

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Experimentální chirurgie



MUDr. Eliška Rotnáglová

Význam lidských papillomavirů v etiologii a prognóze dlaždicobuněčných karcinomů
orofaryngu

The role of human papillomavirus in the etiology and prognosis of squamous cell
carcinoma of the oropharynx

Dizertační práce

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

Konzultant:
RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

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

V Praze, 30.5.2011

MUDr. Eliška Rotnágllová

Podpis

Identifikační záznam:

ROTNÁGLOVÁ, Eliška. *Význam lidských papillomavirů v etiologii a prognóze dlaždicobuněčných karcinomů orofaryngu [The role of human papillomavirus in the etiology and prognosis of squamous cell carcinoma of the oropharynx]*. Praha, 2011. 74 s. Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku. Vedoucí práce Jan Klozar.

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

Dále děkuji RNDr. Martině Salákové, PhD. a RNDr. Janě Šmahelové, Pavlíně Jarolímkové, Blance Langové, RNDr. Evě Hamšíkové a RNDr. Viěře Ludvíkové a všem zaměstnancům oddělení experimentální virologie ÚHKT v Praze za odborné rady, vstřícnost a pomoc v laboratorní práci. Za pomoc při získávání vzorků a v klinické práci velice děkuji MUDr. Evě Košťalové a MUDr. Evě Foltynové.

Dále děkuji všem spolupracovníkům z Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole, především Prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc. za pracovní zázemí vstřícné k postgraduálnímu studiu a Doc. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D. a MUDr. Petru Lukešovi, Ph.D. za cenné rady při vzniku dizertační práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu IGA MZ ČR 9466-3 a GAUK 8808.

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 kládla 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. Exprese 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

8. OBSAH

1. ÚVOD	9
<i>1.1 Tonzilární karcinomy</i>	<i>10</i>
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Příznaky a diagnostika	11
1.1.3 Léčebný postup	12
1.1.4 Uzliny	13
1.1.5 Volba léčebné modality	14
<i>1.2 Charakteristika lidských papillomavirů</i>	<i>17</i>
1.2.1 Stavba virionu HPV	18
1.2.2 Životní cyklus viru	19
1.2.3 Integrace	20
1.2.4 HPV a tonzilární karcinomy	20
<i>1.3 Přehled dosavadních důkazů o souvislosti HPV infekce s tonzilárními karcinomy</i>	<i>21</i>
1.3.1 Epidemiologie	21
1.3.2 Molekulárně biologické důkazy	24
1.3.2.1 Přítomnost DNA	24
1.3.2.2 Přítomnost RNA	24
1.3.2.3 Protein p16	24
1.3.2.4 Mutace p53	25
1.3.3 Sérologie	25
1.3.4 Prognostické rozdíly	26
<i>1.4 Možnosti detekce HPV infekce, jejich význam pro klinickou praxi</i>	<i>27</i>
1.4.1 Detekce HPV DNA	27
1.4.2 Detekce RNA	27
1.4.3 Detekce p16 a p53 pomocí imunohistochemie	28
1.4.4 Sérologie	28
1.4.5 Výplachy dutiny ústní	29
2. CÍLE PRÁCE	30
3. METODIKA	31
3.1 Soubor pacientů	31
3.2 Vzorky tkáně tumoru	31
3.3 Krev.	32
3.4 Cytologie.	32
3.5 Izolace DNA a RNA	32
3.5.1 Parafinové bločky s biopsiemi.	32
3.5.2 Cytologie.	33
3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	34
3.6.1 PCR kontrolního genu u DNA/RNA z parafinových řezů	34

3.6.2 PCR detekce HPV v DNA extrahované z tkáně v parafinových blocích pomocí GP5+/6+ primerů	35
3.6.3 PCR detekce HPV v DNA extrahované z tkáně v parafinových blocích pomocí GP5+/GP6+BIO primerů	35
3.6.4 PCR detekce HPV DNA u výplachů.	36
3.6.5 Diskrepantní vzorky	36
3.6.6 Detekce HPV16 E6*I mRNA	36
3.6.6 Detekce HPV16 E2 mRNA	37
3.7 Analýza PCR produktů Southern blotem	38
3.8 Určení typů HPV metodou obrácené hybridizace	39
3.9 Určení typu HPV sekvenací	39
3.10 Imunohistochemie	39
3.11 Sérologické testy	40
3.11.1 Příprava antigenů	40
3.11.1.1 Příprava kapsid (virus-like particles, VLP)	40
3.11.1.2 Příprava rekombinantních bakteriálních proteinů E6 a E7 viru HPV16	41
3.11.2 Detekce specifických protilátek proti HPV	41
3.11.2.1 Protilátky proti VLP	41
3.11.2.2 Protilátky proti onkoproteinům HPV16 E6 a E7	42
3.11.3 Vyhodnocení	43
3.12 Statistická analýza	43
4. VÝSLEDKY	45
4.1 Demografické charakteristiky/parametry	45
4.2 Klinicko-patologické charakteristiky	48
4.3 Typově specifická HPV DNA prevalence	49
4.4 Prevalence HPV DNA ve výplachích dutiny ústní	49
4.5 Prevalence HPV-specifických protilátek	51
4.6 Detekce markerů aktivní virové infekce	52
4.7 Analýzy přežití	59
5. DISKUZE	63
6. ZÁVĚRY	69
7. Literatura	72
10. Příloha	80

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)¹⁻³. Nejvyšší prevalence HPV DNA je standardně nalézána ve tkáni karcinomů patrových tonzil (dále TC = tonsilar cancer)⁴⁻⁶. U této podskupiny nádorů se také pomocí vedlejších markerů podařilo nejsilněji prokázat kauzální souvislost virové infekce se vznikem nádoru.

Karcinomy hlavy a krku obecně představují světově přibližně 5 - 7% všech nádorových onemocnění⁷. Celosvětové studie uvádějí, že se ročně vyskytne mezi 400 000 a 500 000 nových případů a zhruba poloviční počet pacientů ročně na toto onemocnění umírá⁷.

Incidence nádorů hlavy a krku je přibližně 3-4x vyšší u mužů než u žen, i když se tento rozdíl u některých nádorů v posledních dekádách lehce stírá. Lze vysledovat významné geografické rozdíly ve výskytu – obecně jsou tyto nádory častější v Indii a v jihovýchodní Asii, ale i v západní Evropě a ve Spojených státech amerických (kde je popsána vyšší incidence u příslušníků afro-americké rasy než u bělochů). V Evropě byla pozorována vzrůstající incidence směrem od severu k jihu – vysoký výskyt nádorů hlavy a krku je tradičně popisován ve Francii, nízký výskyt ve Švédsku⁵ a Finsku⁴.

Hlavní rizikové faktory zodpovědné přibližně za 3/4 nádorů jsou kouření cigaret a konzumace alkoholu. Jejich současným užíváním se jednotlivá rizika nesčítají, ale násobí⁸. Bylo prokázáno, že riziko vzniku nádoru stoupá s užitou dávkou (až do určité hranice⁹ - jak alkoholu, tak cigaret) a délkou užívání^{10, 11}.

Jako další možné rizikové faktory, podložené menším množstvím dat, jsou uváděny dietní faktory (zejména deficit v příjmu vitamínů)¹², žvýkání tabáku¹³ nebo betelových ořechů¹⁴. K méně průkazným rizikovým faktorům patří například užívání konopí, úroveň ústní hygieny a další. Řada studií se zabývá i vztahem individuálních genetických dispozic k riziku vzniku karcinomů hlavy a krku¹⁵.

Humánním papillomavirům, jakožto nezávislému rizikovému faktoru, je věnována samostatná část této práce.

Pojem "nádory hlavy a krku" je v literatuře používán velmi často, nicméně je nutné mít na paměti, že představuje velmi heterogenní skupinu a to z několika hledisek. Především se na hlavě a krku může vyskytnout řada nádorů různého původu a různé histologické struktury. V převážné většině případů se pojem „nádory hlavy a krku“ používá ve zúženém významu pro dlaždicobuněčné karcinomy horních cest dýchacích a polykacích. I v rámci této kategorie nalézáme nádory značně odlišné. Tato heterogenita však nespočívá jen v různých nádorových sublokality, ale i v jejich patologicko-anatomických odlišnostech, expozici a vlivu rizikových faktorů a v epidemiologických charakteristikách. Typickým příkladem jsou nádory nosohltanu, které jsou specifické svými rizikovými faktory a většinou i po stránce mikroskopické morfologie. I ze skupiny nádorů s předpokládanými stejnými rizikovými faktory a podobnou morfologií se pravděpodobně budou vyčleňovat podskupiny nádorů se specifickými vlastnostmi, jak o tom svědčí příklad HPV pozitivních nádorů. Identifikace takových podskupin bude patrně v budoucnosti hrát významnou roli při volbě léčby, která by měla být stále více individualizována až k ideálu terapie „šité na míru“.

Obecně se zdá, že větší výpovědní hodnotu mají studie věnované buď jedné přesně definované sublokality nebo ty, v nichž jsou jednotlivé sublokality studovány odděleně.

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 tonzilárními karcinomy, které lze chápat jako model virově indukovaného nádoru oblasti hlavy a krku.

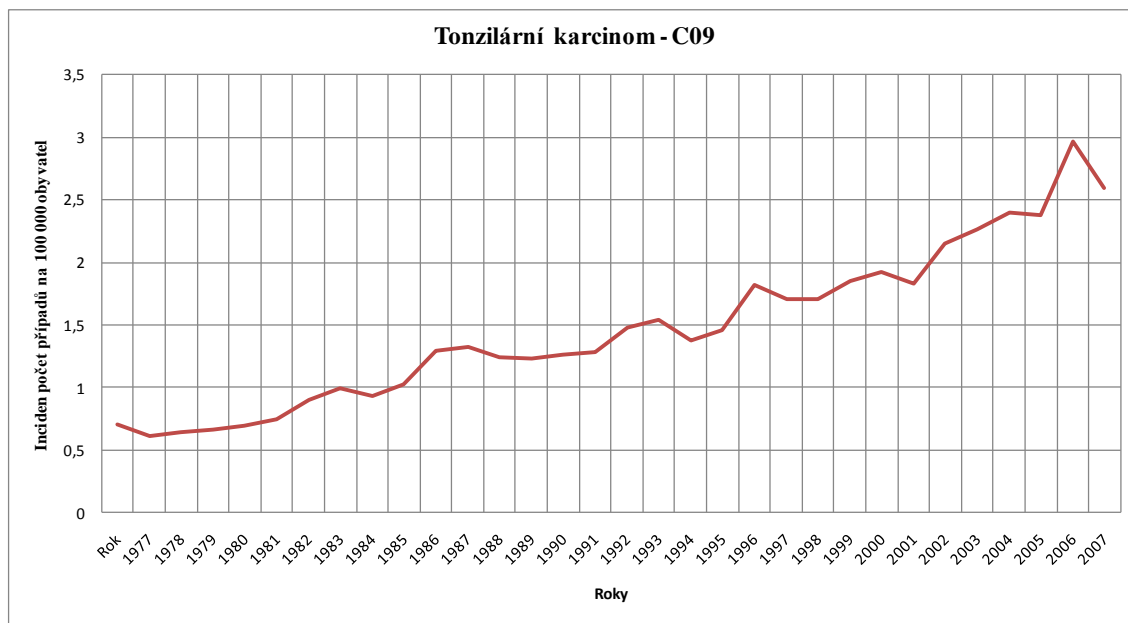
1.1 Tonzilární karcinomy

1.1.1 Epidemiologie

Dlaždicobuněčné tonzilární karcinomy patří mezi nejčastější zhoubné nádory orofaryngeální oblasti. Jejich incidence je v současné době v České republice $3,8/10^5$ u mužů a $1,1/10^5$ u žen¹⁶. Výskyt těchto nádorů neustále stoupá, za posledních 30 let došlo v ČR zhruba k trojnásobnému vzestupu incidence a tento růst dále pokračuje.

Situace v jiných evropských zemích a v USA je v podstatě podobná. Ve Finsku stoupla incidence TC v posledních padesáti letech dvakrát⁴, ve Švédsku v posledních třiceti letech

tříkrát¹⁷. Ve Spojených státech amerických byl popsán statisticky významný meziroční vzestup incidence TC v posledních 20 letech v kategorii pacientů mladších šedesáti let¹⁸.



Graf 1. Vývoj incidence TC v České republice v posledních 30ti letech; zdroj: www.svod.cz¹⁹

1.1.2 Příznaky a diagnostika

Dominantní obtíží, se kterou se pacienti většinou dostaví k lékaři, je dysfagie či odynofagie, někteří pozorují přítomnost krve ve slinách, nebo si stěžují na bolesti vystřelující do ucha na straně nádoru (způsobené drážděním nervus glossopharyngeus). U některých pacientů mohou být tyto příznaky zaměněny za zánětlivé onemocnění hltanu a neřídka jsou tyto nemocní opakovaně léčeni antibiotiky. Varovným signálem by v tomto případě měla být jednostrannost obtíží a asymetrický nález v oblasti tonzil by měl být prakticky vždy pečlivě vyšetřen k vyloučení nádoru. V některých případech však pacient žádné obtíže nemá a prvním příznakem je až objevení se regionální metastázy.

Z diferenciálně diagnostického hlediska se v patrových mandlích mohou vedle dlaždicobuněčných karcinomů tvořit extranodální lymfomy, popřípadě adenokarcinomy. Benigní nádory jsou vzácné, u dětí se mohou vyskytnout hemangiomy nebo lymfangiomy, u dospělých pak nejčastěji papilomy.

Diagnostika tonzilárních karcinomů začíná aspekcí a palpací. Pro poměrně častý výskyt duplicitních tumorů, je vždy nutné provést vyšetření celé ORL oblasti. Po odběru biopsie a verifikaci procesu je většina pacientů indikována k provedení panendoskopie v celkové narkóze k přesnějšímu posouzení rozsahu a operability nádoru a k vyšetření oblastí, které nejsou dostupné při ambulantním vyšetření, jako je například oblast jícnu.

Rozsah nádoru a přítomnost regionálních metastáz zpřesní použití zobrazovací metody - nejčastěji CT (computer tomography = počítačová tomografie), v některých případech MR (magnetická rezonance).

1.1.3 Léčebný postup

Po provedení všech vyšetření je v interdisciplinárním týmu rozhodnuto o volbě léčebné modality. Na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol je nejčastěji volena u resektabilních nádorů primárně chirurgická terapie. K dispozici je několik operačních přístupů, které jsou voleny podle rozsahu tumoru. Nejkonzervativnějším postupem je perorální resekce, která se uplatňuje u velmi malých nádorů a u TC přichází v úvahu zřídka. Častěji je zde perorální přístup použit v kombinaci s přístupem zevním. Další možností je laterální nebo mediální faryngotomie, při které je hltan otevřen na laterální stěně nebo ve valemule glosopiglotické. Mandibula není při těchto postupech dotčena a představuje kraniální omezení operačního pole. Expozice tonzilární jámy je při laterální faryngotomii dostatečná. Pokud se tumor šíří kraniálněji, je třeba zvolit rozsáhlejší přístup. Tím je dočasná mandibulotomie, při které je protnuta mandibula nejčastěji před výstupem třetí větve trigeminu. Řez tak přechází intraorálně a oblast tumoru je široce exponována. V případě že se tumor šíří do bezprostřední blízkosti mandibuly, k čemuž nejčastěji dochází v oblasti retromolárního trigona, je nezbytné resekovat laterální segment mandibuly. Tato operace se nejčastěji nazývá transmandibulární bukofaryngektomie a patří k nejrozsáhlejším výkonům pro TC.

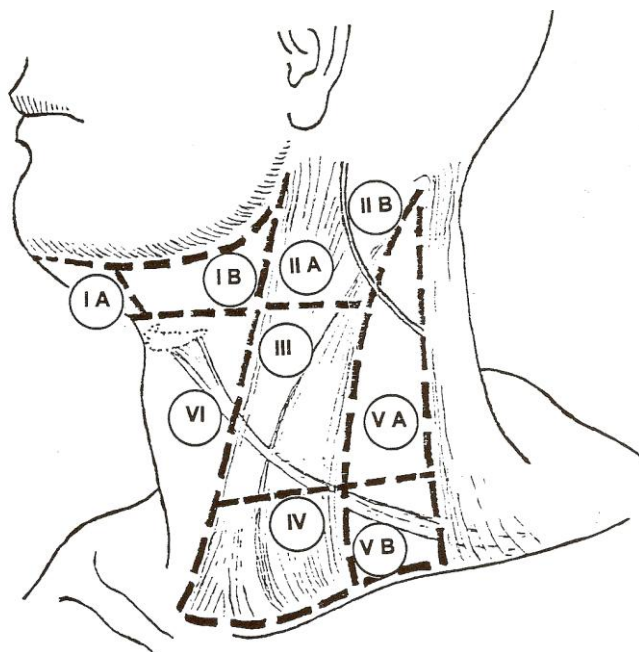
Se vzrůstající radikalitou výkonu se zvětšují následky pro pacienta a klesá kvalita jeho života po léčbě²⁰. Operace ze zevního přístupu jsou prakticky vždy spojeny s blokovou resekci krčních uzlin. Pooperační radioterapie, případně chemoradioterapie, je indikována u většiny pacientů na základě histologického nálezu v oblasti primárního tumoru a uzlin.

Další možností primární léčby je radioterapie, v případě pokročilejších nádorů chemoradioterapie. V odborné veřejnosti probíhá celosvětová diskuze ohledně indikací primární konzervativní léčby u pacientů s dlaždicobuněčnými karcinomy orofaryngeální oblasti a názory na vhodnost této léčby se stále různí. V některých zemích je drtivá většina pacientů s tonzilárními karcinomy léčena primární radioterapií a k operačnímu řešení je přistoupeno až v případě recidivy nebo persistence nádoru. Podobně jako u karcinomu hrtanu byly i u TC v rámci studií použity tzv. "orgán zachovávající nebo záchovné protokoly", kdy byly pacientovi nejprve aplikovány dvě série chemoterapie a o léčebné modalitě bylo rozhodnuto na základě odpovědi na tuto indukční chemoterapii. Tento postup se dnes prakticky nepoužívá a pojem záchovné protokoly je v současnosti spíše užíván v širším smyslu pro každou nechirurgickou léčbu.

