	CRL3240	4095,67	98,1	0,949	-3,367
<i>PTGS2</i>	83,5 °C	SiHa	4699,22	101,9	0,968	-3,278
<i>HPRT</i>	82 °C	SiHa	3387,85	96,9	0,993	-3,399
<i>GUSB</i>	81 °C	SiHa	3336,10	91,8	0,993	-3,534
<i>hACTB</i>	85 °C	SiHa	4908,54	108,7	0,999	-3,130



Obr. č. 33: Příklad standardní křivky pro gen *CD163* detekovaný na cDNA nádorové tkáně tonsilárního karcinomu (Tu16T). osa x – ředění vzorku Tu16T, osa y – hodnota Cq (cyklus)



a) standardní křivka pro referenční gen *HPRT* a *GUSB*



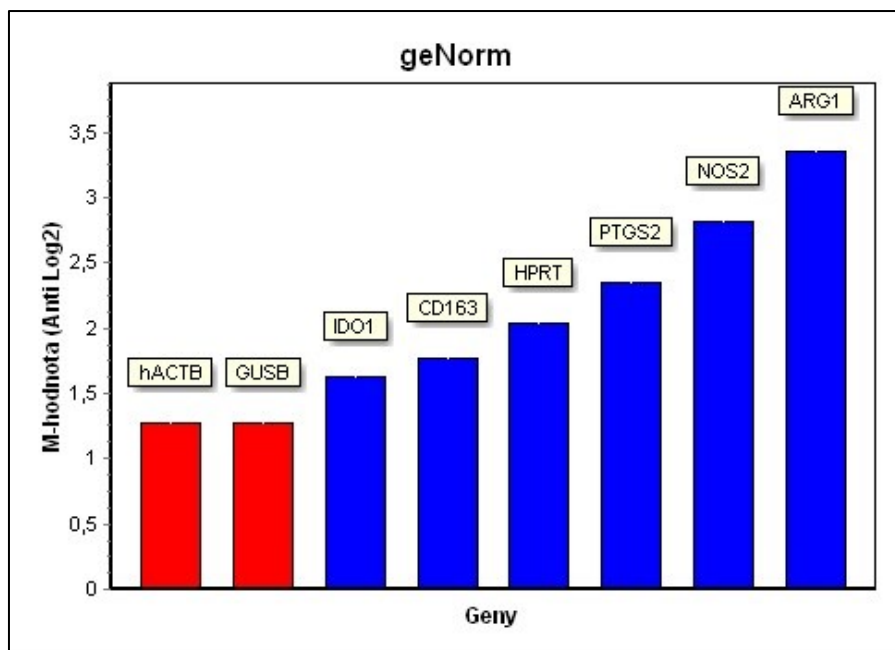
b) standardní křivka pro referenční gen *hACTB*

Obr. č. 34: Standardní křivky referenčních genů *HPRT* a *GUSB* (a) a genu *hACTB* (b) detekované na cDNA buněčné linie SiHa. osa x – ředění buněčné linie SiHa, osa y – hodnota Cq (cyklus)

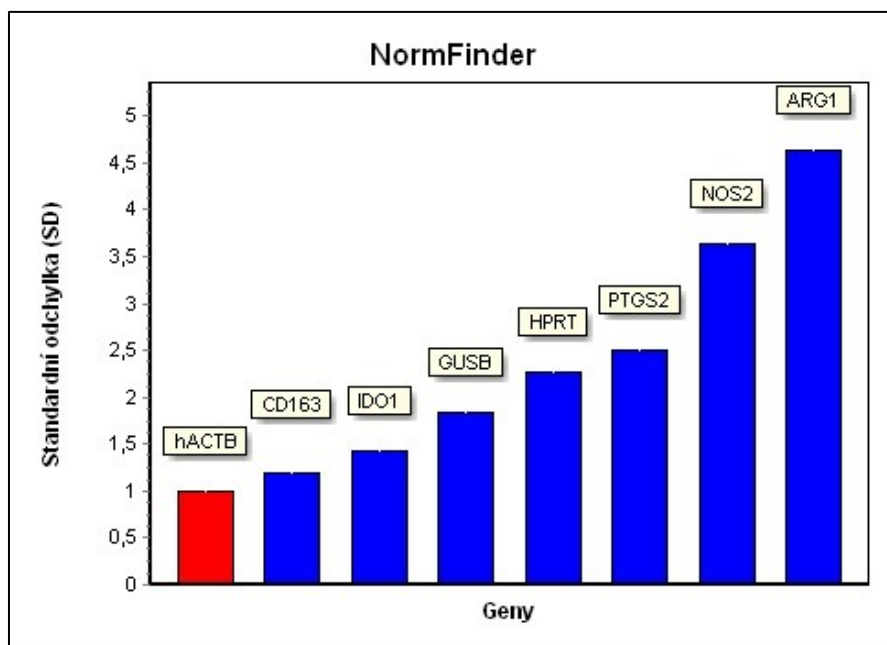
K expresním analýzám vybraných makrofágových a imunosupresivních znaků jsem využila vzorky cDNA připravené reverzní transkripcí (Kap. 4.4.2), na kterých jsem provedla všech osm qPCR reakcí pro pět vybraných a tři referenční geny. Na základě nízké koncentrace RNA jsem z analýzy vyřadila dva vzorky (ORL 476 a ORL 479) a skupina HPV⁺ se tak skládala z 26 vzorků a HPV⁻ z 27 vzorků. V programu Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, USA) jsem nejprve provedla kontrolu křivek tání pro případné vyřazení vzorků s nescifickou amplifikací. Získané hodnoty Ct vzorků jsem analyzovala v programu GenEx™ 6 (MultiD Analyses AB, Švédsko), ve kterém jsem chybějící hodnotu Ct jednoho z duplikátů doplnila naměřenou hodnotou Ct druhého replikátu, pokud měl vzorek odpovídající teplotu tání na křivce tání pro daný gen. V případě, že u vzorku chyběly oba duplikáty, nahradila jsem je po normalizaci dat maximální naměřenou hodnotou Ct pro daný gen zvýšenou o 4 Ct, a to podle návodu v GenEx™ 6 (MultiD Analyses AB, Švédsko), který doporučuje pro vysoce variabilní vzorky používat větší hodnoty pro kompenzaci rozdílů v hodnotách Ct pro další analýzy. V mém případě se to týkalo amplifikace mRNA pro geny *ARG1* a *NOS2*.

Při výběru vhodného referenčního genu metoda geNorm vyhodnotila díky stabilní expresi mezi vzorky geny *hACTB* a *GUSB* jako optimální referenční geny (Obr. č. 35) a podle metody NormFinder byl jako nejstabilnější referenční gen určen *hACTB* (Obr. č. 36). Na základě těchto výsledků jsem zvolila k normalizaci expresních dat využít referenční geny *hACTB* a *GUSB*.

V programu GenEx™ 6 (MultiD Analyses AB, Švédsko) jsem při zpracování dat provedla následující kroky v daném pořadí: korekci účinnosti amplifikace pro každý gen (Tab. č. 13), průměr qPCR replikátů a normalizaci exprese na vybrané referenční geny. Poté byla vyjádřena relativní exprese jednotlivých genů v porovnání s maximální hodnotou Ct, která udává nejnížší expresi genu a získala jsem hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Tab. č. 14). Na závěr byla všechna data převedena logaritmem o základu 2 do logaritmické stupnice a dále jsem s nimi pracovala ve statistickém programu GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA).



Obr. č. 35: Analýza geNorm identifikující geny *hACTB* a *GUSB* (označeny červeně) jako optimální referenční geny s nejnižší M-hodnotou udávající nejnižší variabilitu exprese mezi dvojicí vzorků.



Obr. č. 36: Analýza NormFinder identifikující gen *hACTB* (označen červeně) jako optimální referenční gen s nejnižší hodnotou standardní odchylky (SD) udávající nejnižší variabilitu exprese genu mezi vzorky.

Tab. č. 14: Normalizovaná relativní exprese mRNA $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (log2) zpracovaná v programu GenEx™ 6 pro skupinu HPV⁺ (a) a HPV⁻ (b) vzorků.

Tab. č. 14 a)

HPV ⁺ vzorky					
ID vzorku	<i>IDO1</i>	<i>ARG1</i>	<i>CD163</i>	<i>NOS2</i>	<i>PTGS2</i>
ORL 406	3,389	0,000	0,752	5,156	3,836
ORL 407	5,179	7,196	0,000	11,849	3,738
ORL 408	3,943	6,009	1,439	4,258	3,075
ORL 411	2,985	8,009	0,212	9,621	5,102
ORL 412	3,994	0,000	2,020	5,386	2,760
ORL 413	3,882	3,999	1,358	8,905	3,146
ORL 417	4,374	0,000	1,590	0,000	7,257
ORL 422	5,577	0,000	0,627	8,215	2,979
ORL 423	2,679	8,927	1,338	6,702	3,073
ORL 424	2,674	5,427	1,868	7,931	3,464
ORL 430	5,101	0,000	4,003	0,000	11,139
ORL 431	4,191	6,428	1,651	7,760	1,819
ORL 433	4,306	11,976	5,270	11,485	3,375
ORL 434	0,996	9,452	1,165	6,675	2,647
ORL 437	5,365	6,607	0,183	8,485	3,683
ORL 439	4,713	0,000	3,984	0,000	8,226
ORL 441	2,899	6,477	1,315	10,390	3,245
ORL 443	6,266	0,000	0,344	7,240	1,881
ORL 444	3,647	9,426	0,409	8,719	5,876
ORL 445	5,762	8,785	1,611	8,713	3,460
ORL 446	3,566	0,000	0,829	0,000	3,475
ORL 447	2,273	9,117	2,068	6,550	5,011
ORL 448	3,657	9,874	0,716	9,424	1,630
ORL 449	5,084	0,000	2,199	6,136	0,000
ORL 451	6,061	0,000	2,721	9,408	9,475
ORL 452	3,767	0,000	1,648	5,562	2,912

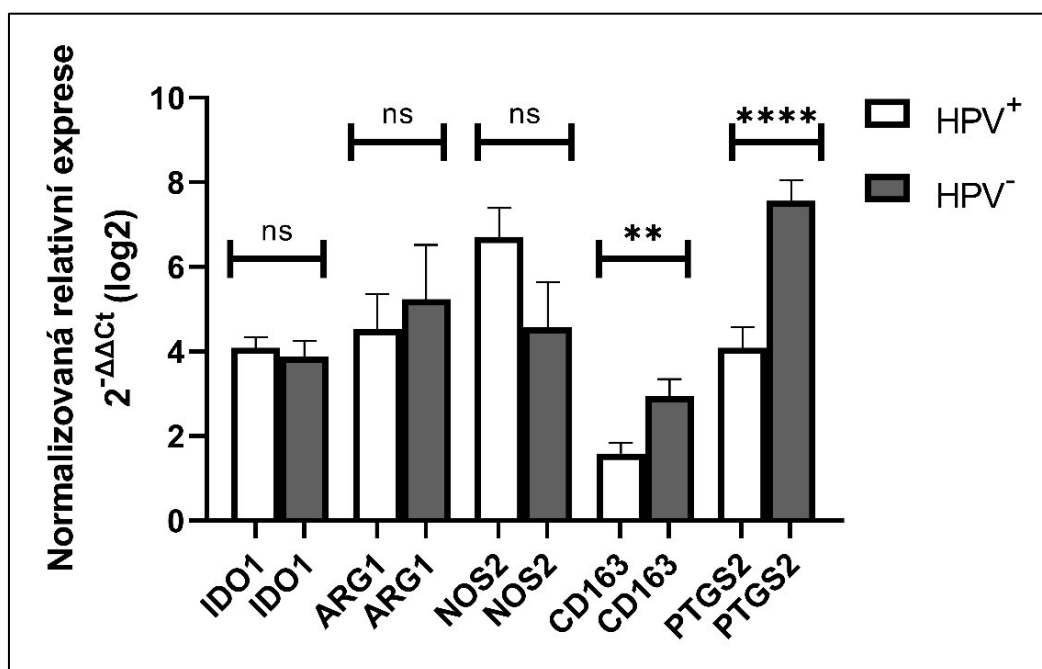
Tab. č. 14 b)

