Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Experimentální chirurgie

MUDr. Eva Košľabová

Klinické aspekty infekce lidskými papillomaviry v diagnostice a léčbě u pacientů se spinocelulárním karcinomem dutiny ústní a orofaryngu

Clinical aspects of human papillomavirus infection in diagnosis and treatment in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
Prof. MUDr. Jan Klozar, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

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

V Praze, 30.5.2017

MUDr. Eva Košľabová

Podpis

Identifikační záznam:

KOŠĽABOVÁ, Eva. *Klinické aspekty infekce lidskými papillomaviry v diagnostice a léčbě u pacientů se spinocelulárním karcinomem dutiny ústní a orofaryngu [Clinical aspects of human papillomavirus infection in diagnosis and treatment in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx]*. Praha, 2017 79s. Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku. Vedoucí práce Jan Klozar.

Velice děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Janu Klozarovi, CSc. a konzultantovi RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za pomoc při sběru, zpracovávání i hodnocení vzorků, za odborné vedení a velkou podporu, kterou mi věnovali po celou dobu mého studia.

Dále děkuji RNDr. Martině Salákové, Ph.D. a RNDr. Janě Šmahelové, Blance Langové, RNDr. Evě Hamšíkové a RNDr. Vieře Ludvíkové a všem zaměstnancům oddělení experimentální virologie ÚHKT v Praze za odborné rady, vstřícnost a pomoc v laboratorní práci a MUDr. Marekovi Gregovi z Ústavu patologie a molekulární medicíny. Za pomoc při získávání vzorků a v klinické práci velice děkuji MUDr. Elišce Rotnáglové, Ph.D. a MUDr. Evě Lukešové.

Dále děkuji všem spolupracovníkům z Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole, především Prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc., FCMA za pracovní zázemí vstřícné k postgraduálnímu studiu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu IGA MZd NR9466

ABSTRAKT

Studie prováděné v posledních 20 letech nahromadily údaje, které ukazují na dvě různé etiologie spinocelulárních karcinomů hlavy a krku (HNC). Nádory dutiny ústní hrtanu a hypofaryngu jsou většinou nezávislé na virové infekci a jsou spojeny s užíváním tabáku a alkoholu. Zhruba 26 % všech HNC a více než 50 % tonzilárních karcinomů je spojeno s přítomností onkogenních lidských papillomavirů (HR HPV). Cílem této práce bylo zjistit, zda přítomnost HPV DNA ve výplaších dutiny ústní a/nebo přítomnost HPV-specifických protilátek u pacientů s nádory hlavy a krku (Head and Neck Cancer, HNC) odpovídá přítomnosti viru ve tkáni nádoru a zda tyto parametry mají prognostický význam.

Do studie byli zařazeni pacienti s primárním nádorem dutiny ústní a orofaryngu (N=142). Přítomnost HPV DNA byla testována jak v nádorové tkáni, tak i v buňkách přítomných ve výplachu dutiny ústní a HPV-specifické protilátky byly stanoveny z krevního séra pacienta. Krev byla odebrána v jednom měsíci a poté v roce po ukončení terapie. Jeden rok po terapii byl také odebrán výplach dutiny ústní. V souboru bylo celkem 59,2 % HPV pozitivních nádorů. Přítomnost HPV v buňkách z výplachu dutiny ústní a pozitivita HPV-specifických protilátek v séru silně koreluje s přítomností HPV DNA v nádoru před terapií. Z celkového počtu 66 pacientů, kteří měli HPV pozitivní výplach před terapií, vymizel tento nález u 56 pacientů (84,8 %) do roku po ukončení terapie. Průměrné titry protilátek proti HPV 16 E6 a/nebo E7 onkoproteinům po terapii u pacientů rovněž statisticky signifikantně poklesly. Šestnáct pacientů s recidivou žilo v době odběru druhého vzorku. Z nich bylo 6 při zařazení do studie a před terapií pozitivních na protilátky HPV 16 E6 a/nebo E7. U pěti z nich nebyl zaznamenán pokles hladiny těchto protilátek. Naproti tomu titry protilátek proti kapsulárním antigenům (HPV 16 VLP) během sledování pacientů se signifikantně neměnily. U pacientů s nádorem hlavy a krku došlo po terapii k vyčištění HPV infekce ve výplachu dutiny ústní, zůstali ale séropozitivní pro protilátky HPV 16 E6/E7. Všechny markery HPV infekce při zařazení do studie byly prediktivní pro lepší přežití a nižší frekvenci recidivy onemocnění.

Naše výsledky naznačují, že přítomnost HPV-specifických protilátek HPV 16 E6 a/nebo E7 proteinů je nejen ukazatelem zapojení HPV do etiologie nádoru, ale i možným citlivým ukazatelem recidivy, což by mohlo být v budoucnu použito při dispenzarizaci pacientů. Výsledky zároveň podporují závěry řady publikovaných prací, že HPV pozitivita nádoru je významným příznivým prognostickým faktorem.

Klíčová slova: HPV, nádory hlavy a krku, protilátky, výplach dutiny ústní, sledování

SUMMARY

A studies carries for the last twenty years accumulated data that show two different etiology of head and neck squamous cell carcinoma. Tumors located in the oral cavity are often independent of the viral infection and is associated with tobacco and alcohol use. Approximately 26 % of all HNC and more than 50 % of tonsillar cancers are associated with the presence of high risk human papillomavirus (HR HPV). The purpose of this study was to determine whether changes in HPV DNA prevalence in oral rinses and/ or HPV – specific antibody levels in sera of patients with head and neck carcinoma (HNC) have prognostic significance.

Patients with HNC were enrolled (N=142). The presence of HPV DNA was assayed in tumor tissue and oral rinses, and HPV–specific antibodies were assessed in sera. Sera were drawn one month and one year after the end of treatment. One year after treatment, oral rinses were collected. Altogether, 59.2 % tumors were HPV positive. Initially, the presence of HPV DNA in the tumors strongly correlated with HPV DNA positivity in oral rinses as well as with the presence of HPV–specific antibodies in sera. Out of 66 patients with HPV positive oral rinses at enrollment, 84.8 % became negative at one-year follow up. The mean titres of HPV 16 E6 and E7 antibodies at follow-up were lower in comparison to those at enrollment; the differences were statistically significant. This was not the case for antibodies specific for HPV16 VLPs. Out of 16 patients with recurrences on follow-up (alive at the time of second sampling), six were positive at enrollment for HPV 16 E6 and/or E7 antibodies. In five of these, no decrease in antibody levels was observed. Patients with HNC cleared HPV infection in oral rinses after treatment while they sustained their seropositivity for HPV 16 E6/ E7. All markers of HPV infection at enrollment were predictive of better survival and lower frequency of recurrence while no markers were predictive at follow-up.

Our data suggests that the detection of seroposivity for HPV – specific antibodies to the HPV 16 E6 and E7 oncoproteins may serve not only as a marker of the HPV viral etiology of HNC, but also of the prognosis of recurrence in these patients.

Key words: HPV, head and neck cancer, antibodies, oral rinses, follow-up

OBSAH

1 ÚVOD 9

1.1 Nádory hlavy a krku 10

1.1.1 Karcinom dutiny ústní a orofaryngu 11

1.1.1.1 Epidemiologie 11

1.1.1.2 Příznaky 14

1.1.1.3 Diagnostika 16

1.1.1.4 Terapie a prognóza 16

1.2 Lidský papillomavirus 18

1.2.1 Charakteristika 18

1.2.2 Životní cyklus a integrace 22

1.2.3 HPV a nádory dutiny ústní a orofaryngu 25

1.2.4 Důkaz přítomnosti HPV a jeho detekce 26

1.2.4.1 Detekce HPV DNA 26

1.2.4.2 Detekce RNA 27

1.2.4.3 Imunohistochemie P16 a P53 28

1.2.4.4 Sérologie 28

2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE 30

3 MATERIÁL A METODIKA 31

3.1 Soubor pacientů 31

3.2 Vzorky tkáně tumoru 31

3.3 Výplach dutiny ústní 32

3.4 Krev 32

3.5 Izolace DNA a RNA 32

3.5.1 Parafinové řezy s biopsiemi 32

3.5.2 Výplach dutiny ústní 33

3.6 PCR – Polymerázová řetězová reakce 34

3.6.1 PCR kontrolního genu u DNA z parafínových řezů – beta-globinová PCR 34

3.6.2 GP5+/GP6+BIO PCR - detekce HPV v DNA z tkáně v parafinových blocích a z výplachu dutiny ústní 35
3.6.3 MY09/11 PCR 36
3.7 Obrácená hybridizace 37
3.8 Metoda Southern blot 38
3.9 Sekvenace 39
3.10 Imunohistochemie 39
3.11 Sérologie 40
3.11.1 Příprava VLP – Virus-Like Particles 40
3.11.2 Příprava proteinů E6 a E7 viru HPV16 41
3.11.3 Detekce protilátek proti HPV 41
3.11.3.1 Detekce VLP protilátek 41
3.11.3.2 Protilátky proti onkoproteinům HPV16 E6 a E7 42
3.11.3.3 Hodnocení 42
3.12 Statistika 43
4 VÝSLEDKY 45
4.1 Demografická a klinicko-patologická charakteristika 45
4.2 Prevalence a specifikace HPV DNA v nádorové tkáni 47
4.3 Přítomnost onkoproteinů P16 a P53 48
4.4 Prevalence HPV DNA ve výplachu dutiny ústní před terapií 50
4.5 Prevalence HPV specifických protilátek před terapií 52
4.6 Prevalence HPV DNA ve výplachu dutiny ústní po terapii 54
4.7 HPV – specifické protilátky po terapii 56
4.8 Sledování markerů po terapii a při rekurenci a analýza přežití 56
5 DISKUZE 61
6 ZÁVĚR 66
7 LITERATURA 68
8 PŘÍLOHA 78

1 ÚVOD

Nádory hlavy a krku jsou sedmou nejčastější skupinou novotvarů na světě a tvoří 5 – 7 % všech nově diagnostikovaných nádorů. Ročně se vyskytne přibližně 400 až 500 tisíc nových případů tohoto onemocnění, z toho až polovina na toto onemocnění umírá. Postiženi jsou 3 – 4x častěji muži než ženy. Geografické rozložení je ve světě značně nerovnoměrné – nádory hlavy a krku jsou frekventovanější v Indii, jihovýchodní Asii, západní a jižní Evropě a v USA (Ferlay et al. 2015;Noone et al. 2017;Howlader et al. 2010).

Dlaždicobuněčné karcinomy cest dýchacích a polykacích jsou tradičně spojovány s dlouhodobým užíváním tabákových výrobků a abúzem alkoholu. Tyto rizikové faktory patří k nejčastějším příčinám vzniku nádorů hlavy a krku, navíc se toto riziko kombinací obou faktorů násobí. Konzumace tabáku a alkoholu je zodpovědná za vznik přibližně 75 % karcinomů v této lokalitě. Dalšími možnými rizikovými faktory jsou uváděny výživa – nízký příjem některých vitamínů, nízká úroveň hygieny dutiny ústní a genetická predispozice. Některé práce popisují možnou souvislost s užíváním konopí. Teprve v posledních přibližně 20 letech je mezi možnými faktory vzniku nádorů hlavy a krku uváděn lidský papillomavirus (Scully et al. 2000; Scully & Bedi 2000; D'Souza et al. 2007; Rotnaglova et al. 2011; Tachezy et al. 2009).

Lidské papillomaviry (HPV) byli uznány jako etiologický faktor karcinomu děložního hrdla a anogenitální oblasti (Munoz et al. 2003; Walboomers et al. 1999; Burd 2003;Walboomers et al. 1999). U nádorů hlavy a krku jsou vysoce rizikové typy HPV (HR HPV) rizikovým faktorem u asi 25 % případů, a to nezávisle na dalších známých rizikových faktorech, jako je alkohol a kouření, což dokladuje několik studií včetně metaanalýz (Gillison et al. 2000; Mehanna et al. 2012; Applebaum et al. 2007; Gillison & Lowy 2004; Rotnaglova et al. 2011). Sexuální chování je rizikovým faktorem při šíření viru, a HPV se považuje za nejčastější sexuálně přenosnou infekci vůbec. Ačkoli způsob přenosu HPV u nádorů hlavy a krku nebyl přesně zjištěn, sexuální chování je někdy spojováno se zvýšeným rizikem i u těchto nádorů. Několik prací poukazuje na souvislost nádoru v ORL oblasti a vyšším počtem sexuálních partnerů, nižší věk prvního pohlavního styku, určitými sexuálními praktikami (oro-genitální, oro-anální kontakt). Dalším rizikovým faktorem byl HPV-pozitivní anogenitální karcinomem v anamnéze a partnerka s anamnézou karcinomu děložního hrdla (D'Souza et al. 2007; Hemminky et al. 2000).

Z epidemiologického hlediska je vývoj incidencí jednotlivých lokalizací nádorů hlavy a krku nerovnoměrný. Zatímco incidence hrtanových nádorů nebo nádorů dutiny ústní je stabilní nebo dokonce klesá, počet nově diagnostikovaných nádorů orofaryngu stoupá, a to i v zemích, kde konzumace tabáku v poslední době klesá. Nejčastější lokalizace HPV-pozitivních nádorů je v oblasti orofaryngu, respektive v oblasti patrových mandlí. Nejčastějším nacházeným typem je HPV 16, který je přítomen až u 90 % HPV pozitivních dlaždicobuněčných karcinomů. Existuje mnoho studií, které se zabývají prognostickým významem HPV u pacientů s karcinomem dutiny ústní a orofaryngu. Důkazy o lepším přežití a nižším výskytu recidiv onemocnění u těchto nádorů přináší většina z nich. HPV pozitivita je spojována s lepší odpovědí na léčbu, snížením počtu recidiv a zlepšeným přežitím (Rubenstein et al. 2011; Mydlarz et al. 2010; Gillison 2009; Hammarstedt et al. 2006; Mellin et al. 2000; Rotnaglova et al. 2011).

V souvislosti s lepší prognózou HPV pozitivních nádorů je u nich v poslední době uvažováno o možné modifikaci léčebných postupů ve smyslu desintenzifikace léčby za účelem omezení akutní i pozdní toxicity nechirurgické léčby a vyhnutí se mutilaci způsobené chirurgií. Vzhledem k evidentním rizikům vyplývajícím z chybného zařazení pacienta s HPV-negativním nádorem mezi HPV pozitivní je otázka markerů HPV infekce v současné době předmětem intenzivního výzkumu. Velmi perspektivním směrem je i studium neinvazivních metod detekce HPV, ke kterým patří sérologické markery a detekce HPV DNA ve výplaších dutiny ústní. V současnosti bylo publikováno jen několik studií, které se věnují serologické detekci protilátek a určování přítomnosti HPV DNA ve slinách u HPV-pozitivních nádorů dutiny ústní a orofaryngu. Ve své práci jsem se proto těmto markerům věnovala, zkoumala jsem jejich vzájemné souvislosti a hodnotila vývoj těchto parametrů při sledování po léčbě.

1.1 NÁDORY HLAVY A KRKU

Heterogenita nádorů hlavy a krku je daná nejen jejími sublokalitami, ale i patologicko-anatomickými rozdíly v morfologii, rizikových faktorech a v epidemiologii. V širším smyslu se může jednat i o nádory nezhoubné. Nádorový proces může projít cestou od hyperplastické tkáně přes dysplazii až k nádorovému bujení. Pojem nádory hlavy a krku se většinou užívá v užším smyslu pro dlaždicobuněčné karcinomy s různým stupněm diferenciace, jejichž původ je v krycím epitelu horních dýchacích a polykacích cest. Ty tvoří kolem 90 % zhoubných nádorů hlavy a krku (Licitra & Felip 2009, Kumar et al. 2012). Jenom v 5 % jde o mezenchymové nádory – například lymfomy, melanomy a sarkomy, a

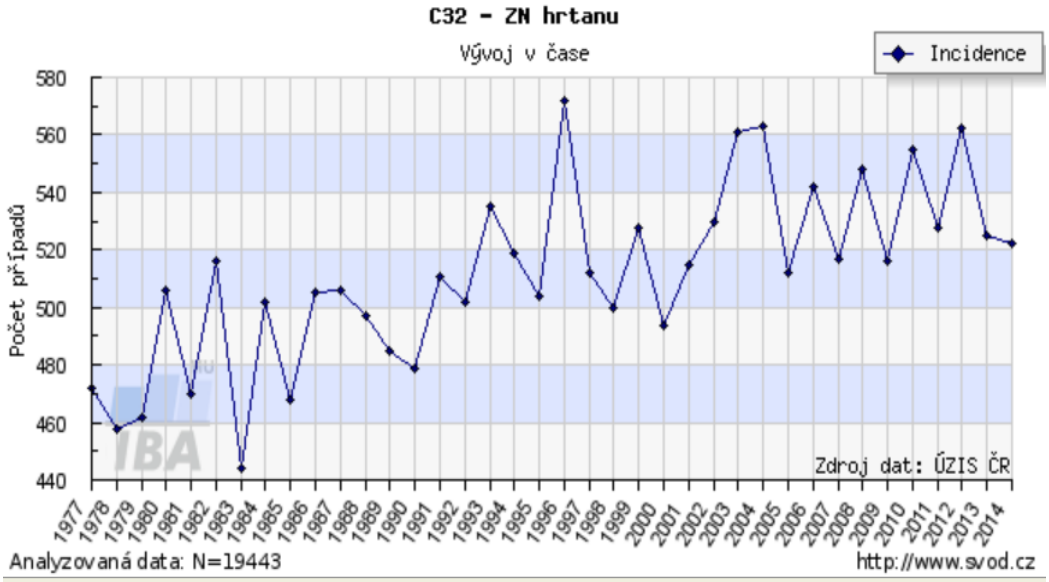
u zbylých 5 procent jsou zastoupeny nádory ze žlázového epitelu a některé vzácné nádory. Nejčastější lokalizací jsou dutina ústní, oropharynx, hypopharynx a larynx.

Společným rysem dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku je tendence k lokoregionálnímu šíření. Bohaté lymfatické zásobení usnadňuje časný vznik metastáz v regionálních lymfatických uzlinách, zatímco vzdálené metastázy jsou méně časté. Tyto nádory mají také vysoké procento recidiv a výskyt mnohočetných nádorů (Jones et al. 1995). V předkládané práci se věnuji pouze nádorům orofaryngu a dutiny ústní.

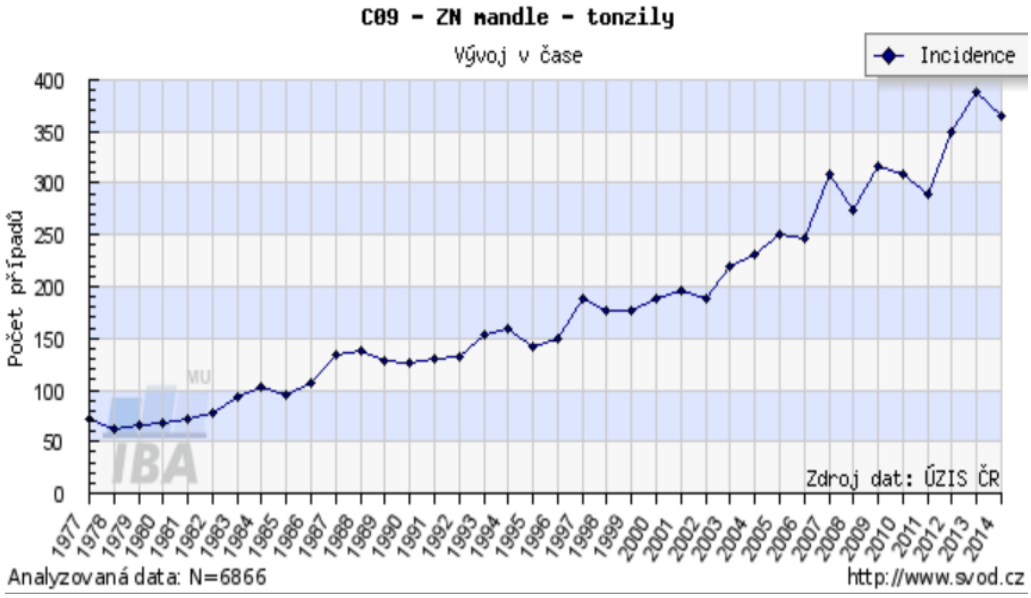
1.1.1 Karcinom dutiny ústní a orofaryngu

1.1.1.1 Epidemiologie

Zhoubné nádory hlavy a krku se zařadily u mužů na 9. místo a u žen na 19. místo mezi všemi malignitami v ČR. V roce 2014 bylo nově nemocných 2 166, z toho 1 606 mužů a 560 žen. Nádor dutiny ústní a orofaryngu tvořilo 1 228 pacientů (muži/ženy 872/356), přičemž tonzilární karcinom tvořil 365 případů (muži/ženy 270/95). Nejsou zde započítané nádory štítné žlázy, krční části jícnu a kožní nádory (Dušek et al. 2014). Zatímco incidence karcinomu hrtanu jako typického nádoru indukovaného tabákem je v posledních letech stabilní (Graf 1), incidence karcinomu orofaryngu a především tonsily stoupá (Graf 2).