1.1.4 Uzliny

Vzhledem k tomu, že tonzilární karcinomy jsou typické častým regionálním šířením, součástí léčby je téměř u všech pacientů i léčba krčních uzlin. Léčebná modalita se zde řídí podle toho, jak byl léčen primární tumor. V případě chirurgie je léčbou krčních uzlin bloková disekce, pokud je primární léčbou radioterapie, jsou ozařována i krční pole. Zajímavá je otázka léčby krčních uzlin v případě, že na základě vyšetření není suspekce na jejich postižení. Vzhledem k častému výskytu subklinických metastáz je u všech TC od klasifikace T2 a výše elektivní léčba krčních uzlin indikována. Rozsah blokové disekce u N0 není přesně stanoven, ale zpravidla jde o selektivní blokovou disekci krčních uzlin v rozsahu I až III (viz. obr.1). Využívá se i peroperační histologické vyšetření a v případě nálezu pozitivní uzliny je výkon rozšířen i na další oblasti.

Na některých pracovištích byla experimentálně používána i identifikace sentinelové uzliny, ale oblast tonsily se pro použití této metody nejeví optimální.



Obr.1 Klinické rozdělení oblastí na krku (použito z: Betka, J.; Černý, E. *Atlas chirurgie hlavy a krku*²¹⁾)

1.1.5 Volba léčebné modality

Jak již bylo uvedeno, existují v principu dvě základní varianty postupu. Chirurgická a nechirurgická. U malých nádorů bez regionálních metastáz je možno zpravidla vystačit s jedinou modalitou tedy buď samostatnou radioterapií, nebo limitovaným chirurgickým výkonem. V případě pokročilejších nádorů je posuzováno, zda je tumor radikálně operabilní, zda celkový pacientův stav dovoluje podstoupit náročný chirurgický výkon a jaký typ rekonstrukce bude potřeba použít po resekci tumoru.

Při volbě léčebné modality hraje významnou roli i úvaha o následcích léčby pro pacienta a funkci po ukončení léčby. Chirurgická léčba s sebou nese často určitou mutilaci, která může zhoršovat pacientovo společenské nebo pracovní uplatnění. Funkční postižení se týká především polykání. To je mnohdy zhoršeno významněji po chemoradioterapii než po chirurgické ablaci.

Jak chirurgické, tak konzervativní postupy, mají své výhody i nevýhody. V současné době neexistuje ve světové literatuře randomizovaná studie, která by srovnávala onkologické a funkční výsledky těchto modalit mezi sebou. Výhodou chirurgie je možnost přizpůsobit adjuvantní léčbu histologickému nálezu. Kromě pooperační klasifikace pN, která se může od

klinické klasifikace lišit, je to případná mikroskopická pozitivita okraje resektátu a přítomnost perivaskulární nebo perineurální invaze. Významnou roli zde hraje kromě radikality výkonu na primárním nádoru i znalost uzlinových prognostických faktorů.

Z hlediska uzlinového nálezu patří k prognosticky nepříznivým faktorům kromě vyšší klasifikace pN přítomnost extrakapsulárního šíření a vyšší počet postižených uzlin. Znalost těchto znaků je významným vodítkem pro dávkování radioterapie na oblast krku a pro rozhodnutí, zda jako adjuvantní léčba bude použita samotná radioterapie nebo konkomitantní chemoradioterapie. Nevýhodou chirurgie je přítomnost jizev a dle rozsahu resekce menší nebo větší pooperační deformita. Pacient zároveň musí být v celkovém stavu, který dovoluje několikahodinovou celkovou anestezii.

Výhoda konzervativních postupů spočívá především ve vyhnutí se chirurgickému výkonu a s ním související mutilaci. Nevýhodou je, že moderní účinná schémata konkomitantní chemoradioterapie mají poměrně vysokou toxicitu jak akutní tak i chronickou. Podmínkou podání je dobrý celkový stav, zejména ledvinné a jaterní funkce, což u skupiny pacientů s nádory hlavy a krku, kteří jsou charakterizováni abusem tabáku a alkoholu, může zužovat indikaci.

Akutní toxicita může vést k nedodržení léčebného plánu a tím zhoršení výsledků u části nemocných. Chronické toxicitě nebyla dosud věnována větší pozornost a zdá se, že významně zhoršuje kvalitu života části nemocných. Polykací obtíže charakteristické pro agresivní konkomitantní režimy v některých případech po léčbě neodezní a pacienti zůstávají závislí na gastrostomii.

Určitou naději do budoucna představuje cílená terapie. Z hlediska nádorů horních dýchacích a polykacích cest jde dnes zejména o blokaci metabolické cesty epidermálního růstového faktoru. Monoklonální protilátka cetuximab se naváže na receptor a brání jeho dimerizaci a tím blokuje spuštění metabolické cesty. Preparát prokázal v kombinaci s radioterapií účinnost srovnatelnou s chemoradioterapií u pokročilých karcinomů hlavy a krku při nižší toxicitě a tím vyšší adherenci k léčbě^{22, 23}. V současné době probíhají studie různých režimů kombinujících biologickou terapii s klasickou chemoterapií a zářením s cílem zvýšit účinnost léčby při současném omezení toxicity.

Další možnou cestou omezení toxicity léčby je větší individualizace léčby. K tomu by mohla přispět i naše práce týkající se virové etiologie části TC. HPV pozitivní nádory mají

odlišné klinické vlastnosti od nádorů indukovaných tabákem, čehož bude v blízké budoucnosti bezesporu využíváno při plánování léčby

1.1.6 Prognóza

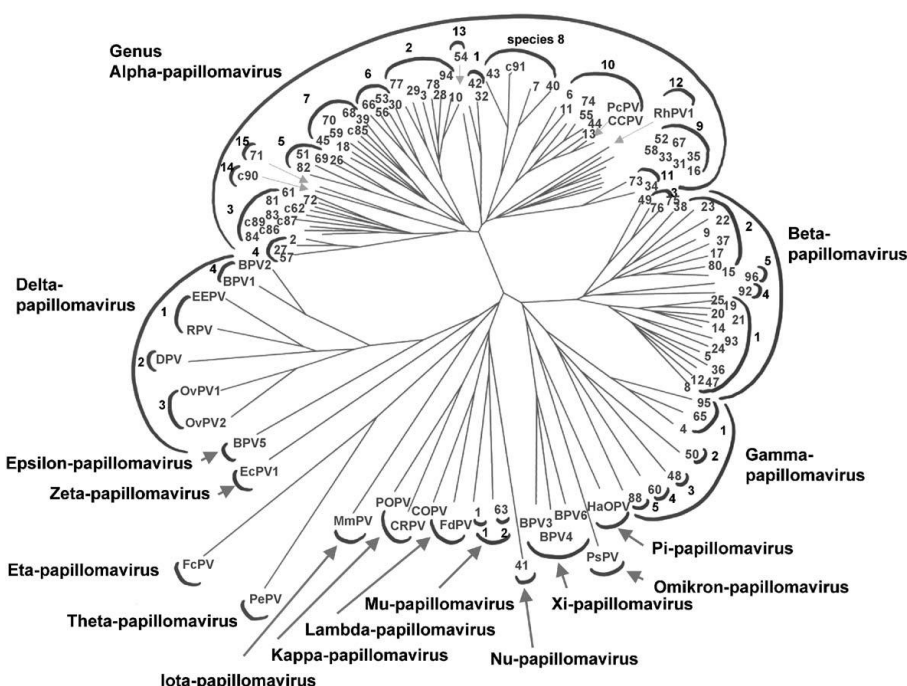
Prognóza pacientů s tonzilárním karcinomem zůstává v posledních 30 letech bez významnějších změn. Přes pokroky radioterapie, zavádění nových účinnějších chemoterapeutik a vývoj chirurgie, především zavedení řady nových rekonstrukčních technik, se pětileté přežití pohybuje již mnoho let okolo 50%. Prognóza závisí na velikosti tumoru - velmi zhrubně lze říci, že pětileté přežití je u T1 80%, u T2 60%, u T3 40% a T4 20%. Dalším významným prognostickým faktorem je přítomnost a rozsah regionálních metastáz. Tradičně je uváděno, že přítomnost nádorem postižených krčních uzlin zhoršuje prognózu o 50%. Na základě výsledků novějších studií se zdá, že význam postižení uzlin u TC je menší než se původně uvádělo^{24, 25}. Tento fakt může být dán zvětšujícím se podílem HPV pozitivních nádorů.

1.2 Charakteristika lidských papillomavirů

Na začátku 20. let minulého století se objevila první zmínka o infekčním původu kožních bradavic. Několik desetiletí poté provedli Rous a spol.²⁶ několik studií, jimiž byl prokázán vztah HPV a karcinogeneze. Papillomaviry (Human papillomaviruses – HPV) pak byly poprvé elektronopticky vizualizovány v r.1949. V roce 2008 byla udělena Nobelova cena profesoru Haraldu zur Hausenovi za objev kauzální souvislosti HPV infekce se vznikem cervikálního karcinomu u žen.

V současnosti je definováno více než 100 jednotlivých typů HPV a vzhledem k tomu, že není možné tyto viry snadno pěstovat v tkáňových kulturách, je systém jejich klasifikace založen na porovnání podobnosti nukleotidové sekvence genomů jednotlivých izolátů²⁷.

Čeď *Papillomaviridae* je rozdělena na rody označované řeckými písmeny, dále dělené do druhů označovaných čísly. Nejčastěji se v patologii člověka vyskytuje rod alfa. Papillomaviry jsou obecně přísně druhově specifické.



Obr.2 Fylogenetický strom zahrnující sekvenci 118 typů papillomavirů. Číslo na koncích jednotlivých větví označují HPV typ. Použito a upraveno z E.-M. de Villiers a spol., 2004²⁸

HPV u člověka cíleně napadají buňky epitelu sliznic a kůže. Podle toho, zda způsobují benigní nebo maligní léze, jsou děleny na vysoce a nízko rizikové (high/low-risk HPV)²⁸. Nízko rizikové typy způsobují vznik benigních lézí (laryngeální papilomatóza, solitární papilomy či veruky, v genitálních oblastech - condylomata accuminata nebo genitální bradavice), vysoce rizikové typy, z nichž nejčastější je HPV 16, 18, 31, 33, jsou schopny způsobit maligní transformaci buněk slizničního epitelu²⁹.

Nejlépe prostudovaným zhoubným nádorem způsobeným infekcí vysoce rizikovými typy HPV je karcinom děložního čípku u žen. V dnešní době je etiologická souvislost HPV infekce prokázána i u karcinomů vulvy, vaginy, anu, penisu a dalších³⁰. Souvislosti HPV se vznikem nádorů hlavy a krku bude věnována samostatná část textu.

1.2.1 Stavba virionu HPV

Virová partikule HPV měří přibližně 55nm, skládá se z dvoušroubovice cirkulární DNA (o délce cca 8000 pb) a kapsidy, kterou tvoří z většiny pentamerické molekuly hlavního kapsidového proteinu a několik málo molekul vedlejšího kapsidového proteinu. Hlavní kapsidový protein je produktem L1 ORF, který je vysoce konzervovaný mezi jednotlivými typy papillomavirů.



Obr. 3. Virová partikule HPV

HPV viry jsou neobalené, což je činí poměrně stabilními vůči vnějšímu prostředí. Jsou odolné vůči změnám teploty a zůstávají infekční i mimo hostitele.

Genom HPV se obecně skládá z oblasti "časných" (E1-E9) a "pozdních"(L1, L2) genů a z nekódující oblasti zvané "long control region" (LCR).

1.2.2 Životní cyklus viru

Hlavním cílem viru je infikovat buňku, která proliferuje a diferencuje se (bazální buňky epitelu sliznic a kůže). Proliferace a diferenciaci buňky je nutná k množení viru – spolu s buněčnou S-fází probíhá replikace episomální virové DNA. Virus je v proliferujících buňkách přítomný v latentní formě a virové proteiny jsou exprimovány pouze v malém množství (E1 a E2, viz níže). V buňkách procházejících diferenciací pak dochází k přeskupení jednotlivých oblastí virového genomu, virus přejde do aktivní fáze a zahájí tak intenzivnější transkripci svých proteinů (nejprve časných, následně pozdních). Navzdory skutečnosti, že v buňkách procházejících diferenciací normálně k syntéze DNA již nedochází, replikace virové DNA v těchto buňkách pokračuje právě vlivem časných virových proteinů a vzniká tak vysoký počet kopií virového genomu³¹.

Klíčovým dějem pro transformaci buňky v nádorovou je exprese velkého množství (tedy "overexpresi") virových onkoproteinů E6 a E7 (viz. Tab. 1).

Tabulka 1. Stručný přehled funkcí jednotlivých transkripčních produktů HPV genomu

E1	ATP-dependentní helikáza, která v kooperaci s E2 iniciuje replikaci virové DNA.
E2	Transkripční faktor, který usnadňuje vazbu E1 na DNA a působí jako represor pro expresi proteinu E6.
E4	Protein se schopností destrukce keratinové sítě, usnadňuje uvolnění virových partikul z buňky.
E5	Drobný hydrofobní protein se schopností vazby a aktivací signální cesty EGFR receptoru, který dále inhibuje expresi tumorsupresorového genu pro p21.
E6	Protein se schopností vazby na protein p53, čímž působí jeho degradaci cestou ubiquitinizace. Dále zvyšuje aktivitu telomerázy a oběma mechanismy tak brání apoptóze.
E7	Protein se schopností vazby mnoha buněčných proteinů. Nejvýznamnější je vazba na protein pRb, kterou dojde k uvolnění transkripčního faktoru E2F, který facilituje syntézu cyklinů a způsobí tak posun buněčného cyklu.
L1	L1 je kódován L1 ORF, což je vysoce konzervovaný úsek HPV genomu mezi velkým množstvím HPV typů, jeho produktem je hlavní kapsidový protein.
L2	Vedlejší kapsidový protein

1.2.3 Integrace

Stále nevyřešenou otázkou v oblasti nádorů hlavy a krku je proces integrace HPV do genomu hostitelské buňky.

V buňkách cervikálních karcinomů bylo popsáno, že virový genom je téměř vždy integrován do genomu hostitelské buňky. Integrace viru je dokonce některými autory považována za rozhodující krok v rozvoji prekursorových cervikálních lézí do stadia invazivního karcinomu³².

Tím, že se virový genom integruje do DNA hostitelské buňky, dojde k porušení kódující oblasti pro časné proteiny E1 a E2 a k potlačení jejich exprese. Snížená exprese E2, coby represoru transkripce proteinů E6 a E7, způsobí nadměrnou produkci E6 a E7 vedoucí k významné selektivní růstové výhodě infikované buňky. Tak vzniká invazivní nádor³³.

V oblasti nádorů hlavy a krku byla otázka integrace viru studován několika autory s různorodými výsledky. Mellin a spol.³⁴ popisuje přítomnost pouze episomálního (tedy extrachromosomálního) viru ve všech 12 studovaných HPV pozitivních tumorech v souboru³⁵, zatímco další autoři pozorovali přítomnost jak integrované, tak episomální formy a u části vzorků přítomnost obou forem virového genomu^{36, 37}.

Zásadní rozdíl v jednotlivých pracích, které jsou tím pádem obtížně srovnatelné, je metoda použitá ke stanovení přítomnosti integrace. Většina dosud provedených prací na toto téma u nádorů hlavy a krku používá detekci přítomnosti E2 genu na úrovni DNA (ať už metodou PCR nebo hybridizací). Nově je však za nesrovnatelně přesnější považováno stanovení expresního profilu tohoto proteinu, tedy stanovení na úrovni mRNA^{38, 39}. Právě tato metoda byla použita v naší studii.

Z výše uvedeného je zřejmé, že k porozumění formě viru v buňkách nádorů hlavy a krku jsou nezbytné další studie na větších souborech.

1.2.4 HPV a tonzilární karcinomy

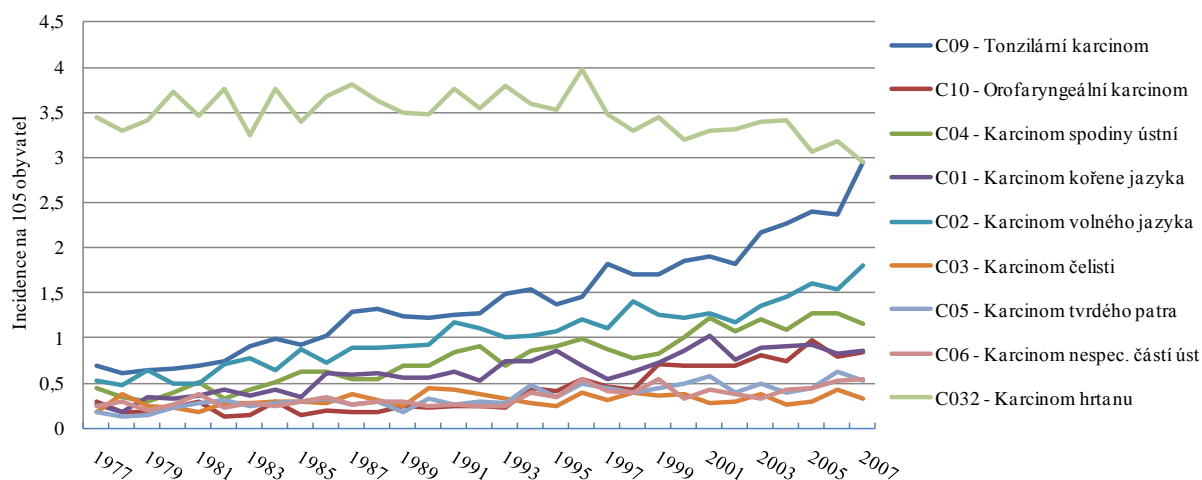
Dosud nebylo jasně vysvětleno, proč je HPV infekce nejvíce rozšířena v patrových tonzilách. Jedno z pravděpodobných vysvětlení předpokládá, že hlavní význam má přítomnost hlubokých krypt vystlaných jednovrstevným epitelem, což vytváří jednak velkou plochu epitelu přístupnou virové infekci a dále toto uspořádání usnadňuje průnik k bazálním vrstvám epitelu, které jsou pro virus cílové⁴⁰⁻⁴². V kryptách je navíc nižší mechanická

obměna epitelových buněk. Někteří autoři přirovnávají tonzilární epitel k epitelu děložního hrdla a tím vysvětlují jeho větší náchylnost k HPV infekci.