HPV ⁻ vzorky					
ID vzorku	<i>IDO1</i>	<i>ARG1</i>	<i>CD163</i>	<i>NOS2</i>	<i>PTGS2</i>
ORL 416	4,730	12,095	1,867	6,389	6,609
ORL 418	3,837	15,448	3,892	0,000	10,062
ORL 419	2,174	12,779	0,838	0,000	6,682
ORL 420	5,085	0,000	2,091	0,000	6,452
ORL 425	5,673	0,000	3,551	0,000	9,393
ORL 427	3,245	11,540	1,954	0,000	5,784
ORL 435	2,710	10,514	1,674	5,382	5,282
ORL 440	4,518	0,000	1,756	0,000	6,915
ORL 442	0,000	0,000	2,495	0,000	6,249
ORL 450	2,000	0,000	2,846	9,852	6,408
ORL 453	3,182	9,183	1,938	4,000	3,964
ORL 455	3,757	14,048	3,959	12,758	9,491
ORL 456	0,879	0,000	4,022	0,000	7,059
ORL 457	5,081	0,000	3,666	0,000	7,879
ORL 458	1,971	0,000	1,060	6,662	5,854
ORL 463	5,453	0,000	4,380	14,315	9,533
ORL 465	4,866	0,000	3,854	13,060	8,631
ORL 466	7,674	0,000	9,139	16,873	13,689
ORL 468	1,541	0,000	1,016	0,000	6,079
ORL 469	3,913	0,000	2,688	0,000	7,160
ORL 471	3,599	0,000	1,319	0,000	8,514
ORL 473	3,351	13,208	2,658	10,291	8,210
ORL 474	3,599	9,653	0,038	4,703	3,158
ORL 477	9,029	19,789	8,179	0,000	14,384
ORL 482	3,924	13,070	3,024	8,845	7,661
ORL 484	5,972	0,000	4,506	10,354	8,368
ORL 489	2,965	0,000	1,447	0,000	4,802

5.5.1 Statistické vyhodnocení

Vzorky jsem rozdělila podle zjištěné HPV positivity založené na přítomnosti mRNA onkogenu *E6* HPV, a tedy aktivní virové infekce, do dvou skupin. V programu GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA) jsem získala průměr exprese jednotlivých znaků pro definované skupiny vzorků (Tab. č. 14). Zlogaritmovaná data získaná metodou qPCR mají normální Gaussovo rozložení, a proto se pro jejich vyhodnocení používají průměrné hodnoty. Analýzou parametrickým nepárovým t-testem jsem prokázala signifikantní rozdíl v expresi genu *CD163* a *PTGS2* u skupiny HPV⁻ vzorků, u kterých byla, v porovnání se skupinou HPV⁺ vzorků, exprese obou genů vyšší. Normalizovaná relativní exprese $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (log2) všech znaků je uvedena na Obr. č. 37.

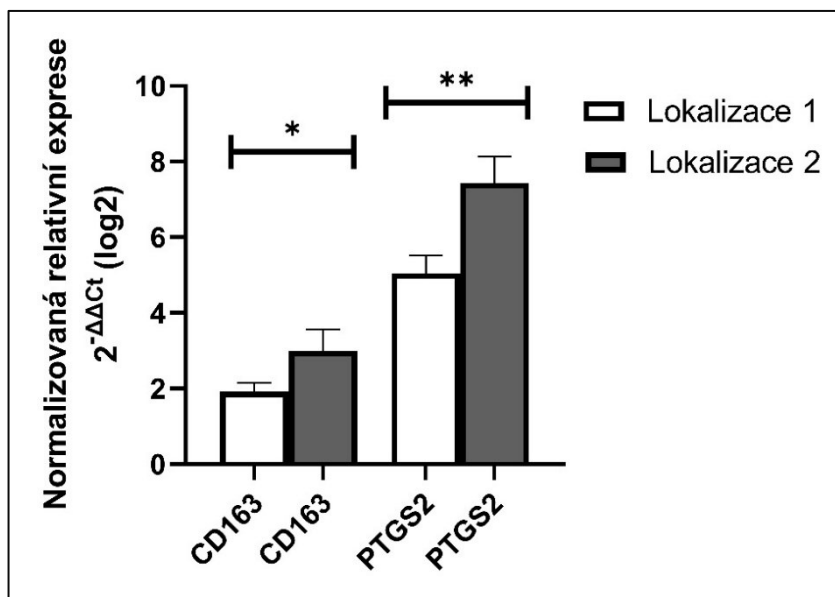
Při porovnání výsledků s ohledem na lokalizaci nádoru byly opět u genu *CD163* a *PTGS2* prokázány signifikantní rozdíly (Tab. č. 15). Exprese obou genů byla vyšší v dutině ústní na rozdíl od orofaryngeální oblasti (Obr. č. 38). Lokalizace nádoru v dutině ústní koreluje s HPV negativitou, a naopak orofaryngeální oblast koreluje s výsledky u HPV⁺ nádorů. Vzhledem k tomu, že je známo z předchozích studií, že výskyt HPV⁺ nádorů je výrazně častější v orofaryngeální lokalizaci, potvrzují naše výsledky vztah HPV⁺ etiologie nádorů a exprese markerů makrofágů fenotypu M2.



Obr. č. 37: Normalizovaná relativní exprese $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (log2) všech vybraných mRNA u skupiny HPV⁺ a HPV⁻ nádorů. chybová úsečka – střední chyba průměru, ns – nesignifikantní, ** – velmi signifikantní (p hodnota 0,001–0,01), **** – extrémně signifikantní (p hodnota <0,0001)

Tab. č. 15: Porovnání výsledků parametrických nepárových t-testů v programu GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, USA) s ohledem na HPV status a lokalizaci nádoru. ns – není signifikantní (p hodnota $\geq 0,05$), * – signifikantní (p hodnota 0,01–0,05), ** – velmi signifikantní (p hodnota 0,001–0,01), *** – extrémně signifikantní (p hodnota 0,0001–0,001), **** – extrémně signifikantní (p hodnota $< 0,0001$), lokalizace 1 – orofaryngeální oblast, lokalizace 2 – dutina ústní, zelené stínování – signifikantní výsledek

znak	HPV status		lokalizace	
	HPV ⁺	HPV ⁻	lokalizace 1	lokalizace 2
IDO1				
průměr	4,09	3,879	4,113	3,729
p hodnota	0,6442	ns	0,4247	ns
ARG1				
průměr	7,212	9,328	7,614	9,606
p hodnota	0,6493	ns	0,4996	ns
CD163				
průměr	1,589	2,958	1,922	2,995
p hodnota	0,0051	**	0,0407	*
NOS2				
průměr	8,676	7,585	8,234	7,899
p hodnota	0,0992	ns	0,5848	ns
PTGS2				
průměr	4,088	7,566	5,046	7,441
p hodnota	$< 0,0001$	****	0,0054	**



Obr. č. 38: Porovnání signifikantní změny exprese mRNA CD163 a PTGS2 v lokalizaci 1 a 2. chybová úsečka – střední chyba průměru, * – signifikantní (p hodnota 0,01–0,05), ** – velmi signifikantní (p hodnota 0,001–0,01), lokalizace 1 – orofaryngeální oblast, lokalizace 2 – dutina ústní

5.6 Korelace výsledků IHC a qPCR

Podle IHC analýzy jsem zaznamenala signifikantně (***, $p = 0,004$) více proteinu ARG1 u skupiny HPV⁻ vzorků, která měla i signifikantně vyšší podíl zastoupení makrofágů M2 CD68⁺ARG1⁺. Metoda qPCR také prokázala u HPV⁻ vzorků větší expresi ARG1 na úrovni mRNA, která však nebyla statisticky významná. Dále skupina HPV⁻ vzorků vykazovala signifikantně (**, $p = 0,0051$) vyšší expresi mRNA CD163. Vyšší exprese ARG1 a CD163, což jsou typické znaky makrofágů M2, u HPV⁻ vzorků souvisela se signifikantně vyšší expresí mRNA PTGS2 (****, $p < 0,0001$), znakem považovaným za charakteristický pro makrofágy M2. Podle qPCR byla exprese znaku NOS2, který je ve většině studií spojen s M1 fenotypem, nesignifikantně vyšší u skupiny HPV⁺ vzorků.

Signifikantně více buněk ARG1⁺ (*, $p = 0,0182$) a makrofágů M2 CD68⁺ARG1⁺ (**, $p = 0,0065$) bylo detekováno v nádorech dutiny ústní (lokalizace 2), kde byla zjištěna i vyšší exprese mRNA ARG1. V dutině ústní byla také zaznamenána signifikantně vyšší exprese mRNA CD163 (*, $p = 0,0407$) a mRNA PTGS2 (**, $p = 0,0054$). Rozdíl v zastoupení makrofágů M2 CD68⁺CD163⁺ v odlišných lokalizacích však nebyl zjištěn.

6 Diskuze

Ve své práci jsem prokázala na úrovni proteinové i genové exprese vyšší podíl M2 makrofágů u pacientů s HPV⁻ HNSCC. Dále jsem bez ohledu na fenotyp zjistila vyšší zastoupení makrofágů ve stromatu oproti oblasti nádoru.

Již v roce 1943 bylo prokázáno, že papilomatóza v dutině ústní u králíků je virové onemocnění spojené s papilomaviry (Parsons & Kidd, 1943). První spojení mezi infekcí HPV a karcinogenezí v dutině ústní lidí bylo publikováno až o 40 let později (Syrjänen *et al.*, 1983). Od začátku 21. století výzkum HPV v HNSCC značně pokročil a odhalil etiologickou roli HPV u karcinomů orofaryngeální lokalizace (Syrjänen *et al.*, 2017).

Na infekci HPV v HNSCC má vliv kromě lokalizace nádoru i imunitní prostředí a vzniklé nádorové mikroprostředí. Oblast nádorů, nejen HNSCC, je bohatá na různé typy buněk, především imunitní buňky, z nichž jsou v nádorovém mikroprostředí nejvíce abundantní TAM (Chen *et al.*, 2019). V posledních dekádách je intenzivně zkoumán vliv TAM v nádorovém mikroprostředí na prognózu pacientů, ale poznání vztahů znesnadňuje vysoká plasticita makrofágů. V závislosti na aktivačních signálech mají makrofágy duální vliv na nádor a při karcinogenezi představují opačné protipóly (Bertani *et al.*, 2017). Dva základní fenotypy makrofágů jsou protinádorový M1 a pronádorový M2 (Sica & Mantovani, 2012).

Ve své studii jsem se zaměřila na detekci makrofágů typu M1 a M2 pomocí multispektrální imunohistochemie a na analýzu exprese vybraných imunosupresivních a makrofágových genů metodou qPCR u dvou odlišných skupin nádorů HNSCC. Použila jsem klinické vzorky HNSCC virové a nevirové etiologie, které byly primárně vybrány na základě detekce proteinu p16, protože v klinické praxi existují dvě možnosti určení virové etiologie HNSCC, a to detekce mRNA *E6* HPV nebo detekce proteinu p16 a současně DNA HPV. Zvýšená exprese p16 však nemusí být vždy závislá na genové expresi HPV, protože v části případů (ve 41 % HNSCC (Smith *et al.*, 2008) a ve 26 % OPSCC (Lewis *et al.*, 2010)) nebyla u p16⁺ vzorků prokázána přítomnost DNA HPV (Wasylyk *et al.*, 2013). Proto jsem pro definitivní potvrzení virové etiologie nádorů prováděla detekci i HPV DNA a mRNA.

Spolehlivým potvrzením aktivní virové infekce je detekce mRNA onkogenu *E6* příslušného typu HPV. Tato metoda je nejen velmi citlivá, ale především vysoce specifická a je označována jako „zlatý standard“ (Wasylyk *et al.*, 2013). Limitací je kvalita klinického materiálu, kdy ne vždy je možné získat mRNA v dostatečné kvalitě. V mých materiálech se ale podařilo mRNA HPV získat v odpovídající kvalitě a detekci mRNA onkogenu *E6* HPV16 nebo HPV35 jsem tedy využila k definitivnímu určení HPV statusu vzorku. Z celkového počtu 55

vzorků bylo pomocí přítomnosti mRNA genu *E6* definováno 26 vzorků jako HPV⁺ a 29 vzorků jako HPV⁻. Detekce mRNA onkogenu *E6* korelovala s přítomností proteinu p16, pouze u jednoho HPV⁺ vzorku nebyla prokázána jeho přítomnost (ORL 412). Z 25 vzorků p16⁺ byl pouze jeden vzorek negativní na DNA HPV (ORL 406). Ve všech vzorcích pozitivních na DNA HPV (55 %) jsem detekovala typ HPV16, pouze ve dvou případech se jednalo o jiný typ HPV. U jednoho vzorku byla prokázána koinfekce s HPV53 a u druhého se jednalo o typ HPV35. Tyto výsledky potvrzují zjištění studií z naší laboratoře i jiných, že nejčastějším typem HPV u HNSCC v orofaryngeální oblasti je HPV16 (Gillison *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2003; Tachezy *et al.*, 2009).

