

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Epidemiologické a imunologické aspekty HPV etiologie nádorů hlavy a krku

Epidemiological and immunological aspects of HPV etiology of head and neck cancers

MUDr. Simona Maléřová

9.8.2021

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole

Školitel: prof. MUDr. Jan Klozar, CSc.

Konzultant: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt:

Četnost výskytu orofaryngeálních nádorů asociovaných s lidskými papilomaviry (HPV) neustále stoupá. Informace o prevalenci orálního HPV a jejích rizikových faktorech jsou velmi důležité pro budoucí screening a včasnou diagnostiku onemocnění.

Tato práce řeší tři témata. Jako první téma je zhodnocení prevalence HPV v ústní dutině u zdravé populace a zkoumání rizikových faktorů orální HPV infekce. Tato data ve střední Evropě téměř chybí. V souboru věkově starších nevakcinovaných pacientů byla nalezena statisticky významně vyšší míra pozitivivity (8,8 %) orální HPV infekce než u mladších, částečně vakcinovaných, dobrovolníků (2,0 %). Míra seropozitivity anamnestických HPV protilátek byla v obou souborech srovnatelná. Žádný z analyzovaných rizikových faktorů nebyl významně spojen s orální HPV pozitivitou.

Druhé téma, kterým se práce zabývá, je dynamika HPV specifických protilátek u pacientů s nádory hlavy a krku a jejich prognostický význam. Posuzovali jsme význam anamnestických protilátek a taky protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 při dlouhodobém sledování 2-14 let od ukončení léčby. Hladina HPV-specifických protilátek se statisticky signifikantně snížila během dlouhodobého sledování u nerecidivujících pacientů. Pokles HPV16 E6 protilátek po prvním roce sledování byl spojen s lepším celkovým přežitím (OS). Statisticky významný pokles anamnestických protilátek byl pozorován v průměru s odstupem více než 10 let od ukončení léčby.

Třetí téma disertační práce je hodnocení prognostického významu p16 pozitivivity u pacientů chirurgicky léčených pro karcinom dutiny ústní. Úloha p16 pozitivivity u karcinomů dutiny ústní není tak jasná jako u karcinomů orofaryngu. Pozitivita p16 proteinu byla zjištěna u 8,3 % pacientů chirurgicky léčených pro karcinom dutiny ústní. V souboru byla exprese p16 prokázána jako nejvýznamnější faktor negativně ovlivňující celkové 5leté přežití pacientů až 4krát ($p=0,019$). Dalšími faktory statisticky významně ovlivňující přežití byly: T status, N status a recidiva základního onemocnění.

Závěry: Nižší prevalence orální HPV DNA u mladších účastníků naznačuje pozitivní vliv očkování proti HPV. Dynamika HPV-specifických protilátek po jednorocním i dlouhodobém sledování je významným prognostickým faktorem. Exprese p16 u karcinomů dutiny ústní je negativním prognostickým faktorem, nicméně význam přítomnosti HPV/p16 proteinu u nádorů mimo orofaryngeální lokalizaci zůstává nejasný.

Klíčová slova: karcinomy hlavy a krku, orální prevalence HPV, HPV specifické protilátky, prognóza, p16 exprese

Summary:

The incidence of human papillomavirus (HPV) -associated oropharyngeal tumors is steadily increasing therefore, information about the prevalence of oral HPV and its risk factors is very important for future screening and early diagnosis of the disease.

This thesis addresses three topics. The first topic is to evaluate the prevalence of oral HPV in a healthy population and to investigate risk factors for oral HPV infection, given that these data are almost completely absent in Central Europe. A statistically significantly higher rate of positivity (8.8%) of oral HPV infection was found in the group of older unvaccinated probands than in younger partially vaccinated volunteers (2.0%). The seropositivity rate of anamnestic HPV antibodies was comparable in both groups. None of the analyzed risk factors were significantly associated with oral HPV positivity.

The second topic of the thesis is the dynamics of HPV specific antibodies in patients with head and neck cancer and their prognostic significance. In patients with cervical cancer, a decrease in HPV E6 / E7-specific antibodies is associated with a better prognosis. Another goal of the dissertation was to assess the importance of anamnestic antibodies and antibodies against oncoproteins E6 and E7 in long-term follow-up 2-14 years after the end of treatment.

The level of HPV-specific antibodies decreased in a statistically significant manner during long-term follow-up in non-recurrent patients. A decrease in HPV16 E6 antibodies after the first year of follow-up was associated with better overall survival (OS). A statistically significant decrease in anamnestic antibodies was observed on average more than 10 years after the end of treatment.

The third topic of the thesis is the evaluation of the prognostic significance of p16 positivity in patients surgically treated for oral squamous cancer. Of patients surgically treated for oral cancer, 8.3% were p16 positive. In the cohort, P16 protein expression was shown to be the most important factor impacting survivability. Its expression negatively affected patient survival up to 4 times ($p = 0.019$). Other factors which had a statistically significant influence on survival were: T status, N status and recurrence of the underlying disease.

Conclusions: The lower prevalence of oral HPV DNA in younger participants suggests a positive effect of HPV vaccination. The value of HPV-specific antibodies after one-year and long-term follow-up is an important prognostic factor. P16 protein expression appears to be a negative prognostic factor, however, the significance of the presence of HPV / p16 protein in tumors with non-oropharyngeal location remains unclear.

Key words: head and neck cancers, oral prevalence of HPV, HPV specific antibodies, prognosis, p16 expression

Obsah:

1 Úvod	5
2 Hypotézy a cíle práce	7
3 Materiál a metodika	8
4 Výsledky	12
5 Diskuse	14
6 Závěr	17
7 Literatura	18
8 Seznam publikací	20

1. Úvod

Lidské papilomaviry (HPV) jsou heterogenní skupina virů zařazených do pěti rodů. V současné době je známo více než 200 genotypů HPV. HPV z rodu alfa (alfa-PV) jsou označovány jako slizniční, z rodu beta, gama, mu a nu jako kožní. Alfa-PV jsou dále děleny na vysokorizikové a nízkorizikové typy. HPV16 je nejčastějším typem ve všech malignitách hlavy a krku asociovaných s papilomaviry. Bylo zjištěno, že pacienti s orofaryngeálním karcinomem s nálezem HPV16 v nádorových buňkách jsou v porovnání s pacienty s orofaryngeálním karcinomem bez asociace HPV16 přibližně o 10 let mladší, mají méně komorbidit, významně nižší expozici alkoholu a tabáku a prognóza jejich onemocnění je lepší. Imunohistochemicky potvrzená nadměrná exprese nádorového supresorového proteinu p16 je nyní rutinně používaným biomarkerem pro HPV-zprostředkovanou karcinogenezi. Lepší prognóza HPV asociovaných nádorů a odlišné spektrum rizikových faktorů si vyžádalo změnu klasifikace TNM a vznik odlišné kategorizace HPV asociovaných nádorů.