1.3 Přehled dosavadních důkazů o souvislosti HPV infekce s tonzilárními karcinomy

1.3.1 Epidemiologie

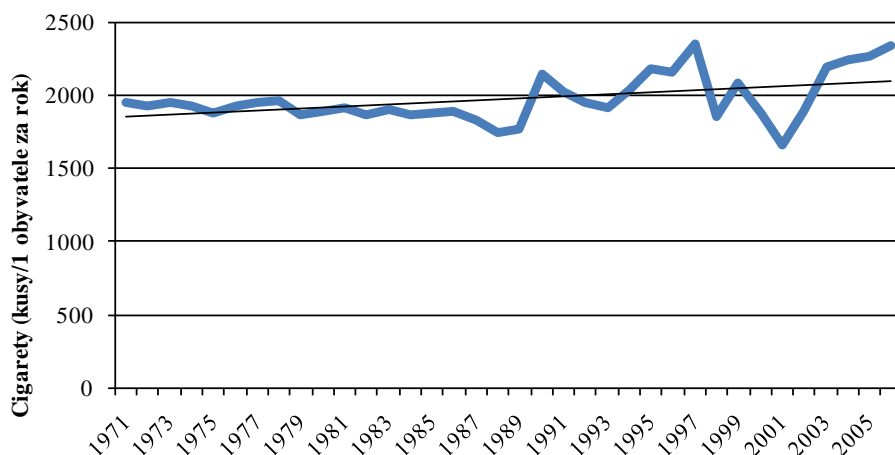
Jak bylo zmíněno výše, incidence tonzilárních karcinomů ve všech evropských zemích, i ve Spojených státech amerických, stoupá. Naproti tomu incidence například karcinomu hrtanu, který je obecně považován za jeden z prototypů kouřením indukovaného onemocnění, celosvětově klesá. V zemích, kde byly úspěšné protikuřácké kampaně, například ve Spojených státech amerických, došlo k poklesu konzumace tabáku a v návaznosti na to, přibližně s dvacetiletou latencí, k poklesu incidence tabákem indukovaných karcinomů. Uvádí se, že incidence těchto nádorů je závislá na prevalenci kuřáků a bývalých kuřáků v populaci. Zároveň se však ukazuje, že v zemích úspěšných v omezení kouření dochází k vzestupu incidence nádorů s pravděpodobnou virovou etiologií (tedy karcinomů kořene jazyka, orofaryngu a dutiny ústní)⁴³.



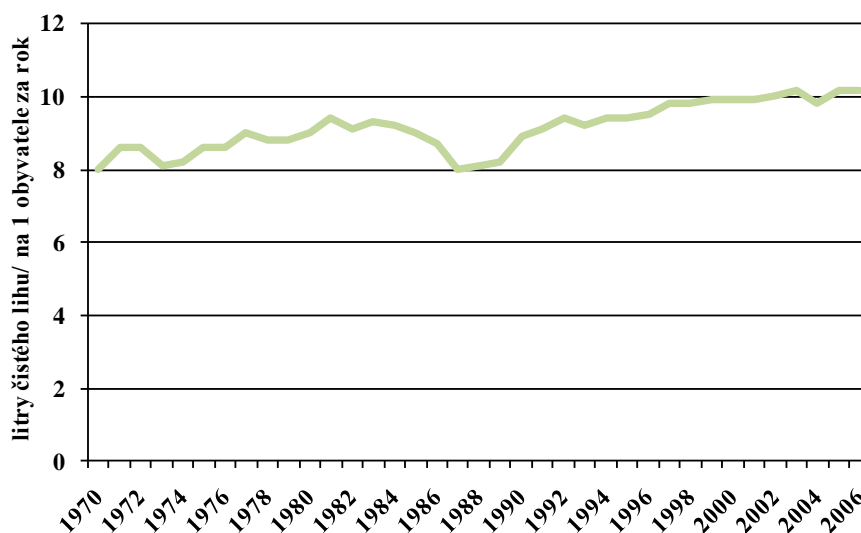
Graf 2. Vývoj incidence dle jednotlivých nádorových lokalizací v České republice za posledních 30 let; zdroj: www.svod.cz¹⁹

Situace v evropských zemích je velmi podobná. Ve Finsku stoupla incidence TC v posledních padesáti letech dvakrát⁴, ve Švédsku v posledních 30 letech třikrát¹⁷. V obou těchto zemích došlo ve sledovaném období k významnému omezení konzumace tabáku.

V České republice bohužel data o spotřebě cigaret nesvědčí o tom, že by lidé méně kouřili, nicméně kuřáctví přibývá jen minimálně, zatímco incidence TC stoupla v ČR za posledních 30 let trojnásobně.



Graf 3. Vývoj spotřeby cigaret v ČR za posledních 30 let vypočtený z jejich nákupu, zdroj: SZÚ



Graf 4. Vývoj spotřeby alkoholu v ČR za posledních 30 let, zdroj: SZÚ

Práce švédských autorů významně přispěla k důkazům o etiologické souvislosti HPV a TC tím, že dokumentovala vzrůstající podíl tonzilárních karcinomů, v jejichž tkáni je přítomna HPV DNA během jednotlivých desetiletí⁵. Stejný trend prokázali později tito autoři i u karcinomů kořene jazyka⁴⁴ a demonstrují tak nejen vzrůstající incidenci těchto nádorů, ale i vzrůstající proporce HPV pozitivních nádorů jako důsledek epidemie HPV infekce v populaci.

Další velkou skupinou demografických dat naznačujících etiologický význam HPV u TC jsou životní zvyklosti pacientů. Ty se v mnoha pracích vzájemně liší u pacientů s HPV pozitivními a negativními nádory.

Celá řada studií zabývajících se rizikovými charakteristikami skupin pacientů s HPV pozitivními karcinomy hlavy a krku opakovaně prokázala, že ve skupině pacientů postižených HPV pozitivním karcinomem je významně vyšší podíl nekuřáků a lidí bez nadměrné konzumace alkoholu^{2, 45} než ve skupině pacientů s HPV negativními nádory.

Applebaum a spol. ve své studii popsali, že kouření a alkohol statisticky nezvýšilo riziko vzniku karcinomu hlavy a krku u pacientů séropozitivních na HPV (viz. níže), zatímco u nekuřáků či subjektů s mírnou konzumací alkoholu zvýšila séropozitivita HPV toto riziko třicetkrát⁴⁶. Můžeme to chápat jako statistické vyjádření poznatku, že papillomavirová infekce je zcela nezávislý etiologický faktor rozvoje části tonzilárních karcinomů.

Několik studií bylo věnováno způsobu přenosu HPV v souvislosti s nádory orofaryngeální oblasti. Jak již bylo zmíněno výše, HPV je nutnou podmínkou rozvoje cervikálního karcinomu. Zároveň je genitální HPV infekce označována jako vlastně nejčastější pohlavně přenosné onemocnění a genitoanální oblast je považována za rezervoár HPV infekce. K dalším důkazům sdílení HPV infekce patří například průkaz vyššího výskytu TC u manželů žen postižených cervikálním karcinomem⁴⁷ nebo vyšší výskyt HPV v dutině ústní u zdravých studentů v souvislosti s líbáním a orálním sexem⁴⁸.

Jiné práce prokázaly, že riziko rozvoje orálního či orofaryngeálního karcinomu stoupá s vyšším počtem sexuálních partnerů, praktikováním orogenitálního sexu, popřípadě s nižším věkem prvního pohlavního styku^{1, 49}. Byl vysloven i předpoklad, že se přenos může uskutečňovat u jednoho jedince při nedostatku osobní hygieny.

Zároveň je pravděpodobné, že dochází i k vertikálnímu přenosu infekce, protože byla HPV infekce nalezena i v bukálních stěrech u novorozenců a mladších dětí^{50, 51}.

1.3.2 Molekulárně biologické důkazy

1.3.2.1 Přítomnost DNA

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

Nejčastěji zastoupeným typem v těchto karcinomech je HPV 16, méně často pak HPV 18, 33, 35, 26, 52 a 58, Výskyt nízkorizikových typů HPV je v těchto karcinomech vzácný.

V tonzilární tkáni pacientů bez nádorového onemocnění (většinou se jedná o vzorky získané po tonzilektomii pacientů s chronickou tonzilitis, tonzilární hypertrofií atd.) se prevalence HPV DNA pohybuje okolo 8%⁴.

Jednotlivé nádorové lokalizace se liší proporcí HPV DNA pozitivních nádorů. Významná proporce takto charakterizovaných nádorů (mimo TC) je v oblasti kořene jazyka, méně pak v oblasti dutiny ústní. Jak bylo zmíněno výše, v nejvyšší míře jsou HR HPV DNA pozitivní nádory zastoupeny u tonzilárních karcinomů. Prevalence HPV DNA u TC se v jednotlivých publikovaných souborech liší – Näsman a spol. popsali prevalenci HPV DNA v TC mezi lety 2006-2007 ve Švédsku – 93%⁶, Klussmann a spol. v Německu 55%⁵², v našem souboru je prevalence 65%⁵³.

1.3.2.2 Přítomnost RNA

Vznik karcinomu na podkladě HPV infekce je podmíněn kontinuální expresí velkého množství virových onkoproteinů E6 a E7 (pro popis jejich funkce viz Tabulka 1.). Zároveň bylo zjištěno, že lze ve tkáni karcinomu nalézt E6 a E7 mRNA, která tak velmi citlivě značí kauzální vztah infekce s rozvojem daného maligního onemocnění.

Zatím jen několik studií zkoumalo tuto problematiku v oblasti nádorů hlavy a krku^{54, 55}. Například Lindquist a spol. popsali přítomnost E6 mRNA v 79% HPV 16 DNA pozitivních TC a zároveň i v 94% takto pozitivních vzorků našli E7 mRNA⁵⁵.

1.3.2.3 Protein p16

Další z důkazů etiologické souvislosti HPV infekce s určitou částí nádorů hlavy a krku poskytuje pozitivita těchto nádorů na některé imunohistochemické markery, které byly popsány u cervikálních karcinomů a které reflektují aktivitu virových onkoproteinů v nádoru. Nejvýznamnějším z těchto proteinů je inhibitor cyklin-dependentní kinázy – p16, který patří do rodiny INK4a. K jeho overexpresi dochází na základě buněčné deregulace

způsobené onkoproteinem E7. Ten váže protein pRb, potlačí tak jeho funkci a na základě zpětné vazby pak dojde k overexpresi p16⁵⁶.

1.3.2.4 Mutace p53

Mutaci tumorsupresorového genu TP53 lze ve skupině nádorů hlavy a krku obecně prokázat velmi často, což je považováno za důsledek mutagenního vlivu kouření na buňky sliznice horních cest dýchacích a polykacích.

U HPV pozitivních tumorů však bylo zjištěno, že se mutace TP53 vyskytuje v signifikantně nižší míře než u nádorů HPV negativních. Na základě těchto zjištění pak byla formulována hypotéza, že HPV pozitivní tumory vznikají jako důsledek potlačení funkce tumorsupresorových proteinů (v tomto případě proteinu p53 onkoproteinem E6) a liší se tak od nádorů HPV negativních, jejichž podkladem je mutace v genech pro tyto významné buněčné regulátory. Potlačení funkce p53 jeho blokací navíc pravděpodobně není funkčně ekvivalentní poruše funkce vzniklé mutací, což by mohlo vysvětlovat lepší reakci HPV pozitivních karcinomů hlavy a krku na léčbu zářením (viz dále). Mutace v TP53 byla totiž popsána jako nositel radiorezistence a tím pádem i horší prognózy.

1.3.3 Sérologie

Výsledky studií opakovaně prokázaly, že pacienti s HPV pozitivními nádory hlavy a krku mají v séru detekovatelné hladiny HPV specifických protilátek. Jedná se jak o protilátky proti kapsidovým antigenům viru, tak o protilátky proti výše zmíněným virovým onkoproteinům E6 a E7. Výzkum v oblasti karcinomu děložního hrdla pomohl objasnit, že přítomnost protilátek proti kapsidovým antigenům je důsledkem přirozené infekce HPV, zatímco protilátky proti E6 a E7 proteinům vznikají až při invazivním nádorovém onemocnění. Naše i další výsledky potvrzují, že přítomnost protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 velmi dobře koreluje s HPV pozitivitou nádoru. V našem souboru pacientů s TC byla anti-E6 nebo anti-E7 pozitivita nalezena v 85% pacientů s HPV pozitivním TC, zatímco u HPV negativních TC pouze v 5%.

1.3.4 Prognostické rozdíly

Ve výčtu důkazů, které máme zatím k dispozici pro tvrzení, že HPV pozitivní karcinomy hlavy a krku představují komplexně odlišnou entitu, než nádory HPV negativní, by neměla chybět zmínka o odlišné reakci těchto tumorů na léčbu.

V mnohých studiích, jejichž počet mimochodem stále roste, bylo prokázáno, že HPV pozitivní karcinomy na léčbu reagují většinou lépe než karcinomy HPV negativní. Zprvu se zdálo, že jsou pouze radiosenzitivnější⁵⁷, což vysvětlovala výše zmíněná teorie, že vliv onkoproteinu E6 na funkci p53 není tak významný pro reakci buňky na poškození, jako mutace v jeho genu. Buňky HPV pozitivních nádorů tak mají zřejmě do určité míry zachovánu schopnost apoptózy v reakci na záření.

Jiné práce však dokumentovaly lepší výsledky přežití i u pacientů léčených pouze chirurgicky⁵⁸, což naznačuje, že dochází k mnohem komplexnějším dějům, než pouze ke zvýšení radiosenzitivity. Nespornou, ale zatím málo objasněnou roli v protinádorové reakci organismu, hraje i imunogenicitu viru.

Zajímavý je vztah HPV a tradičně užívaných prognostických markerů jako je např. TNM klasifikace. V posledních desetiletích je obecně míra postižení lymfatických uzlin metastatickým nádorem (spolu s velikostí tumoru) považována za jedno z nejvýznamnějších ukazatelů přežití. HPV infekce však byla opakovaně prokázána jako nezávislý pozitivní prognostický faktor⁵⁷. Straetmans a spol. v nedávné studii prokázali, že v případě tonzilárních karcinomů (vzhledem k významnému zastoupení HPV pozitivních tumorů) nemá klasifikace N prognostický význam⁵⁹. Naznačené lepší výsledky přežití logicky vyvolávají diskuzi, zda by mohli být pacienti s HPV pozitivními karcinomy hlavy a krku například ušetřeni části léčby, která má většinou významný dopad na jejich kvalitu života.

Současné práce, včetně naší, souhrnně ukazují, 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 odliší HPV indukované nádory od těch, kde mohlo například dojít pouze k náhodné superinfekci.

1.4 Možnosti detekce HPV infekce, jejich význam pro klinickou praxi.

1.4.1 Detekce HPV DNA

HPV DNA je možno prokázat ve tkáni tumoru pomocí několika metod. Jedná se o vyšetření buď přímo ve tkáni, nebo po izolaci DNA.

Nejčastěji je používána metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) DNA izolované z tumorózní tkáně za použití primerů cílených do konzervovaných úseků papillomavirového genomu (např. L1), identifikujících přítomnost celé řady typů HPV v jedné reakci nebo typově specifických primerů. V případě použití obecných primerů je dále k určení přesného typu HPV po provedení PCR prováděna např. metoda obrácené hybridizace – RLB – "reverse line blot", která umožňuje typizaci až 37 HPV typů v jednokrokové reakci. Pokud hybridizační reakce neurčí jasně, o který HPV typ se jedná, je pak možno použít sekvenaci (detailněji viz metodická část).

Další možností průkazu přítomnosti HPV DNA ve tkáni nádoru je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), která používá fluorescenčně označené próby kompatibilní k úsekům DNA specifickým pro vybrané typy HPV (např. HPV 16).

1.4.2 Detekce RNA

Studie na rozsáhlých souborech vzorků cervikálních tumorů ukázaly, že nalezení virové DNA ve vzorku ještě nutně neznačí aktivně probíhající infekci, tedy tu, která je klíčová pro maligní transformaci buněk. Pouze informuje o přítomnosti viru, ale neříká nic o jeho transkripční aktivitě.

Ukázalo se, že ke stanovení klinicky významné infekce je vhodnější použít detekci virové mRNA ve tkáni tumoru. Nejnovější studie navíc prokazují, že toto vyšetření nevyžaduje zmraženou tkáň, ale že detekce je velmi výtěžná i z tkáně fixované ve formalinu a uchovávané v parafínu.

Nicméně i přesto, že je stanovení exprese virových onkoproteinů obecně přijímáno jako zlatý standard průkazu transformující papillomavirové infekce, jedná se o technicky a finančně náročnou metodu. Metoda sice velmi dobře poslouží pro výzkum této problematiky, ale pravděpodobně nebude rutinně využitelná v klinické praxi.

1.4.3 Detekce p16 a p53 pomocí imunohistochemie

Velmi dobře dostupnou a v patologicko-anatomických laboratořích dnes rutinně používanou metodou je imunohistochemie. Bylo opakovaně prokázáno, že pozitivita p16 velmi dobře koreluje s HPV DNA i RNA pozitivitou tumorů hlavy a krku a lze ji tak považovat za velmi spolehlivý nepřímý marker klinicky relevantní HPV infekce⁶⁰. Bylo dokonce navrženo, aby byla imunohistochemická detekce p16 (například z ekonomických důvodů) prováděna samostatně, bez nutnosti "ověření" přítomnosti viru pomocí PCR či jiné detekce virových nukleových kyselin. Autoři se však shodují na tom, že nejvyšší citlivosti a specificity je dosaženo kombinací imunohistochemie p16 a PCR detekce HR HPV DNA. Dle dostupných výsledků vykazuje kombinace těchto markerů srovnatelnou citlivost a specificitu pro průkaz aktivní infekce jako je technicky náročná detekce virové mRNA.

1.4.4 Sérologie

Sérologická detekce HPV specifických protilátek je využívána zejména v séroepidemiologických studiích.

Jak bylo popsáno výše, imunitní systém reaguje na papillomavirovou infekci mimo jiné tvorbou virově-specifických protilátek, které je možné detekovat pomocí enzymoimunoanalýzy (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay = ELISA). Protilátky proti hlavnímu kapsidovému proteinu viru (L1) vznikají u části infikovaných osob jako reakce na přirozenou infekci a v laboratorních podmínkách se v současné době pro jejich detekci používají tzv. viru podobné částice (virus-like particles, VLP). Ty se spontánně tvoří při vysoké expresi L1 proteinu v rekombinantních expresních systémech (baculoviry/hmyzí buňky, kvasinky atp.) a po důkladném vyčištění slouží jako antigen. Pro detekci protilátek proti časným antigenům (onkoproteinům E6 a E7 vysoce rizikových typů HPV, především HPV16), jejichž tvorba je usnadněna integrací virové DNA do genomu buňky, se používají fúzní proteiny virových antigenů s glutation-S-transferázou (GST), připravované v bakteriálních expresních systémech.

Na základě dnes již mnoha dostupných dat je zřejmé, že anti-VLP protilátky nejsou použitelné pro detekci invazivního onemocnění, ať už děložního hrdla nebo sliznice horních cest dýchacích a polykacích. Naopak přítomnost anti-E6/E7 velmi dobře koreluje s přítomností nádorového onemocnění. Předběžné výsledky též ukazují, že u pacientů s HPV pozitivními karcinomy hlavy a krku bývá hladina anti-E6/E7 dokonce několikanásobně vyšší, než je tomu u pacientek s invazivním karcinomem cervixu a že tato hladina po

úspěšné léčbě klesá. Jejich opětovná přítomnost v séru pacienta by pak mohla být užitečným časným markerem recidivy onemocnění. Studie, které by měly tento předpoklad potvrdit, jsou v běhu a výsledky můžeme očekávat v blízké budoucnosti.