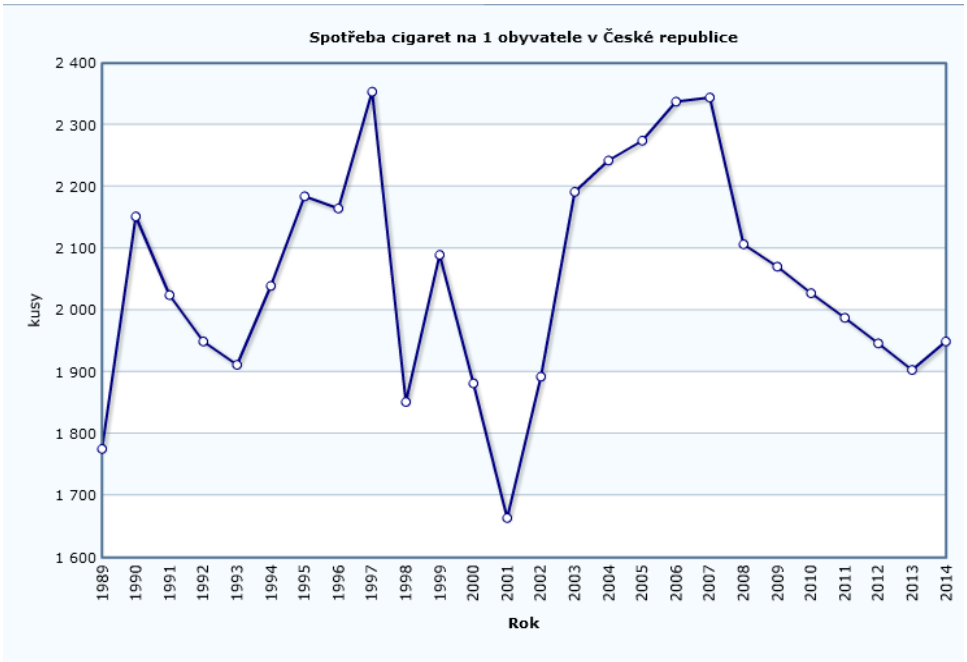


Graf 1 Incidence karcinomu hrtanu, zdroj: www.svod.cz

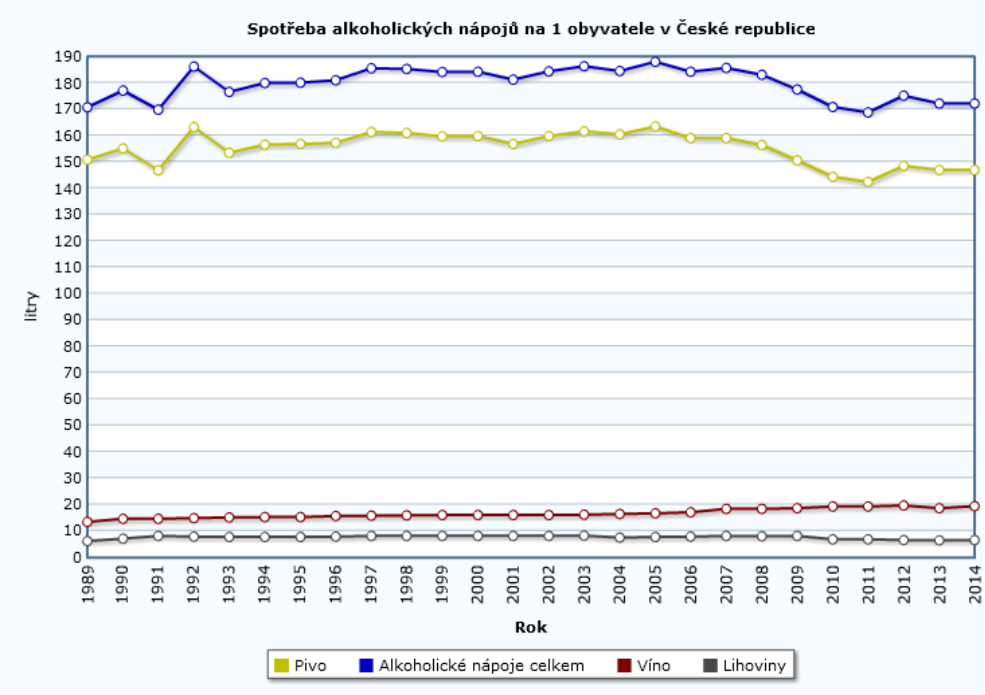


Graf 2 Incidence karcinomu orofaryngu, zdroj: www.svod.cz

Velké epidemiologické studie v USA a v Evropě za poslední roky taky ukazují na stoupající incidenci spinocelulárních karcinomů v oblasti orofaryngu, a její nejčastější lokalitou jsou tonzily, kde výskyt stoupl asi třikrát za posledních 30 let, zatímco incidence nádorů v ostatních anatomických lokalizacích hlavy a krku klesá, a to zejména v zemích, kde proběhly úspěšné protitabákové kampaně (Hammarstedt et al. 2007; Sturgis 2013; Sturgis & Cinciripini 2007; Syrjanen & Rautava 2015). V České republice konzumace tabáku a alkoholu bohužel zatím neklesá, spíše kolísá. (Graf 3, Graf 4). Největší pokles kouření byl zaznamenán v roce 2001. Poměrně velký vzestup pak byl v roce 2007, a od té doby má klesající tendenci. Konzumace alkoholu se v průběhu několik let výrazně nemění (Graf 4).



Graf 3 Spotřeba cigaret v ČR, zdroj: SZÚ, www.szu.cz



Graf 4 Spotřeba alkoholu v ČR, zdroj: SZÚ, www.szu.cz

Tento trend evidentně vzrůstajícího podílu nádorů orofaryngu na úkor jiných lokalizací souvisí s vysoce rizikovými lidskými papillomaviry (High Risk Papillomavirus, HR HPV) (Smith et al. 1998; Gillison & Lowy 2004; Klozar et al. 2010).

1.1.1.2 Příznaky

Příznaky nádorů dutiny ústní a orofaryngu jsou většinou nenápadné a značná část pacientů je navíc bagatelizuje. K prvotním nejčastějším příznakům patří dyskomfort, škrábaní či bolest v dané oblasti, která může vystřelovat do ucha na stejné straně nádoru. Bolest se může zhoršovat při polykání (odynofagie) či mluvení. Polykání se zhoršuje, a to počínaje tužším jídlem a konče afágií (neschopností polykat vůbec), výsledkem čehož je hubnutí. Při nádoru spodiny dutiny ústní či dásně začne špatně sedět zubní protéza (Obrázek 1). Dále je to foetor ex ore (zápach z úst), zhoršení artikulace, někdy pacienti pozorují v slinách přítomnost krve. U některých pacientů však příznaky primárního nádoru zcela chybí a jako první příznak se objeví krční metastáza (Obrázek 2).

Obrázek 1 Karcinom spodiny dutiny ústní

Obrázek 2 Krční metastáza na krku vpravo

Obrázek 3 Karcinom patrové mandle vlevo

1.1.1.3 Diagnostika

Včasné rozpoznání příznaku tohoto onemocnění vede k rychlé diagnóze, a tím k včasné terapii a lepší prognóze. Příznaky však často imitují obraz chronického zánětu. Důležitá je anamnéza – varováním by měla být jednostrannost obtíží, zejména u pacienta s abusem alkoholu, a kuřáka. Dalším krokem je důkladné vyšetření: 1) aspekce – lokální nález, přítomnost asymetrie (hlavně u patrových mandlí (Obrázek 3)), 2) vyšetřit funkci a 3) palpace. Kvůli možnému výskytu duplicitních nádorů by měl pacient podstoupit panendoskopii k vyšetření celé ORL oblasti k vyloučení duplicit a určení rozsahu nádoru z hlediska posouzení operability. Rozsah nádoru včetně metastáz nám pomůže doplnit zobrazovací metoda – počítačová tomografie nebo magnetická rezonance. Základní součástí diagnostiky je histologická verifikace procesu, která nám diagnózu potvrdí. Úspěšnost terapie závisí na několika aspektech – rozsahu onemocnění a celkového stavu pacienta.

1.1.1.4 Terapie a prognóza

Klasickými léčebnými postupy jsou chirurgie, radioterapie a chemoterapie, a to buď samostatně, nebo v kombinaci. Výběr modality se odvíjí od šíře postižení, přítomnosti metastáz – regionálních či vzdálených; rozhodující je i zdravotní stav pacienta a samozřejmě jeho přání. Terapie se musí zaměřit jak na primární nádor, tak i na regionální lymfatické uzliny, a to při chirurgické či nechirurgické modalitě. Na našem pracovišti je v případě resekabilního nádoru volena nejčastěji chirurgie. Při volbě léčebného postupu hraje roli i toxicita nechirurgické léčby případně chirurgií způsobená mutilace. Odstraňuje se jednak primární nádor, a ve většině případů se provádí i bloková krční disekce uzlin. V případě pozitivity nádoru v uzlinách a dle histologického nálezu se pooperačně indikuje i radioterapie, případně chemoradioterapie. S větší radikalitou se však zhoršují následky i kvalita života pacienta po léčbě (Klozar et al 2001). Nejčastěji jsou po chirurgickém zásahu potíže s polykáním, které se můžou ještě zhoršit adjuvantní terapií, což může skončit i zavedením trvalé gastrostomie. Dále se může zhoršit artikulace a samozřejmě význam má i estetické hledisko. Konzervativní terapeutický postup má výhodu v tom, že pacient se vyhne mutilaci, ale konkomitantní chemoradioterapie má poměrně vysokou toxicitu a to akutní i chronickou (Pignon et al 2000, Posner 2002).

V poslední době se testuje další léčební modalita u nádorů hlavy a krku, a to na molekulární úrovni. Tato takzvaná biologická terapie má za úkol působit na signalizační dráhy, které jsou zapojeny do vzniku a růstu nádoru. Asi nejdále se dostal výzkum, ve kterém byly

vyvinuty monoklonální protilátky proti receptoru pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) – cetuximab. Navázáním těchto protilátek na receptor se zabrání jeho dimerizaci, a zablokuje se tím spuštění následné metabolické cesty (Bonner et al. 2004). Cetuximab v kombinaci s radioterapií se ukázal být účinnější než samotná radioterapie, hlavně u pokročilých nádorů hlavy a krku, a to při nižší toxicitě v porovnání s chemoradioterapií (Bonner et al. 2006).

Biologické chování nádorů hlavy a krku vykazuje značnou heterogenitu, a proto se nezřídka setkáváme s odlišnou odezvou pacientů na léčbu. Pětileté přežití se pohybuje kolem 50 %, záleží jak na velkosti primárního nádoru, tak na přítomnosti metastáz. Velikost nádoru ovlivňuje pětileté přežití, které se uvádí u T1 80 %, zatímco u T4 jen přibližně 20 %. Prognózu obecně snižuje přítomnost krčních uzlinových metastáz (de Bondt et al. 2007). Velký rozdíl v pětiletém přežití určuje i lokalizace, kde jazyk má 90 %, zatímco hypopharynx 31 % (Howlader et al 2013). Řada prací z poslední doby dokazuje lepší přežití pacientů s nádory, kde se etiologicky podílí HPV, a to i při větším postižení krčních uzlin (Klozar et al. 2008; Sedaghat et al. 2009).

1.2 LIDSKÝ PAPILLOMAVIRUS

1.2.1 Charakteristika

Lidské papillomaviry (HPV) je heterogenní skupina virů. Nemá obal, je tvořen dvoušroubovicovou DNA a kapsidou, která je složena z hlavního kapsidového a několika vedlejších proteinů. Je přibližně 55 nm velký a má 7,9 kD. V současnosti je definováno přes 120 typů těchto virů. Jsou druhově specifické. Patří do čeledě Papillomaviridae a mají 30 fylogenetických rodů, které jsou pojmenovaný řeckými písmeny a protože řecká abeceda má jenom 24 písmen, tak u nových rodů se používá předpona dyo (podruhé). (Bernard et al. 2010) Z toho 5 rodů tvoří lidské a opičí papillomaviry (α, β, γ ,μ a ν). Druhy jsou označené čísly (de Villiers et al. 2004; Bernard 2005).

- Alfa-papillomaviry se vyskytují u člověka. Tyto viry mají afinitu k dlaždicovému epitelu kůže a sliznice, a můžou způsobit maligní či benigní léze.
- Beta-papillomaviry se podílejí na vzniku maligních i benigních kožních lézí, a to hlavně u pacientů se sníženou imunitou nebo s kožním onemocněním – epidermodysplasia verruciformis, která je podmíněná geneticky. Tito pacienti jsou velmi citliví k infekci HPV 5 a HPV 8. Infikovaná kůže, která je navíc exponována slunci, je náchylná k tvorbě maligních lézí.
- Gamma, Mu a Nu-papillomaviry způsobují benigní kožní léze (Bernard 2005; Doorbar 2006; Ramoz et al. 2002).

První zmínkou o infekčnosti HPV bylo u kožních bradavic, a vyskytla se na začátku minulého století (Rous & Beard 1935). Až o několik let poté byl prokázán jejich vztah k nádorovému onemocnění. Jako první byla dokázána kauzální souvislost HPV infekce a vznik karcinomu děložního hrdla.

Infekce HPV je většinou asymptomatická a přibližně do dvou let se ztratí. Pokud však přetrvává, zvyšuje se pravděpodobnost vzniku léze. Nejčastěji se klinicky projevuje jako bradavice na kůži, papilomy na sliznici dýchacích a polykacích cest, nebo lézí děložního krčku a anogenitální oblasti. Podle toho, zda způsobují maligní nebo benigní léze, jsou viry děleny na nízkorizikové (LR (low risk) HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54…) a vysoce rizikové (HR (high risk) HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45…). Nízkorizikové typy způsobují vznik benigních lézí: papilomů, veruk, laryngeální papilomatózy, dále condylomata accuminata nebo genitální bradavice. Maligní onemocnění, které můžou způsobit vysoce rizikové typy:

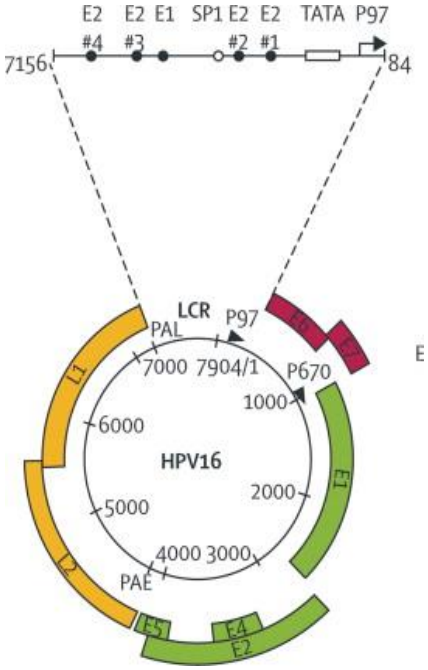
nejvíce je prostudován karcinom děložního čípku, dále pak vaginy, penisu, vulvy, anu a také karcinom hlavy a krku (Doorbar 2006; Bernard 2005; Bernard et al. 2010).

K infikaci dochází v případě anogenitálního traktu při sexuálním styku, kde se virové partikule dostávají přes mikroskopické trhliny na pohlavních orgánech k bazálním buňkám, které jsou mitoticky aktivní. Je ale otázkou, jak dochází k infekci HPV při nádorech hlavy a krku. V některých studiích se popisuje souvislost vzniku HPV-pozitivního nádoru s vyšším počtem sexuálních partnerů či praktikováním orogenitálního sexu (Gillison et al. 1999). Nejčastější lokací je oblast orofaryngu, a to konkrétně patrové mandle, což je pravděpodobně dáno jejich histologickým složením (Frisch & Biggar 1999). V případě kožní infekce dochází k přenosu buďto přímo osobním kontaktem, autoinokulací, nebo zprostředkovaně přenosem přes infikované povrchy. Dále také vertikálním přenosem – při porodu z matky na dítě, kde byla infekce HPV nalezena ve výtěru z dutiny ústní u novorozenců a mladších dětí (Duray et al. 2011; D'Souza et al. 2007; Klussmann et al. 2003;Smith et al. 2007b).

Genom viru obsahuje následující segmenty:

- Otevřený čtecí rámec (Open Reading Frame, ORF), který se skládá z oblasti časných (Early-E) a pozdních (Late-L) genů
- Nekódující oblasti (Long Control Region, LCR). Tyto segmenty jsou odděleny časným (PAE) a pozdním (PAL) polyadenylačním místem (Obrázek 4).

Prvním celým sekvenovaným genomem byl HPV 16, který byl izolovaný z karcinomu děložního hrdla (Doorbar 2006).



Obrázek 4 Genom HPV 16, (Doorbar 2006)

Nekódující oblast je dlouhá přibližně 1 000 párů bází, reguluje expresi, replikaci a skládaní do virových částic. V E (1-8) genech jsou zakódované nestrukturální proteiny regulující virovou transkripci a replikaci. Konkrétně v E1, E2, E4-E7, které jsou nezbytné pro replikaci viru. Časné geny E1, E2, E4, E6 a E7 jsou obsaženy u všech známých typů papillomavirů, geny E3, E5 a E8 pouze u některých.

Protein E1 (ATP-dependentní helikáza) se uplatňuje na počátku replikace viru.

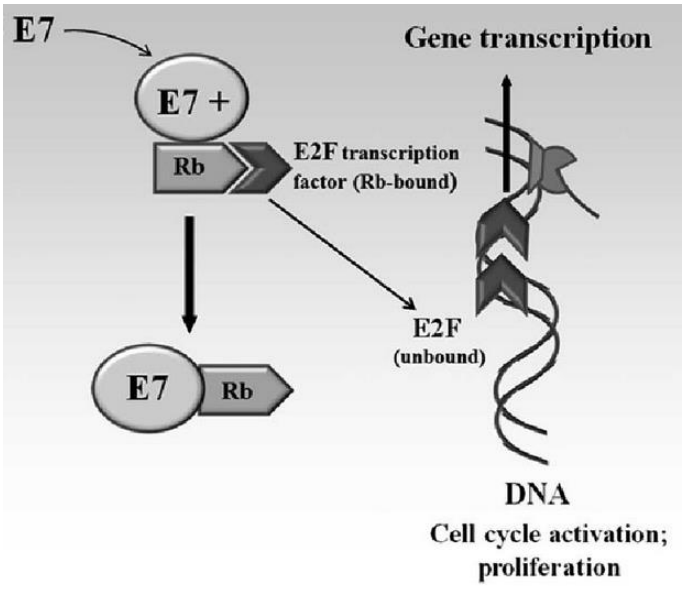
Protein E2 se uplatňuje při regulaci virové replikace a transkripce. Dále zlepšuje vazbu E1. Jeho dimer se váže na specifickou sekvenci v nekódující oblasti, může fungovat i jako represor E6/E7.

K expresi proteinu E4 dochází ve zralých korneocytech. Destruuje keratinové sítě a taky ulehčuje uvolňování partikulí viru z buňky. Jeho sekvence je hodně rozdílná napříč spektrem HPV typů. Aktivita je nejvyšší během vegetativní fáze dělení, a když nastane fáze tvorby L1 proteinu, mizí.

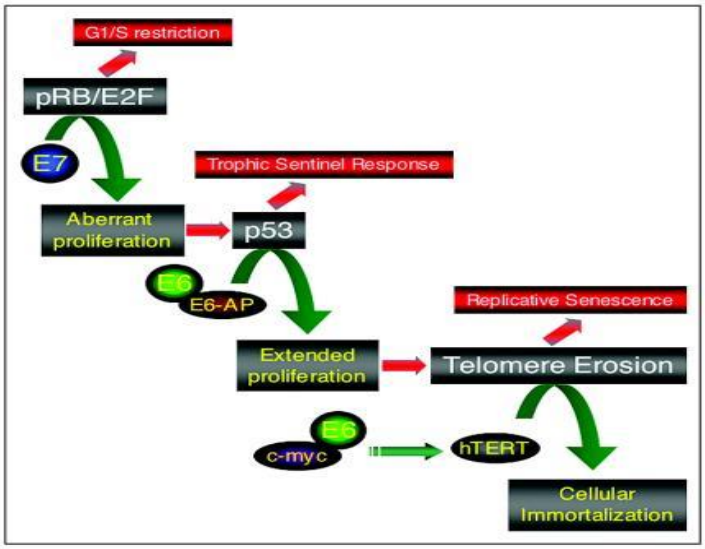
Protein E5 má schopnost modulovat aktivitu buněčných proteinů a podporuje progresi nádoru, hlavně v časných stádiích nemoci. Například inhibuje expresi tumorsupresorového genu pro P21 pomocí aktivace cesty EGFR receptoru, čímž podporuje buněčnou proliferaci. Snižuje také funkci hlavního histokompatibilního komplexu MHC I a dává tak možnost vyhnout se normální imunitní odpovědi (DiMaio & Petti 2013).

Protein E6 je jedním ze dvou hlavních onkoproteinů HPV. Jeho účinek spočívá v interakci s tumorsupresorovým proteinem P53, který reguluje buněčný cyklus, a to v kontrolních bodech fází G1 a G2, a kontroluje přechod buňky do apoptózy. Způsobuje jeho degradaci cestou polyubiquitinizace, zvyšuje aktivitu telomeráz, nebo asociuje s P300 a způsobuje inhibici acetylacie, která aktivuje protein P53 a tím způsobuje ztrátu kontroly buněčné proliferace. Zasahuje taky do pro-apoptotických funkcí jiných proteinů, jako je bak, bax, c-myc.

Protein E7 je druhým důležitým onkoproteinem HPV. Interaguje s proteinem retinoblastomem (Protein retinoblastoma – pRb), který reguluje buněčnou proliferaci (Obrázek 5, 6). Váže se na transkripční faktor E2F, jež je důležitým pro přechod buňky do S-fáze. Faktor E2F tak není inaktivován a výsledkem je ztráta kontroly buněčné proliferace (Cobrinik et al. 1992;Ruttkay-Nedecky et al. 2013).