Prevalence orální HPV infekce u zdravých jedinců byla zkoumána jen v omezeném počtu studií a rizikové faktory pro její výskyt nejsou dosud zcela objasněny. Přehledové studie za posledních deset let ukázaly orální prevalenci HPV 4,5 až 7,7 %, HR HPV prevalenci 2,7 až 3,5 % a HPV16 prevalenci 1,0 až 1,4 % (Kreimer, 2010, Shigeishi and Sugiyama, 2016, Tam, 2018). Přehled prevalence HPV ve zdravé populaci je důležitý, jelikož incidence karcinomů orofaryngu v posledních letech významně stoupá. Ve skupině pacientů s těmito nádory stoupá podíl nádorů asociovaných s vysoce rizikovými typy HPV.

Ve Švédské studii byl pozorován účinek rutinního očkování proti HPV na orální prevalenci HPV. Před rutinním očkováním byla orální prevalence HPV 9,3 % a po naočkování 73,0 % populace byla snížena na 1,4 % (Grun, 2015).

Zkoumání prevalence orální HPV infekce u zdravých jedinců a rizikových faktorů této infekce může přispět k definování preventivních opatření pro tento druh malignit. Tyto údaje ze střední Evropy doposud chyběli.

V závislosti na virové náloži a době trvání infekce, protilátky proti virovým kapsidovým proteinům se vyvíjejí se zpožděním několika měsíců. Protilátková odpověď na kapsidové proteiny zůstává stabilní po dlouhou dobu od vymizení infekce, což ji předurčuje jako užitečný epidemiologický marker, který odráží minulou infekci (Herrero, 2003, Tachezy 2009).

Protilátky specifické pro virové onkoproteiny HPV16 E6 a E7 jsou vzácně přítomny u zdravých jedinců, ale jejich prevalence je typicky vysoká u pacientů s invazivními maligními nádory (Zumbach, 2000). Několik studií analyzovalo přetrvávání HPV-specifických protilátek u pacientů s HNC po léčbě. Ve studii Košlabová a kol. hladina protilátek specifických pro HPV16 E6 / E7 klesala již měsíc po ukončení léčby, protilátky specifické pro kapsidové proteiny zůstaly stabilní i po roce (Košlabova, 2013). Podobné výsledky byly pozorovány v jiných studiích (Zhang, 2017, Fakhry, 2016, Rubenstein, 2011), zatímco Lang Kuhs a kol. (Lang Kuhs, 2017) nepozoroval pokles hladin protilátek HPV16 E6 po ukončení léčby. Spector a kol. (Spector, 2017) zjistili signifikantně vyšší hladiny protilátek HPV16 E6 / E7 u pacientů s recidivou nádorů, a naopak častější pokles protilátek HPV16 E7 u pacientů bez recidiv během sledování.

Ve všech dosavadních studiích byla doba pozorování krátká, rychlost poklesu protilátek specifických pro HPV16 E6 / E7 u pacientů po léčbě nebyla zkoumána při delším sledování. Bylo také zjištěno, že u pacientů s orofaryngeálním karcinomem jsou protilátky HPV16 E6 / E7 přítomny mnoho let před diagnózou, proto je zajímavé analyzovat změny hladin protilátek během delšího sledování (Kreimer, 2014, Kreimer, 2017).

Dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní je jedním z nejčastějších malignit horního aerodigestivního traktu. Hlavním rizikovým faktorem je kouření, zejména v kombinaci s konzumací alkoholu. Dalším rizikovým faktorem pro vznik dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, zejména v oblasti orofaryngu, je infekce lidským papilomavirem (HPV). U dlaždicobuněčných karcinomů orofaryngu představuje HPV pozitivita významný

prognostický faktor. Prognostická role HPV positivity u dlaždicobuněčných karcinomů v ostatních lokalitách hlavy a krku zůstává nejasná.

Nejčastější metoda pro detekci HPV infekce u nádorů orofaryngu, která se využívá v běžné klinické praxi, je imunohistochemická detekce exprese proteinu p16INK4a (p16). Pro detekci HPV-asociovaného orofaryngeálního karcinomu má exprese p16 proteinu podle recentní přehledové studie s metaanalýzou sensitivitu 94 % (CI 91-97 %) a specificitu 83 % (CI 78-88 %) (Prigge, 2017).

U neorofaryngeálních karcinomů hlavy a krku se, podle některých studií, jeví diagnostický význam zvýšené exprese p16 jako markeru HPV infekce jako nejasný, podobně nejasná je i role HPV infekce v jejich etiologii (Klozar 2019).

Prevalence p16 exprese v karcinomech dutiny ústní se v publikovaných studiích liší, v Evropě se pohybuje v rozmezí 7-15,4 % (Dediol 2016, Gotz 2016). Výsledky studií zaměřených na posouzení vlivu p16/HPV DNA positivity na přežití pacientů po léčbě karcinomu dutiny ústní jsou rovněž velmi rozdílné.

2. Hypotézy a cíle práce

Cíl I:

1. Zjistit prevalenci HPV v buňkách z orálních výplachů a HPV specifických protilátek u zdravé populace ve věku 20 až 35 let
2. Zjistit souvislost HPV positivity s parametry demografickými a s parametry sexuálního chování
3. Porovnat soubor věkové skupiny 20 až 35 let s kontrolním souborem probandů ve věku 35 až 85 let

Cíl II:

4. Sledovat dynamiku kapsidových (anamnestických) protilátek a protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 HR HPV v intervalu 2-14 let od ukončení léčby pacientů s karcinomem orofaryngu
5. Porovnat dynamiku protilátek u pacientů s recidivou a bez recidivy karcinomu orofaryngu

Cíl III:

6. Zjistit prevalenci p16 pozitivních karcinomů dutiny ústní
7. Analyzovat prognostické faktory karcinomů dutiny ústní 5 let od ukončení léčby
8. Zjistit jakou roli v prognóze dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní hraje p16 pozitivita

Cíle byly stanoveny na základě těchto hypotéz:

Cíl I:

H1. Prevalence orální HPV u zdravé částečně očkované populace bude nižší než prevalence neočkované populace

H2. Prevalence HPV positivity souvisí s faktory sexuálního chování

H3. Prevalence orální HPV stoupá s věkem

Cíl II:

H4. Protilátky proti onkoproteinům E6 a E7 HR HPV klesají s dobou od ukončení léčby, kapsidové (anamnestické) protilátky si drží stabilní hodnotu i při dlouhodobém sledování

H5. Protilátky proti onkoproteinům E6 a E7 si u pacientů s recidivou základního onemocnění udržují vysokou hodnotu

Cíl III:

H6. Prevalence p16 pozitivních karcinomů dutiny ústní je nižší než prevalence p16 pozitivních karcinomů orofaryngu

H7. Nejvýznamnějším prognostickým faktorem lokálně pokročilých karcinomů dutiny ústní je postižení krčních uzlin

H8. Zvýšená exprese proteinu p16 nemá prognostický význam u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

3. Materiál a metodika

3.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace

3.1.1 Charakteristika souboru pacientů a dotazníky

Byly hodnoceny dvě skupiny zdravých účastníků. Do souboru I bylo zařazeno 294 studentů medicíny ve věku 20 až 35 let. Od všech studentů byl odebrán vzorek výplachu dutiny ústní. Od studentů, kteří nebyli očkováni, byl odebrán i vzorek krve. Každému účastníkovi bylo přiděleno identifikační číslo a byli tak anonymizováni. Soubor II byl složen z 215 jedinců ve věku 35 až 85 let s průměrným věkem 55,7 let, kterým byl materiál odebírán v rámci předchozích studií našeho výzkumného týmu (Tachezy et al., 2009). Žádný z jedinců ze souboru II nebyl očkován.

Dotazníky: Všichni účastníci souboru I byli požádáni, aby vyplnili anonymizovaný online dotazník zahrnující údaje o věku, sexuálním chování, vzdělání, stavu očkování proti HPV, užívání tabáku, alkoholu a drog. Další otázky se týkaly sexuálního chování.

Dotazník použitý pro soubor II, použitý v rámci předchozí studie (Tachezy et al., 2009), se zcela nepřekrýval s nově vytvořeným dotazníkem, a proto jen část byla využita pro účely porovnání.

3.1.2 HPV DNA detekce, genotypizace

Orální exfoliované buňky byly získány orálním výplachem po dobu 30 až 60 sekund pomocí 10 ml fosfátového pufru (PBS). DNA pro detekci HPV byla extrahována pomocí Puregene Core Kit B (Gentra Qiagen, Hilden, Německo).

HPV DNA detekce a genotypizace byly prováděny pomocí PCR za použití GP5 + a 5'-koncových biotinem značených GP6 + (BSGP5 + / 6 + bio) primerů, specifických pro region L1, a metodou reverzní hybridizace (RLB) (Tachezy et al., 2013).

Produkty PCR, u kterých nebylo možné určit typizaci pomocí reverzní hybridizace, byly sekvenovány pomocí soupravy BigDye Terminator Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). (Tachezy et al., 2013).

3.1.3. Sérologické vyšetření

Od každého pacienta bylo odebráno pět mililitrů krve. Přítomnost protilátek proti virově specifickým antigenům byla testována pomocí in-house metody ELISA (Parker et al., 2006). Pro detekci protilátek proti virovým kapsidovým proteinům jsme použili viru podobné částice složené z L1 proteinu (VLP), odvozené od HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58, které byly připraveny v rekombinantním bakulovirovém expresním systému (Frayne et al., 2006). Protilátky proti HPV16 E6 a E7 onkoproteinům byly detekovány pomocí fúzních proteinů s glutathion-S-transfrázou (Sehr et al., 2001).

Od hodnoty OD (optical density - optické hustoty) séra, získané na mikrotitrační destičce s virově-specifickým antigenem, byla odečtena hodnota OD stejného séra na destičce kontrolní. Pro každý antigen a destičku byla vypočtena hraniční hodnota (cut-off, CO) jako aritmetický průměr rozdílů OD plus 2/3 směrodatné odchylky (VLP/GST). Všechny výsledky testů ELISA byly vyjádřeny jako tzv. OD index (podíl mezi rozdílem OD daného séra a hodnotou CO), který do určité míry ukazuje sílu protilátkové odpovědi. Testovaná séra s OD indexem vyšším než 1 jsme označili jako pozitivní.

3.1.4 Statistická analýza

T-test a Fisherův test byly použity k vyhodnocení rozdílů mezi skupinami HPV-pozitivních a HPV-negativních. Statistiky byly vypočteny v R verzi 3.3 Core Team. Data jsou uvedena jako procenta nebo průměr ± standardní odchylky (SD).

3.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu

3.2.1 Charakteristika souboru pacientů

V této studii byla analyzována séra pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu orofaryngu (ICD-10: C9–10), kteří byli léčeni na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole v období 2001–2013. Před zahájením léčby byla odebrána krev. V této studii jsme hodnotili vzorky 133 pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu orofaryngu, kteří měli pozitivní séra na přítomnost protilátek proti HPV16 E6 a / nebo E7 před zahájením léčby. Z těchto 133 pacientů bylo 88,7 % (118/133) HPV DNA pozitivních a 11,3 % (15/133) HPV DNA negativních.

U 93 z těchto 133 pacientů bylo k dispozici kontrolní odběr po roce od ukončení léčby. Kromě toho jsme v roce 2015 přišlo 58 pacientů k dalšímu odběru vzorků krve. V kohortě 93 pacientů bylo během prvního roku sledování detekováno 5 recidiv. Ve skupině 58 pacientů s odběrem vzorků 2 až 14 let po léčbě byly zjištěny dvě duplicity.

3.2.2 Serologické vyšetření

Viz 3.1.3.

Všechny vzorky séra jednoho pacienta byly testovány na jedné destičce. Konverze ze séropozitivity na séronegativitu byla definována poklesem OD indexu pod cut-off hodnotu (index OD = 1).

3.2.3 Statistická analýza

Pro odhad změny průměrných hodnot HPV specifických protilátek v průběhu sledovaného období byly použity zobecněné odhadovací rovnice (generalized estimating equations - GEE) s korelační strukturou. Pro analýzu specifického přežití (DSS) a celkového přežití (OS) bylo využito Coxova modelu proporcionálních rizik. Modely zahrnovaly ukazatele poklesu hladiny specifických protilátek s přihlédnutím na věk pacienta. Předpoklad proporcionality byl potvrzen Grambschovým a Therneauovým testem. Grafické znázornění přežití u pacientů se snižující se hladinou protilátek bylo vyjádřeno pomocí Kaplan-Meierových grafů.