HPV16, který je současně také celosvětově nejrozšířenějším typem u karcinomu děložního hrdla (Tsakogiannis *et al.*, 2015), byl detekován v 72 % a 92 % HPV DNA pozitivních případů OPSCC (D'Souza *et al.*, 2007; Tachezy *et al.*, 2009) a v 90 % (Gillison *et al.*, 2000) a v 94,7 % HPV DNA pozitivních případů HNSCC (Herrero *et al.*, 2003). Druhý nejčastější typ HPV u HNSCC i karcinomu děložního hrdla představuje HPV18 (Tsakogiannis *et al.*, 2015; Castellsagué *et al.*, 2016; Taberna *et al.*, 2017). Další typy HPV detekované v mé studii způsobují celosvětově pouze malou část HPV⁺ HNSCC, konkrétně HPV35 byl identifikován ve 4,5 % případů a HPV53 byl detekován pouze v 0,3 % (Tumban, 2019). V předchozích souborech pacientů z České republiky vyšetřených v naší laboratoři jsme tyto typy neidentifikovali (Koslabova *et al.*, 2013).

Mezi HPV⁻ pacienty jsem zjistila 26 kuřáků (90 %) v porovnání se skupinou HPV⁺ pacientů, ve které bylo jen 11 kuřáků (42 %), což odpovídá výsledkům dalších studií, které také identifikovaly signifikantně více kuřáků u HPV⁻ OPSCC (Rotnáglová *et al.*, 2011; Oguejiofor *et al.*, 2017). Dále bylo zjištěno, že HPV⁺ OPSCC se častěji vyskytovaly u mladších pacientů mužského pohlaví s minimální nebo žádnou expozicí tabáku. Tito pacienti měli lepší prognózu onemocnění (Dahlstrom *et al.*, 2013). Naopak HPV⁻ karcinomy s horší prognózou onemocnění byly ve větším počtu diagnostikovány u kuřáků (Windon *et al.*, 2020). Signifikantně horší prognóza onemocnění HNSCC byla zaznamenána u pacientů, kteří konzumují alkohol a tabák, i bez ohledu na etiologii HPV (Descamps *et al.*, 2016). Zároveň kouření zhoršuje prognózu u pacientů s HPV⁻ nádory (Rotnáglová *et al.*, 2011). Současně i studie Osazuwa-Peterse a kol. (2017) prokázala, že kouření v době diagnózy HNSCC je spojeno s nižším přežitím a pacienti kuřáci měli téměř dvakrát vyšší riziko úmrtí než nekuřáci. Incidence OPSCC je celosvětově 3–5× vyšší u mužů než u žen (Gillison *et al.*, 2015), což potvrdila i práce Schneidera a kol. (2018), ve které byli více reprezentováni muži (77 %) s mediánem věku v době diagnózy 60 let. V mém studovaném souboru vzorků jsem měla 43 mužů (78 %) a 12 žen (22 %), jejichž medián věku

byl 62 let. Výsledky korelují s ostatními studiemi z naší laboratoře, ve kterých bylo zahrnuto 84 % mužů a medián jejich věku se pohyboval v rozmezí 56-58 let (Rotnáglová *et al.*, 2011; Koslabova *et al.*, 2013).

Karcinogeneze asociovaná s HPV je silněji spojena s orofaryngeální oblastí, především s tkání patrových tonsil. U karcinomu orofaryngu netonsilárního původu, jako je např. karcinom měkkého patra, není HPV často detekován a tento karcinom je klinickými a patologickými charakteristikami více podobný karcinomu dutiny ústní (Gelwan *et al.*, 2017). Pacienti s HPV⁺ a HPV⁻ HNSCC se neliší pouze etiologií, ale i prognózou onemocnění (Gelwan *et al.*, 2017).

Rozdělení HPV statusu nádorů podle lokalizací je patrné i v mé práci, kde všechny HPV⁺ nádory pocházely z orofaryngeální oblasti (26 vzorků) a naopak většina HPV⁻ nádorů byla z dutiny ústní (20 vzorků) a jen část z orofaryngu, konkrétně z patrových tonzil (9 vzorků). Potvrdila jsem výsledky několika studií, ve kterých byla u OSCC zaznamenána pouze malá frakce nádorů způsobených HPV, a to v 5,9 %, 25 % a 28,3 % případů (Lingen *et al.*, 2013; Tachezy *et al.*, 2005; Zafereo *et al.*, 2016). Současně toto zjištění odpovídá všeobecnému trendu, že orofaryngeální nádory, které vznikají většinou v oblasti tonzil, mívají častěji HPV pozitivní status (Gillison *et al.*, 2000; Tachezy *et al.*, 2005; Gillison *et al.*, 2008).

Pozitivní HPV status byl validován jako příznivý prognostický marker u HNSCC (Koslabova *et al.*, 2013; Sivals *et al.*, 2017), zatímco u HPV⁻ OPSCC nádorů byla zjištěna horší prognóza onemocnění (Ang *et al.*, 2010). Lepší přežívání může souviset s imunitní odpovědí. V naší studii jsem v HNSCC metodou IHC detekovala dva základní typy makrofágů M1 a M2. K jejich detekci jsem použila panmakrofágový znak CD68, který je specifický pro buňky monocytární linie a je exprimován M1 i M2 makrofágy. Tento znak byl využit k detekci TAM u HNSCC (Ni *et al.*, 2015; Bagul *et al.*, 2016; Seminerio *et al.*, 2018), ale i u jiných typů nádorů, jako je např. karcinom prsu (Medrek *et al.*, 2012) a hepatocelulární karcinom (Zhou *et al.*, 2009).

K odlišení protinádorové populace M1 TAM jsem využila znak CD80, který slouží k aktivaci T lymfocytů skrze interakci CD28 na jejich povrchu (Ambarus *et al.*, 2012; Scarpa *et al.*, 2015). Znak CD80 není typický výhradně pro makrofágy a nachází se na povrchu různých typů imunitních buněk, jako jsou B lymfocyty, monocyty a DC. V mé práci jsem pozorovala, že protilátka proti CD80 výrazněji značila jiné buňky než makrofágy. K identifikaci M1 makrofágů při IHC analýze jsem proto využívala buňky s méně výrazným značením CD80, u kterých musela být zároveň zjištěna koexprese s CD68 (Greening *et al.*, 2018).

Pro M2 makrofágy je typická vysoká hladina exprese CD163 a CD206 (Ambarus *et al.*, 2012b). Ve studii Bertaniho a kol. (2017) byly M2 makrofágy charakterizovány vysokou

expresí CD206 a nepřítomností CD80 a naopak fenotyp M1 byl pozitivní pro znak CD80 s nízkou expresí CD206. Povrchový CD163 je běžně považován za marker polarizace makrofágů na typ M2 (Vogel *et al.*, 2014), jejímž ukazatelem je zároveň i produkce proteinu ARG1. Oba markery CD163 a ARG1 jsem využila k detekci M2 populace metodou IHC a definovala jsem dva fenotypy M2 makrofágů a to CD68⁺CD163⁺ a CD68⁺ARG1⁺. Zároveň jsem sledovala i značení ARG1 bez koexprese s CD68, které může být přítomno na nádorových buňkách exprimujících ARG1.

Na základě IHC analýzy panmakrofágového znaku CD68 jsem zjistila větší zastoupení CD68⁺ buněk ve stromatu v porovnání s oblastí nádoru a zároveň větší počet CD68⁺ buněk u HPV⁻ HNSCC nádorů oproti HPV⁺. Vyšší hustota makrofágů u pokročilých stádií nádorů HNSCC a zvýšená exprese CD68⁺ byla také spojena se špatnou prognózou těchto pacientů (Seminerio *et al.*, 2018). V literatuře byla u OSCC také detekována větší hustota CD68⁺ TAM ve stromatu, která zároveň korelovala s pokročilým stádiem nádoru a metastázemi v lymfatických uzlinách (Ni *et al.*, 2015). Podle Oguejiofora a kol. (2017) měly HPV⁻ OPSCC více CD68⁺ PD-L1⁺ makrofágů ve stromatu oproti HPV⁺ nádorům, což zde však bylo naopak spojeno se zlepšeným přežíváním pacientů. Některé studie neprokázaly signifikantní asociaci vyšší exprese CD68 s přežitím pacientů s OSCC (Nguyen *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2017).

Dále jsem pomocí IHC analýzy prokázala signifikantně více makrofágů typu M2 (dohromady oba fenotypy: CD68⁺CD163⁺ a CD68⁺ARG1⁺) ve stromatu a nesignifikantně více M2 u skupiny HPV⁻. Potvrdila jsem tak výsledky práce Oua a kol. (2019), která prokázala větší množství M2 makrofágů ve stromatu (větší poměr CD68⁺ CD163⁺ M2 makrofágů vůči CD68⁺ makrofágům) u HPV⁻ HNSCC. V cervikálním adenokarcinomu a kolorektálním karcinomu korelovalo větší zastoupení makrofágů M2 s horší prognózou onemocnění (Kawachi *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019). Vysoká infiltrace makrofágy M2 u kolorektálního karcinomu byla signifikantně spojena s kratším celkovým přežitím, naopak pozitivním prognostickým markerem pro tyto pacienty byla vysoká hustota CD68⁺ makrofágů (Zhao *et al.*, 2019). Také M2 makrofágy infiltrované v cervikálním adenokarcinomu predikovaly horší prognózu onemocnění a HPV⁺ nádory měly signifikantně vyšší hustotu intratumorálních lymfocytů než nádory HPV⁻ (Kawachi *et al.*, 2018).

Podle mých výsledků IHC bylo v nádorovém stromatu detekováno více CD68⁺ CD163⁺ pronádorových M2 makrofágů než v nádoru. Větší množství CD68⁺ a CD163⁺ TAM ve stromatu HNSCC zaznamenala i studie Balermpace a kol. (2014), ve které byla zvýšená hustota CD68⁺ a CD163⁺ buněk statisticky signifikantně spojena s horším přežíváním. Prognostická významnost TAM tedy závisí na oblasti HNSCC, ve které se TAM nacházejí.

Stejně výsledky zaznamenala i práce Troiana a kol. (2019), ve které vysoká exprese CD163⁺ TAM ve stromatu také korelovala s horším celkovým přežíváním pacientů HNSCC. Podobné výsledky byly zjištěny v recentní studii Yamamota a kol. (2020) při multiplexové IHC analýze nádorového mikroprostředí karcinomu jícnu, kde vysoká infiltrace CD163⁺ M2 makrofágů byla spojena s nepříznivým celkovým přežitím a se špatnou odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii těchto pacientů.

Nedávné studie prokázaly, že i nádorové buňky mohou exprimovat CD163 (Shabo *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018). Exprese CD163 je spojena se špatnou prognózou i u karcinomu prsu (Shabo *et al.*, 2008), u kterého infiltrace CD163⁺ makrofágů v nádorovém stromatu korelovala s pokročilým stádiem nádoru (Medrek *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2019). Vysoká exprese CD163 v nádorové tkáni korelovala s maligním klinicko-patologickým statusem uroteliálního karcinomu močového měchýře a pacienti s vysokou infiltrací CD163⁺ TAM vykazovali horší prognózu onemocnění (Xu *et al.*, 2018). U nižších stádií OSCC byly CD163⁺ M2 makrofágy detekovány ve stromatu a naopak v pokročilejších fázích onemocnění byl vyšší počet CD163⁺ makrofágů detekován v nádoru. S rostoucím patologickým stádiem OSCC se zvyšovalo procento CD163⁺ M2 makrofágů (Mori *et al.*, 2011). Moje výsledky naznačují, že přítomnost CD163 je důležitá při vzniku a vývoji HNSCC. Stejně výsledky byly prezentovány i v práci Hea a kol. (2014), kde CD68⁺ a CD163⁺ makrofágy ovlivňovaly progresi OSCC a exprese charakteristických znaků byla signifikantně spojena s agresivním chováním nádoru a metastázemi v lymfatických uzlinách. Fenotypizace v mé studii však byla přesnější, díky kombinování znaků a doplnění detekce exprese mRNA charakteristických makrofágových znaků. Ve stromatu jsem vždy detekovala více makrofágů než v oblasti nádoru. Pro budoucí analýzy je segmentace tkáně na nádor a stroma stěžejní a analýzy přežití by se měly provádět s ohledem na počet TAM v jednotlivých kategoriích.