Obrázek 5 Vazba E7 na pRb (Rutkay Nedecky et al. 2013)

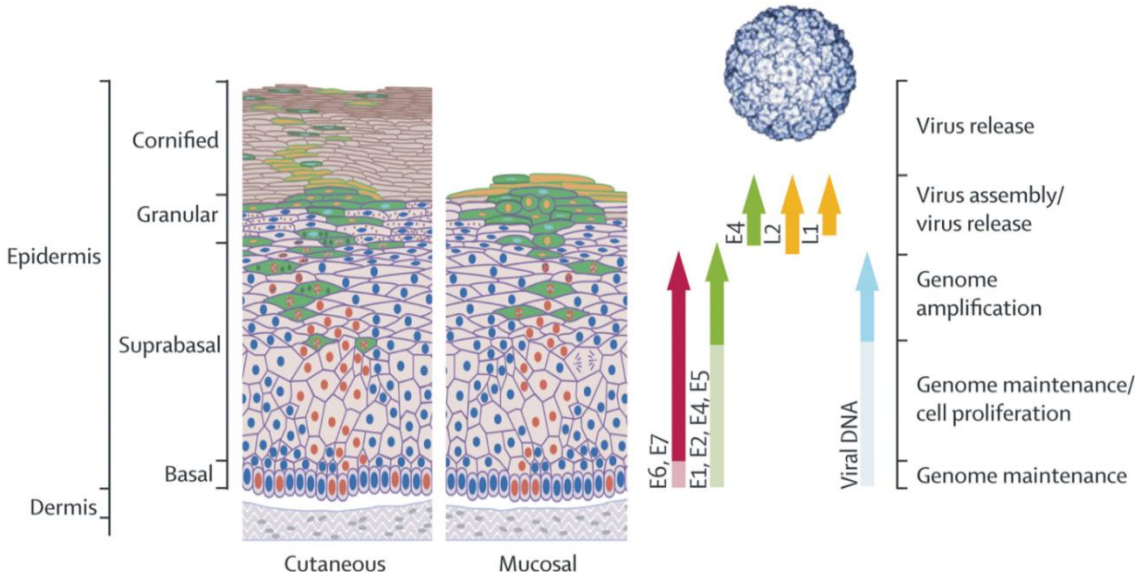


Obrázek 6 Degradace proteinu p53 (Münger et al 2004)

L1 a L2 jsou pozdní geny a jsou v genomu všech papillomavirů. Protein L1 má za úkol se navázat na buňku a tvorbu kapsidy kolem HPV genomu. Váže se na hepran-sufátové proteoglykany na povrchu buněk bazální vrstvy keratynocytů. Má 72 kapsomér, které mají 360 kopií proteinu. Kapsoméry jsou vzájemné propojeny disulfidickými vazbami a spojeny proteinem L2. Protein L2 je zodpovědný za vazbu virové DNA při syntéze virionu a tvorbu kapsidy. Má v kapsidu 12 a více monomerů L2. Oba proteiny mají vliv na infekčnost viru (Doorbar 2006).

1.2.2 Životní cyklus a integrace

HPV virus napadá nediferencované bazální buňky dlaždicového epitelu kůže nebo sliznic. Tam se dostane buď po poranění epitelu, nebo přímo, dostane-li se na místo přechodu dlaždicového epitelu v cylindrický. Pro životní cyklus viru je důležitá proliferační aktivita těchto buněk. Po infekci buněk se v bazální vrstvě vytvoří jen pár kopií. V průběhu diferenciace pak virus přejde do aktivní fáze, během níž vznikne vysoký počet kopií genomu viru (Obrázek 7). Zdravé diferencované buňky dlaždicového epitelu se dále nedělí, postupně odumírají a u kůže se odlupují. HPV však má schopnost svými proteiny udržovat proliferační aktivitu těchto buněk dále, což je pro jeho množení nezbytné (Doorbar 2006;Bernard 2005;Doorbar et al. 2015).



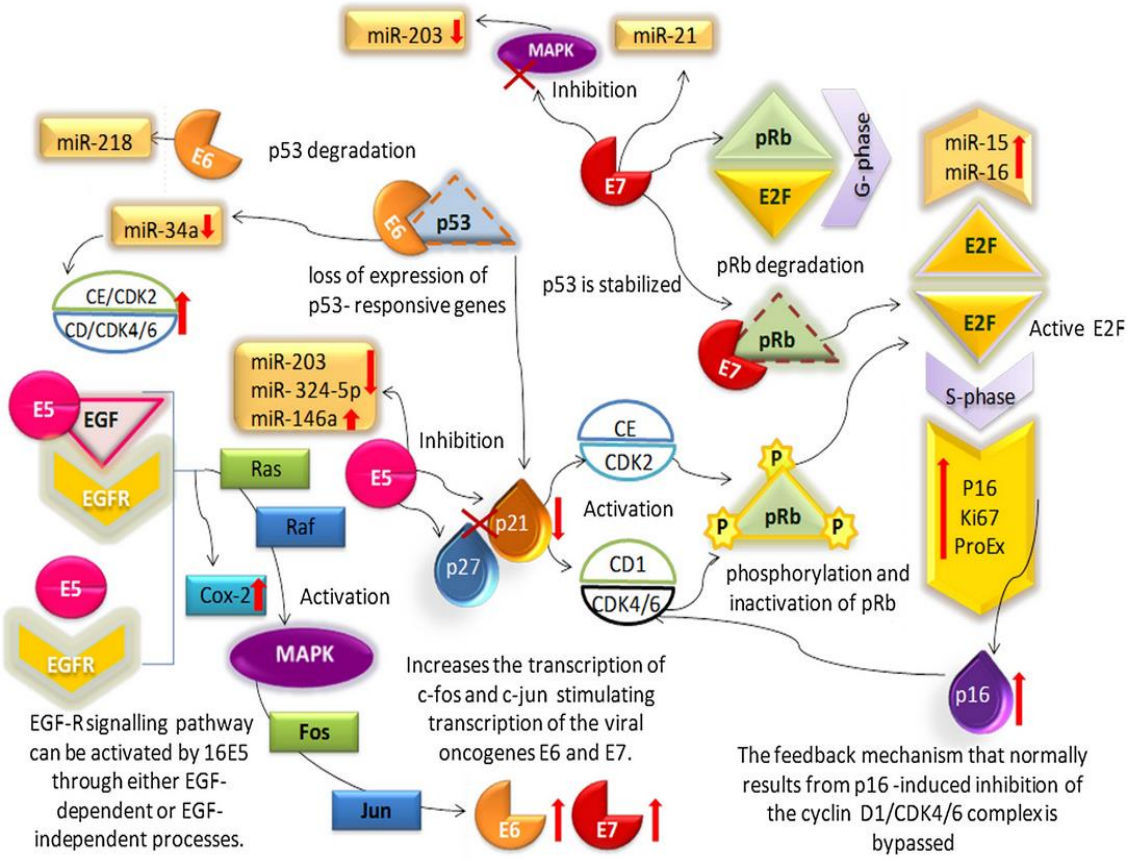
Obrázek 7 Replikace HPV (Doorbar 2006)

Když se HPV dostane k bazálním buňkám, zachytí se na membráně hostitelské buňky a je transportován dovnitř. Důležitou roli při vychytávání viru může hrát proteoglykan heparán sulfát. Pro účinnou infekci vyžaduje HPV přítomnost i sekundárních receptorů, a předpokládá se, že tuto úlohu hraje α 6 integrin (Doorbar 2005). Poté, co se virus dostane do hostitelské buňky, jeho DNA je nejdříve v epizomální formě (není integrována do DNA hostitelské buňky). Je replikována v S-fázi buněčného cyklu spolu s DNA hostitelské buňky. U takto infikovaných buněk se tak vytvoří jenom několik kopií DNA viru. Důležitou roli zde hrají proteiny E1 a E2.

V suprabazálních vrstvách, kde buňky procházejí diferenciací, pak virus přejde do aktivní fáze a dojde k intenzivnější tvorbě virových proteinů. Vznik maligního nádoru může způsobit virus HR HPV a jeho integrace do hostitelského genomu, a několik chromozomálních abnormalit. Důležitou roli zde hrají onkoproteiny E6 a E7. Při integraci HPV DNA do hostitelského genomu dojde k zlomu cirkulární DNA v místě ORF E1/E2 a E4. Další virové onkogeny jsou neporušeny a dál aktivně přepisovány. Po fragmentaci proteinu E2 jako negativního faktoru dojde k mnohonásobnému zvýšení transkripce E6 a E7. Tím se stimulují diferencované buňky do S-fáze buněčného cyklu a tak dojde k dělení.

Inaktivují se tumorsupresorové geny, které jsou nezbytné pro správný buněčný cyklus či apoptózu buňky – jde o P53 a pRb. Po navázání onkoproteinu E7 na protein pRb

inhibuje jeho funkci. V buňce nedochází k opravě DNA a pokračuje dál ve svém cyklu a následně na základě zpětné vazby dochází k vzestupu p16INK4a. U nádorů, kde má HR HPV etiologickou souvislost, byla prokázána ve vysokém procentu zvýšená exprese tohoto proteinu (Smith et al. 2008; Wang et al. 2004; Reuschenbach et al. 2008). Onkoprotein E6 se váže na buněčný protein P53, který degraduje a inhibuje. Ztráta funkce P53 vede k poruše regulace buněčného cyklu a podporuje mutace, chromozomální nestabilitu a následně karcinogenezi hostitelské buňky (Obrázek 8) (Werness et al. 1990; Reuschenbach et al. 2008).



Obrázek 8 Modul buněčného cyklu HPV (De Freitas et al. 2014)

Asi nejvíce byla prozkoumána forma výskytu a následný průběh HPV u karcinomu děložního hrdla, kde na počátku byla důležitá integrace HPV DNA do genomu hostitelské buňky. U HPV 18 to bylo ve 100 % případů, u HPV16 přibližně v 80 %. Premaligní léze CIN3 a carcinoma in situ (CIS) byl nález jak epizomální, tak integrované HPV DNA. CIN I-II byl nalezen nejčastěji v epizomální formě (Hudelist et al. 2005;Vinokurova et al. 2008). U nádorů hlavy a krku jsou však výsledky různé. Jsou práce, které popisují přítomnost

epizomální, integrovanou i přítomnost obou forem HPV DNA pozitivních nádorů (Mellin et al. 2002; Koskinen et al. 2003; Hafkamp et al. 2008).

Integrace HPV do genomu ještě nemusí nutně znamenat, že dojde ke zvýšeným hladinám virových onkogenů nebo že dojde ke konkurenčnímu bujení ve srovnání s buňkami obsahující epizomální formu (Scarpini et al. 2014). Dle různých autorů může být integrace HPV náhodným procesem vyskytujícím se u téměř všech chromozomů, v blízkosti či v rámci křehkých míst či blízko translokačních zlomových bodů, transkripčně aktivních míst nebo v kontrolních genech. Pokud tedy dojde k nádorovému bujení, vzniknou změny v genomu, které se dále přepisují, například vzniknou četné kopie DNA, nebo inter a intrachromozomální přestavby (Wentzensen et al. 2004; Ragin et al. 2004; Khoury et al. 2013). U mnoha z těchto akcí je zdokumentován jejich podíl na vzniku zhoubného nádoru.

1.2.3 HPV a nádory dutiny ústní a orofaryngu

Jak již bylo zmíněno, významnou roli při vzniku většiny nádorů hlavy a krku má kouření, a v kombinaci s abúzem alkoholu se toto riziko prudce vzrůstá. V posledních desetiletích však přibývá pacientů, kde jako důležitý etiologický agens při vzniku malignity dutiny ústní a orofaryngu je HR HPV. Největší zastoupení HR HPV pozitivních nádorů v ORL oblasti mají patrové mandle (Hansson et al. 2005; Rotnaglova et al. 2011). Někteří autoři přirovnávají jednovrstvový epitel tonzily k epitelu děložního hrdla, protože mají poměrně velký povrch vzhledem k přítomnosti hlubokých krypt a taky mechanická obměna buněk je nižší (Frisch & Biggar 1999). To vše zvyšuje predispozici pro proniknutí HPV infekce. Celkově roste incidence HPV pozitivních karcinomů hlavy a krku zatímco incidence karcinomů HPV negativních je stacionární nebo dokonce klesá.

Profil pacientů s HPV pozitivním nádorem je celkově jiný. Na rozdíl od pacientů, kde je nádor způsoben kouřením a alkoholem, je mezi těmito pacienty vysoký podíl nekuřáků a jen mírných konzumentů alkoholu. Mají také častěji vyšší vzdělaní a dobré sociální postavení, jejich celkový zdravotní stav je zpravidla lepší. Dle D'Souzy a spol. (D'Souza et al 2007) je výskyt orofaryngeálního karcinomu spojený s orální infekcí HPV a séropozitivitou HPV, a to bez ohledu na historii konzumace alkoholu nebo tabáku. Častěji postihují tyto nádory muže, i když za poslední desetiletí se pozoruje stoupající incidence i u žen. Věk pacientů s nádory orofaryngu je v dnešní době přibližně o 5 let nižší než před 20 lety, což opět pravděpodobně souvisí s jinou etiologií. Nověji je v některých zahraničních souborech pozorován ještě výraznější posun směrem k nižším věkovým skupinám (Gillison et al. 2015).

Prognóza pacientů s HPV-pozitivním nádorem je na rozdíl od HPV-negativních lepší, a to nezávisle na typu použité terapie, a to i přesto, že tito pacienti mají častěji metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin. Lymfatické uzliny a velikost primárního nádoru jsou významným prognostickým faktorem, ale u HPV-pozitivních nádorů tonzil nemá postižení uzlin prognostický význam (Straetmans et al. 2009).

Důvodem lepšího přežívání pacientů s HPV pozitivními nádory je pravděpodobně fakt, že mechanismus vzniku HPV-pozitivních nádorů je jiný, než u HPV-negativních. Vysvětluje se to teorií, že v těchto nádorech dochází pouze k inhibici tumorsupresorových genů virovými onkoproteiny E6, kdežto u HPV-negativních je podobného efektu dosahováno četnými mutacemi (Mellin et al. 2000). K lepší reakci nádoru na terapii podle další teorie přispívá i imunitní systém a jeho reakce na virus. Roli patrně hraje i to, že se jedná o mladší pacienty bez přidružených závažných komorbidit.

1.2.4 Důkaz přítomnosti HPV a jeho detekce

Dokázat přítomnost HPV v nádoru je možné několika způsoby na molekulární úrovni, a to buď z tkáně nádoru, výplachu dutiny ústní či z krve.

Jde o detekci:

- HPV DNA a RNA z nádorové tkáně a z výplachu dutiny ústní
- P16 a P53 – imunohistochemicky z nádorové tkáně
- HPV specifických protilátek – z krevního séra

Je však třeba mít na zřeteli, že přítomnost viru ještě neznamená, že je zapojen jako etiologický faktor. Je třeba využít markery, které přímo poukazují na jeho zapojení do kancerogeneze, a odlišit tak ty, kde HPV je jenom náhodnou infekcí.

1.2.4.1 Detekce HPV DNA

HPV DNA můžeme získat z nádorové tkáně, nebo z buněk získaných z výplachu dutiny ústní. Nejčastější metodou je polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chaine Reaction, PCR). Při ní se užívají buď primery se širokým spektrem (identifikují celou řadu HPV) cílené na úseky specifické pro region (např. L1) a HPV typizace je dále provedená obrácenou hybridizací (reverse line blot – RLB) se sondami specifickými pro 37 typů. Lze také využít typově specifické primery. V případě, že výsledek není jednoznačný, využívá se dále metoda sekvenace.

Metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace) je založená na využití DNA sond, které jsou značené fluorochromem. Tato sonda se váže k cílové sekvenci DNA, a to pak můžeme sledovat pod fluorescenčním mikroskopem vybaveným vhodným filtrem.

V nádorových tkáních dutiny ústní a orofaryngu jsou zastoupeny alfa-papilomaviry, kde je nejčastějším identifikovaným typem typ HR HPV 16. Další typy jsou pak HR HPV 18, 33, 35, 52 a 58. Nejčastější lokalizace těchto typů nádorů je v tonzilách (průměrně v 70 %) (Rotnaglova et al. 2011), dále v oblasti kořene jazyka, a nejméně je to v oblasti dutiny ústní (Tachezy et al. 2009). To, že se HR HPV podílí na vzniku nádoru – hlavně tonzilárniho, ukazuje i stav, kdy zastoupení tohoto viru v tkáni nepostižené nádorem je hodně nízké. Studií zabývajících se prevalencí HR HPV v nenádorové tonzilární tkáni není mnoho, nicméně uvádějí prevalenci v rozmezí 0-8%. Nenádorová tonzilární tkáň byla získána od pacientů po tonzilektomii pro chronickou tonzilitidu, peritonzilární absces či SAS (Sleep Apnoe Syndrom – syndrom spánkového apnoe) (Kreimer et al. 2010;D'Souza et al. 2014).

Přítomnost HPV DNA ve výplaších dutiny ústí dále korelovala s přítomností HPV v nádorové tkáni a ve většině i s typem viru. To poukazuje na možnost využití neinvazivního vyšetření HPV infekce v ORL oblasti. Na rozdíl od nádorové tkáně se ve výplachu objevuje i nízkorizikový typ HPV (Koslabova et al. 2013;Smith et al. 2004).

1.2.4.2 Detekce RNA

Přítomnost HPV DNA v nádorové tkáni ještě neznamená, že je zapojený do kancerogeneze. Jednou z možností, jak zjistit jeho transkripční aktivitu, je detekce mRNA, a to konkrétně HPV E6 a E7 mRNA (Lindquist et al. 2007), protože v nádorové tkáni podmíněné HPV infekcí se tvoří poměrně velké množství virových onkoproteinů E6 a E7. To se považuje za přímý marker HPV infekce.

PCR specifická pro onkoprotein HPV 16 E6* I mRNA se provádí na cDNA získané reverzní transkripcí z izolované a DNázou opracované RNA. Tato metoda nevyžaduje zmraženou tkáň, ale může využít i tkáň fixovanou formalinem, nebo tkáň v parafinu. Korelace HPV 16 E6* I mRNA se vzorkem tkání nádorů tonzil pozitivní na HPV 16 DNA byla v našich výsledcích vysoká – 93 % (Rotnaglova et al. 2011). I když je detekce E6/E7 mRNA přijatá jako standard pro prokázání etiologické souvislosti HR HPV a nádorem, není tato metoda vzhledem k riziku degradace RNA a své náročnosti vhodná pro použití v běžné praxi. Z toho důvodu byly testovány další markery aktivní infekce HPV.

Další možností je vyšetření integrace HPV DNA do genomu hostitelské buňky, a to zjištěním přítomnosti HPV E2 RNA, kde jeho nepřítomnost a zároveň detekce vysokých hodnot exprimovaných onkoproteinů E6/E7 značí jeho integraci. Na druhé straně může jeho přítomnost u HPV pozitivního nádoru vypovídat o jeho epizomální formě.

1.2.4.3 Imunohistochemie P16 a P53

Další možností, jak zjistit přítomnost HPV v nádorové tkáni, je detekovat P16 a P53 pomocí imunohistochemie. Jedná se o markery, které mají velmi dobrou korelaci s DNA i RNA viru a také značí jejich zapojení do kancerogeneze. Poukazují na aktivitu onkoproteinů viru. Jak již bylo zmíněno výše, tumorsupresorový gen TP53 u HPV pozitivních nádorů je působením virového onkoproteinu E6 inhibovaný, a ztrácí tím svoji funkci. Na rozdíl od nádorů hlavy a krku způsobených kouřením a alkoholem, je TP53 mutovaný a tyto nádory jsou rádiorezistentnější – pacienti mají horší prognózu přežití. U proteinu P16 má důležitou roli virový onkoprotein E7, který inhibuje funkci pRb (viz nahoře). Jeho nejvýznamnější protein je z rodiny INK4a – cyklin-dependentní kináza p16. V buňce nedochází k opravě DNA, pokračuje dál v cyklu a následně dochází k vzestupu p16INK4a na základě zpětné vazby. P16 je poměrně spolehlivý, specifický marker, který poukazuje na aktivitu viru, a na rozdíl od mRNA je méně náročný na detekci (Hoffmann et al. 2010;Rotnaglova et al. 2011). Tato metoda je dnes již rutinně používaná a má poměrně vysokou senzitivitu a specificitu.

1.2.4.4 Sérologie

Imunitní systém reaguje na virovou infekci tvorbou specifických protilátek. V případě HPV infekce jsou to dva typy – protilátky proti hlavnímu pozdnímu kapsidovému proteinu (L1) a protilátky proti časným antigenům – onkoproteinům E6 a E7.

Velký kapsidový protein L1 je na povrchu virionu a při infekci se jako první dostává do kontaktu s hostitelským imunitním systémem, čímž stimuluje imunitní odpověď organizmu. Pro detekci protilátky proti kapsidovému proteinu se používají částice podobné viru (Virus-Like Particles, VLP), tvořené z kapsidy bakulovirových rekombinant, které exprimují L1 (u typů 6, 16, 18, 31, 33) nebo oba proteiny (L1 a L2) (typ 11). Detekovatelné hladiny protilátek se v periferní krvi objevují 1 – 12 měsíců po infekci, jejich množství záleží kromě jiného na intenzitě a délce infekce.