Wilcoxonův test se použil pro testování rozdílu v indexu OD počátečních hodnot hladin protilátek před zahájením terapie u pacientů s recidivami a pacientů bez nich.

Analýzy byly generovány pomocí statistického programu GraphPad Prism, verze 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA), softwaru CDC Epi Info™ (verze 7.2.1) a softwaru R (verze 3.4.0).

3.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

3.3.1 Charakteristika souboru pacientů

Do retrospektivní studie bylo zařazeno 120 pacientů, primárně chirurgicky léčených v období 2002–2017 pro dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní.

Soubor zahrnuje dvě skupiny pacientů. Skupina 1 (N=31) je skupina pacientů operovaných v období 2002-2012, jejichž data a vzorky biologického materiálu byly prospektivně odebrány v rámci předchozích projektů našeho výzkumného týmu (Koslabova et al., 2013, Rotnaglova et al., 2011). V tomto souboru byla již provedena detekce HPV DNA a taky imunohistochemická detekce proteinu p16. Skupina 2 (N=89) je skupina pacientů operovaných v období 2013-2017, u kterých byl k dispozici pouze výsledek imunohistochemického vyšetření p16 proteinu. Obě skupiny byly srovnatelné, co do klinicko-patologických parametrů (pohlaví, věk, anatomická lokalizace, kuřáctví, T a N status).

Alkohol pravidelně konzumovalo 37,0 % pacientů, 63,0 % pacientů alkohol nepilo vůbec nebo jen příležitostně. Od 7,5 % pacientů se tuto informaci nepodařilo zpětně dohledat.

Soubor zahrnoval 47,2 % nádorů těla jazyka (C02), 32,0 % nádorů spodiny dutiny ústní (C04), 14,4 % nádorů lokalizovaných v jiných částech dutiny ústní (C06) a 6,4 % nádorů v retromolární oblasti (C062) nebo v oblasti dásně (C03).

Podle rozsahu onemocnění, převažovali pacienti s nádory pT1 (42,5 %) a pT2 (43,3 %).

V průběhu sledování byla recidiva u 30,0 % pacientů a nádorová duplicita popsána u 8,3 % pacientů.

3.3.2 Imunohistochemie, HPV DNA detekce a genotypizace

Exprese p16 byla stanovena pomocí imunohistochemie v nádorové tkáni protilátkou p16INK4a (Purified Mouse) Anti-Human p16, Clone G175-405, BD, v ředění 1:100 (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Jako pozitivní jsou hodnoceny nádory, které vykazují střední a vyšší intenzitu barvení (++, +++) a jadernou i cytoplazmatickou pozitivitu, a to minimálně v 70 % nádorových buněk.

HPV DNA detekce a genotypizace byly prováděny identickou metodikou, jak je popsáno ve Studii I (kapitola 3.1.2).

3.3.3 Statistická analýza

Ke statistickému zpracování výsledků byl použitý program IBM SPSS verze 22.0. Pro popis souboru byly zvoleny metody deskriptivní statistiky, Fisherův přesný test a Pearsonův chí-kvadrát test. K hodnocení 5letého přežití od ukončení léčby bez známek nádoru (DSS) a celkového přežití (OS) byla použita Kaplan-Meierova metoda a ve vztahu k různým faktorům Log rank test (Mantel-Coxova metoda). Pro hodnocení statistické významnosti byla zvolena

hodnota $p \leq 0,05$. Metodou Coxova modelu proporcionálních rizik, byly v zařazených proměnných spočítané: signifikance, hazard ratio (HR – změna rizika exitu při jednotkové změně nezávislé proměnné) a 95 % intervaly spolehlivosti HR.

4. Výsledky

4.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace

Demografické charakteristiky: Do souboru I bylo zařazeno 294 z 388 odebraných dobrovolníků. Průměrný věk účastníků ze souboru I byl $23,20 \pm 1,24$ let a většina z nich byly ženy (71,4 %), nekuřáci (75,2 %), pravidelní uživatelé alkoholu (64,0 %) a nevakcinovaní HPV (59,4 %). V souboru II ($n = 215$) byl průměrný věk $55,70 \pm 10,63$ let. Většina účastníků byli muži (69,3 %) a kuřáci (61,4 %) a o něco více než polovina účastníků byla pravidelnými konzumenty alkoholu (51,2 %). Žádný dobrovolník ze souboru II nebyl vakcinován.

Charakteristiky sexuálního chování: V souboru I měla většina účastníků heterosexuální orientaci (96,3 %). Většina měla celkem za život 1 až 5 vaginálních sexuálních partnerů (67,7 %) a 1 až 2 partnery pro orální sex (46,3 %). Charakteristiky dostupné pro soubor II byly omezeny na počet vaginálních sexuálních partnerů, což bylo nejčastěji mezi 1 a 5 partnerů u 58,6 % účastníků.

Prevalence orální HPV infekce: Z 294 účastníků bylo v souboru I pouze 2,0 % (6/294) pozitivních na HPV, zatímco v souboru II bylo pozitivních na HPV 8,8 % (19/215). Ve výplachu úst bylo detekováno více typů HR HPV (HPV16, 45 a 59 v souboru I a HPV16, 18, 33, 39, 45, 51, 56 a 58 v souboru II). LR HPV typy 30, 44 a 54 byly nalezeny v souboru I, zatímco typy HPV11, 61, 70 a 118 v souboru II.

Prevalence HPV-specifických protilátek: Míra séropozitivity byla v obou souborech srovnatelná ($p = 0,758$); 63,7 % nevakcinovaných účastníků v souboru I ($n = 168$) a 61,6 % v souboru II mělo protilátky proti jakémukoli typu HPV. Prevalence protilátek proti proteinům E6 a E7 byla v obou souborech velmi nízká; 1,8 % (3/168) a 3,6 % (6/174) v souboru I a 2,8 % (6/211) pro oba typy proteinů v souboru II. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi oběma soubory v prevalenci žádné z testovaných protilátek.

