

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**MUDr. Eliška Rotnáglová**

2011

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Experimentální chirurgie.

**Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

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

**Školitel:** Doc. MUDr. Jan Klozar, CSc.

**Konzultant:** RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

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

## Příloha č. 3

### **OBSAH**

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 1. Úvod               | 6  |
| 2. Cíle práce         | 9  |
| 3. Metodika           | 10 |
| 4. Výsledky           | 11 |
| 5. Diskuse            | 13 |
| 6. Závěr              | 17 |
| 7. Použitá literatura | 18 |
| 8. Příloha            | 23 |

## **ABSTRAKT**

Tonzilární karcinomy (dále TC) zaujímají významnou část nádorů hlavy a krku a jejich incidence v ČR stoupá. Kouření tabáku a nadměrná konzumace alkoholu jsou považovány za původce tří čtvrtin všech nádorů hlavy a krku, mezi další nezávislé rizikové faktory je dnes jasně řazena i infekce lidskými papillomaviry (dále HPV).

Prezentovaná práce si kladla za cíl zjistit, zda a jak se navzájem demograficky liší skupina HPV pozitivních a negativních pacientů, stanovit prevalenci HPV v TC u pacientů v České republice a zjistit, zda je virus v HPV DNA pozitivních nádorech transkripčně aktivní. Dalším cílem bylo ověřit vhodnost jednotlivých markerů HPV infekce pro přesný výběr pacientů s HPV asociovaným onemocněním a stanovit prognostický význam těchto markerů.

Na souboru 109 pacientů s TC jsme provedli detekci HPV DNA v nádorové tkáni a přítomnosti HPV specifických protilátek v séru. Pomocí dotazníků jsme získali informace ohledně rizikových faktorů. Pro analýzu exprese virové E6 a E2 mRNA a imunohistochemickou detekci proteinu p16 a p53 bylo k dispozici 45 ze 109 vzorků.

Celková prevalence HPV DNA v TC byla 65%. U 93% HPV16 DNA pozitivních vzorků byly nalezeny známky transkripční aktivity viru. Pomocí exprese E2 oblasti virového genomu jsme zjistili, že virus je integrován v genomu hostitelské buňky u 64% pozitivních vzorků. Expres proteinu p16 a přítomnost HPV16 E6/E7 specifických protilátek vysoce korelovala s HPV DNA i RNA pozitivitou. Specifické přežití pacientů s HPV pozitivními nádory bylo významně lepší, než přežití pacientů s HPV negativními nádory. Naše práce dokazuje kauzální vztah HPV se vznikem části karcinomů patrových tonzil, definuje klinicky využitelné markery a ukazuje na prognostickou výhodu pacientů s HPV asociovanými nádory. Výsledky práce tak dávají předpoklad k začlenění poznatků o HPV infekci v orofaryngeální oblasti do klinické praxe.

**Klíčová slova:** lidské papillomaviry, tonzilární karcinomy, protilátky, prognóza

## SUMMARY

Tonsillar cancer (TC) presents an important part of head and neck cancers and its incidence is rising in the Czech Republic. Cigarette smoking and alcohol abuse are risk factors responsible for approximately two thirds of all head and neck cancers. Furthermore, a role of human papillomavirus (HPV) as an independent risk factor has been demonstrated recently.

The aims of the present study were to find demographical differences between the group of HPV-positive and negative patients, to determine the prevalence of HPV in TC of Czech patients and also to find out whether the virus in HPV DNA positive tumors is transcriptionally active. Another aim was to test different markers of HPV infection for a precise selection of patients with HPV associated disease and to determine the prognostic role of these markers.

A set of 109 patients with primary TC was examined for HPV DNA presence in tumor tissue and for the presence of HPV specific antibodies in serum. Data regarding risk factors were obtained by questionnaires. Forty-five samples were available for E6 and E2 mRNA analysis and for immunohistochemical analysis of p16 and p53 expression.

The overall prevalence of HPV DNA in TC was 65%. In 93% of HPV16 DNA positive samples the virus was transcriptionally active. The E2 expression status has shown that in 64% of positive samples the virus is integrated in cellular genom. P16 expression and the presence of HPV16 E6/E7 specific antibodies correlated well with HPV DNA and RNA positivity. Disease specific survival of patients with HPV positive tumors was significantly better than that of patients with negative tumors.

In addition to providing further evidence of the involvement of HPV infection in the etiopathogenesis of a proportion of TC cases, our study demonstrates the prognostic advantage of patients with HPV associated tumors. The results of our study clearly show that recent findings concerning HPV infection of oropharyngeal region may be involved in clinical practice. **Key words:** human papillomavirus, tonsillar cancer, antibodies, prognosis

## 1. ÚVOD

Současné studie ukazují, že 20-25% dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku je etiologicky spjato s infekcí vysoce rizikovými typy lidských papillomavirů (dále jen HR HPV)<sup>1-3</sup>. Nejvyšší prevalence HPV DNA je standardně nalézána ve tkáni karcinomů patrových tonzil (dále TC = tonsilar cancer)<sup>4-6</sup>. U této podskupiny nádorů se také pomocí vedlejších markerů podařilo nejsilněji prokázat kauzální souvislost virové infekce se vznikem nádoru.

Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku obecně představují světově přibližně 5 - 7% všech nádorových onemocnění<sup>7</sup>.

Hlavní rizikové faktory, které jsou zodpovědné přibližně za 3/4 nádorů, jsou kouření cigaret a konzumace alkoholu. Jejich současným užíváním navíc jednotlivá rizika nesčítají, ale násobí<sup>8</sup>.

Jedním z cílů této práce bylo vytvořit homogenní soubor, který poskytne průkaznější výsledky než soubor heterogenní. Celá práce je tedy věnována podskupině pacientů s primárními TC, které lze chápat jako jakýsi model virově indukovaného nádoru oblasti hlavy a krku.

### **Tonzilární karcinomy**

Tonzilární karcinomy (TC) jsou nejčastější zhoubné nádory orofaryngeální oblasti, jejich incidence je v současné době v České republice  $3,8 \times 10^5$  u mužů a  $1,1 \times 10^5$  u žen<sup>9</sup>. Výskyt těchto nádorů neustále stoupá.

Diagnostika tonzilárních karcinomů začíná aspekci a palpací. Po odběru biopsie a verifikaci procesu je většinou pacientů provedena panendoskopie v celkové narkóze k posouzení rozsahu a operability nádoru a k vyšetření oblastí nedostupných ambulantním vyšetřením.

Rozsah nádoru a přítomnost regionálních metastáz zpřesní použití zobrazovací metody - nejčastěji CT, v některých případech NMR.

Na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole je nejčastěji volena u resekabilních nádorů primárně chirurgická terapie. Operace ze zevního přístupu jsou prakticky vždy spojeny s blokovanou resekci krčních uzlin. Pooperační radioterapie případně chemoradioterapie je indikována u většiny pacientů na základě histologického nálezu v oblasti primárního tumoru a uzlin.

Další možností primární léčby je radioterapie v případě pokročilejších nádorů chemoradioterapie.

Prognóza pacientů s tonzilárním karcinomem zůstává v posledních 30 letech bez významnějších změn – okolo 50%. Odvíjí se od velikosti tumoru (T) a rozsahu regionálních metastáz (N).

### **Charakteristika lidských papillomavirů**

HPV jsou neobalené DNA viry, jejichž genom obsahuje 8000 pb. V současnosti bylo popsáno více než 109 jednotlivých typů, systém jejich klasifikace je založen na porovnání podobnosti nukleotidové sekvence genomů jednotlivých izolátů<sup>10</sup>.

Podle toho, zda způsobují benigní (např. laryngeální papilomatóza) nebo maligní léze, jsou děleny na vysoce a níže rizikové (high/low-risk HPV)<sup>11</sup>. Vysoce rizikové typy, z nichž nejčastější je HPV 16, 18, 31, 33, jsou schopny způsobit maligní transformaci buněk slizničního epitelu. Nejlépe prostudovaným zhoubným nádorem způsobeným infekcí vysoce rizikovými typy HPV je karcinom děložního čípku u žen.

Virus prochází nejprve latentní fází v proliferujících buňkách stratum basale a následně přechází do aktivní fáze, kdy dochází k masivné expresi nejprve časných (E), později pozdních virových proteinů (L). Dojde-li k vytvoření virové partikule, dochází k lýze hostitelské buňky, uvolněné partikule tak mohou napadat další buňky.

Klíčovým dějem pro transformaci buňky v nádorovou je exprese velkého množství (tedy "overexpres") onkoproteinu E6 a E7. Protein E6 váže a potlačuje funkci buněčného regulátoru p53, protein E7 pak tlumí funkci pRb.

### **Přehled dosavadních důkazů o souvislosti HPV infekce s tonzilárními karcinomy**

V Evropě i ve Spojených státech amerických stoupá incidence orofaryngeálních nádorů, zatímco incidence karcinomů hrtanu (prokazatelně tabákem – indukovaného typu karcinomu) všeobecně klesá. Množí se důkazy o tom, že je tento jev způsoben vzrůstající incidencí HPV infekce v orofaryngeální oblasti<sup>5</sup>.

V tkáni karcinomů hlavy a krku je již standardně nalézána HPV DNA.

### Příloha č. 3

Nejčastěji zastoupeným typem v těchto karcinomech je HPV 16, méně často pak HPV 18, a další. Ve tkáni tonzilárních vzorků zdravých kontrol je naopak výskyt HPV DNA vzácný – okolo 8%<sup>4</sup>.