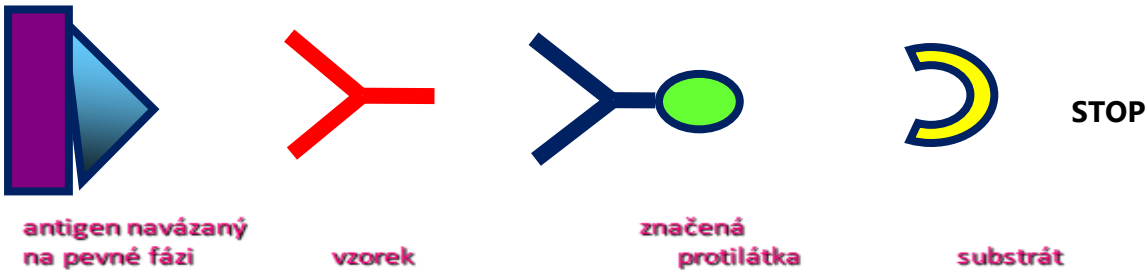
Další detekovatelné protilátky jsou proti onkoproteinům E6 a E7 a úžeji souvisejí s vývojem nádoru, především proti vysoce rizikovým HPV, hlavně HPV 16 (Gillison et al.

2000;Lehtinen et al. 2003). K detekci se používají proteiny virových antigenů s GST (glutation-s-transferáza), které jsou připravované v bakteriálním expresním systému.

Zatímco VLP protilátky odrážejí celoživotní expozici HPV, protilátky E6 a E7 se jenom zřídkakdy vyskytují u zdravých jedinců, jak již bylo dokázáno v pracích u cervikálních karcinomů (Hamsikova et al. 2000;Di et al. 1998). Také hladina titru protilátek po úspěšné terapii klesá. Proto by se tyto markery se daly používat při dispenzarizaci pacienta s HPV pozitivním nádorem hlav a krku po ukončení terapie, což by pomohlo odhalit recidivu onemocnění.

K detekci protilátek se používá metoda ELISA – enzymoimunoanalýza (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), která využívá kombinace enzymaticky značené protilátky s absorpcí některé reakční složky na vhodný povrch, například na důlek sérologické destičky. Používá se na detekci antigenů, protilátek, nádorových markrů, toxinů a jiné.

ELISA má několik variant. Všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky. Imunoglobuliny mají schopnost vázat se na povrch plastů a jsou schopné vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. Takže na povrchu jamky polystyrenové destičky je vázán antigen. Poté se do jamky přidá zkoumané sérum, a pokud je v něm přítomné protilátka, tak se naváže na antigen, který lpí na jamce. Po přemytí se přidá další protilátka (komerčně dostupná a značená barvičkou, nebo enzymem). Po dalším přemytí se přidá substrát a vznikne barevná reakce (Obrázek 9). Tu je pak možné spektrofotometricky detekovat podle změny barvy.



Obrázek 9 Schéma metody ELISA

2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

HPV hraje důležitou roli v procesu kancerogeneze. Předpokládá se, že prozkoumání markerů HPV infekce přispěje k zlepšení diagnostiky nádoru iniciované HPV a v průběhu dispenzarizace pomůže k brzkému odhalení recidivy. Slibnými cestami tohoto výzkumu a zároveň cíli předkládané práce byly následující studijní oblasti:

- Zjistit prevalenci a typovou specificitu HPV u pacientů s dlaždicobuněčným nádorem orofaryngu a dutiny ústní
- Zjistit, jestli je v HPV DNA pozitivních dlaždicobuněčných karcinomech dutiny ústní a orofaryngu přítomný virus i ve výplaších dutiny ústní, a zjistit přítomnost protilátek proti HPV infekci v krvi pacienta
- Ověřit vhodnost a možné využití pro klinickou praxi neinvazivních markerů HPV infekce – přítomnost protilátek a přítomnost HPV DNA ve výplachu pro přesný výběr pacientů s onemocněním spojeným s HPV a následně jejich využití v dispenzarizaci pacienta po terapii
- Zjistit, zda se navzájem klinicky a demograficky liší pacienti dle HPV pozitivity či negativity nádoru
- Zjistit, zda pacienti s dlaždicobuněčným karcinomem dutiny ústní a orofaryngu, kde do etiologie je zapojen HPV, lépe přežívají

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 SOUBOR PACIENTŮ

Do této studie byli zařazeni chirurgicky léčeni pacienti pro primární, histologicky verifikovaný dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní a orofaryngu (MKN-10: C01–C06,C9–10) na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole mezi lety 2001 – 2007.

Tato studie byla schválená etickou komisí FN v Motole a ÚHKT v Praze. Pacienti, kteří byli zařazení do studie, podepsali informovaný souhlas a taky vyplnili dotazníky týkající se kouření a konzumace alkoholu, zjišťovala se sociální a pracovní anamnéza, vzdělání a sexuální chování. Celkem bylo do studie zařazeno 142 pacientů. Všem jsme při zařazení do studie odebrali 10 ml krve, s výjimkou jednoho byl proveden výplach dutiny ústní a u všech se odebral v průběhu operace vzorek nádorové tkáně. Dále byli zařazení pacienti léčeni podle protokolu kliniky a dispenzarizováni po celou dobu trvání studie. Všechny údaje a dotazníky spolu s výsledky byly zpracovávaný anonymně a spolupracovníci v laboratoři neměli přístup k údajům, podle kterých by pacienta mohli identifikovat.

Po ukončení terapie byl každý zařazený onkologicky léčený pacient dále dlouhodobě sledován a byl zaznamenáván jeho zdravotní stav. Měsíc a rok po léčbě byla opět odebrána krev – 10 ml – a rok po terapii byl proveden i výplach dutiny ústní.

3.2 VZORKY TKÁNĚ TUMORU

V průběhu operačního výkonu byl z primárního nádoru odebrán vzorek velikosti asi 5x5 mm a rychle transportován na Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK do laboratoře. Všichni pacienti, kromě tří z nich, byli primárně léčeni chirurgicky. U tří pacientů léčených nechirurgicky byl v lokální anestezii biopticky odebrán vzorek a byl zpracován stejně jako perioperačně získaná tkáň.

Vzorek byl patologem rozdělen na dvě části. Jeden byl zmražen na teplotu -70 °C a uložen pro další vyšetření a zkoumání. Druhá část byla fixována (10% neutrální pufrovaný formol) a následně zalitá do parafinu. U každého parafinového bločku byl patologem vždy vyšetřen první řez, který ověřil, zda obsahuje minimálně 10 % nádorových buněk, další dva řezy byly uchovány pro další vyšetření v laboratoři ÚHKT, kde se izolovala

DNA a RNA, a pro imunohistochemické vyšetření patologem. Poslední řez pak byl opět vyhodnocen na obsah potřebného množství nádorové tkáně.

3.3 VÝPLACH DUTINY ÚSTNÍ

Všem pacientům při zařazení do studie, a rok po ukončení terapie všem žijícím pacientům byl odebrán výplach z dutiny ústní. Pacient si po dobu 30 sekund vyplachoval dutinu ústní 5 ml sterilního fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 7.4; AccuGENE, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium). Výplach byl uložen do lednice při +4 ºC a následující den odeslán do laboratoře ke zpracování. Vzorky byly stočeny po dobu 7 minut při 3 000 otáčkách za minutu, usazenina se dvakrát promyla 30 ml PBS a 10 ml PBS v uvedeném pořadí, a buňky byly resuspendovány v 5 ml PBS. Počty dlaždicových a bazálních buněk na 1 ml suspenze byly stanoveny v hemocytometru. Tím se určilo množství buněk, z kterých bylo možné izolovat DNA. Průměr bazálních buněk byl kolem 10^4 – 10^5/ml, a spinocelulárních buněk 10^4 – 10^5/ml. Buňky byly rozděleny do alikvotů a zmraženy na -70 °C.

3.4 KREV

Při vstupu do studie bylo odebráno od všech pacientů 10 ml srážlivé krve. Dále byl odběr od přeživších pacientů proveden měsíc a rok po ukončení léčby. Krev jsme skladovali při +4 ºC a maximálně den po odběru jsme ji odeslali do laboratoře. Tam bylo sérum získané stáčením při 1 600 otáčkách po dobu 10 minut uloženo v mikrozkumavkách (typ Eppendorf) při teplotě -20 °C.

3.5 IZOLACE DNA A RNA

3.5.1 Parafinové řezy s biopsiemi

Z parafinových řezů tlustých 20 μm byla izolována HPV DNA a RNA. Aby se předešlo případné kontaminaci, byl každý pátý řez čistý parafin. Všechny nástroje použité při manipulaci s každým jednotlivým vzorkem byly ošetřeny etanolem.

Xylenem jsme odstranili parafín z řezu. V 62 vzorcích byla provedena extrakce DNA pomocí proteinázy K 200 μg ml^{-1} inkubací (Sigma, St. Louis, MO, USA) v lyzačním pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, pH 8, 1% Tween 20) po dobu 2 hodin při 55°C. Proteináza K byla inaktivována při 95 ºC po dobu 10 minut a vzorky byly skladovány

při teplotě -20 ºC. Na každých devět vzorků připadl jeden negativní – kontrola, která byla zařazená do procesu přípravy DNA. Do studie jsme pak zavedli novou metodu extrakce, která umožnila současnou extrakci DNA i RNA. Dalších 80 vzorků bylo zpracováno pomocí Ambion RecoverAll™ Total Nucleic Isolation Kit pro FFPE tkání (Applied Bioscience, Austin TX, USA). Parafín jsme i zde vymyli xylenem a následně inkubovali s Digestion pufrem a proteinázou K při 50 °C po dobu 3 hodin. Část vzorku (polovinu) jsme odebrali a ta byla použitá k izolaci RNA. Pro izolaci DNA jsme pokračovali inkubací dalších 48 hodin. Poté jsme přidali Isolation aditive a promíchali, přidali etanol a vzorek jsme nanesli do kolonek, dali do centrifugy a propláchli roztokem Wash 1 a Wash 2/3. Další inkubace se provedla po přidání RNázy, a opět jsme propláchli roztokem Wash 1 a Wash 2/3. Roztokem Elution solution jsme odstranili DNA a skladovali při -20 °C. Izolace RNA probíhala hned po počáteční tříhodinové inkubaci. Postup byl stejný jako při izolaci DNA, jenom DNA byla odstraněna DNázou. Výsledný produkt se dále skladoval při -70 °C.

Pozornost byla věnována zejména zabránění křížové kontaminace vzorků.

3.5.2 Výplach dutiny ústní

Na začátku jsme dle protokolu firmy izolovali DNA z výplachů dutiny ústní za pomoci kitu Qiagen DNA Blood Midi Kit firmy Qiagen. Vzorek byl nejdříve rozmražen, pak jsme k němu přidali Proteasu Q a AL pufr a inkubovali 10 minut při 70 °C. Poté bylo ke vzorku přidáno 100 % etanolu a centrifugovalo se přes kolonky Qiagen. Pak byl vzorek promyt pomocí pufru AW1 a AW2. Pomocí AE pufru jsme promyli DNA, přesráželi s etanolem a rozpustili v 10 mmol/l Tris-HCl pufru s pH 8,0, kde konečná koncentrace DNA byla ze 7 500 buněk v 1 µl. Další skladování vzorků bylo při teplotě -20 °C.

V průběhu studie jsme změnili postup a kit (metoda Gentra Puregene firma Qiagen) k izolaci DNA, protože se prokázala větší výtěžnost viru – pozitivita byla o 20 % větší. Proto jsme všechny negativní a další nové vzorky vyšetřovali tímto kitem. DNA pro detekci HPV byla extrahována z minimálně 250 000 buněk.

Zkumavky jsme pak při laboratorní teplotě centrifugovali při 3 000 RPM 5 min, supernatant následně odsáli, přidali 300 µl lyzačního roztoku a 5 µl proteinázy K a inkubovali při 55 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci jsme přidali 1,5 µl roztoku RNAsy A a dále inkubovali při 37 °C 15 minut. Vzorky jsme rychle zchladili na pokojovou teplotu pomocí ledu, pak přidali 100 µl roztoku rozpouštějícího proteiny, promíchali, uložili na led

na pět minut a poté centrifugovali při 14 000 RPM. Do čisté zkumavky jsme pak přenesli supernatant a promyli 100% isopropanolem a 70% etanolem, opět stočili a supernatant odstranili. Pak jsme k sedimentu ještě přidali DNA pufr tak, aby výsledný objem měl DNA ze 7 500 buněk v 1 μl. Posledním krokem byla ještě inkubace vzorku hodinu při 65 °C a skladovali jsme jej při -20 °C.

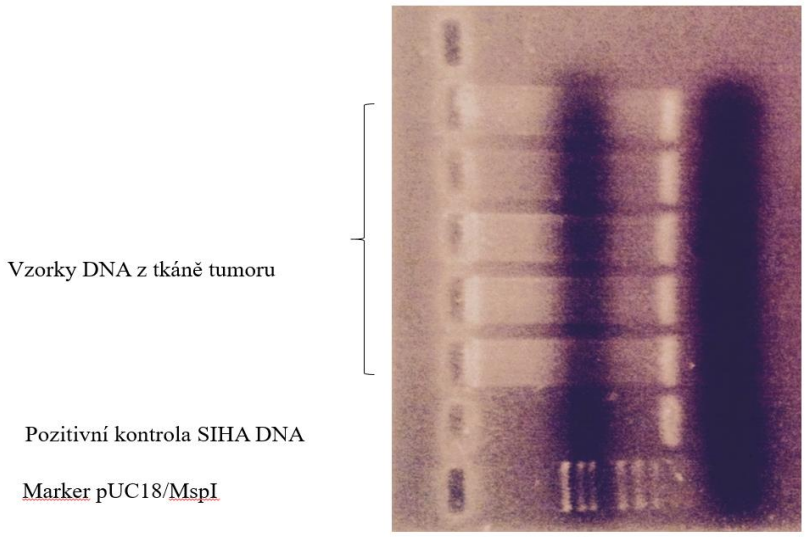
Tady jsme taky na každých 7 vzorků přidali jednu zkumavku s vodou pro monitorování eventuální kontaminace mezi vzorky v průběhu zpracování.

3.6 PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

3.6.1 PCR kontrolního genu u DNA z parafínových řezů – beta-globinová PCR

Tato PCR byla provedená jako první u každého vzorku. Ukazuje na nepřítomnost inhibitorů, a zda je ve vzorku dostatečné množství DNA.

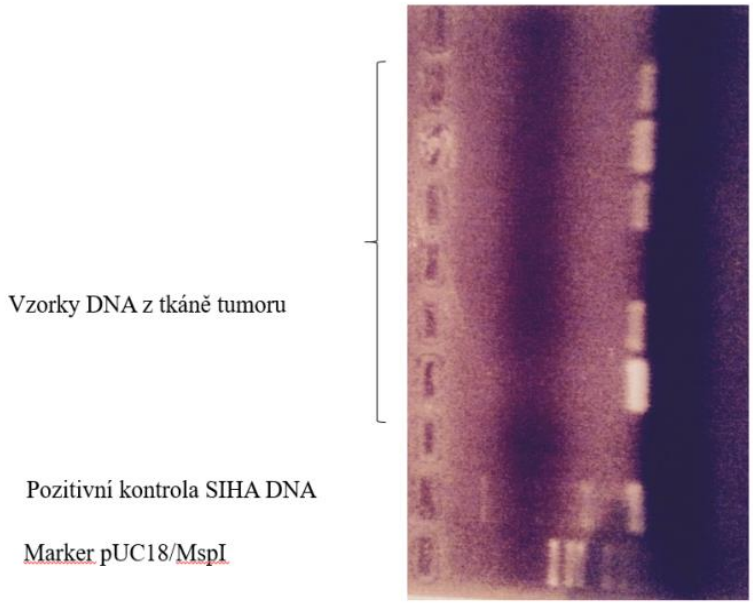
Amplifikovali jsme z genu pro lidský beta-globin fragment (110 pb), na který jsme použili primery PC 03 (5´ACACAACTGTGTTCACTAGC3´) a PC 04 (5´CAACTTCATCCACGTTCACC3´)(Gravitt et al. 2003). Tato reakční směs obsahovala 1x koncentrovaný reakční pufr (Fermentas), 4,0 mmol/l MgCl2, 0,2 mmol dNTP, 0,05 pmol z každého primeru (PC 03 a PC 04) a 2,5 U Taq polymerázy (Fermentas). Celkový objem činil 50 μl. Poté se zkumavka se vzorkem vložila do cykleru. Program pro tuto PCR začínal s počáteční denaturaci 5 minut při 95 ˚C, a poté se 40 cyklů skládalo z denaturace 1 minutu při 95 ˚C, hybridizace primerů při 55 ˚C další 2 minuty a následně syntéza řetězců 2 minuty při 72˚ C. Na konci syntézy všech řetězců se přidala ještě inkubace, která trvala 3 minuty při 72 ˚C (Obrázek 10).



Obrázek 10 Výsledek elektroforézy PCR produktů detekce beta-globinu u vybraných vzorků

3.6.2 GP5+/GP6+BIO PCR - detekce HPV v DNA z tkáně v parafinových blocích a z výplachu dutiny ústní

Detekci HPV jsme provedli u všech vzorků, u kterých byl kontrolní gen pozitivní. Použili jsme obecní primery GP 5+ (5´TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3´) a GP 6+ značený biotinem (GP6+BIO) (5´GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC3´), které amplifikují úsek v L1 genu dlouhý 150 pb (Snijders, 1990). Reakční směs tvořilo 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,5; 50 mmol/l KCl, 4 mmol/l $MgCl_2$, 200 μM každého dNTP, 0,5 pmol primerů GP5+ a GP6+ a 1 U AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems). Celkový objem tvořil 50 μl. Vzorek se vložil do cykleru na program, který začínal počáteční denaturaci 5 min při 94 °C, a dále tvořil 40 cyklů, který se skládal z denaturace 90 sec při 94 °C, hybridizace primerů 30 sec při 38 °C a syntézy řetězce 80 sec při 71 °C. Poslední cyklus, který dokončil syntézu řetězců, trval 4 min při 71 °C (Obrázek 11).

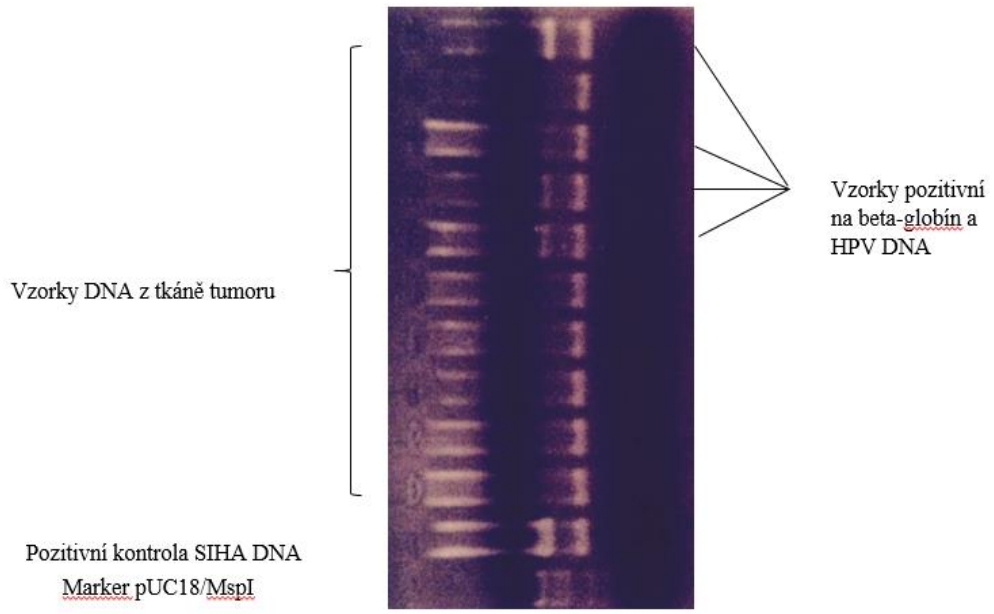


Obrázek 11 Výsledek elektroforézy PCR produktů detekce beta-globinu u vybraných vzorků

3.6.3 MY09/11 PCR

U vzorků se sporným výsledkem – výsledek byl jasně pozitivní na HPV na gelu a negativní při typově specifické hybridizaci, se dále provedla MY09/11 PCR a výsledek se dále použil k sekvenaci. Primery pro tuto PCR tvořili MY09 (5´CGTCCMARRGGAWACTGATC3´) a MY11 (5´GCMCAGGGWCATAAYAATGG3´), které amplifikují úsek v L1 genu dlouhý 450 pb (CP PCR L1) (Manos et al., 1989) a současně primery GH20 a PC04 pro lidský beta-globin. Reakční směs byla složená z 1x koncentrovaného reakčního pufru (Fermentas), 4,0 mmol/l MgCl2, 0,2 mmol každého ze čtyř dNTP, 0,5 pmol každého primeru (MY09 a MY11), 0,05 pmol primerů GH20 a PC04 a 2,5 U Taq polymerázy (Fermentas). Dále se přidala izolovaná DNA – 4 μl – a voda do celkového objemu 50 μl. Poté se vzorek vložil do cykleru, kde na začátku byla provedená denaturace 5 minut při 95 °C. Poté pokračovala PCR ve 40 cyklech, kde se každý cyklus skládal z minutové denaturace při 95 °C, dvouminutové hybridizování primeru při 55 °C a syntéza řetězce 2 minuty při 72 °C. Na závěr a ukončení cyklu se přidala inkubace při 72 °C, která trvala 3 minuty (Obrázek 12).