Metodou qPCR jsem detekovala signifikantně zvýšenou expresi mRNA pro CD163 u HPV⁻ nádorů, které mají horší prognózu onemocnění (Ang *et al.*, 2010). Současně jsem IHC analýzou zjistila více CD163⁺ exprimujících makrofágů v nádorovém stromatu u HPV⁻ nádorů.

Na základě výsledků qPCR jsem zjistila, že zvýšená exprese CD163 u HPV⁻ nádorů podpořila zvýšenou expresi dalšího znaku M2 makrofágů, a to PTGS2 (podle dřívější nomenklatury označován v literatuře jako COX-2). Naopak snížená exprese mRNA pro PTGS2 byla prokázána u HPV⁺ HNSCC (Partlová *et al.*, 2015). Ve studii Leea a kol. (2019) IHC analýza prokázala korelaci exprese CD163 s expresí PTGS2, a VEGF. Vysoká exprese CD163 v této studii byla zjištěna u pacientů s pokročilým stádiem kožního melanomu a horším přežíváním. Exprese PTGS2 souvisela s častějším zasažením lymfatických uzlin. Na základě

pozorování korelace exprese CD163 s PTGS2 a VEGF Lee a kol. (2019) naznačují, že CD163⁺ TAM podporují vznik a růst nádoru širokým spektrem aktivit jako je angiogeneze, snížená prezentace antigenů a remodelace tkáně.

U HPV⁺ HNSCC jsem metodou qPCR určila nesignifikantně zvýšenou expresi mRNA pro IDO1. Signifikantně vyšší expresi genu *IDO1* u HPV⁻ OSCC prokázal Foy a kol. (2017) především u nekuřáků abstinentů. Vyšší hladina proteinu IDO1 v této studii korelovala s vyšším počtem intratumorálních T buněk. Tkáň karcinomu děložního hrdla, v porovnání s nemaligní tkání stejné lokalizace, vykazovala také signifikantně vyšší expresi mRNA a hladinu proteinu IDO1 (Qin *et al.*, 2017).

Kromě pozorované korelace exprese PTGS2 s CD163 (Lee *et al.*, 2019) byla zjištěna i souvislost exprese PTGS2 s IDO1 (Hennequart *et al.*, 2017). Exprese PTGS2 vedla v nádorových buňkách ke konstitutivní expresi mRNA pro IDO1. Vliv PTGS2 na expresi IDO1 následně potvrdilo použití inhibitorů PTGS2, které vedlo ke zlepšení účinnosti protinádorové imunoterapie v důsledku snížení konstitutivní exprese mRNA pro IDO1 (Hennequart *et al.*, 2017). Podle studie Göbela a kol. (2014) PTGS2 potlačuje antigenně specifickou protinádorovou imunitu a přispívá k imunitnímu úniku a k rezistenci vůči nádorové imunoterapii skrze lokální potlačení efektorových funkcí T buněk. Je prokázáno, že deregulace PTGS2 hraje roli v patogenezi kolorektálního karcinomu, kde ovlivňuje signalizaci onkogenů, angiogenezi, invazi a vznik metastáz a v neposlední řadě i přežití pacientů (Tsujii *et al.*, 1997; Kaidi *et al.*, 2006; Göbel *et al.*, 2014). Moje výsledky však korelaci exprese mRNA genu PTGS2 s IDO1 neukazují. Vyšší exprese mRNA pro PTGS2 u HPV⁻ nádorů, které mají horší prognózu onemocnění (Ang *et al.*, 2010), pravděpodobně potvrzuje pronádorové účinky PTGS2 a negativní efekt na patogenezi a prognózu HNSCC.

Analýzou IHC jsem u HPV⁻ HNSCC prokázala signifikantně více buněk s fenotypem ARG1 a fenotypem M2 makrofágů (CD68⁺ARG1⁺). Shodně s metodou IHC jsem také detekovala nesignifikantně vyšší expresi mRNA pro ARG1 u HPV⁻ skupiny HNSCC. Gen *ARG1* hraje klíčovou roli jako onkogen při progresi hepatocelulárního karcinomu, protože podporuje EMT a vznik metastáz (You *et al.*, 2018), a byl potvrzen jako marker k odlišení skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem s horší prognózou (Ma *et al.*, 2019). Zvýšená exprese mRNA pro CD163 a ARG1 byla detekována i v cervikálních lézích a byla spojena s vyšší hustotou infiltrace M2 makrofágy ve stromatu a peritumorální oblasti (Swangphon *et al.*, 2017). Vysoká hladina ARG1 byla popsána také u pacientů s rakovinou tlustého střeva, plic (Süer Gökmen *et al.*, 1999) a prsu (Singh *et al.*, 2000). Vyšší hladina proteinu ARG1 byla

detekována i u adenokarcinomu žaludku, kde ARG1 pocházela převážně z nádorových buněk a byla přítomna v cytoplazmě a ne v jádře buňky (Wu *et al.*, 1996).

Ve studii nemalobuněčného karcinomu plic Rodriguez a kol. (2004) zjistili, že makrofágy stimulované IL-4 a IL-13 produkují ARG1, což vedlo ke snížené expresi receptoru T buněk. Produkce ARG1 maturovanými myeloidními buňkami v nádorovém mikroprostředí sloužila jako centrální mechanismus úniku nádoru imunitnímu dozoru. U karcinomu plic může být ARG1 indukována pomocí PTGS2 a naopak inhibice exprese PTGS2 vede k blokování exprese ARG1 (Rodriguez *et al.*, 2005). Obdobně inhibice PTGS2 snižuje konstitutivní expresi IDO1 (Hennequart *et al.*, 2017). V mé práci je korelace PTGS2, jehož exprese byla signifikantně zvýšena u HPV⁻ nádorů, s ARG1 naznačena jen částečně, protože rozdíl v expresi ARG1 mezi skupinami nádorů virové a nevirové etiologie nebyl signifikantní.

Dalším sledovaným znakem byl enzym NOS2. Bertani a kol. (2017) zjistili, že makrofágy M1 vykazovaly nižší poměr ARG1/NOS2 v porovnání s M2 makrofágy, tzn. M1 měly více NOS2 než ARG1 a enzym NOS2 byl spojen s fenotypem M1 makrofágů. Ve své práci jsem detekovala nesignifikantně vyšší expresi NOS2 u HPV⁺. Společně s vyšší expresí ARG1 u HPV⁻ HNSCC moje výsledky naznačují, že NOS2 je znakem M1 makrofágů.

7 Souhrn

Ve své diplomové práci jsem izolovala nukleové kyseliny z nádorů hlavy a krku virové a nevirové etiologie. Stanovila jsem přítomnost DNA HPV ve vzorcích, určila konkrétní genotyp HPV a následně ověřila aktivní virovou infekci. Detekovala jsem odlišné populace TAM v nádorech hlavy a krku virové i nevirové etiologie a jednotlivé populace lokalizovala a kvantifikovala v nádorovém mikroprostředí pomocí metody multispektrální imunohistochemie, kterou jsem optimalizovala pro analýzu vybraného souboru vzorků. Metodou RT-qPCR jsem analyzovala expresi vybraných genů, které souvisí s přítomností TAM v nádoru a/nebo s jeho imunosupresivním mikroprostředím. Na závěr jsem korelovala zastoupení fenotypů TAM s etiologií nádoru.

Potvrdila jsem hypotézu: „U HPV negativních HNSCC detekujeme větší množství TAM typu M2 a zároveň i vyšší expresi imunosupresivních a makrofágových znaků v porovnání s HPV pozitivními nádory stejné lokalizace.“ HPV⁻ nádory byly infiltrovány větším počtem M2 makrofágů, které byly charakterizované signifikantně vyšší expresí mRNA pro CD163 a mRNA pro PTGS2 a současně přítomností většího množství proteinu ARG1 detekovaného imunohistochemicky. Dále jsem ve své práci potvrdila již dříve pozorovanou skutečnost, že v oblasti orofaryngu vznikají převážně nádory asociované s HPV. Současně jsem ukázala, že bez ohledu na etiologii studovaných nádorů byl vyšší počet makrofágů vždy detekován ve stromatu. Moje výsledky naznačují, že přítomnost CD163, ARG1 a PTGS2 je důležitá při progresi nádorů hlavy a krku nevirové etiologie.

Výzkum nádorového prostředí u HNSCC se v posledních letech velmi zintenzivňuje ve snaze definovat nové terapeutické a diagnostické cíle a přístupy. Velmi málo prací však dosud využilo komplexních přístupů (více znaků pro fenotypizaci buněk, větší spektrum detekce exprimovaných genů souvisejících s různými populacemi TAM) a zároveň s přesnou definicí lokalizace nádorů a jejich etiologie. Moje práce tak rozšiřuje stávající poznání o funkci TAM u nádorů hlavy a krku.

8 Seznam použité literatury

- Adel, M., Kao, H.-K., Hsu, C.-L., Huang, J.-J., Lee, L.-Y., Huang, Y., Browne, T., Tsang, N.-M., Chang, Y.-L. & Chang, K.-P. (2015). Evaluation of Lymphatic and Vascular Invasion in Relation to Clinicopathological Factors and Treatment Outcome in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore)* **94**, e1510.
- Alexander, K. A. & Giuliano, A. R. (2012). HPV—Beyond Cervical Cancer (Online Resource Center). *Am J Med* **125**, S1.
- *Alves, A. M., Diel, L. F. & Lamers, M. L. (2018). Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med* **47**, 460–467.
- Ambarus, C. A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T. R. D. J., Reedquist, K. A., Tak, P. P. & Baeten, D. L. P. (2012a). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* **375**, 196–206.
- Ambarus, C. A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T. R. D. J., Reedquist, K. A., Tak, P. P. & Baeten, D. L. P. (2012b). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* **375**, 196–206.
- American Cancer Society. (2020). Cancer Facts & Figures 2020. *CA Cancer J Clin* 1–76.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**, 5245–50.
- Anderson, C. F. & Mosser, D. M. (2002). A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol* **72**, 101–106.
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C. & other authors. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **363**, 24–35.
- Anzai, A., Anzai, T., Nagai, S., Maekawa, Y., Naito, K., Kaneko, H., Sugano, Y., Takahashi, T., Abe, H. & other authors. (2012). Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* **125**, 1234–1245.
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J. & Bray, F. (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Heal* **8**, e191–e203.
- Argiris, A. & Eng, C. (2003). Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res* **114**, 15–60.
- *Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. & Ferris, R. L. (2008). Head and neck cancer. *Lancet* **371**, 1695–1709.
- Asai, A., Nakamura, K., Kobayashi, M., Herndon, D. N. & Suzuki, F. (2012). CCL1 released from M2b macrophages is essentially required for the maintenance of their properties. *J Leukoc Biol* **92**, 859–867.
- Ashrafi, G. H., Haghshenas, M., Marchetti, B. & Campo, M. S. (2006). E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* **119**, 2105–2112.
- Bagul, N., Roy, S., Ganjre, A., Kathariya, R., Meher, A. & Singh, P. (2016). Quantitative Assessment of Tumor Associated Macrophages in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Using CD68 Marker: An Immunohistochemical Study. *J Clin Diagn Res* **10**, ZC81–ZC84.
- Balermipas, P., Rödel, F., Liberz, R., Oppermann, J., Wagenblast, J., Ghanaati, S., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Weiss, C. & other authors. (2014). Head and neck cancer relapse after chemoradiotherapy correlates with CD163+ macrophages in primary tumour and CD11b+ myeloid cells in recurrences. *Br J Cancer* **111**, 1509–1518.
- Barros, M. R., de Melo, C. M. L., Barros, M. L. C. M. G., de Cássia Pereira de Lima, R., de Freitas, A. C. & Venuti, A. (2018). Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *J Exp Clin Cancer Res* **37**, 137.
- *Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Vadasz, Z., Toubi, E. & Giacomelli, R. (2019). Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **18**, 102369.
- Bertani, F. R., Mozetic, P., Fioramonti, M., Iuliani, M., Ribelli, G., Pantano, F., Santini, D., Tonini, G., Trombetta, M. & other authors. (2017). Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep* **7**, 8965.
- *Biswas, S. K. & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889–896.
- *Biswas, S. K. & Mantovani, A. (2012). Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab* **15**, 432–437.
- Blank, C. & Mackensen, A. (2007). Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: An update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 739–745.

- Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Susan, S., Preston, M., Bernstein, L., Schoenberg, J. B. & other authors. (1988). Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res* **48**, 3282–3287.
- Boffetta, P., Mashberg, A., Winkelmann, R. & Garfinkel, L. (1992). Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* **52**, 530–533.
- Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H. G. & other authors. (2006). Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* **12**, 1144–1151.
- Bravo, I. G. & Alonso, A. (2004). Mucosal Human Papillomaviruses Encode Four Different E5 Proteins Whose Chemistry and Phylogeny Correlate with Malignant or Benign Growth. *J Virol* **78**, 13613–13626.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424.
- Brennan, P. A., Palacios-Callender, M., Zaki, G. A., Spedding, A. V. & Langdon, J. D. (2001). Type II nitric oxide synthase (NOS2) expression correlates with lymph node status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **30**, 129–134.
- *Bronte, V. & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* **5**, 641–654.
- Van den Brule, A. J. C., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. L. M. & Snijders, P. J. F. (2002). GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**, 779–787.
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., Bosch, F. & de Sanjosé, S. (2019). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World - Summary Report. *ICO/IARC HPV Inf Cent* 1–315.
- Cardoso, A. P., Pinto, M. L., Pinto, A. T., Oliveira, M. I., Pinto, M. T., Gonçalves, R., Relvas, J. B., Figueiredo, C., Seruca, R. & other authors. (2014). Macrophages stimulate gastric and colorectal cancer invasion through EGFR Y1086, c-Src, Erk1/2 and Akt phosphorylation and smallGTPase activity. *Oncogene* **33**, 2123–2133.
- Carlin, J. M., Borden, E. C., Sondel, P. M. & Byrne, G. I. (1989). Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* **45**, 29–34.
- Castellsagué, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quirós, B., Tous, S., Clavero, O., Alòs, L., Biegner, T. & other authors. (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* **108**, djv403.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M. & other authors. (2011). Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *J Clin Oncol* **29**, 4294–4301.
- Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Curado, M. P., Ferlay, J., Franceschi, S., Rosenberg, P. S., Bray, F. & Gillison, M. L. (2013). Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *J Clin Oncol* **31**, 4550–4559.
- Chen, B. D., Clark, C. R. & Chou, T. H. (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **71**, 997–1002.
- *Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H. & Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci* **26**, 78.
- Cho, K. Y., Miyoshi, H., Kuroda, S., Yasuda, H., Kamiyama, K., Nakagawara, J., Takigami, M., Kondo, T. & Atsumi, T. (2013). The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **22**, 910–918.
- Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C. & other authors. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563.
- Concha-Benavente, F., Srivastava, R. M., Trivedi, S., Lei, Y., Chandran, U., Seethala, R. R., Freeman, G. J. & Ferris, R. L. (2016). Identification of the cell-intrinsic and -extrinsic pathways downstream of EGFR and IFN γ that induce PD-L1 expression in head and neck Cancer. *Cancer Res* **76**, 1031–1043.
- *Corliss, B. A., Azimi, M. S., Munson, J. M., Peirce, S. M. & Murfee, W. L. (2016). Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation* **23**, 95–121.
- Cunha, L. L., Marcello, M. A., Nonogaki, S., Morari, E. C., Soares, F. A., Vassallo, J. & Ward, L. S. (2015). CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and COX2 expression may predict relapse in differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* **83**, 246–253.
- D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H. & Gillison, M. L. (2007). Prevalence and clinical significance of human papillomavirus in oral cancer: the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence and Prevalence in Oral Cancer Study. *J Clin Oncol* **25**, 3901–3908.

- M. L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**, 1944–1956.
- Dahlstrom, K. R., Calzada, G., Hanby, J. D., Garden, A. S., Glisson, B. S., Li, G., Roberts, D. B., Weber, R. S. & Sturgis, E. M. (2013). An evolution in demographics, treatment, and outcomes of oropharyngeal cancer at a major cancer center: A staging system in need of repair. *Cancer* **119**, 81–89.
- Davy, C. E., Jackson, D. J., Wang, Q., Raj, K., Masterson, P. J., Fenner, N. F., Southern, S., Cuthill, S., Millar, J. B. A. & Doorbar, J. (2002). Identification of a G2 Arrest Domain in the E1/E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J Virol* **76**, 9806–9818.
- Deng, Z., Hasegawa, M., Aoki, K., Matayoshi, S., Kiyuna, A., Yamashita, Y., Uehara, T., Akena, S., Maeda, H. & other authors. (2014). A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **45**, 67–76.
- Descamps, G., Karaca, Y., Lechien, J. R., Kindt, N., Decaestecker, C., Rimmelink, M., Larsimont, D., Andry, G., Hassid, S. & other authors. (2016). Classical risk factors, but not HPV status, predict survival after chemoradiotherapy in advanced head and neck cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **142**, 2185–2196.
- Dhar, P. K., Rao, T. R., Sreekumaran Nair, N., Mohan, S., Chandra, S., Bhat, K. R. & Rao, K. (2000). Identification of risk factors for specific subsites within the oral and oropharyngeal region—a study of 647 cancer patients. *Indian J Cancer* **37**, 114–122.
- DiMaio, D., Guralski, D. & Schiller, J. T. (1986). Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc Natl Acad Sci* **83**, 1797–1801.
- Doedens, A. L., Stockmann, C., Rubinstein, M. P., Liao, D., Zhang, N., DeNardo, D. G., Coussens, L. M., Karin, M., Goldrath, A. W. & Johnson, R. S. (2010). Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 α suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res* **70**, 7465–7475.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824–827.
- Van Doorslaer, K., Li, Z., Xirasagar, S., Maes, P., Kaminsky, D., Liou, D., Sun, Q., Kaur, R., Huyen, Y. & McBride, A. A. (2017). The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res* **45**, D499–D506.
- Van Doorslaer, K., Li, Z., Xirasagar, S., Maes, P., Kaminsky, D., Liou, D., Sun, Q., Kaur, R., Huyen, Y. & McBride, A. A. (2020). PaVE: Papilloma virus genome database [cit. 19.7.2020]. [online] Dostupné z https://pave.niaid.nih.gov/#explore/reference_genomes/human_genomes.
- Doyle, A. G., Herbein, G., Montaner, L. J., Minty, A. J., Caput, D., Ferrara, P. & Gordon, S. (1994). Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon- γ . *Eur J Immunol* **24**, 1441–1445.
- *Duray, A., Demoulin, S., Hubert, P., Delvenne, P. & Saussez, S. (2010). Immune Suppression in Head and Neck Cancers: A Review. *Clin Dev Immunol* **2010**, 701657.
- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & Zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3812–3815.
- Edin, S., Wikberg, M. L., Rutegård, J., Oldenberg, P.-A. & Palmqvist, R. (2013). Phenotypic Skewing of Macrophages In Vitro by Secreted Factors from Colorectal Cancer Cells. *PLoS One* **8**, e74982.
- Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. & Mosser, D. M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* **80**, 1298–1307.
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Rubin Grandis, J., Takata, T., Slootweg, P. J. & International Agency for Research on Cancer. (2017). *WHO classification of head and neck tumours*, 4th edn.
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. & McMillan, N. A. (1997). Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**, 2449–2456.
- *Fabrick, B. O., Dijkstra, C. D. & van den Berg, T. K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* **210**, 153–160.
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A. & Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **100**, 261–269.
- Fang, J., Li, X., Ma, D., Liu, X., Chen, Y., Wang, Y., Lui, V. W. Y., Xia, J., Cheng, B. & Wang, Z. (2017). Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **17**, 375.
- Fischer-Posovszky, P., Wang, Q. A., Asterholm, I. W., Rutkowski, J. M. & Scherer, P. E. (2011). Targeted deletion of adipocytes by apoptosis leads to adipose tissue recruitment of alternatively activated M2 macrophages. *Endocrinology* **152**, 3074–3081.

- Foy, J. P., Bertolus, C., Michallet, M. C., Deneuve, S., Incitti, R., Bendriss-Vermare, N., Albaret, M. A., Ortiz-Cuaran, S., Thomas, E. & other authors. (2017). The immune microenvironment of HPV-negative oral squamous cell carcinoma from never-smokers and never-drinkers patients suggests higher clinical benefit of IDO1 and PD1/PD-L1 blockade. *Ann Oncol* **28**, 1934–1941.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U. & Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* **196**, 459–468.
- van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G. & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* **46**, 845–852.
- van Furth, R. & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **128**, 415–435.
- *Galdiero, M. R., Garlanda, C., Jaillon, S., Marone, G. & Mantovani, A. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol* **228**, 1404–1412.
- Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Storchi, I., Vergari, W. A. & Ziche, M. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* **90**, 587–596.
- Ganster, R. W., Taylor, B. S., Shao, L. & Geller, D. A. (2001). Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8638–8643.
- Gao, G., Chernock, R. D., Gay, H. A., Thorstad, W. L., Zhang, T. R., Wang, H., Ma, X. J., Luo, Y., Lewis, J. S. & Wang, X. (2012). A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis. *Int J Cancer* **132**, 882–890.
- Gelwan, E., Malm, I. J., Khararjian, A., Fakhry, C., Bishop, J. A. & Westra, W. H. (2017). Nonuniform Distribution of High-risk Human Papillomavirus in Squamous Cell Carcinomas of the Oropharynx: Rethinking the Anatomic Boundaries of Oral and Oropharyngeal Carcinoma from an Oncologic HPV Perspective. *Am J Surg Pathol* **41**, 1722–1728.
- Georgopoulos, N. T., Proffitt, J. L. & Blair, G. E. (2000). Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 4930–4935.
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M. & other authors. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **92**, 709–720.
- Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S. & Viscidi, R. (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **100**, 407–420.
- *Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F. & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* **33**, 3235–3242.
- Göbel, C., Breitenbuecher, F., Kalkavan, H., Hähnel, P. S., Kasper, S., Hoffarth, S., Merches, K., Schild, H., Lang, K. S. & Schuler, M. (2014). Functional expression cloning identifies COX-2 as a suppressor of antigen-specific cancer immunity. *Cell Death Dis* **5**, e1568.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M. F. & other authors. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551.
- Gordon, S. (1998). The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* **149**, 685–688.
- *Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. *Clin Sci* **131**, 2201–2221.
- Greening, G., Bess, S. & Muldoon, T. (2018). Immunohistochemistry Staining for Tumor-associated Macrophage Polarization in Murine Subcutaneous Colon Tumor Allografts. *BIO-PROTOCOL* **8**, 1–16.
- Guess, J. C. & McCance, D. J. (2005). Decreased Migration of Langerhans Precursor-Like Cells in Response to Human Keratinocytes Expressing Human Papillomavirus Type 16 E6/E7 Is Related to Reduced Macrophage Inflammatory Protein-3 α Production. *J Virol* **79**, 14852–14862.
- Guha, N., Warnakulasuriya, S., Vlaanderen, J. & Straif, K. (2014). Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: A meta-analysis with implications for cancer control. *Int J Cancer* **135**, 1433–1443.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* **210**, 1977–1992.
- Gwak, J. M., Jang, M. H., Kim, D. I., Seo, A. N. & Park, S. Y. (2015). Prognostic Value of Tumor-Associated Macrophages According to Histologic Locations and Hormone Receptor Status in Breast Cancer. *PLoS One* **10**, e0125728.