Vznik karcinomu na podkladě HPV infekce je podmíněn kontinuální expresí velkého množství virových onkoproteinů E6 a E7. Právě úseky virové E6 a E7 mRNA lze rovněž detekovat ve tkáni TC.

Dalším důkazem je imunohistochemická pozitivita na protein p16, jehož zvýšená exprese reflektuje právě působení virového onkoproteinu E7. Zároveň bylo zjištěno, že mutace genu pro p53 se u HPV pozitivních karcinomů vyskytuje mnohem vzácněji než u karcinomů HPV negativních. Obecně to dokazuje, že se ve vzniku HPV pozitivních tumorů uplatňují jiné patofyziologické děje než u tumorů negativních.

Výsledky studií opakovaně prokázaly, že pacienti s HPV pozitivními nádory hlavy a krku mají v séru detekovatelnou hladinu HPV specifických protilátek. Vznikají protilátky proti kapsidovým proteinům, které značí expozici infekci během života a protilátky proti virovým onkoproteinům, které značí invazivní onemocnění. Tyto později zmíněné protilátky jsou u pacientů s orofaryngeálními nádory nalézány ve vysokých koncentracích.

V neposlední řadě dokazuje vzájemnou odlišnost HPV pozitivních a negativních nádorů i odlišné biologické chování. V mnoha studiích se podařilo prokázat, že pacienti s HPV pozitivními nádory mají významně lepší specifické přežití<sup>12</sup>, některé studie dokonce prokázaly, že HPV pozitivita v nádorové tkáni je nezávislým pozitivním prognostickým faktorem<sup>13</sup>.

Současné práce se však shodují na tom, že prognostická výhoda platí výhradně pro pacienty, v jejichž tumoru má HPV skutečně etiologický význam. Je tedy nezbytné mít k dispozici co nejpřesnější, ale zároveň co nejjednodušší a klinicky snadno využitelné markery, které označí HPV indukované nádory od těch, kde mohlo například dojít pouze k náhodné superinfekci.



## 2. CÍLE PRÁCE

- Zjistit prevalenci HPV DNA v homogenní skupině dlaždicobuněčných karcinomů tonzil z hlediska lokalizace u pacientů v České republice
- Zjistit, zda je virus v HPV DNA pozitivních dlaždicobuněčných karcinomech tonzil skutečně transkripčně aktivní či pouze pasivně přítomný
- Ověřit vhodnost jednotlivých markerů HPV infekce pro přesný výběr pacientů s HPV asociovaným onemocněním pro účely klinické praxe
- Zjistit, zda se liší navzájem skupina HPV pozitivních a negativních pacientů demograficky a klinicky
- Zjistit, zda pacienti s HPV etiologií dlaždicobuněčných karcinomů tonzil lépe přežívají a zda toto přežívání ovlivňují ještě jiné demografické a klinické faktory

### **3. METODIKA**

#### **Soubor pacientů**

Do studie bylo zařazeno 109 pacientů léčených na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole s primárním histologicky ověřeným dlaždicobuněčným karcinomem patrových tonzil (MKN-10: C09.0; C09.1; C09.8; C09.9). Pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie a vyplnili dotazníky, které se týkaly rizikových faktorů (např. kuřáctví, konzumace alkoholu a další).

#### **Sběr biologického materiálu**

Při zařazení pacienti zároveň provedli výplach dutiny ústní (cytologie) a bylo jim odebráno 10 ml krve.

Všichni pacienti s výjimkou tří byli léčeni chirurgicky. Během výkonu byl odebrán vzorek tkáně nádoru a odeslán do laboratoře Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK. Vzorek byl fixován v 10% neutrálním pufovaném formolu a zalit do parafinu. Z každého bločku pak byly vytvořeny řezy určené k izolaci nukleových kyselin a k imunohistochemické detekci.

#### **Zpracování vzorků:**

##### **1) Extrakce DNA a RNA**

- a) z parafinových řezů
- b) z cytologického materiálu

##### **2) Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

- a) PCR kontrolního genu u DNA/RNA z parafinových řezů
- b) PCR detekce HPV v DNA extrahované z tkáně v parafinových blocích pomocí GP5+/6+ primerů
- c) PCR detekce HPV v DNA extrahované z tkáně v parafinových blocích pomocí GP5+/GP6+BIO primerů
- d) PCR detekce HPV DNA u výplachů
- e) Detekce HPV16 E6\*I mRNA
- f) Detekce HPV16 E2 mRNA

##### **3) Analýza PCR produktů Southern blotem**

##### **4) Určení typu HPV sekvenací**

##### **5) Imunohistochemie**

##### **6) Sérologické testy**

- a) Příprava antigenů
  - b) Detekce specifických protilátek proti HPV
- 7) Statistická analýza

## 4. VÝSLEDKY

### Demografické charakteristiky

Z celkového počtu 109 vzorků bylo 65% (71/109) HR HPV DNA-pozitivních nádorové tkáni.