V cykleru PTC 200 firmy MJ Research, INC se amplifikovala DNA. Po dokončení bylo z každého vzorku 10 µl PCR produktu použito na elektroforézu v 3% agarozovém gelu (NuSieve 3:1, FMC BioProduct). Elektroforéza byla provedená po každé PCR.



Obrázek 12 Výsledek elektroforézy PCR produktů detekce HPV DNA a beta-globinu u vybraných vzorků

3.7 OBRÁCENÁ HYBRIDIZACE

HPV typizace byla provedena obrácenou hybridizací (Reverse Line Blot, RLB), která má sondy specifické pro 37 typů. Komerčně připravené specifické oligonukleotidy, jsme kovalentně navázali na negativně nabitou membránu – Biodyne C přes aminoskupinu na 5´ konci. Membránu jsme nejdříve aktivovali 16% 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimidem (EDAC). Poté jsme membránu promyli a dali do blotovacího zařízení MN45 (Inogmunetics). Poté jsme na membránu nanesli připravené amplikony a inkubovali při 42 ºC. Po hodině jsme membránu přeložili, 2x promyli a inkubovali pomocí streptavidinového konjugátu značený peroxidázou 1 hodinu při 42 ºC. Poté jsme membránu promyti a navázané amplikony jsme detekovali za pomoci ECL detekčního kitu (Amersham Biosciences), který je chemiluminiscentní. Následně jsme membránu detekovali na LumiFilm (Roche) po dobu 10 sekund, 1 minutu a 5 minut (Obrázek 13).

Obrázek 13 Membrána detekovná na LumiFilm po jedné minutě

3.8 METODA SOUTHERN BLOT

Southern blot je metoda, kterou jsme potvrdili specificitu amplifikace primerů MY09/11, a to hybridizací PCR produktů. Na gel byl nanesen PCR produkt, ten byl krátce depurinován v 0,25 mol/l HCl a poté ponořen do roztoku alkalického pH (0,4 mol/l NaOH, 0,6 mol/l NaCl) na 10 minut, který se používá na přenos DNA na membránu (nylonová membránu Biodyne B (Pall Biosupport)). Neutralizace membrány byla provedená 15 minut v 1 mol/l Tris-HCl, pH 7,4 a 1,2 mol/l NaCl. Dál jsme prováděli hybridizaci se směsí pěti prób dlouhých 410 pb, které jsou specifické pro HPV11, 16, 18, 31 a 51, a oligopróby pro lidský beta-globin. Za použití typově specifických primerů a DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim) jsme generovali a značili PCR HPV próby. Membránu, na které byli nanesené vzorky, jsme poté dvě hodiny prehybridizovali v přehybridizačním pufru při 42 °C – složení: 5x high grade SSC, 20 % formamid, 0,1 %

ficoll, 0,01 % BSA, 50 mM Na_2PO_4, 0,1 % high grade SDS, 0,1 mg/ml Herring sperm DNA. Pak jsme k tomuto roztoku přidali próby a tuto membránu jsme hybridizovali přes noc při 42 °C. Navázanou próbu jsme dvakrát odmyli po pěti minutách v 30 ml roztoku A (2xSSC; 0,1%SDS) při pokojové teplotě. Pak třikrát po třicet minut v 300 ml roztoku B (0,5xSSC; 0,1%SDS) při 50 °C. Poté jsme provedli detekci s použitím setu - DIG-Wash and Block Buffer, Anti-digoxigenin-AP (FAB fragment), CSPD ready-to-use (Boehringer Mannheim). Promývacím roztokem (30 ml, složení: kyselina maleinová (0,1 mol/l), NaCl (0,15 mol/l), Tween 20 (0,3%), pH 7,5) jsme následně ekvilibrovali membránu a inkubovali v blotovacím roztoku (složení: kyselina maleinová (0,1 mol/l), NaCl (0,15 mol/l) a 3,5 % blokovací reagens) 45 minut. Pak jsme přidali FAB fragment a inkubovali dalších 30 minut. Membránu jsme opět třikrát promyli 15 minut ve WB (30 ml) a v detekčním roztoku ekvilibrovali (složení: Tris-Cl (0,1 mol/l); NaCl (0,1 mol/l), pH 9,5) pět minut. Takto připravenou membránu jsme ještě inkubovali s CSPD pět minut při laboratorní teplotě a nakonec ještě při 37 °C po dobu 15 minut. Poté se membrána půl hodiny exponovala na Lumi-Film Chemiluminescent Detection (Boehringer Mannheim).

3.9 SEKVENACE

Jak již bylo zmíněno výše, u všech diskrepančních vzorků, kde na gelu byl jasný proužek a při reverzní hybridizaci nebyl určen typ, jsme na jeho typizaci provedli sekvenaci. Pomocí Qiagen kitu (MinElute Gel Extraction kit) jsme izolovali PCR produkt z 2% agarozového gelu (NuSieve GTG agarose, FMC BioProducts) a následně jsme provedli sekvenaci pomocí BigDye Terminator Primer Cycle Sequencing kitu (Perkin Elmer Corporation). Analýza byla provedená na ABI PRISM 310 (Perkin Elmer Corporation) - automatický sekvenátor.

3.10 IMUNOHISTOCHEMIE

U parafinových řezů jsme provedli imunohistochemické vyšetření. Na detekci proteinů P16 a P53 jsme použili protilátky - Purified Mouse Anti-Human P16, Clone G175-405, BD Pharmingen™ (proti P16) s ředěním 1:100, a Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, Dako (proti P53) s ředěním 1:50. Nejdříve jsme pomocí vzestupné řady alkoholů odstranili z řezů parafin. Vzorky byly podrobené varu v citrátu, aby se demaskoval antigen (P16 30 minut a P53 40 minut). Dále jsme přidali H2O2, aby se zablokovala vnitřní enzymatická aktivita. Pak jsme přidali protilátky a inkubovali přes noc. Další den se vzorky odmyly a tím se odstranil přebytek protilátky, poté provedli detekci za pomoci sekundární

protilátku s chromogenem (3,3´-diaminobenzidin tetrahydrochlorid hydrát (Fluka)). Preparáty se dále obarvily hematoxylinem/eosinem pro lepší orientaci. Posledním krokem bylo odvodnění preparátů vzestupnou řadou alkoholu.

Hodnocení výsledků tohoto vyšetření bylo jednak z pohledu intenzity (+ až +++), i dle procenta obarvenosti – obarvené vs. neobarvené buňky. Pro statistiku bylo použito semikvantitativní vyjádření: vzorek byl hodnocen pozitivní na P53, když bylo zabarveno nejméně 10 % buněk, a pozitivní na P16 tehdy, když bylo zabarveno minimálně 50 % buněk a to jak v jádře, tak v cytoplazmě.

Pro pozitivní vnitřní kontrolu pro P53 byly použity bazální keratinocyty normálního dlaždicobuněčného epitelu z orofaryngeální sliznice nebo patrové mandle, které měly pozitivní barvení. Pro pozitivní vnější kontrolu byl použit invazivní karcinom prsu s pozitivním barvení jader u pacientek s mutací TP53. Pro detekci proteinu P16 byly použity jako pozitivní kontrola dysplastické buňky cervikálního epitelu, které byly infikované HPV.

3.11 SÉROLOGIE

3.11.1 Příprava VLP – Virus-Like Particles

Rekombinantním bakulovirem jsme hmyzí buňky Sf9 (asi $4x10^9$, které jsme pěstovali v hmyzím médiu s 10% fetálním telecím sérem) infikovali při multiplicitní infekci 10 PFU na buňku. Tyto baculoviry mají genetickou informaci pro protein L1 HPV, a to pro více typů – nízko i vysocerizikové HPV-6,11,16,18, 31 a 33. Po infikaci – za 72 hodin – jsme buňky sklidili, propláchli PBS 1x a pelet se zmrazil na -20 °C.

V dalším kroku jsme tento buněčný pelet resuspendovali ve 40 ml extrakčního pufru (10 mmol/l $MgCL_2$, 50 mmol/l $CaCl_2$, 150 mmol/l NaCl, 0,01% Triton X-100, 20 mmol/l HEPES, pH 7,4) a sonikovali třikrát 30 sekund při 0° C. Po centrifugaci jsme resuspendovali pelet znovu a to v extrakčním pufru (40ml). To vše jsme opakovali 2x. Pak jsme oba tyto supernatanty spojili a nasytili je do celkové 30% koncentrace chloridem cesným. Tento roztok jsme centrifugovali 22 hod při teplotě 18 °C a 45 000 otáčkách/min. Poté jsme odebrali horní proužek, dialyzovalo se 30 minut proti PBS a znovu dělilo na CsCl „step" gradientu (36%, 30,5%, 16%) 4 hod při 18 °C a 35 000 otáčkách/min. Opět jsme odebrali horní proužek a přítomnost VLP jsme testovali: elektroforézou (koncentrace

proteinů), analýzou Western blott (antigenní specificita – denaturovaný protein) a ELISA (VLP (kapsomery)).

3.11.2 Příprava proteinů E6 a E7 viru HPV16

Na přípravu virových onkoproteinů HPV 16 E6 a E7 jsme použili rekombinantní bakterie E.coli BL21, které nesly jejich genetickou informaci. Ty byly navázané na GST (Glutathion-S-transferáza) a na 3' konci značené undekapeptidem a pěstované na Luria Bertani mediu s ampicilinem (1 mmol/l). Poté, co optická denzita buněčné kultury byla 0,5, měřená při 600 nm, jsme přidali isopropyl–β–D–thio–galaktosidu (IPTG) do koncentrace 0,25 mmol/l a podpořili tím expresi rekombinantního proteinu. Pak jsme další šest hodin inkubovali, poté sklidili a pelet resuspendovali v PBS, v kterém bylo přidáno 2 mmol/l DTT, 1 % Tritonem X–100 a koktejlem inhibitorů proteáz. Tento roztok jsme pak sonikovali pětkrát 30 sekund při 0 °C. Lyzát byl stočen v centrifuze, aby se odstranily zbytky buněk, dále jsme určili koncentraci a naředili glycerolem v poměru 1:1. Poté jsme uložili obsah do lednice na -20 °C.

3.11.3 Detekce protilátek proti HPV

Na vyšetření specifických protilátek jsme použili přímou metodu - enzymatická imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA).

3.11.3.1 Detekce VLP protilátek

K detekci těchto protilátek jsme použili kapsidy připravené z bakulovirových rekombinant (viz výše) a byly použity jako antigen (majoritní L1 nebo oba L1 a L2). Použili jsme mikrotitrační destičky (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Denmark), jichž jamky byly potažené roztokem VLP a PBS (50 μl) a jejich koncentrace byla 2μg/ml. Potahování destičky trvalo 2 hodiny při 37 °C a v noci při 4 °C. Poté jsme jamky pětkrát promývali roztokem A (PBS, 0,21 mol/1 NaCl, 0,1 % Triton X-100) a mezi promytími jsme inkubovali 1 hodinu při 37 °C. Vazbová místa, která zůstala volná, jsme zaplnili 1% roztokem BSA v PBS, inkubovali, a poté k jamkám ještě přidali sérum v paralelách, která byla ředěná 1:25 v roztoku A s 1% BSA. Protilátky, které se navázaly, jsme označili oslím imunoglobinem proti lidskému IgG, který byl konjugovaný s křenovou peroxidázou (1:7 500 v roztoku A s 1% BSA). Po přidání 0,04% roztoku o-fenylendiaminu, který byl ve fosfátovo-citrátovém pufru 50 mmol/l(pH 5,0) a s 0,006% peroxidem vodíku, vznikla barevná reakce. Tuto reakci jsme zastavili po přidání 2 mol/l roztokem kyseliny

sírové. Výsledek byl pak vyhodnocen spektrofotometricky jako OD při 492 a 630 nm (Infinite 200 microplate reader, TECAN, Austria).

Vyšetřovány byly typy: 6, 11, 16, 18, 31 a 33, a u všech byl použit stejný postup.

3.11.3.2 Protilátky proti onkoproteinům HPV16 E6 a E7

K detekci jsme použili mikrotitrační destičky (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Denmark), jejichž jamky jsme potáhli 100 μl roztokem konjugátu kasein–glutathion (2 μg/ml). Potahování probíhalo přes noc při teplotě +4 °C. Poté jsme jamky pětkrát promývali roztokem B (PBS, 0,05% Tween 20) a mezitím inkubovali po jednu hodinu při 37 °C. Vazbová místa, která zůstala volná, jsme zaplnili roztokem C (roztok B+0,2% kasein) a opět inkubovali. Poté jsme přidali rekombinantní proteiny v roztoku C v koncentraci 0,25 μg/ml. Rekombinantní proteiny jsme přidávali jednotlivě, podle typu. Poté jsme naředili sérum, a to v koncentraci 1:50 v roztoku C s kontrolním antigenem v koncentraci 0,25 μg/ml. Kontrolní antigen je rekombinantní GST. Tato séra jsme pak nechali půl hodiny při laboratorní teplotě a následně přidali do jamek v paralelách. Protilátky, které se navázaly, jsme ještě označili oslím imunoglobinem proti lidskému IgG a ten byl ještě konjugovaný křenovou peroxidázou v koncentraci 1:10 000 v roztoku C. Po přidání 0,01% roztoku tetrametylbenzidinu, který byl v 100 mmol/l acetátovém pufru (ph 6,0) s peroxidem vodíku (0,003%), vznikla barevná reakce. Tu jsme zastavili přidáním roztoku kyseliny sírové (1 mol/l). Výsledek jsme hodnotili spektrofotometricky pomocí Infinite 200 microplate reader TECAN (Austria) jako OD při 450 a 630 nm.

3.11.3.3 Hodnocení

Při vyhodnocování výsledku jsme na každé destičce měli a testovali taky sérum, a to jak pozitivní tak negativní proti tomuto antigenu. Při hodnocení jsme od hodnoty OD daného séra s virově specifickým antigenem na destičce odečetli hodnotu OD stejného séra na kontrolní destičce. Cut-off (hraniční hodnota) jsme spočítali jako aritmetický průměr rozdílu OD plus 2 (VLP) resp. 3 směrodatní odchylky (onkoprotein). Séra, u kterých byl rozdíl OD vyšší, než spočítaná hodnota jsme vyloučili a tak dlouho tuto proceduru opakovali, dokud nebyla hodnota rozdílu OD z těchto sér vyšší. Výsledek tohoto testu jsme vyjádřili jako OD index (je to poměr mezi rozdílem OD daného séra a CO hodnoty). Sérum, které bylo testované a mělo OD index vyšší než jedna, bylo označeno za pozitivní. Pro ověření výsledku jsme všechny vzorky s OD indexem do 10 % nad hodnotou CO opakovali.

3.12 STATISTIKA

Pro hodnocení rizikových faktorů byly důležité informace o kouření a alkoholu. Při hodnocení kouření se počítalo množství spotřebovaného tabáku, vyjádřené jako balíček/rok. Jeden balíček/rok znamená kouření 1 balíčku (20 cigaret) denně po dobu 1 roku. Objem spotřebovaného alkoholu byl počítán na dávkách za týden, kde jedna dávka byla určena typem alkoholu: 0,5 l piva, 0,2 l vína nebo 0,05 l destilátu. Pacienti v této studii byli rozděleni na nekuřáci a nekuřáci, a u konzumaci alkoholu na abstinent a konzumenti alkoholu.

Vzájemné poměry šancí (Odds Ratio - OR) s 95% intervalem spolehlivosti (Confidence Interval, CI) byly vypočítány v tabulce 2x2 pomocí statistického balíku EPI INFO (2002) a softwaru GraphPad INSTAT (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA). Všechny testy byly oboustranné a hladina významnosti byla $\alpha=0,05$. Korelace mezi proměnnými a pozitivitou na HPV DNA a přítomností specifických protilátek byla hodnocena za využití logistické mnohorozměrné regrese, počítaje postupné metody výběru kovariant ($P\leq0,05$).

Přežití pacientů bylo hodnoceno v dnech. Začátek byl od data diagnózy až po úmrtí či do poslední kontroly pacienta. Pacienti, kteří zemřeli z jiné příčiny, než byl nádor hlavy a krku, byli hodnoceni v analýze specifického přežití jako cenzurovaný údaj, který byl vztažen k nádoru (Disease Specific Survival, DSS). Kaplan-Meierova metoda byla použita na míru přežití a pomocí log-rank testu byla vypočítaná významnost rozdílu v přežití mezi HPV pozitivními a negativními pacienty. Další faktory, které ovlivnily prognózu pacienta, jsme ověřili Coxovou mnohorozměrní regresí, a významnost byla vypočítaná pro hladinu významnosti $\alpha=0,05$ (oboustranný test). Devadesát pět procentní interval spolehlivosti pro OR byl počítán za pomoci aproximace normálním rozložením.

V Coxově regresním modelu byly použity proměnné:

- Přítomnost HR HPV
- Věk
- Pohlaví
- Kouření
- Grading
- Velikost nádoru – pT dle klasifikace TNM dle UICC 1997

- Uzlinové metastázy – pN dle klasifikace TNM UICC 1997

Přežívání ovlivnilo výběr proměnných a byla použitá postupná metoda ($P \leq 0,05$). Pomocí programu SPSS byla provedená analýza (version 19; SPSS Inc., Chicago, IL).

4 VÝSLEDKY

4.1 DEMOGRAFICKÁ A KLINICKO-PATOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Do našeho souboru bylo zařazeno 142 pacientů, který měli primární, histologicky verifikovaný spinocelulární karcinom dutiny ústní nebo orofaryngu. Většina případů byli muži, a to v 82,6 % (117/142), zatímco 17,4 % byly ženy (25/142). Nádory s přítomností HPV DNA byly relativně častější u žen. Většina pacientů byla starší 55 let (≤55 vs. >55, 43,7 % vs. 56,3 %) a měla méně, než 12 let vzdělávání (<12 vs. ≥12, 69 % vs. 31 %). Prevalence kouření byla 86,6 % (123/142) a 81,0 % případů (115/142) užívalo pravidelně alkohol. Většina pacientů měla orofaryngeální tumor, 83,1 % (118/142), zatímco 16,9 % (24/142) mělo nádor dutiny ústní. Přítomnost HPV DNA byla nalezena častěji u orofaryngeálních nádorů. Mezi HPV-pozitivními a negativními se veličiny distribuce pohlaví (adj. P=0,443), vzdělání (<12 let vs. ≥12 let, adj. P=0,135), počet sexuálních partnerů (<6 vs. ≥6, adj. P=0,109), provozování oro-análního sexu (adj. P=0,482), oro-genitálního sexu (adj. P=0,759) statisticky nelišily.

Menší nádory byly v této studii častější, než větší nádory (T1 + 2 vs. T3 + 4, 76,1 % vs. 33,9 %), ale rozdíl mezi HPV-pozitivními a negativními nebyl statisticky významný (adj. P=0,664). Většina pacientů měla pozitivní lymfatické uzliny (N0 vs. N1-3, 29,6 % oproti 70,4 %) a pokročilejší stadium nádoru (I, II vs. III, IV, 28,2 % vs. 71,8 %). Tyto dvě veličiny se také častěji vyskytovaly u HPV pozitivních nádorů (lymfatické uzliny adj. P=0,46 a staging adj. P=0,015). Nádory byly také častěji dobře diferencované (G3 vs. G1, 2, 33,1 % vs. 66,9 %) (Tabulka 1), avšak u HPV-pozitivních nádorů nebyly statisticky významné (adj. P=0,052).