- *Hammer, A., Rositch, A., Qeadan, F., Gravitt, P. E. & Blaakaer, J. (2016). Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* **138**, 2795–2803.
- Hasan, U. A., Zannetti, C., Parroche, P., Goutagny, N., Malfroy, M., Roblot, G., Carreira, C., Hussain, I., Müller, M. & other authors. (2013). The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* **210**, 1369–1387.
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Maso, L. D., Daudt, A. W., Fabianova, E. & other authors. (2007). Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI J Natl Cancer Inst* **99**, 777–789.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J. & other authors. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804.
- He, K.-F., Zhang, L., Huang, C.-F., Ma, S.-R., Wang, Y.-F., Wang, W.-M., Zhao, Z.-L., Liu, B., Zhao, Y.-F. & other authors. (2014). CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* **2014**, 838632.
- Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., De Plaen, E. & Van Den Eynde, B. J. (2017). Constitutive IDO1 expression in human tumors is driven by cyclooxygenase-2 and mediates intrinsic immune resistance. *Cancer Immunol Res* **5**, 695–709.
- Herrero, R., Castellsagué, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B. & other authors. (2003). Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1772–1783.
- Van den Heuvel, M. M., Tensen, C. P., Van As, J. H., Van den Berg, T. K., Fluitsma, D. M., Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Droste, A., Van Gaalen, F. A. & other authors. (1999). Regulation of CD163 on human macrophages: Cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* **66**, 858–866.
- Hissong, B. D., Byrne, G. I., Padilla, M. L. & Carlin, J. M. (1995). Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1. *Cell Immunol* **160**, 264–269.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. & Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv Bioinformatics* **2008**, 420747.
- Hu, Y., He, M.-Y., Zhu, L.-F., Yang, C.-C., Zhou, M.-L., Wang, Q., Zhang, W., Zheng, Y.-Y., Wang, D.-M. & other authors. (2016). Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 12.
- Huang, Q., Lan, F., Wang, X., Yu, Y., Ouyang, X., Zheng, F., Han, J., Lin, Y., Xie, Y. & other authors. (2014). IL-1 β -induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9. *Mol Cancer* **13**, 18.
- Hudelist, G., Manavi, M., Pischinger, K. I. D., Watkins-Riedel, T., Singer, C. F., Kubista, E. & Czerwenka, K. F. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: Different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* **92**, 873–880.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* **10**, 4129–4135.
- Hwang, S. G., Lee, D., Kim, J., Seo, T. & Choe, J. (2002). Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem* **277**, 2923–2930.
- Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W. & Young, H. A. (2000). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *J Immunol* **164**, 3596–3599.
- IARC. (1995). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. Hum Papillomaviruses.*
- *IARC. (2012). *A review of human carcinogens. Biological agents. Int Agency Res Cancer.*
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O., Schroeder, A. & Auffray, C. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* **33**, 1–12.
- Inaba, T., Ino, K., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kondo, S., Umez, T., Nawa, A., Takikawa, O. & Kikkawa, F. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* **117**, 423–428.
- Ito, I., Bhopale, K. K., Nishiguchi, T., Lee, J. O., Herndon, D. N., Suzuki, S., Sowers, L. C., Suzuki, F. & Kobayashi, M. (2016). The Polarization of M2b Monocytes in Cultures of Burn Patient Peripheral CD14 +

Cells Treated with a Selected Human CCL1 Antisense Oligodeoxynucleotide. *Nucleic Acid Ther* **26**, 269–276.

- Jeong, H., Hwang, I., Kang, S. H., Shin, H. C. & Kwon, S. Y. (2019).** Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer* **22**, 38–51.
- Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M. J., Post, M. J., De Winther, M. P. J. & Donners, M. M. P. C. (2014).** Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118.
- Joseph, C., Alsaleem, M., Orah, N., Narasimha, P. L., Miligy, I. M., Kurozumi, S., Ellis, I. O., Mongan, N. P., Green, A. R. & Rakha, E. A. (2020).** Elevated MMP9 expression in breast cancer is a predictor of shorter patient survival. *Breast Cancer Res Treat* **182**, 267–282.
- Josephs, D. H., Bax, H. J. & Karagiannis, S. N. (2015).** Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy Development , Growth and Metastasis Activity to Target Tumour Cells 6 . Targeting TAMs as an Immunotherapeutic Strategy for Cancer Antibodies Macrophages In vitro and In vivo 2. *Front Biosci* **7**, 334–351.
- Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, A. C. & Paraskeva, C. (2006).** Direct Transcriptional Up-regulation of Cyclooxygenase-2 by Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Promotes Colorectal Tumor Cell Survival and Enhances HIF-1 Transcriptional Activity during Hypoxia. *Cancer Res* **66**, 6683–6691.
- Kamimura, D., Ishihara, K. & Hirano, T. (2003).** IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. In *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, pp. 1–38.
- Karnevi, E., Andersson, R. & Rosendahl, A. H. (2014).** Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol* **92**, 543–552.
- Kawachi, A., Yoshida, H., Kitano, S., Ino, Y., Kato, T. & Hiraoka, N. (2018).** Tumor-associated CD204+ M2 macrophages are unfavorable prognostic indicators in uterine cervical adenocarcinoma. *Cancer Sci* **109**, 863–870.
- Kawamura, K., Komohara, Y., Takaishi, K., Katabuchi, H. & Takeya, M. (2009).** Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int* **59**, 300–305.
- Kodelja, V., Müller, C., Tenorio, S., Schebesch, C., Orfanos, C. E. & Goerdts, S. (1997).** Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. *Immunobiology* **197**, 478–493.
- Koslabova, E., Hamsikova, E., Salakova, M., Klozar, J., Foltynova, E., Salkova, E., Rotnaglova, E., Ludvikova, V. & Tachezy, R. (2013).** Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer* **133**, 1832–1839.
- Koss, L. G. & Durfee, G. R. (1956).** Unusual Patterns Of Squamous Epithelium Of The Uterine Cervix: Cytologic And Pathologic Study Of Koilocytotic Atypia. *Ann N Y Acad Sci* **63**, 1245–1261.
- Krishna, S., Ulrich, P., Wilson, E., Parikh, F., Narang, P., Yang, S., Read, A. K., Kim-Schulze, S., Park, J. G. & other authors. (2018).** Human papilloma virus specific immunogenicity and dysfunction of CD8+ T cells in head and neck cancer. *Cancer Res* **78**, 6159–6170.
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K. A. & Moestrup, S. K. (2001).** Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198–201.
- Kross, K. W., Heimdahl, J. H., Olsnes, C., Olofson, J. & Aarstad, H. J. (2007).** Tumour-associated macrophages secrete IL-6 and MCP-1 in head and neck squamous cell carcinoma tissue. *Acta Otolaryngol* **127**, 532–539.
- *Kupper, T. S. & Fuhlbrigge, R. C. (2004).** Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* **4**, 211–222.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C. J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B. & other authors. (2009).** IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. *J Immunol* **183**, 6469–6477.
- Lane, D. P. (1992).** p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16.
- Lechner, M. S. & Laimins, L. A. (1994).** Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* **68**, 4262–4273.
- Lee, W. J., Lee, M. H., Kim, H. T., Won, C. H., Lee, M. W., Choi, J. H. & Chang, S. E. (2019).** Prognostic significance of CD163 expression and its correlation with cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **29**, 501–509.
- van Leeuwen, M. T., Grulich, A. E., McDonald, S. P., McCredie, M. R. E., Amin, J., Stewart, J. H., Webster, A. C., Chapman, J. R. & Vajdic, C. M. (2009).** Immunosuppression and Other Risk Factors for Lip Cancer after Kidney Transplantation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 561–569.
- Legrand, C., Gilles, C., Zahm, J.-M., Polette, M., Buisson, A.-C., Kaplan, H., Birembaut, P. & Tournier, J.-M. (1999).** Airway Epithelial Cell Migration Dynamics: MMP-9 Role in Cell–Extracellular Matrix Remodeling. *J Cell Biol* **146**, 517–529.
- Lehoux, M., D'Abramo, C. M. & Archambault, J. (2009).** Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics* **12**, 268–280.

- Levi, F., Pasche, C., La Vecchia, C., Lucchini, F., Franceschi, S. & Monnier, P. (1998). Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* **77**, 705–709.
- Lewis, J. S., Thorstad, W. L., Chernock, R. D., Haughey, B. H., Yip, J. H., Zhang, Q. & El-Mofty, S. K. (2010). p16 Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: An Entity With a Favorable Prognosis Regardless of Tumor HPV Status. *Am J Surg Pathol* **34**, 1088–1096.
- Li, A. C. Y., Warnakulasuriya, S. & Thompson, R. P. H. (2003). Neoplasia of the tongue in a patient with Crohn's disease treated with azathioprine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **15**, 185–187.
- Li, H., Yang, B., Huang, J., Lin, Y., Xiang, T., Wan, J., Li, H., Chouaib, S. & Ren, G. (2015). Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes breast cancer cell survival by triggering a positive-feedback loop between macrophages and cancer cells. *Oncotarget* **6**, 29637–29650.
- Li, T. J. & Cui, J. (2013). COX-2, MMP-7 expression in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Trop Med* **6**, 640–643.
- Li, Y., Nichols, M. A., Shay, J. W. & Xione, Y. (1994). Transcriptional Repression of the D-Type Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p16. *Cancer Res* **54**, 6078–6082.
- Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. & Pollard, J. W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* **193**, 727–739.
- Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N. & Pollard, J. W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* **66**, 11238–11246.
- Lingen, M. W., Xiao, W., Schmitt, A., Jiang, B., Pickard, R., Kreinbrink, P., Perez-Ordóñez, B., Jordan, R. C. & Gillison, M. L. (2013). Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* **49**, 1–8.
- Liu, G., Yin, L., Ouyang, X., Zeng, K., Xiao, Y. & Li, Y. (2020). M2 Macrophages Promote HCC Cells Invasion and Migration via miR-149-5p/MMP9 Signaling. *J Cancer* **11**, 1277–1287.
- Liu, Y. & Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* **30**, 668–681.
- Ma, C., Horlad, H., Ohnishi, K., Nakagawa, T., Yamada, S., Kitada, S., Motoshima, T., Kamba, T., Nakayama, T. & other authors. (2018). CD163-positive cancer cells are potentially associated with high malignant potential in clear cell renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol* **51**, 13–20.
- Ma, Z., Lian, J., Yang, M., Wuyang, J., Zhao, C., Chen, W., Liu, C., Zhao, Q., Lou, C. & other authors. (2019). Overexpression of Arginase-1 is an indicator of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Pathol - Res Pract* **215**, 152383.
- Manchester, K. L. (1996). Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques* **20**, 968–970.
- Mantovani, A. & Locati, M. (2013). Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 1478–1483.
- *Mantovani, A. & Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* **22**, 231–237.
- *Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S. & Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* **13**, 265–270.
- *Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677–686.
- Martinez-Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., Cousido-Siah, A., Masson, M., Pol, S. Vande & other authors. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* **529**, 541–545.
- Mason, D. Y., Micklem, K. & Jones, M. (2000). Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. *J Pathol* **191**, 452–461.
- Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C. & Oppenheim, J. J. (1989). Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* **169**, 1485–1490.
- Matthews, K., Leong, C. M., Baxter, L., Inglis, E., Yun, K., Bäckström, B. T., Doorbar, J. & Hibma, M. (2003). Depletion of Langerhans Cells in Human Papillomavirus Type 16-Infected Skin Is Associated with E6-Mediated Down Regulation of E-Cadherin. *J Virol* **77**, 8378–8385.
- Medrek, C., Pontén, F., Jirstrom, K. & Leandersson, K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **12**, 306.
- Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M. & Munn, D. H. (2003). Cutting Edge: Induced Indoleamine 2,3 Dioxygenase Expression in Dendritic Cell Subsets Suppresses T Cell Clonal Expansion. *J Immunol* **171**, 1652–1655.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol* **164**, 6166–6173.
- Mizutani, K., Sud, S., McGregor, N. A., Martinovski, G., Rice, B. T., Craig, M. J., Varsos, Z. S., Roca, H. &