Průměrný věk (56 vs. 58 let,  $P=0.309$ ), distribuce pohlaví (adj. $P=0.248$ ) a délka vzdělání (12 let vs. >12 let) (adj.  $P=0.925$ ) se statisticky významně nelišily mezi pacienty s HPV pozitivními a negativními nádory. Signifikantní rozdíl jsme nenalezli ani v parametrech sexuálního chování. Významně se však pacienti s HPV pozitivními a negativními nádory navzájem lišili v kuřáckých zvyklostech a to nezávisle na modelu, který byl pro srovnání použit. Naproti tomu v ohledu konzumace alkoholu se dvě studované skupiny vzájemně nelišily.

### Klinicko-patologické charakteristiky

HPV pozitivní tumory byly celkově větší, avšak rozdíl nedosahoval statistické významnosti. Pacienti s HPV pozitivními nádory měli častěji v době diagnózy uzlinové metastázy (85% vs. 69%, adj.  $P=0.053$ ). Tyto charakteristiky se promítly do rozdílu ve stadiu, kde HPV pozitivní nádory byly významně pokročilejší (III a IV vs. I a II) (89% vs. 72%, adj.  $P=0.038$ ).

### Typově specifická HPV DNA prevalence

Celková prevalence HR HPV DNA v nádorové tkáni byla 65% (71/109 pacientů). Nejčastěji se vyskytoval typ HPV 16 (nalezen v 94% HPV-pozitivních vzorků).

### Prevalence HPV DNA ve výplších dutiny ústní

Pacienti s HPV DNA pozitivními tumory měli významně častěji detekovatelnou HPV DNA ve výplachu dutiny ústní než pacienti s HPV DNA negativními tumory. Senzitivita a specificita této detekční metody vyšla 74% a 82%, respektive.

### Prevalence HPV-specifických protilátek

Přítomnost protilátek specifických pro HPV16 VLP i pro HPV 16 E6- a E7 v séru dobře korelovala s přítomností HR HPV DNA v

nádorové tkáni (Kappa hodnota=0,396; 0,719 a 0,584, respektive). HPV16 VLP-specifické protilátky byly nalezeny u 65% HPV-pozitivních pacientů a pouze 21% HPV-negativních (adj.  $P=0,003$ ). Protilátky proti HPV16 E6 a E7 onkoproteinům byly přítomny v sérech 80% a 70% HR HPV-pozitivních pacientů, respektive.

### **Detekce markerů aktivní virové infekce**

Pro izolaci RNA a imunohistochemickou analýzu bylo k dispozici celkově 47 vzorků. Pro veškeré analýzy nepřímých markerů jsme použili pouze vzorky HPV DNA negativní a HPV DNA 16 a 18 pozitivní.

Kromě dvou vzorků byla u všech HPV DNA-pozitivních případů (93%) nalezena i exprese virové HPV16 E6-specifické mRNA. Kromě jednoho HPV DNA-pozitivního vzorku (97%) žádný z těchto vzorků neexprimoval p53 v detekovatelné míře, zatímco u 8 (50%) z 16 HPV DNA-negativních případů jsme overexpresi p53 imunohistochemicky potvrdili. Expresse proteinu p16 byla až na 2 vzorky nalezena u všech HPV DNA-pozitivních případů (93%).

Optimální kombinaci vysoké senzitivity i specificity vykazovala imunohistochemická detekce p16 (96% a 94%, respektive), o málo nižší hodnoty pak sérologická detekce HPV 16 E6 a/nebo E7- specifických protilátek (96% a 89%, respektive).

Pouze u 9 (36%) z 25 vzorků exprimujících E6 mRNA jsme zároveň našli i mRNA specifickou pro oblast E2. To jasně značí, že 16 z 25 (64%) HPV mRNA pozitivních případů vykazovalo známky exprese virové mRNA, která je charakteristická pro integraci viru do genomu buňky.

### **Analýzy přežití**

Použitím Kaplan-Meierovy metody a log-rank testu jsme zjistili významně lepší specifické přežití u pacientů s HR HPV pozitivními nádory oproti pacientům s HPV-negativními nádory (průměrný čas přežití 4,4 vs. 3,3 let,  $P=0,004$ )

Prognostická výhoda pacientů s HPV-pozitivním tumorem byla pozorována nezávisle na tom, který marker byl ke stanovení aktivní HPV infekce použit. Multivariantní Coxova regresní analýza potvrdila lepší přežití pacientů s HPV pozitivními tumory i v přítomnosti dalších kofaktorů (adj.  $P=0,023$ ) – věk, kuřáctví, konzumace alkoholu, velikost

tumoru, stádium onemocnění, diferenciacie nádoru a incidence a rozsah uzlinového postižení.