Rizikové faktory spojené s orální infekcí HPV: Dále jsme zkoumali rizikové faktory pro orální HPV infekci v souboru I, kde byly zjištěny podrobné informace o potenciálním rizikovém chování účastníků studie. Žádný ze zkoumaných rizikových faktorů nebyl při porovnání

účastníků HPV pozitivních a negativních v dutině ústní statisticky významný. Žádný ze zkoumaných rizikových faktorů nebyl statisticky významný ani v souboru II.

4.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu

4.2.1 Změny v dynamice hladiny protilátek během prvního roku sledování

Jeden rok po ukončení léčby byly k dispozici vzorky séra od 93 z 133 pacientů, kteří byli při vstupu do studie pozitivní na protilátky anti-HPV16 E6 a / nebo E7.

Ve skupině pacientů bez recidiv bylo pozorováno snížení hladin protilátek u všech testovaných antigenů, ale pouze u HPV16 E6 ($p < 0.001$) a HPV16 E7 ($p < 0.001$) byly rozdíly statisticky významné. Ve skupině pacientů s recidivami se hladiny protilátek také snížily u všech testovaných antigenů, ale pokles byl statisticky významný pouze pro HPV16 E7 ($p = 0,025$). Taky rozdíl v OD indexu mezi pacienty s recidivou a bez recidivy byl pro HPV16 E7 statisticky významný ($p = 0,035$).

Vliv, jaký měla dynamika hladiny protilátek detekovaných jeden rok po léčbě na přežití byl testován pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik upraveného podle věku. HPV16 E6 protilátka byla jediným statisticky významným prognostickým faktorem pro celkové a specifické přežití pacienta.

4.2.2 Změny v dynamice hladiny protilátek při dlouholetém sledování

Z 93 pacientů, 58 pacientů přišlo poskytnout vzorek séra ke kontrole s odstupem 2 až 14 let od zahájení léčby (průměrně s odstupem 7 let).

U všech hodnocených protilátek byl zjištěn statisticky významný pokles jejich hladiny během dlouhodobého sledování a byla vypočtena průměrná roční změna OD indexu.

4.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

4.3.1 Exprese proteinu p16 – vztah k demografickým a klinicko-patologickým parametrům

Při analýze charakteristiky p16 pozitivních pacientů byli všichni (10/10) mužského pohlaví. Průměrný věk ve skupině p16 pozitivních byl 57,2 let, průměrný věk ve skupině p16 negativních byl 59,4 let. Ve studii nebyl zjištěn statisticky významný vztah mezi kuřáctvím a zvýšenou expresí p16 ($p=0,623$). Při analýze vztahu exprese p16 s anatomicou lokalizací nebyla nalezena statistická významnost ($p=0,578$). Nebyl prokázán významný vztah exprese p16 a velikosti nádoru (pT) nebo rozsahu uzlinového postižení (pN) ($p=0,900$, respektive $p=1,000$).

Celkové 5leté přežití (OS) bylo ve skupině p16 negativních delší, než u p16 pozitivních pacientů ($p=0,019$). Nenašli jsme statisticky významný rozdíl v nádorově specifickém přežití (DSS) ($p=0,952$) při porovnání p16 pozitivních pacientů s pacienty s p16 negativními nádory.

4.3.2 Faktory ovlivňující pětileté přežití

Pětileté přežití od ukončení léčby při analýze podle Kaplan-Meiera bylo 49,2 % (59/120), z toho u mužů 44,0 % (41/93) a u žen 66,7 % (18/27). Pohlaví bylo vyhodnoceno jako statisticky významný faktor ovlivňující 5leté přežití pacientů ($p=0,05$).

Věk při diagnóze a kouření neovlivňovali 5leté přežití pacientů ($p=0,771$, respektive $p=0,586$). Ani v Coxově modelu proporcionálních rizik věk ani kouření neměli vliv na riziko úmrtí ($p=0,902$; HR=0,965; 95 % CI 0,545 – 1,708; respektive $p=0,295$; HR=1,476; 95 % CI 0,715 – 3,58).

Anatomická lokalizace neovlivňovala 5leté přežití ($p=0,349$).

Klasifikace pT statisticky významně ovlivňovala 5leté přežití ($p=0,016$). Pět let přežívalo 62,7 % (32/51) pacientů s pT1, 44,2 % (23/52) pacientů s pT2, 33,3 % (4/12) u pacientů s pT3 a 0,0 % (0/4) u pacientů s pT4. Naproti tomu v Coxově modelu proporcionálních rizik, pT nebyla statisticky významná ($p=0,569$; HR=1,237; 95 % CI 0,595 – 2,572).

Postižení uzlin statisticky významně ovlivňovalo 5leté přežití. Pět let od ukončení léčby přežívalo 60,3 % (38/63) pacientů bez postižení uzlin a 36,8 % (21/57) pacientů s postižením uzlin ($p=0,011$). V Coxově modelu proporcionálních rizik, N status statisticky významně ovlivňoval riziko úmrtí ($p=0,007$; HR=2,159; 95 % CI 1,236 – 3,772).

Recidiva onemocnění také statisticky signifikantně ovlivnila 5leté přežití ($p=0,001$). Pět let od ukončení léčby přežívalo 25 % (9/36) pacientů s recidivou a 59,5 % (50/84) pacientů bez recidivy. V Coxově modelu proporcionálních rizik, recidiva významně ovlivnila riziko úmrtí ($p=0,007$; HR=2,263; 95 % CI 1,248 – 4,106).

Pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik byly analyzovány jako faktory zhoršující 5leté přežití: p16 pozitivita, recidiva a postižení krčních uzlin (pN+).

5. Diskuse

5.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace

Prevalence orální HPV u mladých dospělých jedinců byla nedávno sledována v několika studiích z jiných částí Evropy a světa. Přehledové studie za posledních deset let ukázaly orální prevalenci HPV 4,5 až 5,5 %, HR HPV prevalenci 2,7 až 3,5 % a HPV16 prevalenci 1,0 až 1,3 % (Kreimer et al., 2010, Shigeishi and Sugiyama, 2016). Nejnovější přehled (Tam et al., 2018), který zahrnoval 66 studií provedených v letech 1995 až 2017 s celkovým počtem zahrnutých vzorků 56 600, zaznamenal srovnatelná čísla; prevalenci orální jakékoliv HPV 7,7 %, HR HPV 3,5 % a HPV16 1,4 %. Poukázal také na geografickou variabilitu orální prevalence HPV, která byla nejvyšší v Jižní Americe (12,4 %) a nejnižší v Asii (2,6 %). V evropských studiích byla střední hodnota prevalence orální HPV infekce 9,9 %. Tento výsledek je srovnatelný s prevalencí HPV zjištěnou v našem Souboru II (8,8 %).