- Pienta, K. J. (2009).** The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia* **11**, 1235–1242.
- Momen-Heravi, F. & Dubey, S. K. (2020).** Arginase-1 production by myeloid cells in tumor microenvironment induce inflammasome activation and activate PI3K pathway in tumor-associated macrophages in head and neck cancer. *J Immunol* **204**, 164.20.
- *Moody, C. A. & Laimins, L. A. (2010).** Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**, 550–560.
- Mori, K., Hiroi, M., Shimada, J. & Ohmori, Y. (2011).** Infiltration of M2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. *Cancers (Basel)* **3**, 3726–3739.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A. J., Kouzarides, T. & Hagemeier, C. (1997).** An E2F-like repressor of transcription [9]. *Nature* **390**, 567–568.
- Mozet, C., Marin, D. G., Bertolini, J., Tannapfel, A., Wichmann, G. & Dietz, A. (2009).** Nitric Oxide Synthase (NOS2/3) Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in Correlation with Clinical Patterns. *Onkologie* **32**, 655–660.
- Multhaupt, H., Fritz, P. & Schumacher, K. (1987).** Immunohistochemical localisation of arginase in human liver using monoclonal antibodies against human liver arginase. *Histochemistry* **87**, 465–470.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A. & Mellor, A. L. (1999).** Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* **189**, 1363–1372.
- *Munn, L. L. (2017).** Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **9**, e1370.
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B. & other authors. (2014).** Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20.
- Nakanishi, Y., Nakatsuji, M., Seno, H., Ishizu, S., Akitake-Kawano, R., Kanda, K., Ueo, T., Komekado, H., Kawada, M. & other authors. (2011).** COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. *Carcinogenesis* **32**, 1333–1339.
- Nelson, L. M., Rose, R. C. & Moroianu, J. (2002).** Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* **277**, 23958–23964.
- Nguyen, N., Bellile, E., Thomas, D., McHugh, J., Rozek, L., Virani, S., Peterson, L., Carey, T. E., Walline, H. & other authors. (2016).** Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **38**, 1074–1084.
- Ni, Y. H., Ding, L., Huang, X. F., Dong, Y. chun, Hu, Q. G. & Hou, Y. Y. (2015).** Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Tumor Biol* **36**, 5291–5298.
- Oguejiofor, K., Galletta-Williams, H., Dovedi, S. J., Roberts, D. L., Stern, P. L. & West, C. M. L. (2017).** Distinct patterns of infiltrating CD8+ T cells in HPV+ and CD68 macrophages in HPV- oropharyngeal squamous cell carcinomas are associated with better clinical outcome but PD-L1 expression is not prognostic. *Oncotarget* **8**, 14416–14427.
- Olshan, A. F. (2010).** *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer*. Springer Science & Business Media.
- Osazuwa-Peters, N., Adjei Boakye, E., Chen, B. Y., Tobo, B. B. & Varvares, M. A. (2017).** Association Between Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival, Smoking at Diagnosis, and Marital Status. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* **144**, 43–50.
- Ou, D., Adam, J., Garberis, I., Blanchard, P., Nguyen, F., Levy, A., Casiraghi, O., Gorphe, P., Breuskin, I. & other authors. (2019).** Influence of tumor-associated macrophages and HLA class I expression according to HPV status in head and neck cancer patients receiving chemo/bioradiotherapy. *Radiother Oncol* **130**, 89–96.
- Owen, J. L., Lopez, D. M., Grosso, J. F., Guthrie, K. M., Herbert, L. M., Torroella-Kouri, M. & Iragavarapu-Charyulu, V. (2005).** The expression of CCL2 by T lymphocytes of mammary tumor bearers: Role of tumor-derived factors. *Cell Immunol* **235**, 122–135.
- *Pan, C., Issaeva, N. & Yarbrough, W. G. (2018).** HPV-driven oropharyngeal cancer: current knowledge of molecular biology and mechanisms of carcinogenesis. *Cancers Head Neck* **3**, 1–12.
- Park, S. W., Lee, S. G., Song, S. H., Heo, D. S., Park, B. J., Lee, D. W., Kim, K. H. & Sung, M. W. (2003).** The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. *Int J Cancer* **107**, 729–738.
- Parsons, R. J. & Kidd, J. G. (1943).** Oral Papillomatosis Of Rabbits: A Virus Disease. *J Exp Med* **77**, 233–250.
- Partlová, S., Bouček, J., Kloudová, K., Lukešová, E., Záborský, M., Grega, M., Fučíková, J., Truxová, I., Tachezy, R. & other authors. (2015).** Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* **4**, e965570.
- Petridou, E., Zavras, A. I., Lefatzis, D., Dessypris, N., Laskaris, G., Dokianakis, G., Segas, J., Douglas, C.**

- W., Diehl, S. R. & Trichopoulos, D. (2002). The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma. *Cancer* **94**, 2981–2988.
- Polz-Dacewicz, M., Strycharz-Dudziak, M., Dworżański, J., Stec, A. & Kocot, J. (2016). Salivary and serum IL-10, TNF- α , TGF- β , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. *Infect Agent Cancer* **11**, 45.
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A. C., Léone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D. & Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* **142**, 481–489.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A. & Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222–225.
- *Qian, B. Z. & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **141**, 39–51.
- Qian, B., Deng, Y., Im, J. H., Muschel, R. J., Zou, Y., Li, J., Lang, R. A. & Pollard, J. W. (2009). A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. *PLoS One* **4**, e6562.
- Qin, Y., Ekmekcioglu, S., Forget, M.-A., Szekvolgyi, L., Hwu, P., Grimm, E. A., Jazaeri, A. A. & Roszik, J. (2017). Cervical Cancer Neoantigen Landscape and Immune Activity is Associated with Human Papillomavirus Master Regulators. *Front Immunol* **8**, 1–8.
- Quick, C. A., Krzyzek, R. A., Watts, S. L. & Faras, A. J. (1980). Relationship between condylomata and laryngeal papillomata: Clinical and molecular virological evidence. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **89**, 467–471.
- Rainey, A. M. & Davidson, M. W. (2015). Spectral Imaging with Linear Unmixing [cit. 24.6.2020]. [online] Dostupné z <https://www.zeiss.com/microscopy/int/solutions/reference/all-tutorials/spectral-imaging/spectral-imaging-with-linear-unmixing.html>.
- *Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I. & Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* **5**, 1–10.
- Reinartz, S., Schumann, T., Finkernagel, F., Wortmann, A., Jansen, J. M., Meissner, W., Krause, M., Schwörer, A.-M., Wagner, U. & other authors. (2014). Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: Correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer* **134**, 32–42.
- Rikardsen, O. G., Bjerkli, I.-H., Uhlin-Hansen, L., Hadler-Olsen, E. & Steigen, S. E. (2014). Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway: a retrospective study. *BMC Oral Health* **14**, 103.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuelo, M. B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J. & other authors. (2004). Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res* **64**, 5839–5849.
- Rodriguez, P. C., Hernandez, C. P., Quiceno, D., Dubinett, S. M., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., Gilbert, J. & Ochoa, A. C. (2005). Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* **202**, 931–939.
- Rotnáglová, E., Tachezy, R., Saláková, M., Procházká, B., Košl'abová, E., Veselá, E., Ludvíková, V., Hamšíková, E. & Klozar, J. (2011). HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer* **129**, 101–110.
- Rous, P. & Beard, J. W. (1935). The cancers have developed from the papillomas of domestic rabbits The First Appearance of Malignancy. *J Exp Med* **62**, 523–548.
- *Ruffell, B. & Coussens, L. M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462–472.
- Ryan, M., Crow, J., Kahmke, R., Fisher, S. R., Su, Z. & Lee, W. T. (2014). FoxP3 and indoleamine 2,3-dioxygenase immunoreactivity in sentinel nodes from melanoma patients. *Am J Otolaryngol* **35**, 689–694.
- Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K. & Toi, M. (2001). Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* **92**, 1085–1091.
- Salazar, C. R., Smith, R. V., Garg, M. K., Haigentz, M., Schiff, B. A., Kawachi, N., Anayannis, N., Belbin, T. J., Prystowsky, M. B. & other authors. (2014). Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival: A Comparison by Tumor Site and Initial Treatment. *Head Neck Pathol* **8**, 77–87.
- Salvesen, H. B. & Akslen, L. A. (1999). Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer* **84**, 538–543.
- Sanford, D. E., Belt, B. A., Panni, R. Z., Mayer, A., Deshpande, A. D., Carpenter, D., Mitchem, J. B.,

- Plambeck-Suess, S. M., Worley, L. A. & other authors. (2013). Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: A role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res* 19, 3404–3415.
- Scarpa, M., Brun, P., Scarpa, M., Morgan, S., Porzionato, A., Kotsafti, A., Bortolami, M., Buda, A., D'Inca, R. & other authors. (2015). CD80-CD28 signaling controls the progression of inflammatory colorectal carcinogenesis. *Oncotarget* 6, 20058–20069.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129–1136.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.
- Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Morales, J. & other authors. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337, 76–84.
- Schmitt, M., Bravo, I. G., Snijders, P. J. F., Gissmann, L., Pawlita, M. & Waterboer, T. (2006). Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 44, 504–512.
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T. & Pawlita, M. (2008). Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46, 1050–1059.
- Schneider, K., Marbaix, E., Bouzin, C., Hamoir, M., Mahy, P., Bol, V. & Grégoire, V. (2018). Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol (Madr)* 57, 1165–1172.
- Schraufstatter, I. U., Zhao, M., Khaldoyanidi, S. K. & Discipio, R. G. (2012). The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology* 135, 287–298.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. & Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 1–14.
- *Schultze, J., Nadler, L. M. & Gribben, J. G. (1996). B7-mediated costimulation and the immune response. *Blood Rev* 10, 111–127.
- Seminerio, I., Kindt, N., Descamps, G., Bellier, J., Lechien, J. R., Mat, Q., Pottier, C., Journé, F. & Saussez, S. (2018). High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. *Oncotarget* 9, 11046–11059.
- Seppälä, M., Halme, E., Tiilikainen, L., Luukkainen, A., Laranne, J., Rautiainen, M., Huhtala, H., Paavonen, T. & Toppila-Salmi, S. (2016). The expression and prognostic relevance of indoleamine 2,3-dioxygenase in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 136, 729–735.
- Shabo, I., Stål, O., Olsson, H., Doré, S. & Svanvik, J. (2008). Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer* 123, 780–786.
- Shabo, I., Midtbo, K., Andersson, H., Åkerlund, E., Olsson, H., Wegman, P., Gunnarsson, C. & Lindström, A. (2015). Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and cannot be explained by cellular interaction. *BMC Cancer* 15, 1–11.
- Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L. & Munn, D. H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 2570–2582.
- She, L., Qin, Y., Wang, J., Liu, C., Zhu, G., Li, G., Wei, M., Chen, C., Liu, G. & other authors. (2018). Tumor-associated macrophages derived CCL18 promotes metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Cell Int* 18, 120.
- Shenoi, R., Chaudhuri, Sapre, S., Devrukhkar, V., Sharma, B. & Chikhale, A. (2012). Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: A retrospective study. *Indian J Cancer* 49, 21–26.
- Shigyo, H., Nonaka, S., Katada, A., Bando, N., Ogino, T., Katayama, A., Takahara, M., Hayashi, T. & Harabuchi, Y. (2007). Inducible nitric oxide synthase expression in various laryngeal lesions in relation to carcinogenesis, angiogenesis, and patients' prognosis. *Acta Otolaryngol* 127, 970–979.
- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J. A., Morgan, J., Livingston, D. M. & Chittenden, T. (1992). The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 68, 157–166.
- Shope, R. E. & Hurst, E. W. (1933). Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* 58, 607–624.
- *Sica, A. & Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development Find the latest version: Review series Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117, 1155–1166.
- Sica, A. & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–