## 5. DISKUZE

Tato prospektivně koncipovaná studie byla provedena na přesně definovaném souboru pacientů s primárním tonzilárním karcinomem. Analyzovali jsme přítomnost, transkripční aktivitu a integraci HR HPV a několik dalších nepřímých markerů, které by mohly mít prognostický význam. Výsledky poskytují další významný důkaz pro hypotézu, že pacienti s HPV-iniciovanými tumory mají lepší přežití a mohli by tak být léčeni méně agresivními nebo odlišnými metodami. Zároveň jsme identifikovali několik biomarkerů, které se ve vzájemné kombinaci jeví jako vysoce senzitivní i specifické a mohou být navíc využity v klinické praxi.

Prevalence HPV DNA byla v naší studii 65%, nejčastějším typem HPV byl HPV 16, který zaujímal 94% všech HPV DNA pozitivních tumorů. Tato data se shodují s výsledky dalších studií<sup>4,5</sup>

Skupina pacientů s HPV-pozitivními a skupina s HPV-negativními tumory se v našem souboru nelišila v demografických charakteristikách jako je věk, pohlaví, vzdělání, sexuální chování a konzumace alkoholu. Významný rozdíl jsme však pozorovali v kuřáckých zvyklostech: ve skupině pacientů s HPV-negativními bylo výrazně více kuřáků a silných kuřáků. Toto pozorování se shoduje jak s našimi předešlými daty<sup>14</sup>, tak s výsledky mnoha dalších prací<sup>15, 16</sup>. Zároveň jasně ukazuje, že kouření, které představuje významný rizikový faktor pro dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku obecně, nehraje v případě HPV-pozitivních nádorů zdaleka tak významnou roli. Jaká je skutečná role kouření u HPV pozitivních nádorů není v současné chvíli známo. V našem souboru bylo celkové přežití HPV pozitivních kuřáků jen nesignifikantně horší než HPV pozitivních nekuřáků. V tomto případě byl navíc soubor rozdělen na základě přítomnosti HR HPV DNA, nešlo tedy o bezpečný důkaz HPV etiologie u HPV pozitivních pacientů. Je možné, že část HPV pozitivních kuřáků měla sice v nádoru přítomnou virovou DNA, která se však neuplatňovala na vzniku tumoru

a šlo u nich o tabákem indukovaný tumor (pro vyšetření RNA byla k dispozici jen zhruba polovina vzorků).

Na rozdíl od jiných studií se však mezi HPV-pozitivními a negativními v našem souboru nepodařilo prokázat rozdíl v sexuálních praktikách.

Výsledky předešlých studií naznačují, že přítomnost HR HPV DNA ve tkáni tumoru ještě nutně neznačí kontinuální expresi virových onkogenů a tím pádem vliv na vznik TC. Na vzorcích cervikálních karcinomů bylo zjištěno, že nejlépe virovou aktivitu reflektuje přítomnost E6/E7 mRNA ve tkáni<sup>17</sup>. Zaměřili jsme se proto jak na tyto přímé markery infekce, tak na markery nepřímé, jako je exprese p16 a další. Pro testování RNA byla k dispozici jen menší část vzorků (celkem 45). Tento podsoubor byl však shodný s celým souborem v demografických i klinických charakteristikách.

HPV16 E6\*I mRNA, který je považován za hlavní transkript genu E6/E7 u HPV-16 dependentních karcinomů, byl nalezen v 93% vzorků pozitivních na HPV-16 DNA.

Ve shodě s našimi výsledky popsali Lindquist a kol. E6 mRNA ve 42 z 53 (79%) vzorků HPV16 DNA-pozitivních TC. Zároveň ale tyto autoři našli E7 mRNA v 94% takto pozitivních vzorků<sup>18</sup>. Další 2 studie věnované tomuto tématu prokázaly expresi onkogenů v menší míře. Smeets a kol. zdetekovali E6 mRNA expresi v 6 (75%) z 8 HPV16 DNA-pozitivních vzorcích orofaryngeálních karcinomů<sup>19</sup>. Jung a kol. nedávno popsali expresi HPV onkogenu pouze u 12 z 30 (40%) HR HPV DNA-pozitivních vzorků orofaryngeálních karcinomů<sup>20</sup>.

Takto diskrepantní výsledky mohou vycházet z odlišností v prevalenci HPV v TC, z geografických a socioekonomických souvislostí a z rozdílných metod použitých pro analýzu RNA.

Jako první jsme provedli na vzorcích TC analýzu exprese genové oblasti HPV 16 E2, tedy na úrovni RNA, což je metoda považovaná za zlatý standard detekce integrace virové DNA do genomu hostitelské buňky<sup>21, 22</sup>. V cervikálních karcinomech vede integrace HR HPV DNA do genomu buňky k eliminaci supresního vlivu genu E2 na geny E6 a E7, které jsou následně "overexprimovány"<sup>23</sup>.