Specificita orální HPV prevalence pro jednotlivé věkové kategorie byla stanovena v americké studii zahrnující 5 579 jedinců ve věku 14–69 let. Nejvyšší prevalence byla pozorována ve věkových skupinách 30-34 let (7,0 %) a 60-64 let (11,0 %). Autoři předpokládali, že vysokou míru HPV pozitivitu lze přičíst zvýšené sexuální aktivitě v prvním vzestupu a snížené účinnosti imunitních mechanismů v důsledku stárnutí v druhém vzestupu (Gillison et al., 2012).

Několik studií prokázalo značný pokles prevalence orální HPV infekce u očkované populace. V Evropě studie Grun et al. (Grun et al., 2015) a Nordfors et al. (Nordfors et al., 2013) v populacích s mírou vakcinace 73 % a 64 % zjistili, že míra prevalence HPV v ústech byla 1,4 %, respektive 1,8 %. V souboru I aktuální studie byla pozorována srovnatelná orální HPV prevalence, navzdory nižšímu pokrytí vakcínou (40,5 %). Rozdíl v orální HPV prevalenci mezi dvěma zkoumanými soubory v této studii lze vysvětlit právě mírou proočkovanosti Souboru I. Polovina HPV-pozitivních účastníků ze Souboru I (3 ze 6) byla očkována a u žádného z nich nebyly identifikovány vakcinační typy HPV. Navzdory skutečnosti, že ve studii bylo málo potvrzených orálních HPV DNA pozitivních, výsledky naznačují možný pokles orální HPV infekce v souvislosti s vakcinací. To je v souladu s výsledky větších studií (Herrero et al., 2013, Mehanna et al., 2019, Schlecht et al., 2019).

Prevalence anamnestických (VLP) HPV-specifických protilátek se mezi soubory statisticky nelišila pro žádný studovaný antigen. Prevalence HR HPV-specifických protilátek v aktuální studii byla 38,1 % v souboru I a 46,9 % v souboru II. Při porovnání údajů z plošné studie Hamšíková et al. v obecné populaci nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v mladší ani starší věkové kategorii (soubor I vs. věková skupina 18–35 let z plošné studie; soubor II vs. věková skupina 35-88 z plošné studie) (Hamsikova et al., 2013).

V souboru I, ve které byl použit podrobný dotazník, jsme nebyli schopni identifikovat žádné rizikové faktory statisticky významně spojené s pozitivitou orální HPV infekce. Několik studií zjistilo, že sexuální chování, kouření a pití alkoholu (Gillison et al., 2012, Cook et al., 2014) jsou významnými rizikovými faktory pro orální HPV infekci. Americká studie zaměřena na vliv sexuálního chování na orální HPV infekci zaznamenala vyšší prevalenci u jedinců, kteří měli orální sexuální styk v posledních třech měsících před odběrem (D'Souza et al., 2014). V aktuální studii měli všichni jedinci s pozitivním vzorkem orální HPV infekce za posledních 12 měsíců více než jednoho partnera pro orální sexuální styk; výsledek ale nebyl statisticky významný kvůli malému počtu pozitivně testovaných jedinců ve studii.

Hlavní limitací této studie je nerandomizovaný výběr účastníků souboru I; studenti medicíny mají dobré znalosti o sexuálně přenosných nemocech a bariérové antikoncepci. Malý počet účastníků, mohl ovlivnit statistickou významnost asociace HPV infekce s rizikovými faktory. Výsledky jsou však srovnatelné s podobně koncipovanou studií (Antonsson et al., 2014). Další limitací, podobně jako v jiných studiích, je skutečnost, že prevalence orální HPV je obecně nízká. Důležitost některých rizikových faktorů proto nemusela být zjevná.

5.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu

V této studii jsme zjišťovali prognostickou hodnotu hladin HPV-specifických protilátek při zahájení léčby pro recidivu onemocnění.

Jen málo studií hodnotilo dynamiku HPV – specifických protilátek po ukončení léčby. Jen několik studií dosud se zaměřilo na dynamiku HPV-specifických protilátek u pacientů s HNC a většina z nich byla krátkodobá (Koslabova et al., 2013, Zhang et al., 2017, Rubenstein et al., 2011).

Spector a kol. (Spector et al., 2017) pozorovali vyšší hladiny protilátek HPV16 E6 a E7 při diagnostice a sledování u recidivujících pacientů a rychlejší pokles protilátek E7 u pacientů bez recidiv. Jiné studie naopak nepozorovaly rozdíly v hladinách protilátek HPV16 E6 a E7 u pacientů s recidivami a bez nich (Zhang et al., 2017, Lang Kuhs et al., 2017).

V našem souboru pacientů s orofaryngeálními nádory jsme vyhodnotili vliv poklesu hladiny protilátek detekovaných jeden rok po léčbě na přežití pacientů a zjistili jsme, že pokles hladiny HPV16 E6 – specifických protilátek je prediktivním faktorem celkového i specifického přežití.

5.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

V našem zkoumaném souboru byla prevalence p16 positivity 8,3 %, což je v souladu s recentními evropskými studiemi z Německa a Španělska, kde zjistili prevalenci p16 pozitivních pacientů s karcinomem dutiny ústní 7 % a 11 % (Grobe et al., 2013, Rodriguez-Santamarta et al., 2016).

Vztah mezi expresí p16 jako nepřímým markerem aktivní HPV infekce, která je spojena s lepší prognózou pacientů je využívána rutinně u nádorů orofaryngu. Existuje však velké spektrum nádorů se zvýšenou expresí p16, u kterých není HPV infekce kauzálním agens. U těchto nádorů může být zvýšená p16 exprese způsobena například genovou mutací oblastí, které jeho expresi reguluje. Pro některé nádory (karcinom plic nebo maligní melanom), je ztráta exprese p16 spojená s horší prognózou (Yanagawa et al., 2002).

Studie, které zkoumaly vztah mezi p16/HPV DNA pozitivitou a jejím vlivem na celkové i specifické přežití pacientů po léčbě karcinomu dutiny ústní jsou nejednoznačné. Některé korelují s výsledky naší studie a udávají horší prognózu u p16/HPV DNA pozitivních pacientů (Duray et al., 2012, Lee et al., 2015, Saghravarian et al., 2016), jiné naopak udávají lepší prognózu u pacientů s p16/HPV DNA pozitivitou u karcinomů dutiny ústní (Hoffmann et al., 2012, Minami et al., 2017, Satgunaseelan et al., 2016). Příčiny však nejsou zcela jasné. Někteří autoři zdůrazňují, že p16 exprese nemusí být známkou HPV infekce u karcinomů dutiny ústní a jde tedy o samostatný prognostický marker. Jako vysvětlení se taky nabízí, že nadměrná exprese p16 vede ke snížení invazivity redukcí matricových metaloproteináz (MMP-1 a MMP-9). (Kalfert et al., 2014).

