

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Šiklův ústav patologie



Dizertačná práca

**HPV asociované karcinómy hlavy a krku:
morfologická, klinická a molekulovo biologická
korelácia**

**HPV-associated head and neck cancer: Morphological, Clinical,
and Molecular-Biological Correlation**

Marián Švajdler

Plzeň 2017

Odbor: Patologie

Školiteľka: Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.

PodĎakovanie

Rád by som poĎakoval vĎetkým kolegom, ktorí poskytli bioptický materiál a „follow-up“ pacientov, alebo sa iným spôsobom podieľali na príprave publikácií súvisiacich s témou tejto dizertačnej práce. Osobitné poĎakovanie patrí Prof. MUDr. Alene Skálovej, CSc. za odborné vedenie a prístup k materiálom v Registri nádorov hlavy a krku, RNDr. Jane Kašpírkovej, PhD. za genetické vyšetrenie súborov pacientov a RNDr. Romanovi Mezencevovi, PhD., za cenné pripomienky a pomoc pri spracovaní štatistiky a metaanalýz.

Vyhlasenie

Ďestne vyhlasujem, že dizertačnú prácu som vypracoval samostatne, na základe štúdia odbornej literatúry, ktorej zoznam je kompletne uvedený na príslušnom mieste.

Súhlasím s trvalým uložením elektronickej verzie práce v databáze UK LF Plzeň ako aj s možnosťou zapožičania tlačenej verzie tejto práce.

V Plzni 20.3.2017

MUDr. Marián Švajdler

Abstrakt

Práca je rozdelená na dve samostatné štúdie. (i) Vykonali sme retrospektívnu štúdiu na 22 pacientoch s cystickými metastázami skvamocelulárneho karcinómu (SCC) v oblasti hlavy a krku. Cieľom bolo zistiť či histomorfológia, expresia proteínu p16, HPV a EBV status môžu predpovedať primárnu lokalizáciu tumoru. Origo bolo identifikované v 20 z 22 prípadov a zahŕňalo orofarynx (14 prípadov, 63,3%), nazofarynx (traja pacienti, 13,6%), pľúca (dvaja pacienti, 9%) a kožu vonkajšieho zvukovodu (1 prípad, 4,5%). Primárna lokalizácia ostala neznáma v dvoch prípadoch (9%). 16 zo 17 metastáz (94,1%) pochádzajúcich z Waldayerovho prstenca a oba prípady s neznámym origom mali morfológiu nekeratinizujúceho SCC, alebo nekeratinizujúceho SCC s vyzrievaním. Všetky nádory s pôvodom v orofaryngu a oba prípady s neznámym origom boli difúzne p16-pozitívne a HPV-pozitívne. Všetky tri metastázy nazofaryngeálneho (NPCa) karcinómu boli EBV-pozitívne a p16/HPV negatívne. Metastázy pľúcnych karcinómov a karcinómu kože mali morfológiu dobre diferencovaného, resp. nízko diferencovaného keratinizujúceho SCC a boli HPV/EBV negatívne. Potvrdili sme, že cystické metastázy SCC v oblasti hlavy a krku sú asociované s okultným origom v orofaryngu. Orofaryngeálny pôvod by vždy mal byť podporený vyšetrením expresie p16 a HPV špecifickým testom, pretože SCC z iných lokalít sa môžu prezentovať cystickými metastázami. Pridanie EBV testu môže v časti p16/HPV-negatívnych prípadov odhaliť origo v nazofaryngu.

(ii) NPCa je v Českej a Slovenskej republike vzácna malignita a EBV/HPV status týchto nádorov je v podstate neznámy. V retrospektívnej štúdiu sme vyšetrili prítomnosť EBV a HPV u 62 pacientov s NPCa a vykonali sme metaanalýzu štúdií, ktoré udávali zastúpenie EBV-pozitívnych NPCa, HPV-pozitívnych NPCa detekovaných PCR vyšetrením a HPV-pozitívnych NPCa detekovaných pomocou expresie p16 alebo vyšetrením in situ hybridizáciou v bielej (kaukazskej) populácii. 61 prípadov malo morfológiu nekeratinizujúceho SCC a jeden bol keratinizujúci SCC. Iba jeden NPCa bol p16 a HPV-pozitívny; pomocou PCR vyšetrenia sme dokázali prítomnosť typ HPV18. Prítomnosť EBV bola dokázaná v 85,5% (53/62) prípadov. Na rozdiel od udávanej prevalencie EBV a HPV positivity v NPCa v kaukazskej populácii, väčšina našich pacientov z non-endemickej oblasti je EBV-pozitívnych a môžu byť vhodnými kandidátmi na cieľnú liečbu zameranú na prítomnosť EBV. HPV-pozitivita je v našej populácii vzácna a zdá sa, že HPV nezohráva významnú úlohu v patogeneze NPCa. Pravdepodobnosť, že HPV-pozitívna metastáza z neznámeho origa pochádza z okultného origa v nazofaryngu je v našej populácii malá a HPV-pozitivita by mala zamerať diagnostickú pozornosť na oblasť orofaryngu.

Abstract

This doctor thesis comprises two studies. (i) A retrospective study was performed on 22 patients who presented with cystic head and neck squamous cell carcinoma (SCC) metastases. The purpose of the study was to find out whether histomorphology, p16 protein expression, HPV and EBV status could be useful in predicting the localization of the primary tumor. The primary site was identified in 20 of 22 patients and included the oropharynx in 14 patients (63.6%), the nasopharynx in 3 patients (13.6%), the lungs in 2 cases (9%), and the skin of the auricle in one case (4.5%). No primary was found in two patients (9%). Sixteen of 17 cases (94.1%) originating in Waldayer's ring, and both cases with an unknown primary showed morphology of non-keratinizing SCC or non-keratinizing SCC with maturation. All tumors with oropharyngeal primary and both cases with unknown primary showed diffuse p16 staining and presence of HPV DNA. All three cystic metastases of nasopharyngeal carcinoma (NPCa) were EBV-positive and p16/HPV negative. In contrast, cutaneous and pulmonary metastases showed morphology of a well differentiated keratinizing SCC and poorly differentiated keratinizing SCC, respectively, and were HPV/EBV-negative. We confirmed that cystic SCC lymph node metastases of the head and neck region are strongly associated with the occult oropharyngeal primary. The oropharyngeal origin should always be corroborated by p16 immunohistochemistry and HPV-specific testing because SCC arising in other sites may manifest with cystic neck metastases as well. Addition of EBV testing in p16/HPV-negative cases can disclose the nasopharyngeal origin of the cystic neck metastases in a subset of cases.

(ii) NPCa is a rare malignancy in the Czech Republic and Slovakia and EBV/HPV status of NPCa is currently unknown. In a retrospective study, we evaluated the presence of EBV and HPV in 62 NPCa cases and performed meta-analysis separately for proportion of EBV-positive cases, PCR-detected HPV-positive cases and p16/in situ hybridization -detected HPV-positive cases in the Caucasian patients with NPCa. Sixty-one studied cases showed non-keratinizing morphology and one was keratinizing SCC. Only one non-keratinizing SCC was p16/HPV-positive and the DNA PCR confirmed the presence of HPV18 type. EBV was detected in 85.5% (53/62) of cases. In contrast with previous reports on the prevalence of EBV-positivity in Caucasian patients with NPCa, the majority of patients coming from this non-endemic region show EBV-positivity; therefore, they may be candidates for novel EBV-targeting therapies. Conversely, HPV-positive NPCa is very rare and HPV does not seem to play a significant role in the etiopathogenesis of NPCa in these populations. The probability that HPV-positive cervical metastasis from an unknown origin comes from an occult nasopharyngeal primary is very low in our population and HPV detection should direct attention to oropharynx.

Obsah

Zoznam použitých skratiek	7
1. Úvod	8
1.1. Epidemiológia malignít oblasti hlavy a krku.....	8
1.2. Epidemiológia malignít oblasti hlavy a krku v Českej a Slovenskej republike.....	8
1.3. Rizikové faktory karcinómov hlavy a krku	12
1.3.1. Vek a pohlavie.....	13
1.3.3. Úroveň orálnej hygieny a strata zubov.....	14
1.3.4. Socioekonomický status.....	15
1.3.5. Transplanácia hematopoetických kmeňových buniek	15
1.3.6. Zloženie stravy	15
1.3.7. Telesná konštitúcia (body mass index)	16
1.3.8. Infekcia ľudským papillomavírusom (Human papillomavirus, HPV)	16
2. HPV-asociovaný skvamocelulárny karcinóm orofaryngu a HPV v non-orofaryngeálnych karcinómoch hlavy a krku.....	17
2.1. Epidemiológia HPV-asociovaného karcinómu orofaryngu	17
2.2. Epidemiológia HPV-asociovaného skvamocelulárneho karcinómu orofaryngu v Českej a Slovenskej republike	19
2.3. Rizikové faktory HPV-asociovaného karcinómu orofaryngu.....	22
2.4. Klinické charakteristiky HPV-asociovaného karcinómu orofaryngu	23
2.5. HPV v non-orofaryngeálnych karcinómoch hlavy a krku.....	26
2.6. Morfológia HPV-asociovaného skvamocelulárneho karcinómu orofaryngu	28
2.6.1. Morfológia typického HPV-asociovaného orofaryngeálneho skvamocelulárneho karcinómu	28
2.6.2. Grading, histomorfologické prediktívne charakteristiky a staging HPV-asociovaného orofaryngeálneho skvamocelulárneho karcinómu.....	30
2.6.3. Histomorfologické varianty HPV-asociovaného orofaryngeálneho skvamocelulárneho karcinómu	31

3. Metastázy z neznámeho origa v oblasti hlavy a krku, cystické metastázy a diagnostická aplikácia imunohistochemického vyšetrenia p16 a HPV testovania	39
4. Metódy detekcie klinicky relevantnej HPV infekcie	41
5. Pôvod cystických metastáz v oblasti hlavy a krku	44
5.1. Ciele práce	44
5.2. Materiál a metodika	44
5.2.1. Výber pacientov, histologické a imunohistochemické vyšetrenie ...	44
5.2.2. PCR vyšetrenie	45
5.2.3. In situ hybridizácia	45
5.2.4. Výsledky	45
5.2.5. Diskusia	50
5.2.6. Záver	52
6. HPV a EBV v nazofaryngeálnom karcinóme v non-endemickej východoeurópskej populácii	53
6.1. Ciele práce	53
6.2. Materiál a metodika	55
6.2.1. Výber pacientov, histologické a imunohistochemické vyšetrenie ...	55
6.2.2. PCR vyšetrenie a in situ hybridizácia	55
6.2.3. Metaanalýza	55
6.3. Výsledky	56
6.4. Diskusia	60
6.5. Záver	62
Literatúra	63
Prehľad publikačnej činnosti	88
Prílohy	97

Zoznam použitých skratiek

DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBER	Epstein–Barr virus-encoded small RNAs
EBV	Epstein-Barrovej vírus
HPV	Human papillomavirus
HPV+ OP-SCC	HPV-asociovaný orofaryngeálny karcinóm
ISH	<i>in situ</i> hybridizácia
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
NK-SCC	nekeratinizujúci skvamocelulárny karcinóm
NPCa	nazofaryngeálny karcinóm
OP-SCC	orofaryngeálny skvamocelulárny karcinóm
PCR	polymerázová reťazová reakcia
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou
SCC	skvamocelulárny karcinóm

1. Úvod

1.1. Epidemiológia malignít oblasti hlavy a krku

Karcinómy oblasti hlavy a krku, patria celosvetovo medzi šesť najčastejších malignít, s incidenciou približne 600,000 nových prípadov za rok, so stúpajúcim trendom predovšetkým v mladších vekových kategóriách [Hunter 2005, Duvvuri 2009, Curado 2009, Warnakulasuriya 2009]. Vo výskyte karcinómov hlavy a krku sú výrazné geografické rozdiely (až 20-násobné), pričom riziko vzniku karcinómu ústnej dutiny a faryngu je v európskej populácii 1,85% u mužov a 0,37% u žien. V Európe je najvyššia incidencia v západnej Európe (najvyššia je vo Francúzsku, hlavne v severných častiach) a najnižšia v južnej a severnej Európe (Grécko, Fínsko, Švédsko). Stúpajúca incidencia a najvyššia mortalita v Európe je reportovaná z krajín východnej a juhovýchodnej Európy (Maďarsko, Slovensko, Česká republika, Slovinsko, Rumunsko, Bulharsko) [Warnakulasuriya 2009]. Napriek pokrokom v chirurgickej a onkologickej liečbe je mortalita v tejto skupine nádorov stále mimoriadne vysoká. Každoročne na malígne nádory oblasti hlavy a krku zomrie viac než 350,000 pacientov a 5-ročné prežívanie ostáva v posledných približne troch desaťročiach nezmenené, na úrovni iba približne 50% [Miller 2012, Conley 2006, Freedman et al., 2008].

1.2. Epidemiológia malignít oblasti hlavy a krku v Českej a Slovenskej republike

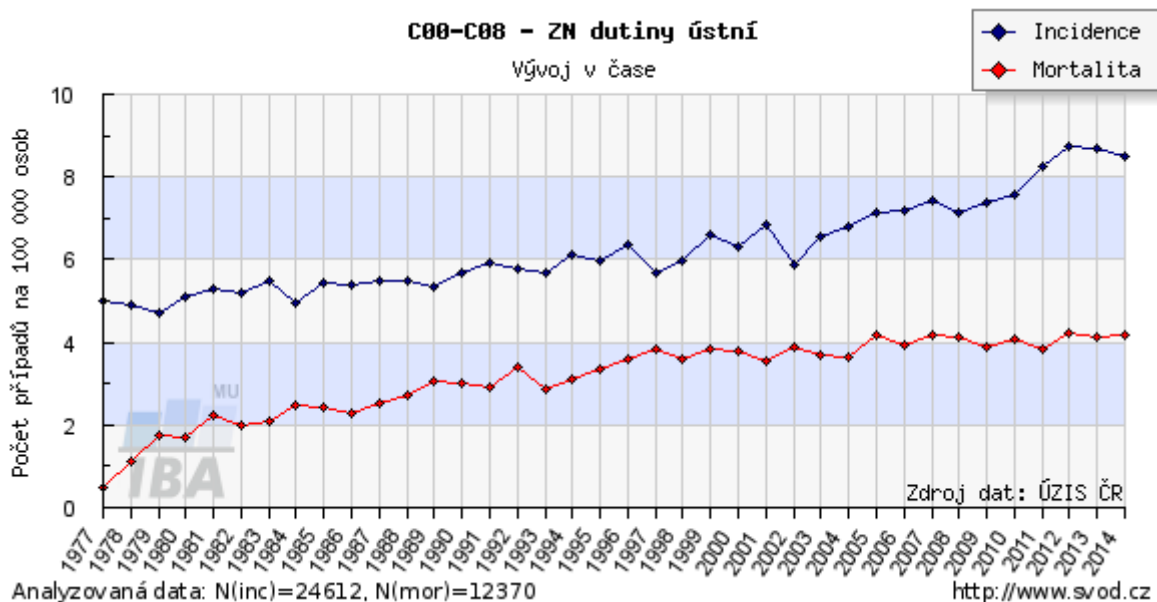
Podľa údajov Národného onkologického registra ČR za rok 2014 [Národní zdravotnický informační systém – Registry: NZIS Report č. R/1 (09/2016), dostupné na <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>] boli nádory dutiny ústnej a hltana deviatou najčastejšou malignitou u mužov (siedmou v poradí podľa mortality) a sedemnástou najčastejšou malignitou u žien (sedemnástou v poradí podľa mortality). Podľa údajov ÚZIS ČR (Ústav zdravotníckých informací a statistiky ČR) spracovaných webovým portálom www.svod.cz (Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice) [Dušek et al. 2005] bola v roku 2014 vekovo štandardizovaná incidencia (age standardized rate -world) malígnych nádorov dutiny ústnej a slinných žliaz 4,68 a mortalita 2,26 na 100,000 obyvateľov. Hrubá incidencia bola 8,48 a mortalita 4,19 na 100,000 obyvateľov. Hrubá incidencia a mortalita v rovnakej skupine malígnych nádorov (diagnózy C00-C08) vypočítaná z údajov Národného onkologického registra Slovenskej republiky pre rok 2009 [Dida et al. 2015] bola 10,35 a 5,9 na 100,000 obyvateľov. Vekovo štandardizovaná incidencia malígnych nádorov faryngu (mimo nazofaryngu) v roku 2014 v Českej republike bola 3,28 a mortalita 1,74 na 100,000 obyvateľov. Hrubá incidencia bola 5,64 a mortalita 3,13 na 100,000 obyvateľov [Dušek et al. 2005]. Hrubá incidencia a mortalita v rovnakej skupine

malígných nádorov (diagnózy C09, C10, C12-C14) v Slovenskej republike v roku 2009 bola 8,73 a 5,94 na 100,000 obyvateľov.

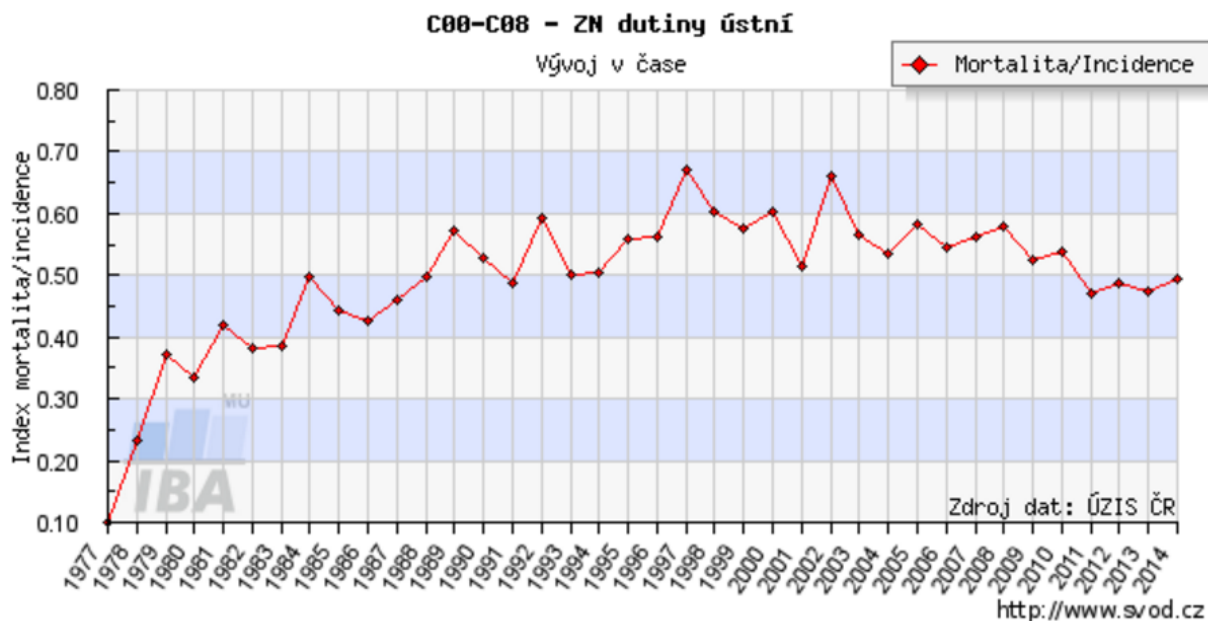
Časový vývoj hrubej incidencie a mortality a pomeru mortality k incidencii zhubných nádorov dutiny ústnej a slinných žliaz (diagnózy C00-C08) a hltanu (okrem nazofaryngu, diagnózy C09, C10, C12-C14) v Českej republike ukazujú Grafy 1 až 4. Z grafov je zjavné, že zatiaľ čo incidencia nádorov dutiny ústnej a slinných žliaz je relatívne stabilná, resp. stúpa mierne, v prípade karcinómov faryngu došlo za posledných necelých 40 rokov k dramatickému nárastu. Mortalita pre obe skupiny nádorov za posledných desať rokov (2005-2014) pohybuje medzi 50-60%.

Porovnanie vývoja vekovo štandardizovanej incidencie karcinómov dutiny ústnej a faryngu a vývoja mortality na karcinómy pery, dutiny ústnej a faryngu v Českej a Slovenskej republike podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie ukazujú Grafy č.5 a 6 [<http://gco.iarc.fr/>].

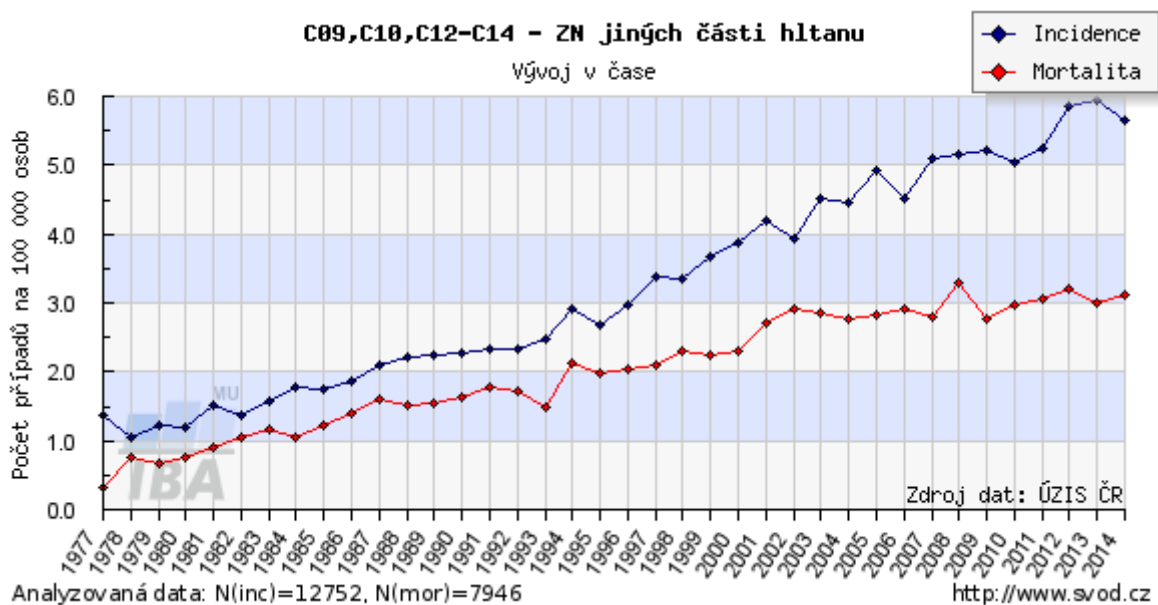
Graf č.1 - Časový vývoj hrubej incidencie (počet nových prípadov na 100,000 obyvateľov) a mortality na malígne nádory dutiny ústnej a slinných žliaz v Českej republike



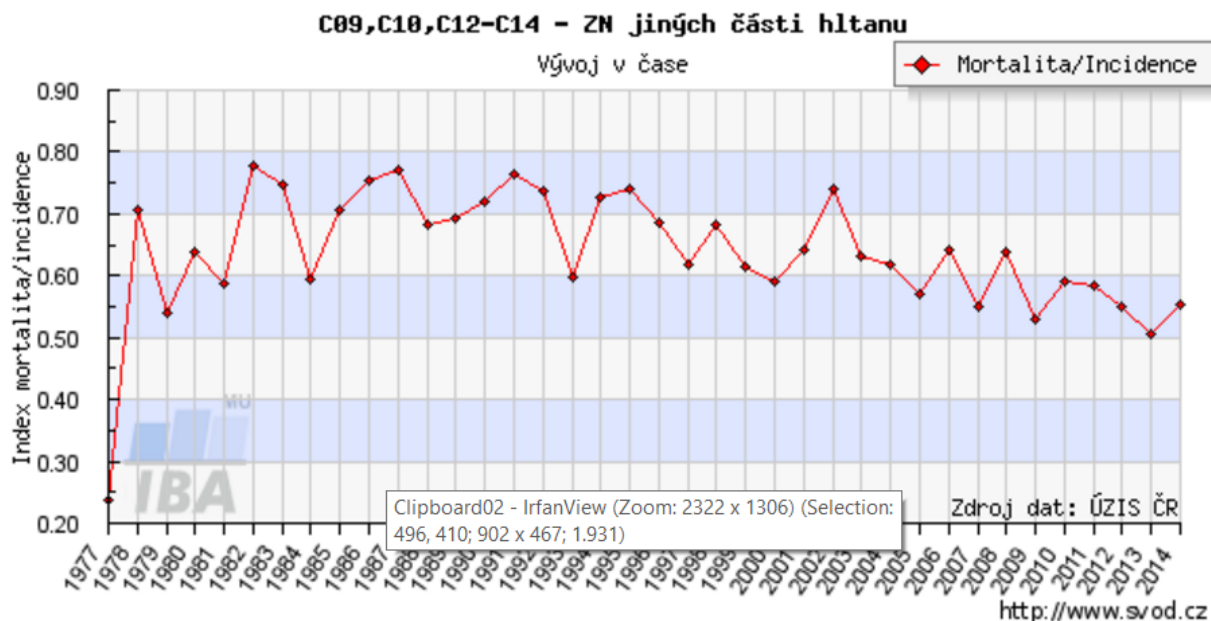
Graf č.2 - Časový vývoj pomeru mortality a hrubej incidence nádorov dutiny ústnej a slinných žliaz v Českej republike



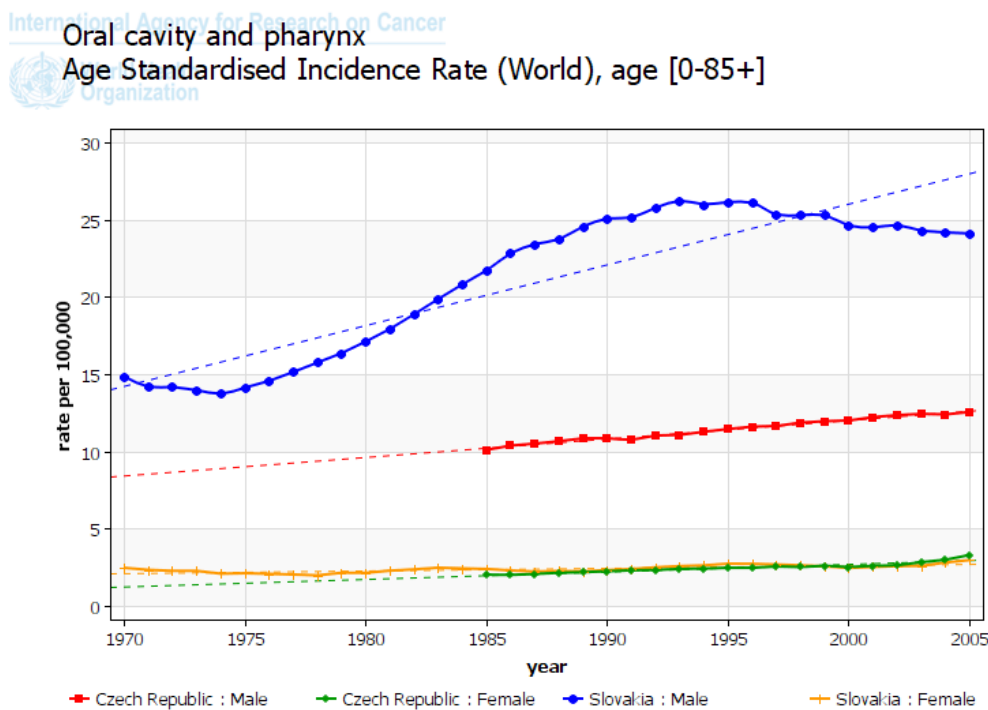
Graf č.3 - Časový vývoj hrubej incidence (počet nových prípadov na 100,000 obyvateľov) a mortality na malígne nádory faryngu (okrem nazofaryngu) v Českej republike



Graf č.4 - Časový vývoj pomeru mortality a hrubej incidence nádorov faryngu (okrem nazofaryngu) v Českej republike



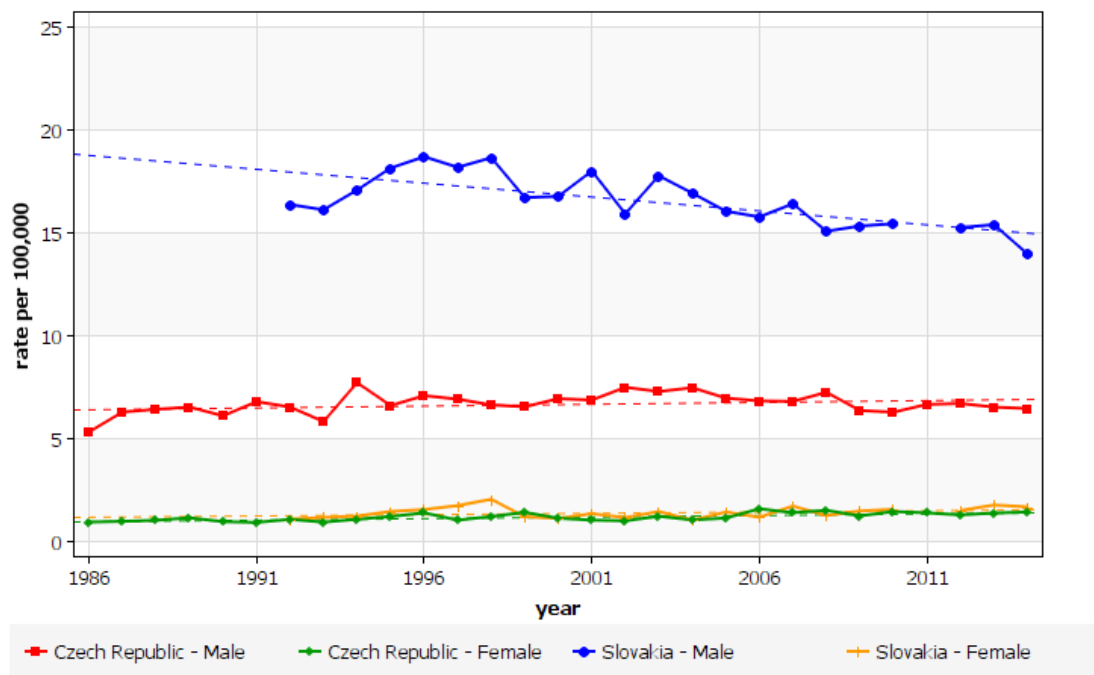
Graf č.5 - Porovnanie vývoja vekovo štandardizovanej incidence karcinómov dutiny ústnej a faryngu v Českej a Slovenskej republike



International Agency for Research on Cancer (IARC) - 27.11.2016

Graf č.6 - Porovnanie mortality na karcinómy pery, dutiny ústnej a faryngu v Českej a Slovenskej republike

Mortality from Cancer of the lip, oral cavity and pharynx
Age-standardised rate (World), all ages



International Agency for Research on Cancer (IARC) - 27.11.2016

1.3. Rizikové faktory karcinómov hlavy a krku

Skupina nádorov hlavy a krku zahŕňa malignity horného aerodigestívneho traktu (t.j. nádory nosa, prínosových dutín a nazofaryngu, dutiny ústnej a orofaryngu a hypofaryngu, hrtanu a trachey) a nádory slinných žliaz. Približne 90% týchto malignít tvoria skvamocelulárne karcinómy (SCC) vznikajúce v sliznici jednotlivých lokalít horného aerodigestívneho traktu [Curado et al., 2009] a práve tejto skupine nádorov sa venuje táto práca.

Aj keď je etiológia, patogenéza a prognóza karcinómov jednotlivých lokalít odlišná, majú spoločné niektoré rizikové faktory.

1.3.1. Vek a pohlavie

Riziko karcinómov hlavy a krku rastie so stúpajúcim vekom a väčšina prípadov sa vyskytuje vo veku viac ako 50 rokov. Vo všeobecnosti, vo väčšine krajín sveta sú karcinómy hlavy a krku častejšie u mužov ako u žien. Napríklad, v prípade karcinómov pery je pomer mužov k ženám približne 1,5:1 a v prípade karcinómu orofaryngu približne 2,8:1. Súvisí to pravdepodobne s častejším rizikovým správaním u mužov a vyššou expozíciou ultrafialovému žiareniu (v prípade karcinómu pery) [Warnakulasuriya 2009, Curado et al. 2009]. Incidencia karcinómov orofaryngu rastie predovšetkým v populácii vo veku menej ako 45 rokov, čo je dávané do súvislosti so stúpajúcou prevalenciou HPV infekcie [Curado et al., 2009].

1.3.2. Tabak a alkohol

Najznámejšími a hlavnými rizikovými faktormi karcinómov hlavy a krku je fajčenie a konzumácia alkoholu [La Vecchia et al. 1997, Hunter et al. 2005, Rodriguez et al. 2004, Wyss et al. 2013, Ordóñez-Mena et al. 2016]. Rizikom je aj žuvanie alebo šnupanie tabaku a to aj u pacientov, ktorí nikdy nefajčili [Sapkota et al. 2007, Lee 2013, Khan et al. 2014, Wyss et al. 2016], fajčenie vodnej fajky [Al-Amad et al. 2014] a žuvanie betelu [IARC 2004].