Absence mRNA obsahující oblast E2 byla zjištěna u 16 (64%) z 25 vzorků TC exprimujících E6 mRNA, což značí, že exprese E6/E7

pochází v těchto nádorech z integrovaného HPV genomu. Tento poměr je shodný s údaji, které uvádí Hafkamp a kol. a Koskinen a kol.<sup>24,25</sup>. Ve zbývajících 9 vzorcích, které jsou na expresi E2 pozitivní, pochází E6/E7 mRNA velmi pravděpodobně z extrachromosomálního, neintegrovaného plasmidu HPV. Bohužel však použitá metoda nedokáže rozlišit čistě episomální formu od formy smíšené a bylo by tak vhodné doplnit další analýzy k objasnění, zda tyto vzorky neobsahují kromě episomálního viru zároveň i část integrovaného.

Podsoubor vzorků, vhodných pro RNA analýzu, jsme dále vyšetřili z hlediska nepřímých markerů aktivního působení viru v buňce, tedy na expresi proteinu p16 a p53 pomocí imunohistochemie. Protein p16 je dnes všeobecně přijímán za nepřímou známku aktivního vlivu onkogenu E7 v buňkách cervikálního karcinomu<sup>17</sup>. Naše výsledky, ve shodě s dalšími autory<sup>26-28</sup>, ukazují, že detekce exprese p16, zejména pokud je zároveň detekována HPV DNA, představuje velmi senzitivní a specifickou metodu pro výběr pacientů s HPV-asociovaným tumorem i v oblasti hlavy a krku.

Senzitivita a specifita kombinace imunohistochemické detekce p16 s PCR detekcí HPV DNA vypočtená z našich výsledků vychází 100% a 88%, respektive. Jedná se o srovnatelné hodnoty s ostatními studii<sup>19</sup>, které zároveň naznačují, že společná analýza HPV DNA a p16 by mohla nahradit technicky i finančně náročnou detekci E6 mRNA.

Dále jsme v menším souboru 45 vzorků analyzovali expresi proteinu p53. Kromě jednoho žádný z HPV-pozitivních vzorků neexprimoval v detekovatelné míře p53, zatímco mezi HPV-negativními tumory byla p53 overexprese nalezena v 50%. Bohužel však senzitivita i specifita tohoto "inverzního" markeru byla nízká. Jedním z možných vysvětlení může být jev popsáný dříve<sup>29, 30</sup>, že imunohistochemická detekce exprese p53 nevypovídá zcela věrohodně o mutačním stavu genu TP53. Souhrnně lze říci, že absence overexprese p53 není spolehlivým markrem aktivního působení HPV v TC.

Výsledky analýzy výplachů dutiny ústní ukázaly, že přítomnost HPV DNA v odloučených buňkách dutiny ústní dobře koreluje s přítomností HPV DNA ve tkáni a jeví vysokou senzitivitu (74%) a specifitu (82%). Podobné výsledky popisují i další autoři<sup>3, 31</sup>.

Sérologické markery použité v naší studii vysoce korelují s HPV DNA i RNA pozitivitou nebo negativitou v nádorové tkáni.

Sérologické studie u pacientek s cervikálním karcinomem ukazují, že ačkoli protilátky proti virovým partikulím, detekovatelné pomocí VLP částic, reflektují anamnestickou expozici HPV infekci, nepodávají žádnou informaci o současně probíhajícím onemocnění<sup>32</sup>. Naproti tomu protilátky proti onkoproteinům E6 a E7 jsou velmi často přítomny v sérech pacientů s HPV-asociovaným nádorovým onemocněním, ale nejsou přítomny v sérech zdravých pacientů či u nositelů asymptomatické infekce<sup>33</sup>.

V souladu s touto teorií byla v celém souboru 109 pacientů s TC nalezena statisticky významná korelace HPV DNA a/nebo RNA pozitivita/negativita se séropozitivitou na protilátky proti E6/E7 onkoproteinům.

Přítomnost anti-E6/E7 protilátek (na rozdíl od přítomnosti HPV specifických protilátek proti VLP) zároveň významně korelovala s přežíváním pacientů. Podobná pozorování popsali i další autoři<sup>34</sup>. Z výše uvedeného vyplývá, že protilátky proti HPV 16 E6 a E7 onkoproteinům jsou vysoce senzitivními (96%) a specifickými (89%) markery HPV-asociovaných TC.

Výsledky multivariantní analýzy celého souboru ukázaly, že HPV pozitivita představuje nejsilnější ukazatel přežití u pacientů s TC. Prognostická výhoda HPV-pozitivních navíc nezávisí na markeru, který byl použit k identifikaci HPV pozitivity nádoru.