Závěry z publikovaných studií se značně liší. Z výsledků vyplývá, že prevalence HPV DNA v nádorech dutiny ústní je výrazně nižší než u nádorů orofaryngu a zdá se, že není korelace mezi přítomností HPV DNA a expresí p16 v těchto nádorech. Otázka HPV etiologie u nádorů dutiny ústní tedy není zatím objasněna. Exprese p16 se, na základě našich i publikovaných dat, zdá být spíše negativním prognostickým faktorem, toto pozorování bude muset být ověřeno v rámci studií s větším souborem pacientů.

6. Závěry

Prevalence orální HPV positivity je u zdravé české populace ve věku 20-35 let 2 %. Séropozitivita na jakýkoli typ HPV byla u nevakcinovaných účastníků 63,7 %. Prevalence protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 je velmi nízká; 1,8 % (3/168) pro E6 a 3,6 % (6/174)

pro E7. Žádný ze zkoumaných demografických parametrů a faktorů sexuálního chování nebyl pro HPV pozitivitu statisticky významný. Prevalence orální HPV byla při porovnání s kontrolním souborem probandů ve věku 35 až 85 let významně nižší v souboru mladší částečně vakcinované populace (míra zaočkovanosti: 40,6 %). Prevalence HPV-specifických protilátek byla při porovnání souborů stejná. Míra positivity kapsidových protilátek (VLP) a protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 není závislá na věku ani kolektivní imunitě dané částečnou vakcinací (protilátky sledovány pouze u neočkovaných). U pacientů s orofaryngeálním karcinomem Během dlouhodobého sledování (2-14 let) dynamiky kapsidových (anamnestických) protilátek a protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 u pacientů s orofaryngeálním karcinomem po ukončení byl zjištěn statisticky významný pokles jejich hladiny během dlouhodobého sledování. U protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 byl statisticky významný pokles již při prvním kontrolním odběru s odstupem 1 roku. Kapsidové (anamnestické) protilátky měli významný pokles až při druhém odběru s odstupem 2-14 let od ukončení léčby. Statisticky významný pokles kapsidových protilátek byl s odstupem 10 let od ukončení léčby. V souboru pacientů s orofaryngeálními nádory byl vyhodnocen vliv poklesu hladiny protilátek detekovaných po léčbě na přežití pacientů a bylo zjištěno, že pokles hladiny HPV16 E6 – specifických protilátek je prediktivním faktorem celkového i specifického přežití. Pacienti bez recidivy základního onemocnění měli statisticky významně vyšší pokles hladiny protilátek v porovnání s analyzovanými pacienty s recidivou nebo duplicitou základního onemocnění.

Prevalence positivity proteinu p16 u pacientů operovaných pro karcinom dutiny ústní je 8,3 % (10/120 pacientů). Jako statisticky významné prognostické faktory negativně ovlivňující 5leté přežití byly potvrzeny: pozitivní exprese p16, vyšší status N, vyšší status T a recidiva onemocnění. Pozitivita proteinu p16 byl vyhodnocen jako nejvýznamnější faktor, statisticky významně zhoršující celkové 5leté přežití pacientů s dlaždicobuněčnými karcinomy dutiny ústní ($p=0,019$). Nebyl statisticky významný rozdíl v nádorově specifickém přežití (DSS) ($p=0,952$) při porovnání pacientů p16 pozitivních s p16 negativními nádory.

7. Použitá literatura

ANTONSSON, A., CORNFORD, M., PERRY, S., et.al., 2014. Prevalence and risk factors for oral HPV infection in young Australians. *PLoS One*, 9, e91761.