Tabulka 1 Demograficko-epidemiologická charakteristika

Charakteristika		**Počet (%)**	**Z toho HPV+ počet (%)**	**Z toho HPV– počet (%)**	**Adjustována P hodnota**
Věk[1]	Průměrný věk 57,1				
Věk	≤55	62 (43,7 %)	33 (53,2%)	29 (46,8%)	0,123
	> 55	80 (56,3 %)	51 (63,8%)	29 (36,2%)	
Pohlaví	žena	25 (17,6 %)	19 (70,4%)	6 (29,6%)	0,443
	muž	117 (82,4 %)	65 (55,6%)	52 (44,4%)	
Vzdělání	**<** 12	98 (69,0 %)	55 (56,1%)	43 (43,9%)	0,135
	≥12	44 (31 %)	29 (65,9%)	15 (34,1%)	
Počet sexuálních partnerů	**<** 6	66 (50,4 %)	35 (53,0%)	31 (47,0%)	0,109
	≥6	65 (49,6 %)	42 (64,6%)	13 (35,4%)	
Oro-genitalní sex	Ne	44 (32,6 %)	26 (59,0%)	18 (41,0%)	0,759
	Ano	92 (67,4 %)	57 (62,0%)	35 (38,0%)	
Oro-analní sex	Ne	122 (89,7%)	73 (59,8%)	49 (40,2%)	0,482
	Ano	14 (10,3 %)	10 (71,4%)	4 (28,6%)	
Kouření	Ne	19 (13,4 %)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	0,001
	Ano	123 (86,6 %)	66 (53,7%)	57 (46,3%)	
Alkohol	Ne	27 (19,0 %)	21 (77,8%)	6 (22,2%)	0,536

Charakteristika		Počet (%)	Z toho HPV+ počet (%)	Z toho HPV– počet (%)	Adjustována P hodnota
Alkohol	Ano	115 (81,0 %)	63 (54,8%)	52 (45,2%)	
Velkost tumoru	T1+T2	108 (76,1 %)	66 (61,1%)	42 (38,9%)	0,664
	T3+T4	34 (23,9 %)	18 (52,9%)	16 (47,1%)	
Přítomnost uzlin	N0	42 (29,6 %)	17 (40,5%)	25 (59,5%)	0,46
	N1-3	100 (70,4 %)	67 (67,0%)	33 (33,0%)	
Stádium tumoru	I+II	40 (28,2 %)	15 (37,5%)	25 (62,5%)	0,015
	III+IV	102 (71,8 %)	69 (67,6%)	33 (32,4%)	
Grade	G1+G2	95 (66,9 %)	50 (52,6%)	45 (47,4%)	0,052
	G3	47 (33,1 %)	34 (72,3%)	13 (27,7%)	
Lokalizace	orofarynx	118 (83,1 %)	80 (67,8%)	38 (32,2%)	<0,0001
	dutina ústní	24 (16,9 %)	4 (16,7%)	20 (83,3%)	

[1]Použit T-test k porovnání průměru věku

Adjustováno na věk, alkohol a kouření cigaret

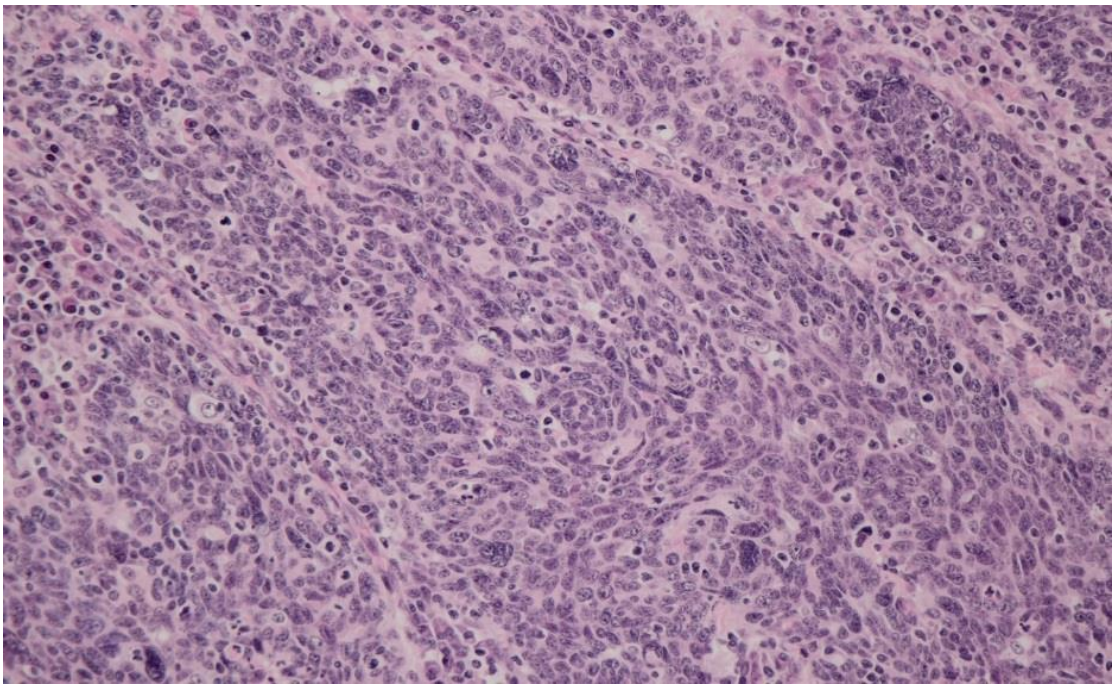
4.2 PREVALENCE A SPECIFIKACE HPV DNA V NÁDOROVÉ TKÁNI

Ze 142 pacientů bylo 59,2 % (84/142) HPV DNA pozitivních. S výjimkou jednoho vzorku se souběžnou infekcí vysoce rizikového a nízkorizikového typu – HPV 16 a HPV 11 byly nalezeny pouze HR HPV typy. Nejčastěji je jednalo o infekci HPV 16, a to v 91,7 % (77/84), následovanou HPV 33 u 3,6 % (3/84), zatímco HPV 26 a HPV 58 byly nalezeny

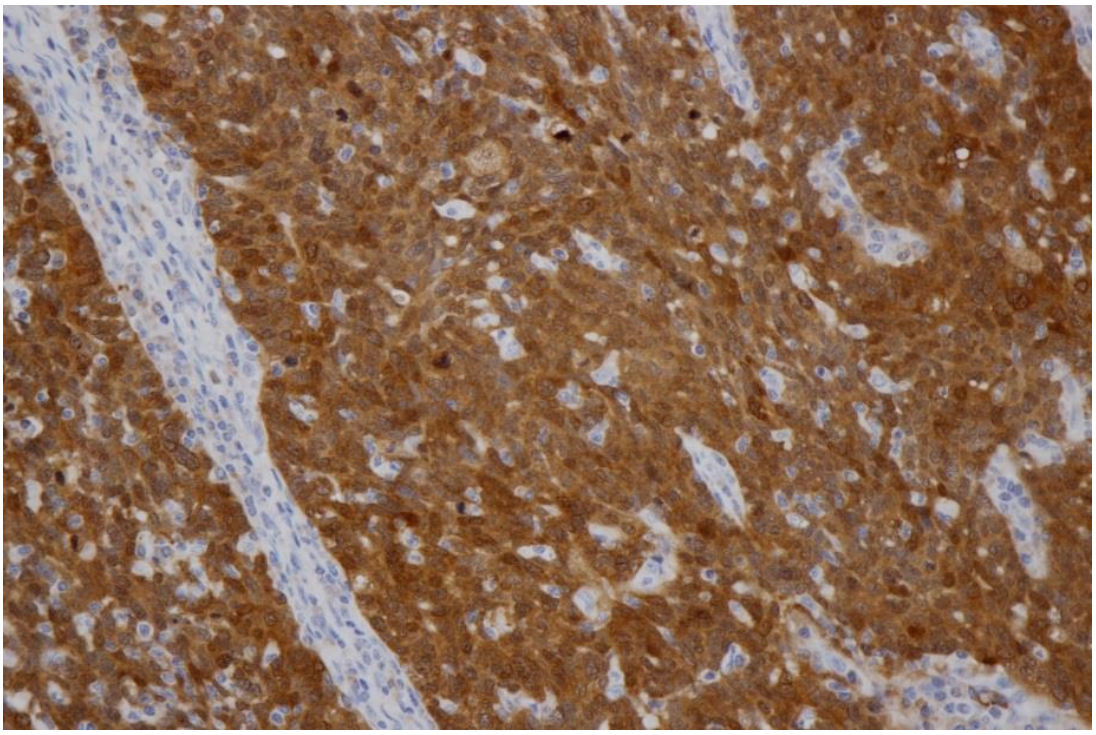
po jednom vzorku (1,2 %). Dále byly zjištěny vícenásobné infekce u dvou pacientů (2,4 %), jeden vzorek byl pozitivní na HPV 16 a 18, druhý na HPV 11 a HPV 16. DNA byla zjištěna významně častěji u orofaryngeálních nádorů než u nádorů ústní dutiny (67,8 % vs. 16,7 %, adj. P<0,0001). V orofaryngeální lokalizaci byly nejčastěji pozitivní nádory mandlí 69/80 (86,3 %), v dutině ústní se vyskytovalo 50 % nádorů (2/4) a nejčastěji se jednalo o lokalizace v jazyku.

4.3 PŘÍTOMNOST ONKOPROTEINŮ P16 A P53

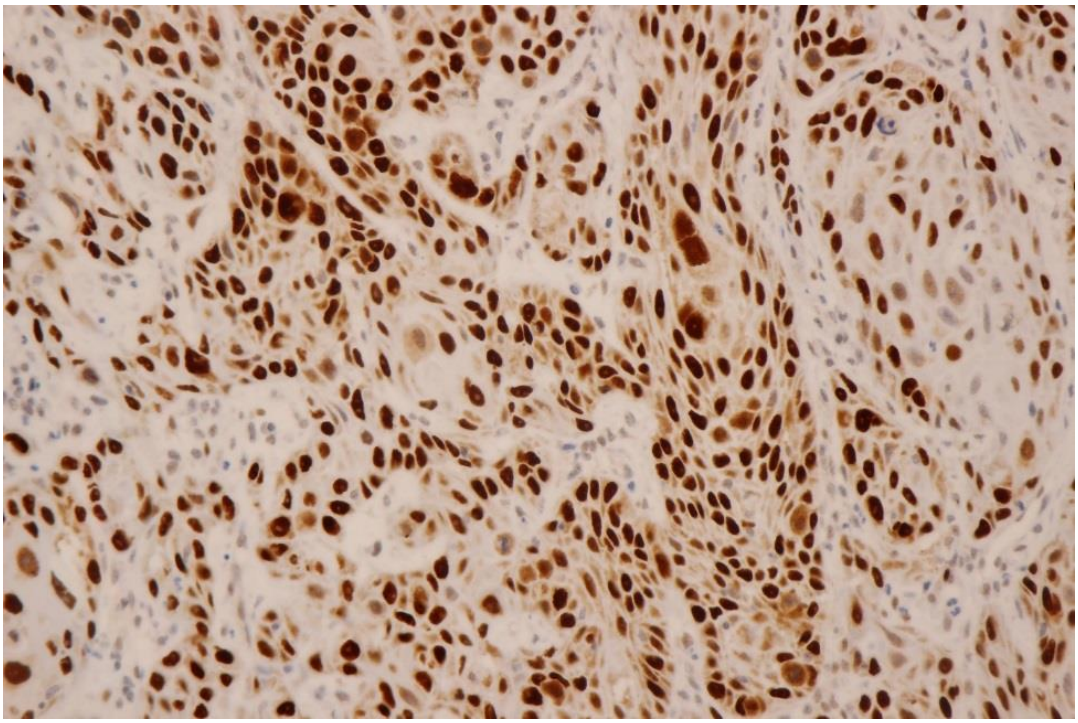
K imunohistochemickému vyšetření jsme měli k dispozici tkáň od 117 pacientů pro protein P16, a pro P53 od 116 pacientů (Obrázek 14-16). Vyšetřením jsme zjistili, že exprese proteinu P16 byla nalezena u 64 nádorových tkání, z toho bylo 60 HPV16 DNA pozitivních a jeden HPV26 DNA pozitivní. U HPV DNA negativních tkání byla exprese proteinu detekována ve 3 vzorcích. Zvýšená exprese P53 byla detekována u 26 vzorků HPV DNA negativních nádorových tkání, a v 9 případech u HR HPV pozitivních.



Obrázek 14 Dlaždicobuněčný karcinom tonzily – parafinový řez, barven hematoxylinem-eosinem, originální zvětšení 400x



Obrázek 15 Dlaždicobuněční karcinom tonzily – parafinový řez, barven imunohistochemicky protilátkou proti proteinu P16, originální zvětšení 400x. Hodnocené pozitivně.



Obrázek 16 Dlaždicobuněčný karcinom – parafinový řez, barven imunohistochemicky protilátkou proti proteinu P53, originální zvětšení 400x. Hodnocené pozitivně.

4.4 PREVALENCE HPV DNA VE VÝPLACHU DUTINY ÚSTNÍ PŘED TERAPIÍ

Ve výplachu dutiny ústní byla HPV DNA detekována v 53,2 % případů (75/141). Většina ze zjištěných typů HPV byly HR 96,0 % (72/75). LR HPV typy, jako samostatná infekce, byla zjištěna u 4,0 % HPV-pozitivních výplachů dutiny ústní (3/75), a to HPV 40, 61 a 47. Nejběžnějším vysoce rizikovým typem ve výplachu byl HPV 16, a to v 77,3 % (58/75). HPV 18 a 33 byly nalezeny ve dvou vzorcích (2,7 %) a pravděpodobně vysoce rizikový typ HPV 70 v jednom vzorku (1,3 %). Dále byly zjištěny vícenásobné infekce u devíti pacientů (12 %, 9/75), dva pacienti byly pozitivní na HPV 16 a 51 a HPV 16 a 89, po jednom vzorku byla pozitivní kombinace HPV 16 a 33, HPV 16 a 55, HPV 16 a 81, HPV 16 a 56 a 82 a v jednom případě šlo o kombinaci 16 a 11, tedy HR a LR typu HPV. Z 83 pacientů s HR HPV pozitivní nádorovou tkáni mělo 64 (77,1 %) HR HPV zjištěný i ve výplachu dutiny ústní, a 96,9 % těchto výplachů bylo ve shodě s typem HPV v nádoru. Z 58 pacientů s HPV negativním nádorem mělo 15,5 % (9/58) detekované HR HPV ve výplachu dutině ústní. (Tabulka 2).

Souvislost mezi přítomností HR HPV DNA v nádorové tkáni a ve výplachu dutiny ústní byl statisticky velmi významný (adj. $P<0,0001$).

Tabulka 2 Korelace přítomnosti HPV DNA v nádorové tkáni a výplachu dutiny ústní před terapií

Nádorová tkáň		**Výplach dutiny ústní**	
HPV typ	Počet (%)	HPV typ	Počet (%)
Negativní	58 (40,8 %)	Negativní	47 (81 %)
		16**	6 (10,3 %)
		18	2 (3,4 %)
		40	1 (1,7 %)
		61	1 (1,7 %)
		70	1 (1,7 %)
16*	78 (55,6 %)	16***	60 (76,9 %)
		Negativní	17 (21,8 %)
		47	1 (1,3 %)
33	3 (2,1 %)	33	2 (66,7 %)
		16	1 (33,3 %)
26	1 (0,7 %)	Negativní	1 (100 %)
58	1 (0.7%)	Negativní	1 (100 %)

* zahrnuje 2 pacienty s mnohočetnými infekcemi (HPV 16 + 18, HPV 16 + 11)

** zahrnuje 3 samostatné infekce a 3 smíšené infekce (2x HPV 16 + 51 a HPV 16 + 55)

*** zahrnuje 6 pacientů s mnohočetnými infekcemi (HPV 16 + 56 + 82, HPV 16 + 11, dvakrát HPV 16 + 89, HPV 16 + 81, HPV 16 + 33)

4.5 PREVALENCE HPV SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK PŘED TERAPIÍ

Protilátky specifické pro onkoproteiny HPV 16 E6 a/nebo E7 při zařazení do studie byly přítomny v 51,4 % (73/142) všech případů. Prevalence specifických protilátek pro VLP 16 a pro některé z testovaných čtyř HR VLP byla 43,7 % (62/142), respektive 52,8 % (75/142). Souvislost mezi přítomností specifických protilátek proti HPV všech testovaných antigenů (HPV 16 E6, E7 a E6 a/nebo E7, VLP 16 a HR VLP) a pozitivitou nádorové tkáně pro HR HPV DNA byla statisticky velmi významná (adj. P<0,0001 pro anti-HPV 16 E6, anti-HPV 16 E7, anti-HPV 16 E6 a/nebo E7, anti-VLP 16 a P=0,001 pro anti- HR VLP protilátek) i po adjustaci na věk, kouření a konzumaci alkoholu. Z 84 pacientů s HR HPV DNA pozitivní nádorovou tkáni bylo 79,8 % (67/84) séropozitivních pro E6, 60,7 % (51/84) pro E7 a 82,1 % (69/84) pro E6 a/nebo E7. Protilátky proti VLP 16 byly zjištěny u 61,9 % (52/84), a na některou z HR VLP v 69,0 % (58/84) z HR HPV pozitivních pacientů (Tabulka 3).

Z 58 pacientů s HPV DNA negativní nádorovou tkáni bylo séropozitivních na E6 a/nebo E7 pouze 6,9 % (4/58). Prevalence protilátek proti kapsidovým antigenům byla vyšší, 17,2 % (10/58) pacientů mělo anti-VLP 16 protilátky a 29,3 % (17/58) mělo anti–HR VLP protilátky (Tabulka 3).

Tabulka 3 Markery HPV infekce – specifické protilátky proti HPV a HPV DNA ve výplachu dutiny ústní u pacientů s HPV DNA pozitivním a negativním karcinomem

	HR HPV +	**HPV -**	**P-hodnota**	**OR (95%CI)**	**Adjustované OR (95%Cl)**	**Adjustovaná P hodnota***
Výplach dutiny ústní HR HPV+	63 (75,9 %)	8 (13,8 %)	<0,0001	19,7 (8,0-48,4)	7,2 (3,0-17,3)	<0,0001
Výplach dutiny ústní LR+/HPV-	20 (24,1 %)	50 (86,2 %)				
anti-E6 +	67 (79,8 %)	4 (6,9 %)	<0,0001	53,2 (16,9-167,5)	70,8 (18,2-276,1)	<0,0001
anti-E6 -	17 (20,2 %)	54 (93,1 %)				
anti-E7 +	51 (60,7 %)	3 (5,2 %)	<0,0001	28,3 (8,2-98,8)	65,8 (3,6-213,2)	<0,0001
anti-E7 -	33 (39,3 %)	55 (94,8 %)				
anti- E6/E7 +	69 (82,1 %)	4 (6,9 %)	<0,0001	62,1 (19,5-198,0)	74,4 (19,1-289,3)	<0,0001
anti- E6/E7 -	15 (17,0 %)	54 (93,1 %)				
****anti-HR VLP +**	58 (69,0 %)	17 (29,3 %)	<0,0001	5,4 (2,6-11,2)	3,830 (1,8-8,3)	0,001
****anti-HR VLP -**	26 (31,0 %)	41 (70,7 %)				
anti-VLP16 +	52 (61,9 %)	10 (17,2 %)	<0,0001	7,8 (3,5-17,6)	5,6 (2,4-13,0)	<0,0001
anti-VLP16 -	32 (38,1 %)	48 (82,8 %)				

* Adjustováno na věk ≤55/**>** 55, kouření cigaret ano/ne, konzumace alkoholu ano/ne; ** HR VLP= 16,18,31,33

4.6 PREVALENCE HPV DNA VE VÝPLACHU DUTINY ÚSTNÍ PO TERAPII

Druhý odběr byl odebrán za rok po ukončení terapie. Dvacet čtyři pacientů během prvního roku od léčby zemřelo, k dispozici byl proto materiál od 118 pacientů. Od jednoho pacienta nebyl k dispozici první výplach před terapií, pacient byl proto vyloučen z další analýzy. Ze 117 pacientů bylo 66 (56,4 %) pozitivních na HPV DNA ve výplachu při zařazení do studie, tedy před terapií, a z toho u 84,8 % pacientů (56/66) došlo po terapii k vyčištění infekce. Po terapii tedy u 7,6 % (5/66) HPV infekce přetrvávala. Šlo o HR HPV 16 ve čtyřech případech a LR HPV 61 v jednom případě. U 7,6 % pacientů (5/66) byla HPV infekce nově zjištěná či změněná (HPV 23, 37, 45, 100, a 110) (Tabulka 4).

Z celkových 51 pacientů s negativním výplachem při zařazení získalo 11,8 % (6/51) pacientů nově HR HPV infekci (dvakrát HPV 16, po jednom HPV 33, 53, 56, 59), u jednoho pacienta (2,0 %) se mísila HR a LR infekce (HPV 56 a 17) a jeden pacient získal LR HPV typ 23 (2,0 %). Celkově lze říci, že ve výplachu dutiny ústní po jednom roku od ukončení terapie byla nově prokázána HPV infekce u 11,1 % (13/117) pacientů, a z nich se v 61,5 % (8/13) jednalo o HR typy (Tabulka 4).

Z 24 zemřelých pacientů jich 17 mělo lokoregionální recidivu. Z nich pouze 11,8 % (2/17) mělo HR HPV DNA-pozitivní nádorovou tkáň a 23,5 % (4/17) pozitivní výplach dutiny ústní před terapií. Sedm pacientů zemřelo na nemoc, která nesouvisela s nádorovým onemocněním. Navíc, z přeživších pacientů mělo 16 v době kontroly lokoregionální recidivu. Šedesát devět procent (11/16) z těchto pacientů bylo HR HPV pozitivní v nádorové tkáni, a z toho 63,6 % (7/11) mělo pozitivní i výplach dutiny ústní při zařazení. Pouze jeden z pacientů s recidivou a pozitivitou HPV před terapií měl perzistenci viru (HPV 16) ve výplachu po terapii.