1.4.5 Výplachy dutiny ústní

V několika studiích bylo testováno cytologické vyšetření na principu izolace DNA a následné detekce HPV v deskvamovaných epitelích z výplachu dutiny ústní. Přítomnost virové DNA ve výplachu velmi dobře korelovala s přítomností HPV pozitivního nádoru (zejména v orofaryngeální oblasti)⁶¹. Několik prací navíc ukázalo i shodu ve variantách nebo typech viru přítomných ve tkáni tumoru jako v buňkách výplachu u jednotlivých pacientů^{62,34}. Dle nejnovějších výsledků představuje cytologické vyšetření orálního výplachu další neinvazivní metodu pro HPV infekci orální a orofaryngeální oblasti, která v kombinaci se sérologií vykazuje vysokou citlivost i specificitu³⁴.

2. CÍLE PRÁCE

- Zjistit prevalenci a typovou specificitu HPV v homogenní skupině dlaždicobuněčných karcinomů tonzil 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 s ohledem na možné využití 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

3.1 Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti léčení na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole mezi lety 2001 – 2007 s primárním histopatologicky ověřeným dlaždicobuněčným karcinomem patrových tonzil (MKN-10: C09.0; C09.1; C09.8; C09.9).

Koncept studie byl schválen etickou komisí FN v Motole a ÚHK T v Praze. Pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie a vyplňovali dotazníky, které se týkaly kouření a konzumace alkoholu, dále zjišťovaly vzdělání, pracovní a sociální anamnézu a sexuální chování. Pacienti i kontroly provedli při zařazení výplach dutiny ústní (cytologie) a bylo jim odebráno 10 ml krve.

Pacienti zařazení do studie byli klinicky sledováni po celou dobu trvání studie a jsou nadále v dispenzarizaci.

Ke každému subjektu byla sestavena dokumentace obsahující informace o zdravotním stavu při zařazení, o způsobu léčby, odpovědi na ni a o stavu pacienta v průběhu dlouhodobého sledování. Do studie tak bylo celkem zařazeno 109 pacientů. Data byla uložena spolu s klinickými údaji a výsledky prováděných laboratorních vyšetření v digitální podobě k dalšímu počítačovému zpracování. Dotazníky i další údaje byly zpracovávány anonymně, spolupracovníci zadávající data do počítače byli z laboratorního pracoviště a neměli přístup k datům identifikujícím jednotlivé pacienty.

3.2 Vzorky tkáně tumoru

Všichni pacienti s výjimkou tří byli léčení chirurgicky. Během výkonu byl odebrán vzorek tkáně makroskopicky z nádoru velikosti cca 5x5mm a odeslán zmrazený do laboratoře Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK. U tří pacientů, kteří chirurgicky léčení nebyli, byl odebrán bioptický vzorek v lokální anestézii a zpracován stejným způsobem jako u perioperačně získané tkáně (viz dále).

Patolog obdržel dva oddělené vzorky, z nichž jeden byl zamražen na teplotu -70° a archivován pro další/budoucí vyšetřování. Druhý vzorek byl fixován v 10% neutrálním pufrovaném formolu a následně zalit do parafinu. Z každého parafinového bločku byl vždy první z řezů vyšetřen patologem, zda obsahuje minimálně 10% nádorových buněk, následné dva řezy byly uchovány pro izolaci nukleových kyselin a pro imunohistochemii,

poslední řez pak byl opět zhodnocen, zda obsahuje potřebné množství nádorové tkáně. Řezy pro imunohistochemickou analýzu byly připraveny společně s řezy pro PCR.

Pro další vyšetřování byly zařazeny pouze ty vzorky, které podléhaly výše popsaným kritériím.

3.3 Krev

Od všech pacientů bylo odebráno při vstupu do studie, měsíc a rok po ukončení léčby, 10 ml srážlivé krve. Materiál jsme skladovali při +4°C a transportovali do laboratoře nejdéle jeden den po odběru. Sérum bylo odděleno stáčením při 1600 otáčkách 10 minut a uloženo v alikvotech při – 20°C.

3.4 Cytologie

Cytologie byla odebrána od pacientů dle následujícího postupu: pacient si vypláchl ústa 5 ml sterilního roztoku kuchyňské soli, 30 vteřin kloktal a vyplivl obsah do 10 ml sterilní zkumavky. Materiál jsme skladovali při +4°C a transportovali do laboratoře nejdéle jeden den po odběru. Od pacientů byly cytologické vzorky odebírány před léčbou a rok po ukončení léčby.

Buňky získané orálním výplachem jsme v laboratoři promyli fyziologickým roztokem (každý vzorek byl třikrát centrifugován při 3000 rpm), následně jsme v Bürkerově komůrce určili počet basálních a spinocelulárních epitelálních buněk, což umožnilo standardizovat množství buněk použitých dále pro izolaci DNA (průměrné počty basálních buněk $10^4 - 10^5/ml$ a spinocelulárních buněk $10^4 - 10^5/ml$). Buňky jsme skladovali v alikvotech při –70°C.

3.5 Izolace DNA a RNA

3.5.1 Parafinové bločky s biopsiemi.

HPV DNA a RNA byly izolovány z 20µm parafinových řezů. Kontrolní řezy čistého parafinu byly vytvořeny po každém čtvrtém vzorku tkáně, aby se předešlo případně

kontaminaci. Nůž mikrotomu, stejně jako veškeré použité nástroje, byly ošetřeny etanolem po manipulaci s každým jednotlivým vzorkem tkáně.

Parafin z řezů jsme odstranili xylenem a DNA jsme izolovali inkubací při 55°C v lyzačním pufru s 200 µg/ml proteinázy K. Po inaktivaci proteinázy K jsme připravené hrubé lyzáty skladovali při teplotě -20°C. V průběhu studie jsme zavedli novou metodu extrakce, která umožňuje izolovat z parafinových řezů nejen DNA, ale i RNA. DNA i RNA ze vzorků s číslem 100 a výše byla izolována za použití Recover All Total Nucleic Acid Isolation kit (Applied Biosystems). Pomocí tohoto kitu jsme parafin z řezů odstranili xylenem a vzorky inkubovali s Digestion pufrem a proteinázou K při 50°C 3 hodiny a poté jsme polovinu vzorku odebrali pro izolaci RNA. Izolace RNA začala přidáním Isolation aditive ke vzorku a promícháním. Po přidání etanolu jsme vzorek nanесли na připravené kolonky, stočili a promyli roztokem Wash 1 a Wash 2/3. Kolonku jsme dále inkubovali s DNázou, opět promyli roztokem Wash 1 a Wash 2/3. RNA jsme vymyli Elution Solution a skladovali při -70°C do dalšího použití. Abychom snížili riziko, že izolovaná RNA je kontaminována DNA, podrobili jsme získanou RNA před reverzní transkripcí ještě samostatnému cyklu DNázování. RNA (2 µg) spolu s 2 µl U RQ1 DNase (Promega, WI, USA) a 2 µl DNase Buffer 10x (Promega, WI, USA) bylo v celkovém objemu 20 µl inkubováno 30 minut při teplotě 37°C, poté jsme přidali 1 µl SS stop solution (Promega, WI, USA) a inkubovali 1 minutu při 65°C.

DNA jsme izolovali z druhé půlky vzorku po 48 hodinové inkubaci. Postup izolace byl stejný jako pro RNA. DNA byla ze vzorku odstraněna inkubací s RNázou a dále skladována při -20°C.

3.5.2 Cytologie

DNA z výplachů jsme izolovali pomocí kitu Qiagen DNA Blood Midi Kit firmy Qiagen podle firemního protokolu. Po rozmražení vzorků při laboratorní teplotě jsme vzorky inkubovali společně s Protease Q a AL pufrem při 70°C 10 min. Ke vzorku jsme přidali 100% etanol a centrifugovali přes Qiagen kolonky. Kolonky jsme promyli pufrem AW1 a AW2. DNA jsme vymyli AE pufrem, přesráželi pomocí etanolu a rozpustili v 10 mmol/l Tris-HCl pufru na konečnou koncentraci DNA ze 7 500 buněk v 1 µl. Vzorky jsme skladovali při teplotě - 20°C. Na každých 7 vzorků jsme pro izolaci přidali jednu

mikrozkumavku s vodou pro monitorování eventuálního přenosu kontaminace mezi vzorky v průběhu jejich zpracování.

Jelikož publikace od D'Souza a spol.⁶³ prokázala vyšší výtěžnost izolace virové DNA metodu Gentra Puregene firmy Qiagen pro izolaci DNA z výplachů, rozhodli jsme se vybrané cytologické vzorky z našeho souboru touto metodou přešetřit.

Po rozmražení vzorků při laboratorní teplotě jsme zkumavky centrifugovali 5 min při 3 000 rpm. Odsáli jsme supernatant, přidali 300 µl roztoku lyzujícího buňky a 5 µl proteinázy K a inkubovali při 55°C 2 hodiny. Poté jsme přidali 1,5 µl roztoku RNAsy A a inkubovali při 37°C 15 min. Vzorky jsme zchladili na pokojovou teplotu, přidali 100 µl roztoku rozpouštějícího proteiny, intenzivně promíchali, uložili na led na pět minut a poté sedimentovali při 14 000 rpm. Supernatant jsme přenesli do čisté zkumavky, promyli 100% isopropanolem a 70% etanolem, stočili a supernatant odstranili. K sedimentu jsme přidali DNA pufr tak, aby výsledný objem obsahoval DNA ze 7 500 buněk v 1 µl a vzorek jsme inkubovali ještě hodinu při 65°C. Vzorek jsme skladovali při teplotě -20°C. Metodu jsme testovali na 25 vzorcích pro porovnání s předchozí metodou izolace. Pomocí metody Gentra Puregene jsme identifikovali o 20% více pozitivních vzorků, a proto jsme od června 2009 používali tuto metodu. Původně negativní vzorky jsme ze zmražených alikvótů přetestovali.

3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Čtyři µl DNA jsme amplifikovali v cykleru PTC 200 firmy MJ Research, Inc. Po dokončení amplifikace jsme 10 µl PCR produktu podrobili elektroforéze v 3 % agarózovém gelu (NuSieve 3:1, FMC BioProduct).

3.6.1 PCR kontrolního genu u DNA/RNA z parafinových řezů

Jako první byla provedena amplifikace kontrolního genu. Pozitivní výsledek amplifikace tohoto genu ukazuje na nepřítomnost inhibitorů a na dostatečné množství DNA ve vzorku. Fragment o délce 110 pb z genu pro lidský beta-globin jsme amplifikovali za pomoci primerů PC 03 (5' ACACA ACTGTGTTCTACTAGC 3') a PC 04

(5'CAACTTCATCCACGTTTACC 3')⁶⁴. Pokud byla amplifikace kontrolního genu neúspěšná, provedli jsme fenol-chloroformové přečištění výchozího materiálu a amplifikaci kontrolního genu jsme opakovali, ale pouze u vzorků izolovaných klasickou metodou. Padesát µl reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný reakční pufr (Fermentas), 4,0 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol každého ze čtyř dNTP, 0,05 pmol každého primeru (PC 03 a PC 04) a 2,5 U Taq polymerázy (Fermentas). Po počáteční denaturaci 5 minut při 95°C se každý ze 40 cyklů PCR skládal z denaturace 1 minutu při 95°C, při hybridizování primeru 2 minuty při 55°C a syntézy řetězce 2 minuty při 72°C. Pro dokončení syntézy všech řetězců jsme přidali na závěr tříminutovou inkubaci při 72°C.

3.6.2 PCR detekce HPV v DNA extrahované z tkáně v parafinových blocích pomocí GP5+/6+ primerů

U vzorků, u nichž byla amplifikace kontrolního genu pozitivní, jsme provedli detekci HPV pomocí obecných primerů GP5+ (5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3') a GP6+ (5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'), které amplifikují 150 pb dlouhý úsek v L1 genu (Snijders, 1990). Padesát µl reakční směsi obsahovalo 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,5; 50 mmol/l KCl, 3,5 mmol/l MgCl₂, 200 µM každého dNTP, 50 pmol primerů GP5+ a GP6+ a 1 U Taq polymerázy (Fermentas). Počáteční denaturace 5 min v 94°C byla následovaná 40 cykly, z nichž každý sestával z 1 min v 94°C, 2 min ve 40°C, 1,5 min při 72°C. Nakonec byl zařazen 1 cyklus pro dokončení syntézy řetězců 4 min při 72°C.

Tato metoda byla nahrazena vylepšenými primery a metodou reverzní hybridizace pro určení typu (viz. dále). Vzorky s čísly 1-100, které byly vyšetřeny původní metodou, byly přetestovány metodou novou. Vzorky s čísly vyššími než 100 byly analyzovány pouze metodou novou (viz další bod).

3.6.3 PCR detekce HPV v DNA extrahované z tkáně v parafinových blocích pomocí GP5+/GP6+BIO primerů

U vzorků, u nichž byla amplifikace kontrolního genu pozitivní, jsme provedli detekci HPV též pomocí obecných primerů stejných jako v bodě 3.6.2 s tou výjimkou, že primer GP6+ byl značený biotinem (GP6+BIO). Padesát µl reakční směsi obsahovalo 10 mmol/l

Tris-HCl, pH 8,5; 50 mmol/l KCl, 4 mmol/l MgCl₂, 200 μM každého dNTP, 0,5 pmol primerů GP5+ a GP6+ a 1 U AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems). Počáteční denaturace 5 min při 94°C byla následována 40 cykly, z nichž každý sestával z 90 sec při 94°C, 30 sec při 38°C, 80 sec při 71°C. Nakonec byl zařazen jeden cyklus pro dokončení syntézy řetězců 4 min při 71° (van den Brule a spol., 2002).

3.6.4 PCR detekce HPV DNA u výplachů

U vzorků DNA z výplachů jsme prováděli detekci a typizaci HPV pomocí GP5+/GP6+ BIO primerů popsanou výše.

3.6.5 Diskrepantní vzorky

U všech diskrepantních vzorků, tj. takových s pozitivním výsledkem na gelu a negativním při typově-specifické hybridizaci, jsme vzorky dále analyzovali pomocí PCR s degenerovanými primery MY 09 (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC 3') a MY 11 (5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'), amplifikujících 450 pb dlouhý úsek v L1 genu (CP PCR L1) (Manos a spol., 1989). Součástí reakce byly i primery GH20 a PC04 amplifikující kontrolní gen pro lidský b-globin, pro kontrolu integrity DNA a přítomnosti inhibitorů ve vzorku. Padesát μl reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný reakční pufr (Fermentas), 4,0 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol každého ze čtyř dNTP, 0,5 pmol každého primeru (MY 09 a MY 11), 0,05 pmol primerů GH20 a PC04 a 2,5 U Taq polymerázy (Fermentas). Po počáteční denaturaci 5 minut při 95°C se každý ze 40 cyklů PCR skládal z denaturace 1 minutu při 95°C, při hybridizování primeru 2 minuty při 55°C a syntézy řetězce 2 minuty při 72°C. Pro dokončení syntézy všech řetězců jsme přidali na závěr tříminutovou inkubaci při 72°C.

*3.6.6 Detekce HPV16 E6*I mRNA*

Ze směsi izolované a DNázou opracované RNA (2 μg) jsme cDNA připravovali metodou reverzní transkripce: 11 μl směsi s opracovanou RNA jsme inkubovali 10 minut při 70°C a poté přenesli na led na 5 minut. Po přidání 9 μl reakční směsi byla celá směs inkubována 90 minut při teplotě 37°C. Reakční směs obsahovala 50 U of M-MLV

reverzní transkriptázy (Promega, WI, USA); reakční pufr složený z 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 75 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l DTT (Promega, WI, USA); 20 U RNasin Plus inhibitoru RNAsy (Promega, WI, USA); 10 pmol směsi náhodných hexamerových primerů (Fermentas, Vilnius, Lithuania) a 10 pmol směsi nukleotidů (dNTPs).

Absenci kontaminující DNA jsme prokázali pomocí amplifikace interního kontrolního genu GAPDH (GAPDH-U: 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3' a GAPDH-L: 5' -CATGAGTCCTTCCACGATACCAA-3' amplifikující 288 bp dlouhý fragment⁶⁵). Dvacet pět mikrolitrů reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný pufr (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 4 mmol/l MgCl₂, 200 μM dNTPs, 5 pmol každého primeru a 1,25 U Taq-polymerázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Po počáteční denaturaci 5 minut při 95°C se každý ze 40 cyklů PCR skládal z denaturace 1 minutu při 94°C, při hybridizování primeru 1 minutu při 55°C a syntézy řetězce 1 minutu při 72°C. Po dokončení syntézy všech řetězců jsme přidali na závěr čtyřminutovou inkubaci při 72°C. Kvalita cDNA byla ověřena opět amplifikací kontrolního genu – v tomto případě genu pro lidský beta globin (délky 110pb), jak popsáno výše.

PCR specifickou pro HPV 16E6 onkoprotein jsme prováděli se 4 μl cDNA s primery, které amplifikují fragment dlouhý 86 pb⁵⁴ (5' TTAAGTGGGACGAGGTGTA 3' ; 5' GGAATCTTTGCTTTTGTCC 3'). Padesát mikrolitrů reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný pufr (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1,5 mmol/l MgCl₂, 200 μM dNTPs, 25 pmol každého primeru a 1 U Taq-polymerázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Po počáteční denaturaci 5 minut při 95°C se každý ze 40 cyklů PCR skládal z denaturace 1 minutu při 95°C, při hybridizování primeru 2 minuty při 55°C a syntézy řetězce 2 minuty při 72°C. Pro dokončení syntézy všech řetězců jsme přidali na závěr tříminutovou inkubaci při 72°C.

3.6.6 Detekce HPV16 E2 mRNA

Detekci genu pro HPV 16 E2 jsme prováděli na 4 μl DNA izolované z parafinových řezů. Použili jsme primery popsané v Cricca a spol.⁶⁶, které amplifikují 184 pb dlouhý fragment. Padesát mikrolitrů reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný pufr

(Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1,5mM MgCl₂, 200μM dNTPs, 25pmol každého primeru a 1U Taq-polymerázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Po počáteční denaturaci 5 minut při 95°C se každý ze 40 cyklů PCR skládal z denaturace 1 minutu při 95°C, přihybridizování primeru 2 minuty při 50°C a syntézy řetězce 2 minuty při 72°C. Po dokončení syntézy všech řetězců jsme přidali na závěr tříminutovou inkubaci při 72°C.