Fajčiari, ktorí nikdy nepili alkohol mali podľa jednej zo štúdií zvýšené riziko karcinómu dutiny ústnej (OR 1.35, 95% CI 0.90–2.01), faryngu (OR 2.02, 95% CI 1.34–3.05) a laryngu (OR 6.84, 95% CI 4.25–11.01) [Hashibe et al. 2007]. Naopak, v populácii, ktorá nikdy nefajčila ale pila alkohol, bolo riziko vzniku karcinómu orofaryngu, hypofaryngu a laryngu zvýšené iba v prípade častej konzumácie alkoholu (tri a viac nápojov denne, OR = 2.04, 95% CI = 1.29 -3.21) [Hashibe et al. 2007].

Podľa metaanalýzy z roku 2008 je u aktívnych fajčiarov relatívne riziko vzniku karcinómu laryngu 6,98, riziko vzniku karcinómu faryngu 6,76 a riziko karcinómu dutiny ústnej 3,43 [Gandini et al. 2008].

Nedobrovoľné (pasívne) fajčenie je taktiež asociované s približne 1,5 násobným rizikom vzniku karcinómov hlavy a krku, ak trvala pasívna expozícia tabakovému dymu v domácnosti alebo práci viac ako 15 rokov [Lee et al. 2008].

Je známe, že pri kombinácii fajčenia a pitia alkoholu sa riziko vzniku karcinómov hlavy a krku vzájomne násobí. Podľa jednej zo štúdií mali ťažkí fajčiari vo veku menej ako 46 rokov približne 20-násobné riziko vzniku karcinómu a ťažkí konzumenti alkoholu približne päť-násobné riziko. Pri

kombinácii ťažkého fajčenia a pitia alkoholu bolo riziko vzniku karcinómu dutiny ústnej a faryngu takmer 50-násobné [Rodriguez et al. 2004].

Významnú úlohu fajčenia a pitia alkoholu v patogenéze karcinómov hlavy a krku nepriamo potvrdzujú štúdie zaoberajúce sa vplyvom obmedzenia fajčenia a/alebo pitia alkoholu na riziko vzniku karcinómov hlavy a krku [Ordóñez-Mena et al. 2016]. V talianskej štúdii z roku 2007 bolo kumulatívne riziko karcinómu horného aerodigestívneho traktu vo veku 75 rokov u fajčiacich mužov 6,3% a toto riziko sa znížilo o približne polovicu (na 3,1%) u mužov, ktorí prestali fajčiť vo veku približne 50 rokov. U mužov, ktorí prestali fajčiť vo veku okolo 30 rokov bolo riziko dokonca iba 1,2%, takže sa priblížili populácii, ktorá nikdy nefajčila (riziko 0,8%) [Bosetti et al. 2007]. Analýza 17 štúdií skúmajúcich vplyv ukončenia fajčenia a 13 štúdií skúmajúcich vplyv ukončenia pitia alkoholu na riziko karcinómu hlavy krku potvrdila, že v prípade ukončenia fajčenia začína riziko klesať už po 1-4 rokoch ale v oboch prípadoch klesá riziko na úroveň populácie ktorá nikdy nefajčila/nepila alkohol až po viac ako 20 rokoch [Marron et al. 2010].

1.3.3. Úroveň orálnej hygieny a strata zubov

V japonskej epidemiologickej štúdii bol pozorovaný signifikantne vyšší výskyt karcinómov oblasti hlavy a krku, pažeráka a pľúc u pacientov so stratou zubov. Asociácia straty zubov a malignít hlavy a krku bola potvrdená aj po zohľadnení ďalších rizikových faktorov, najmä fajčenia a konzumácie alkoholu a týkala sa mužov vo veku 70 a menej rokov a všetkých žien [Hiraki et al. 2008]. Podobne, multicentrická štúdia pacientov z Latinskej Ameriky a Centrálnnej Európy dokázala asociáciu zlej ústnej hygieny (nepoužívanie zubnej kefy, chýbanie zubných preventívnych prehliadok, pravidelné používanie ústnej vody namiesto adekvátnej starostlivosti) a chýbania zubov s karcinómami dutiny ústnej, hltana, hrtana a pažeráka. Táto asociácia bola nezávislá od konzumácie alkoholu a fajčenia [Guha et al. 2007].

Uvažuje sa o viacerých možných mechanizmoch asociácie nízkej orálnej hygieny a straty zubov s malignitami hlavy a krku. Predovšetkým, strata zubov je bežným dôsledkom chronických bakteriálnych infekcií a periodontitídy a chronický zápal sa produkciou rôznych cytokínov môže podieľať na patogenéze malignít. Ďalším možným mechanizmom môže byť produkcia karcinogénov baktériami (predovšetkým nitrózamínov). Strata zubov môže ďalej viesť k zníženiu schopnosti žuť potravu, s následným požívaním menej zdravých potravín a prehĺtanie väčších kusov potravy s mechanickým poškodzovaním slizníc. A nakoniec, periodontitída môže byť markerom stavu

imunity, ktorá taktiež hrá významnú úlohu v nádorovej progresii [Hiraki et al. 2008, Guha et al. 2007, Meyer et al., 2008].

1.3.4. Socioekonomický status

Nízka ústna hygiena čiastočne pravdepodobne súvisí s ďalším skúmaným rizikovým faktorom, ktorým je nízky socioekonomický status. Podľa metaanalýzy 41 prác skúmajúcich vplyv socioekonomického stavu na riziko vzniku karcinómu dutiny ústnej boli nízka úroveň vzdelania, nízky sociálny status na základe hodnotenia zamestnania a nízky finančný príjem asociované s 1,84-2,41-násobným rizikom vzniku karcinómu. Táto asociácia platila rovnako pre bohaté krajiny ako aj krajiny s nižšími príjmami [Conway et al., 2008].

1.3.5. Transplanácia hematopoetických kmeňových buniek

Pacienti po transplantácii hematopoetických kmeňových buniek majú zvýšené riziko sekundárnych malignít. Najčastejšie sa jedná o leukémie alebo lymfómy, ale je zvýšené aj riziko výskytu solídnych nádorov a to predovšetkým skvamocelulárneho karcinómu dutiny ústnej (najmä jazyka), karcinómu slinných žliaz, pažeráka alebo kože. Rizikovými faktormi sú chemoterapia s alebo bez celotelového ožiarovania, imunosupresívna liečba, aktivácia vírusových infekcií, uplynutá doba od transplantácie a predovšetkým chronická forma „graft versus host disease“ prejavujúca sa mukozitídou, xerostómiou a lichenoidnými zmenami na slizniciach [Demarosi et al. 2005, Kruse et al. 2009, Chen et al. 2011, Yokota et al. 2012, Atsuta et al. 2014, Adhikari et al. 2015].

1.3.6. Zloženie stravy

Strava s nízkym obsahom ovocia, zeleniny a antioxidantov je rizikovým faktorom pre vznik karcinómov hlavy a krku [La Vecchia et al. 1997, Petridou et al. 2002]. Naopak, niekoľko štúdií dokázalo inverzný vzťah medzi výskytom karcinómov oblasti hlavy a krku a absolútnym množstvom konzumovanej zeleniny a ovocia ako aj konzumáciou niektorých konkrétnych skupín ovocia a zeleniny (napr. strukoviny, jablká, broskyne, nektarinky, slivky, jahody, papriky, paradajky, mrkva, listový šalát) [Freedman et al. 2008, Maasland et al. 2015]. Potenciálnym protektívnym mechanizmom sú antikarcinogénne, antioxidantné a protizápalové vlastnosti mnohých zložiek obsiahnutých v ovoci a zelenine, najmä vitamínov, vlákniny, folátov, flavonoidov a karotenoidov

[Maasland et al. 2015]. Metaanalýza štúdií zaoberajúcich sa vplyvom karotenoidov prijatých v potrave na riziko karcinómov hlavy a krku potvrdila výraznú redukciu rizika karcinómov dutiny ústnej, laryngu a faryngu vplyvom celej skupiny karotenoidov [Leoncini et al. 2015]. Aj keď vysoká konzumácia zeleniny a ovocia môže odrážať celkovo zdravší životný štýl, s nižšou tendenciou fajčiť a nižšou konzumáciou alkoholu, niektoré štúdie dokázali protektívny efekt antioxidantov aj v populácii fajčiarov a/alebo konzumentov alkoholu [Suzuki et al. 2006]. V iných štúdiách bol však protektívny účinok konzumácie zeleniny a ovocia vynulovaný konzumáciou alkoholu a fajčením [Peters et al. 2008].

Kontroverzný je vzťah medzi konzumáciou mliečnych výrobkov a rizikom karcinómov hlavy a krku. Zatiaľ čo v štúdiu Petersa a spol. bol príjem mliečnych výrobkov a živočíšnych tukov asociovaný s vyšším rizikom karcinómov hlavy a krku [Peters et al. 2008], v iných štúdiách bol potvrdený inverzný vzťah medzi výskytom karcinómov a konzumáciou niektorých mliečnych výrobkov [Sapkota et al. 2008, Kawakita et al. 2012].

1.3.7. Telesná konštitúcia (body mass index)

Zaujímavý je vzťah medzi telesnou konštitúciou (body mass index, BMI) a rizikom karcinómov hlavy a krku. Viaceré štúdie dokázali zvýšené riziko karcinómu u podvýživných ľudí ($BMI \leq 18,5 \text{ kg/m}^2$), a to aj po zohľadnení fajčenia alebo konzumácie alkoholu a znížené riziko u ľudí s nadváhou ($BMI > 25.0\text{--}30.0 \text{ kg/m}^2$) alebo obezitou ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) [Peters et al. 2008, Gaudet et al. 2010, Petrick et al. 2014]. Podľa niektorých štúdií sa však protektívny efekt $BMI > 25.0$ môže týkať iba populácie s pozitívnou fajčiarskou anamnézou a/alebo konzumáciou alkoholu [Gaudet et al. 2010] alebo iba konkrétnej rasy (napr. Afroameričanov) [Petrick et al. 2014]. Akým mechanizmom nadváha alebo obezita chráni pred vnikom karcinómov hlavy a krku nie je jasné, ale uvažuje sa, že vyššia telesná hmota môže modifikovať efekt karcinogénov alebo metabolický efekt toxínov [Peters et al. 2008].

1.3.8. Infekcia ľudským papillomavírusom (Human papillomavirus, HPV)

Časť pacientov s karcinómami oblasti hlavy a krku (až do približne 20%) nemá v anamnéze fajčenie, pitie alkoholu ani ďalšie významné rizikové faktory. Vďaka úsiliu verejného zdravotníctva a aktivitám na prevenciu fajčenia v posledných tridsiatich rokoch celosvetovo prevalencia fajčenia pomaly klesá [Ng et al. 2014, Li et al. 2016] a s týmto poklesom klesá aj výskyt karcinómov hlavy a krku asociovaných s fajčením. Na druhej strane, incidencia

orofaryngeálnych karcinómov v období medzi rokmi 1973 až 2004 signifikantne rástla ročne o 1,3% (karcinómy bázy jazyka), resp. o 0,6% (karcinómy podnebnjej mandle), zatiaľ čo v rovnakom období incidencia karcinómov dutiny ústnej klesala o 1,9% [Chaturvedi et al. 2008, Wilczynski et al. 1998]. Za tento nárast incidence orofaryngeálnych karcinómov je zodpovedná predovšetkým infekcia ľudským papillomavírusom (HPV) [Chaturvedi et al. 2013, Gillison et al. 2015].

Na možnú úlohu HPV v etiopatogenéze karcinómov oblasti hlavy a krku po prvý krát poukázal Syrjänen a spol. v roku 1983 [Syrjänen et al. 1983]. V nasledujúcich rokoch mnohé štúdie dokázali asociáciu medzi HPV a skvamocelulárnym karcinómom oblasti hlavy a krku, a to predovšetkým v oblasti orofaryngu [Gillison et al, 2000, Tran et al., 2007, Chaturvedi et al. 2011, Abogunrin et al. 2014, Tinhofer et al. 2015, Garnaes et al. 2015]. IARC (International Agency for Research on Cancer; organizácia Svetovej zdravotníckej organizácie) uznala v roku 2007 infekciu HPV ako významný nezávislý rizikový faktor pre vznik karcinómov oblasti hlavy a krku [IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2007].

2. HPV-asociovaný skvamocelulárny karcinóm orofaryngu a HPV v non-orofaryngeálnych karcinómoch hlavy a krku

2.1. Epidemiológia HPV-asociovaného karcinómu orofaryngu

Orofarynx je časť hltana, ktorá je ohraničená rovinou hornej plochy mäkkého podnebia a hornou plochou os hyoideum, respektíve spodinou vallecule epiglottica. Skvamocelulárne karcinómy orofaryngu sú teda lokalizované na (i) na zadnej tretine (koreni) jazyka a na vallecule epiglottica; (ii) podnebných mandliach, fossa tonsillaris a sliznici podnebných oblúkov; (iii) spodnej strane mäkkého podnebia, vrátane uvuly a (iv) na zadnej stene orofaryngu [Patel et al. 2009]. Prevalencia HPV-asociovaných orofaryngeálnych skvamocelulárných karcinómov (HPV⁺ OP-SCC) je relatívne vysoká predovšetkým na koreni jazyka (jazyková mandľa) a podnebných mandliach, v porovnaní s ostatnými časťami orofaryngu [Garnaes et al. 2015, Abogunrin et al. 2014].

Podľa prác zo Spojených štátov je s HPV asociovaných až ~ 70 - 80 % OP-SCC [Chaturvedi et al. 2011, Singhi et al. 2010a, Lewis et al. 2010]. Prevalencia HPV⁺ OP-SCC v Európe je udávaná vo všeobecnosti nižšia (v rozmedzí 3 % - 79 %) [Rodrigo et al. 2014, Näsman et al. 2009], pričom výrazne závisí od študovanej populácie, časového obdobia štúdie a úspešnosti

implementácie programov na zníženie fajčenia v konkrétnej krajine - vo všeobecnosti platí, že je vyšší podiel HPV⁺ OP-SCC v krajinách s klesajúcim počtom fajčiarov. Aj v populáciách, kde je stále výrazný podiel fajčiarov je však zaznamenaný signifikantný nárast HPV⁺ OP-SCC. Napríklad, v holandskej štúdií stúpla prevalencia HPV⁺ OP-SCC z 5,1% v roku 1990 na 29% v roku 2010 [Rietbergen et al. 2013]. Podobne, v nemeckej štúdií bol zaznamenaný signifikantný nárast HPV⁺ OP-SCC z 27% (obdobie 2004-2006) na 59% (obdobie 2012-2013) [Tinhofer et al. 2015]. Metaanalýzou štúdií týkajúcich sa európskych krajín (roky 2002-2012) bola zistená celková prevalencia HPV v karcinómoch hlavy a krku na úrovni 40%, pričom najvyššia prevalencia bola zistená v karcinómoch tonzily a bázy jazyka (66,4% a 47,2%) [Abogunrin et al. 2014]. V nedávnej a doposiaľ najväčšej medzinárodnej štúdií zahŕňajúcej celkom 29 krajín z Európy, Severnej Ameriky, Centrálnnej a Južnej Ameriky, Afriky a Ázie bola zistená HPV pozitivita v 271 z 1090 (24,9%) OP-SCC, pričom zastúpenie HPV⁺ OP-SCC bolo najvyššie v Južnej Amerike (48,4–53,6%), Strednej a Východnej Európe (44,9–50%) a Severnej Európe (25–50%) a najnižšie v Južnej Európe (7,6–9,4%) [Castelsagué et al. 2016].

Podľa americkej štúdie Chaturvediho a spol., vzrástla prevalencia HPV v OP-SCC z 16,3% v období 1984-1989 na 71,7% v období 2000-2004 a incidencia HPV-asociovaných orofaryngeálnych karcinómov v populácii narástla v období medzi rokmi 1984 až 2004 o takmer 225% (z 0,8 na 2,6 /100,000 obyvateľov), pričom incidencia HPV-negatívnych orofaryngeálnych karcinómov v rovnakom období klesla približne o 50%. Autori predpokladajú, že ak tento trend bude pokračovať, tak v roku 2020 by počet každoročne diagnostikovaných HPV⁺ OP-SCC mohol predstihnúť počet karcinómov krčka maternice [Chaturvedi et al. 2011]. Iba v samotných Spojených Štátoch je aktuálne ročne diagnostikovaných približne 10,000 nových prípadov HPV-asociovaných orofaryngeálnych karcinómov a odhaduje sa, že toto číslo narastie v roku 2030 na približne 16,000, pričom tento trend pravdepodobne nebude zvrátený profylaktickou vakcináciou skôr ako v roku 2060 [Gillison et al. 2015]. Stúpajúca incidencia HPV-asociovaného skvamocelulárneho karcinómu orofaryngu je zaznamenaná najmä u pacientov mladších ako 45 rokov. V tejto vekovej skupine došlo k priemernému 3% ročnému nárastu v období medzi rokmi 1973 až 2004, pričom incidencia v ostatných lokalitách hlavy a krku v rovnakom období v rovnakej vekovej skupine zostala nezmenená alebo klesla [Sturgis et al., 2007].

Podľa švédskej štúdie stúpla incidencia karcinómu tonzily 2,8-krát v období medzi rokmi 1970-2002. V rovnakom období stúpla incidencia HPV-asociovaného karcinómu tonzily 2,9-krát. Distribúcia HPV pozitívnych prípadov bola 23,3% v 70. rokoch, 29% v 80. rokoch 57% v 90. rokoch a 68% v období medzi rokmi 2000–2002 [Hammarstedt et al. 2006]. V nasledujúcom období

medzi rokmi 2003 až 2007 podiel HPV-pozitívnych karcinómov tonzily ďalej stúpala a predstavovala 68% v období 2000-2002 a až 93% v období 2006-2007 [Näsman et al. 2009].

Z vyššie prezentovaných údajov je možné skonštatovať, že predovšetkým v rozvinutých krajinách sa zvyšuje incidencia orofaryngeálneho karcinómu, a to predovšetkým u mužov a v mladších vekových skupinách. Na niektorých miestach (napr. USA, Austrália, severná a západná Európa) nadobúda tento trend až charakter epidémie, za ktorú je zodpovedná predovšetkým zvyšujúca sa incidencia HPV⁺ OP-SCC [Chaturvedi et al. 2013, Gillison et al. 2015].

2.2. Epidemiológia HPV-asociovaného skvamocelulárneho karcinómu orofaryngu v Českej a Slovenskej republike

Podľa údajov ÚZIS ČR spracovaných webovým portálom www.svod.cz [Dušek et al. 2005] bola v roku 2014 vekovo štandardizovaná incidencia (age standardized rate -world) malígnych nádorov tonzily 2,06 na 100,000 obyvateľov a nádorov orofaryngu 0,5 na 100,000 obyvateľov. U karcinómov tonzily bola hrubá incidencia 3,47 na 100,000 obyvateľov a mortalita 1,42 na 100,000 obyvateľov. U karcinómov orofaryngu bola hrubá incidencia 0,84 na 100,000 obyvateľov a mortalita 0,54 na 100,000 obyvateľov.

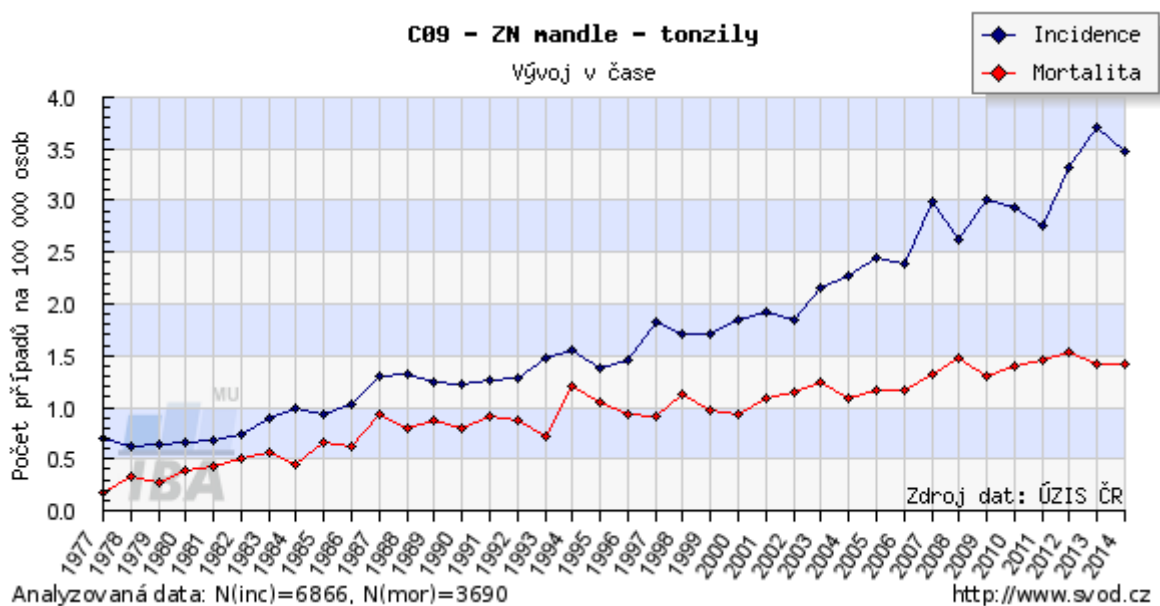
Časový vývoj hrubej incidence a mortality a pomeru mortality k incidencii zhubných nádorov tonzily a orofaryngu v Českej republike ukazujú Grafy 7 až 10. Z grafov je zjavné, že hrubá incidencia malígnych nádorov tonzily stúpala v rozmedzí rokov 1977-2014 takmer 5-krát a incidencia nádorov orofaryngu mimo tonzily takmer 3-krát. Mortalita je napriek stúpajúcej incidencii relatívne stabilná, resp. mierne klesá.

Hrubá incidencia malígnych nádorov tonzily (C09) vypočítaná z údajov Národného onkologického registra Slovenskej republiky pre rok 2009 [Dida et al. 2015] bola 2,77 na 100,000 obyvateľov a mortalita 0,98 na 100,000 obyvateľov. Incidencia nádorov tonzily v roku 2003 bola pritom iba 1,87 na 100,000 obyvateľov. Hrubá incidencia nádorov orofaryngu (C10) v roku 2009 bola 2,28 na 100,000 obyvateľov a mortalita 1,61 na 100,000 obyvateľov. Incidencia v roku 2003 bola iba 1,41 na 100,000 obyvateľov. V období 2003-2009 teda na Slovensku vzrástla incidencia malígnych nádorov tonzily a orofaryngu približne 1,5-krát.

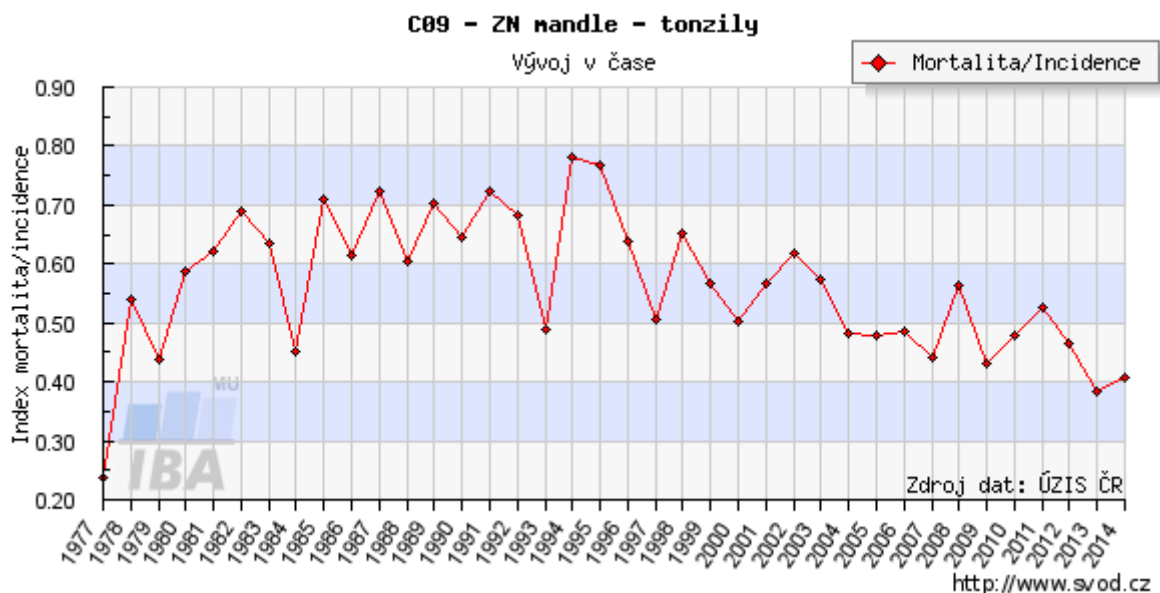
V českej a slovenskej populácii sú za hlavné rizikové faktory OP-SCC tradične považované fajčenie a konzumácia alkoholu. Údaje o prevalencii HPV v OP-SCC v českej populácii sú zatiaľ limitované malým počtom vyšetrených pacientov. Publikované dáta však naznačujú, že v českej populácii zohráva

infekcia HPV významnú úlohu v patogenéze OP-SCC. Klozar a spol. dokázali prítomnosť HPV v 50 zo 71 (70%) OP-SCC, pričom najvyšší výskyt HPV bol dokázaný v karcinómoch tonzily (41/51 prípadov; 80%) a karcinómoch bázy jazyka (5/10 prípadov; 50%) [Klozar et al. 2008]. V ďalšej štúdii rovnakej skupiny autorov bolo HPV-pozitívnych 91 zo 139 (64,5%) orofaryngeálnych karcinómov [Klozar et. al 2013]. V ďalšej českej štúdii Laco a spol. dokázali prítomnosť HPV pomocou DNA in situ hybridizácie v 21 z 22 OP-SCC [Laco a spol. 2011]. Podobná štúdia týkajúca sa slovenských pacientov nebola doteraz publikovaná.

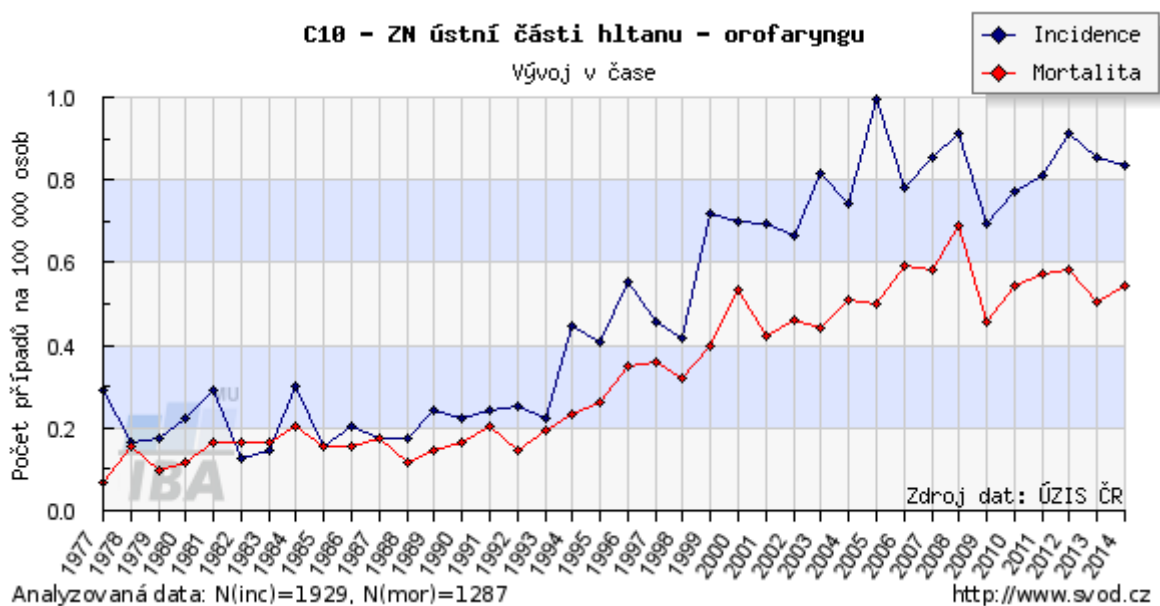
Graf č.7 - Časový vývoj hrubej incidence (počet nových prípadov na 100,000 obyvateľov) a mortality na malígne nádory tonzily v Českej republike



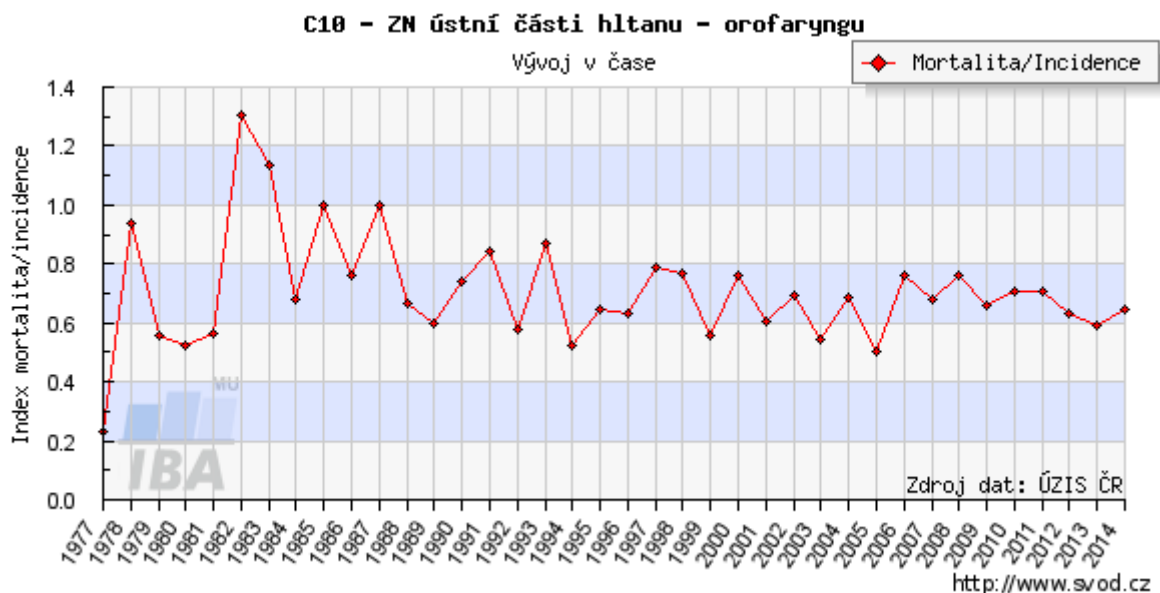
Graf č.8 - Časový vývoj poměru mortality a hrubé incidence nádorů tonzily v České republice



Graf č.9 - Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100,000 obyvatelů) a mortality na maligne nádory orofaryngu okrem tonzily v České republice



Graf č.10 - Časový vývoj pomeru mortality a hrubej incidencie nádorov orofaryngu okrem tonzily v Českej republike



2.3. Rizikové faktory HPV-asociovaného karcinómu orofaryngu

Za najsilnejší rizikový faktor pre vznik HPV⁺ OP-SCC je považovaná orálna HPV infekcia, ktorá je vo väčšine prípadov ($\geq 90\%$) sexuálne získaná [D'Souza et al. 2009, Gillison et al. 2012a]. Aj keď sú dôkazy limitované a inkonzistentné, sexuálne správanie, konkrétne celoživotný počet sexuálnych partnerov a počet orálnych sexuálnych partnerov, sú považované za hlavné rizikové faktory HPV⁺ OP-SCC [Heck et al. 2010]. Ďalšou rizikovou skupinou by mohli byť muži, ktorých partnerky mali karcinóm krčka maternice [Chancellor et al. 2016]. Úlohu sexuálneho prenosu nepriamo podporuje dôkaz konkordancie HPV-typov u partnerov pri porovnaní vzoriek z krčka maternice a v ústnej dutine [Mbulawa et al. 2014, Vogt et al. 2013]. HPV-asociovaný OP-SCC sa častejšie vyskytuje u mladších pacientov s minimálnou, alebo žiadnou expozíciou tabaku a/alebo alkoholu, signifikantne častejšie je však užívanie marihuany [Gillison et al. 2008]. V porovnaní s HPV-negatívnymi OP-SCC majú pacienti s HPV⁺ OP-SCC často lepší celkový zdravotný stav, lepšiu výživu a stav chrupu a vyšší socioekonomický status. Napriek tomu, že je vo všeobecnosti výskyt karcinómov hlavy a krku vyšší v afroamerickej populácii, HPV⁺ OP-SCC sa signifikantne častejšie vyskytuje v bielej americkej populácii (HPV pozitivita v 34% OP-SCC u bielych pacientov a iba 4% u afroameričanov), čo vysvetľuje lepšie výsledky liečby OP-SCC u bielych Američanov [Settle et al. 2009].

Vzťah medzi infekciou HPV a ďalšími významnými rizikovými faktormi – fajčením a alkoholom – je stále predmetom diskusie. Súčasné dôkazy o spolupôsobení fajčenia a konzumácie alkoholu ako kofaktorov v karcinogéze HPV⁺ OP-SCC sú nejednoznačné. Na jednej strane stoja práce, ktoré podporujú pozitívnu asociáciu (teda spolupôsobenie týchto rizikových faktorov) [Schwartz et al. 1998, Herrero et al. 2003, Smith et al. 2004, Ribeiro et al. 2011, Anantharaman et al. 2016], na druhej strane však existujú štúdie, ktoré asociáciu nedokázali [D'Souza et al. 2007, Applebaum et al. 2007]. Podobne nejednoznačné sú dôkazy o spolupôsobení HPV a alkoholu, keďže existujú štúdie podporujúce asociáciu [Schwartz et al. 1998, Herrero et al. 2003, Smith et al. 2004] ako aj štúdie, ktoré asociáciu nedokazujú [Applebaum et al. 2007].