Tabulka 4 HPV DNA přítomné ve výplachu dutiny ústní před a po

1. výplach		**2. výplach**	
HPV typ	Počet (%)	HPV type	No (%)
16**	67 (47,5 %)	16	4 (5,9 %)
		45	1 (1,5 %)
		negative	52 (77,6 %)
		LR HPV*	4 (5,9 %)
		exitus	6 (9,0 %)
18	2 (1,4 %)	exitus	2 (100 %)
33	2 (1,4 %)	negative	2 (100 %)
40	1 (0,7 %)	exitus	1 (100 %)
47	1 (0,7 %)	negative	1 (100 %)
61	1 (0,7 %)	61	1 (100 %)
70	1 (0,7 %)	negative	1 (100 %)
81	1 (0,7 %)	negative	1 (100 %)
89	1 (0,7 %)	negative	1 (100 %)

*LR HPV: 23, 37, 100, 110

** Zahrnuje 6 pacientů s mnohočetnými infekcemi (HPV 16 + 56 + 82, HPV 16 + 11, dvakrát HPV 16 + 89, HPV 16 + 81, HPV 16 + 33)

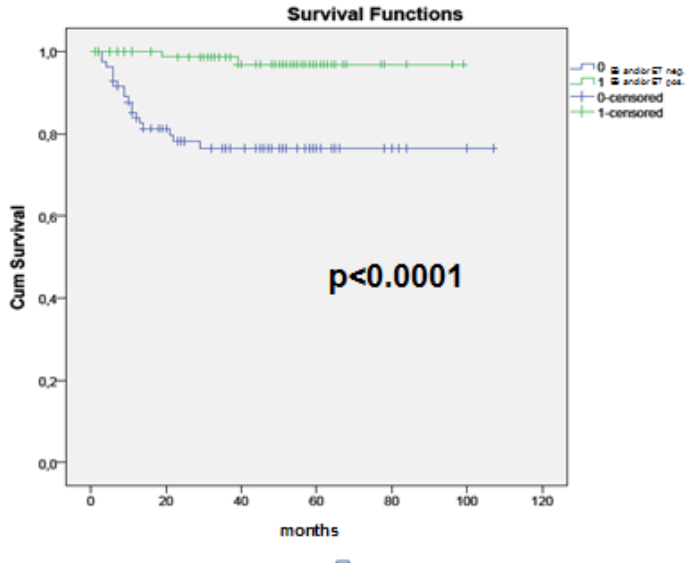
4.7 HPV – SPECIFICKÉ PROTILÁTKY PO TERAPII

Druhý vzorek krve na serologické vyšetření byl odebrán měsíc po ukončení terapie a byl k dispozici od 133 pacientů. Poslední odběr byl proveden rok od ukončení terapie a byl získán od 125 pacientů. Většina séropozitivních pacientů na HPV 16 E6 a/nebo E7 při zařazení před terapií (98,5 %, 67/68) zůstala séropozitivními pro HPV 16 E6 a/nebo E7 i rok po ukončení terapie, jeden pacient (1,5 %, 1/68) se stal séronegativním. Stejně tak u většiny pacientů se udržela séropozitivita na VLP 16 a HR VLP rok po terapii (92,3 %, 48/52, respektive 93,4 %, 57/61). Pouze 7,7 % (4/52) z pozitivních pacientů pro anti-HPV 16 VLP před terapií se stalo séronegativními, a pouze jeden pacient séronegativní na specifické protilátky HPV 16 VLP sérokonvertoval při kontrole rok po terapii.

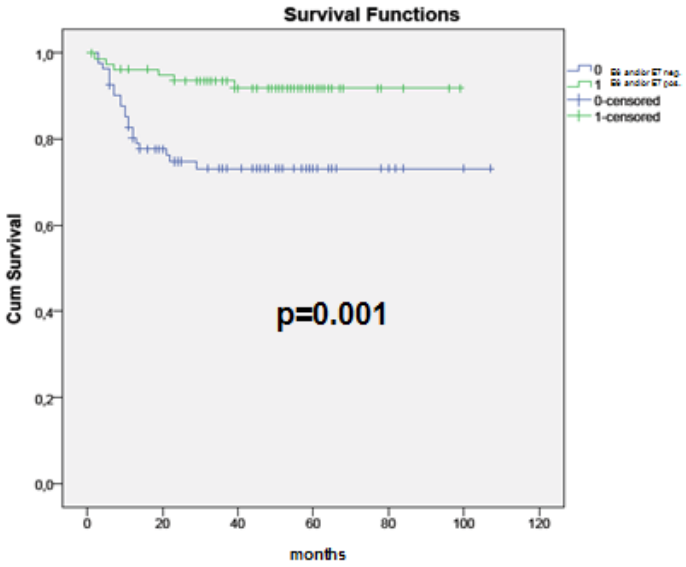
4.8 SLEDOVÁNÍ MARKERŮ PO TERAPII A PŘI REKURENCI A ANALÝZA PŘEŽITÍ

Tato analýza přežití se provedla na celkovém počtu 142 pacientů. Z tohoto počtu jich 54 zemřelo, 37 na lokoregionální recidivu a 17 na nesouvisející nemoci. Specifické přežití u pacientů s HR HPV DNA-pozitivním nádorem oproti pacientům s HPV DNA negativním nádorem je významně lepší, co jsme dokázali za pomocí Kaplan-Meierovy metody a log-rank testu.

U HPV 16 E6 a/nebo E7 pozitivních jsme pozorovali signifikantně lepší přežívání, a to jak celkové, tak specifické. Lepší přežití bylo potvrzeno i při použití multivariantní Coxovy regresní analýzy s kofaktory - věk, kouření, konzumace alkoholu, velikost nádoru a přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách (adj. P=0,001, adj. P< 0,0001, v uvedeném pořadí)(Obrázek 16, 17). Tito pacienti měli také méně často recidivu původního onemocnění (průměrná doba sledování byla 47 měsíců, rozsah 0,8 – 101 měsíce).



Obrázek 17 Specifické přežití



Obrázek 18 Celkové přežití

Celkově došlo u pacientů s nádorem hlavy a krku po terapii k vyčištění HPV infekce ve výplachu dutiny ústní, zatímco pro HPV-specifické protilátky zůstaly seropozitivní. Nicméně u pacientů, kteří byli při zařazení do studie seropozitivní, v průběhu sledování průměr titru HPV 16 E6 a E7 protilátek statisticky významně poklesl v odebraných vzorcích s odstupem jednoho měsíce a jednoho roku po ukončení léčby (pro oba vzorky HPV 16 E6 a E7 P≤0,0001) (Tabulka 5). Po roce došlo k poklesu hladiny HPV 16-specifických protilátek E6 a E7 u 64,2 %, respektive 64,7 % pacientů. To se však

nepotvrdilo pro protilátky specifické pro HPV 16 VLP a všechny testované HR VLPs (P=0,5570 a P=0,1734).

Tabulka 5 Titry HPV-specifických protilátek před a po terapii

		Před terapií	**1. Odběr po terapii**		**2. Odběr po terapii**	
	N	MEAN OD	MEAN OD	P	MEAN OD	P
E6+	67	8,3	7,4	<0,0001	6,0	<0,0001
E7+	51	7,4	5,6	<0,0001	5,0	<0,0001
VLP16+	52	3,6	3,6	0,5570	3,5	0,1734

Z 16 pacientů, kteří přežili a měli recidivu při sledování po roce, bylo šest pozitivních při zařazení na anti-HPV16 E6 a/nebo E7 protilátek. V pěti z nich nebyl v době kontroly zaznamenán pokles hladin protilátek. Z těchto 16 pacientů mělo osm také HPV DNA-pozitivní výplach při zařazení, ale pouze dva z nich měli HPV infekci i v době rekurence (jeden HR HPV16 a jeden LR HPV 61).

Pacienti, kteří měli před terapií HPV negativní nádorovou tkáň a výplach dutiny ústní, měli až dvakrát vyšší riziko smrti (adj. P=0,012 a P=0,009) a třikrát vyšší riziko smrti způsobené onemocněním (adj. P=0,003 a P=0,018, v uvedeném pořadí). Riziko recidivy u těchto pacientů bylo třikrát vyšší (adj. P=0,024 pro nádorové tkáně a výplach dutiny ústní). HPV-séronegativní pacienti na protilátky E6 a/nebo E7 měli třikrát vyšší riziko úmrtí (adj. P=0,004) a pětkrát vyšší riziko úmrtí specifické pro onemocnění (adj. P=0,002). Riziko recidivy onemocnění bylo šestkrát vyšší (adj. P=0,001). Po terapii, negativita specifických markerů proti onkoproteinům HPV 16 E6 a/nebo E7 má až třikrát vyšší celkové i specifické riziko úmrtí. Tento rozdíl nicméně nebyl statisticky významný. Přítomnost HR HPV DNA ve výplachu dutiny ústní, jakož i pozitivita VLP 16 specifických protilátek nebyla prediktivní pro přežití ani pro recidivu (Tabulka 6).

Tabulka 6 Poměr rizik úmrtí a poměr pravděpodobnosti recidivy dle pozitivity markerů HPV infekce před a po terapii

	Před terapií												**Rok po terapii#**							
	HR HPV DNA						**HPV-specifické protilátky**						**HR HPV DNA**			**HPV-specifické protilátky**				
***Výsledek/marker status**	**No (%)**	**nádorová tkáň (95%CI)**	**Hodnota P***	**No (%)**	**výplach dutiny ústní (95%CI)**	**Hodnota P***	**No (%)**	**VLPs 16 (95%CI)**	**Hodnota P***	**No (%)**	**HPV 16 E6 a/nebo E7 (95%CI)**	**Hodnota P***	**No (%)**	**výplach dutiny ústní (95 % CI)**	**Hodnota P***	**No (%)**	**VLPs 16(95%CI)**	**Hodnota P***	**No (%)**	**HPV 16E6 a/neboE7 (95%CI)**	**Hodnota P***
Overal Deaths																					
Negativní	16 (27,6)	2,4 (1,2-4,7)	0,012	15 (21,7)	2,8 (1,3-5,9)	0,009	14 (17,5)	1,1 (0,6-2,3)	0,700	19 (27,5)	3,1 (1,4-6,7)	0,004	25 (23,6)	0,7 (0,1-3,2)	0,616	21 (30,4)	1,7 (0,5-5,2)	0,371	19 (37,3)	3,1 (0,9-1,0)	0,064
Positivní	8 (9,5)			9 (2,5)			10 (16,1)			5 (6,8)			5 (41,7)			9 (18,4)			11 (16,4)		

Disease Specific Deaths																				
Negativní	15 (25,9)	3,5 (1,5-8,2)	0,003	13 (18,8)	3,1 (1,2-7,9)	0,018	10 (12,5)	1,1 (0,5-2,4)	0,876	16 (23,2)	5,2 (1,8-14,9)	0,002	19 (17,9)	1,1 (0,1-9,0)	0,964	14 (20,3)	2.2 (0,5-8,9)	0,267	14 (27,5)	3.1 (0,8-12,4)	0,240
Positivní	2 (2,4)			4 (5,6)			7(11,3)			1 (1,4)			1 (8,3)			6(12.2)			6 (9,0)		
Rekurence																				
Negativní	20 (60,6)	2,9 (1,2-7,1)	0,024	22 (31,9)	3,1 (1,2-8,4)	0,024	19 (57,6)	0,8 (0,3-2,1)	0,723	26 (78,8)	6,4 (2,1-19,0)	0,001	NA##			NA##			NA##	
Positivní	13 (39.4)			11 (15.3)			14 (42.4)			7 (21.2)										

* Adjustováno na věk ≤55/>55, kouření, konzumace alkoholu, velikost tumoru, přítomnost lymfatických metastáz

Vzorky odebrané 1 rok po ukončení léčby a stav pacientů při poslední známé kontrole

Pouze dva pacienti s recidivou přežili

5 DISKUZE

V této studii jsme sledovali pacienty s ověřenými primárními nádory dutiny ústní a orofaryngu. Zaměřili jsme se na přítomnost HPV DNA v tkáni tumoru, na jeho korelaci s přítomností specifických protilátek, s přítomností HPV DNA ve výplachu dutiny ústní a přítomností proteinu P16 a P53 před terapií. Dále jsme analyzovali souvislost mezi hladinami protilátek, přítomnost viru ve výplachu a klinickým stavem pacienta ve smyslu výskytu recidivy, která má logicky přímý vztah k přežití. V této prospektivní studii jsme také ukázali, že detekci přítomnosti HPV DNA v nádorové tkáni hlavy a krku lze provést i méně invazivními postupy, a ty že dobře korelují se standardními metodami na detekci HPV v nádorové tkáni. Tyto biomarkery jsou poměrně vysoce senzitivní i specifické, a v kombinaci by se mohly využívat v klinické praxi. Dále jsme prokázali, že bez ohledu na klinický stav pacienta, který byl hodnocen před terapií, je HPV infekce dobrým prognostickým markerem, a také že tito pacienti mají nižší frekvenci recidivy onemocnění. Mohlo by se taky uvažovat o desintenzifikaci terapie, aniž by došlo k zhoršení zatím velmi dobrých výsledků léčby HPV pozitivních nádorů. To ale ještě vyžaduje další zkoumání.

V naší studii byla u pacientů prevalence HPV DNA 59,2 %, největší zastoupení měl typ HPV16 (91,7 %) a nejčastější lokalizací tumoru byl orofarynx, konkrétně tonzily (86,9%). Typ HPV33 byl v našem souboru přítomný v 3,6 %. Tyto výsledky se shoduji s výsledky dalších studií (Mehanna et al. 2012; Gillison et al. 2000; Smith et al. 1998; Tachezy et al. 2009; Hammarstedt et al. 2006). Na rozdíl od metaanalýzy Kreimer et al. (Kreimer et al. 2005) se v našem souboru vyskytla multiplicitní infekce pouze u dvou pacientů. V nádorové tkáni jsme nedetekovali nízkorizikové HPV jako samostatnou infekci, na rozdíl od studie Badaracco a spol. (Badaracco et al. 2000).

Demografické rozdíly mezi skupinami pacientů s HPV pozitivními a HPV negativními nádory s ohledem na věk, vzdělání, sexuální chování, pohlaví a konzumace alkoholu není tak významná. Soubory se liší v kuřáctví, které je vyšší u HPV-negativních pacientů. Tato data popisují i další studie (Ritchie et al. 2003;Gillison et al. 2008;Tachezy et al. 2009). Kouření je významným faktorem u vzniku karcinomu v oblasti hlavy a krku. Ale u pacientů, kteří měli pozitivní anamnézu na kouření a měli taky HPV-pozitivní nádor, bylo zjištěno, že mají signifikantně lepší přežití, než HPV-negativní pacienti, i když nesignifikantně horší než nekuřáci s HPV-pozitivním nádorem. To naznačuje, že existence kouření u těchto pacientů (HPV-pozitivních) nemá až takou významnou roli (Rotnaglova

et al. 2011). Ke zjištění příčiny vzniku nádoru – kouření nebo HPV by bylo zapotřebí aktivně vyšetřit markery, které dokazují aktivní zapojení HPV v nádoru. Za nepřímou známku aktivity viru je brána přítomnost proteinu P16 v nádorové tkáni, který je již přijímán za marker u nádorů děložního hrdla (Cuschieri & Wentzensen 2008). Jeho exprese roste vlivem onkoproteinu E7 a spolu s detekcí HPV DNA mají vysokou senzitivitu a specificit i u nádorů hlavy a krku (Smith et al 2008, Klussmann et al 2003, Cuschieri & Wentzensen 2008). Při analýze exprese proteinu P53 jsme zjistili, že senzitivita i specificita byla nízká a jeho chybění není spolehlivým markrem, co popisují i další práce (Geisler et al 2002, Kumar et al 2008)

Imunitní systém reaguje na infekci HPV tvorbou specifických protilátek, které lze detekovat enzymoimunoanalýzou (ELISA). Několik studií prokázalo vysokou korelaci mezi HPV-pozitivními nádory a přítomností HPV-specifických protilátek, a to jak u pacientek s karcinomem děložního hrdla (Baay et al. 1999;Hamsikova et al. 2000), tak u pacientů s nádory hlavy a krku (Zumbach et al. 2000;Smith et al. 2010;Koslabova et al. 2013).

VLP protilátky se objeví přibližně 18 měsíců po infekci HPV virem. Tyto protilátky odrážejí celoživotní expozici HPV infekce a můžou přetrvávat celý život. Nepodávají tudíž informaci o současné nemoci. To by mohlo vysvětlit skutečnost, proč u některých pacientů naší studie byly nalezeny protilátky proti VLP několika typů HPV. Dalším vysvětlením by mohla být zkřížená reaktivita mezi různými typy HPV (Malik et al. 2009; af, V et al. 1998; Hamsikova et al. 2000; Malik, Hailpern, & Burk 2009). Studie ukazují, že tyto protilátky nejsou vhodným diagnostickým testem aktuální HPV infekce.

Naproti tomu E6 a E7 protilátky jsou jen vzácně přítomny u zdravých lidí. Jejich přítomnost byla zjištěna u pacientů s nádory, u kterých se etiologicky podílí virus HPV a jejich prevalence se zvyšuje s klinickým stadiem. Tyto markery jsou citlivějšími indikátory nejen pro detekci HPV pozitivního nádoru, ale mohou hrát roli i při sledování pacienta po terapii, jak jsme spolu s jinými prokázali (Hamsikova et al. 2000;Tachezy et al. 2006;Rubenstein et al. 2011;Koslabova et al. 2013). V našem souboru pacientů byla statisticky významná korelace mezi pozitivitou nádoru na HPV DNA a protilátkami proti onkoproteinům E6 a/nebo E7. Tyto protilátky mají poměrně vysokou senzitivitu i specificitu.

Přítomnost protilátek v séru (E6, E7 a HR VLP) v naší studii vysoce koreluje s výskytem HPV DNA v tkáni nádorů, což se shoduje i s jinými studiemi. Tyto studie popisují korelaci mezi 40-80 % (Zumbach et al. 2000; Reuschenbach et al. 2008). V naší studii byla prevalence protilátek proti onkoproteinům E6/E7 82,9 % a pro HR VLP to bylo 69,0%. Z hlediska demografické charakteristiky měli tito pacienti podobné parametry jako pacienti s nálezem HPV DNA ve tkáni nádoru. Pacienti s pozitivní sérologií byli častěji nekuřáci, nekonzumovali alkohol a neměli vysoký počet sexuálních partnerů. Ale byla zjištěna korelace mezi HPV pozitivní sérologií a praktikováním oro-genitálního sexu (E6 a/nebo E7 - nastavení P=0,016, nastavení VLP P=0,05).

U pacientek léčených na lézi na děložním hrdle byl zaznamenán pokles specifických protilátek proti HPV 16 E6 a/nebo E7, a to v několika studiích. Ve shodě s prací Rubenstein a spol. (Rubenstein et al. 2011) jsme pozorovali pokles titru protilátek proti virovým onkoproteinům HPV 16 E6 a/nebo E7, zatímco u protilátek proti VLP jsme žádný pokles nepozorovali. Toto zjištění je v souladu s tím, že přítomnost anti-VLP protilátek může odrážet celoživotní expozici HPV infekce, a protože mohou přetrvávat celý život, neodráží aktuální stav pacienta.

V průběhu času se počet pacientů, u kterých byl zaznamenán pokles hladiny protilátek, zvýšil. Titr HPV 16 E6 specifických protilátek proti HPV klesl jeden měsíc a rok po ukončení terapie v 54 % a 64 % pacientů. Podobné výsledky byly zjištěny pro protilátky specifické pro HPV 16 E7 antigen, 43 % a 65 % v daném pořadí. Podobné výsledky popisuje i práce Rubenstein a spol. (Rubenstein et al. 2011). Hladina titru protilátek se nicméně nezměnila u pacientů, kteří měli HPV DNA-pozitivní nádor před terapií a u nichž byla pozorována recidiva při dispenzarizaci. To naznačuje, že stálé hladiny protilátek specifických proti onkoproteinům HPV mohou být specifickým markerem pro detekci recidivy nemoci. Nicméně zde bude nutné vyhodnocovat naše data ve větším počtu případů.

Pokud je nám známo, zatím neexistuje žádná studie porovnávající HPV typy ve výplaších dutiny ústní a v nádorové tkáni hlavy a krku, která umožňuje detekci širokého spektra HPV a současně počítá i s vícenásobnou infekcí. Agrawal a spol. ve studii (Agrawal et al. 2008) porovnává přítomnost HPV 16 ve výplaších i v nádorové tkáni a poukazuje na shodu HPV typu v obou materiálech ve většině hodnocených případů. V naší studii jsme ukázali, že zatímco v nádorové tkáni jsme detekovali pouze HR HPV typy a vícenásobné infekce jsou spíše výjimečné (2,4 %), ve výplaších dutiny ústní jsou vícenásobné infekce častější (12 %)

a také jsme zaznamenali i LR HPV jako samostatnou infekci. U pacientů s HR HPV-pozitivním nádorem byli nicméně přítomné ve shodě s HR HPV ve výplachu dutiny ústní v 97 % případů, což naznačuje vylučování viru z nádoru. Tato korelace se jeví jako vysoce senzitivní a specifická, což potvrzují i další autoři (Smith et al. 2004;Zhao et al. 2005;Koslabova et al. 2013).

U pacientek léčených na lézi na děložním hrdle způsobené HPV dochází po 6-12 měsících po terapii k vymizení tohoto viru. Tyto pacientky již pak měly negativní cytologický nález, a to i na HPV DNA, a mají velmi malé riziko vzniku onemocnění (Kocken et al. 2011). Agrawal a spol. (Agrawal et al. 2008) naproti tomu poukazuje, že HPV může u pacientů s nádorem hlavy a krku přetrvávat v dutině ústní až po dobu pět let a HPV se detekuje před i po terapii ve výplachu. V naší studii jsme pozorovali vyčištění infekce s odstupem jednoho roku od ukončení terapie, ale na rozdíl od pacientek s cervikální lézí nebyla přítomnost či nepřítomnost HPV DNA ve výplaších po terapii významným markerem pro recidivu onemocnění či pro celkové přežití. Chuanga a spol. (Chuang et al. 2008) zase prokázal a tvrdí, že přítomnost HPV 16 ve výplachu po terapii může znamenat recidivu, a to o 3,5 měsíce dříve, než je klinicky detekovatelná. Nicméně tento jeho předpoklad je založen pouze na 4 případech recidivy onemocnění.