3.7 Analýza PCR produktů Southern blotem

Specificitu amplifikace primery MY 09/11 jsme potvrdili hybridizací PCR produktů na Southern blotech. Gel byl krátce depurinován v 0,25 mol/l HCl a ponořen na 10 minut do alkalického roztoku (0,6 mol/l NaCl, 0,4 mol/l NaOH) používaného pro přenos DNA na nylonovou membránu Biodyne B (Pall Biosupport). Membrána byla následně neutralizována v 1 mol/l Tris-HCl, pH 7,4 a 1,2 mol/l NaCl 15 minut. Hybridizaci jsme prováděli se směsí pěti 410 pb dlouhých prób specifických pro HPV11, 16, 18, 31, 51 a oligopróby pro lidský beta-globin. HPV próby jsme generovali a značili PCR za použití typově specifických primerů a DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim). Oligopróba pro lidský beta-globin je syntetizována s 5' koncem značeným digoxigeninem. Membránu se vzorky jsme prehybridizovali 2 hod při 42°C v prehybridizačním pufru (5x high grade SSC, 20% formamid, 0,1% ficoll, 0,01% BSA, 50 mM Na₂PO₄, 0,1% high grade SDS, 0,1 mg/ml Herring sperm DNA). K prehybridizačnímu roztoku jsme přidali próby a membránu hybridizovali přes noc při 42°C. Nespecificky navázanou próbu jsme odmývali při pokojové teplotě 2 x 5 min ve 30 ml roztoku A (2xSSC; 0,1%SDS) a dále při teplotě 50°C 3 x 30 min ve 300 ml roztoku B (0,5xSSC; 0,1%SDS). Detekci jsme prováděli s použitím "DIG-Wash and Block Buffer setu", "Anti-digoxigenin-AP" (FAB fragment), "CSPD ready-to-use" (Boehringer Mannheim). Membránu jsme ekvilibrovali ve 30 ml promývacího roztoku (WB) (0,1 mol/l kyselina maleinová, 0,15 mol/l NaCl, 0,3% Tween 20, pH 7,5), inkubovali 45 minut v blokovacím roztoku (BS) (0,1 mol/l kyselina maleinová, 0,15 mol/l NaCl, 3,5% blokovací reagens) a poté třicet minut v témže roztoku s FAB fragmentem. Promytí jsme prováděli 3 x 15 min ve 30 ml WB roztoku a ekvilibrovali 5 min v detekčním roztoku (0,1 mol/l Tris-Cl; 0,1 mol/l NaCl, pH

9,5). Ekvilibrovanou membránu jsme inkubovali s CSPD nejdříve při laboratorní teplotě 5 min, pak 15 min při 37°C. Membránu jsme exponovali 30 minut na "Lumi-Film Chemiluminescent Detection" (Boehringer Mannheim).

3.8 Určení typů HPV metodou obrácené hybridizace

Tato metoda umožňuje určení až 37 HPV typů v jedнокrokové reakci. Krátké typové specifické oligonukleotidy připravené komerčně jsme přes aminoskupinu na 5'konci kovalentně navázali na aktivovanou negativně nabitou membránu Biodyne C. Aktivaci membrány jsme provedli 16% 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimidem (EDAC). Po inaktivaci a promytí jsme membránu vložili do blotovacího zařízení MN45 (Inogmunetics). Na membránu jsme nanесли amplicony a inkubovali 1 hodinu při 42°C. Membránu jsme promyli a inkubovali se streptavidinovým konjugátem značeným peroxidázou po dobu 1 hodiny při 42°C. Po promytí jsme navázané amplicony detekovali chemiluminiscenčně pomocí ECL detekčního kitu (Amersham Biosciences) a membránu jsme exponovali na LumiFilm (Roche) po dobu 5 minut.

3.9 Určení typu HPV sekvenací

U vzorků, které po PCR ukázaly na gelu jasný proužek a u nichž nebyl typ určen reverzní hybridizací, jsme HPV typ určili sekvenací. Padesát mikrolitrů PCR produktu jsme izolovali z 2% agarózového gelu (NuSieve GTG agarose, FMC BioProducts) pomocí „MinElute Gel Extraction kitu“ (Qiagen), sekvenovali pomocí "BigDye Terminator Primer Cycle Sequencing kitu" (Perkin Elmer Corporation) a analyzovali na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 310 (Perkin Elmer Corporation).

3.10 Imunohistochemie

Imunohistochemickou analýzu jsme provedli na 2 µm parafinových řezech z histologických preparátů připravených jak popsáno výše. Použili jsme protilátky proti proteinu p16 (Purified Mouse Anti-Human p16, Clone G175-405, BD Pharmingen™, ředění 1:100) a protilátku proti proteinu p53 (Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, Dako, ředění 1:50). Deparafinizaci jsme provedli za použití

vzestupné řady alkoholů, za účelem demaskování antigenů byly preparáty podrobeny varu v citrátu (30 minut pro p16 a 40 minut pro p53). K blokadě vnitřní enzymatické aktivity jsme použili peroxid vodíku. Inkubace řezů s primární protilátkou vždy probíhala přes noc. Následující den jsme odmyli přebytek primární protilátky a tuto detekovali pomocí sekundární protilátky s chromogenem (3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid hydrát (Fluka)). Pro vizualizaci buněčných jader a orientaci v nádorové a normální tkáni jsme vzorky dobarvili hematoxylinem/eosinem. Následně bylo provedeno odvodnění preparátu ve vzestupné řadě alkoholů.

Jako pozitivní vnitřní kontrola pro p53 sloužilo pozitivní barvení bazálních keratinocytů normálního dlaždicobuněčného epitelu tonzilární nebo orofaryngeální sliznice. Jako pozitivní vnější kontrola byla použita pozitivita barvení jader buněk invazivního karcinomu prsu u pacientů s mutací TP53, Jako pozitivní kontrola pro detekci protein p16 sloužily dysplastické buňky cervikálního epitelu infikované HPV.

Výsledky imunohistochemie byly hodnoceny jak z hlediska intenzity (označeno + až +++), tak z hlediska proporce obarvených buněk oproti neobarveným (vyjádřeno v procentech). Pro statistické hodnocení jsme použili semikvantitativní vyjádření: vzorek byl považován za pozitivní na p53, pokud bylo zbarveno nejméně 10% buněk, a pozitivní na p16 v případě, když bylo obarveno minimálně 50% buněk a to jak v jádře, tak v cytoplazmě.

3.11 Sérologické testy

3.11.1 Příprava antigenů

3.11.1.1 Příprava kapsid (virus-like particles, VLP)

Hmyzí buňky Sf9 jsme pěstovali v suspenzi v TNM-FH hmyzím médiu s 10% fetálního telecího séra. Přibližně 4×10^9 buněk jsme infikovali rekombinantním baculovirem při multiplicitě infekce 10 PFU/buňku. Jednotlivé rekombinantní baculoviry nesou genetickou informaci pro obalový protein L1 různých typů HPV (6, 11, 16, 18, 31 a 33). Za 72 hodin po infekci jsme buňky sklídili, propláchli 1x PBS a peletované buňky zamrazili při -20°C .

Buněčný pelet jsme resuspendovali ve 40 ml extrakčního pufru (10 mmol/l MgCl_2 , 50 mmol/l CaCl_2 , 150 mmol/l NaCl, 0,01% Triton X-100, 20 mmol/l HEPES, pH 7,4) a sonikovali 3x30 s při 0°C , po odstředění jsme pelet znovu resuspendovali ve 40 ml

extrakčního pufru a celou proceduru zopakovali. Oba supernatanty jsme spojili a roztok nasýtili chloridem cesným do 30% koncentrace. Roztok jsme centrifugovali 22 hod při 45 000 otáčkách/min a 18°C, odebrali horní proužek, dialyzovali 30 min proti PBS a znovu dělili na CsCl „step“ gradientu (36%–30,5%–16%), 4 hod při 35 000 otáčkách/min, 18°C. Proužek jsme odebrali a přítomnost VLP jsme testovali SDS PAGE elektroforézou (koncentrace proteinů), Western blottingovou analýzou (antigenní specifita – denaturovaný protein) a ELISA testem se specifickými protilátkami (antigenní specifita – VLP (kapsomery)).

3.11.1.2 Příprava rekombinantních bakteriálních proteinů E6 a E7 viru HPV16

Rekombinantní bakterie *E. coli* BL21, nesoucí genetickou informaci pro virové onkoproteiny HPV16 E6 a E7 navázané na glutathion-S-transferázu (GST) a na 3'konci značené undekapeptidem, odvozeným z SV40 T antigenu (tag), jsme pěstovali v Luria Bertani mediu s 1 mmol/l ampicilinu. Poté, co bakteriální kultura dosáhla hodnoty optické denzity 0,5 (měřeno při 600 nm), indukovali jsme expresi rekombinantního proteinu přidáním isopropyl-β-D-thio-galaktosidu (IPTG) do konečné koncentrace 0,25 mmol/l. Šest hodin po indukci jsme buňky sklidili, pelet resuspendovali v PBS s 2 mmol/l DTT, 1% Tritonem X-100 a koktejlem inhibitorů proteáz a lyzovali sonikací 5x 30 s při 0°C. Zbytky buněk jsme z lyzátu odstranili centrifugací, určili jsme koncentraci proteinů, lyzát naředili 1:1 glycerolem a uložili při teplotě –20°C. Jako kontrolní antigen jsme stejným způsobem připravili lyzát rekombinantních bakterií, které nesly genetickou informaci pro GST a tag. Účinnost exprese jsme zjišťovali reakcí s monoklonální protilátkou proti tag.

3.11.2 Detekce specifických protilátek proti HPV

3.11.2.1 Protilátky proti VLP

Přítomnost specifických protilátek v sérech jsme testovali přímou metodou enzymatické imunoanalýzy (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay = ELISA). Jako antigen jsme používali kapsidy připravené z baculovirových rekombinant, které exprimují majoritní kapsidový antigen L1 (u typů 6, 16, 18, 31, 33) nebo oba kapsidové proteiny L1 a L2 (u typu 11). ELISA test jsme prováděli podle následujícího schématu:

jamky mikrotitračních destiček (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Denmark) jsme potahovali roztokem VLP v 50 μ l PBS v koncentraci 2 μ g/ml a to po dobu 2 hod při teplotě 37°C a přes noc při 4°C. Všechny další inkubace jsme prováděli po dobu 1 hodiny při 37°C, po každé inkubaci jsme jamky promývali pětkrát roztokem A (PBS, 0,21 mol/l NaCl, 0,1% Triton X-100). Potenciálně volná vazebná místa jamek jsme vysytili 1% roztokem BSA v PBS a po inkubaci k jamkám přidali v paralelách séra ředěná 1:25 v roztoku A s 1% BSA. Navázané protilátky jsme označili oslím imunoglobulinem proti lidskému IgG (H a L řetězec), konjugovaným s křenovou peroxidázou, ředěným 1:7 500 v roztoku A s 1% BSA a barevnou reakci jsme vyvolali 0,04% roztokem o-fenylendiaminu v 50 mmol/l fosfátovém–citrátovém pufru, pH 5,0 s 0,006% peroxidu vodíku. Reakci jsme zastavili přidáním 2 mol/l roztokem kyseliny sírové a vyhodnotili spektrofotometricky jako OD při 492 a 630 nm (Infinite 200 microplate reader, TECAN, Austria).

3.11.2.2 Protilátky proti onkoproteinům HPV16 E6 a E7

Přítomnost specifických protilátek v sérech jsme testovali sendvičovou enzymatickou imunoanalýzou. ELISA test jsme prováděli podle následujícího schématu: jamky mikrotitračních destiček (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Denmark) jsme potahovali 100 μ l roztoku konjugátu kasein–glutathion (2 μ g/ml) přes noc při teplotě +4°C. Všechny další inkubace jsme prováděli po dobu 1 hodiny při 37°C, po každé inkubaci jsme jamky promývali pětkrát roztokem B (PBS, 0,05% Tween 20). Potenciálně volná vazebná místa jamek jsme vysytili roztokem C (roztok B s 0,2% kaseinu) a po inkubaci k jamkám přidali příslušné rekombinantní proteiny v koncentraci 0,25 μ g/ml v roztoku C. Séra jsme ředili 1:50 v roztoku C s kontrolním antigenem (rekombinantní GST) v koncentraci 0,25 μ g/ml, takto naředěná séra jsme ponechali 30 minut při laboratorní teplotě a poté k jamkám přidali v paralelách. Navázané protilátky jsme označili oslím imunoglobulinem proti lidskému IgG (H a L řetězec), konjugovaným s křenovou peroxidázou, ředěným 1:10 000 v roztoku C a barevnou reakci vyvolali přidáním 0,01% roztokem tetrametylbenzidinu ve 100 mmol/l acetátovém pufru pH 6,0 s 0,003% peroxidu vodíku. Reakci jsme zastavili přidáním 1 mol/l roztokem kyseliny sírové a vyhodnotili spektrofotometricky jako OD při 450 a 630 nm.

3.11.3 Vyhodnocení

Na každé mikrotitrační destičce jsme vždy testovali standardní pozitivní a negativní sérum proti danému antigenu. Od hodnoty OD séra, získané na mikrotitrační destičce s virově–specifickým antigenem, jsme odečetli hodnotu OD stejného séra na destičce kontrolní (v případě VLP bez antigenu, v případě onkoproteinů GST). Pro každý antigen a destičku jsme spočítali hraniční hodnotu (cut-off) jako aritmetický průměr rozdílů OD plus 2 (VLP) respektive 3 směrodatné odchylky (onkoproteiny), vyloučili séra s rozdílem OD vyšším než hodnota spočtená a proceduru opakovali tak dlouho, až hodnota rozdílu OD žádného ze zbývajících sér nebyla vyšší.

Výsledky ELISA testů vyjadřujeme jako tzv. OD index (poměr mezi rozdílem OD daného séra a CO hodnotou). Testovaná séra s OD indexem vyšším než 1 jsme označili jako pozitivní. Pro konfirmaci výsledků jsme všechny vzorky s OD indexem do 10% nad hodnotou CO opakovali, stejně jako asi 25% vzorků z celého souboru.

3.12 Statistická analýza

Množství spotřebovaného tabáku bylo vyjádřené jako rok/balíček. Jeden rok/balíček znamená kouření 1 balíčku (20 cigaret) za den, po dobu 1 roku. Množství vypitého alkoholu bylo vyjádřené počtem dávek za týden. Dávkou alkoholu se rozumí 0,5 l piva, 0,2 l vína nebo 0,05 l destilátu. Při analýze rizikových faktorů byli pacienti rozděleni do skupin nekuřáci, bývalí kuřáci (kouřili pravidelně alespoň půl balíčku cigaret za týden po dobu jednoho roku nebo více, ale nebyli kuřáky v době diagnózy), a současní kuřáci. Podobné definice byly použity u konzumace alkoholu; abstinenti (nepili nikdy), bývalí pijáci (pili průměrně jednu dávku alkoholu nebo více za týden, ale nepili v době diagnózy) a současní konzumenti alkoholu.

Hraniční hodnoty pro kouření a spotřebu alkoholu byly vypočteny jako medián spotřeby skupiny HPV negativních pacientů (v našem souboru 33 cigaret/den, 15 dávek alkoholu/týden).

Pro porovnání parametrů kuřáckých zvyklostí pacientů s HPV pozitivními a HPV negativními tumory jsme použily 3 různé modely. V prvním jsme porovnávali počet

kuřáků a nekuřáků, ve druhém a třetím modelu jsme HPV pozitivní a negativní pacienty rozdělili vždy na 3 skupiny – kuřáky, bývalé kuřáky a nekuřáky (ve druhém modelu) a na silné kuřáky (kouřící více než hraniční hodnot – 33 cigaret/den), slabé kuřáky (<33 cigaret/den)

Pro porovnání průměrů kontinuálních proměnných mezi skupinami jsme použili t test.

Chi² test a v některých případech i Fisherův test jsme použili pro porovnání kategorických dat mezi jednotlivými skupinami.

V 2 x 2 tabulkách byly vypočteny poměry šancí (odds ratio = OR) s 95% intervaly spolehlivosti (confidence interval = CI) a hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pomocí programu EPI INFO statistical package (2002) a GraphPad InStat (version 3.00) (GraphPad Software, San Diego, CA). Veškeré testy byly dvoustranné. Korelace mezi proměnnými a pozitivitou na HPV byla hodnocena za použití logistické mnohorozměrné regrese, včetně postupné metody výběru kovariant (P value $\geq 0,1$).

Přežití bylo měřeno ve dnech od data diagnózy až po úmrtí či do data posledního kontaktu s pacientem. Datum úmrtí pacienta, který zemřel z jiné příčiny, než na sledovaný nádor bylo hodnoceno jako cenzurovaný údaj v analýze specifického přežití vztaheného k nádoru. Míry přežití byly odhadovány Kaplan-Meierovou metodou. Významnost rozdílu v přežívání mezi skupinou pacientů s HPV pozitivními a HPV negativními nádory byla vypočtena pomocí log-rank testu. Pomocí Coxovy mnohorozměrné regrese jsme ověřili faktory ovlivňující prognózu pacienta. Významnost byla vypočtena pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ (dvoustranný test). Devadesáti pěti procentní intervaly spolehlivosti pro OR byly počítány pomocí aproximace normálním rozložením.

Proměnné testované v Coxově regresním modelu byly: přítomnost HR HPV, věk, pohlaví, spotřeba cigaret, spotřeba alkoholu, histologický grading nádoru, velikost nádoru – pT podle klasifikace TNM dle UICC 1997, stav uzlinových metastáz – pN. Postupná metoda byla použita pro výběr proměnných, které přežívání ovlivňovaly (P $\geq 0,1$). Analýzy byly provedené pomocí programu SPSS (version 12; SPSS Inc., Chicago, IL).

4. VÝSLEDKY

4.1 Demografické charakteristiky/parametry

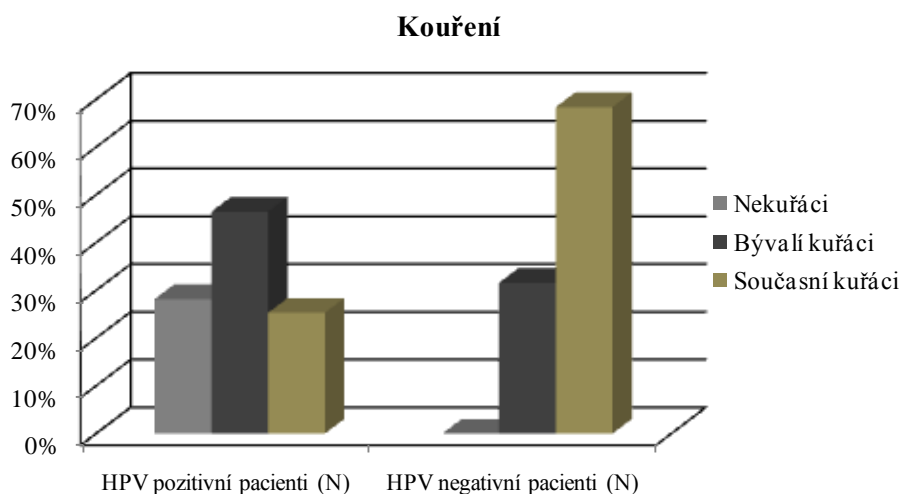
V souboru pacientů s TC použitým v této studii bylo 83% mužů a 17% žen. Z celkového počtu 109 vzorků bylo 65% (71/109) HR HPV DNA-pozitivních a 35% (38/109) HR HPV DNA-negativních v nádorové tkáni.