Chýbanie jednoznačnej asociácie medzi HPV a fajčením resp. užívaním alkoholu možno teoreticky vysvetliť tým, že tieto rizikové faktory odlišným mechanizmom vplývajú na rovnaké cieľové molekuly v cestách zahrnutých v patogéze OP-SCC (napr. p53 a pRb) [Chaturvedi 2012].

Prevalencia orálnej onkogénnej HPV infekcie má dva vrcholy – medzi 25.-30. rokom života a 55.-60. rokom života a medián výskytu HPV⁺ OP-SCC je 58 rokov [Chaturvedi et al. 2011]. Odhadovaná latentná perióda pre vznik HPV⁺ OP-SCC je teda 10-30 rokov [Gillison et al. 2015].

2.4. Klinické charakteristiky HPV-asociovaného karcinómu orofaryngu

HPV-negatívne OP-SCC sú charakterizované vyšším vekom výskytu (typicky 7. dekáda života), predominciou u mužov (3:1), silnou asociáciou s fajčením a konzumáciou alkoholu a stredne výraznou asociáciou s ďalšími rizikovými faktormi ako napr. nízka úroveň orálnej hygieny, alebo nízky príjem zeleniny a ovocia [Chaturvedi 2012]. Naproti tomu, HPV-asociované orofaryngeálne karcinómy sú charakterizované nižším vekom výskytu (typicky < 60 rokov), asociáciou so sexuálnym správaním, inkonzistentnou alebo slabou asociáciou s fajčením, resp. často negatívnou fajčiarskou anamnézou, a čo je najdôležitejšie, signifikantne lepšou prognózou v porovnaní s HPV-negatívnymi OP-SCC a to napriek častým metastázam v lymfatických uzlinách a vyššiemu N štádiu [Licitra et al. 2006, Ragin et al. 2007, Hafkamp et al. 2008, Fakhri et al. 2008, Ukpo et al. 2009, Chernock et al. 2009, Ang et al. 2010, Dayyani et al. 2010, Chaturvedi 2012].

V prvej prospektívnej štúdií 96 pacientov so stage III alebo IV karcinómami orofaryngu alebo laryngu mali pacienti s HPV-pozitívnymi nádormi (HPV-asociovaných bolo celkovo 40% nádorov a všetky boli lokalizované v orofaryngu) vyššiu odpoveď na indukčnú chemoterapiu (82% vs. 55%), vyššiu odpoveď na pokračujúcu chemoradioterapiu (84% vs. 57%), signifikantne lepšie 2-ročné celkové prežívanie (95% vs. 62%) a nižšie riziko

progresie ochorenia a riziko úmrtia z akejkoľvek príčiny ako pacienti s HPV-negatívnymi OP-SCC [Fakhri et al. 2008].

Podobne, mnohé ďalšie (prevažne retrospektívne) štúdie dokázali, že HPV-pozitívne orofaryngeálne karcinómy majú signifikantne lepšie celkové prežívanie, signifikantne nižší výskyt lokoregionálnych a distálnych relapsov, lepšiu odpoveď na radioterapiu, lepšiu odpoveď na kombinovanú chemoradioterapiu ako aj lepšiu odpoveď na rôzne modifikácie štandardnej chemo/radioterapie [Lindel et al. 2001, Ragin et al. 2007, Sedaghat et al. 2009, Rischkin et al. 2010, Dayyani et al. 2010, Lorch et al. 2011, Granata et al. 2012, Laco et al. 2012, Huang et al. 2012, Worsham et al. 2013, Bledsoe et al. 2013, Melkane et al. 2014, Mizumachi et al. 2014, Nguyen-Tan et al. 2014, Iyer et al. 2015, Rosenthal et al. 2016].

P16/HPV status je signifikantným nezávislým prediktorom celkového prežívania aj u pacientov s progredujúcim ochorením [Vermorken et al. 2014, Fakhri et al. 2014]. V štúdií Fakhriho a spol. bolo dvojročné prežívanie po progresii ochorenia 54,6% u pacientov s p16 (HPV)-pozitívnymi nádormi a iba 27,6% u pacientov s p16 (HPV)-negatívnymi tumormi [Fakhri et al. 2014].

Z vyššie uvedeného vyplýva, že HPV-asociovaný skvamocelulárny karcinóm orofaryngu je v súčasnosti nutné považovať za samostatnú klinickú jednotku, ktorá sa od HPV-negatívneho OP-SCC odlišuje etiopatogenézou, prirodzeným priebehom ochorenia, prognózou ako aj odpoveďou na chemoterapiu a radioterapiu. U HPV-negatívnych karcinómov by sa ďalší výskum mal zamerať na nové cielenejšie typy terapie, keďže intenzifikácia súčasnej štandardnej terapie prežívanie nezlepšuje. Na druhej strane, v súčasnosti používaná kuratívna chemo/radioterapia so sebou nesie riziko výraznej morbidita (mukozitída, xerostómia, dysfágia, dentálne problémy, hypotyreóza, fibróza). Vzhľadom na skutočnosť, že pacienti s HPV⁺ OP-SCC majú lepšiu prognózu, sú mladší a prežívajú dlhšie predstavujú chronické komplikácie liečby významný problém. Preto v súčasnosti prebiehajú štúdie, ktoré hľadajú možnosti deintenzifikovanej onkologickej terapie, s cieľom znížiť výskyt komplikácií liečby bez zníženia terapeutickú efektivity a bezpečnosti pacienta [Bhatia et al. 2015]. Aktuálne prebiehajúce štúdie deintenzifikovanej liečby HPV⁺ OP-SCC skúmajú vplyv skrátenia a zníženia dávky radioterapie, vynechania, zníženia alebo zámény radiosenzibilizačnej chemoterapie (cisplatina vs. cetuximab, v rôznych kombináciách radioterapiou) a použitie minimálne invazívnej robotickej chirurgie s použitím alebo vynechaním adjuvantnej chemo/radioterapie [Bhatia et al. 2015, Kelly et al. 2016]. Správny výber pacientov na deintenzifikovanú terapiu a stratifikácia rizika sa tak stáva kľúčovou otázkou v manažmente HPV⁺ OP-SCC.

Viaceré štúdie potvrdili, že fajčenie významne ovplyvňuje prognózu a terapeutickú odpoveď HPV⁺ OP-SCC [Ang et al. 2010, Maxwell et al. 2010a, Gillison et al. 2012b, Ward et al. 2014]. Maxwell a spol. skúmali vplyv fajčenia na rekurencie a kompletnú odpoveď na chemoradioterapiu u pacientov s HPV⁺ OP-SCC. Pacienti boli klasifikovaní ako aktuálne fajčiaci, bývalí fajčiari a nikdy nefajčiaci (≤ 1 pack-year). Aktuálne fajčiaci pacienti mali signifikantne vyššie riziko rekurencie (HR, 5,2). Až 35% fajčiarov (bývalých a aktuálnych) malo rekurenciu ochorenia, na rozdiel od 6% pacientov, ktorí nikdy nefajčili [Maxwell et al. 2010a]. Podobne, Gillison a spol. zistili, že riziko progresie alebo smrti stúpa u p16⁺ OP-SCC o jedno percento na jeden „pack-year“ [Gillison et al. 2012b].

Ďalšími nezávislými rizikovým faktorom zhoršujúcimi prežívanie môžu byť okrem fajčenia aj vyššie T-štádium ochorenia [Mackenzie et al. 2014, Nguyen-Tan et al.] alebo vysoký vek pacientov [Lin et al. 2013, Ljøkjel et al. 2014].

Ang a spol. v retrospektívnej štúdií zhodnotili vplyv HPV a ďalších faktorov (fajčenie, stage, nodálny stage) na prognózu pacientov s orofaryngeálnymi karcinómami, ktorí boli randomizované liečení v dvoch ramenách s akcelerovanou frakcionovanou radioterapiou alebo štandardnou frakcionovanou radioterapiou, v oboch prípadoch kombinovanou s chemoterapiou cisplatinou. Trojročné prežívanie bolo veľmi podobné v oboch ramenách štúdie (70,3% vs. 64,3%), rovnako ako výskyt vážnej včasnej a neskorej toxicity. 206 z 323 (63,8%) orofaryngeálnych karcinómov bolo HPV-pozitívnych a títo pacienti mali signifikantne lepšie trojročné prežívanie ako HPV-negatívni pacienti (82,4 vs. 57,1%). Pacienti s HPV-pozitívnymi nádormi mali o 58% redukované riziko smrti a o 51% redukované riziko relapsu alebo smrti. HPV status bol najsilnejším faktorom celkového prežitia, a bol nasledovaný fajčiarskou anamnézou (≤ 10 vs. ≥ 10 „pack-years“) a nodálnym štádiom pre HPV-pozitívne nádory (N0-N2a vs. N2b-N3) resp. T-štádiom pre HPV-negatívne nádory (T2-T3 vs. T4). Na základe týchto faktorov bolo možné pacientov klasifikovať do troch rizikových skupín: pacienti s HPV-pozitívnymi nádormi patrili do skupiny s najnižším rizikom, fajčiari s HPV-pozitívnymi nádormi a vysokým N štádiom patrili do strednej skupiny a pacienti s HPV-negatívnymi nádormi (s výnimkou nefajčiarov s nízkym T štádiom, ktorí mali stredné riziko) patrili do skupiny s vysokým rizikom. Trojročné prežívanie v týchto skupinách bolo 93%, 71% a 43% [Ang et al. 2010]. V ďalšej retrospektívnej štúdií OP-SCC liečených samotnou radioterapiou alebo kombinovanou chemoradioterapiou boli pacienti s HPV⁺ OP-SCC stratifikovaní do skupiny s nízkym rizikom (T1-T3, N0-N2c) alebo do skupiny s vysokým rizikom (N3 alebo N4), s rizikom distálnych metastáz po troch rokoch 7% a 24%. Kontrola distálnych metastáz bola v skupine HPV-pozitívnych nádorov

s nízkym rizikom (N0-N2a alebo < 10 „pack-years“ s N2b) podobná pri porovnaní samotnej radioterapie s chemoradioterapiou, ale bola nižšia v skupine vysoko rizikových pacientov (N2c) liečených samotnou radioterapiou. Títo pacienti teda pravdepodobne nie sú vhodní na deescaláciu terapie [O'Sullivan et al 2013].

Aj keď v súčasnosti nie je úplne jasné podľa akých kritérií vyberať pacientov s HPV⁺ OP-SCC na deintenzifikovanú liečbu, z doterajších poznatkov je jasné, že ťažkí fajčiari a pacienti s pokročilým ochorením nie sú aktuálne kandidátmi na menej intenzívnu liečbu.

Okrem OP-SCC možno HPV detekovať aj v časti non-orofaryngeálnych SCC. Udávaný výskyt je však značne variabilný a je závislý od anatomickej lokalizácie, etnicity študovanej populácie a predovšetkým od metodiky použitej na detekciu HPV [Isayeva et al. 2012]. Prognostický význam prítomnosti HPV v non-orofaryngeálnych SCC je však prinajmenšom sporný [Ragin et al. 2007].

2.5. HPV v non-orofaryngeálnych karcinómoch hlavy a krku

Aj keď sa HPV⁺ SCC vyskytujú aj v iných podoblastiach hlavy a krku mimo orofaryngu, skutočná incidencia non-orofaryngeálnych HPV-asociovaných SCC bola v starších prácach pravdepodobne nadhodnotená [Westra 2015]. Podľa nedávno publikovaného prehľadu literatúry bola reportovaná prevalencia detekcie HPV v karcinómoch ústnej dutiny 20 %, v karcinómoch laryngu 24 %, v karcinómoch sinonazálneho traktu 30 %, v nazofaryngeálnych karcinómoch 31 % a v kontrolách od zdravých jedincov 7%, pričom jednotlivé publikácie udávali hodnoty v rozmedzí 0 - 100 % [Isayeva et al. 2012]. Za nadhodnotenie úlohy HPV v non-orofaryngeálnych SCC je pravdepodobne zodpovedných viacero faktorov. Napríklad, HPV-asociovaný nazofaryngeálny karcinóm v niektorých prípadoch predstavuje iba šírenie HPV-pozitívneho karcinómu z orofaryngu [Singhi et al. 2012]. Na druhej strane, počet HPV-asociovaných non-orofaryngeálnych SCC nadhodnocuje použitie vysoko citlivých PCR metód, ktoré nie sú schopné odlíšiť biologicky relevantnú HPV infekciu od inaktívnej infekcie alebo iba kontaminácie vzorky. Pri použití špecifickejších metód, ktoré detekujú iba transkripčne aktívnu infekciu HPV (napr. kombinácia imunohistochemie p16 a PCR, použitie HPV in situ hybridizácie) a po vylúčení nádorov, ktoré infiltrujú viaceré anatomicke oblasti revíziou radiologických nálezov je skutočné zastúpenie HPV⁺ SCC v oblasti ústnej dutiny, hypofaryngu a laryngu na úrovni 0% až 5,9% [Kraft et al. 2012, Singhi et al. 2012, Lewis et al. 2012a, Bishop et al. 2012], v oblasti sinonazálneho traktu 20-25% [Alos et al. 2009, Singhi et al. 2012, Chernock et al. 2013, Lingen et al. 2013, Bishop et al. 2013, Larque et al. 2014, Laco et al.

2015, Thavaraj et al. 2016] a v oblasti nazofaryngu 5-30% [Robinson et al. 2013, Lin et al. 2014, Dogan et al. 2014, Stenmark et al. 2014].

Zdá sa teda, že na rozdiel od orofaryngeálnych karcinómov, prítomnosť transkripčne aktívnej HPV infekcie v non-orofaryngeálnych SCC hlavy a krku je podstatne nižšia ako sa doposiaľ predpokladalo. Navyše, podľa aktuálnych poznatkov, prítomnosť HPV v non-orofaryngeálnych karcinómoch nie je asociovaná s lepšou prognózou, aj keď sú údaje značne limitované a na potvrdenie alebo vylúčenie prognostického významu budú potrebné ďalšie štúdie [Ragin et al. 2007, Isayeva et al. 2012, Salazar et al. 2014].

Rutínne testovanie non-orofaryngeálnych SCC hlavy a krku na prítomnosť HPV v súčasnosti nie je doporučované, pretože žiadnym spôsobom neovplyvňuje spôsob terapie a ani nemá jednoznačnú prognostickú informáciu.

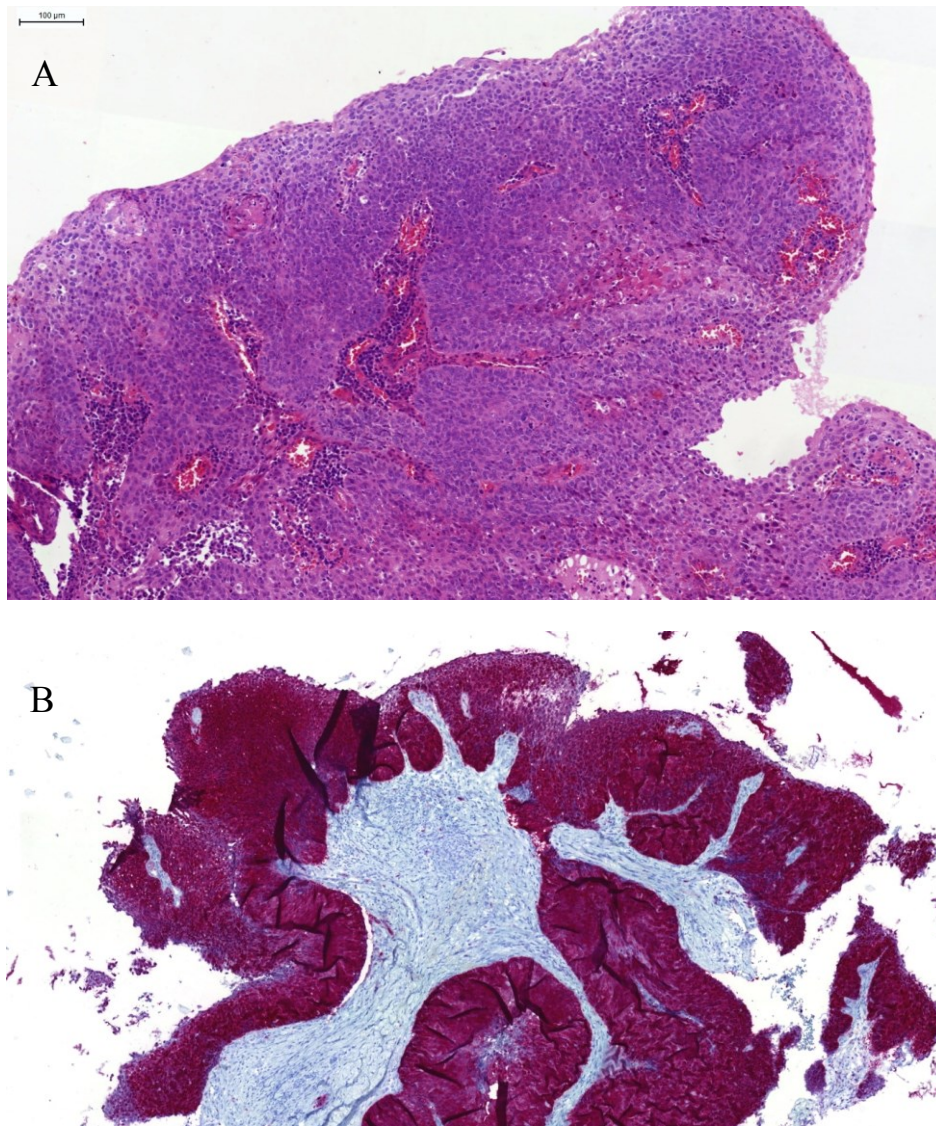
Výnimkou by mohli byť byť HPV-pozitívne karcinómy sinonazálneho traktu. Podľa niektorých štúdií by mohla byť prítomnosť transkripčne aktívnej infekcie HPV v sinonazálnych karcinómoch asociovaná s lepšou prognózou. V štúdií Alosiovej a spol. bola prítomnosť transkripčne aktívnej HPV infekcie (p16+, HPV DNA+) dokázaná v 12 zo 60 (20%) sinonazálnych karcinómov. Pacienti s HPV-asociovanými karcinómami mali signifikantne lepšie 5-ročné prežívanie bez progresie ochorenia (62% vs. 20%) ako aj celkové prežívanie (80% vs. 31%) [Alos et al. 2009]. V ďalšej štúdií bolo HPV pozitívnych 14 zo 70 (20%) sinonazálnych SCC (p16+, HPV DNA+, HPV in situ hybridizácia+). Priemerné prežívanie bez progresie ochorenia ($65,8 \pm 9,8$ mesiacov vs. $30,47 \pm 4,9$ mesiacov) ako aj celkové prežívanie ($156,8 \pm 47,2$ mesiacov vs. $72 \pm 12,3$ mesiacov) bolo signifikantne lepšie v skupine HPV-pozitívnych sinonazálnych SCC ako v skupine HPV-negatívnych SCC [Larque et al. 2014]. V českej štúdií Laca a spol. bola transkripčne aktívna infekcia HPV (p16+, HPV DNA+, HPV mRNA+, HPV in situ hybridizácia+) dokázaná v 18 zo 73 (25%) sinonazálnych karcinómov. Medián prežívania pacientov s HPV-asociovanými karcinómami bolo 30 mesiacov a medián prežívania pacientov s HPV-negatívnymi karcinómami 14 mesiacov. Aj keď tento rozdiel nebol štatisticky významný, bol zaznamenaný trend k lepšiemu prežívaniu u pacientov s HPV-pozitívnymi nádormi [Laco et al. 2015]. Presný význam prítomnosti HPV v sinonazálnych karcinómoch je však stále nejasný, keďže sú závery limitované nízkym počtom pacientov, veľkou heterogenitou histologických podtypov zaradených do týchto štúdií a rozličnými metódami použitými na liečbu pacientov.

2.6. Morfológia HPV-asociovaného skvamocelulárneho karcinómu orofaryngu

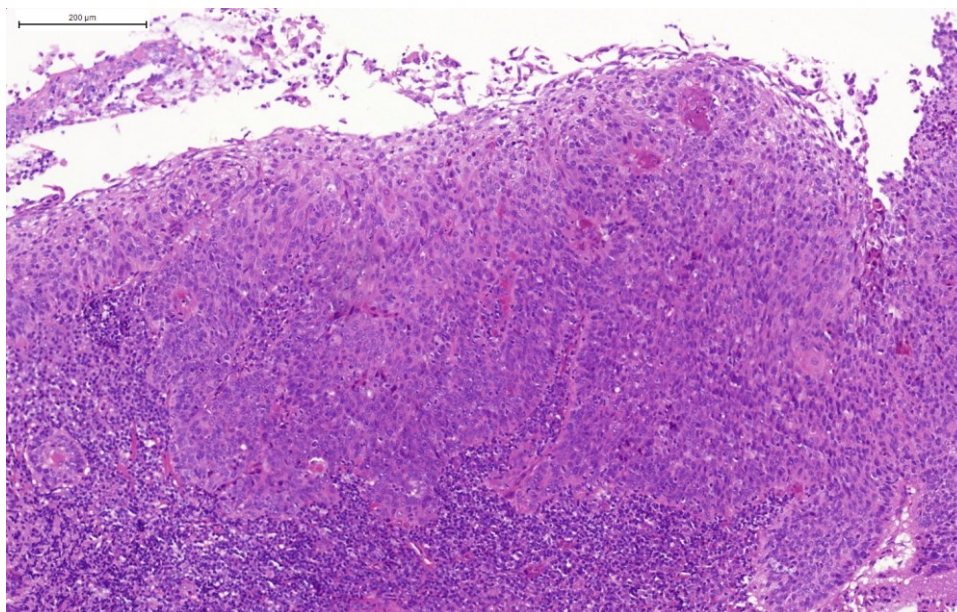
2.6.1. Morfológia typického HPV-asociovaného orofaryngeálneho skvamocelulárneho karcinómu

V drvivej väčšine prípadov HPV⁺ OP-SCC morfologicky rekapituluje morfológiu epitelu tonzilárnych krýpt, teda miesta, kde tieto karcinómy najčastejšie vznikajú. HPV⁺ OP-SCC má typicky „bazaloidný“ vzhľad nekeratinizujúceho SCC (NKSCC), charakterizovaný bunkami oválneho až vretenitého tvaru s vysokým nukleocytoplazmatickým pomerom, syncyziálnym spôsobom rastu, bez identifikovateľných intercelulárnych mostíkov (Obr. 1).

Častá je centrálna nekróza, niekedy až cystická degenerácia. Cytoplazmatická alebo extracelulárna keratinizácia chýba alebo ju možno zastihnúť iba v malom rozsahu (<10% buniek). V prípade, že je prítomná keratinizácia na >10% plochy tumoru, možno takýto tumor klasifikovať ako nekeratinizujúci SCC s maturáciou, alebo ako hybridný SCC [El-Mofty et al. 2006]. Kolonizácia povrchového epitelu tonzily je sekundárny fenomén. Prechod medzi karcinómom a normálnym epitelom je abruptný, bez prechodov alebo jednoznačnej prekursorovej intraepitelovej *in situ* lézie. Karcinóm často invaduje v podobe hniezd s „pushing“ okrajmi, s nejasnou hranicou medzi epitelom a strómou, ktorá je často prekrytá lymfocytmi. Dezmozplastická reakcia na inváziu je často minimálna, alebo úplne chýba. Preto je takmer nemožné spoľahlivo posúdiť moment, kedy je už karcinóm invazívny. Tonzilárny epitel navyše nemá kontinuálnu bazálnu membránu, ktorú by malígne bunky museli prerušiť a je dobre známe, že aj veľmi malé a klinicky okultné karcinómy, veľké často iba niekoľko milimetrov, ktoré sa histologicky javia ako „*in situ*“, môžu mať uzlinové metastázy. Pre vyššie uvedené skutočnosti sa v praxi nedoporučuje pokúšať sa odlíšiť invazívny karcinóm od *in situ* lézií, ale vždy ich diagnostikovať ako karcinóm [Lewis et al. 2014a, Westra 2015] (Obr. 2).



Obrázok 1 - Nekeratinizujúci HPV-asociovaný orofaryngeálny karcinóm, tvorený ovoidnými bunkami s vysokým nukleocytoplazmatickým pomerom, syncytiálnym spôsobom rastu, bez intercelulárnych mostíkov (**A**). Imunohistochemicky typická difúzna silná pozitivita exprese proteínu p16 (**B**).



Obrázok 2 - Nekeratinizujúci HPV-asociovaný orofaryngeálny karcinóm. Charakteristický „pushing“ spôsob invazívneho rastu so zápalovou lymfocytárnou reakciou v stróme. Je takmer nemožné spoľahlivo posúdiť kde je karcinóm „in situ“ a kde už invazívny.

2.6.2. Grading, histomorfologické prediktívne charakteristiky a staging HPV-asociovaného orofaryngeálneho skvamocelulárneho karcinómu

Grade nádoru je semikvantitatívne vyjadrenie stupňa diferenciácie, t.j. ako sa tumor podobá na normálne tkanivo, z ktorého vzniká. Podľa klasických kritérií používaných na grading keratinizujúcich skvamocelulárnych karcinómov (podľa Brodersa), je väčšina HPV-asociovaných orofaryngeálnych karcinómov klasifikovaná ako nízko diferencovaný, resp. nediferencovaný SCC, keďže sa vôbec nepodobajú na povrchový keratinizujúci skvamózny epitel. Pretože však väčšina HPV-asociovaných OP-SCC vzniká v morfoloicky odlišnom epiteli tonzilárnych krýpt, ktorého morfológiu HPV⁺ OP-SCC väčšinou rekapituluje, nekeratinizujúci HPV⁺ OP-SCC môže byť považovaný za dobre diferencovaný tumor [Westra 2015]. Informácia o „nízkom stupni diferenciácie“ podľa tradičného gradingu je navyše v rozpore s klinickým správaním väčšiny týchto nádorov. Preto viacerí autori nedoporučujú vykonávať formálny grading nekeratinizujúceho HPV⁺ OP-SCC, ale ani ďalších podtypov HPV⁺ OP-SCC, keďže prítomnosť HPV s malými výnimkami signifikantne zlepšuje prognózu aj inak klinicky agresívnych histologických podtypov SCC (viď nižšie) [Lewis et al. 2014a, Westra 2015].

Ako bolo spomínané vyššie, v súčasnosti prebieha množstvo štúdií, ktoré pacientom s HPV⁺ OP-SCC ponúkajú deintezifikovanú terapiu s cieľom

znižit' výskyt postterapeutických komplikácií. Nie všetci pacienti s HPV⁺ OP-SCC však majú dobrú prognózu a preto je dôležité identifikovať pacientov s vysokým rizikom, u ktorých by deintenzifikovaná liečba bola nedostatočná. Na úrovni histomorfológie spoľahlivé biomarkery agresivity HPV⁺ OP-SCC v súčasnosti nie sú známe. Podľa jednej štúdie prítomnosť anaplázie (≥ 3 jadrá nádorových buniek s priemerom ≥ 5 jadier lymfocytov, t.j. $\sim 25 \mu\text{m}$, v ktoromkoľvek zornom poli x40) alebo mnohojadrových nádorových buniek (≥ 3 nádorové bunky s viacerými jadrami v ktoromkoľvek zornom poli x40) bola asociovaná s horším prežívaním, nezávisle od ostatných faktorov, vrátane prítomnosti HPV [Lewis et al. 2012b]. Podobne zatiaľ iba v experimentálnej rovine zostáva pokus o identifikáciu klinicky agresívnej podskupiny HPV⁺ OP-SCC pomocou kvantitatívnej morfometrie digitálnych obrazov [Lewis et al. 2014b]. Podľa ďalšej práce by mohol mať prognostický význam stupeň zápalovej infiltrácie v nádore, resp. nádorovej stróme (tumor-infiltrujúce lymfocyty). HPV-asociované karcinómy s vysokým stupňom zápalovej infiltrácie (prominentná infiltrácia lymfocytmi $> 80\%$ nádoru/strómy) mali trojročné prežívanie 96% a nádory s nízkym stupňom infiltrácie (infiltrácia lymfocytmi $< 20\%$ nádoru/strómy) mali prežívanie iba 59% a nelíšilo sa výrazne od prežívania pacientov s HPV-negatívnymi nádormi. Jedným z faktorov zodpovedných za lepšiu prognózu HPV⁺ OP-SCC by teda mohla byť úroveň protinádorovej imunitnej reakcie [Ward et al. 2014]. Alternatívou pre stratifikáciu rizika a výber vhodnej terapie by mohla v budúcnosti byť molekulárna subklasifikácia OP-SCC [Nakano et al. 2016].

Aktuálne platný AJCC/TNM systém (7. vydanie) pre orofaryngeálny karcinóm bol odvodený z výsledkov liečby OP-SCC asociovaného s fajčením a bez asociácie s HPV. Existujú čoraz presvedčivejšie dôkazy, že tento stagingový systém je nevhodný na spoľahlivé predpovedanie prognózy HPV⁺ OP-SCC [Ward et al. 2015, Huang et al. 2015]. V novom AJCC/TNM staging systéme (8. vydanie, s účinnosťou od 1.1.2018) je už HPV⁺ OP-SCC („HPV-mediated (p16+) oropharyngeal cancer“) klasifikovaný oddelenie od p16-negatívneho OP-SCC (líšia s cN a pN kategóriami) [O'Sullivan et al. 2017]. V budúcnosti budú pravdepodobne v TNM klasifikácii HPV⁺ OP-SCC používané aj neanatomické rizikové faktory (vek a fajčenie), ktorých zohľadnenie omnoho spoľahlivejšie predpovedá prognózu [Huang et al. 2015].

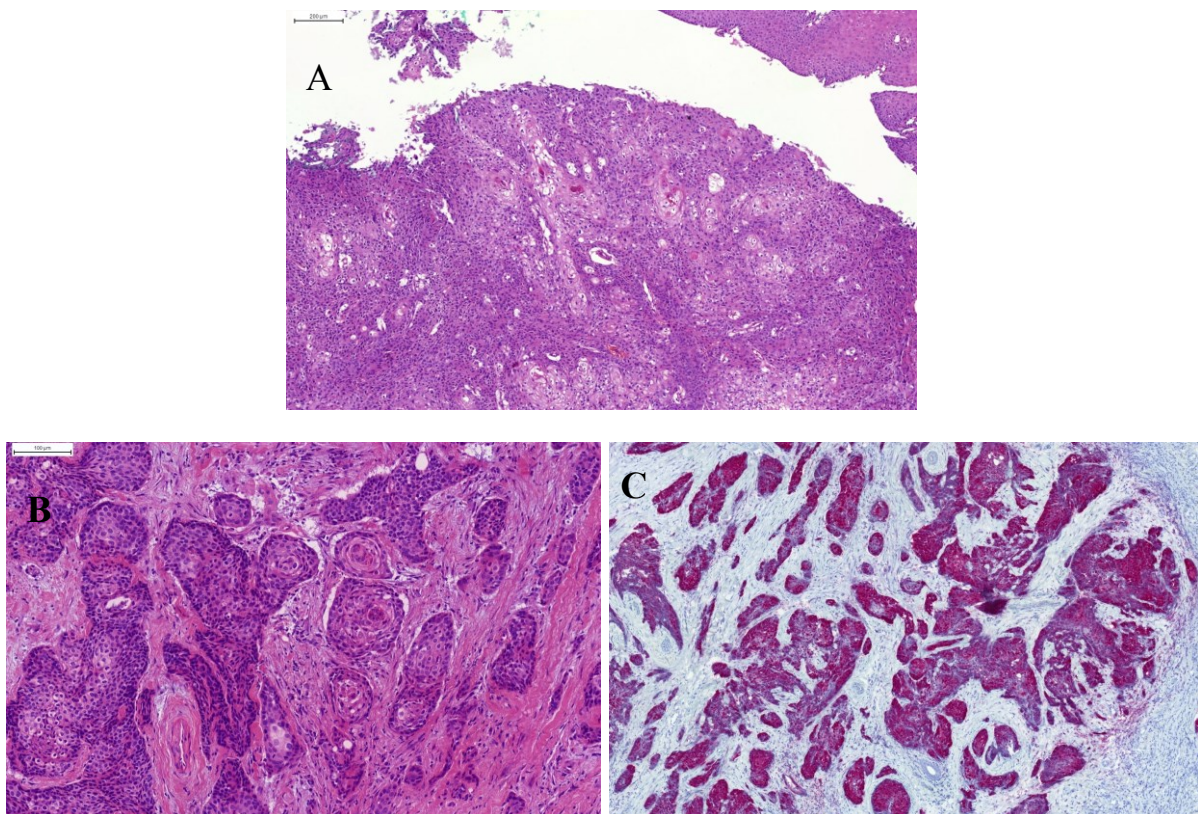
2.6.3. Histomorfologické varianty HPV-asociovaného orofaryngeálneho skvamocelulárneho karcinómu

Menej často má HPV⁺ OP-SCC inú morfológiu ako NKSCC/hybridný SCC. Varianty HPV⁺ OP-SCC zahŕňajú keratinizujúci, papilárny, bazaloidný,

adenoskvamózny, lymfoepiteliálny, vretenobunkový (sarkomatoidný) a malobunkový karcinóm [El-Mofty 2015].