- COOK, R. L., THOMPSON, E. L., KELSO, N. E., et al., 2014. Sexual behaviors and other risk factors for oral human papillomavirus infections in young women. *Sex Transm Dis*, 41, 486-92.
- D'SOUZA, G., KLUZ, N., WENTZ, A., et al. 2014. Oral Human Papillomavirus (HPV) Infection among Unvaccinated High-Risk Young Adults. *Cancers (Basel)*, 6, 1691-704.
- DEDIOL, E., SABOL I., VIRAG M. et al., HPV prevalence and p16INK4a overexpression in non-smoking non-drinking oral cavity cancer patients, *Ora Dis*, 2016; 22(6):517-522.
- DURAY, A., DESCAMPS, G., DECAESTECKER, C., et al., 2012. Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *Laryngoscope*, 122, 1558-65.
- FAKHRY, C., QUALLIOTINE, J. R., ZHANG, Z., et al. 2016. Serum Antibodies to HPV16 Early Proteins Warrant Investigation as Potential Biomarkers for Risk Stratification and Recurrence of HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 9, 135-41.
- FRAYNE, S. M., PARKER, V. A., CHRISTIANSEN, C. L. et al. 2006. Health status among 28,000 women veterans. The VA Women's Health Program Evaluation Project. *J Gen Intern Med*, 21 Suppl 3, S40-6.
- GILLISON, M. L., BROUTIAN, T., PICKARD, R. K., et al. 2012. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*, 307, 693-703.
- GOTZ C., DRECOL E., STRAUB M., et al. Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 2016;7(47):76704-76712.
- GROBE, A., HANKEN, H., KLUWE, L., et al. 2013. Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 42, 676-81.
- GRUN, N., AHRlund-RICHTER, A., FRANZEN, J., et al. 2015. Oral human papillomavirus (HPV) prevalence in youth and cervical HPV prevalence in women attending a youth clinic in Sweden, a follow up-study 2013-2014 after gradual introduction of public HPV vaccination. *Infect Dis (Lond)*, 47, 57-61.
- HAMSIKOVA, E., LUDVIKOVA, V., STASIKOVA, J. & TACHEZY, R. 2013. Cross-sectional study on the prevalence of HPV antibodies in the general population of the Czech Republic. *Sex Transm Infect*, 89, 133-7.
- HERRERO, R., QUINT, W., HILDESHEIM, A., et al. 2013. Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. *PLoS One*, 8, e68329.
- HOFFMANN, M., TRIBIUS, S., QUABIUS, E. S., et al. 2012. HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett*, 323, 88-96.
- KALFERT, D., LUDVIKOVA, M., TOPOLCAN, O., et al. 2014. Analysis of preoperative serum levels of MMP1, -2, and -9 in patients with site-specific head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res*, 34, 7431-41.
- KLOZAR, J. 2019. Clinical relevance of human papillomavirus outside of oropharynx. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 27, 80-84.
- KOSLABOVA, E., HAMSIKOVA, E., SALAKOVA, M., et al. 2013. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer*, 133, 1832-9.
- KREIMER, A. R. 2014. Prospects for prevention of HPV-driven oropharynx cancer. *Oral Oncol*, 50, 555-9.
- KREIMER, A. R., BHATIA, R. K., MESSEGUER, A. et al. 2010. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*, 37, 386-91.
- KREIMER, A. R., JOHANSSON, M., YANIK, E. L., et al. 2017. Kinetics of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Antibody Response Prior to Oropharyngeal Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 109.
- LANG KUHS, K. A., KREIMER, A. R., TRIVEDI, S., et al. 2017. Human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence. *Cancer*, 123, 4382-4390.
- LEE, L. A., HUANG, C. G., TSAO, K. et al. 2015. Human Papillomavirus Infections are Common and Predict Mortality in a Retrospective Cohort Study of Taiwanese Patients With Oral Cavity Cancer. *Medicine (Baltimore)*, 94, e2069.
- MEHANNA, H., BRYANT, T. S., BABRAH, J., et al. 2019. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Effectiveness and Potential Herd Immunity for Reducing Oncogenic Oropharyngeal HPV-16 Prevalence in the United Kingdom: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis*, 69, 1296-1302.
- MINAMI, K., KOGASHIWA, Y., EBIHARA, Y., et al. 2017. Human papillomavirus and p16 protein expression as prognostic biomarkers in mobile tongue cancer. *Acta Otolaryngol*, 137, 1121-1126.
- NORDFORS, C., GRUN, N., HAEGGBLOM, L., et al. 2013. Oral human papillomavirus prevalence in high school students of one municipality in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 45, 878-81.
- PARKER, T. M., SMITH, E. M., RITCHIE, J. M., et al. 2006. Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. *Oral Oncol*, 42, 288-96.
- PRIGGE, E. S., ARBYN, M., VON KNEBEL DOEBERITZ, et al. 2017. Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 140, 1186-1198.
- RODRIGUEZ-SANTAMARTA, T., RODRIGO, J. P., GARCIA-PEDRERO, J. M., et al. 2016. Prevalence of human papillomavirus in oral squamous cell carcinomas in northern Spain. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273, 4549-4559.
- ROTNAGLOVA, E., TACHEZY, R., SALAKOVA, M., et al. 2011. HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer*, 129, 101-10.
- RUBENSTEIN, L. M., SMITH, E. M., 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.
- SAGHRAVANIAN, N., ZAMANZADEH, M., MESHKAT, Z., et al. 2016. Evaluation of the Prevalence Rate and the Prognostic Effect of Human Papilloma Virus Infection in a Group of Patients With Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Iran J Cancer Prev*, 9, e3998.

- SATGUNASEELAN, L., VIRK, S. A., LUM, T., et. al. 2016. p16 expression independent of human papillomavirus is associated with lower stage and longer disease-free survival in oral cavity squamous cell carcinoma. *Pathology*, 48, 441-8.
- SEHR, P., ZUMBACH, K. & PAWLITA, M. 2001. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods*, 253, 153-62.
- SHIGEISHI, H. & SUGIYAMA, M. 2016. Risk Factors for Oral Human Papillomavirus Infection in Healthy Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med Res*, 8, 721-9.
- SCHLECHT, N. F., MASIKA, M., DIAZ, A., et. al. 2019. Risk of Oral Human Papillomavirus Infection Among Sexually Active Female Adolescents Receiving the Quadrivalent Vaccine. *JAMA Netw Open*, 2, e1914031.
- SPECTOR, M. E., SACCO, A. G., BELLILE, E., et. al. 2017. E6 and E7 Antibody Levels Are Potential Biomarkers of Recurrence in Patients with Advanced-Stage Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 23, 2723-2729.
- TACHEZY, R., KLOZAR, J., RUBENSTEIN, L., et. al. 2009. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol*, 81, 878-87.
- TACHEZY, R., SMAHELOVA, J., KASPIRKOVA, J. et. al. 2013. Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One*, 8, e79156.
- TAM, S., FU, S., XU, L., et. al. 2018. The epidemiology of oral human papillomavirus infection in healthy populations: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*, 82, 91-99.
- YANAGAWA, N., TAMURA, G., OIZUMI, H., et. al. 2002. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in non-small cell lung cancers of tobacco smokers. *Jpn J Cancer Res*, 93, 1107-13.
- ZHANG, Y., WATERBOER, T., HADDAD, R. I., et. al. 2017. Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment. *Oral Oncol*, 67, 77-82.
- 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, 815-8.

8. Seznam publikací:

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

S.Simonidesová, E. Hamšíková, J. Klozar, R. Tachezy; Výskyt orální HPV infekce u zdravé populace: Systematický přehled se zaměřením na evropskou populaci; *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 67, 2018, č. 4, s. 175-183, IF: 0,397

Simonidesova S, Hamsikova E, Ludvikova V, Klozar J, Vencalek O, Tachezy R.; Prognostic value of posttreatment HPV-specific antibodies in patients with oropharyngeal tumors. *J Surg Oncol.* 2019 Apr 15. doi: 10.1002/jso.25473. IF: 3,114

Maléřová S, Hejtmánková A., Hamsikova E, Saláková M., Šmahelová J., Klozar J, Tachezy R.; Prevalence and Risk Factors for Oral HPV in Healthy Population, in Central Europe *Anticancer Res.* 2020 Mar;40(3):1597-1604. IF: 1,935

Maléřová S., Kalfeřt D., Grega M., Tachezy R., Klozar J. Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní; *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2020, č. 2, s. 64-72, IF: 0,397

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

J. Betka, J. Klozar, M. Kuchař, **S. Simonidesová**, M. Zábrodský, J. Plzák; Léky navozená spánková endoskopie – cesta k lepším chirurgickým výsledkům při léčbě syndromu obstrukční spánkové apnoe; *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(5): 516-520, IF: 0,209

Publikace bez IF: 0