Demografické charakteristiky zobrazuje tabulka 2. 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.

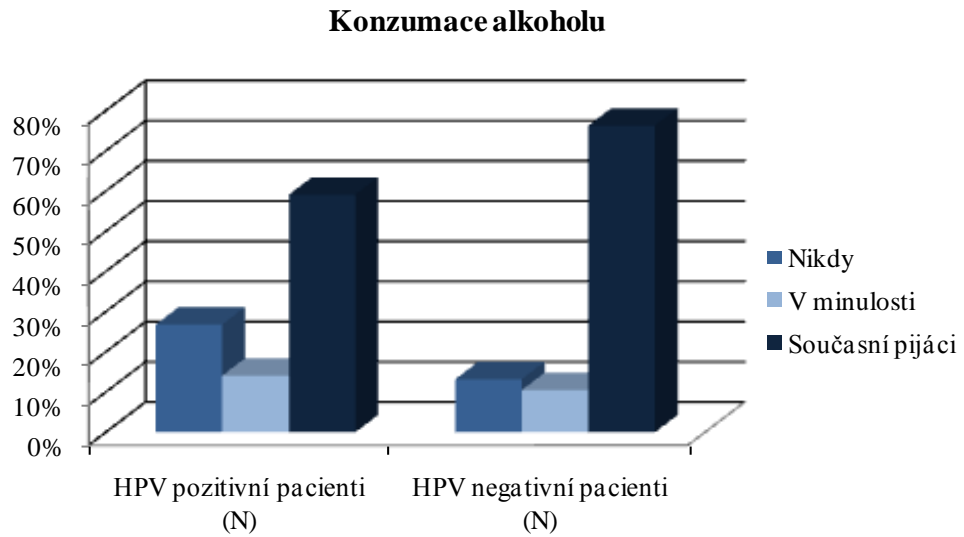
Signifikantní rozdíl jsme nenalezli ani v parametrech sexuálního chování, jako je počet sexuálních partnerů (≤ 6 vs. >6) (adj. $P=0,489$) či provozování orogenitálního (adj. $P=0,834$) a oro-análního (adj. $P=0,785$) sexu.

Významně se však pacienti s HPV pozitivními a negativními nádory vzájemně lišili v kuřáckých zvyklostech a to nezávisle na modelu, který byl pro srovnání použit (pro přesnější popis viz METODIKA). Mezi pacienty s HPV-pozitivním karcinomem bylo oproti těm s negativním karcinomem podstatně více nekuřáků, tyto pacienti byli zároveň méně často kuřáci a bylo mezi nimi méně těžkých kuřáků.

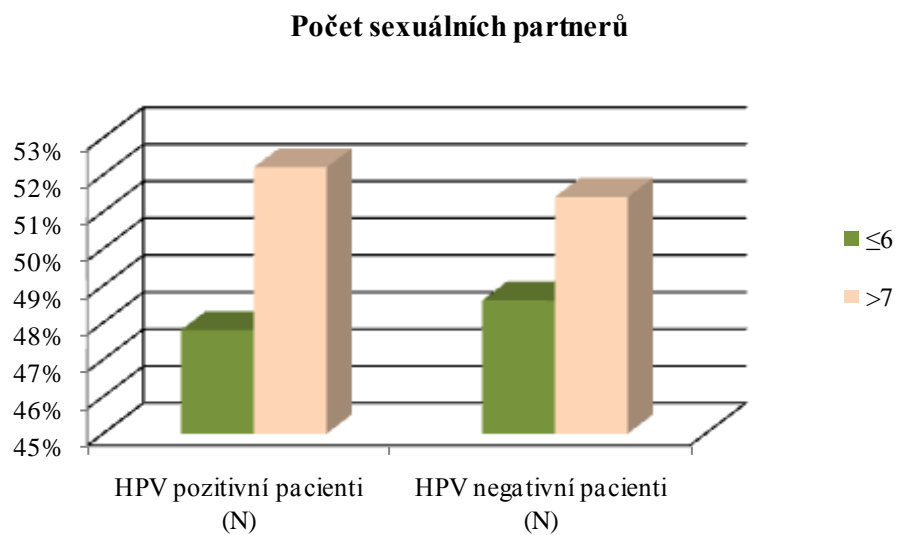
Z hlediska konzumace alkoholu se však obě studované skupiny vzájemně nelišily.



Graf. 5. Zastoupení pacientů ve skupině HPV DNA+/HPV DNA- dle kuřáckých zvyklostí

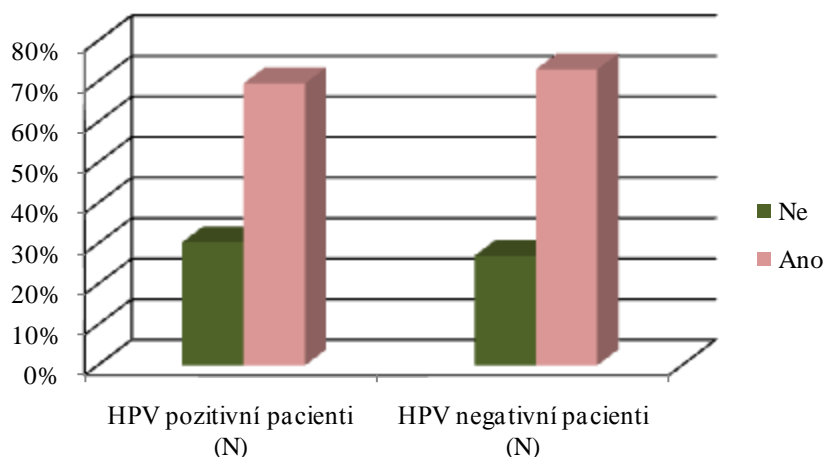


Graf. 6. Zastoupení pacientů ve skupině HPV DNA+/HPV DNA dle konzumace alkoholu



Graf. 7. Zastoupení pacientů ve skupině HPV DNA+/HPV DNA dle počtu partnerů

Orogenitální sex



Graf. 8. Zastoupení pacientů ve skupině HPV DNA+/HPV DNA dle sexuálních praktik

Tabulka 2 Demografické a epidemiologické charakteristiky pacientů s TC

Charakteristika	(Počet ¹)		HPV+ případy N (%)	HPV- případy N (%)	OR (95% CI)	P-hodnota	Adjustované ² OR (95% CI)	Adjustovaná P hodnota
Věk³	109	Věk - průměr	58	56		0,309		
Věk	44	Věk ≤ 55	26(37%)	18 (47%)	1		1	
	65	Věk > 55	45(63%)	20(53%)	0,6 (0,3-1,4)	0,277	0,9 (0,3-2,1)	0,834
Pohlaví	19	Ženské	13(18%)	6(16%)	1		1	
	90	Mužské	58(82%)	32(84%)	1,2 (0,4-3,4)	0,741	0,4 (0,1-1,8)	0,248
Vzdělání	78	≤12	48(68%)	30(79%)	1,8 (0,7-4,5)	0,214	1,1 (0,3-3,2)	0,925
	31	>12	23(32%)	8(21%)	1		1	
Počet sexuálních partnerů	50	≤6	32(48%)	18(49%)	1		1	
	54	>7	35(52%)	19(51%)	1,0 (0,4-2,2)	0,931	0,7 (0,2-2,0)	0,489
Oro-genitální sex	31	Ne	21(30%)	10(27%)	1		1	
	75	Ano	48(70%)	27(73%)	0,9 (0,3-2,2)	0,713	0,9 (0,3-2,7)	0,834
Oro-anální sex	96	Ne	61(88%)	35(95%)	1		1	
	10	Ano	8(12%)	2(5%)	2,3 (0,4-16,6)	0,31	1,3 (0,2-8,4)	0,785
Kuřáctví⁴	20	Ne	20(28%)	0(0%)	1		1	
	89	Ano	51(72%)	38(100%)	30,6 (1,8-522,7)	<0,001	9,2 (2,0-62,8)	0,001
Alcohol	24	Ne	19(27%)	5(13%)	1		1	
	85	Ano	52(73%)	33(87%)	2,4 (0,8-7,1)	0,109	1,4 (0,8-7,1)	0,567

OR= odds ratio; CI= confidence interval; P= pravděpodobnost;

¹Počet = počet subjektů s dostatkem dat

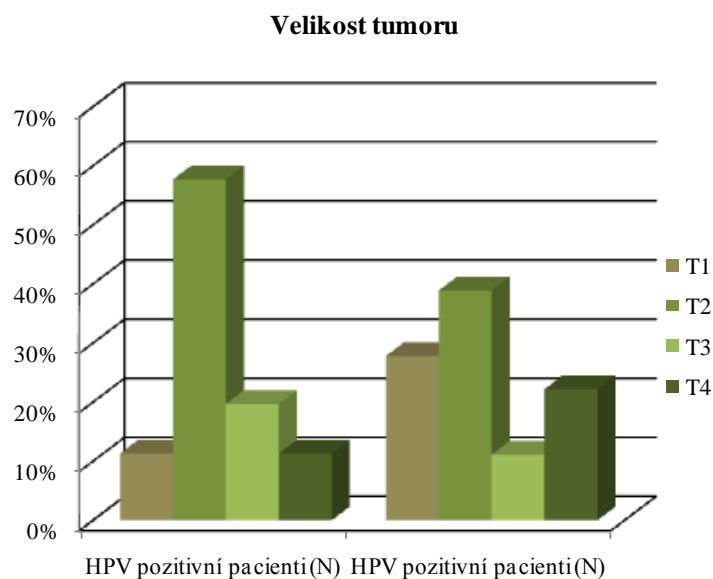
²Adjustováno na věk, konzumaci alkoholu a kouření cigaret

³Použit T-test k porovnání průměrného věku

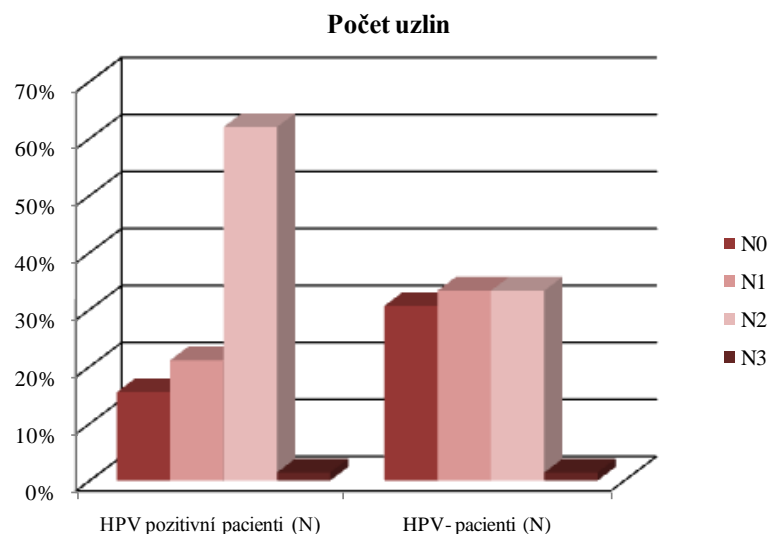
⁴Tam, kde parametry nabývaly nulovou hodnotu, byl použit logit-model, kde k nulové hodnotě bylo přidáno 0,5

4.2 Klinicko-patologické charakteristiky

HPV pozitivní tumory byly celkově větší, avšak rozdíl nedosahoval statistické významnosti. Pacienti s HPV pozitivními nádory měli častěji (na hranici statistické významnosti) 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), kde statistické významnosti dosaženo bylo. HPV pozitivní nádory měly tendenci být méně diferencované (G3 vs. G1,2) (43% vs. 26%, adj. P=0.429), ale tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti.



Graf. 9. Rozdíl v zastoupení velikosti tumoru ve skupině HPV DNA+ a HPV DNA-



Graf. 10. Rozdíl v míře postižení krčních uzlin mezi HPV DNA+ a HPV DNA-

Tabulka 3. Klinicko-patologické charakteristiky tumorů u pacientů s TC

Charakteristika	(Počet ¹)		HPV+ případy N (%)	HPV- případy N (%)	OR (95% CI)	P-hodnota	Adjustované ² OR (95% CI)	Adjustovaná P-hodnota
Velikost tumoru	18	T1	8(11%)	10(28%)	1		1	
	55	T2	41(58%)	14(39%)	1,5 (1,2-11,1)	0,022	3,7 (0,9-14,5)	0,061
	18	T3	14(20%)	4(11%)	4,4 (1,0-18,5)	0,046	7,0 (1,3-38,5)	0,025
	16	T4	8(11%)	8(22%)	1,3 (0,3-4,8)	0,746	1,9 (0,4-9,7)	0,418
Velikost tumoru	73	T1+T2	49(69%)	24(67%)	1		1	
	34	T3+T4	22(31%)	12(33%)	0,9 (0,4-2,1)	0,805	1,4 (0,5-3,7)	0,512
Uzlinové metastázy	22	N0	11(16%)	11(31%)	1		1	
	85	N1-3	60(84%)	25(69%)	2,4 (0,9-6,2)	0,073	3,2 (1,0-10,3)	0,053
Stádium tumoru	18	I+II	8(11%)	10(28%)	1		1	
	89	III+IV	63(89%)	26(72%)	3,0 (1,1-8,5)	0,036	3,7 (1,1-1,3)	0,038
Grade	67	1+2	39(57%)	28(74%)	1		1	
	39	3	29(43%)	10(26%)	2,1 (0,9-5,0)	0,097	1,5 (0,6-3,9)	0,429

Pro vysvětlivky viz. Tabulka 2.

4.3 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). Dále byly vždy po jednom vzorku detekovány HPV typy 26, 33, 52 a 58. Mnohočetná infekce (HPV 16 a 18) byla nalezena rovněž pouze v jednom vzorku.

4.4 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. U 51 ze 70 (73%) HPV DNA pozitivních pacientů se HPV typ ve výplachu shodoval s HPV typem ve tkáni tumoru. Citlivost a specifická této detekční metody vyšla 74% a 82%, respektive.

Tabulka 4 Typově specifická prevalence HPV ve výplacích dutiny ústní ve vztahu k HPV DNA pozitivitě/negativitě tkáně tumoru

	HPV typ - tkáň	HPV typ - výplach	N
HPV pozitivní (N=70)	HPV16 (N=65)	HPV16	43
		HPV81	1
		HPV84	1
		HPV89	1
		HPV16, 51	1
		HPV16,56,82	1
		HPV16,11	1
		HPV16,42	1
		HPV16,33	1
		HPV16,31	1
		HPVnegativní	13
	HPV26 (N=1)	HPVnegativní	1
	HPV33 (N=2)	HPV33	2
	HPV52 (N=1)	HPVnegativní	1
HPV58 (N=1)	HPVnegativní	1	
HPV negativní (N=39)		HPV16	3
		HPV16,55	1
		HPV16,51	2
		HPV45,51	1
		HPV40	1
		HPV61	1
		HPV70	1
		HPV911	1
		HPVnegativní	28

Tabulka 5. Korelace HPV DNA positivity ve výplachu dutiny ústní s HPV DNA pozitivitou tkáně tumoru

	N	HPV DNA ve tkáni tumoru		OR (95%CI)	P hodnota
		HPV-poz. (N=69)	HPV-neg. (N=40)		
HPV DNA ve výplachu dutiny ústní					
HPV negativní/LR HPV pozitivní	51	18 (26,0%)	33 (82,5%)	1,00	ref.
HR HPV pozitivní	58	51 (74,0%)	7 (17,5%)	14,4 (1,0-100,0)	<0,001

Pro vysvětlivky viz. Tabulka 2.

4.5 Prevalence HPV-specifických protilátek

Přítomnost protilátek specifických pro HPV16 VLP v séru dobře korelovala s přítomností HR HPV DNA v nádorové tkáni (Kappa hodnota=0,396). HPV16 VLP-specifické protilátky byly nalezeny u 65% HPV-pozitivních pacientů a pouze u 21% HPV-negativních (adj. P=0,003) (viz. Tabulka 6). Protilátky proti HPV16 E6 a E7 onkoproteinům byly přítomny v sérech 80% a 70% HR HPV-pozitivních pacientů, respektive. Mezi HPV negativními pacienty byl pouze jeden, v jehož séru jsme našli HPV 16 E6-specifické protilátky a dva pacienti s pozitivitou HPV 16 E7-specifických protilátek (adj. P<0,001 pro E6 i E7).

Mezi 71 pacienty s HR HPV DNA-pozitivním tumorem jsme u 85% našli protilátky specifické pro alespoň jeden z HPV 16 E6 a E7 antigen. U 66% pacientů byly v séru přítomny oba typy protilátek (adj. P=0,006 a P<0,001, respektive). Přítomnost HPV 16 E6- a E7-specifických protilátek tedy vysoce korelovala s přítomností HR HPV DNA v nádorové tkáni (Kappa hodnota=0,719 a 0,584).