2.6.3.1. Keratinizujúci skvamocelulárny karcinóm

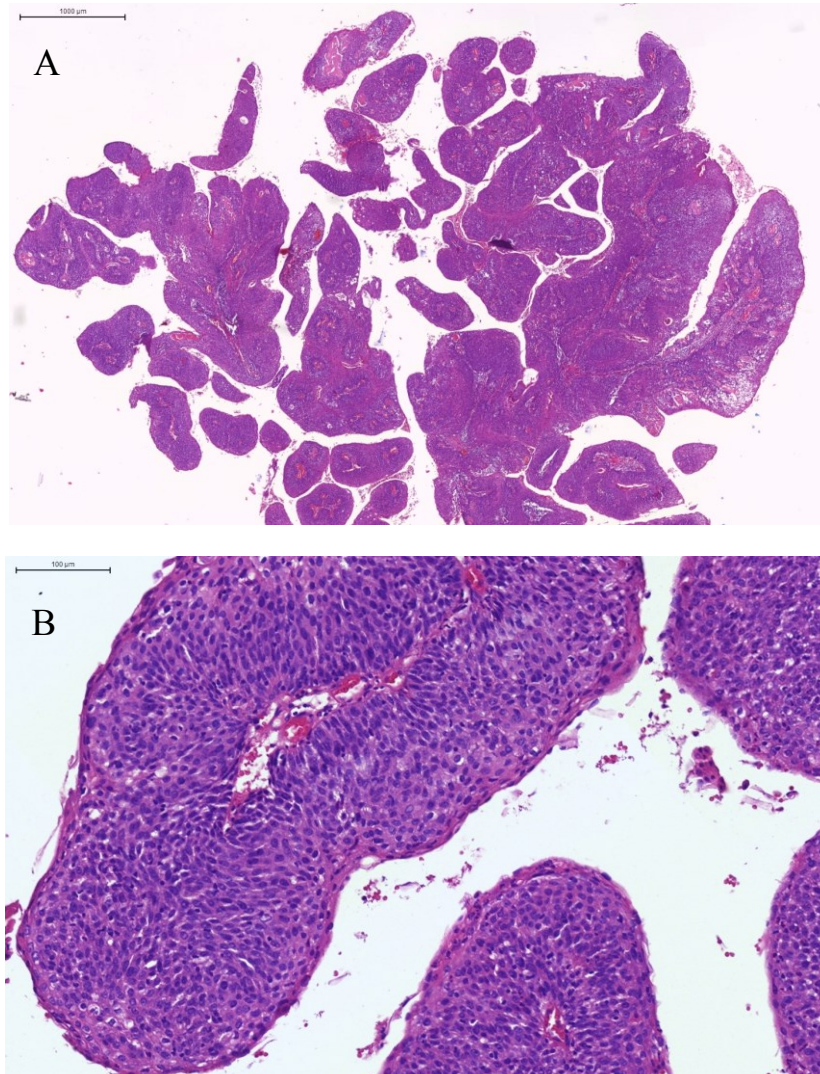
Keratinizujúci SCC je kompletne tvorený vyzrievajúcimi skvamóznymi bunkami bez prítomnosti nekeratinizujúcich oblastí (Obr. 3). Aj keď drvivá väčšina keratinizujúcich SCC orofaryngu nie je asociovaná s HPV, v malej časti prípadov možno dokázať prítomnosť transkripčne aktívnej HPV infekcie. V doposiaľ najväčšej štúdiu keratinizujúcich SCC orofaryngu, sedem z 54 prípadov difúzne exprimovalo proteín p16. HPV E6/E7 RNA bola dokázaná v piatich zo šiestich vyšetrených p16-pozitívnych prípadov, ale iba v jedinom p16-negatívnom prípade. Aj keď išlo iba o malý súbor pacientov, expresia p16 v keratinizujúcich SCC bola asociovaná so signifikantne lepšou prognózou [Cai et al. 2014].



Obrázok 3 - Dobře diferencovaný keratinizujúci HPV-asociovaný karcinóm. Je kompletne tvorený vyzrievajúcimi skvamóznymi bunkami bez prítomnosti nekeratinizujúcich oblastí (A). Na rozdiel od nekeratinizujúceho SCC, v keratinizujúcich karcinómoch je častá dezmozplastická reakcia strómy (B). Imunohistochemicky typická difúzna silná expresia proteínu p16 (C).

2.6.3.2. Papilárny skvamocelulárny karcinóm

Papilárny SCC je charakterizovaný exofytickým papilárnym spôsobom rastu a excelentnou prognózou, najmä ak nie je prítomná invazívna komponenta SCC (Obr. 4).



Obrázok 4 - Papilárny SCC s exofytickým papilárnym spôsobom rastu (A), typicky tvorený nekeratinizujúcimi bunkami (B).

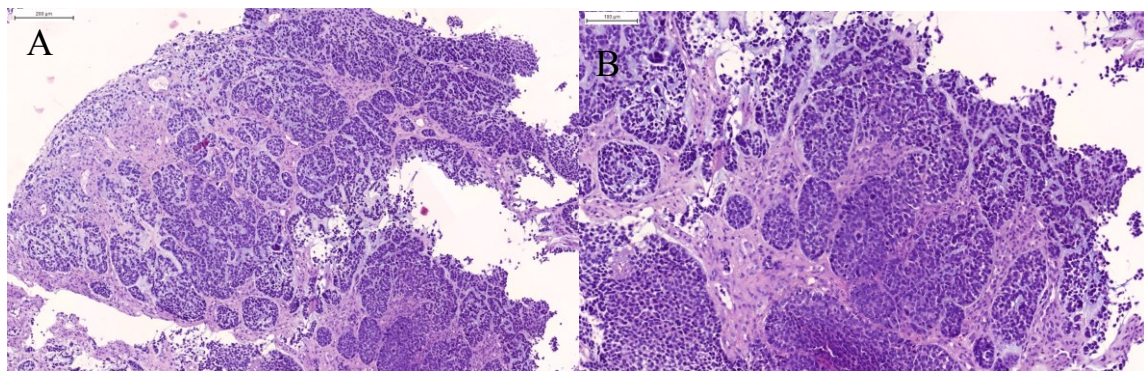
Väčšina HPV-pozitívnych papilárnych SCC je lokalizovaná v orofaryngu, laryngu alebo sinonazálnom trakte, raritne v ústnej dutine alebo hypofaryngu. Nádorové bunky majú v typickom prípade imatúrne „bazaloidný“ vzhľad nekeratinizujúceho SCC, vzácnne vykazujú rôznu stupeň keratinizácie [Jo et al. 2009, Yang et al. 2013, Mehrad et al. 2013]. Vo všeobecnosti je papilárny SCC oblasti hlavy a krku asociovaný s dobrou prognózou a nie je isté, či

prítomnosť HPV signifikantne mení prognózu, aj keď jedna štúdia dokázala trend k lepšiemu prežívaniu v HPV⁺ prípadoch [Mehrad et al. 2013].

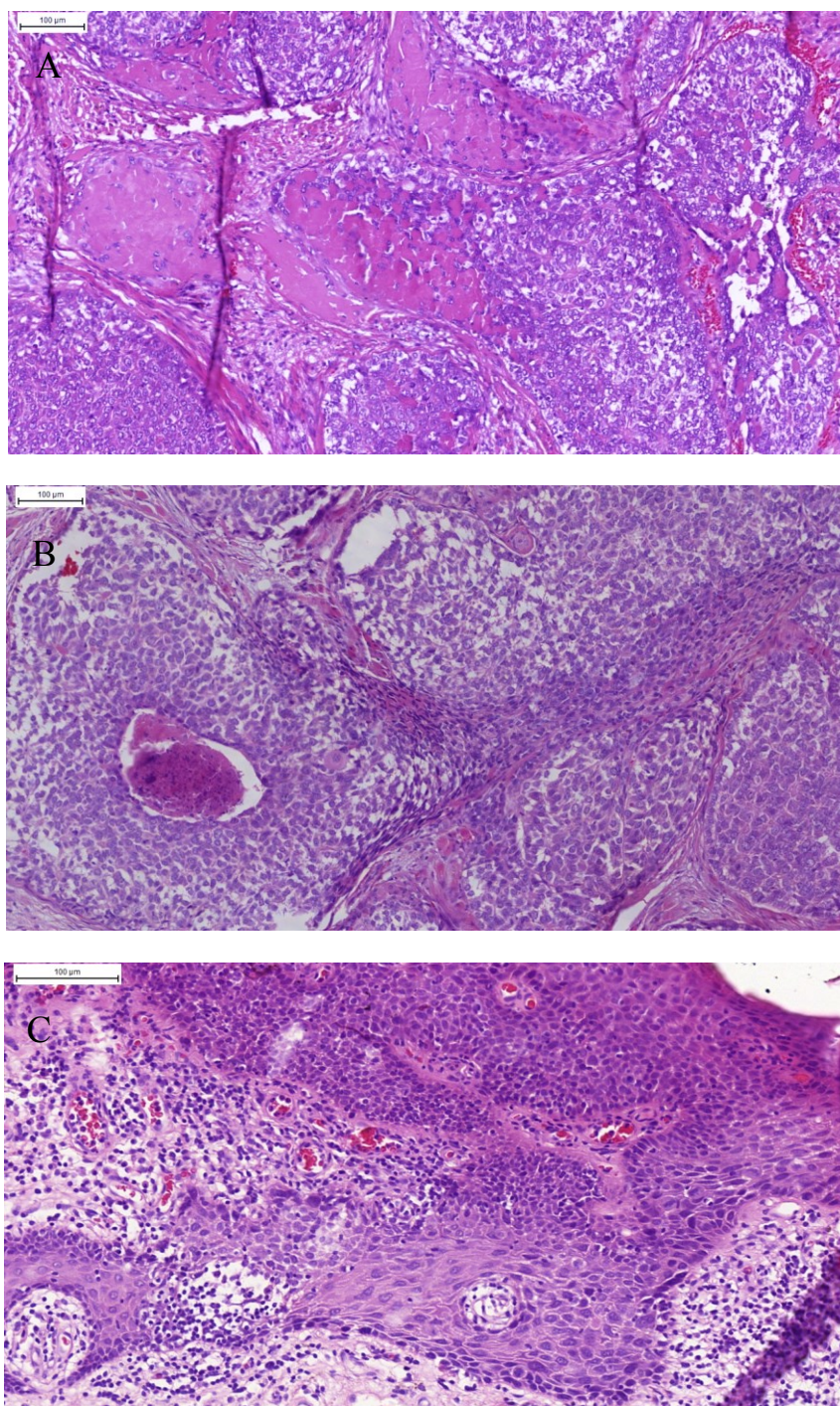
2.6.3.3. Bazaloidný skvamocelulárny karcinóm

Nekeratinizujúci orofaryngeálny SCC je často zamieňaný za bazaloidný skvamocelulárny karcinóm. Aj keď sa bazaloidný SCC čiastočne podobá na nekeratinizujúci SCC, predstavuje samostatnú klinicky agresívnu high grade variantu SCC oblasti hlavy a krku. Najčastejšie sa bazaloidný SCC vyskytuje v laryngu a hypofaryngu, v orofaryngu je vzácny. Bazaloidný SCC je charakterizovaný solídnym alebo lobulárnym („jigsaw puzzle“) spôsobom rastu, niekedy s periférnym palisádovaním buniek. Môžu byť prítomné abruptné ložiská keratinizácie a v povrchovom epiteli je možné nájsť ťažkú dyspláziu. Pomerne častý je výskyt komedo-nekróz a malých cystických priestorov s materiálom pozitívnym vo farbení PAS alebo Alcianovou modrou. Typická je prítomnosť stromálnej hyalinizácie alebo myxoidného bazofilného materiálu, pripomínajúceho mucín. Nádorové bunky nie sú na rozdiel od typického HPV-asociovaného nekeratinizujúceho SCC pretiahnutého až vretenitého tvaru, ale sú prevažne okrúhle a majú hyperchrómne jadrá (Obr. 5 a Obr. 6) [Westra 2015, Lewis et al. 2014a].

Väčšina (~ 75%) orofaryngeálnych bazaloidných SCC orofaryngu je HPV-pozitívnych a v porovnaní s HPV negatívnymi bazaloidnými SCC ako aj bazaloidnými SCC iných oblastí, ktoré sú iba vzácné HPV-pozitívne, majú signifikantne lepšiu prognózu [Begum et al. 2008, Chernock et al. 2010].



Obrázok 5 - Bazaloidný SCC, charakterizovaný lobulárnym („jigsaw puzzle“) spôsobom rastu, so stromálnou hyalinizáciou a myxoidným bazofilným materiálom pripomínajúcim mucín.



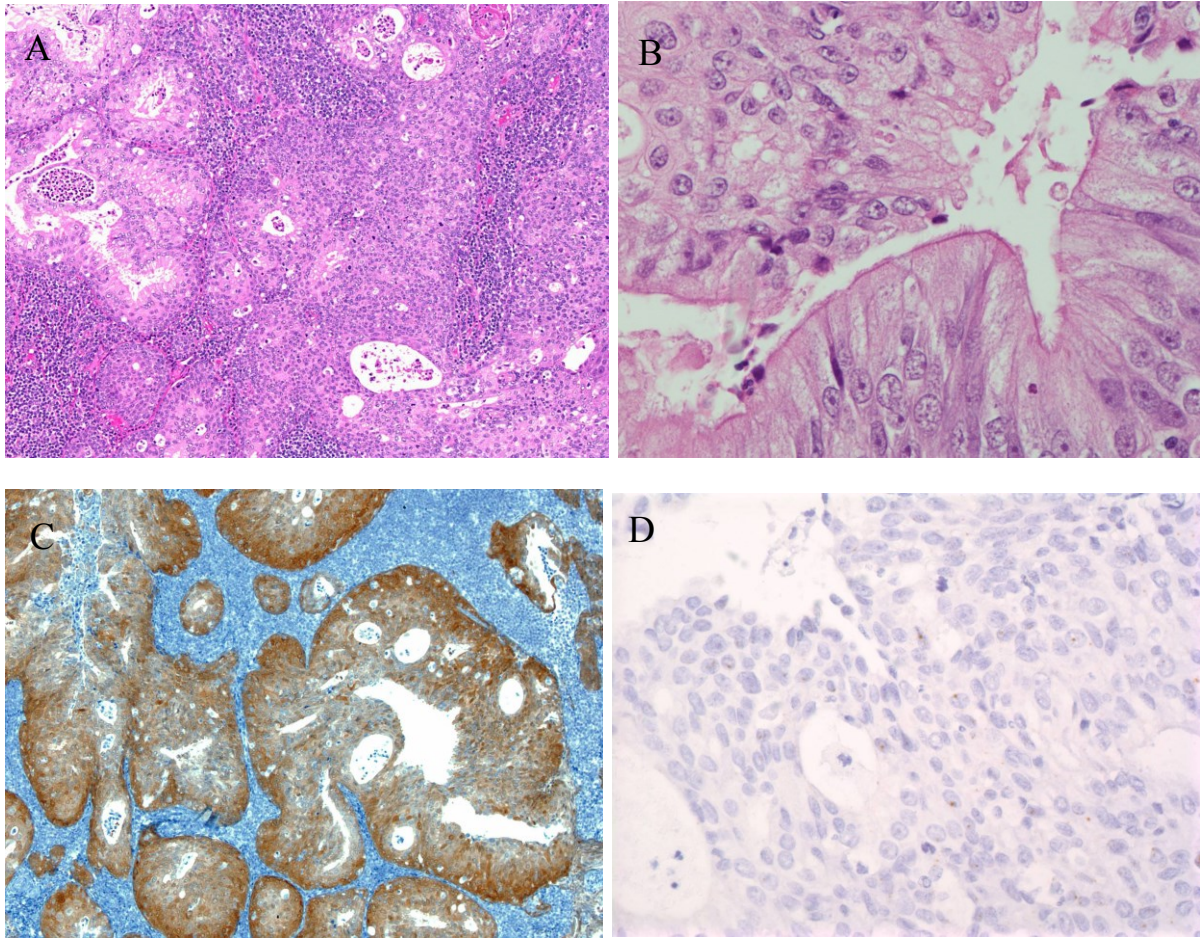
Obrázok 6 - Bazaloidný SCC. Nádorové bunky sú na rozdiel od nekeratinizujúceho SCC prevažne okrúhle. Typická je stromálna hyalinizácia a komedo-nekrózy (A, B). Na rozdiel od HPV-asociovaného nekeratinizujúceho SCC možno v povrchovom epiteli nájsť high-grade dyspláziu (C).

2.6.3.4. Adenoskvamózny karcinóm

Adenoskvamózny karcinóm je vzácny a vo všeobecnosti agresívny podtyp SCC, charakterizovaný bifázickou proliferáciou keratinizujúceho SCC a adenokarcinómu, pričom jednotlivé zložky sú morfológicky oddelené, nie premiešané, bez prítomnosti intermediárnych buniek (na rozdiel od mukoepidermoidného karcinómu). Je častejší v laryngu a ústnej dutine ako v orofaryngu [Cardesa et al. 2005, Masand et al. 2011]. Komponenta SCC je v podobe *in situ* karcinómu alebo invazívneho SCC, zložka adenokarcinómu býva prítomná v hlbších častiach tumoru a je charakterizovaná tubulárnou/duktálnou diferenciáciou, typicky s intra- alebo extracelulárnou produkciou mucínu [Cardesa et al. 2005]. V jednej z najväčších publikovaných sérií, Masad a spol. vyšetrili prítomnosť HPV v 18 prípadoch adenoskvamóznych karcinómov oblasti hlavy a krku (16 karcinómov laryngu a hypofaryngu, 4 ústnej dutiny, 3 orofaryngu a 3 sinonazálne karcinómy). Prítomnosť replikačne aktívnej HPV infekcie dokázali v dvoch orofaryngeálnych a jednom adenoskvamóznom karcinóme z nosovej dutiny. Obaja pacienti s orofaryngeálnym HPV-asociovaným karcinómom boli nažive a bez známk ochorenia 103 a 24 mesiacov od stanovenia diagnózy. Tieto dáta sú značne limitované nízkym počtom pacientov, naznačujú však lepšiu prognózu orofaryngeálnych HPV-asociovaných adenoskvamóznych karcinómov [Masand et al. 2011].

2.6.3.5. Adenoskvamózny karcinóm s riasinkami

Radkay-Gonzales a spol. nedávno popísali zvláštny podtyp HPV-asociovaného adenoskvamózneho karcinómu s riasinkovými bunkami [Radkay-Gonzales et al. 2015]. Išlo o sedem prípadov morfológicky unikátneho tumoru (4 orofaryngeálne, 3 s neznámym origom v oblasti hlavy a krku), ktoré sa líšili od klasického adenoskvamózneho karcinómu prítomnosťou zložky blandne vyzerajúceho prevažne nekeratinizujúceho SCC s mikrocystickým alebo kribriiformným usporiadaním, premiešaného s bunkami produkujúcimi mucín (pripomínajúc tak mukoepidermoidný karcinóm), alebo s prítomnosťou tubuloglandulárnych formácií s luminálnymi kolumnárnymi bunkami bez mucínprodukcie a abluminálnymi nekeratinizujúcimi skvamóznymi elementami. Vo všetkých prípadoch boli minoritne v žľazovej komponente prítomné bunky s riasinkami (Obr. 7).



Obrázok 7 - Adenoskvamózny karcinóm s riasinkami. Mikrocysticky usporiadaný tumor, tvorený nekeratinizujúcim skvamocelulárnym karcinómom s primiešaným bunkami ktoré produkujú mucín. Nádor tak pripomína mukoepidermoidný karcinóm (A). Kolumnárne bunky s riasinkami (B). Imunohistochemicky difúzna silná pozitívna expresie proteínu p16 (C). Dôkaz prítomnosti HPV pomocou in situ hybridyzácie (D). Obrázky láskavo poskytol Raja R. Seethala, Presbyterian University Hospital, Pittsburgh, USA.

Všetky prípady tohto pozoruhodného karcinómu mali multilokulárne alebo makrocystické metastázy v lymfatických uzlinách. Na základe malého počtu pacientov nemožno zo štúdie vyvodit' defínitívne závery týkajúce sa prognózy tohoto podtypu adenoskvamózneho karcinómu, z dostupných údajov sa ale zdá sa, že HPV-asociovaný adenoskvamózny karcinóm s riasinkami môže mať relatívne dobrú prognózu, keďže ochoreniu podľahol jediný pacient s metastázami v pľúcach.

2.6.3.6. Nediferencovaný (lymfoepiteliálny) karcinóm

Nediferencovaný (lymfoepiteliálny) karcinóm orofaryngu je vzácny tumor, morfológicky podobný nekeratinizujúcemu nediferencovanému nazofaryngeálnemu karcinómu. Je charakterizovaný bunkami s vezikulárnymi jadrami s nápadnými jadierkami a objemnou cytoplazmou s nejasnými kontúrami, syncyciálnym spôsobom rastu v pruhoch, menších solídnych hniezdach alebo po jednotlivých bunkách a zápalovým pozadím tvoreným lymfocytmi a plazmatickými bunkami [El-Mofty 2015, Perez-Ordoñez 2007]. Dôležitú úlohu v patogenéze nazofaryngeálneho karcinómu hrá Epstein-Barrovej vírus (EBV), najmä v endemických oblastiach a v nazofaryngeálnom karcinóme nekeratinizujúceho typu [Perez-Ordoñez 2007, Peterrson 2015, Tsao et al. 2015]. Na rozdiel od nazofaryngeálnych karcinómov sú lymfoepiteliálne karcinómy orofaryngu konzistentne EBV-negatívne a ~ 90% je asociovaných s infekciou HPV [Singhi et al. 2010b, Carpenter et al. 2011]. Napriek „nediferencovanému“ vzhľadu sa zdá, že HPV-asociované lymfoepiteliálne karcinómy orofaryngu majú dobrú prognózu, porovnateľnú s inými HPV⁺ OP-SCC.

2.6.3.7. Vretenobunkový (sarkomatoidný) skvamocelulárny karcinóm

Vretenobunkový (sarkomatoidný) skvamocelulárny karcinóm je vzácny variant SCC, charakterizovaný bifázickou proliferáciou konvenčného SCC a vretenobunkovej komponenty, ktorá na jednom konci spektra môže pripomínať reaktívnu fibroblastickú proliferáciu alebo, na opačnom konci spektra, môže imitovať naozajstný sarkóm [Westra 2015, El-Mofty 2015]. V prípade, že je zastúpená iba vretenobunková zložka (až 1/3 prípadov), ktorá navyše pomerne často stráca expresiu keratínov, môže byť odlišenie sarkomatoidného SCC od benígnych a malígnych mezenchymálnych lézií problematické [Bishop et al. 2014]. Bishop a spol. zistili prítomnosť HPV16 v troch z desiatich orofaryngeálnych sarkomatoidných SCC. Žiaden z 27 non-orofaryngeálnych sarkomatoidných SCC nebol HPV-pozitívny [Bishop et al. 2014]. Naopak, Watson a spol. nedokázali prítomnosť HPV ani v jednom z piatich orofaryngeálnych sarkomatoidných SCC a zistili prítomnosť HPV v jednom z dvanástich sarkomatoidných SCC dutiny ústnej a jednom prípade z hypofaryngu/laryngu [Watson et al. 2013]. Na základe malého počtu HPV-asociovaných sarkomatoidných SCC orofaryngu sa nemožno vyjadriť k prognóze tejto varianty. Vo všeobecnosti má však sarkomatoidný SCC oblasti hlavy a krku prognózu podobnú konvenčnému SCC. Keďže je však infekcia HPV viazaná na epitelové bunky, dôkaz prítomnosti HPV (je prítomný v konvenčnej ako aj vretenobunkovej zložke sarkomatoidného SCC) môže slúžiť

ako diagnostická pomôcka pri odlišovaní karcinómu od mezenchymálnych lézií orofaryngu [Bishop et al. 2014, Watson et al. 2013].

2.6.3.8. Malobunkový karcinóm

Malobunkový karcinóm orofaryngu je extrémne vzácny tumor, morfológicky identický s malobunkovými karcinómami iných lokalít (t.j. ide o nízko diferencovaný neuroendokrinný karcinóm). Bishop a Westra zistili prítomnosť HPV v piatich z deviatich prípadov, pričom v štyroch prípadoch mal karcinóm prítomnú zložku konvenčného HPV-asociovaného nekeratinizujúceho karcinómu [Bishop et al. 2011]. Kraft a spol. popísali osem prípadov malobunkového karcinómu orofaryngu, z ktorých bolo sedem HPV-pozitívnych; jeden prípad mal zachytenú zložku konvenčného skvamocelulárneho karcinómu a jeden prípad zložku stredne diferencovaného neuroendokrinného karcinómu [Kraft et al. 2012]. Klinicky sa jednalo o agresívne tumory, často so vzdialenými metastázami v čase prezentácie. HPV⁺ malobunkový karcinóm orofaryngu sa teda prognosticky nelíši od malobunkového karcinómu v typickejších lokalitách. Rozpoznanie malobunkovej zložky je preto dôležité, aj keď z hľadiska morfológie nie vždy jednoduché. Imunohistochemicky malobunková komponenta vždy vykazuje pozitivitu neuroendokrinných markerov (synaptofyzín, chromogranín) a stratu markerov skvamóznej diferenciácie (CK5/6, p63) [Westra 2015].

3. Metastázy z neznámeho origa v oblasti hlavy a krku, cystické metastázy a diagnostická aplikácia imunohistochemického vyšetrenia p16 a HPV testovania

Veľkú časť malignít oblasti hlavy a krku tvoria metastázy v lymfatických uzlinách z neznámeho origa. Predstavujú 3 - 9 % všetkých malignít tejto oblasti a vo väčšine prípadov sa histologicky jedná o SCC (53 - 90 %) [Layfield et al. 2007, Park et al. 2010, Strojjan et al. 2013, Arrangoiz et al. 2014]. Väčšina cervikálnych metastáz je solídnych, SCC Waldayerovho prstenca však často vytvárajú objemné cystické metastázy, ktoré klinicky, radiologicky a dokonca aj histomorfologicky môžu napodobovať branchiogénnu (lymfoepiteliálnu) cystu. Podľa dvoch veľkých štúdií boli cystické metastázy karcinómov z oblasti Waldayerovho prstenca identifikované v 20 % a 61,3 % prípadov [Regauer et al. 1999, Goldenberg et al. 2008]. Z opačného pohľadu, vo väčšine prípadov cystických metastáz SCC je identifikované origo v orofaryngu, najmä v podnebnnej mandli a na koreni jazyka [Regauer et al. 1999, Goldenberg et al. 2008, Granström et al. 1989, Flanagan et al. 1994, Gourin et al. 2000, Thompson et al. 1998, Verma et al. 1995]. Je známe, že HPV⁺ OP-SCC si

v metastázach zachováva prítomnosť transkripčne aktívnej infekcie HPV, ako aj overexpresiu proteínu p16 [Goldenberg et al. 2008, Mehrad et al. 2014, Morani et al. 2013, Yasui et al. 2014] a mnohé štúdie dokázali, že prítomnosť HPV v p16-pozitívnej solídnej alebo cystickej metastáze s vysokou pravdepodobnosťou predpovedá origo v orofaryngu [Yasui et al. 2014, Begum et al. 2003, El-Mofty et al. 2008, Weiss et al. 2011, Park et al. 2012].

Nie všetky cystické metastázy v oblasti hlavy a krku však majú origo v orofaryngu [Regauer et al. 1999, Thompson et al. 1998]. Vzácné môžu cystické metastázy vytvoriť karcinómy nazofaryngu, hypofaryngu, laryngu, ústnej dutiny, prínosových dutín alebo pažeráka [Gourin et al. 2000, Thompson et al. 1998, Verma et al. 1995, Zhang et al. 2014].

Ako náhradný marker high-risk HPV infekcie v cervikálnych ako aj orofaryngeálnych karcinómoch je často používaná imunohistochemická detekcia proteínu p16 [Bergeron et al. 2015, Venuti et al. 2012]. Aj keď má expresia p16 takmer 100% senzitivitu pre detekciu high-risk HPV v OP-SCC, špecificita je iba na úrovni ~ 80% (tj. cca 20% p16-pozitívnych OP-SCC je HPV negatívnych) [Grønhøj et al. 2014]. Napriek tomu, že konkordancia medzi expresiou p16 a prítomnosťou high-risk HPV nie je dokonalá, imunohistochemické vyšetrenie expresie p16 niektorí autori navrhujú ako samostatný a jediný test na detekciu high-risk HPV a klinickú stratifikáciu OP-SCC [Lewis et al. 2010, Lewis 2012c].

Senzitivita a špecificita samotného imunohistochemického vyšetrenia p16 v prípade metastáz z neznámeho origa však nie je známa. Pri diagnostike metastáz z neznámeho origa je nutné pamätať na skutočnosť, že overexpresia p16 bola popísaná okrem HPV-asociovaných orofaryngeálnych karcinómov aj v iných benígnych a malígnych léziách, ktoré môžu byť v diferenciálnej diagnóze. Cao a spol. popísali pozitivitu p16 v 43% (16/37) benígnych lymfoepiteliálnych cyst, ako aj v 5/12 cytologických vzoriek z týchto cyst. Žiadna z týchto lézií však nebola HPV-pozitívna [Cao et al. 2010]. Aj podľa našich skúseností je expresia proteínu p16 bežne prítomná v benígnych lymfoepiteliálnych cystách hlavy a krku. Expresiu p16 sme dokázali v 9 z 11 (81,8%) prípadov vyhládaných v plzenskom Registri nádorov hlavy a krku (2015, nepublikované údaje). Vo väčšine prípadov však bola expresia iba slabá a fokálna a nikdy nebolo pozitívnych viac ako 50% epitelových buniek. Expresia p16 je ďalej bežná v pľúcnych malobunkových karcinómoch [Yuan et al. 1999], ktoré však tiež nie sú HPV-pozitívne [Hartley et al. 2015] ako aj orofaryngeálnych malobunkových karcinómoch, ktoré sú ale takmer vždy HPV-pozitívne (viď vyššie) [Bishop et al. 2011, Kraft et al. 2012]. Difúzna a silná pozitivita p16 bez asociácie s HPV bola ďalej zistená v piatich prípadoch sinonazálneho nediferencovaného karcinómu [Wadsworth et al. 2011]. Signifikantná pozitivita p16 (> 50 % nádorových buniek) bola popísaná v 6/20

ezofageálnych SCC, 7/20 pľúcnych SCC a 8/20 SCC kože, pričom high-risk HPV bol detekovaný iba v jedinom ezofageálnom prípade [Doxtader et al. 2012]. V nedávnej práci bola dokázaná difúzna imunohistochemická expresia p16 (> 70 % nádorových buniek) v 31% uzlinových metastáz kožného skvamocelulárneho karcinómu v oblasti a krku, čo môže byť príčinou diagnostického omylu. Všetky tieto metastázy však boli HPV negatívne vyšetrením pomocou mRNA in situ hybridizácie [McDowell et al. 2016]. High-risk (a low-risk) HPV typy sa môžu podieľať na vzniku časti SCC kože, prítomnosť HPV však zrejme nie je, na rozdiel od karcinómov orofaryngu, v ďalších fázach nádorovej progresie nevyhnutná [Wang et al. 2014, Quint et al. 2015, Švajdler et al. 2016a, Švajdler et al. 2016b]. Podobne, časť uroteliálnych karcinómov a uroteliálnych karcinómov so skvamóznou diferenciáciou vykazuje p16-pozitivitu bez asociácie s high risk HPV [Alexander et al. 2012].

Pretože je špecificita p16-pozitivity vo vzťahu k diagnostike HPV-pozitívnych nádorov relatívne nízka, na podporenie klinicky najpravdepodobnejšieho orofaryngeálneho origa p16-pozitívnej metastázy SCC z neznámeho origa je vždy nutné vykonať špecifický dôkaz prítomnosti HPV. Ako bolo diskutované vyššie, HPV-pozitívne SCC sa vzácné vyskytujú aj v iných podoblastiach hlavy a krku, najpravdepodobnejšie origo p16/HPV-pozitívnej metastázy je však v klinicky okultnom karcinóme orofaryngu.