- Silzle, T., Kreutz, M., Dobler, M. A., Brockhoff, G., Knuechel, R. & Kunz-Schughart, L. A. (2003). Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol* **33**, 1311–1320.
- Singh, R., Pervin, S., Karimi, A., Cederbaum, S. & Chaudhuri, G. (2000). Arginase Activity in Human Breast Cancer Cell Lines: N ω -Hydroxy-L-arginine Selectively Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in MDA-MB-468 Cells. *Cancer Res* **60**, 3305–3312.
- Sironi, M., Martinez, F. O., D'Ambrosio, D., Gattorno, M., Polentarutti, N., Locati, M., Gregorio, A., Iellem, A., Cassatella, M. A. & other authors. (2006). Differential regulation of chemokine production by Fc γ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J Leukoc Biol* **80**, 342–349.
- Sivars, L., Landin, D., Grün, N., Vlastos, A., Marklund, L., Nordemar, S., Ramqvist, T., Munck-Wikland, E., Näsman, A. & Dalianis, T. (2017). Validation of human papillomavirus as a favourable prognostic marker and analysis of CD8 $^{+}$ tumour-infiltrating lymphocytes and other biomarkers in cancer of unknown primary in the head and neck region. *Anticancer Res* **37**, 665–674.
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W. & Smejkal, W. (1953). “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6**, 963–968.
- Smith, E. M., Wang, D., Kim, Y., Rubenstein, L. M., Lee, J. H., Haugen, T. H. & Turek, L. P. (2008). p16INK4a Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* **44**, 133–142.
- Snijders, P. J. F., Van Den Brule, A. J. C., Schrijnemakers, H. F. J., Snow Meijer, G. C. J. L. M. & Walboomers, J. M. M. (1990). The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of broad spectrum papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* **71**, 173–181.
- Spitkovsky, D., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Möller, A. & Lienhard Schmitz, M. (2002). The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- κ B activation by targeting the I κ B kinase complex. *J Biol Chem* **277**, 25576–25582.
- *Stack, E. C., Wang, C., Roman, K. A. & Hoyt, C. C. (2014). Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* **70**, 46–58.
- *Stanley, M. A., Pett, M. R. & Coleman, N. (2007). HPV: From infection to cancer. *Biochem Soc Trans* **35**, 1456–1460.
- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. & Beard, P. (1998). Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol* **283**, 529–536.
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A. & Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**, 375–536.
- *Steenbergen, R. D. M., Snijders, P. J. F., Heideman, D. A. M. & Meijer, C. J. L. M. (2014). Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer* **14**, 395–405.
- Stein, B. M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation By Michael Stein, Satish Keshav, Neil Harris,* and Siamon Gordon. *J Exp Med* **176**, 287–292.
- *Stevaux, O. & Dyson, N. J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 684–691.
- Stockmann, C., Doedens, A., Weidemann, A., Zhang, N., Takeda, N., Greenberg, J. I., Cheresch, D. A. & Johnson, R. S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* **456**, 814–819.
- Stout, R. D. & Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* **76**, 509–513.
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K. & Suttles, J. (2005). Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *J Immunol* **175**, 342–349.
- Su, S., Liu, Q., Chen, J., Chen, J., Chen, F., He, C., Huang, D., Wu, W., Lin, L. & other authors. (2014). A Positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell* **25**, 605–620.
- Süer Gökmen, S., Yörük, Y., Cakir, E., Yorulmaz, F. & Gülen, S. (1999). Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys* **17**, 125–131.
- Surviladze, Z., Dziduszko, A. & Ozbun, M. A. (2012). Essential Roles for Soluble Virion-Associated Heparan Sulfonated Proteoglycans and Growth Factors in Human Papillomavirus Infections. *PLoS Pathog* **8**, e1002519.
- Swangphon, P., Pientong, C., Sunthamala, N., Bumrungthai, S., Azuma, M., Kleebkaow, P.,

- Tangsiriwatthana, T., Sangkomkamhang, U., Kongyingyoes, B. & Ekalaksananan, T. (2017). Correlation of Circulating CD64+/CD163+ Monocyte Ratio and stroma/peri-tumoral CD163+ Monocyte Density with Human Papillomavirus Infected Cervical Lesion Severity. *Cancer Microenviron* **10**, 77–85.
- Syrjänen, K., Syrjänen, S., Lamberg, M., Pyrhönen, S. & Nuutinen, J. (1983). Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* **12**, 418–424.
- Syrjänen, K. J. & Syrjänen, S. M. (1981). Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma. *Orl* **43**, 181–194.
- *Syrjänen, S., Rautava, J. & Syrjänen, K. (2017). HPV in Head and Neck Cancer-30 Years of History. *Recent Results Cancer Res* **206**, 3–25.
- *Taberna, M., Mena, M., Pavón, M. A., Alemany, L., Gillison, M. L. & Mesía, R. (2017). Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* **28**, 2386–2398.
- Tachezy, R., Klozar, J., Saláková, M., Smith, E., Turek, L., Betka, J., Kodet, R. & Hamšíková, E. (2005). HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* **11**, 181–185.
- Tachezy, R., Klozar, J., Rubenstein, L., Smith, E., Saláková, M., Šmahelová, J., Ludvíková, V., Rotnáglová, E., Kodet, R. & Hamšíková, E. (2009). Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* **81**, 878–887.
- Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F. & Kido, R. (1988). Mechanism of interferon- γ action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon - γ and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem* **263**, 2041–2048.
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* **157**, 411–421.
- Thiele, O. C., Seeberger, R., Flechtenmacher, C., Hofele, C. & Freier, K. (2012). The role of elective supraomohyoid neck dissection in the treatment of early, node-negative oral squamous cell carcinoma (OSCC): A retrospective analysis of 122 cases. *J Cranio-Maxillofacial Surg* **40**, 67–70.
- Tommasino, M. (2017). The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res* **231**, 128–138.
- Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nishioka, Y., Sone, S. & Kuwano, M. (2000). Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer* **85**, 182–188.
- Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Madrid-González, C., Burguete-García, A. I., Bermúdez-Morales, H., Peralta-Zaragoza, O., Madrid-Marina, V., Ber-Múdez-Morales, H., Torres-Poveda, K. & other authors. (2014). design of new targeted immunotherapies for women with cervical neoplasia. Madrid-Marina V. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immuno- suppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol* **5**, 753–763.
- Troiano, G., Caponio, V. C. A., Adipietro, I., Tepedino, M., Santoro, R., Laino, L., Lo Russo, L., Cirillo, N. & Lo Muzio, L. (2019). Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* **93**, 66–75.
- Tsakogiannis, D., Diamantidou, V., Toska, E., Kyriakopoulou, Z., Dimitriou, T. G., Ruether, I. G. A., Gortsilas, P. & Markoulatos, P. (2015). Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. *Arch Virol* **160**, 207–214.
- Tsou, C.-L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P., Mack, M. & Charo, I. F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* **117**, 902–909.
- Tsujii, M., Kawano, S. & Dubois, R. N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3336–3340.
- *Tumban, E. (2019). A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses* **11**, 922.
- Turner, L., Scotton, C., Negus, R. & Balkwill, F. (1999). Hypoxia inhibits macrophage migration. *Eur J Immunol* **29**, 2280–2287.
- Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Koike, M., Inadera, H. & Matsushima, K. (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 3282–3289.
- Umemura, N., Saio, M., Suwa, T., Kitoh, Y., Bai, J., Nonaka, K., Ouyang, G.-F., Okada, M., Balazs, M. & other authors. (2008). Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* **83**, 1136–1144.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. & Van den Eynde,

- B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* **9**, 1269–1274.
- *Valastyan, S. & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275–292.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, research0034.1.
- *Varol, C., Mildner, A. & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol* **33**, 643–675.
- Vogel, D. Y. S., Glim, J. E., Stavenhagen, A. W. D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra, C. D. & Beelen, R. H. J. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* **219**, 695–703.
- Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., Shah, K., Snijders, Peter, J. F., Peto, J., Meijer, C. J. . L. & Munoz, N. (1999). Human Papillomavirus Is a Necessary Cause. *J Pathol* **189**, 12–19.
- *Wang, H., Wang, S., Tang, Y.-J., Chen, Y., Zheng, M., Tang, Y. & Liang, X. (2019). The Double-Edged Sword—How Human Papillomaviruses Interact With Immunity in Head and Neck Cancer. *Front Immunol* **10**, 1–12.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P. J., Walker, P. A. & other authors. (2004). Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1A/E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization. *J Virol* **78**, 821–833.
- Wang, Q., Ni, H., Lan, L., Wei, X., Xiang, R. & Wang, Y. (2010). Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res* **20**, 701–712.
- Wang, S., Sun, M., Gu, C., Wang, X., Chen, D., Zhao, E., Jiao, X. & Zheng, J. (2014a). Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. *Eur J Oral Sci* **122**, 202–209.
- Wang, T., Ge, Y., Xiao, M., Lopez-Coral, A., Azuma, R., Somasundaram, R., Zhang, G., Wei, Z., Xu, X. & other authors. (2012). Melanoma-derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 493–505.
- Wang, Z.-M., Liu, J., Liu, H.-B., Ye, M., Zhang, Y.-F. & Yang, D.-S. (2014b). Abnormal COX2 Protein Expression May Be Correlated with Poor Prognosis in Oral Cancer: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int* **2014**, 364207.
- *Warnakulasuriya, S. (2009). Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *Br Dent J* **207**, 471–475.
- Warnakulasuriya, S., Parkkila, S., Nagao, T., Preedy, V. R., Pasanen, M., Koivisto, H. & Niemelä, O. (2008). Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med* **37**, 157–165.
- Wasylyk, B., Abecassis, J. & Jung, A. C. (2013). Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: In p16 should we trust? *Oral Oncol* **49**, e33–e37.
- Weber, M., Büttner-Herold, M., Hyckel, P., Moebius, P., Distel, L., Ries, J., Amann, K., Neukam, F. W. & Wehrhan, F. (2014). Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages - An immunohistochemical analysis. *J Cranio-Maxillofacial Surg* **42**, 1087–1094.
- Wehrhan, F., Büttner-Herold, M., Hyckel, P., Moebius, P., Preidl, R., Distel, L., Ries, J., Amann, K., Schmitt, C. & other authors. (2014). Increased malignancy of oral squamous cell carcinomas (oscc) is associated with macrophage polarization in regional lymph nodes – an immunohistochemical study. *BMC Cancer* **14**, 522.
- Weller, P., Bankfalvi, A., Gu, X., Dominas, N., Lehnerdt, G. F., Zeidler, R., Lang, S., Brandau, S. & Dumitru, C. A. (2014). The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer. *Eur J Cancer* **50**, 1291–1300.
- WHO©. (2018). WHO - Human papillomavirus (HPV). [cit. 06.07.2020]. [online] Dostupné z <https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/>.
- Winston, M. J., D'Souza, G., Waterboer, T., Rooper, L., Westra, W. H., Troy, T., Pardoll, D., Tan, M., Yavvari, S. & other authors. (2020). Risk factors for human papillomavirus-positive nonoropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* **42**, 1954–1962.
- Wu, C.-W., Kao, H.-L., Lui, W.-Y., P'eng, F.-K., Chung, W.-W., Chi, C.-W. & Wang, S.-R. (1996). Immunohistochemical study of arginase in cancer of the stomach. *Virchows Arch* **428**, 325–331.
- Xu, Z., Wang, L., Tian, J., Man, H., Li, P. & Shan, B. (2018). High expression of B7-H3 and CD163 in cancer tissues indicates malignant clinicopathological status and poor prognosis of patients with urothelial cell carcinoma of the bladder. *Oncol Lett* **15**, 6519–6526.

- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M. & other authors. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* **40**, 274–288.
- Yamagata, Y., Tomioka, H., Sakamoto, K., Sato, K., Harada, H., Ikeda, T. & Kayamori, K. (2017). CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* **75**, 2144–2153.
- Yamamoto, K., Makino, T., Sato, E., Noma, T., Urakawa, S., Takeoka, T., Yamashita, K., Saito, T., Tanaka, K. & other authors. (2020). Tumor-infiltrating M2 macrophage in pretreatment biopsy sample predicts response to chemotherapy and survival in esophageal cancer. *Cancer Sci* **111**, 1103–1112.
- Ye, J., Liu, H., Hu, Y., Li, P., Zhang, G. & Li, Y. (2013). Tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts poor outcome in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* **462**, 73–81.
- You, J., Chen, W., Chen, J., Zheng, Q., Dong, J. & Zhu, Y. (2018). The Oncogenic Role of ARG1 in Progression and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int* **2018**, 1–10.
- Zafereo, M. E., Xu, L., Dahlstrom, K. R., Viamonte, C. A., El-Naggar, A. K., Wei, Q., Li, G. & Sturgis, E. M. (2016). Squamous cell carcinoma of the oral cavity often overexpresses p16 but is rarely driven by human papillomavirus. *Oral Oncol* **56**, 47–53.
- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B. & Jansen-Dürr, P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* **69**, 6389–6399.
- Zhang, J., Yan, Y., Yang, Y., Wang, L., Li, M., Wang, J., Liu, X., Duan, X. & Wang, J. (2016). High Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Influences Poor Prognosis in Human Gastric Cancer Patients, Associates with the Phenomenon of EMT. *Med (United States)* **95**, 1–6.
- *Zhang, J., Patel, L. & Pienta, K. J. (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 41–48.
- Zhang, Q., Liu, L., Gong, C., Shi, H., Zeng, Y., Wang, X., Zhao, Y. & Wei, Y. (2012). Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS One* **7**, e50946.
- Zhang, Z. F., Morgenstern, H., Spitz, M. R., Tashkin, D. P., Yu, G. P., Marshall, J. R., Hsu, T. C. & Schantz, S. P. (1999). Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 1071–1078.
- Zhao, Y., Ge, X., Xu, X., Yu, S., Wang, J. & Sun, L. (2019). Prognostic value and clinicopathological roles of phenotypes of tumour-associated macrophages in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **145**, 3005–3019.
- Zhou, J., Ding, T., Pan, W., Zhu, L., Li, L. & Zheng, L. (2009). Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* **125**, 1640–1648.
- Zimmermann, T. (2005). Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **95**, 245–265.
- Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. & Cohen, P. L. (2012). Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. *J Immunol* **189**, 3508–3520.