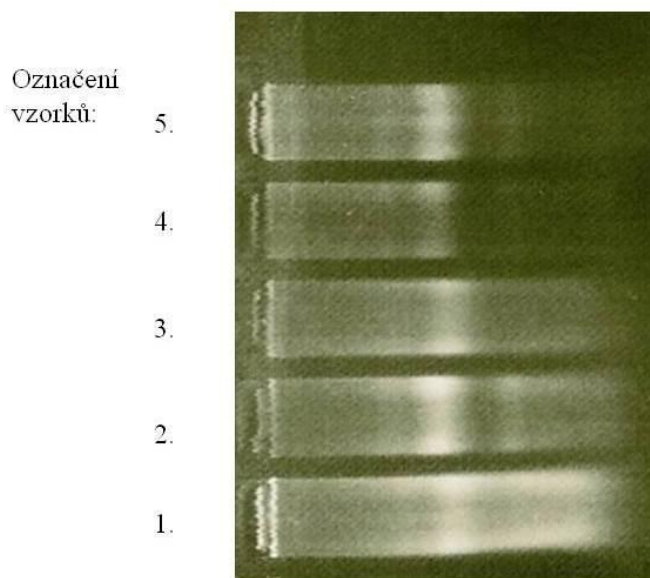
Tabulka 6. Korelace sérologické pozitivity/negativity s HPV DNA pozitivitou/negativitou ve tkáni tumoru

Charakteristika	(Počet ¹)		HPV+ případy N (%)	HPV- případy N (%)	OR (95%CI)	P-hodnota	Adjustované ² OR (95%CI)	Adjustovaná P-hodnota
HPV 16 VLP	55	neg.	25(35%)	30(79%)	1		1	
	54	poz.	46(65%)	8(21%)	6,6 (2,8-0,4)	<0,001	4,6 (1,7-12,3)	0,003
HPV 16 E6	51	neg.	14(20%)	37(97%)	1		1	
	58	poz.	57(80%)	1(3%)	142,0 (18,8-1000,0)	<0,001	250,0 (21,3- inf)	<0,001
HPV 16 E7	57	neg.	21(30%)	36(95%)	1		1	
	52	poz.	50(70%)	2(5%)	43,5 (9,4-200,0)	<0,001	50,0 (8,3-200,0)	<0,001
HPV 16 E6 and/or E7	47	oba neg.	11(16%)	36(95%)	1		1	
	14	E6 nebo E7 poz.	13(18%)	1(2,5%)	41,7 (5,0-333,3)	0,001	58,8 (3,2-1000,0)	0,006
	48	oba poz.	47(66%)	1(2,5%)	142,9 (18,9-1000,0)	<0,001	4,8 (21,3- inf)	<0,001

Pro vysvětlivky viz. Tabulka 2.

4.6 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. (Vyloučili jsme vzorky pozitivní na HPV 33, 52 a 58).



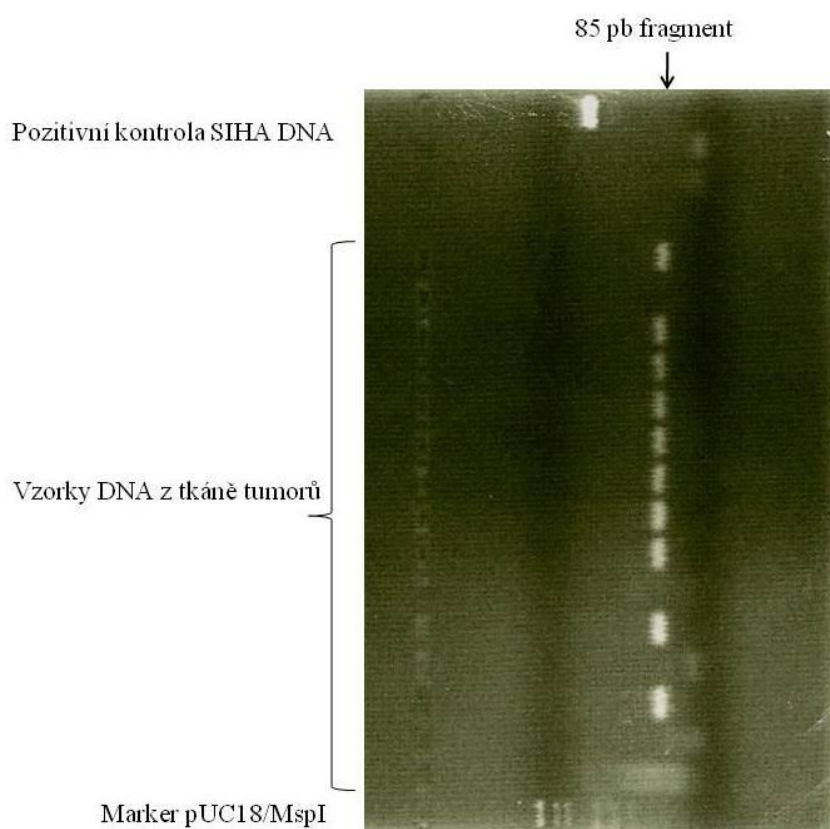
Obr. 4 Výsledek elektroforézy RNA získané izolací ze tkáně tumoru u vybraných 5 vzorků

Při rozdělení této podskupiny dle RNA se HPV 16 E6 mRNA pozitivní a negativní pacienti nelišili v průměrném věku, v zastoupení pohlaví a délce vzdělání. RNA pozitivní pacienti sice uvedli větší počet sexuálních partnerů (>6) během života (64% vs. 41%, adj. $P=0,040$), ale nelišili se od HPV negativních v parametrech vypovídajících o cestě přenosu infekce (orálně-genitální/orálně-anální kontakt).

Stejně jako v celém souboru, tumory pozitivní na HPV 16 E6 mRNA byly častěji diagnostikovány v pokročilém stádiu (III a IV vs. I a II, 30% vs. 11%, $P=0,017$) než nádory bez virové mRNA exprese. HPV 16 E6 mRNA pozitivní nádory byly dále oproti negativním častěji asociovány s uzlinovými metastázami v době diagnózy (N^+ vs. N_0 , 81% vs. 56%, $P=0,022$). Statistická významnost obou těchto parametrů však zmizela po adjustaci. Jediný parametr, ve kterém se skupina HPV 16 mRNA pozitivních a negativních lišila statisticky významně, byl stupeň diference, kdy u HPV 16 E6

mRNA pozitivních tumorů byla patrna tendence k nižší diferenciaci než u RNA negativních. Hodnoty citlivosti a specifity jednotlivých přímých a nepřímých markerů pro detekci aktivní virové infekce (stanovené detekcí HPV E6 mRNA u vzorků dostupných pro RNA izolaci) jsou uvedeny v Tabulce 7.

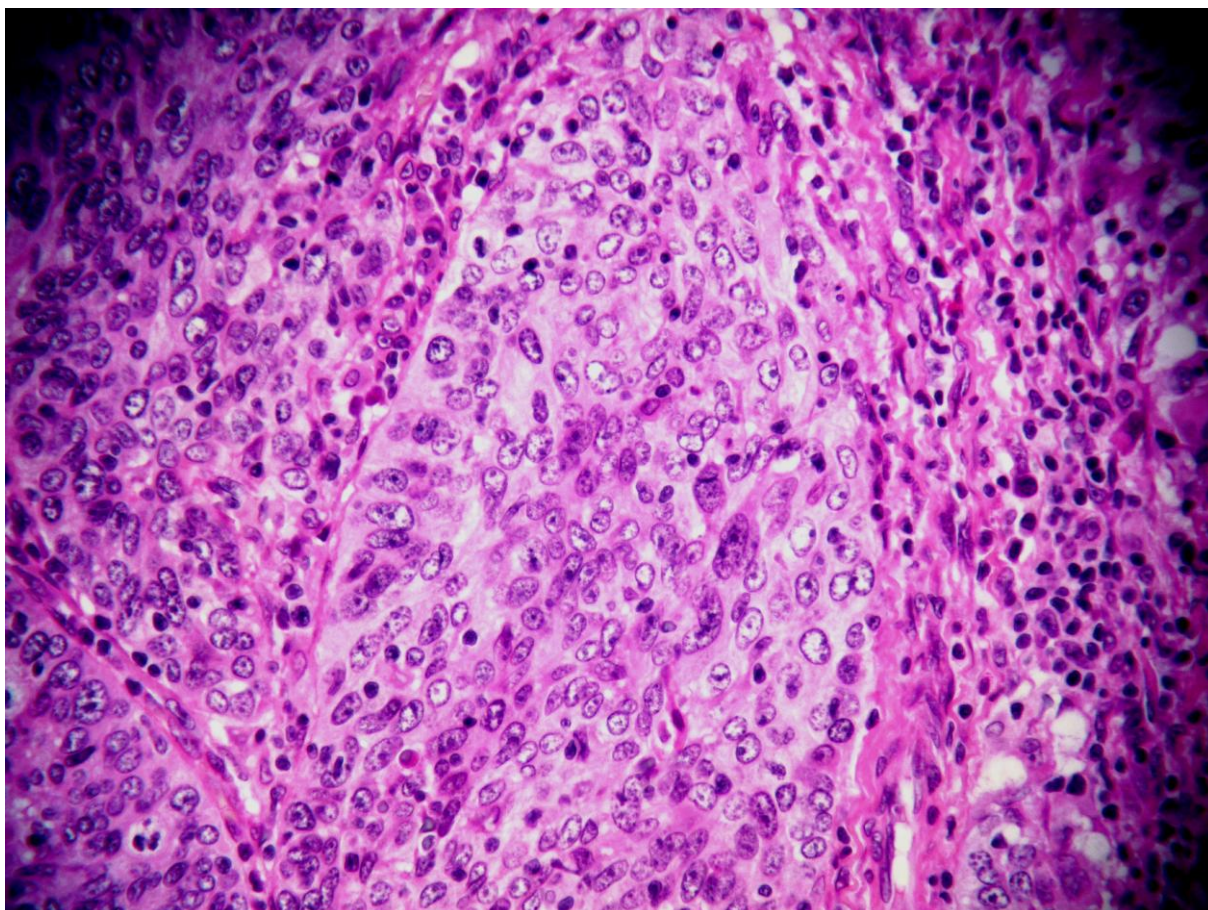
Kromě dvou vzorků byla u všech HPV DNA-pozitivních případů (93%) nalezena exprese virové HPV16 E6-specifické mRNA.



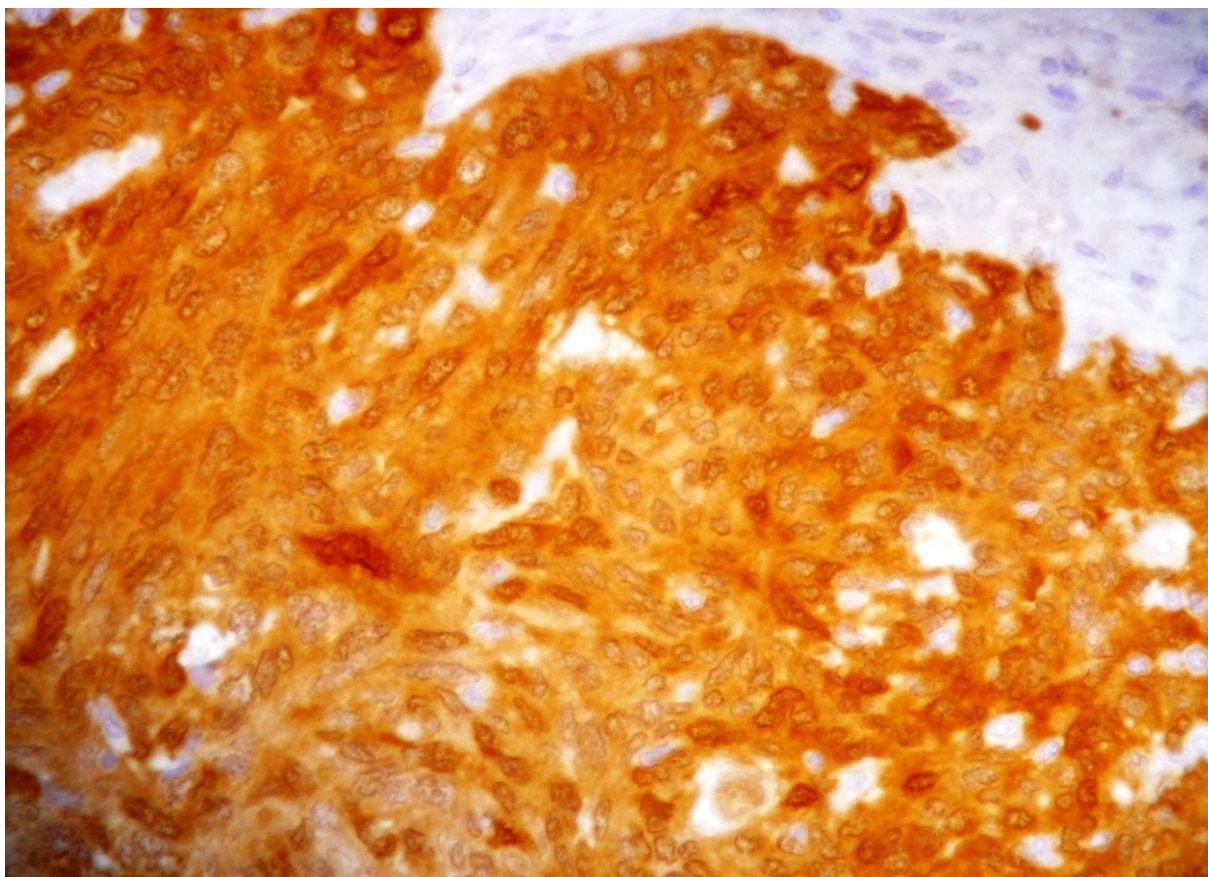
Obr.5 Výsledek elektroforézy PCR produktů detekce HPV 16 E6 mRNA u vybraných vzorků

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.

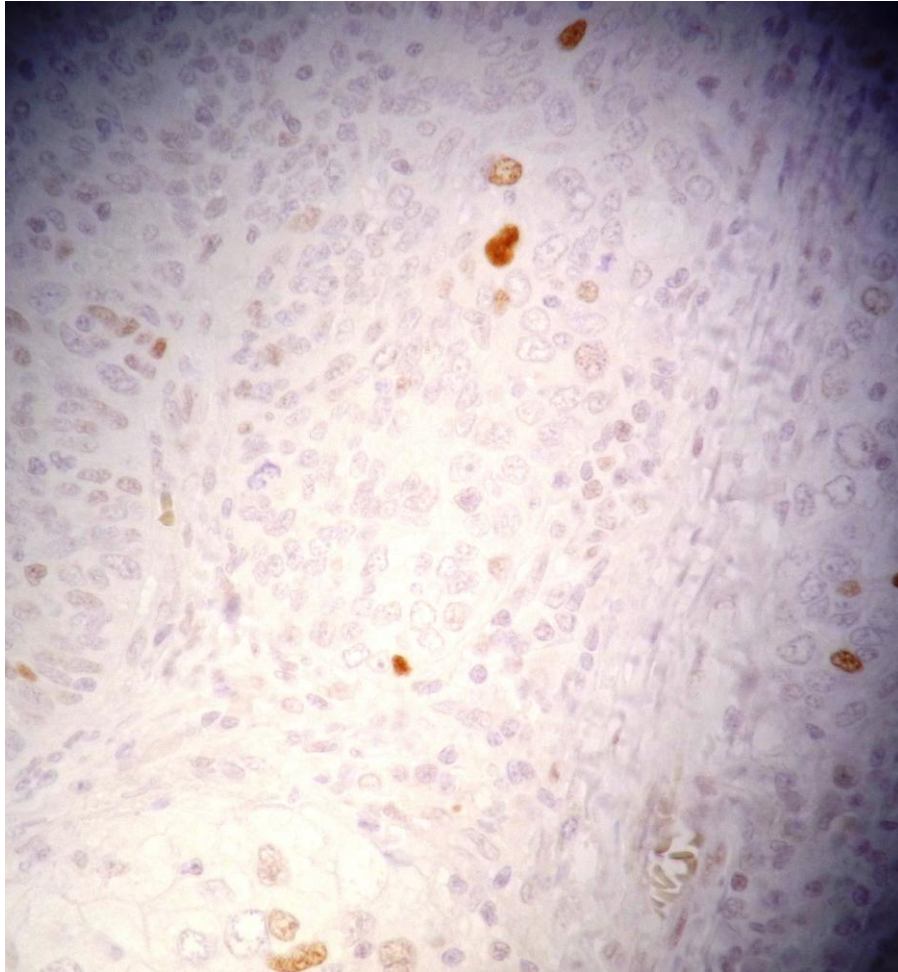
Expresse proteinu p16 byla až na 2 vzorky nalezena u všech HPV DNA-pozitivních případů (93%).



Obr. 6 Vzorek 1. Parafínový řez tkání dlaždicobuněčného karcinomu, barveno hematoxylinem-eosinem, originální zvětšení 400x



Obr. 7 Vzorek 1. Parafínový řez tkání dlaždicobuněčného karcinomu, barveno imunohistochemicky protilátkou proti proteinu p16, originální zvětšení 400x. Hodnoceno jako 100% pozitivita nukleárně i cytoplazmaticky



Obr. 8 Vzorek 1, Parafinový řez tkání dlaždicobuněčného karcinomu, barveno imunohistochemicky protilátkou proti proteinu p53, originální zvětšení 400x. Hodnoceno jako negativní.

Stejně jako v celkovém souboru (109 TC) jsme i u této podskupiny pacientů prokázali významnou shodu v přítomnosti HPV DNA a séropozitivitou na HPV16 E6 a E7-specifické protilátky. Tyto protilátky byly v séru přítomny u všech kromě dvou (93%) HPV DNA pozitivních pacientů, oba výše zmíněné typy protilátek byly zároveň nalezeny pouze u jednoho pacienta s HPV DNA-negativním tumorem.

Jeden ze dvou výše popsaných případů bez detekovatelné exprese mRNA při HPV DNA pozitivitě byl právě případ pozitivní na HPV 16 i HPV 18 DNA zároveň (viz. Typově specifická prevalence). Další markery aktivní virové infekce spíše ukazují u tohoto vzorku na etiologický význam HPV 18 nebo na jinou než virovou etiologii. Naproti tomu u druhého HPV 16 DNA pozitivního vzorku bez exprese HPV16 E6 mRNA všechny nepřímé markery naznačovaly aktivně probíhající HPV infekci. Příčina nemožnosti zachycení HPV 16 E6 mRNA je tedy otazná.

Pro stanovení citlivosti, specifity, pozitivní (PPV) a negativní (NPV) prediktivní hodnoty jednotlivých markerů jsme podsoubor rozdělili na skupinu pozitivních na expresi virového genomu (HR HPV DNA-pozitivní s expresí HPV 16 E6 mRNA) a skupinu negativních (DNA a RNA-negativní nebo DNA-pozitivní a RNA-negativní).

Optimální kombinaci vysoké citlivosti i specifity 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). Srovnatelnou hodnotu citlivosti, ale nižší specifitu ukázala metoda imunohistochemické detekce p53 (96% a 56%, respektive).

Pouze u 9 (36%) z 25 studovaných 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.