4. Metódy detekcie klinicky relevantnej HPV infekcie

HPV status v OP-SCC poskytuje dôležitú prognostickú informáciu a je pravdepodobné, že v blízkej budúcnosti bude rozhodovať aj o spôsobe rutínne používanej liečby, napr. o použití deintezifikovanej chemo/radioterapie. HPV testovanie OP-SCC je v súčasnosti nevyhnutnou podmienkou pre zaradenie pacientov do klinických štúdií. HPV-pozitivita v metastázach z neznámeho origa navyše umožňuje zacielenie diagnostických a chirurgických postupov na oblasť orofaryngu a vo vybraných prípadoch umožňuje obmedziť ožarovanie iba na túto oblasť aj v prípade, že sa primárne ložisko nenájde. Ide o vyšetrenie, ktoré je zahrnuté vo viacerých významných klinických a patologických odporúčaniach (napr. College of American pathologists, the Royal college of pathologists, NCCN guidelines). Napriek zjavnému významu a dôležitosti HPV testovania, neexistuje všeobecný konsenzus akú stratégiu a ktoré z viacerých dostupných metód na dôkaz HPV treba použiť [Kašpírková et al. 2013, Bishop et al. 2015]. Výber metodiky by mal vychádzať zo zistení, že klinicky dobrá prognóza HPV-asociovaného orofaryngeálneho (a prípadne sinonazálneho) SCC je limitovaná

iba na nádory s transkripčne aktívnou HPV infekciou [Kašpírková et al. 2013, Bishop et al. 2015]. Ideálny test by mal mať vysokú senzitivitu a špecificitu, primeranú cenu a mal by byť dostatočne jednoduchý na rutínne použitie.

V HPV-asociovaných karcinómoch vírusové onkoproteíny E6 a E7 high risk HPV typov funkčne inaktivujú proteín p53 a pRb (retinoblastoma protein), čo následne vedie k overexpresii tumor supresorového proteínu p16. Niektorí autori preto navrhujú použiť na detekciu high-risk HPV a klinickú stratifikáciu OP-SCC samotné imunohistochemické vyšetrenie expresie proteínu p16, ktoré je najlacnejšou a najdostupnejšou alternatívou [Lewis et al. 2010, Lewis 2012c]. Najlepšia korelácia expresie p16 a prítomnosti HPV v OP-SCC (neplatí to ale pre non-orofaryngeálne SCC) je v prípade ak sa za pozitívny výsledok považuje jadrová a cytoplazmatická expresia $\geq 70\%$ nádorových buniek. Samotná imunohistochemická expresia p16 však môže byť považovaná za zástupný „surrogate“ marker aktívnej HPV infekcie iba v prípade, ak má karcinóm charakteristickú morfológiu, t.j. ide o nekeratinizujúci alebo hybridný SCC (s maturáciou). V prípade, že sa jedná o p16-pozitívny karcinóm s variantnou morfológiou (viď vyššie) alebo v prípade imunohistochemickej negativity v nekeratinizujúcom orofaryngeálnom karcinóme, je nutné doplniť HPV špecifický test.

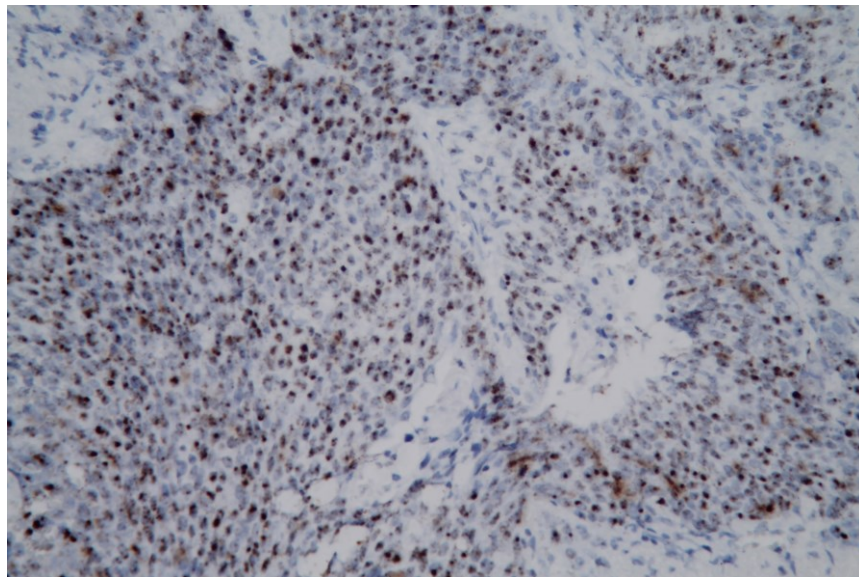
Za „zlatý štandard“ dôkazu biologicky aktívnej infekcie je považovaný dôkaz E6/E7 mRNA metódou reverznej transkripcie a polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR). Toto vyšetrenie je však technicky náročné a problémom môže byť kvalita mRNA v parafínovom materiáli; na dosiahnutie optimálnych výsledkov je nutné čerstvo zmrazené tkanivo [Kašpírková et al. 2013, Bishop et al. 2015].

PCR dôkaz HPV DNA fylogeneticky konzervatívnych génov L1/E1 (prípadne doplnené o vyšetrenie typovo špecifických génov E6/E7) je metódou s vysokou senzitivitou, ktorá je všeobecne a relatívne jednoducho použiteľná aj na parafínovom materiáli [Kašpírková et al. 2013]. Samotná detekcia HPV DNA je však pomerne nešpecifická, keďže neodlíši aktívnu infekciu od inaktívnej infekcie (tzv. „passenger“ HPV), prípadne kontamináciu vzorky. V kombinácii s imunohistochemickým vyšetrením expresie p16 je však HPV DNA najpoužívanejším spôsobom detekcie aktívnej HPV infekcie; iba p16-pozitívne/HPV PCR-pozitívne tumory môžu byť považované za HPV-asociované [Kašpírková et al. 2013].

Vysoko špecifický dôkaz relevantnej HPV infekcie, navyše s priamou vizualizáciou v nádorovom tkanive poskytuje DNA in situ hybridizácia (ISH). Problémom DNA ISH je však relatívne nízka senzitivita, ktorá je na úrovni iba $\sim 70\%$ [Kašpírková et al. 2013, Bishop et al. 2015]. Relatívne časté sú aj problémy s interpretáciou pre prítomnosť artefaktov; z vlastnej skúsenosti

vieme, že na dosiahnutie optimálnych výsledkov je nutná dokonalá fixácia a spracovanie tkaniva.

Nádejnou alternatívou k DNA ISH je vyšetrenie pomocou metódy RNA ISH (Obr. 8) [Lewis et al. 2012, Bishop et al. 2012a, Laco et al. 2015]. Senzitivita a špecificita vyšetrenia sa blížia „zlatému štandardu“. Nevýhodami sú zatiaľ malé skúsenosti s metodikou, relatívna technická náročnosť a vyššia cena.



Obr. 8 - Pozitívny výsledok RNA in situ hybridizácie (HPV RNAscope) v nekeratinizujúcom karcinóme tonzily.

5. Pôvod cystických metastáz v oblasti hlavy a krku

5.1. Ciele práce

Cieľom retrospektívnej štúdie bolo zistiť či môžu histopatologické charakteristiky, expresia proteínu p16, HPV status a EBV status predpovedať origo cystických uzlinových metastáz skvamocelulárneho karcinómu v oblasti hlavy a krku.

5.2. Materiál a metodika

5.2.1. Výber pacientov, histologické a imunohistochemické vyšetrenie

Pacienti s cystickými uzlinovými metastázami skvamocelulárneho karcinómu v oblasti hlavy a krku boli nájdení v databáze Registra nádorov slinných žliaz a hlavy a krku (Bioptická laboratoř s.r.o. Plzeň) a databázach patologických oddelení troch českých a slovenských nemocníc terciárneho typu (FN Plzeň, FN J.A. Reimana Prešov, Univerzitná nemocnica L. Pasteura Košice). Dokopy bolo identifikovaných 22 prípadov diagnostikovaných v rokoch 1995-2012. Na potvrdenie diagnózy boli zrevidované všetky dostupne hematoxylín-eozínové preparáty. Metastázy boli klasifikované do troch skupín: (i) nekeratinizujúci SCC, (ii) nekeratinizujúci SCC s maturáciou a (iii) keratinizujúci SCC. Ďalšie vzácne podtypy SCC (napr. bazaloidný, sarkomatoidný, adenoskvamózny atď.) sa v súbore nevyskytovali.

Prvým krokom v ďalšom vyšetrowaní bolo imunohistochemické vyšetrenie expresie proteínu p16 a detekcia prítomnosti HPV. V prípade p16/HPV negatívnych metastáz bolo doplnené vyšetrenie prítomnosti EBV.

Klinické informácie boli získané od ošetrojúcich lekárov a v prípade konzultačných vyšetrení od odosielaajúcich patológov.

Na imunohistochemické vyšetrenie bol z každého prípadu vybraný jeden reprezentatívny parafínový blok a bolo vykonané imunohistochemické vyšetrenie protilátkou p16 (CINtec® p16Histology, Ventana, Basel, Švajčiarsko), s použitím automatizovaného systému Ventana Benchmark (Ventana Medical System), podľa protokolu doporučovaného výrobcom protilátky. Vždy boli použité pozitívne a negatívne kontroly. Expresia p16 bola klasifikovaná ako pozitívna v prípade, že bola prítomná jadrová a cytoplazmatická pozitivita $\geq 70\%$ nádorových buniek, pretože táto hranica

pozitivity najlepšie koreluje s prítomnosťou transkripčne aktívnej HPV infekcie [Grønhøj et al. 2014].

5.2.2. PCR vyšetrenie

Na molekulovo-genetické vyšetrenie bola izolovaná DNA z tkaniva pomocou QIASymphony DNA Mini Kit-u (Qiagen, Hilden, Nemecko) s použitím protokolu doporučovaným výrobcom a použitím zariadenia QIASymphony SP. Kvalita izolovanej DNA bola overená pomocou PCR, ktorá amplifikuje súbor kontrolných génov [van Dongen et al. 2003]. Na detekciu HPV boli použité viaceré PCR primery cielené na L1, E1 a E6-E7 oblasti HPV genómu [Skálová et al. 2013]. V skratke, boli použité primery CPSGB a GP5+/GP6+ zacielené na oblasti E1 a L1 HPV genómu (detekcia širokého spektra high-risk a low-risk HPV typov) a na zvýšenie senzitivity (pri možnej integrácii HPV do hostiteľského genómu a strate L1/E1 génov) bola použitá typovo špecifická detekcia oblastí E6-E7 šiestich HPV typov s najvyššou prevalenciou (HPV16, 18, 31, 33, 35, 45). Ďalej bol použitý kit RHA kit HPV SPF10-LiPA25, version 1 (Biomedical Products, Rijswijk, Holandsko) na odhalenie možnej infekcie viacerými HPV typmi. Detekcia EBV bola vykonaná pomocou Real Time PCR zameranej na gén p143 [Watzinger et al. 2004].

5.2.3. In situ hybridizácia

Detekcia HPV bola vykonaná pomocou DNA in situ hybridizácie použitím koktejlu sond, ktorý detekuje HPV typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 66 (INFORM HPV III Family 16 Probe (B)) s použitím detekčného systému iViewBlue plus (Ventana, Roche, Basel, Švajčiarsko) a automatického farbiaceho systému Ventana Benchmark (Ventana Medical System).

Detekcia EBV RNA bola vykonaná pomocou sondy INFORM EBER s použitím detekčného systému iViewBlue plus (Ventana, Roche, Basel, Švajčiarsko) a automatického farbiaceho systému Ventana Benchmark (Ventana Medical System).

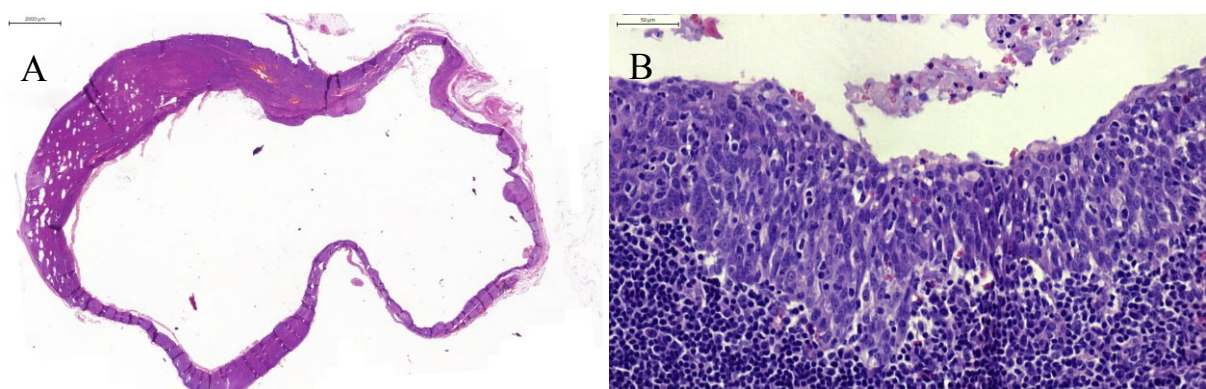
5.2.4. Výsledky

Súbor bol tvorený šiestimi ženami a 16 mužmi vo veku 39 až 74 rokov. Priemerný vek v čase diagnózy bol 58,4 rokov (medián 59,5 rokov). V 17 prípadoch boli cystické metastázy prítomné v hornej alebo strednej tretine krku, v dvoch prípadoch v submandibulárnej oblasti, v dvoch prípadoch

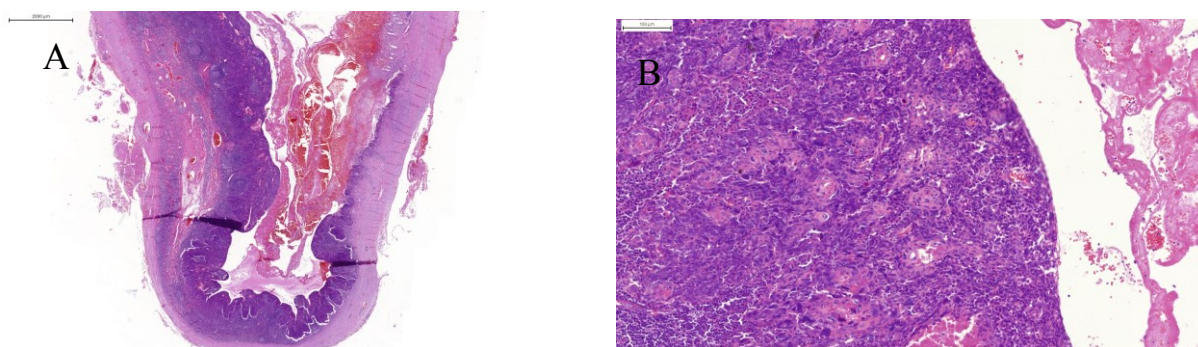
preaurikulárne a v jednom prípade v dolnej tretine krku v supraklavikulárnej oblasti. Origo bolo identifikované pomocou klinického vyšetrenia, panendoskopického vyšetrenia s probatórnymi biopsiami, diagnostickej tonzilektómie alebo pomocou radiologického vyšetrenia v 20 prípadoch (90,9%). V piatich prípadoch (22,7%) bol primárny tumor lokalizovaný na báze jazyka (jazyková mandľa), v deviatich prípadoch (40,9%) na podnebnnej mandli, v troch prípadoch v nazofaryngu (13,6%), v dvoch prípadoch v pľúcach (9%) a v jednom prípade na koži vonkajšieho zvukovodu (4,5%). V dvoch prípadoch sa primárnu lokalitu zistiť nepodarilo. V jednom z týchto prípadov išlo o nespolupracujúceho pacienta, ktorý nebol dostatočne vyšetrený a ktorý navyše odmietol akúkoľvek onkologickú liečbu. Napriek tomu bol tri roky po resekcii metastázy nažive a bez známk ochorenia. V druhom prípade bol pacient liečený kombinovanou chemoradioterapiou a bol nažive bez známk ochorenia 16 rokov od diagnózy.

Metastázy z origom vo Waldayerovom prstenci (orofarynx a nazofarynx) mali v drvivej väčšine (16 zo 17 prípadov, 94,1%) typickú morfológiu nekeratinizujúceho skvamocelulárneho karcinómu (Obr. 9). Jediná metastáza tonzilárneho karcinómu mala morfológiu keratinizujúceho SCC. Obaja pacienti s metastázou z neznámeho origa mali nádory s morfológiou nekeratinizujúceho SCC, resp. nekeratinizujúceho SCC s maturáciou (Obr. 10).

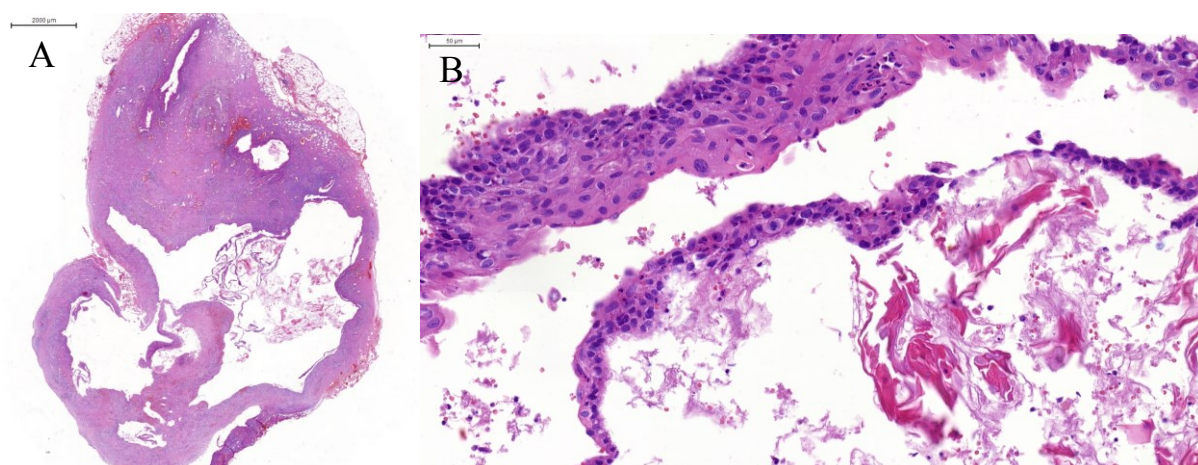
Metastáza karcinómu zvukovodu a jedna z metastáz karcinómu pľúc mala morfológiu keratinizujúceho SCC (Obr. 11). Druhá metastáza pľúcneho karcinómu mala morfológiu nízko diferencovaného SCC s ložiskovou keratinizáciou.



Obrázok 9 - Cystická metastáza nekeratinizujúceho skvamocelulárneho karcinómu (A). Epitel má typický „bazaloidný“ a reletívne blandný vzhľad, Charakteristická je infiltrácia lymfocytmi (B).



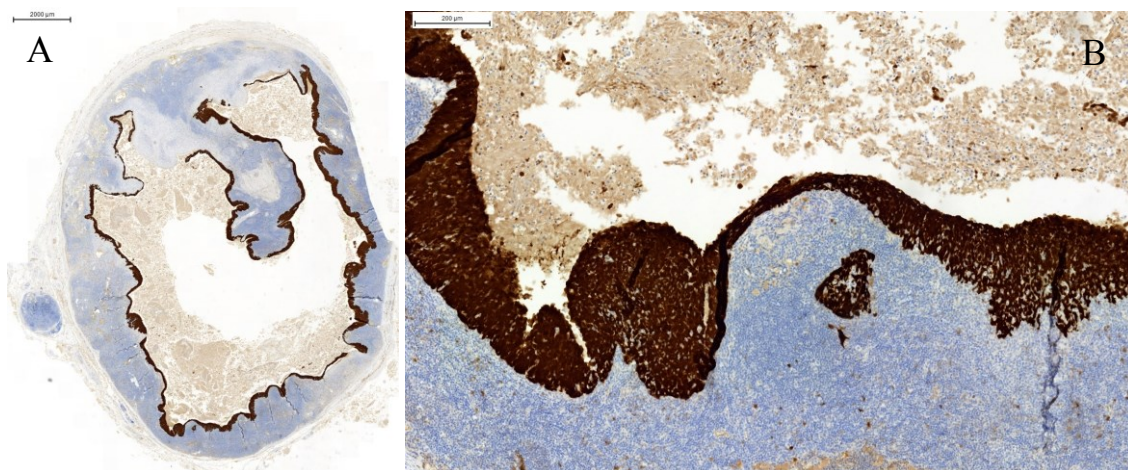
Obrázok 10 - Cystická metastáza nekeratinizujúceho karcinómu s maturáciou (hybridného SCC) (A). Nádor je tvorený prevažne „bazaloidnými“ bunkami oválneho až vretenitého tvaru, s primiešanými ložiskami keratinizácie - hniezdami buniek s hojnou eozinofilnou cytoplazmou a tvorbou intercelulárnych mostíkov (B).



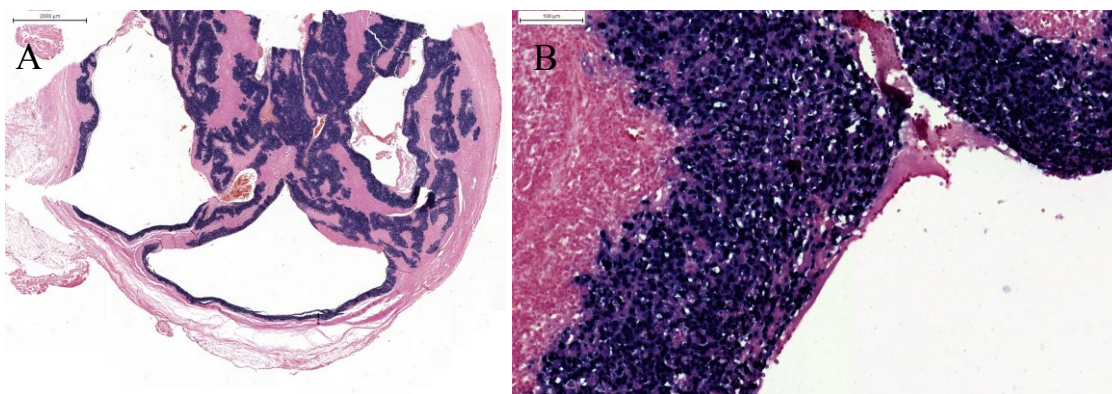
Obrázok 11 - Cystická metastáza keratinizujúceho karcinómu (A). Nádor je tvorený bunkami s objemnou eozinofilnou cytoplazmou, s intercelulárnymi mostíkmi a extracelulárnou keratinizáciou (B).

Imunohistochemicky bolo 16 prípadov difúzne p16-pozitívnych (72,7%) (Obr. 12). Origo všetkých p16-pozitívnych metastáz bolo identifikované v orofaryngu a žiadna metastáza s extrafaryngeálnym origom nebola p16-pozitívna. Oba prípady s neznámym origom boli tiež p16-pozitívne. High-risk HPV typy boli dokázané v 15 zo 16 p16-pozitívnych prípadov. V jednom p16-

pozitívnom prípade nebolo možné PCR vyhodnotiť a prítomnosť HPV bola dokázaná pomocou in situ hybridizácie. Prítomnosť high-risk HPV teda bola dokázaná vo všetkých p16-positívnych prípadoch. EBER in situ hybridizácia bola pozitívna (vždy v 100% nádorových buniek) v troch zo šiestich p16/HPV-negatívnych prípadov (Obr. 13). Origo vo všetkých troch prípadoch bolo potvrdené v nazofaryngu. Origo vo zvyšných troch p16/HPV negatívnych prípadoch bolo potvrdené v pľúcach (2x) a na koži vonkajšieho zvukovodu. Klinicko-patologické charakteristiky súboru sú zhrnuté v Tabuľke 1.



Obrázok 12 - Cystická metastáza HPV-asociovaného nekeratinizujúceho karcinómu s difúznou silnou imunohistochemickou p16 pozitivitou.



Obrázok 13 - EBER in situ hybridizácia – difúzna pozitivita v cystickej metastáze EBV-asociovaného nekeratinizujúceho nazofaryngeálneho karcinómu.

Tabuľka 1. Klinicko-patologické charakteristiky súboru

	Vek a pohlavie	Lokalizácia a histológia	Origo	P16	HPV PCR	HPV ISH	EBER1 /EBV PCR	Liečba	Follow-up
1	57/M	krk laterálne, NKSCC	Neznáme	+	HPV16	N	N	---	NED, 3 roky
2	67/Ž	krk laterálne, NKSCC	Báza jazyka	+	HPV16	N	N	RT, CHT	Nedávny prípad
3	67/Ž	krk laterálne, NKSCCM	BJ	+	NA	+	N	Res, RT	NED, 4 roky
4	46/Ž	krk laterálne, NKSCC	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT, CHT	NED, 4 roky
5	51/M	krk laterálne, KSCC, dobre diferencovaný	Zvukovod	-	-	N	- / -	Res, RT, CHT	NED, 4 roky
6	62/M	krk laterálne, NKSCC	Nazofarynx	-	-	N	EBER + / N	RT, CHT	DWRD, 8 mesiacov
7	62/Ž	krk laterálne, NKSCC	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT, CHT	NED, 6 rokov
8	61/M	krk laterálne, NKSCC	Tonzila	+	HPV16	NA	N	Res, RT	NED, 7 rokov
9	57/M	krk laterálne, NKSCCM	Báza jazyka	+	HPV16	N	N	Res, RT, CHT	NED, 6 rokov
10	50/M	supraklavikulárne, KSCC, dobre diferencovaný	Pľúca	-	-	N	- / -	RT	DOMD, 1 rok
11	55/Ž	submandibulárne, NKSCC	Báza jazyka	+	HPV16	N	N	Res, RT, CHT	DOMD, 1 rok
12	39/Ž	krk laterálne, NKSCC	Nazofarynx	-	-	N	EBER + / N	NEZ	NEZ
13	55/M	krk laterálne, NKSCCM	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT	NED, 9 rokov
14	63/M	krk laterálne, nízko diferencovaný SCC s ložiskovou keratinizáciou	Pľúca	-	-	N	NA / PCR +	CHT	DOMD, 1 year
15	71/M	krk laterálne, NKSCC	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT	NED, 13 rokov
16	62/M	krk laterálne, NKSCC	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT	NED, 15 rokov
17	58/M	Submandibulárne, NKSCCM	Neznáme	+	HPV16	NA	N	RT, CHT	NED, 16 rokov
18	74/M	krk laterálne, NKSCC	Báza jazyka	+	HPV16	N	N	Res, RT, CHT	DOUC, 6 rokov
19	54/Ž	preaurikulárne, KSCC	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT, CHT	NED, 4 roky
20	73/Ž	preaurikulárne, NKSCCM	Tonzila	+	HPV35	N	N	TE, RT	NED, 2 roky
21	39/Ž	krk laterálne, NKSCC	Tonzila	+	HPV16	N	N	TE, RT	Nedávny prípad
22	61/M	krk laterálne, NKSCC	Nazofarynx	-	-	ND	EBER + / N	CHT	AWRD, 8 rokov

NKSCC – nekeratinizujúci skvamocelulárny karcinóm, NKSCCM – nekeratinizujúci skvamocelulárny karcinóm s maturáciou, KSCC - keratinizujúci skvamocelulárny karcinóm, NA – neanalyzovateľné, N – nevykonané, NEZ – neznáme, Res –resekcia nádoru, RT- radioterapia, CHT – chemoterapia, TE – tonzilektómia, NED – bez známk ochorenia (no evidence of disease), AWRD – nažive s reziduálnym ochorením (alive with residual disease), DWRD- úmrtie s reziduálnym ochorením (died with residual disease), DOMD – úmrtie s metastatickým ochorením (died of metastatic disease), DOUC – úmrtie z inej príčiny (died of unrelated cause)

5.2.5. Diskusia

Metastázy z neznámeho origa tvoria významný podiel malignít oblasti hlavy a krku - predstavujú 3 - 9 % všetkých malignít tejto oblasti a vo väčšine prípadov sa histologicky jedná o SCC (53 - 90 %) [Layfield et al. 2007, Park et al. 2010, Strojjan et al. 2013, Arrangoiz et al. 2014]. Solitárne cystické metastázy môžu klinicky, radiologicky a dokonca aj histologicky napodobovať benígnu branchiogénnu cystu, pretože metastatický epitel má často blandný vzhľad, pripomínajúci normálny epitel tonzilárnych krýpt [Cinberg et al. 1982, Flanagan et al. 1994, Thompson et al. 1998, Regauer et al. 1999, Gourin et al. 2000, Pietarinen-Runtti et al. 2010, Zhang et al. 2014]. Až 22% cýst, ktoré sú klinicky považované za benígne je histologicky diagnostikovaných ako cystická metastáza skvamocelulárneho karcinómu [Cinberg et al. 1982, Granström et al. 1989, Flanagan et al. 1994, Gourin et al. 2000, Pietarinen-Runtti et al. 2010]. Incidencia malignity v cystických krčných léziách je ešte vyššia u pacientov starších ako 40 rokov (až do 80%) a preto viacerí autori u týchto pacientov doporučujú vylúčiť okultné primárne ložisko karcinómu ešte pred samotnou resekciou cysty [Granström et al. 1989, Flanagan et al. 1994, Gourin et al. 2000, Zhang et al. 2014]. Samotný vek však nemusí byť vhodným kritériom na odlišenie benígnych a malígnych krčných cýst, keďže vek výskytu cystických metastáz a branchiogénnych cýst sa vzájomne prekrýva [Gourin et al. 2000]. Pri vyšetovaní pacientov so suspektnou metastázou z neznámeho origa sa nedoporučuje otvorená chirurgická biopsia lézie pre potenciálne riziko diseminácie nádorových buniek, narušenie fascií a lymfatickej drenáže, čo v konečnom dôsledku môže viesť k nutnosti použitia agresívnejšej pooperačnej radioterapie [Arrangoiz et al. 2014]. Doporučený diagnostický postup pozostáva z klinického a endoskopického vyšetrenia slizníc horného aerodigestívneho traktu, radiologického vyšetrenia a tenkoihlovej bioipsie (FNAB) [Balm et al. 2010, Arrangoiz et al. 2014, Strojjan et al. 2013].

Cystická metastáza v krčnej lymfatickej uzline, najmä ak má typickú histomorfológiu nekeratinizujúceho SCC, ktorý rekapituluje morfológiu tonzilárneho kryptálneho epitelu je vysoko sugestívna pre lokalizáciu primárneho ložiska v orofaryngu [Thompson et al. 1998]. Najpravdepodobnejším zdrojom metastázy je často malý a klinicky okultný karcinóm podnebnnej mandle alebo bázy jazyka [Granström et al. 1989, Flanagan et al. 1994, Verma et al. 1995, Thompson et al. 1998, Regauer et al. 1999, Gourin et al. 2000, Goldenberg et al. 2008, Morani et al. 2013, Yasui et al. 2014].

Imunohistochemická expresia proteínu p16 je často používaná ako náhradný marker high-risk HPV infekcie v orofaryngeálnych karcinómoch [Venuti et al. 2012]. Pozitívna expresia p16 však ani zďaleka nie je špecifická pre HPV-asociovaný orofaryngeálny karcinóm (viď kapitola 3). Preto je na

podporenie predpokladaného orofaryngeálneho origa v prípade cystickej krčnej metastázy potrebná detekcia prítomnosti HPV (viď kapitola 4). Viaceré štúdie potvrdili, že pozitívny dôkaz HPV v p16-pozitívnej krčnej cystickej alebo solídnej metastáze skvamocelulárneho karcinómu predpovedá origo v orofaryngu [Begum et al. 2003, El-Mofty et al. 2008, Weiss et al. 2011, Park et al. 2012, Yasui et al. 2014]. V zhode s publikáciami ostatných autorov sme v našej štúdii potvrdili pôvod všetkých p16/HPV-pozitívnych cystických metastáz v orofaryngu. Navyše, u oboch pacientov, u ktorých klinicky primárny nádor nájdený nebol možno predpokladať, že sa jednalo o metastázujúci karcinóm orofaryngu, keďže išlo o p16/HPV pozitívne nádory a obaja pacienti mali priaznivý priebeh ochorenia, v jednom prípade dokonca bez akejkoľvek onkologickej liečby.

Nie všetky cystické metastázy skvamocelulárneho karcinómu v oblasti hlavy a krku však pochádzajú z orofaryngu (viď kapitola 3) a nie všetky metastázy orofaryngeálnych SCC majú typickú morfológiu [Thompson et al. 1998, Regauer et al. 1999]. Prevalencia krčných cystických metastáz z non-orofaryngeálneho origa je v súčasnosti neznáma. Pôvod cystických metastáz v oblasti nazofaryngu bol doposiaľ popísaný iba v niekoľkých málo prácach [Gourin et al. 2000, Regauer et al. 1999, Verma et al. 1995, Zhang et al. 2014]. V najväčšej štúdii krčných cystických metastáz tvorili metastázy nazofaryngeálneho karcinómu 8% (11 zo 136 prípadov) [Thompson et al. 1998]. V našej štúdii (s omnoho menším súborom pacientov) tvorili cystické metastázy non-orofaryngeálnych karcinómov až 30%, pričom 15% (3 prípady z 20 so známym origom) tvorili metastázy nazofaryngeálneho karcinómu. Hlavným etiologickým faktorom nazofaryngeálneho karcinómu, najmä v endemických oblastiach a v nazofaryngeálnych karcinómoch nekeratinizujúceho typu je infekcia EBV [Petersson et al. 2015]. Asociácia EBV s nazofaryngeálnym karcinómom však nie je taká silná v non-endemických oblastiach [Westra et al. 2015, Petersson et al. 2015]. Navyše, niekoľkých štúdiách bola v časti nazofaryngeálnych karcinómov dokázaná prítomnosť HPV, čo robí z nazofaryngeálneho karcinómu ďalší potenciálny zdroj p16/HPV-pozitívnych cystických metastáz [Tyan et al. 1993, Hording et al. 1994, Giannoudis et al. 1995, Rassekh et al. 1998, Punwaney et al. 1999, Tung et al. 1999, Mirzamani et al. 2006, Maxwell et al. 2010b, Lo et al. 2010, Laantri et al. 2011, Huang et al., 2011, Deng et al. 2011, Barwad et al. 2012, Singhi et al. 2012, Robinson et al. 2013, Lin et al. 2014, Dogan et al. 2014, Stenmark et al. 2014]. Udávaná HPV-pozitivita v nazofaryngeálnom karcinóme je však značne variabilná (v rozmedzí 0-100%) a je závislá od študovanej populácie a použitej metodiky na detekciu HPV. Akú úlohu v patogenéze nazofaryngeálneho karcinómu má infekcia HPV v súčasnosti nie je úplne jasné. V našej štúdii 64 pacientov s nazofaryngeálnymi karcinómami sme dokázali prítomnosť transkripčne aktívnej HPV infekcie iba v jedinom prípade (viď kapitola 6). Pravdepodobnosť, že HPV pozitívna

cystická metastáza má pôvod v nazofaryngeálnom karcinóme je preto, minimálne v našej populácii, veľmi nízka.