V souladu s předešlou studií případ-kontrola, která byla provedená na menším počtu pacientů, jsme potvrdili velmi dobrou korelaci mezi přítomností HPV DNA ve výplaších dutiny ústní a přítomností specifických protilátek proti HPV v krevním séru pacienta s přítomností HPV DNA v nádorové tkáni (Tachezy et al. 2009). Podobné výsledky byly ve shodě zaznamenány i v dalších pracích pro detekci HPV DNA a/nebo se specifickými protilátkami proti HPV (Smith et al. 2007a; Zumbach et al. 2000). Někteří autoři ale žádnou takou korelaci nepopisují (Herrero et al. 2003; Schwartz et al. 1998).

V průběhu dispenzarizace – přibližně jeden rok po ukončení terapie – u pacientů, u kterých byla prokázaná HPV infekce, došlo k jejímu vyčištění ve výplaších dutiny ústní, ale pořád zůstali séropozitivní na HPV-specifické protilátky. Nicméně došlo k poklesu titru protilátek proti HPV16 E6 a/nebo E7 onkoproteinům. Výjimku tvořili pacienti, u kterých byla prokázaná recidiva onemocnění.

Zatímco při dispenzarizaci pacientů naznačuje přítomnost protilátek proti HPV specifickým onkoproteinům lepší přežití, trvalé zvýšení jejich hladiny na druhé straně předpovídá rekurenci onemocnění. Přítomnost těchto protilátek významně korelovala

s přežitím, což ve svých pracích popisují i jiní autoři (Smith et al. 2010, Zumbach et al. 2000). Přítomnost HPV DNA ve výplachu dutiny ústní není prediktivním markerem, protože u většiny pacientů došlo k vymizení infekce po terapii a neobjevila se ani v případě recidivy onemocnění.

Dalším faktorem projevujícím se také na prognóze je velikost primárního nádoru a přítomnost uzlin. U HPV asociovaných nádorů však stadium choroby a zejména pak uzlinové postižení mají na celkové přežití významně menší vliv než u HPV negativních nádorů (Tachezy et al. 2009; Hafkamp et al. 2008; Charfi et al. 2008).S tím ale nesouhlasí práce Hoffman a spol. (Hoffmann et al. 2005), kde přežívání ovlivňuje přítomnost uzlinového postižení u pacientů bez ohledu na přítomnost HPV. Avšak převážná většina prací, včetně naších hodnotí HPV pozitivitu u pacientů jako nejvýznamnější prognostický ukazovatel (Charfi et al. 2008;Licitra et al. 2006).

Lepší prognóza zatím není zcela jasně vysvětlena, i když byla podána řada teorií. Asi nejvíc pravděpodobně se jeví tyto dvě teorie. První: pravděpodobně je to dáno rozdíly v metabolické dráze, která vede k vzniku nádoru. Pacienti s HPV-pozitivním nádorem, na rozdíl od tumorů, kde je hlavním etiologickým faktorem kouření, mají přítomen funkční gen TP53 a jsou tak citlivější na radioindukovanou apoptózu. Mají jiné a méně genetických alterací (Klussmann et al. 2009). Druhým možným důvodem, proč HPV pozitivní pacienti mají lepší přežívání, může být v imunitním systému. Lepší reakce pacienta na daný stav mohou být podstatné při obou léčebních modalitách – chirurgickou i nechirurgickou. Experimentální výsledky ukazují, že ke zlepšení odpovědi na radio a chemoterapii u HPV pozitivních tumorů jsou nutné funkční imunitní mechanismy (Spanos et al. 2009; Gillison et al. 2000; Ritchie et al. 2003; Lukesova et al. 2014).

Výsledky této studie ukázaly, že přítomnost HPV DNA v nádorových tkáních úzce souvisí s přítomností protilátek v séru a s přítomností HPV DNA ve výplachu dutiny ústní. Tyto markery se zdají být specifické a citlivé k identifikaci HPV infekce v nádorové tkáni a jsou prediktivní pro lepší přežití a méně časté recidivy nemoci. (Koslabova et al. 2013)

Mnohé studie (Gillison et al. 2000 ; Ritchie et al. 2003; Ragin & Taioli 2007), včetně této, dokázaly, že pacienti s HPV-pozitivním tumorem mají lepší výsledky přežití, dále mají lepší odpověď na terapii a taky mají menší počet rekurencí. Lepší přežití pacientů s HPV-pozitivními tumory je většinou nezávislé na velikosti tumoru, stavu uzlin, věku či pohlaví.

6 ZÁVĚR

Dizertační práce přinesla několik zjištění, z nichž některé jsou originální a jiné potvrzují již publikované poznatky:

- Ve skupině primárních dlaždicobuněčných nádorů orofaryngu a dutiny ústní byla prevalence HPV DNA v nádorové tkáni 59,2 % a nejčastější lokalita byla v orofaryngu, konkrétně v tonzilách. Nejčastějším typem byl HPV16.

- Detekce přítomnosti onkoproteínu P16 v nádorové tkáni, protilátek specifických proti HPV16E6 a/nebo E7 onkoproteinům a přítomnost HPVDNA ve výplaších při diagnóze jsou dobrými markery zapojení HPV do etiologie skupiny HNC

- Přítomnost HPV specifických protilátek proti HPV16E6 a/nebo E7 onkoproteinům může být citlivým ukazatelem recidivy při dispenzarizaci pacienta

- Skupina pacientů s HPV-pozitivním nádorem a pacienti s HPV-negativním nádorem mají rozličnou klinickou a demografickou charakteristiku

- Byla potvrzena prognostická výhoda pacientů s HPV pozitivními nádorem bez ohledu na další faktory

Výsledky této práce ukázaly dvě etiologické skupiny nádorů dutiny ústní a orofaryngu. Pacienti, u nichž byl nádor iniciován HPV, se liší od druhé skupiny, a to jak klinicky, tak demograficky. Příznivá prognóza pacientů s HPV pozitivními nádory by v budoucnosti mohla mít vliv na rozhodování o terapeutickém postupu, případně by mohla vést k desitenzifikaci léčby u HPV-pozitivních pacientů. Snížení intenzity léčby by přispělo ke snížení toxicity nechirurgické léčby a snížení mutilace operovaných pacientů. Při zlepšující se prognóze a lehkému snížení věku pacientů nabývají otázky kvality života po léčbě na významu.

I přes jasné molekulární a klinické rozdíly mezi HPV pozitivními a negativními tumory doposud neexistuje jiné doporučení k léčebnému přístupu k těmto dvěma jednotkám. Teprve probíhající studie dají odpověď na možnosti desintenzifikace léčby bez zhoršení doposud velmi nadějných výsledků u HPV pozitivních nádorů.

Důležité jsou i otázky prevence nádorů hlavy a krku. Zdá se, že vakcinace proti HPV infekci by mohla příznivě ovlivnit i nejen incidenci karcinomu děložního hrdla, ale i tuto skupinu nádorů orofaryngu. Očkování celé populace spolu s opatřeními proti konzumaci tabáku by v budoucnosti mohlo vést ke snížení převážné většiny nádorů hlavy a krku.

Domníváme se, že detekce HPV DNA ve výplaších dutiny ústní metodou PCR a serologická detekce anti-E6 a/nebo E7 protilátek jsou vysoce senzitivní a specifické a mohly by se využívat v klinické praxi. Sledování hladiny titru protilátek proti onkoproteinům E6 a/nebo E7 při dispenzarizaci pacienta by mohlo být časným markerem recidivy nádoru i v případech, kde klinický obraz ještě není jednoznačný.

7 LITERATURA

af G, V, Kibur M, Wang Z et al. (1998) Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. J Infect Dis 177:1710-1714.

Agrawal Y, Koch WM, Xiao W et al. (2008) Oral human papillomavirus infection before and after treatment for human papillomavirus 16-positive and human papillomavirus 16-negative head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 14:7143-7150.

Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A et al. (2007) Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. J Natl Cancer Inst 99:1801-1810.

Baay MF, Duk JM, Burger MP et al. (1999) Humoral immune response against proteins E6 and E7 in cervical carcinoma patients positive for human papilloma virus type 16 during treatment and follow-up. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:126-132.

Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A and Marcante ML (2000) Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. Anticancer Res 20:1301-1305.

Bernard HU (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 32 Suppl 1:S1-S6.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z et al. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology 401:70-79.

Bonner JA, Buchsbaum DJ, Russo SM et al. (2004) Anti-EGFR-mediated radiosensitization as a result of augmented EGFR expression. Int J Radiat Oncol Biol Phys 59:2-10.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 354:567-578.

Burd EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 16:1-17.

Charfi L, Jouffroy T, de CP et al. (2008) Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. Cancer Lett 260:72-78.

Chuang AY, Chuang TC, Chang S et al. (2008) Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol 44:915-919.

Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S and Weinberg RA (1992) The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. Trends Biochem Sci 17:312-315.

Cuschieri K and Wentzensen N (2008) Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17:2536-2545.

D'Souza G, Kluz N, Wentz A et al. (2014) Oral Human Papillomavirus (HPV) Infection among Unvaccinated High-Risk Young Adults. Cancers (Basel) 6:1691-1704.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al. (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med 356:1944-1956.

de Bondt RB, Nelemans PJ, Hofman PA et al. (2007) Detection of lymph node metastases in head and neck cancer: a meta-analysis comparing US, USgFNAC, CT and MR imaging. Eur J Radiol 64:266-272.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur HH (2004) Classification of papillomaviruses. Virology 324:17-27.

Di LA, Marcante ML, Poggiali F and Venuti A (1998) HPV 16 E7 antibody levels in cervical cancer patients: before and after treatment. J Med Virol 54:192-195.

DiMaio D and Petti LM (2013) The E5 proteins. Virology 445:99-114.

Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. J Clin Virol 32 Suppl 1:S7-15.

Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond) 110:525-541.

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C and Murakami I (2015) Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol 25 Suppl 1:2-23.

Duray A, Descamps G, Bettonville M et al. (2011) High prevalence of high-risk human papillomavirus in palatine tonsils from healthy children and adults. Otolaryngol Head Neck Surg 145:230-235.

Dušek L. MJ, Kubásek M., Koptíková J., et al,. www.svod.cz Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online] Verze 7.0 [2007]: Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine and Faculty of Science, Masaryk University

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 136:E359-E386.

Frisch M and Biggar RJ (1999) Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. Lancet 354:1442-1443.

Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC et al 2002. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. Clin Cancer Res;8:3445-53

Gillison ML (2009) HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. Eur J Cancer 45 Suppl 1:383-385.

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF and Fakhry C (2015) Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. J Clin Oncol 33:3235-3242.

Gillison ML, D'Souza G, Westra W et al. (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 ML, Koch WM, Capone RB et al. (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 ML, Koch WM and Shah KV (1999) Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? Curr Opin Oncol 11:191-199.

Gillison ML and Lowy DR (2004) A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. Lancet 363:1488-1489.

Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C et al. (2003) Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. J Virol Methods 112:23-33.

Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A et al. (2008) Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. Int J Cancer 122:2656-2664.

Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D et al. (2007) The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. Acta Otolaryngol 127:988-992.

Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H et al. (2006) Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. Int J Cancer 119:2620-2623.

Hamsikova E, Ludvikova V, Tachezy R et al. (2000) Longitudinal follow-up of antibody response to selected antigens of human papillomaviruses and herpesviruses in patients with invasive cervical carcinoma. Int J Cancer 86:351-355.

Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A et al. (2005) Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. Acta Otolaryngol 125:1337-1344.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M et al. (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. J Natl Cancer Inst 95:1772-1783.

Hemminki K., Dong, C., Triech, M. (2000) Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. Eur. J. Cancer Prev.,9, s. 433

Howlader N, Noone AM, Krapcho M et al (2013) SEER Cancer Statistics Review 1975-2010.

Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S et al. (2005) Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. Cancer Lett 218:199-206.

Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T et al. (2010) p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. Int J Cancer 127:1595-1602.

Howlader N, Ries LA, Mariotto AB et al. (2010) Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. J Natl Cancer Inst 102:1584-1598.

Hudelist G, Czerwenka K, Singer C et al. (2005) cDNA array analysis of cytobrush-collected normal and malignant cervical epithelial cells: a feasibility study. Cancer Genet Cytogenet 158:35-42.

Jones AS, Morar P, Phillips DE et al (1995), Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Cancer. 75(6):1343-53.

Khoury JD, Tannir NM, Williams MD et al. (2013) Landscape of DNA virus associations across human malignant cancers: analysis of 3,775 cases using RNA-Seq. J Virol 87:8916-8926.

Klozar J, Kratochvil V, Salakova M et al. (2008) HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol 265 Suppl 1:S75-S82.

Klozar J, Tachezy R, Rotnaglova E et al. (2010) Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. Wien Med Wochenschr 160:305-309.

Klozar J, Lischkeova B, Betka J. (2001) Subjective functional results 1 year after surgery and postoperative radiation for oropharyngeal carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 258:546-51

Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M et al. (2009) Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. Clin Cancer Res 15:1779-1786.

Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U et al. (2003) Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? Med Microbiol Immunol 192:129-132.

Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J et al. (2011) Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. Lancet Oncol 12:441-450.

Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I et al. (2003) Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer 107:401-406.

Koslabova E, Hamsikova E, Salakova M et al. (2013a) Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. Int J Cancer 133:1832-1839.

Kreimer AR, Bhatia RK, Messeguer AL et al. (2010) Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. Sex Transm Dis 37:386-391.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P and Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14:467-475.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. 2012. Robbins Basic Pathology: Elsevier/Saunders

Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. J Clin Oncol 2008;26:3128-37

Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K et al. (2003) Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. Am J Obstet Gynecol 188:49-55.

Licitra L and Felip E (2009) Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 20 Suppl 4:121-122.

Licitra L, Perrone F, Bossi P et al. (2006) High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 24:5630-5636.

Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L et al. (2007) Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. Mol Oncol 1:350-355.

Lukesova E, Boucek J, Rotnaglova E et al. (2014) High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. Biomed Res Int 2014:303929.

Malik ZA, Hailpern SM and Burk RD (2009) Persistent antibodies to HPV virus-like particles following natural infection are protective against subsequent cervicovaginal infection with related and unrelated HPV. Viral Immunol 22:445-449.

Manos MM, Wright DK, Lewis AJ et al, 1989, The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus, Mol Diagn Human Cancer 7,209-14

Mehanna H, Beech T, Nicholson T et al. (2012) Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. Head Neck.

Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E et al. (2002) Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. Int J Cancer 102:152-158.

Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T and Munck-Wikland E (2000) Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. Int J Cancer 89:300-304.

Munoz N, Bosch FX, de SS et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 348:518-527.

Mydlarz WK, Hennessey PT and Califano JA (2010) Advances and Perspectives in the Molecular Diagnosis of Head and Neck Cancer. Expert Opin Med Diagn 4:53-65.

Noone AM, Cronin KA, Altekruse SF et al. (2017) Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 26:632-641.

Pignon JP.,Bourhis J.,Bijnens L.,et al. (2000), Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma:three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet,355(9208),p.949-955

Posner MR (2002) Head and neck cancer carcinoma: new directions for treatment. MedGenMed 4:15.

Ragin CC, Reshmi SC and Gollin SM (2004) Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. Int J Cancer 110:701-709.

Ragin CC and Taioli E (2007) Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. Int J Cancer 121:1813-1820.

Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B et al. (2002) Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. Nat Genet 32:579-581.

Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin KL et al. (2008) Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. Int J Cancer 123:2626-2631.

Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF et al. (2003) Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. Int J Cancer 104:336-344.

Rotnaglova E, Tachezy R, Salakova M et al. (2011) HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. Int J Cancer 129:101-110.

Rous P and Beard JW (1935) THE PROGRESSION TO CARCINOMA OF VIRUS-INDUCED RABBIT PAPILLOMAS (SHOPE). J Exp Med 62:523-548.

Rubenstein LM, Smith EM, Pawlita M et al. (2011) Human papillomavirus serologic follow-up response and relationship to survival in head and neck cancer: a case-comparison study. Infect Agent Cancer 6:9.

Ruttkay-Nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdl L et al. (2013) Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). Int J Oncol 43:1754-1762.

Scarpini CG, Groves IJ, Pett MR, Ward D and Coleman N (2014) Virus transcript levels and cell growth rates after naturally occurring HPV16 integration events in basal cervical keratinocytes. J Pathol 233:281-293.

Schwartz SM, Daling JR, Doody DR et al. (1998) Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. J Natl Cancer Inst 90:1626-1636.

Scully C and Bedi R (2000) Ethnicity and oral cancer. Lancet Oncol 1:37-42.

Scully C, Field JK and Tanzawa H (2000) Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. Oral Oncol 36:256-263.

Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S et al. (2009) Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. Laryngoscope 119:1542-1549.

Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS et al. (1998) Human papillomavirus and risk of oral cancer. Laryngoscope 108:1098-1103.

Smith EM, Pawlita M, Rubenstein LM et al. (2010) Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer. Int J Cancer 127:111-117.

Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M et al. (2007a) Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. Int J Cancer 120:825-832.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF et al. (2004) Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. J Natl Cancer Inst 96:449-455.

Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM et al. (2007b) Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. Pediatr Infect Dis J 26:836-840.

Smith EM, Wang D, Kim Y et al. (2008) P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. Oral Oncol 44:133-142.

Spanos WC, Nowicki P, Lee DW et al. (2009) Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 135:1137-1146.

Straetmans JM, Olthof N, Mooren JJ et al. (2009) Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. Laryngoscope 119:1951-1957.

Sturgis EM (2013) International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium: update no. 9. Head Neck 35:2-3.

Sturgis EM and Cinciripini PM (2007) Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? Cancer 110:1429-1435.

Syrjanen S and Rautava J (2015) [HPV and cancer]. Duodecim 131:1765-1774.

Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L et al. (2009) Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. J Med Virol 81:878-887.

Tachezy R, Mikyskova I, Ludvikova V et al. (2006) Longitudinal study of patients after surgical treatment for cervical lesions: detection of HPV DNA and prevalence of HPV-specific antibodies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 25:492-500.

Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I et al. (2008) Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. Cancer Res 68:307-313.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 189:12-19.

Wang SS, Trunk M, Schiffman M et al. (2004) Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13:1355-1360.

Wentzensen N, Vinokurova S and von Knebel DM (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res 64:3878-3884.

Werness BA, Levine AJ and Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248:76-79.

Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL et al. (2005) Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. Int J Cancer 117:605-610.

Zumbach K, Hoffmann M, Kahn T et al. (2000) Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 85:815-818.

8 PŘÍLOHA

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

S IF:

Rotnáglová E, Tachezy R, Saláková M, Procházka B, **Košľabová E**, Veselá E, Ludvíková V, Hamšíková E, Klozar J. HPV involvement in tonsillar cancer : Prognostic significance and clinically relevant markers, *Int J Cancer*, Jul 2011, 129(1): 101-10, (**IF 2011: 5.444**)

Klozar J, Rotnáglová E, **Košľabová E**, Saláková J, Tachezy R. Risk and prognostic factor of tumors of oropharynx and oral cavity: the role of HPV, *Abstr Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009 Jul, 266:1085, (**IF 1.02**)

Košľabová E, Hamšíková E, Saláková M, Klozar J, Šalková E, Rotnáglová E, Ludvíková V, Tachezy R. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors, *Int. J Cancer*,Oct. 2013, 133(8):1832-9, (**IF 2013: 5.007**)

Kozar J, **Košľabová E**, Kratochvíl V, Saláková M, Tachezy R. Nodal status in not a prognostic factor in patients with HPV-positive oral/oropharyngeal tumors, , *J Surg Oncol*., May 2013, 107(6), 625-33, (**IF 2013: 2.843**)

Lukesova E, Boucek J, Rotnaglova E, Salakova M, **Koslabova E**, Grega M, Eckschlager T, Rihova B, Prochazka B, Klozar J, Tachezy R. High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas, *Biomed Res Int*. 2014;2014:303929. doi: 10.1155/2014/303929. Epub 2014 Apr 23, (**IF 2014: 2.53**)

Bez IF:

Rotnáglová E., Tachezy R., Saláková M., **Košľabová E**., Šmahelová J.,Hamšíková E., Ludvíková V., Klozar J., Vztah mezi HPV a epidemiologií u tonzilárních nádorů,; *Otorinolaryng. a Foniat.* , 59, 2010, No. 1

Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace

S IF:

Klozar J, Čada Z, **Košľabová E**. Complication of total laryngectomy in the era of chemoradiation , *Eur Arch Otorhinolaryngolog*. 2011, Apr 17, (**IF 2011: 1.8**)

Martina Saláková, **Eva Košlabová**, Zuzana Vojtěchová, Ruth Tachezy, Vojtěch Šroller. Detection of human polyomaviruses MCPyV, HPyV6, and HPyV7 in malignant and non-malignant tonsillar tissues, *Journal of Medical Virology*, Volume 88, Issue 4, pages 695–702, April 2016, (**IF: 1.998**)

Bez IF:

Roubíčková L., **Košľabová E**., Kysílko M., Vosmiková M., Sýba J., Kavka A., Hrušková M., Lukeš P., Lukešová E., Kolář P., Kövári M., Diagnostika a základy principů terapie dysfagie u pacientů po resekcích nádorů orofaryngeální oblasti, *Rehabilitace a fyzikální lékařství*, 2015, vol. 22, s. 64-69. ISSN 1211-2658

Betka J., Voldřich Z., **Košľabová E**., Devadesáté výročí vzniku Československé (České) Otorinolaryngologické společnosti, *Otorinolaryngologie a foniatrie,* 2013, vol. 62, s. 168-172. ISSN 1210-7867

Monografie:

Košľabová E. Akutní onemocnění ORL oblasti (Meniérova choroba, Quinckeho edém, laryngospasmus, cizí těleso v nose a uchu). V ORL pro všeobecné praktické lékaře, Praha : RAABE, 2011, Kapitola 1, str.: 4.-9., ISBN 978-80-86307-90-9