Jediný z dalších faktorů, u něhož se projevil vliv na prognózu, byla velikost tumoru, což se shoduje s výsledky jiných studií<sup>24, 35</sup>. Rozsah uzlinového postižení (N-klasifikace) neměl pro náš soubor pacientů významný vliv na přežití, což souhlasí s našimi předešlými výsledky<sup>36</sup> a výsledky dalších studie<sup>24</sup>, naproti tomu Hoffmann a kol. popisuje, že míra postižení uzlin v jejich souboru významně ovlivnila přežití a to nezávisle na HPV statusu<sup>37</sup>.

Prognostická výhoda HPV-pozitivních pacientů byla potvrzena výsledky mnoha prací<sup>35, 38, 39</sup>, zpracováno v metaanalýze<sup>12</sup>. Důležité je v tomto bodě podotknout, že převážná většina studií hodnotících přežití ve vztahu k HPV byla koncipována retrospektivně, pouze dvě studie<sup>27, 40</sup> probíhaly podobně jako naše v prospektivním schématu. Pro



vysvětlení byla navržena celá řada hypotéz, stále však není v této otázce jasno. Jako nejpravděpodobnější se jeví názor, že zablokování metabolických cest p53 a pRb virovými onkoproteiny je podstatně menším zásahem do genomu, než četné mutace u tabákem indukovaných nádorů. Nádorové buňky s menším genetickým poškozením pak lépe odpovídají na léčbu<sup>41</sup>. Další možností je, že HPV pozitivní nádory stimulují imunitní systém, který se pak podílí na eliminaci nádoru.

Pokusili jsme se i blíže definovat vztah HPV a kouření, coby významného rizikového faktoru pro karcinomy horních cest dýchacích a polykacích. Porovnali jsme parametry přežití ve skupinách rozdělených dle parametrů kuřáctví i HPV statusu dohromady. Kaplan-Maierova analýza ukázala statisticky významný rozdíl v přežití ve skupině kuřáků dle HPV positivity, zatímco ve skupině HPV pozitivních pacientů mezi kuřáky a nekuřáky významný rozdíl nalezen nebyl.

Toto zjištění se jednak shoduje s výsledky popsány v další studii<sup>42</sup>, ale zároveň značně podtrhuje HR HPV etiologii coby nejsilnější prognostický faktor pro karcinomy hlavy a krku.

## 6. ZÁVĚR

Výsledky, které práce poskytuje, svědčí pro existenci dvou etiologicky odlišných skupin TC.

Pacienti s HPV iniciovanými karcinomy se v mnoha aspektech liší od pacientů, jejichž nádory byly vyvolány klasickými rizikovými faktory, mimo jiné i významnou prognostickou výhodou.

To napovídá, že by se HPV pozitivita tumoru, jakožto nezávislý prognostický faktor, měla mít vliv na klinické rozhodování. Pacienti postižení HPV pozitivním nádorem by tak pravděpodobně mohli podstoupit léčbu v odlišném – méně agresivním – režimu.

Aby se však nezhoršily dosud velmi dobré výsledky léčby pacientů s HPV-závislými tumory, musí být bezpodmínečně zavedení tohoto poznatku do praxe potvrzeno ještě pomocí dalších studií provedených na velkých souborech pacientů.

Ukázali jsme, že detekce HR HPV DNA pomocí PCR v nádorové tkáni spolu s imunohistochemickou detekcí p16 a/nebo sérologickou detekcí anti-E6 a/nebo anti-E7 protilátek představují vysoce senzitivní a

### Příloha č. 3

specifické metody k identifikaci pacientů, jejichž TC je kauzálně spojen s HPV infekcí. Navíc jsou tyto testy snadno dostupné v rutinní klinické praxi.

Obečně má problematika HPV asociovaných zhoubných nádorů v současnosti ještě další významný rozměr, vzhledem k nově vyvinutým vakcínám proti papillomavirové infekci, které již prošly stádiem klinických zkoušek a jsou již běžně (v některých zemích dokonce plošně) aplikovány. Dosavadní výsledky ukazují, že tyto vakcíny s velkou pravděpodobností (při dodržení určitých podmínek) zabrání vzniku cervikálního karcinomu – tedy prototypu HPV-asociovaných nádorů. Je velmi pravděpodobné, že by plošná vakcinace mohla mít podobný vliv i na část dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Vzhledem k zvyšujícímu se podílu HPV pozitivních nádorů by se pak vakcinace mohla stát vedle protitabákových opatření nejvýznamnějším faktorem v prevenci nádorů hlavy a krku. Definitivní ustanovení etiologické souvislosti nádorů hlavy a krku by zároveň vybízelo k vakcinaci nejen dívek, ale i chlapců

---

#### **Použitá literatura:**

- 1. 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;90:1626-36.
- 2. 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;92:709-20.
- 3. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-72.
- 4. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:449-55.