5.2.6. Záver

V retrospektívnej štúdii sme potvrdili, že väčšina cystických metastáz skvamocelulárneho karcinómu v oblasti hlavy a krku je aj v našej populácii asociovaná s klinicky okultným HPV-asociovaným orofaryngeálnym karcinómom. Pridanie testu na dôkaz EBV (EBER in situ hybridizácia) v prípade p16/HPV-negatívnej cystickej metastázy môže v malej časti prípadov odhaliť origo v nazofaryngu. Skvamocelulárne karcinómy iných oblastí (pľúca, koža) sa môžu vzácnne prezentovať cystickými metastázami na krku.

6. HPV a EBV v nazofaryngeálnom karcinóme v non-endemickej východoeurópskej populácii

6.1. Ciele práce

Nazofaryngeálny karcinóm (NPCa) je častá malignita v niektorých častiach sveta (Juhovýchodná Ázia, Stredný východ, Severná Afrika, Arktída), s ročnou incidenciou v niektorých oblastiach až 1:4000 [Thompson 2007, Liu et al. 2007, Carle et al. 2012, Petersson 2015]. V karcinogéze nazofaryngeálneho karcinómu hrá dôležitú úlohu Epstein-Barrovej vírus (EBV). U pacientov z endemických oblastí možno EBV dokázať v 80-100% prípadov a to najmä v nazofaryngeálnych karcinómoch nekeratinizujúceho typu [Perez-Ordoñez B 2007, Petersson 2015, Tsao et al. 2015]. Na rozdiel od endemických oblastí je nazofaryngeálny karcinóm vzácny v „západných“ populáciách a non-endemických oblastiach, s ročnou incidenciou < 1 na 100,000. Asociácia s EBV v krajinách s nízkou incidenciou a v keratinizujúcich nazofaryngeálnych karcinómoch nie je taká silná ako v endemických oblastiach [Westra et al. 2015, Petersson et al. 2015]. Navyše, početné štúdie z endemických aj non-endemických oblastí zistili, že by v karcinogéze časti nazofaryngeálnych karcinómov mohla zohrávať úlohu infekcia HPV [Tyan et al. 1993, Hording et al. 1994, Giannoudis et al. 1995, Rassekh et al. 1998, Punwaney et al. 1999, Tung et al. 1999, Mirzamani et al. 2006, Maxwell et al. 2010^b, Lo et al. 2010, Laantri et al. 2011, Huang et al., 2011, Deng et al. 2011, Barwad et al. 2012, Singhi et al. 2012, Robinson et al. 2013, Lin et al. 2014, Dogan et al. 2014, Stenmark et al. 2014].

Nazofaryngeálny karcinóm je radiosenzitívny tumor a radioterapia je štandardnou súčasťou terapie vo všetkých štádiách lokálneho ochorenia [Tsang et al. 2014, Lee et al. 2015]. Viac ako 30% pacientov však má po iniciálnej liečbe lokoregionálnu rekurenciu alebo distantné metastázy. Lokálne pokročilé ochorenie je liečené kombinovanou chemoradioterapiou a metastatické ochorenie paliatívnou chemoterapiou. Celkové prežívanie pri rekurencii ochorenia je však nízke, prognóza je zlá a liečba je asociovaná s toxicitou [Tsang et al. 2014, Hutajulu et al. 2014, Lee et al. 2015, Ribassin-Majed et al. 2016].

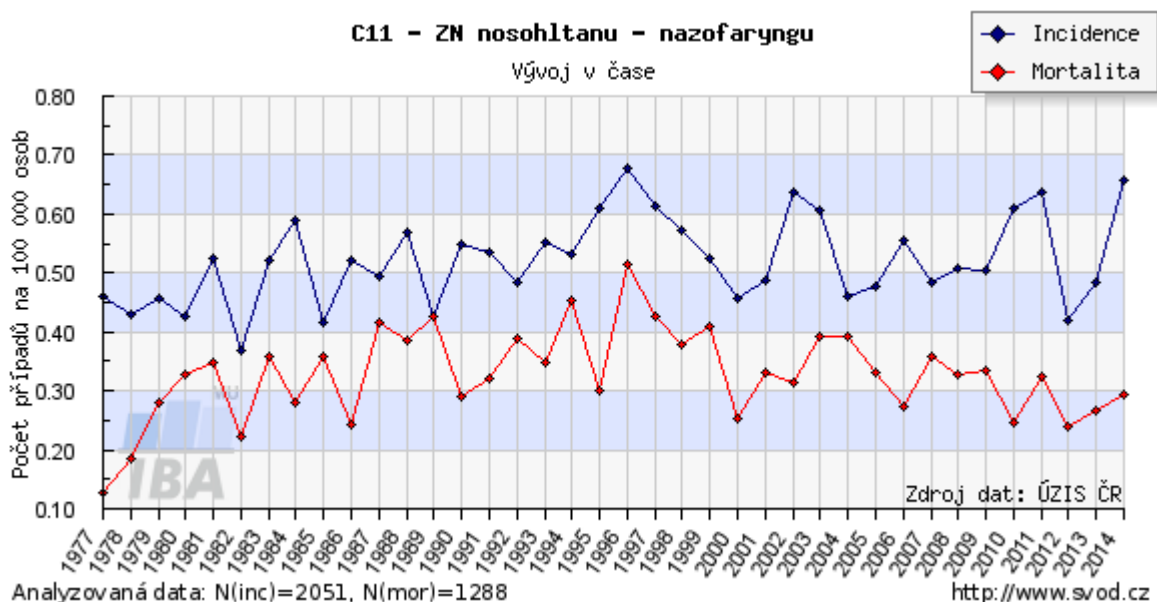
Prognóza, terapeutické postupy a preventívne opatrenia by sa v budúcnosti mohli líšiť podľa toho, či sa jedná o nazofaryngeálny karcinóm ktorý je HPV-asociovaný, EBV-asociovaný, alebo bez asociácie s vírusom. Napríklad, prítomnosť EBV vo všetkých nádorových bunkách v EBV-asociovaných karcinómoch poskytuje unikátnu príležitosť pre ciele liečbu zameranú na EBV (napr. imunoterapia, epigenetická liečba) [Louis et al. 2010, Li et al. 2015,

Lee et al. 2015]. HPV-asociovaným nazofaryngeálnym karcinómom by sa mohlo predísť očkovaním. Stanovenie prítomnosti EBV alebo HPV v nazofaryngeálnom karcinóme tak v budúcnosti môže byť dôležitým prediktívnym a prognostickým parametrom.

Nazofaryngeálny karcinóm je v slovenskej a českej populácii vzácné ochorenie so štandardizovanou incidenciou <1 na 100,000 obyvateľov (Graf č.11) [Dušek et al. 2005, Diba et al. 2015]. Asociácia nazofaryngeálneho karcinómu s EBV a HPV je v českej a slovenskej populácii v podstate neznáma. V retrospektívnej štúdii sme preto vyšetrili prítomnosť HPV a EBV v súbore českých a slovenských pacientov s nazofaryngeálnym karcinómom.

Za účelom porovnania našich výsledkov s literárnymi údajmi a aby sme zistili či má metodika detekcie HPV vplyv na popisovanú incidenciu HPV-asociovaného nazofaryngeálneho karcinómu sme vykonali metaanalýzu štúdií, ktoré udávali zastúpenie EBV-pozitívnych nazofaryngeálnych karcinómov, HPV-pozitívnych karcinómov detekovaných PCR vyšetrením a HPV-pozitívnych karcinómov detekovaných p16 vyšetrením v bielej (kaukazskej) populácii.

Graf č.11 - Časový vývoj hrubej incidencie (počet nových prípadov na 100,000 obyvateľov) a mortality nazofaryngeálneho karcinómu v Českej republike



6.2. Materiál a metodika

6.2.1. Výber pacientov, histologické a imunohistochemické vyšetrenie

Pacienti s nazofaryngeálnym karcinómom boli identifikovaní v databázach patologických oddelení dvoch slovenských nemocníc terciárneho typu (FN J.A. Reimana Prešov a Univerzitná nemocnica L. Pasteura Košice) a privátnej patológie (Medicyt s.r.o. Košice), pokrývajúce veľkú časť diagnostiky nádorov hlavy a krku východného Slovenska (dokopy 41 prípadov), FN Hradec Králové (19 prípadov), a v registri nádorov slinných žliaz a hlavy a krku (Bioptická laboratoř s.r.o. Plzeň, 2 prípady). Spolu bolo identifikovaných 61 prípadov diagnostikovaných v rokoch 1997-2014. Na potvrdenie diagnózy boli zrevidované všetky dostupné hematoxylín-eozínové preparáty. Nádory boli klasifikované do dvoch skupín: (i) nekeratinizujúci SCC (vrátane diferencovaného a nediferencovaného variantu) a (ii) keratinizujúci SCC. Ďalšie vzácne podtypy SCC (napr. bazaloidný, sarkomatoidný, adenoskvamózny atď.) sa v súbore nevyskytovali.

Na imunohistochemické vyšetrenie bol z každého prípadu vybraný jeden reprezentatívny parafínový blok a bolo vykonané imunohistochemické vyšetrenie protilátkou p16 postupom ako bolo uvedené v kapitole 5.2.1.

6.2.2. PCR vyšetrenie a in situ hybridizácia

Vyšetrenie bolo vykonané rovnakým postupom ako bolo uvedené v kapitolách 5.2.2. a 5.2.3.

6.2.3. Metaanalýza

Štúdie ktoré reportovali HPV a zároveň aj EBV status v nazofaryngeálnych karcinómoch boli identifikované vyhľadávaním na stránkach MEDLINE/PubMed použitím rôznych kombinácií kľúčových slov „nasopharyngeal carcinoma“, „human papillomavirus“ a „Epstein-Barr virus“. Ďalšie relevantné práce boli identifikované medzi referenciami v nájdených publikáciách. Na odhad prevalencie EBV-asociovaného nazofaryngeálneho karcinómu v kaukazskej populácii boli do metaanalýzy zahrnuté všetky štúdie, ktoré udávali veľkosť súboru a zastúpenie EBV-pozitívnych karcinómov v kaukazskej populácii. Prevalencia HPV-pozitívnych karcinómov bola stanovená samostatne pre PCR-definovanú HPV pozitivitu a HPV pozitivitu definovanú pomocou p16/in situ hybridizácie.

Prevalencia EBV a HPV-pozitivity u nazofaryngeálnych karcinómov bola odhadnutá pomocou meta-analýz s použitím modelov "fixed-effects" a "random effects" implementovaných v SW MedCalc pre Windows, verzia 15.6 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). "Fixed-effects" model je založený na predpoklade, že jednotlivé štúdie poukazujú na spoločný skutočný efekt odhadovaný pomocou sumarizácie dát, kým "random effects" model predpokladá, že skutočné efekty sa v jednotlivých štúdiách odlišujú a že sumárny efekt je váženým priemerom hodnôt zistených v jednotlivých štúdiách. Prevalencie z jednotlivých štúdií a odhady súhrnných efektov sú prezentované spolu s hodnotami CI95 pomocou lesných grafov, kde veľkosť značiek zodpovedá váženému vplyvu jednotlivých štúdií. Zhoda prevalencií medzi jednotlivými štúdiami zahrnutými do meta-analýz bola testovaná s použitím štatistík Cochran Q a I². V prípadoch, kedy bola prítomná heterogenita, sa na interpretáciu výsledkov meta-analýz použili modely "random-effects".

Na zhodnotenie štatistickej významnosti rozdielov v prevalencii HPV a EBV medzi mužmi a ženami bol použitý Fisherov exaktný test. Na zhodnotenie štatistickej významnosti rozdielov priemerného veku medzi mužmi a ženami a medzi EBV-pozitívnymi a EBV-negatívnymi pacientmi bol použitý Welchov t-test. Všetky p-hodnoty sú dvojstranné a rozdiely sú považované za signifikantné ak je hodnota $p < 0,05$.

6.3. Výsledky

Súbor tvorilo 62 pacientov, 13 žien a 49 mužov vo veku 46 až 81 rokov. Priemerný vek v čase diagnózy bol 64,2 rokov (medián 63 rokov). 61 karcinómov (98,4%) malo morfológiu nekeratinizujúceho SCC. Jediný karcinóm mal morfológiu keratinizujúceho SCC. Imunohistochemicky bol iba jeden prípad p16 pozitívny (1,6%). Prítomnosť HPV v tomto prípade bola dokázaná pomocou DNA in situ hybridizácie a PCR analýza potvrdila prítomnosť HPV18. Morfologicky sa jednalo o nekeratinizujúci typ SCC. Revíziou radiologických nálezov bola potvrdená lokalizácia nádoru v nazofaryngu. Zvyšných 61 prípadov bolo p16-negatívnych (3 prípady vykazovali fokálnu expresiu v <70% buniek). Všetky p16-negatívne prípady boli zároveň HPV negatívne pri vyšetrení DNA in situ hybridizáciou aj pomocou PCR.

EBER in situ hybridizácia bola pozitívna vo všetkých nádorových bunkách v 53 prípadoch (85,5%). HPV-pozitívny prípad bol EBER-negatívny. HPV/EBV status všetkých prípadov a demografické charakteristiky súboru sú zhrnuté v Tabuľke 2 a Tabuľke 3.

Tabuľka 2 - Demografické a klinickopatologické charakteristiky súboru pacientov

	Muži	Ženy	P-hodnota
N	49	13	
Priemerný vek \pm SD	45,5 \pm 13,6	53.5 \pm 18,4	0.18
P16-pozitívne	0	1	
P16-negatívne	49	12	0.21
HPV ISH-pozitívne	0	1	
HPV ISH-negatívne	49	12	0.21
EBER-pozitívne	43	10	
EBER-negatívne	6	3	0.38

Tabuľka 3 - Histologický podtyp a HPV/EBV status 62 nazofaryngeálnych karcinómov

WHO typ	EBV-pozitívne	HPV-pozitívne	EBV/HPV-negatívne
Keratinizujúci	0	0	1 (1,6%)
Nekeratinizujúci	53 (85,5%)	1 (1,6%)	7 (11,3%)

Mužskí pacienti mali nižší priemerný vek v čase diagnózy ako ženy a vyššie zastúpenie EBV-pozitívnych karcinómov, tieto rozdiely však neboli štatisticky významné. EBV-negatívni pacienti však boli starší (priemerne 61,6 rokov) ako EBV-pozitívni (50,2 rokov) a tento rozdiel bol štatisticky signifikantný ($p=0,0298$).

Zhrnutie publikácií ktoré zodpovedali vyhľadávacím kritériám (popisujúce výskyt HPV aj EBV-asociovaných nazofaryngeálnych karcinómov v rámci jednej publikácie) je v Tabuľke 4. Časť týchto článkov, ktoré popisovali výskyt EBV a HPV-asociovaných karcinómov v kaukazskej populácii bola použitá na ďalšie spracovanie metaanalýzou.

Metaanalýzou ôsmich štúdií, ktoré popisovali EBV-pozitivitu v nazofaryngeálnom karcinóme bola odhadnutá prevalencia EBV-pozitívnych karcinómov v kaukazskej populácii na ~42% (Tabuľka 5 a Graf č.12). Nami zistená EBV-pozitivita v 85,5% nazofaryngeálnych karcinómov sa od tohto čísla signifikantne líši a je skôr podobná prevalencii v endemických oblastiach.

Metaanalýza piatich štúdií, ktoré popisovali HPV-pozitivitu definovanú pomocou PCR vyšetrenia (Graf 13) a štyroch štúdií, ktoré popisovali HPV-pozitivitu definovanú pomocou p16/in situ hybridizácie (Graf 14) v nazofaryngeálnych karcinómoch u pacientov kaukazskej rasy dokázala signifikantnú heterogenitu medzi štúdiami s I^2 hodnotou $>75\%$ a p-hodnotami

0,0018 a 0,0001. Skutočné zastúpenie HPV-pozitívnych karcinómov v kaukazskej populácii preto nemôže byť odhadnuté.

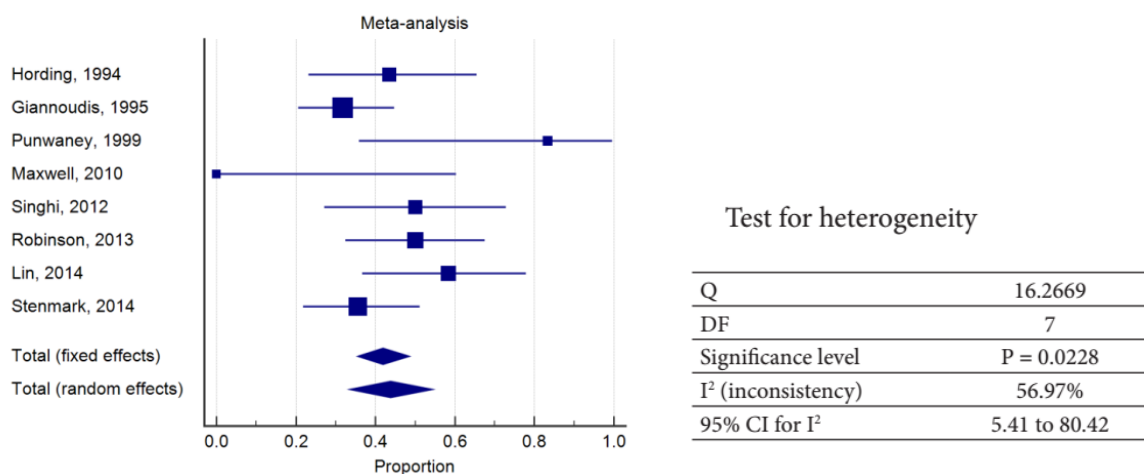
Tabuľka 4 - Prehľad článkov popisujúcich HPV a zároveň EBV status v nazofaryngeálnych karcinómoch v rámci jednej publikácie

Autor	Počet prípadov (typ populácie)	Metodiky detekcie EBV/HPV	EBV pozitivita (%)	HPV pozitivita (%)
Tyan 1993	30 (Východná Ázia/Taiwan)	PCR/PCR	30/30 (100)	14/30 (47)
Hørding 1994	38 (23 Dáni, 15 Inuiti)	PCR/PCR	10/23 (45) Dánov 15/15 (100) Inuitov	4/15 (27) Dánov 0/15 (0) Inuitov
Giannoudis 1995	63 (Gréci)	PCR/PCR	20/63 (32)	12/63 (19)
Rassekh 1998	17 (neznáma)	PCR/PCR	15/17 (88.2)	9/17 (52.9)
Punwaney 1999	30 (6 kaukazská, 1 čínsko-americká, 23 korejská/čínska)	PCR/PCR	10/13 (77) celkovo 5/6 (83) kaukazská 5/7 (71) ázijská	7/30 (23) celkovo 3/6 (50) kaukazská 4/24 (17) ázijská
Tung 1999	88 (Východná Ázia/Čína)	PCR/PCR	73/88 (83)	45/88 (51)
Mirzamani 2006	20 (Západná Ázia/ Irán)	ISH/ISH	19/20 (95)	2/20 (10) HPV 6/11 2/20 (10) HPV 16/18
Maxwell 2010 ^b	5 (4 kaukazská, 1 ázijská)	ISH/PCR, p16 IHC	0/4 (0) kaukazská 1/1 (100) ázijská	4/4 (100) kaukazská 0/1 (0) ázijská
Lo 2010	30 (19 kaukazská + 5 ázijská + 6 iná)	ISH/ISH, PCR, p16 IHC	14/28 (50)	15/28 (54)
Laantri 2011	70 (Severná Afrika /Maroko)	PCR/PCR	70/70 (100)	24/70 (34)
Huang 2011	43 (PCR skupina) + 46 (ISH skupina) (Východná Ázia/Taiwan)	ISH, PCR/ISH, PCR	43/43 (100) PCR skupina 43/46 (94) ISH skupina	15/42 (35) PCR skupina 19/46 (41) ISH skupina
Singhi 2012	45 (20 kaukazská, 11 ázijská, 11 afroamerická, 2 Stredný Východ, 1 hispánska)	ISH/ISH, p16 IHC	34/45 (76) celkovo 10/20 (50) kaukazská 11/11 (100) ázijská 10/11 (91) afroamerická 2/2 (100) Stredný Východ 1/1 (100) hispánska	4/45 (9) celkovo 4/20 (20) kaukazská
Robinson 2013	67 (34 kaukazská, 17 ázijská, 14 afroamerická, 2 severoafrická)	ISH/ ISH, PCR, p16 IHC	47/67 (70) celkovo 17/34 (50) kaukazská 16/17 (94) ázijská 12/14 (86) afroamerická 2/2 (100) severoafrická	11/67 (16) celkovo 9/34 (26) kaukazská 2/14 (14) afroamerická
Lin 2014	86 ázijská/Čína, 108 americká (77 ázijská, 25 kaukazská, 2 afroamerická, 3 hispánska, 1 neznáma)	ISH, PCR/ISH, PCR, p16 IHC	83/86 (97) čínska 93/104 (89) americká 74/74 (100) ázijská 14/24 (58) kaukazská 2/2 (100) afroamerická 3/3 (100) hispánska 0/1 (0) neznáma	0/86 (0) čínska 5/104 (5) americká 5/24 (21) kaukazská
Dogan 2014	90 (56 kaukazská, 4 afroamerická, skupina 1981-2012; neznáma pre skupinu 1956-1971)	ISH/ISH, p16 IHC	53/92 (58)	6/63 (10) všetci kaukazská
Stenmark 2014	61 (45 kaukazská, 9 afroamerická, 5 ázijská, 2 Stredný Východ)	ISH/PCR, p16 IHC	26/61 (43) celkovo 16/45 (36) kaukazská 5/9 (56) afroamerická 4/5 (80) ázijská 1/2 (50) Stredný Východ	18/61 (30) celkovo 17/45 (38) kaukazská 1/9 (10) afroamerická

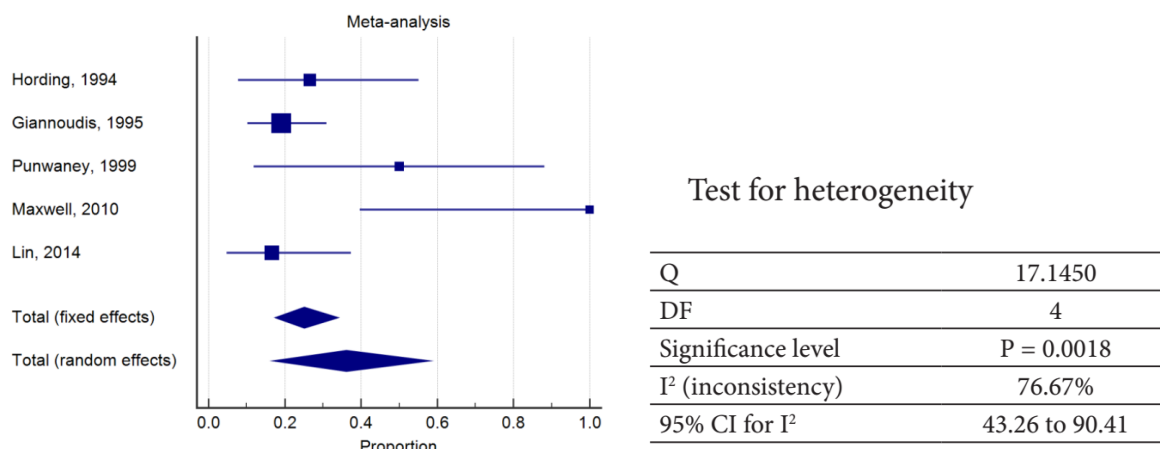
Tabuľka 5 - Zastúpenie EBV-pozitívnych nazofaryngeálnych karcinómov v kaukazskej populácii

Študia	Štandardná odchýlka	Zastúpenie EBV pozitívnych prípadov (%)	95% CI
Hording, 1994	23	43.5	23.2 - 65.5
Giannoudis, 1995	63	31.7	20.6 - 44.7
Punwaney, 1999	6	83.3	35.9 - 99.6
Maxwell, 2010	4	0.00	0.00 - 60.2
Singhi, 2012	20	50.0	27.2 - 72.8
Robinson, 2013	34	50.0	32.4 - 67.6
Lin, 2014	24	58.3	36.6 - 77.9
Stenmark, 2014	45	35.6	21.9 - 51.2
Celkovo (fixed effects)	219	41.9	35.4 - 48.6
Celkovo (random effects)	219	43.8	33.4 - 54.5

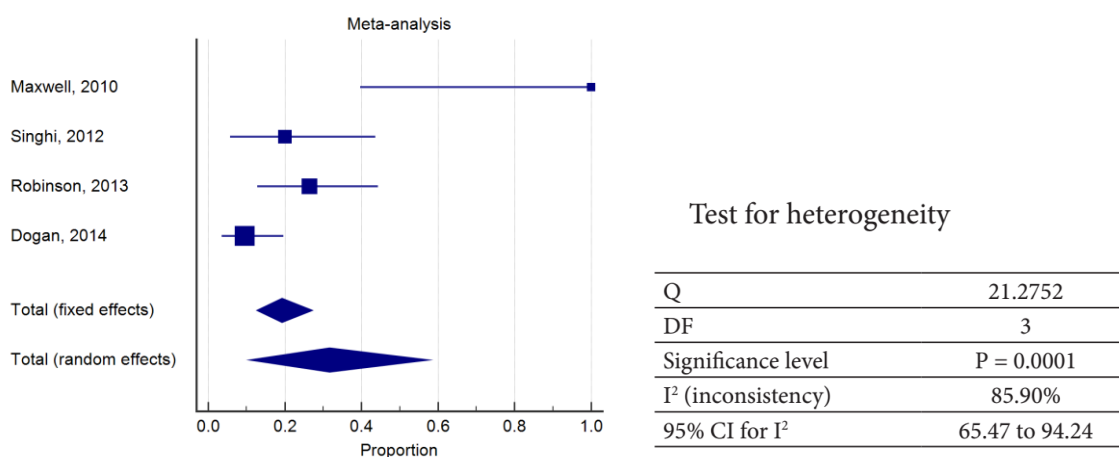
Graf č.12 - Metaanalýza prevalencie EBV pozitivity v nazofaryngeálnom karcinóme v kaukazskej populácii



Graf č. 13 - Metaanalýza prevalencie HPV pozitivity v nazofaryngeálnom karcinóme v kaukazskej populácii detekovanej pomocou PCR



Graf č. 14 - Metaanalýza prevalencie HPV pozitivity v nazofaryngeálnom karcinóme v kaukazskej populácii detekovanej pomocou p16/in situ hybridizácie



6.4. Diskusia

Dôležitými etiologickými faktormi nazofaryngeálneho karcinómu sú environmentálne karcinogény, napr. nitrozamíny a polycyklické uhľovodíky vyskytujúce sa v potravinách konzervovaných pomocou soli, fajčenie, rôzne chemické výpary (napr. formaldehyd) a výpary vznikajúce pri varení v podmienkach s nedostatočnou ventiláciou, priemyselný prach, nazálne oleje a rôzne bylinkové preparáty používané v alternatívnej medicíne. Pacienti s určitými HLA haplotypmi majú zvýšené riziko vzniku nazofaryngeálneho karcinómu [Thompson 2007, Liu et al. 2007, Perez-Ordoñez 2007, Petersson 2015]. Hlavným etiologickým faktorom je však infekcia EBV a to najmä

v endemických oblastiach (Juhovýchodná Ázia, južné oblasti Číny, Stredný výcjad a Severná Afrika, Arktída) a karcinómoch nekeratinizujúceho typu. Asociácia NPCa s EBV však nie je taká výrazná v non-endemických oblastiach a v karcinómoch s variantnou morfológiou. Navyše, viaceré štúdie naznačujú, že v karcinogenéze časti nazofaryngeálnych karcinómov môže zohrávať úlohu infekcia HPV [Tyan et al. 1993, Hording et al. 1994, Giannoudis et al. 1995, Rassekh et al. 1998, Punwaney et al. 1999, Tung et al. 1999, Mirzamani et al. 2006, Maxwell et al. 2010b, Lo et al. 2010, Laantri et al. 2011, Huang et al., 2011, Deng et al. 2011, Barwad et al. 2012, Singhi et al. 2012, Robinson et al. 2013, Lin et al. 2014, Dogan et al. 2014, Stenmark et al. 2014]. Reportovaná HPV-pozitivita v nazofaryngeálnych karcinómoch je však značne variabilná (údaje v rozmedzí 0-100%).

Účelom metaanalýz bolo odhadnúť podiel HPV-pozitívnych nazofaryngeálnych karcinómov v kaukazskej populácii a zistiť či za rozdiely v udávanej HPV-pozitivite je zodpovedná metodika dôkazu HPV. Metaanalýzami (použitím „random effects“ modelu) bolo zistené, že HPV-pozitívne karcinómy detekované pomocou PCR metodiky tvoria 36.1% (CI95: 16.9-58.0%) a HPV-pozitívne karcinómy detekované pomocou p16/in situ hybridizácie tvoria 31.7% (10.7-57.6%). Keďže obe študované skupiny publikácií vykazovali výraznú heterogenitu ($I^2 > 75\%$ pre obe metaanalýzy), výsledky naznačujú, že existujú dve alebo viaceré subpopulácie, vzájomne sa líšiace významom HPV v karcinogenéze nazofaryngeálneho karcinómu. Zastúpenie HPV-pozitívnych karcinómov detekovaných rôznymi postupmi je však veľmi podobné. Za rozdiely v reportovanej prevalencii HPV preto pravdepodobne nie je zodpovedná metodika detekcie HPV, ale za rozdiely v prevalencii budú zodpovedné iné faktory, akými je napr. etnicita študovanej populácie alebo obdobie v ktorom bola štúdia vykonaná. Výsledky našej štúdie naznačujú, že v našej populácii infekcia HPV nezohráva významnú úlohu v patogenéze nazofaryngeálneho karcinómu a prítomnosťou EBV v 85,5% prípadov sa náš súbor podobá skôr na pacientov z endemických oblastí. Tento záver (aj keď vychádza z relatívne malého súboru pacientov) má praktický význam v tom, že v prípade HPV-pozitívnej metastázy s neznámym origom je pôvod metastázy v nazofaryngu málo pravdepodobný a diagnostiku/liečbu je nutné zamerať na oblasť orofaryngu. Väčšina našich pacientov by navyše bola vhodnými kandidátmi na nové spôsoby liečby, zacielené práve na EBV. Zároveň je možné väčšinu pacientov počas liečby monitorovať kvantitatívnym vyšetrením prítomnosti EBV DNA v periférnej krvi [Pettersson 2015].

Prognostický význam HPV-pozitivity v nazofaryngeálnych karcinómoch je na rozdiel od karcinómov orofaryngu neznámy. Huang a spol. dokázali HPV v 35% nazofaryngeálnych karcinómov, ale nezistili žiadnu asociáciu medzi HPV-pozitivitou a štádiom ochorenia, rekurenciami ani celkovým prežívaním

[Huang et al. 2011]. Robinson a spol. dokázali HPV-pozitivitu v 16% prípadov a HPV-status nebol asociovaný s celkovým prežívaním [Robinson et al. 2013]. V ďalšej štúdií porovnávajúcej dve populácie (bieli američania vs. čínski pacienti) bola HPV-pozitivita zistená iba v piatich zo 105 amerických prípadov (čínski pacienti boli všetci HPV-negatívni) a opäť nebola asociovaná s prognózou. Americkí pacienti s EBV-negatívnymi karcinómami však vykazovali trend k horšiemu preživaníu [Lin et al. 2014]. V štúdií Dogana a spol. bolo HPV-pozitívnych 9 z 90 karcinómov (3 ale zasahovali do orofaryngu). Celkové prežívanie HPV-pozitívnych pacientov sa nelíšilo od HPV-negatívnych. EBV/HPV negatívni pacienti však mali signifikantne kratšie prežívanie [Dogan et al. 2014]. V ďalšej práci bolo HPV-pozitívnych 30% karcinómov (18 zo 61). Pacienti s HPV-pozitívnymi a EBV/HPV-negatívnymi nádormi mali hošiu lokoregionálnu kontrolu ochorenia, čas do progresie aj celkové prežívanie ako pacienti s EBV-pozitívnymi karcinómami [Stenmark et al. 2014]. Výsledky týchto štúdií naznačujú, že HPV-pozitivita v nazofaryngeálnych karcinómoch nie je asociovaná s lepšou prognózou. Správny staging ochorenia (nazofarynx vs. orofarynx) má v prípade HPV-pozitívneho karcinómu prognostický význam. Tieto dáta sú však limitované a bude potrebné závery o prognostickom význame HPV v nádoroch nazofaryngu potvrdiť vo väčších štúdiách.