### Příloha č. 3

- 5. 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;119:2620-3.
- 6. Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009;125:362-6.
- 7. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- 8. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:541-50.
- 9. Novotvary 2006 ČR/ Cancer Incidence 2006 CR: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
- ve spolupráci s Národním onkologickým registrem ČR, 2009.
- 10. Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 10):2653-60.
- 11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- 12. 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;121:1813-20.
- 13. Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, Smith E, Salakova M, Smahelova J, Ludvikova V, Rotnaglova E, Kodet R, Hamsikova E. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* 2009;81:878-87.
- 14. Tachezy R, Klozar J, Salakova M, Smith E, Turek L, Betka J, Kodet R, Hamsikova E. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005;11:181-5.
- 15. 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;100:407-20.
- 16. Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SM, Klingenberg B, Voogd AC, Bot FJ, Klusmann JP, Hopman AH, Manni JJ, Kremer B, Ramaekers FC, Speel EJ.

### Příloha č. 3

- P21(Cip1/WAF1) expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Mod Pathol* 2009;22:686-98.
- 17. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2536-45.
  - 18. Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L, Näsman A, Dahlstrand H, Lindholm J, Onelöv L, Ramqvist T, Ye W, Munck-Wikland E, Dalianis T. Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Molecular Oncology* 2007;1:350-5.
  - 19. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121:2465-72.
  - 20. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reynies A, Rickman D, Thomas E, Abecassis J, Clavel C, Wasylyk B. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2009;126:1882-94.
  - 21. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 2002;21:419-26.
  - 22. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1654-8.
  - 23. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:24-31.
  - 24. 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;122:2656-64.
  - 25. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, Suuronen R, Lindqvist C, Auvinen E, Moliyn A, Quint WG, Vaheri A, et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003;107:401-6.
  - 26. Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T. p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2010.
  - 27. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, et al. EGFR, p16,

### Příloha č. 3

- HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3128-37.
- 28. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162:747-53.
  - 29. Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH. Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol* 1999;30:1221-5.
  - 30. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, Vick K. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3445-53.
  - 31. Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, Koch W, Jiang W, Sidransky D, Califano J. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;117:605-10.
  - 32. Hamsikova E, Ludvikova V, Tachezy R, Kovarik J, Brouskova L, Vonka V. Longitudinal follow-up of antibody response to selected antigens of human papillomaviruses and herpesviruses in patients with invasive cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2000;86:351-5.
  - 33. Smith EM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Risk factors and survival by HPV-16 E6 and E7 antibody status in human papillomavirus positive head and neck cancer. *Int J Cancer* 2009.
  - 34. Smith EM, Rubenstein LM, Ritchie JM, Lee JH, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Does pretreatment seropositivity to human papillomavirus have prognostic significance for head and neck cancers? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2087-96.
  - 35. Charfi L, Jouffroy T, de Cremoux P, Le Peltier N, Thioux M, Freneaux P, Point D, Girod A, Rodriguez J, Sastre-Garau X. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. *Cancer Lett* 2008;260:72-8.
  - 36. 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.
  - 37. Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T. Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 2005;218:199-206.
  - 38. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, et al. High-risk

### Příloha č. 3

- human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5630-6.
- 39. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, Tornillo L, Wolfensberger M, Terracciano LM. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 2009.
  - 40. 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;100:261-9.
  - 41. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SM, Stenner M, Huebbers CU, Weissenborn SJ, Wedemeyer I, Preuss SF, Straetmans JM, Manni JJ, Hopman AH, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res* 2009;15:1779-86.
  - 42. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, Eisen EA, Peters ES, McClean MD, Kelsey KT. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1801-10.

*Seznam publikací doktoranda:*

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

**Publikace s IF:**

- 1) Rotnáglová E, Tachezy R, Saláková M, Procházka B, Košl'abová E, Veselá E, Ludvíková V, Hamšíková E, Klozar J. **HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers.** Int J Cancer 2011;129 (1):101-10, **IF 4,722**
- 2) Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, Smith E, Saláková M, Šmahelová J, Ludvíková V, Rotnáglová E, Kodet R, Hamšíková E. **Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors.** J Med Virol 2009;81:878-87, **IF 2,75**

**Publikace bez IF:**

- 1) Klozar J.; Tachezy R.; Rotnáglová E.; Košl'abová E.; Saláková M; Hamšíková E. **Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects.** Wiener Medizinische Wochenschrift , 2010, sv. 160, s. 305–309.
- 2) Rotnáglová E., Tachezy R., Saláková M., Košl'abová E., Šmahelová J.,. **Vztah lidských papillomavirů a etiologie karcinomů patrových mandlí.**Otorinolaryngie a Foniatrie , 2010, sv. 59, s. 32–37
- 3) Mudrová E.; Tachezy R.; Hamšíková E.; Saláková M.; Šmahelová J.; Klozar J. **HPV pozitivní karcinom tonzily u pacientky s negativní kuřáckou a alkoholickou anamnézou.** Lékařské listy, 2008, sv. 5, s. 33–34