6.5. Záver

Zdá sa, že v našej populácii infekcia HPV nezohráva významnú úlohu v patogenéze nazofaryngeálneho karcinómu. Naopak, na rozdiel od iných non-endemických oblastí, sme vo väčšine prípadov dokázali prítomnosť EBV. Títo pacienti sú potenciálnymi kandidátmi na liečbu zameranú na prítomnosť EBV [Louis et al. 2010, Li et al. 2015, Lee et al. 2015]. Priebeh ochorenia u týchto pacientov je možné monitorovať kvantitatívnym vyšetrením prítomnosti EBV DNA v periférnej krvi [Petersson 2015]. Pravdepodobnosť, že HPV-pozitívna metastáza z neznámeho origa pochádza z oblasti nazofaryngu je v našej populácii malá.

Literatúra

- Abogunrin S, Di Tanna GL, Keeping S, Carroll S, Iheanacho I. Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancers in European populations: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2014;14:968.
- Adhikari J, Sharma P, Bhatt VR. Risk of secondary solid malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and preventive strategies. *Future Oncol* 2015;11(23):3175-85.
- Al-Amad SH, Awad MA, Nimri O. Oral cancer in young Jordanians: potential association with frequency of narghile smoking. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;118(5):560-565.
- Alexander RE, Hu Y, Kum JB, et al. p16 expression is not associated with human papillomavirus in urinary bladder squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012; 25(11):1526-1533.
- Alos L, Moyano S, Nadal A, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer* 2009; 115(12):2701–2709.
- Anantharaman D, Muller DC, Laggiou P, Ahrens W, Holcátová I, Merletti F, Kjærheim K, Polesel J, Simonato L, Canova C, Castellsague X, Macfarlane TV, Znaor A, Thomson P, Robinson M, Conway DI, Healy CM, Tjønneland A, Westin U, Ekström J, Chang-Claude J, Kaaks R, Overvad K, Drogan D, Hallmans G, Laurell G, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Agudo A, Larrañaga N, Travis RC, Palli D, Barricarte A, Trichopoulou A, George S, Trichopoulos D, Quirós JR, Grioni S, Sacerdote C, Navarro C, Sánchez MJ, Tumino R, Severi G, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Panico S, Weiderpass E, Lund E, Gram IT, Riboli E, Pawlita M, Waterboer T, Kreimer AR, Johansson M, Brennan P. Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *Int J Epidemiol* 2016;45(3):752-761.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363(1):24–35.
- Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(23):1801–1810.
- Arrangoiz R, Galloway TJ, Papavasiliou P, Ridge JA, Lango MN. Metastatic cervical carcinoma from an unknown primary: literature review. *Ear Nose Throat J* 2014;93(4-5):E1–E10.

- Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol* 2014;25(2):435-441.
- Balm AJ, van Velthuysen ML, Hoebbers FJ, Vogel WV, van den Brekel MW. Diagnosis and treatment of a neck node swelling suspicious for a malignancy: an algorithmic approach, *Int J Surg Oncol* 2010;2010:581540.
- Barwad A, Sood S, Gupta N, Rajwanshi A, Panda N, Srinivasan R. Human papilloma virus associated head and neck cancer: a PCR based study. *Diagn Cytopathol* 2012;40(10):893–897.
- Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2003;9(17):6469-6475.
- Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol* 2008;32(7):1044–1050.
- Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer* 2015; 136(12): 2741–2751.
- Bishop JA, Westra WH. Human papillomavirus-related small cell carcinoma of the oropharynx. *Am J Surg Pathol* 2011;35(11):1679–1684.
- Bishop JA, Ma XJ, Wang H, Luo Y, Illei PB, Begum S, Taube JM, Koch WM, Westra WH. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *Am J Surg Pathol* 2012;36(12):1874–1882.
- Bishop JA, Guo TW, Smith DF, Wang H, Ogawa T, Pai SI, Westra WH. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol* 2013;37(2):185–192.
- Bishop JA, Montgomery EA, Westra WH. Use of p40 and p63 immunohistochemistry and human papillomavirus testing as ancillary tools for the recognition of head and neck sarcomatoid carcinoma and its

distinction from benign and malignant mesenchymal processes. *Am J Surg Pathol* 2014;38(2):257–264.

Bishop JA, Lewis JS Jr, Rocco JW, Faquin WC. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Semin Diagn Pathol* 2015;32(5):344-351.

Bhatia A, Burtness B. Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancer: Defining Risk Groups and Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3243-3250.

Bledsoe TJ, Noble AR, Hunter GK, Rybicki LA, Hoschar A, Chute DJ, Saxton JP, Greskovich JF, Adelstein DJ, Koyfman SA. Oropharyngeal squamous cell carcinoma with known human papillomavirus status treated with definitive chemoradiotherapy: patterns of failure and toxicity outcomes. *Radiat Oncol* 2013;8:174.

Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C. Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol* 2008; 167(4):468–473.

Cai C, Chernock RD, Pittman ME, El-Mofty SK, Thorstad WL, Lewis JS Jr. Keratinizing-type squamous cell carcinoma of the oropharynx: p16 overexpression is associated with positive high-risk HPV status and improved survival. *Am J Surg Pathol* 2014;38(6):809-815.

Cao D, Begum S, Ali SZ, Westra WH. Expression of p16 in benign and malignant cystic squamous lesions of the neck. *Hum Pathol* 2010;41(4):535-539.

Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, Clavero O, Alòs L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimerà N, Lloveras B, León X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Iljazovic E, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Félix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, López-Revilla R, Mandys V, González ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, de Sanjosé S, Xavier Bosch F; ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(6):djv403.

- Cardesa A, Zidar N, Alos L. Adenosquamous carcinoma. In: Barnes EL, Eveson JW, Reichart P, Sideransky D, eds. Pathology and genetics of head and neck tumors. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: IARC Press;2005:130-131.
- Carle LN, Ko CC, Castle JT. Nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck Pathol* 2012;6(3):364–368.
- Carpenter D, El-Mofty SK, Lewis JS Jr. Undifferentiated carcinoma of the oropharynx: a human papillomavirus-associated tumor with favorable prognosis. *Mod Pathol* 2011;24(10):1306–1312.
- Cinberg JZ, Silver CE, Molnar JJ, Vogl SE. Cervical cysts: cancer until proven otherwise, *Laryngoscope* 1982;92(1):27–30.
- Conley BA. Treatment of advanced head and neck cancer: what lessons have we learned? *Journal of Clinical Oncology* 2006;24(7):1023-1025.
- Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 2008; 122(12):2811–2819.
- Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2009;21(3):194-200.
- Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2010;2:15.
- Demarosi F, Lodi G, Carrassi A, Soligo D, Sardella A. Oral malignancies following HSCT: graft versus host disease and other risk factors. *Oral Oncol* 2005;41(9):865-877.
- Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, Maeda H, Suzuki M. Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268(11):1625–1631.
- Diba Ch. S., ed. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2009. Bratislava, NCZI, 2015.
- Dogan S, Hedberg ML, Ferris RL, Rath TJ, Assaad AM, Chiosea SI. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a low-incidence population. *Head Neck* 2014;36(4):511–516.

- Doxtader EE, Katzenstein AL. The relationship between p16 expression and high-risk human papillomavirus infection in squamous cell carcinomas from sites other than uterine cervix: a study of 137 cases. *Hum Pathol* 2012;43(3):327-332.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356(19):1944–1956.
- Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita [2005], [cit. 2016-11-19] Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802-8861.
- Duvvuri U, Myers JN. Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Curr Probl Surg* 2009;46(2):114–117.
- El-Mofty SK, Patil S. Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101(3):339–345.
- El-Mofty SK, Zhang MQ, Davila RM. Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary carcinoma. *Head Neck Pathol* 2008;2(3):163-168.
- El-Mofty SK. Human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinomavariants. *Semin Diagn Pathol* 2015;32(1):23-31.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(4):261–269.
- Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, Soulieres D, Trotti A, Avizonis V, Ridge JA, Harris J, Le QT, Gillison M. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2014;32(30):3365-3373.
- Flanagan PM, Roland NJ, Jones AS. Cervical node metastases presenting with features of branchial cysts. *J Laryngol Otol* 1994;108(12):1068-1071.
- Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a

large United States prospective cohort study. *Int J Cancer* 2008;122(10):2330–2336.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P. Tobacco smoking and cancer: a metaanalysis. *Int J Cancer* 2008;122(1):155–164.

Garnaes E, Kiss K, Andersen L, Therkildsen MH, Franzmann MB, Filtenborg-Barnkob B, Hoegdall E, Krenk L, Josiassen M, Lajer CB, Specht L, Frederiksen K, Friis-Hansen L, Nielsen FC, Kjaer SK, Norrild B, von Buchwald C. A high and increasing HPV prevalence in tonsillar cancers in Eastern Denmark, 2000-2010: the largest registry-based study to date. *Int J Cancer* 2015;136(9):2196-2203.

Gaudet MM, Olshan AF, Chuang SC, Berthiller J, Zhang ZF, Lissowska J, Zaridze D, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Schwartz SM, Rudnai P, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Menezes A, Matos E, Bucur A, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Kelsey K, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wunsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, Benhamou S, Boffetta P, Brennan P, Hashibe M. Body mass index and risk of head and neck cancer in a pooled analysis of case-control studies in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium. *Int J Epidemiol* 2010;39(4):1091-1102.

Giannoudis A, Ergazaki M, Segas J, Giotakis J, Adamopoulos G, Gorgoulis V, Spandidos DA. Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in nasopharyngeal carcinoma by the polymerase chain reaction technique. *Cancer Lett* 1995;89(2):177–181.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-720.

Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(6):407-420.

Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, Spencer S, Harris J, Chung CH, Ang KK. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2012a;30(17):2102-2111.

- Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* 2012b;307(7):693-703.
- Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human Papillomavirus Positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2015;33(29):3235-3242.
- Goldenberg D, Begum S, Westra WH, Khan Z, Sciubba J, Pai SI, Califano JA, Tufano RP, Koch WM. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head Neck* 2008;30(7):898-903.
- Gourin GC, Johnson JT. Incidence of unsuspected metastases in lateral cervical cysts. *Laryngoscope* 2000;110(10 Pt 1):1637-1641.
- Granata R, Miceli R, Orlandi E, Perrone F, Cortelazzi B, Franceschini M, Locati LD, Bossi P, Bergamini C, Mirabile A, Mariani L, Olmi P, Scaramellini G, Potepan P, Quattrone P, Ang KK, Licitra L. Tumor stage, human papillomavirus and smoking status affect the survival of patients with oropharyngeal cancer: an Italian validation study. *Ann Oncol* 2012;23(7):1832-1837.
- Granström G, Edström S. The relationship between cervical cysts and tonsillar carcinoma in adults. *J Oral Maxillofac Surg* 1989;47(1):16-20.
- Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, Konge L, von Buchwald C. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer* 2014;110(6):1587-1594.
- Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Mates D, Daudt AW, Lissowska J, Dikshit R, Brennan P. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol* 2007;166(10):1159–1173.
- Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, Hopman AH, Ramaekers FC, Speel EJ. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122(12):2656-2664.
- Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human

papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2006;119(11):2620-2623.

Hartley CP, Steinmetz HB, Memoli VA, Tafe LJ. Small cell neuroendocrine carcinomas of the lung do not harbor high-risk human papillomavirus. *Hum Pathol* 2015;46(4):577-582.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(10):777-789.

Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, Schwartz SM, Purdue MP, Pilarska A, Eluf-Neto J, Menezes A, McClean MD, Matos E, Koifman S, Kelsey KT, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernández L, Daudt AW, Curado MP, Chen C, Castellsagué X, Ferro G, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: A pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol* 2010;39(1):166-181.

Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(23):1772-1783.

Hiraki A, Matsuo K, Suzuki T, Kawase T, Tajima K. Teeth loss and risk of cancer at 14 common sites in Japanese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(5):1222-1227.

Hørding U, Nielsen HW, Daugaard S, Albeck H. Human papillomavirus types 11 and 16 detected in nasopharyngeal carcinomas by the polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1994;104(1 Pt 1):99-102.

Huang CC, Hsiao JR, Yang MW, Wu YH, Hsu KF, Chang Y, Chen CW, Tsai ST, Wei HP, Jin YT. Human papilloma virus detection in neoplastic and non-

neoplastic nasopharyngeal tissues in Taiwan. *J Clin Pathol* 2011;64(7):571–577.

Huang H, Zhang B, Chen W, Zhou SM, Zhang YX, Gao L, Xu ZG, Qiao YL, Tang PZ. Human papillomavirus infection and prognostic predictors in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(3):891-896.

Huang SH, Xu W, Waldron J, Siu L, Shen X, Tong L, Ringash J, Bayley A, Kim J, Hope A, Cho J, Giuliani M, Hansen A, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Perez-Ordonez B, Weinreb I, Liu FF, O'Sullivan B. Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *J Clin Oncol* 2015;33(8):836-845.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(2):127-135.

Hutajulu SH, Kurnianda J, Tan IB, Middeldorp JM. Therapeutic implications of Epstein-Barr virus infection for the treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Ter Clin Risk Manag* 2014;10:721–736.

Chancellor JA, Ioannides SJ, Elwood JM. Oral and oropharyngeal cancer and the role of sexual behaviour: a systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol* 2016, In press.

Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol* 2012;6:Suppl 1:S16–24.

Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013;31(36):4550-4559.

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26(4):612–619.

Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4294-4301.

Chen MH, Chang PM, Li WY, Hsiao LT, Hong YC, Liu CY, Gau JP, Liu JH, Chen PM, Chiou TJ, Tzeng CH. High incidence of oral squamous cell carcinoma

independent of HPV infection after allogeneic hematopoietic SCT in Taiwan. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(4):567-572.

Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS Jr. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol* 2009;3(3):186-194.

Chernock RD, Lewis JS Jr, Zhang Q, El-Mofty SK. Human papillomavirus positive basaloid squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a distinct clinicopathologic and molecular subtype of basaloid squamous cell carcinoma. *Human Pathol* 2010;41(7):1016–1023.

Chernock RD, Wang X, Gao G, Lewis JS Jr, Zhang Q, Thorstad WL, El-Mofty SK. Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol* 2013;26(2):223–231.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004;85:1-334.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2007;90:1-636.

Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol* 2012; 6: Suppl 1: S104–120.

Iyer NG, Dogan S, Palmer F, Rahmati R, Nixon IJ, Lee N, Patel SG, Shah JP, Ganly I. Detailed Analysis of Clinicopathologic Factors Demonstrate Distinct Difference in Outcome and Prognostic Factors Between Surgically Treated HPV-Positive and Negative Oropharyngeal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22(13):4411-4421.

Jo VY, Mills SE, Stoler MH, Stelow EB. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: frequent association with human papillomavirus infection and invasive carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009;33(11):1720–1724.

Kašpírková J, Ondič O, Černá K, Skálová A. Možnosti průkazu biologicky relevantní papilomavirové infekce u maligních nádorů hlavy a krku v diagnostické patologii. *Cesk Patol* 2013;49(1):29-34.

Kawakita D, Sato F, Hosono S, Ito H, Oze I, Watanabe M, Hanai N, Hatooka S, Hasegawa Y, Shinoda M, Tajima K, Murakami S, Tanaka H, Matsuo K.

- Inverse association between yoghurt intake and upper aerodigestive tract cancer risk in a Japanese population. *Eur J Cancer Prev* 2012;21(5):453-459.
- Kelly JR, Husain ZA, Burtness B. Treatment de-intensification strategies for head and neck cancer. *Eur J Cancer* 2016;68:125-133.
- Khan Z, Tönnies J, Müller S. Smokeless tobacco and oral cancer in South Asia: a systematic review with meta-analysis. *J Cancer Epidemiol* 2014;2014:394696.
- Klozar J, Koslabova E, Kratochvil V, Salakova M, Tachezy R. Nodal status is not a prognostic factor in patients with HPV-positive oral/oropharyngeal tumors. *J Surg Oncol* 2013;107(6):625-633.
- Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, Betka J, Tachezy R. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265 Suppl 1:S75-82.
- Kraft S, Faquin WC, Krane JF. HPV-associated neuroendocrine carcinoma of the oropharynx: a rare new entity with potentially aggressive clinical behavior. *Am J Surg Pathol* 2012;36(3):321–330.
- Kruse AL, Grätz KW. Oral carcinoma after hematopoietic stem cell transplantation--a new classification based on a literature review over 30 years. *Head Neck Oncol* 2009;1:29.
- Laco J, Nekvindova J, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, Vosmikova H, Vosmik M, Neskudlova T, Cermakova E, Hacova M, Sobande FA, Ryska A. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma* 2012;59(4):398-408.
- Laco J, Vosmikova H, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, Nekvindova J, Vosmik M, Cermakova E, Ryska A. The role of high-risk human papillomavirus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients: a clinicopathological and molecular study of 46 cases. *Virchows Arch* 2011;458(2):179-187.
- Laco J, Sieglová K, Vošmiková H, Dundr P, Němejcová K, Michálek J, Čelakovský P, Chrobok V, Mottl R, Mottlová A, Tuček L, Slezák R, Chmelařová M, Sirák I, Vošmik M, Ryška A. The presence of high-risk human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA transcripts in a subset of sinonasal carcinomas is evidence of involvement of HPV in its etiopathogenesis. *Virchows Arch* 2015;467(4):405-415.

- Laantri N, Attaleb M, Kandil M, Naji F, Mouttaki T, Dardari R, Belghmi K, Benchakroun N, El Mzibri M, Khyatti M. Human papillomavirus detection in moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2011;6(1):3.
- Larque AB, Hakim S, Ordi J, Nadal A, Diaz A, del Pino M, Marimon L, Alobid I, Cardesa A, Alos L. High-risk human papillomavirus is transcriptionally active in a subset of sinonasal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* 2014;27(3):343–351.
- La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33(5):302–312.
- Layfield LJ. Fine-needle aspiration in the diagnosis of head and neck lesions: a review and discussion of problems in differential diagnosis. *Diagn Cytopathol* 2007;35(12):798-805.
- Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, Lazarus P, Matos E, Hayes RB, Winn DM, Zaridze D, Wünsch-Filho V, Eluf-Neto J, Koifman S, Mates D, Curado MP, Menezes A, Fernandez L, Daudt AW, Szeszenia-Dabrowska N, Fabianova E, Rudnai P, Ferro G, Berthiller J, Brennan P, Hashibe M. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(8):1974–1981.
- Lee PN. Epidemiological evidence relating snus to health--an updated review based on recent publications. *Harm Reduct J* 2013;10:36.
- Lee AW, Ma BB, Ng WT, Chan AT. Management of Nasopharyngeal Carcinoma: Current Practice and Future Perspective. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3356-3364.
- Leoncini E, Nedovic D, Panic N, Pastorino R, Edefonti V, Boccia S. Carotenoid Intake from Natural Sources and Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24(7):1003-1011.
- Lewis JS Jr, Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(8): 1088-1096.
- Lewis JS Jr, Ukpo OC, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Thorstad WL, Chernock RD. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity

and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas--a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology* 2012a;60(6):982–991.

- Lewis JS Jr, Scantlebury JB, Luo J, Thorstad WL. Tumor cell anaplasia and multinucleation are predictors of disease recurrence in oropharyngeal squamous cell carcinoma, including among just the human papillomavirus-related cancers. *Am J Surg Pathol* 2012b;36(7):1036–1046.
- Lewis JS Jr. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 2012c; 6 Suppl 1:S75-S82.
- Lewis JS Jr, Chernock RD. Human papillomavirus and Epstein Barr virus in head and neck carcinomas: suggestions for the new WHO classification. *Head Neck Pathol* 2014a;8(1):50-58.
- Lewis JS Jr, Ali S, Luo J, Thorstad WL, Madabhushi A. A quantitative histomorphometric classifier (QuHbIC) identifies aggressive versus indolent p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2014b;38(1):128-137.
- Li J, Chen QY, He J, Li ZL, Tang XF, Chen SP, Xie CM, Li YQ, Huang LX, Ye SB, Ke M, Tang LQ, Liu H, Zhang L, Guo SS, Xia JC, Zhang XS, Zheng LM, Guo X, Qian CN, Mai HQ, Zeng YX. Phase I trial of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy following concurrent chemoradiotherapy in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Oncoimmunology* 2015; 4(2):e976507.
- Li S, Meng L, Chioloro A, Ma C, Xi B. Trends in smoking prevalence and attributable mortality in China, 1991-2011. *Prev Med* 2016;93:82-87.
- Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S. Highrisk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5630-5636.
- Lin BM, Wang H, D'Souza G, Zhang Z, Fakhry C, Joseph AW, Drake VE, Sanguineti G, Westra WH, Pai SI. Long-term prognosis and risk factors among patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013;119(19):3462-3471.
- Lin Z, Khong B, Kwok S, Cao H, West RB, Le QT, Kong CS. Human papillomavirus 16 detected in nasopharyngeal carcinomas in white

Americans but not in endemic southern Chinese patients. *Head Neck* 2014;36(5):709–714.

Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92(4):805-813.

Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Gillison ML. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2013;49(1):1–8.

Liu FF, Frappier L, Kim J, O'Sullivan B, Hui A, Bastianutto C. East-West Symposium on nasopharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67(3):703–708.

Ljøkjel B, Haave H, Lybak S, Aarstad HH, Karlsdóttir A, Vintermyr OK, Aarstad HJ. Ljøkjel B, Haave H, Lybak S, Aarstad HH, Karlsdóttir A, Vintermyr OK, Aarstad HJ. The impact of HPV infection, smoking history, age and operability of the patient on disease-specific survival in a geographically defined cohort of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2014;134(9):964-973.

Lo EJ, Bell D, Woo J, Li G, Hanna EY, El-Naggar AK, Sturgis EM. Human papillomavirus and WHO type I nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2010;120(10): 1990–1997.

Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, Cullen K, Sarlis N, Tishler R, Tan M, Fasciano J, Sammartino DE, Posner MR; TAX 324 Study Group. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011;12(2):153-159.

Louis CU, Straathof K, Bollard CM, Ennamuri S, Gerken C, Lopez TT, Huls MH, Sheehan A, Wu MF, Liu H, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE, Gottschalk S. Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma. *J Immunother* 2010;33(9):983–990.

Maasland DH, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RA, Schouten LJ. Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head-neck cancer in the Netherlands Cohort Study. *Int J Cancer* 2015;136(5):E396-409.

- Mackenzie P, Pryor D, Burmeister E, Foote M, Panizza B, Burmeister B, Porceddu S. T-category remains an important prognostic factor for oropharyngeal carcinoma in the era of human papillomavirus. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2014;26(10):643-647.
- Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Schwartz SM, Rudnai P, Purdue MP, Olshan AF, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Menezes A, McClean M, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Kelsey K, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Cadoni G, Chen C, Castellsague X, Boccia S, Benhamou S, Ferro G, Berthiller J, Brennan P, Møller H, Hashibe M. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol* 2010;39(1):182-196.
- Masand RP, El-Mofty SK, Ma XJ, Luo Y, Flanagan JJ, Lewis JS Jr. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: relationship to human papillomavirus and review of literature. *Head Neck Pathol* 2011;5(2):108–116.
- Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden FP, Lee JS, Eisbruch A, Wolf GT, Prince ME, Moyer JS, Teknos TN, Chepeha DB, McHugh JB, Urba SG, Stoerker J, Walline HM, Kurnit DM, Cordell KG, Davis SJ, Ward PD, Bradford CR, Carey TE. Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. *Clin Cancer Res* 2010a;16(4):1226-1235.
- Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, McHugh JB, Cordell KG, Eisbruch A, Worden FP, Wolf GT, Prince ME, Moyer JS, Teknos TN, Chepeha DB, Stoerker J, Walline H, Carey TE, Bradford CR. HPV-positive/p16-positive/EBV-negative nasopharyngeal carcinoma in white North Americans. *Head Neck* 2010b;32(5):562–567.
- Mbulawa ZZ, Johnson LF, Marais DJ, Coetzee D, Williamson AL. Risk factors for oral human papillomavirus in heterosexual couples in an African setting. *J Infect* 2014;68(2):185-189.
- McDowell LJ, Young RJ, Johnston ML, Tan TJ, Kleid S, Liu CS, Bressel M, Estall V, Rischin D, Solomon B, Corry J. p16-positive lymph node metastases from cutaneous head and neck squamous cell carcinoma: No association with high-risk human papillomavirus or prognosis and implications for the workup of the unknown primary. *Cancer* 2016;122(8):1201-1208.

- Mehrad M, Carpenter DH, Chernock RD, Wang H, Ma XJ, Luo Y, Luo J, Lewis JS Jr, El-Mofty SK. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: clinicopathologic and molecular features with special reference to human papillomavirus. *Am J Surg Pathol* 2013;37(9):1349–1356.
- Mehrad M, Zhao H, Gao G, Wang X, Lewis JS Jr. Transcriptionally-active human papillomavirus is consistently retained in the distant metastases of primary oropharyngeal carcinomas. *Head Neck Pathol* 2014;8(2):157-163.
- Melkane AE, Auperin A, Saulnier sP, Lacroix L, Vielh P, Casiraghi O, Msakni I, Drusch F, Temam S. Human papillomavirus prevalence and prognostic implication in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2014;36(2):257-265.
- Meyer MS, Joshipura K, Giovannucci E, Michaud DS. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control* 2008;19(9):895-907.
- Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Biochem J* 2012;443(2):339-353.
- Mirzamani N, Salehian P, Farhadi M, Tehran EA. Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization. *Exp Mol Pathol* 2006;81(3):231–234.
- Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Hatakeyama H, Suzuki S, Homma A, Oridate N, Fukuda S. Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2013;18(5):824-828.
- Morani AC, Eisbruch A, Carey TE, Hauff SJ, Walline HM, Mukherji SK. Intranodal cystic changes: a potential radiologic signature/biomarker to assess the human papillomavirus status of cases with oropharyngeal malignancies. *J Comput Assist Tomogr* 2013;37(3):343-345.
- Nakano T, Yamamoto H, Nakashima T, Nishijima T, Satoh M, Hatanaka Y, Shiratsuchi H, Yasumatsu R, Toh S, Komune S, Oda Y. Molecular subclassification determined by human papillomavirus and epidermal growth factor receptor status is associated with the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2016;50(4):51-61.
- Národní zdravotnický informační systém – Registry: NZIS Report č. R/1 (09/2016), <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>

- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparén P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009;125(2):362-366.
- Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, Wollum A, Sanman E, Wulf S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA* 2014;311(2):183-192.
- Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK, Weber RS, Rosenthal DI, Soulieres D, Kim H, Silverman C, Raben A, Galloway TJ, Fortin A, Gore E, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Gillison ML, List M, Le QT. Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *J Clin Oncol* 2014;32(34):3858-3866.
- O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Kim J, Ringash J, Bayley A, Dawson LA, Hope A, Cho J, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Hui A, Liu FF, Chen E, Xu W. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol* 2013;31(5):543-550.
- O'Sullivan B, Lydiatt WM, Haughey BH, Brandwein-Gensler M, Glastonbury CM, Shah JP. HPV-mediated (p16+) oropharyngeal cancer. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershengwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR eds. *AJCC Cancer Staging Manual* (8th ed). Springer; 2017:113-121.
- Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U, Jenab M, Freisling H, Bueno-de-Mesquita B, O'Doherty MG, Scott A, Kee F, Stricker BH, Hofman A, de Keyser CE, Ruiter R, Söderberg S, Jousilahti P, Kuulasmaa K, Freedman ND, Wilsgaard T, de Groot LC, Kampman E, Håkansson N, Orsini N, Wolk A, Nilsson LM, Tjønneland A, Pajak A, Malyutina S, Kubínová R, Tamosiunas A, Bobak M, Katsoulis M, Orfanos P, Boffetta P, Trichopoulou A, Brenner H; Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES). Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of

individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med* 2016;14:62.

- Park JM, Jung CK, Choi YJ, Lee KY, Kang JH, Kim MS, Hu HJ. The use of an immunohistochemical diagnostic panel to determine the primary site of cervical lymph node metastases of occult squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2010;41(3):431-437.
- Park GC, Lee M, Roh JL, Yu MS, Choi SH, Nam SY, Kim SY, Cho KJ. Human papillomavirus and p16 detection in cervical lymph node metastases from an unknown primary tumor. *Oral Oncol* 2012;48(12):1250-1256.
- Patel S, Shah JP. Pharynx. In: Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CA, eds. *AJCC Cancer Staging Manual* (7th ed). New York: Springer; 2009:41-56.
- Perez-Ordoñez B. An update on Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2007;1(2):141-145.
- Peters ES, Lockett BG, Applebaum KM, et al. Dairy products, leanness, and head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008;30:1193–1205.
- Peterrsson F. Nasopharyngeal carcinoma: a review. *Semin Diagn Pathol* 2015;32(1):54-73.
- Punwaney R, Brandwein MS, Zhang DY, Urken ML, Cheng R, Park CS, Li HB, Li X. Human papillomavirus may be common within nasopharyngeal carcinoma of Caucasian Americans: investigation of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in eastern and western nasopharyngeal carcinoma using ligation-dependent polymerase chain reaction. *Head Neck* 1999;21(1):21–29.
- Quint KD, Genders RE, de Koning MN, Borgogna C, Gariglio M, Bouwes Bavinck JN, et al. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *J Pathol* 2015;235(2):342–354.
- Petridou E, Zavras AI, Lefatzis D, Dessypris N, Laskaris G, Dokianakis G, Segas J, Douglas CW, Diehl SR, Trichopoulos D. The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma. *Cancer* 2002;94(11):2981–2988.
- Pietarinen-Runtti P, Apajalahti S, Robinson S, Passador-Santos F, Leivo I, Mäkitie AA. Cystic neck lesions: clinical, radiological and differential diagnostic considerations. *Acta Otolaryngol* 2010;130(2):300-304.
- Radkay-Gonzalez L, Faquin W, McHugh JB, Lewis JS Jr, Tuluc M, Seethala RR. Ciliated adenosquamous carcinoma: expanding the phenotypic diversity of

human papillomavirus-associated tumors. *Head Neck Pathol* 2016;10(2):167-175.

- Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007;121(8):1813-1820.
- Rassekh CH, Rady PL, Arany I, Tyring SK, Knudsen S, Calhoun KH, Seikaly H, Bailey BJ. Combined Epstein-Barr virus and human papillomavirus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 1998;108(3):362–367.
- Regauer S, Mannweiler S, Anderhuber W, Gotschuli A, Berghold A, Schachenreiter J, Jakse R, Beham A. Cystic lymph node metastases of squamous cell carcinoma of Waldeyer's ring origin. *Br J Cancer* 1999;79(9-10):1437-1442.
- Ribassin-Majed L, Marguet S, Lee AW, Ng WT, Ma J, Chan AT, Huang PY, Zhu G, Chua DT, Chen Y, Mai HQ, Kwong DL, Cheah SL, Moon J, Tung Y, Chi KH, Fountzilas G, Bourhis J, Pignon JP, Blanchard P. What Is the Best Treatment of Locally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma? An Individual Patient Data Network Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 2016, In press.
- Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Daudt A, Menezes A, Bencko V, Mates D, Fernandez L, Fabianova E, Gheit T, Tommasino M, Boffetta P, Brennan P, Waterboer T. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol* 2011;40(2):489–502.
- Rietbergen MM, Leemans CR, Bloemena E, Heideman DA, Braakhuis BJ, Hesselink AT, Witte BI, Baatenburg de Jong RJ, Meijer CJ, Snijders PJ, Brakenhoff RH. Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer* 2013;132(7):1565-1571.
- Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, Solomon B, Choi J, O'Sullivan B, Kenny LM, McArthur GA. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28(27):4142-4148.
- Robinson M, Suh YE, Paleri V, Devlin D, Ayaz B, Pertl L, Thavaraj S. Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population. *Infect Agent Cancer* 2013;8(1):30.

- Rodrigo JP, Heideman DA, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, Snijders PJ, Hermsen MA. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer* 2014;134(2):487-492.
- Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* 2004;40(2):207-213.
- Rosenthal DI, Harari PM, Giralt J, Bell D, Raben D, Liu J, Schulten J, Ang KK, Bonner JA. Association of Human Papillomavirus and p16 Status With Outcomes in the IMCL-9815 Phase III Registration Trial for Patients With Locoregionally Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Radiotherapy With or Without Cetuximab. *J Clin Oncol* 2016;34(12):1300-1308.
- Salazar CR, Smith RV, Garg MK, Haigentz M Jr, Schiff BA, Kawachi N, Anayannis N, Belbin TJ, Prystowsky MB, Burk RD, Schlecht NF. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment. *Head Neck Pathol* 2014;8(1):77-87.
- Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit RP, Brennan P, Hashibe M, Boffetta P. Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Cancer* 2007;121(8):1793–1798.
- Sapkota A, Hsu CC, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabiánová E, Rudnai P, Janout V, Holcatova I, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M. Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. *Cancer Causes Control* 2008;19(10):1161-1170.
- Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, Levine M, Zinreich E, Messing BP, Gold D, Wu AA, Niparko KJ, Kowalski J, Hirata RM, Saunders JR, Westra WH, Pai SI. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 2009;119(8):1542-1549.
- Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, Strome SE, Haddad RI, Patel SS, Cambell EV 3rd, Sarlis N, Lorch J, Cullen KJ. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2(9):776-781.

- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(21):1626–1636.
- Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010a;116(9):2166-2173.
- Singhi AD, Stelow EB, Mills SE, Westra WH. Lymphoepitheliallike carcinoma of the oropharynx: a morphologic variant of HPV related head and neck carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010b;34(6):800–805.
- Singhi AD, Califano J, Westra WH. High-risk human papillomavirus in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2012;34(2):213–218.
- Skálová A, Kašpírková J, Andrlé P, Hostička L, Vaneček T. Human papillomaviruses are not involved in the etiopathogenesis of salivary gland tumors. *Cesk Patol* 2013;49(2):72-75.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(6):449–455.
- Stenmark MH, McHugh JB, Schipper M, Walline HM, Komarck C, Feng FY, Worden FP, Wolf GT, Chepeha DB, Prince ME, Bradford CR, Mukherji SK, Eisbruch A, Carey TE. Nonendemic HPV-positive nasopharyngeal carcinoma: association with poor prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014;88(3):580–588.
- Strojan P, Ferlito A, Medina JE, Woolgar JA, Rinaldo A, Robbins KT, Fagan JJ, Mendenhall WM, Paleri V, Silver CE, Olsen KD, Corry J, Suárez C, Rodrigo JP, Langendijk JA, Devaney KO, Kowalski LP, Hartl DM, Haigentz M Jr, Werner JA, Pellitteri PK, de Bree R, Wolf GT, Takes RP, Genden EM, Hinni ML, Mondin V, Shaha AR, Barnes L. Contemporary management of lymph node metastases from an unknown primary to the neck: I. A review of diagnostic approaches, *Head Neck* 2013;35(1):123-132.
- Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007;110(7):1429-1435.
- Suzuki T, Wakai K, Matsuo K, Hirose K, Ito H, Kuriki K, Sato S, Ueda R, Hasegawa Y, Tajima K. Effect of dietary antioxidants and risk of oral,

pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits. *Cancer Sci* 2006;97(8):760-767.

Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg* 1983;21(2):147–153.

Švajdler M Jr, Mezencev R, Kašpírková J, Kacerovská D, Kazakov DV, Ondič O, Michal M. Human papillomavirus infection and p16 expression in the immunocompetent patients with extragenital/extraungual Bowen's disease. *Diagn Pathol* 2016a;11(1):53.

Švajdler M Jr, Mezencev R, Kašpírková J, Kacerovská D, Kazakov DV, Ondič O, Michal M. Human Papillomavirus Infection and p16 Expression in Extragenital/Extraungual Bowen Disease in Immunocompromised Patients. *Am J Dermatopathol* 2016b;38(10):751-757.

Thavaraj S. Human papillomavirus-associated neoplasms of the sinonasal tract and nasopharynx. *Semin Diagn Pathol* 2016;33(2):104-111.

Thompson LD, Heffner DK. The clinical importance of cystic squamous cell carcinomas in the neck: a study of 136 cases. *Cancer* 1998;82(5):944-956.

Thompson LD. Update on nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck Pathol* 2007;1(1):81–86.

Tinhofer I, Jöhrens K, Keilholz U, Kaufmann A, Lehmann A, Weichert W, Stenzinger A, Stromberger C, Klinghammer K, Becker ET, Dommerich S, Stölzel K, Hofmann VM, Hildebrandt B, Moser L, Ervens J, Böttcher A, Albers A, Stabenow R, Reinecke A, Budach V, Hoffmeister B, Raguse JD. Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence. *Eur J Cancer* 2015;51(4):514-521.

Tran N, Rose BR, O'Brien CJ. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck* 2007;29(1):64-70.

Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2015;235(2):323-333.

Tsang J, Lee VH, Kwong DL. Novel therapy for nasopharyngeal carcinoma – Where are we. *Oral Oncol* 2014;50(9):798–801.

Tung YC, Lin KH, Chu PY, Hsu CC, Kuo WR. Detection of human papilloma virus and Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma by polymerase chain reaction. *Kaohsiung J Med Sci* 1999;15(5):256–262.

- Tyan YS, Liu ST, Ong WR, Chen ML, Shu CH, Chang YS. Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. *J Clin Microbiol* 1993;31(1):53–56.
- Ukpo OC, Pritchett CV, Lewis JE, Weaver AL, Smith DI, Moore EJ. Human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinomas: primary tumor burden and survival in surgical patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118(5):368-373.
- Verma K, Mandal S, Kapila K. Cystic change in lymph nodes with metastatic squamous cell carcinoma. *Acta Cytol* 1995;39(3):478-80.
- Vogt SL, Gravitt PE, Martinson NA, Hoffmann J, D'Souza G. Concordant oral-genital HPV infection in South Africa couples: Evidence for transmission. *Front Oncol* 2013;3:303.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardisation of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17(12):2257-2317.
- Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol* 2012; 6 Suppl 1:S63-74.
- Vermorken JB, Psyrri A, Mesía R, Peyrade F, Beier F, de Blas B, Celik I, Licitra L. Impact of tumor HPV status on outcome in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck receiving chemotherapy with or without cetuximab: retrospective analysis of the phase III EXTREME trial. *Ann Oncol* 2014;25(4):801-807.
- Wadsworth B, Bumpous JM, Martin AW, Nowacki MR, Jenson AB, Farghaly H. Expression of p16 in sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC) without associated human papillomavirus (HPV). *Head Neck Pathol* 2011;5(4):349-354.
- Wang J, Aldabagh B, Yu J, Arron ST. Role of human papillomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2014;70:621–629.
- Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, Webb A, Hampton C, Patel NN, Randall CJ, Cox HJ, Jogai S, Primrose J, Piper K,

- Ottensmeier CH, King EV, Thomas GJ. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2014;110(2):489-500.
- Ward MJ, Mellows T, Harris S, Webb A, Patel NN, Cox HJ, Piper K, Ottensmeier CH, Thomas GJ, King EV. Staging and treatment of oropharyngeal cancer in the human papillomavirus era. *Head Neck* 2015;37(7):1002-1013.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):309-316.
- Watson RF, Chernock RD, Wang X, Liu W, Ma XJ, Luo Y, Wang H, El-Mofty SK, Lewis JS Jr. Spindle cell carcinomas of the head and neck rarely harbor transcriptionally-active human papillomavirus. *Head Neck Pathol* 2013;7(3):250–257.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, Niesters HG, Lawitschka A, Lion T. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5189-5198.
- Weiss D, Koopmann M, Raudack C. Prevalence and impact on clinicopathological characteristics of human papillomavirus-16 DNA in cervical lymph node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011;33(6):856-862.
- Westra WH. The pathology of HPV-related head and neck cancer: implications for the diagnostic pathologist. *Semin Diagn Pathol* 2015;32(1):42-53.
- Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998;152(1):145-156.
- Worsham MJ, Stephen JK, Chen KM, Mahan M, Schweitzer V, Havard S, Divine G. Improved survival with HPV among African Americans with oropharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(9):2486-2492.
- Wyss AB, Hashibe M, Lee YA, Chuang SC, Muscat J, Chen C, Schwartz SM, Smith E, Zhang ZF, Morgenstern H, Wei Q, Li G, Kelsey KT, McClean M, Winn DM, Schantz S, Yu GP, Gillison ML, Zevallos JP, Boffetta P, Olshan AF. Smokeless Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis of US Studies in the INHANCE Consortium. *Am J Epidemiol* 2016, In press.

- Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Shangina O, Schwartz SM, Schantz S, Rudnai P, Purdue MP, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Michaluart P Jr, Menezes A, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, de Carvalho MB, Cadoni G, Boccia S, Brennan P, Boffetta P, Olshan AF. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol* 2013;178(5):679-690.
- Yang CH, Huang CC, Ko MT, Wei YC, Hwang CF. Human papillomavirus infection and papillary squamous cell carcinoma in the head and neck region. *Tumour Biol* 2013;34(1):301-307.
- Yasui T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, Todo T, Inohara H. Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. *PLoS One* 2014;9(4):e95364.
- Yokota A, Ozawa S, Masanori T, Akiyama H, Ohshima K, Kanda Y, Takahashi S, Mori T, Nakaseko C, Onoda M, Kishi K, Doki N, Aotsuka N, Kanamori H, Maruta A, Sakamaki H, Okamoto S; Kanto Study Group for Cell Therapy (KSGCT). Secondary solid tumors after allogeneic hematopoietic SCT in Japan. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(1):95-100.
- Yuan J, Knorr J, Altmannsberger M, Goeckenjan G, Ahr A, Scharl A, Strebhardt K. Expression of p16 and lack of pRB in primary small cell lung cancer. *J Pathol* 1999;189(3):358-362.
- Zhang GZ, Liu ZL, Gong JS, Cheng ZQ, Ke C. Cystic metastatic nasopharyngeal carcinoma presenting as branchial cleft cyst: report of two cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(11):2366-2374.

Prehľad publikačnej činnosti

Monografie a kapitoly v monografiách

1. Nagy V (ed), Švajdler M, Dubinský P. Choroby penisu. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, lekárska fakulta, Košice 2012, 252 s.
2. Dubinský P, Švajdler M. Glioblastóm s PNET-like zložkou – kazuistika. In: Šlampa P. ed., Gliomy. Současná diagnostika a léčba. Maxdorf Jesenius 2013, 191 s.

Pôvodné články

1. **Švajdler M**, Bohuš P, Baumöhlová H, Sokol L, Bielek J. Epiteloidný hemangióm nohy. *Cesk Patol* 2006;42(2):86-90.
2. **Švajdler M**, Lazúrová I, Bohuš P, Pal'ko M. Intravascular variant of diffuse large B-cell lymphoma with combined endocrine involvement. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118(13-14):422-425. **IF=0,76 (2006)**
3. **Švajdler M**, Bohuš P, Goč V, Tkáčová V. Perivascular Epithelioid Cell Tumor (PEComa) pečene: popis prípadu a prehľad literatúry. *Cesk Patol* 2007;43(1):18-22.
4. **Švajdler M**, Bohuš P, Závacký P, Vol'anská M, Repovský A, Juskaničová E. Paraganglioma of the mesenterium: a case report. *Cesk Patol* 2007;43(4):153-156.
5. Kinčeková J, Hrčková G, Szabadošová V, Hudačková J, Stanislavová M, Straka L, Švajdler M, Bohuš P, Zachar M. Využitie PCR analýzy pre diagnostiku pacientov s alveolárnou echinokokózou pečene. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2007;61(6):304-308.
6. Scholzeová D, Záh J, Vrzgula A, Bohuš P, Švajdler M, Baumöhlová H, Havrilla A. Schwannóm žalúdka. *Gastroenterol prax* 2007;6(3):107-110.
7. **Švajdler M**, Bohuš P. Autoimunitná gastritída a karcinoid žalúdka. Patogenéza, diagnostika a manažment. *Gastroenterol prax* 2007;6(3):103-106.
8. **Švajdler M**, Bohuš P. Nealkoholová tuková choroba pečene: Je potrebná biopsia? *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2008; 62(3):181.
9. **Švajdler M**, Bohuš P, Rychlý B, Šulla I, Moram M. Postradiačná dediferenciácia meningeómu do chondroblastického osteosarkómu. *Cesk Patol* 2009;45(1):20-23.

10. Beňa L, Švajdler M. Retransplantácia obličky pre stratu štepu pre BKV nefropatiu. *Orgánové transplantácie: multidisciplinárny časopis pre transplantačnú problematiku* 2009;5(3-4):3-15.
11. Rychlý B, Švajdler M. Histopatologická diagnostika hepatocelulárneho karcinómu. *Trendy hepatol* 2010;2(4):14-19.
12. **Švajdler M**, Bohuš P, Rychlý B. Histopatologická diagnóza a diferenciálna diagnóza céliakie: Prehľad pre gastroenterológov. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2010;64(3):24–30.
13. Lazúrová I, Angelovičová J, Petříková J, Čalfová A, Oetterová M, Švajdler M. A case of polymyositis and vasculitis induced by ovulation induction therapy with gonadotropin-releasing hormone. *Clin Rheumatol* 2010;29(11):1327-1330. **IF=1,85 (2010)**
14. Lachvac L, Svajdler M, Valansky L, Nagy V, Benicky M, Frohlichova L, Nyitrayova O. Juxtaglomerular cell tumor, causing fetal demise. *Int Urol Nephrol* 2011;43(2):365-370. **IF=1,71 (2011)**
15. Rychlý B, Švajdler M, Šteňo A. Zmeny v najnovšej klasifikácii nádorov centrálného nervového systému podľa svetovej zdravotníckej organizácie a ich dopad na súčasnú diagnostickú prax. *Onkológia* 2010;5 (3):116–119.
16. Rychlý B, Szép Z, Švajdler M. Kontroverzie dysplastického névu. *Ces-slov Derm* 2010;85(5):290-293.
17. Toporcer T, Stančáková M, Švajdler M, Lakyová L, Radoňák J. Cievna malformácia v tenkom čreve ako netypický zdroj krvácania z dolnej časti tráviaceho traktu--kazuistika. *Rozhl Chir* 2010;89(6):370-374.
18. Gombošová L, Zakuciová M, Veseliny E, Drahovská I, Švajdler M, Bober J, Oetterová M. Nesteroidovými antireumatikami indukovaná kolopatia imitujúca Crohnovu chorobu. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2010;64(6):15–20 .
19. **Švajdler M**, Rychlý B, Benický M. Cílená liečba melanómu: fakt alebo fikcia? *Cesk Patol* 2011;47(4):165-167.
20. Gombošová L, Zakuciová M, Veseliny E, Radoňák J, Švajdler M, Sauka C. Špecifiká reaktivácie tuberkulózy počas anti-TNF α liečby – literárny prehľad a kazuistika. *Biologická liečba* 2011;4(3):87-91.
21. Gombošová L, Zakuciová M, Veseliny E, Drahovská I, Švajdler M, Bober J, Oetterová M. Nsaid indukované poškodenie sliznice dolného tráviaceho traktu. *Rheumatologia* 2011;25(2):91-97.

22. Dražilová S, Kinčeková J, Beňa Ľ, Zachar M, Švajdler M, Zavacký P, Jarčuška P. Alveolar echinococcosis in patient after cadaveric kidney transplantation. *Helminthologia* 2011;48(4):229–236. **IF=0,773 (2011)**
23. Švajdler M, Bielek J, Benický M. Jaká je Vaše diagnóza? Intraoseálny glomus tumor. *Cesk Patol* 2012;48(1):35,39.
24. Švajdler M, Andrašina I, Ilenčíková D, Rychlý B, Piačková B. Recurring multifocal leiomyosarcoma of the urinary bladder 22 years after therapy for bilateral (hereditary) retinoblastoma: a case report and review of the literature. *Cesk Patol* 2012;48(1):44-48.
25. Švajdler M, Rychlý B, Grossmann P, Steňo A, Pataky F. Vybrané biomarkery primárných nádorov centrálného nervového systému: krátky prehľad. *Cesk Patol* 2012;48(2):65-71.
26. Švajdler M, Rychlý B, Gajdoš M, Pataky F, Fröhlichová L, Perry A. Gliosarcoma with alveolar rhabdomyosarcoma-like component: Report of a case with a hitherto undescribed sarcomatous component. *Cesk Patol* 2012;48(4):210–214.
27. Dražilová S, Kinčeková J, Beňa Ľ, Zachar M, Švajdler M, Königová A, Janičko M, Jarčuška P. Regression of alveolar echinococcosis after chronic viral hepatitis C treatment with pegylated interferon alpha 2a. *Helminthologia* 2012;49(3):134-138. **IF=0,783 (2012)**
28. Švajdler M, Fröhlichová L, Benický M, Torday T. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma expressing membranous D2-40 immunopositivity and mimicking seminoma: potential diagnostic pitfall. *J Hematopathol* 2012;(5):165–166.
29. Borošová J, Gombošová L, Horáková M, Kaťuchová J, Švajdler M, Pedowski P, Zakuciová M. Hemoragický šok – pravdepodobne prvá manifestácia GIST. *Gastroenterol prax* 2012;11(3):154-157.
30. Švajdler M, Fröhlichová L. Možnosti a limitácie patologickej diagnostiky metastáz z neznámeho origa – krátky prehľad pre onkológov. *Onkologia (Bratisl.)* 2012;(S2):49–52.
31. Kuroda N, Maris S, Monzon FA, Tan PH, Thomas A, Petersson FB, Gatalica Z, Ghazalpour A, Bender RP, Grossmann P, Michal M, Svajdler M, Ovcak Z, Hora M, Hes O. Juxtaglomerular cell tumor: a morphological, immunohistochemical and genetic study of six cases. *Hum Pathol* 2013;44(1):47-54. **IF=2,806 (2013)**
32. Balik V, Kolembus P, Svajdler M, Sulla I, Vaverka M, Hrabalek L. A case report of rapid spontaneous redistribution of acute supratentorial

- subdural hematoma to the entire spinal subdural space presenting as a Pourfour du Petit Syndrome and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(7):849-852. **IF=1,35 (2013)**
33. Laco J, Švajdler M Jr, Andrejs J, Hrubala D, Hácová M, Vaněček T, Skálová A, Ryška A. Mammary analog secretory carcinoma of salivary glands: A report of 2 cases with expression of basal/myoepithelial markers (calponin, CD10 and p63 protein). *Pathol Res Pract* 2013; 209(3):167-172. **IF=1,562 (2013)**
34. Švajdler M, Deák L, Rychlý B, Talarčík P, Fröhlichová L. Subependymal giant cell astrocytoma with atypical clinical and pathological features: a diagnostic pitfall. *Cesk Patol* 2013;49(2):76–79.
35. Farkaš D., Švajdler M. ml., Farkašová Iannaccone S., Labaj P. Nediagnostikovaná Whippleova choroba s letálnym koncom. *Cesk Patol* 2013;49(2):95–98.
36. Felsoci M, Lazurova I, Wagnerova H, Svajdler M. Analysis of pheochromocytomas / paragangliomas from Eastern Slovakia. *Neoplasma* 2013;60(4):452-458. **IF=2,09 (2013)**
37. Katuchova J, Baumohlova H, Harbulak P, Stofcikova M, Svajdler M, Repovsky A, Radonak J. Intrapancreatic accessory spleen. A case report and review of literature. *JOP* 2013;14(3):261-3. **IF=1,38 (2013)**
38. Nagy V, Bober J, Zavacky P, Brandebur O Jr, Svajdler M. The recurrent primary retroperitoneal liposarcoma. *Bratisl Lek Listy* 2013;114(11):662-7. **IF=0,74 (2013)**
39. Senajová G, Zakuciová M, Gombošová L, Švajdler M, Frigová L, Hlebašková M. Lymfadenopatia so závažným hmotnostným úbytkom. *Gastroenterol prax* 2013;12(4):188-189.
40. Hes O, de Souza TG, Pivovarcikova K, Grossmann P, Martinek P, Kuroda N, Kacerovska D, Svajdler M, Straka L, Petersson F, Hora M, Michal M. Distinctive renal cell tumor simulating atrophic kidney with two types of microcalcifications. *Ann Diagn Pathol* 2014;18(2):82–88. **IF=1,117 (2014)**
41. Rychlý B, Šteňo A, Švajdler M, Daniš D. Vzťah medzi genetikou a histologickým obrazom oligodendrogliómov. *Onkologia (Bratisl.)* 2014; 9(1):46-50.
42. Kinkor Z, Vaněček T, Švajdler M, Mukenšnábl P, Veselý K, Baxa J, Kokavec M. Kde končí a začíná diagnóza Ewingova sarkomu - popis

- dvou neobvyklých kostních nádorů s translokací t(20;22) (EWSR1-NFATc2). *Cesk Patol* 2014;50(2):87–91.
43. Wang L, Mezencev R, Svajdler M, Benigno BB, McDonald JF. Ectopic over-expression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and increased drug sensitivity in metastasizing ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* 2014;134(1):96-103. **IF=3,774 (2014)**
44. Petersson F, Branzovsky J, Martinek P, Korabecna M, Kruslin B, Hora M, Peckova K, Bauleth K, Pivovarcikova K, Michal M, Svajdler M, Sperga M, Bulimbasic S, Leroy X, Rychly B, Trivunic S, Kokoskova B, Rotterova P, Podhola M, Suster S, Hes O. The leiomyomatous stroma in renal cell carcinomas is polyclonal and not part of the neoplastic process. *Virchows Arch* 2014;465(1):89-96. **IF=2,651 (2014)**
45. Michal M, Hes O, Kacerovská D, Hora M, Rotter L, Švajdler M, Kazakov D. Klasifikace intraepiteliálních neoplázií předcházejících dlaždicovému karcinomu penisu a jejich analogie s prekancerózami dlaždicových karcinomů vulvy. *Ces Urol* 2014;18(2):94–100.
46. Švajdler M, Daum O, Rychlý B. Autoimunitná pankreatitída: pohľad patológa. *Gastroenterol prax* 2014;13(2):81-85.
47. Švajdler M, Daum O. Praktická diagnostika Lynchovho syndrómu: pohľad patológa. *Gastroenterol prax* 2014;13(2):87-91.
48. Petersson F, Sperga M, Bulimbasic S, Martinek P, Svajdler M, Kuroda N, Hora M, Simpson R, Tichy T, Peckova K, Branzovsky J, Pivovarcikova K, Rotterova P, Kokoskova B, Bauleth K, Martincok D, Nagy V, Michal M, Hes O. Foamy cell (hibernoma-like) change is a rare histopathological feature in renal cell carcinoma. *Virchows Arch* 2014;465(2):215-224. **IF=2,651 (2014)**
49. Švajdler M, Daum O, Rychlý B. Diagnosing Celiac Disease: Role of the Pathologists. *International Journal of Celiac Disease* 2014; 2(2):70-75.
50. Svajdler M, Benický M, Fröhlichová L, Beneš T, Hojstričová Z, Kazakov DV. Foamy Cell Angiosarcoma is a Diagnostic Pitfall: A Case Report of an Angiosarcoma Mimicking Xanthoma. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(8):669-672. **IF=1,387 (2014)**
51. Ondič O, Slunečko R, Švajdler M ml. Postavenie a význam cytologie moča v diagnostike uroteliálnych nádorov. *Cesk Patol* 2014;50(4):142-145.

52. Rychlý B, Švajdler M, Husáková K. Klinické, histopatologické, imunohistochemické a genetické aspekty stratifikácie meduloblastómov. *Onkológia (Bratisl.)* 2014;9(6):355–357.
53. Farkaš D, Švajdler M ml, Fröhlichová L, Šprláková J, Farkašová Iannaccone S, Szép Z, Nyitrayová O. Neobvyklý pľúcny nález masívneho vyplnenia alveolov penovitými makrofágmi pri kongenitálnej epidermolysis bullosa po aspirácii súčastí plodovej vody u novorodenca prežívajúceho 15 dní bez akýchkoľvek príznakov poškodenia dýchacích funkcií. *Cesk Patol* 2015;51(2):89-93.
54. Petříková J, Jarčuška P, Švajdler M, Pella D, Macejová Ž. Autoimmune hepatitis triggered by adalimumab and allergic reactions after various anti-TNF α therapy agents in a patient with rheumatoid arthritis. *IMAJ* 2015;17(4):256–258. **IF=0,879 (2015)**
55. Švajdler M, Baník P, Poliaková K, Straka Ľ, Hříbiková Z, Kinkor Z, Kazakov DV, Skálová A, Michal M. Sebaceous carcinoma of the breast: report of four cases and review of the literature. *Pol J Pathol* 2015;66 (2): 142-148. **IF=1,240 (2015)**
56. Švajdler M, Michal M, Kinkor Z. Jaká je Vaše diagnóza? Giant cell angiofibroma (varianta solitárneho fibrózneho tumoru). *Cesk Patol* 2015;51(3):126-127,132.
57. Kinkor Z, Šidlová H, Mečiarová I, Švec A, Švajdler M jr., Vasovčák P, Kodet R, Matějovský Z, Straka Ľ. Periostální osteosarkom - osobní zkušenost s pěti případy. *Cesk Patol* 2015;51(4):193-198.
58. Farkaš D, Špak Ľ, Švajdler M, Farkašová Iannaccone S, Sihotský V, Kaťuchová J, Ginelliiová A Traumatická pseudoaneuryzma descendentnej torakálnej aorty riešená aortálnym stentgraftom s následnou fatálnou aortoezofageálnou fistulou. *Soud Lek* 2015;60(4):46-50.
59. Michal M, Kazakov DV, Hadravský L, Agaimy A, Švajdler M, Kuroda N, Michal M. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor revisited: all tumors manifest typical morphologic features of myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, further suggesting 2 morphologic variants of a single entity. *Ann Diagn Pathol* 2015;20:40-43. **IF=1,022 (2015)**
60. Švajdler M, Rychlý B, Mezencev R, Fröhlichová L, Bednárová A, Pataky F, Daum O. SOX10 and Olig2 as a negative markers for the diagnosis of ependymomas: An immunohistochemical study of 98 glial tumors. *Histol Histopathol* 2016;31(1):95-102. **IF=1,875 (2015)**

61. **Švajdler M**, Kaspírková J, Mezencev R, Laco J, Torday T, Dubinský P, Straka L, Ondič O, Michal M, Skalová A. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic Eastern European population. *Neoplasma* 2016;63(1):107-113. **IF=1,961 (2015)**
62. Daum O, Kokošková B, Švajdler M. Morfologie gastroezofageálního refluxu. *Cesk Patol* 2016;52(1):17-24.
63. Daum O, Dubová M, Švajdler M. Patologická diagnostika nereflexních ezofagitid. *Cesk Patol* 2016;52(1):25-32.
64. **Švajdler M**, Zakuciová M, Benický M, Daum O. Jaká je Vaše diagnóza? Fibroelastotické zmeny hrubého čreva (fibroelastotický polyp). *Cesk Patol* 2016;52(1):40,45-46.
65. Farkašová Iannaccone S, Farkaš D, Švajdler M, Kaňuchová J, Vyhnálková V, Sihotský V. Non-traumatická arteriovenózná malformácia sleziny s fatálnym krvácaním. *Cesk Patol* 2016;52(2):107-111.
66. **Švajdler M**, Kašpírková J, Hadravský L, Laco J, Dubinský P, Straka L, Ondič O, Michal M, Skalová A. Origin of cystic squamous cell carcinoma metastases in head and neck lymph nodes: Addition of EBV testing improves diagnostic accuracy. *Pathol Res Pract* 2016;212(6):524-531. **IF=1,388 (2015)**
67. Dušek M, Hadravský L, Černá K, Stehlík J, **Švajdler M**, Kokošková B, Dubová M, Michal M, Daum O. Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klin Onkol* 2016;29(3):1–7.
68. **Švajdler M Jr**, Mezencev R, Kašpírková J, Kacerovská D, Kazakov DV, Ondič O, Michal M. Human papillomavirus infection and p16 expression in the immunocompetent patients with extragenital/extraungual Bowen's disease. *Diagn Pathol* 2016;11(1):53. **IF=1,895 (2015)**
69. **Švajdler M**, Laco J, Ondič O, Kašpírková J, Mezencev R, Michal M, Skalová A. HPV-asociované karcinómy hlavy a krku: Aktualizácia poznatkov a odporúčania pre prax. *Cesk Patol* 2016;52(3):130-138.
70. Farkašová-Iannaccone S, Klán J, Lamps LW, Farkaš D, Švajdler M ml, Szabo M. Intrakardiálne pomnoženie plesní rodu *Mucor* v takmer totálne uhorenom torze tela muža po 10 dňoch od jeho zmiznutia. *Soud Lek* 2016;61(3):35-38.
71. **Švajdler M Jr**, Mezencev R, Kašpírková J, Kacerovská D, Kazakov DV, Ondič O, Michal M. Human Papillomavirus Infection and p16 Expression in Extragenital/Extraungual Bowen Disease in Immunocompromised Patients. *Am J Dermatopathol* 2016;38(10):751–757. **IF=0,55 (2015)**

72. **Švajdler M**, Michal M, Dubinský P, Švajdler P, Ondič O, Michal M. Endometrial endometrioid carcinoma with large cystic growth configuration and deceptive pattern of invasion associated with abundant nodular fasciitis-like stroma: a unique hitherto unreported histology in endometrioid carcinoma. *Adv Anat Pathol* 2016;23(6):381–384. **IF=1,62 (2015)**
73. **Švajdler M**, Laco J, Kašpírková J, Ondič O, Michal M, Skálová A. Úloha patológa v diagnostike HPV asociovaných skvamocelulárných karcinómov oblasti hlavy a krku. *Head and neck cancer news* 2016; 2(1):12-19.7
74. Rychlý B, **Švajdler M**, Šteňo A. Zmeny v novej klasifikácii nádorov centrálného nervového systému Svetovej zdravotníckej organizácie v roku 2016. *Onkológia* 2016;11(5):265–267.
75. Ondič O, Ferko R, Kašpírková J, **Švajdler M Jr**, Rýchly B, Talarčík P, Bouda J, Michal M. Bizarre cell dysplasia of the cervix. *J Obstet Gynaecol Res* 2017;43(2):345-351. **IF=1.091 (2015)**
76. Skenderi F, Ulamec M, Vanecek T, Martinek P, Alaghebandan R, Pane Foix M, Babankova I, Perez Montiel D, Alvarado-Cabrero I, **Svajdler M**, Dubinsky P, Cempirkova D, Pavlovsky M, Vranic S, Daum O, Ondic O, Pivovarcikova K, Michalova K, Hora M, Rotterova P, Stehlikova A, Dusek M, Michal M, Hes O. Warthin-like papillary renal cell carcinoma: Clinicopathologic, morphologic, immunohistochemical and molecular genetic analysis of 11 cases. *Ann Diagn Pathol* 2017; 27: 48-56. **IF=1,022 (2015)**
77. **Švajdler M**, Rychlý B, Zámečník J, Švajdler P. Novinky vo WHO klasifikácii nádorov centrálného nervového systému 2016 – 1. časť: Difúzne infiltrujúce gliómy. *Cesk Patol* 2017;53(1):12-21.
78. Zámečník J, Rychlý B, **Švajdler M**. Novinky ve WHO klasifikaci nádorů centrálního nervového systému 2016 - 2. část: Embryonální nádory CNS a ostatní skupiny nádorů (kromě difúzních gliomů). *Cesk Patol* 2017; 53(1):22-28.

79. Farkaš D, Matěj R, **Švajdler M**, Sluková M, Seligová J, Fröhlichová L, Farkašová Iannaccone S, Vyhnálková V, Ginelliová A. Neobvyklý histopatologický obraz akútneho poškodenia pľúc v rôznej fáze rezorpcie s prevahou organizujúcej sa pneumónie u jedinca s chrípkou A(H1N1). *Cesk Patol* 2017; 53(1):38-42.
80. **Švajdler M**, Dubová M, Daum O. Jaká je Vaše diagnóza? Inflamatórny polyp hrubého čreva s bizarnými stromálnymi bunkami. *Cesk Patol* 2017; 53(1):45;47.
81. Mezencev R, **Švajdler M**. On ependymomas and SOX10. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017; 76(2):155-157. **IF=3,432 (2015)**
82. Skalova A, Sar A, Laco J, Metelkova A, Miesbauerova M, Steiner P, **Švajdler M**, Michal M. The Role of SATB2 as a Diagnostic Marker of Sinonasal Intestinal-type Adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, In press 2016. **IF=1,553 (2015)**
83. Mezencev R, **Švajdler M Jr**. Hormone receptor status of contralateral breast cancers: analysis of data from the US SEER population-based registries. *Breast Cancer*, In press 2016. **IF=1,170 (2015)**

Prílohy

Príloha 1 – Plné znenie publikácie týkajúcej sa dizertačnej práce - **Švajdler M**, Kašpírková J, Hadravský L, Laco J, Dubinský P, Straka L, Ondič O, Michal M, Skálová A. Origin of cystic squamous cell carcinoma metastases in head and neck lymph nodes: Addition of EBV testing improves diagnostic accuracy. *Pathol Res Pract* 2016;212(6):524-531. **IF=1,388 (2015)**

Príloha 2 – Plné znenie publikácie týkajúcej sa dizertačnej práce - **Svajdler M**, Kaspírkova J, Mezencev R, Laco J, Torday T, Dubinsky P, Straka L, Ondic O, Michal M, Skalova A. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic Eastern European population. *Neoplasma* 2016;63(1):107-113. **IF=1,961 (2015)**

Príloha 3 – Plné znenie publikácie týkajúcej sa dizertačnej práce - **Švajdler M**, Laco J, Ondič O, Kašpírková J, Mezencev R, Michal M, Skálová A. HPV-asociované karcinómy hlavy a krku: Aktualizácia poznatkov a odporúčania pre prax. *Cesk Patol* 2016;52(3):130-138.