Tabulka 7. Tkáňové a sérologické markery v podskupině pacientů, u nichž byl dostupný materiál pro RNA analýzu

	Číslo vzorku	HPV TYP	HPV 16 E6*I mRNA	p53 IHC	p16 IHC	HPV 16 E2 mRNA	Protilátky		
							HPV 16 E6 ¹	HPV 16 E7 ¹	HPV 16 E6/E7 ¹
	1	16	1	0	1	0	0	1	1
	2	16	1	0	1	1	1	0	1
	3	16	1	0	1	0	1	1	1
	4	16	1	0	1	0	1	0	1
	5	16	1	0	1	NA	1	1	1
	6	16	1	0	1	0	0	1	1
	7	16	1	0	1	NA	1	1	1
	8	16	1	0	1	1	1	1	1
	9	16	1	0	1	0	1	1	1
	10	16	1	0	1	1	1	0	1
	11	16	1	0	1	1	1	1	1
	12	16	1	0	1	0	1	1	1
	13	16	1	0	1	0	1	1	1
	14	16	1	0	1	1	1	1	1
	15	16	1	0	1	1	1	0	1
	16	16	1	0	1	0	0	1	1
	17	16	1	0	1	0	1	1	1
	18	16	1	0	1	0	1	1	1
	19	16	1	0	1	1	1	1	1
	20	16	1	0	1	0	1	1	1
	21	16	1	0	1	0	1	1	1
	22	16	1	0	1	0	1	0	1
	23	16	1	0	1	0	1	1	1
	24	16	1	0	1	1	1	1	1
	25	16	1	0	1	0	1	1	1
	26	16	1	0	1	1	1	1	1
	27	16	1	1	0	0	0	0	0
	44	16,18	0	0	0	0	0	0	0
	45	16	0	0	1	0	1	1	1
	28	0	0	1	0	NA	0	0	0
	29	0	0	1	0	NA	0	0	0
	30	0	0	1	0	NA	0	0	0
	31	0	0	1	0	NA	0	0	0
	32	0	0	1	0	NA	0	0	0
	33	0	0	1	0	NA	0	0	0
	34	0	0	1	0	NA	0	0	0
	35	0	0	1	0	NA	0	1	1
	36	0	0	0	0	NA	0	0	0
	37	0	0	0	0	NA	0	0	0
	38	0	0	0	0	NA	0	0	0
	39	0	0	0	0	NA	0	0	0
	40	0	0	0	0	NA	0	0	0
	41	0	0	0	0	NA	0	0	0
	42	0	0	0	0	NA	0	0	0
	43	0	0	0	0	NA	0	0	0
sensitivita		27/27 (100%)	27/27 (100%)	26/27 (96%)	26/27 (96%)		23/27 (85%)	21/27 (78%)	26/27 (96%)
specifická		16/18 (89%)	18/18 (100%)	10/18 (56%)	17/18 (94%)		17/18 (94%)	16/18 (89%)	16/18 (89%)

NA = nedostupný pro příslušnou analýzu

¹1=séropozitivní/ 0=séronegativní na HPV 16 E6- a/nebo E7-specifické protilátky

4.7 Analýzy přežití

Analýzy přežití byly provedeny na komplexním souboru pacientů (N=109). Z těchto 109 pacientů 77 (71%) žilo v době analýzy bez známek nádoru. Doba sledování se pohybovala mezi 0,02-4,9 roky. Průměrná doba sledování byla 2,4 let. Ze 32 pacientů, kteří zemřeli, 26 mělo recidivu TC, jeden zemřel na duplicitní nádorové onemocnění a 5 pacientů zemřelo na onemocnění bez souvislosti s nádorem

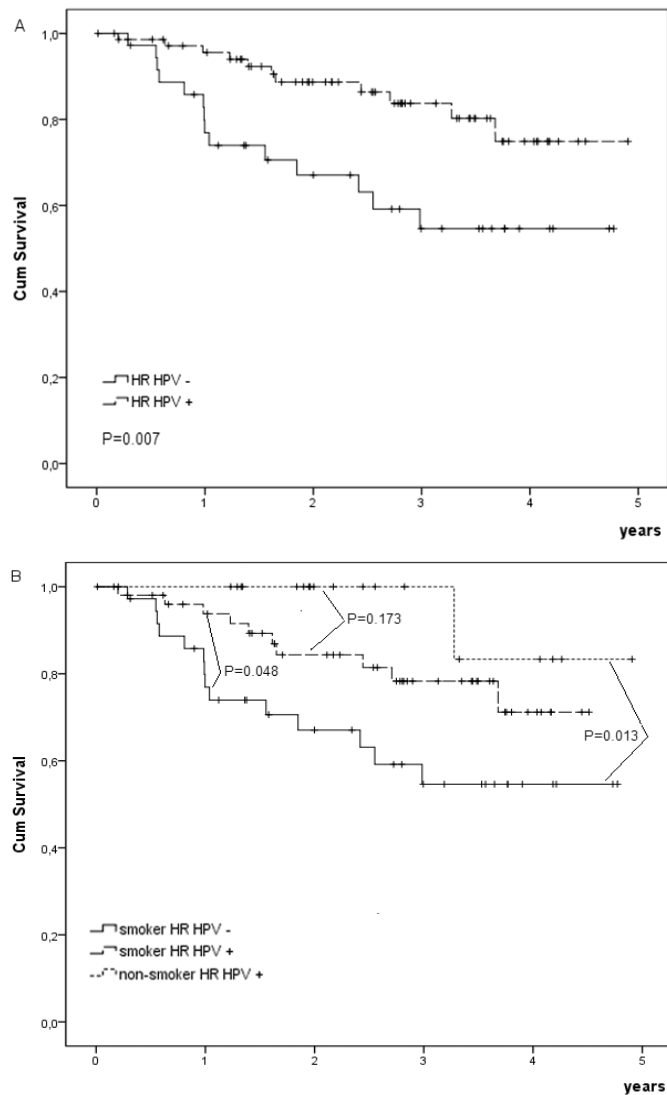
Použitím Kaplan-Meierovy metody a log-rank testu jsme zjistili významně lepší specifické přežití u pacientů s HR HPV pozitivními nádory oproti pacientům s HPV-negativními nádory (průměrný čas přežití 4,4 vs. 3,3 let, $P=0,004$, viz. Tab. 8 a Obr.9).

Prognostická výhoda pacientů s HPV-pozitivním tumorem byla navíc pozorována nezávisle na tom, který marker byl ke stanovení HPV infekce použit. Pacienti se séropozitivitou na HPV16 E6 a/nebo HPV16 E7 specifické protilátky měli rovněž delší průměrnou dobu přežití (4,4 vs. 3,4 a 4,3 vs. 3,5, $P=0,004$ a $P=0,033$, respektive).

Nepřekvapilo zjištění, že jsme u pacientů s menšími tumory (T1 a T2) pozorovali významně lepší specifické přežití než u pacientů s nádory velikosti T3 a T4 (průměrná doba přežití 4,3 vs. 3,0, $P=0,003$).

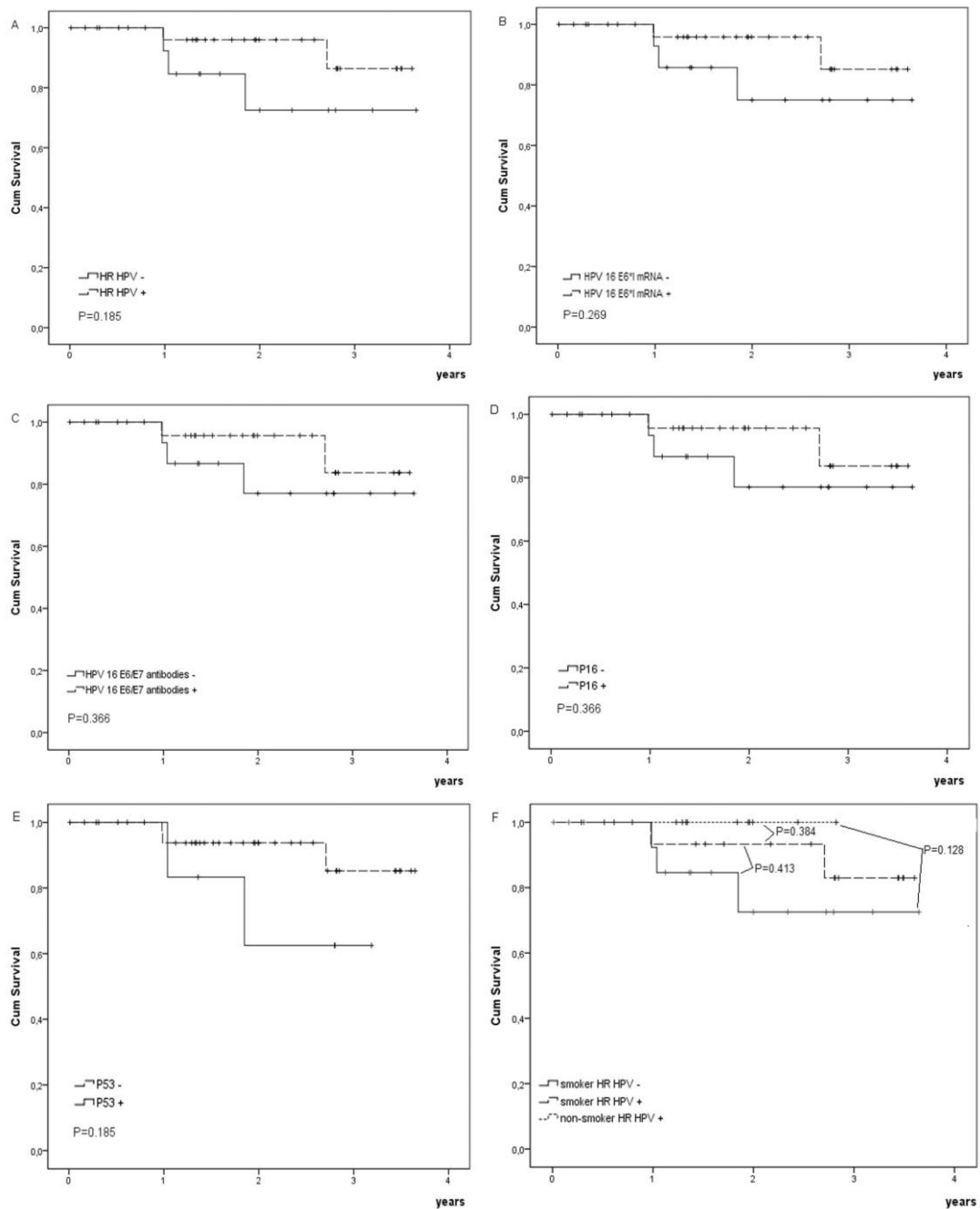
Analýzy epidemiologických parametrů s vlivem na přežití ukázaly, že současní kuřáci v porovnání s bývalými nebo těžci v porovnání s lehkými kuřáky mají statisticky významně horší přežití ($P=0,026$, $P=0,045$, respektive). Nepozorovali jsme však v našem souboru žádný vliv konzumace alkoholu na přežití.

Podrobnější analýza vztahu kuřáctví a HPV positivity a jejich vlivu na přežití ukázala, že kuřáci i nekuřáci s HPV-pozitivním nádorem mají významně lepší přežití než pacienti s HPV-negativním nádorem (mezi kterými nebyl, mimochodem, v celém souboru ani jeden nekuřák). Zmíněný rozdíl v přežití si udržel statistickou významnost i po adjustaci na další kofaktory (věk, konzumace alkoholu, velikost tumoru, incidence a rozsah uzlinových metastáz) v Coxově regresní analýze (adj. $P=0,048$, adj. $P=0,013$, respektive, Obr. 9).



Obr. 9: Analýza přežití podle detekce virové DNA: A/ HR HPV-pozitivní vs. HR HPV-negativní případy ($P=0,007$) a B/ podle současného hodnocení přítomnosti virové DNA a kuřáctví - HPV-pozitivní kuřáci, HPV- pozitivní nekuřáci a HPV-negativní kuřáci

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, stadium onemocnění, diferenciacie nádoru a incidence a rozsah uzlinového postižení. Význam HR HPV pozitivity pro přežití pacientů jsme potvrdili i pomocí omnibus testu, kde se jako nejméně hodnotný prognostický model ukázal ten, z něhož byla HR HPV pozitivita v tumorosní tkáni jako proměnná vyřazena.



Obr.10 Analýzy přežití podle výsledků detekce nepřímých markerů aktivní virové infekce: A/ HR HPV-positivní vs. HR HPV-negativní, B/ tumory pozitivní vs. negativní na expresi HPV 16 E6 mRNA, C/ případy pozitivní vs. negativní na přítomnost HPV 16 specifických E6/E7 protilátek v séru, D/ tumory pozitivní vs. negativní na expresi proteinu p16, E/ tumory pozitivní vs. negativní na expresi proteinu p53, F/ HPV-positivní kuřáci, HPV pozitivní nekuřáci a HPV negativní kuřáci

Jediným dalším faktorem s vlivem na přežití, jehož významnost byla potvrzena multivariantní analýzou, byla velikost tumoru (adj. P=0,049)

V analýze přežití provedené izolovaně pro podsoubor pacientů, jejich vzorky byly dostupné pro izolaci RNA, byly pozorovány stejné trendy, jako v celkovém souboru 109 pacientů, ale výsledky nedosáhly statistické významnosti. Výsledky analýzy přežití podle jednotlivých nepřímých markerů HPV infekce jsou zobrazeny na Obr. 10.

Tabulka 8. Faktory s vlivem na přežití pacientů

Faktor	Celkový počet pacientů	Kaplan-Mayerova analýza		Coxova regresní analýza	
		Průměrné přežití (95% CI)	P-hodnota	HR ³ (95% CI)	Adjustovaná P-hodnota ⁴
HR HPV DNA pozitivita v nádorové tkáni	109	4,30 (3,96-4,64)	0,004	0,368 (0,155-0,874)	0,023
HR HPV DNA negativita v nádorové tkáni		3,25 (2,64-3,87)			
HPV 16 E6/E7 ¹	109	oba poz. 4,41 (4,08-4,75)	0,002	0,098 (0,023-0,416)	0,002
		oba neg. 3,28 (2,74-3,83)			
HPV 16 VLP ²	109	pozitivní 3,91 (3,44-4,39)	0,848	0,255 (0,100-0,663)	0,005
		negativní 3,89 (3,46-4,32)			
Uzlinové metastázy	107	N0 3,72 (3,41-4,03)	0,089	3,528 (0,794-15,670)	0,098
		N1-3 3,82 (3,43-4,21)			
Velikost tumoru	107	T1+T2 4,30 (3,96-4,64)	0,003	2,357 (1,002-5,541)	0,049
		T3+T4 3,05 (2,46-3,63)			
Grade	106	G1+2 3,98 (3,55-4,40)	0,638	1,340 (0,554-3,241)	0,517
		G3 3,74 (3,20-4,28)			
Kouření	109	Ano 3,71 (3,35-4,08)	0,061	3,484 (0,415-29,412)	0,25
		Ne 4,63 (4,15-5,12)			
Alkohol	109	Ano 3,82 (3,45-4,19)	0,695	1,162 (0,403-3,351)	0,781
		Ne 4,08 (3,45-4,72)			
Pohlaví	109	Ž 4,19 (3,44-4,93)	0,447	0,654 (0,178-2,400)	0,522
		M 3,78 (3,43-4,12)			
Věková skupina	109	≤ 55 3,90 (3,36-4,43)	0,0001	0,553 (0,214-1,431)	0,222
		> 55 3,66 (3,28-4,03)			

¹ HPV 16 E6- a/nebo E7-specifické protilátky v séru

² jako antigen použity HPV 16-specifické VLP

³HR = hazard ratio - poměr rizik

⁴Adjustováno na věk, konzumaci alkoholu a tabáku, velikost tumoru, incidenci a rozsah uzlinových metastáz

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 vhodné pro využití v klinické praxi.

Prevalence HPV DNA byla v naší studii 65%, nejčastějším typem HPV byl typ 16, který infikoval 94% všech HPV DNA pozitivních tumorů. Tato data se shodují s výsledky dalších studií^{4,5}. Přestože jsme použili metodu, pomocí níž lze detekovat 37 různých typů i případné multiplicitní HPV infekce, našli jsme, na rozdíl od údajů uvedených v metaanalýze⁶⁷, pouze jeden vzorek pozitivní na dva HPV typy zároveň. V souhlasu s výše zmíněnou metaanalýzou se shoduje údaj o prevalenci HPV 33, který jsme našli u 1% vzorků. Další typy (HPV 26, 52, 58), jejichž výskyt ostatní studie nepopisují, jsme našli každý v jednom vzorku. Na rozdíl od jiných autorů⁶⁸ jsme v nádorové tkáni nenašli žádné nízko rizikové typy.

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 daty⁶⁹, tak s výsledky mnoha dalších prací⁷⁰⁻⁷². 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). Teprve vyšetření větších souborů pacientů na markery ukazující na aktivní roli HPV v nádoru dá přesnější odpověď na otázky interakce kouření a přítomnosti HPV.

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 tkáni⁷³. 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.

Detekce exprese HPV onkogenů byla zatím provedena jen v omezeném množství studií na nádorech hlavy a krku. Ve shodě s našimi výsledky popsali Lindquist a spol. E6 mRNA ve 42 z 53 (79%) vzorků HPV16 DNA-pozitivních TC. Zároveň ale tyto autoři našli E7 mRNA v 94% takto pozitivních vzorků⁵⁵. Další 2 studie věnované tomuto tématu prokázaly expresi onkogenů v menší míře. Smeets a spol. zdetekovali E6 mRNA expresi v 6 (75%) z 8 HPV16 DNA-pozitivních vzorcích orofaryngeálních karcinomů⁵⁴. Jung a spol. nedávno popsali expresi HPV onkogenu pouze u 12 z 30 (40%) HR HPV DNA-pozitivních vzorků orofaryngeálních karcinomů⁷⁴.

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. Podobných studií je ve světové literatuře teprve několik s malým počtem zařazených subjektů. Studie exprese virových onkogenů na větším počtu pacientů umožní přesněji posoudit důvody případných diskrepancí.

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^{38, 39}.

V cervikálních karcinomech vede integrace HR HPV DNA do genomu buňky k eliminaci supresního vlivu produktu genu E2 na expresi genů E6 a E7, které jsou následně velmi silně exprimované⁷⁵.

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 spol. a Koskinen a spol.^{36, 37}. Ve zbývajících 9 vzorcích, které jsou na expresi E2 mRNA 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 karcinomu⁷³. Nicméně v oblasti nádorů hlavy a krku byla nedávno popsána zhruba 20% neshoda ve výsledcích detekce HPV DNA a p16⁷⁶. Autoři interpretovali výstupy této studie tak, že p16 samostatně nemůže sloužit jako nepřímý marker HPV infekce pro karcinomy hlavy a krku. Naproti tomu naše výsledky ve shodě s dalšími autory^{52, 60, 77} ukazují, že detekce exprese p16, zejména pokud je zároveň detekována HPV DNA, představuje velmi citlivou a specifickou metodu pro výběr pacientů s HPV-asociovaným tumorem i v oblasti hlavy a krku.

Citlivost a specifická kombinace imunohistochemické detekce p16 s PCR detekcí HPV DNA v naší studii byla 100% a 88%, respektive. Jedná se o srovnatelné hodnoty s dalšími publikovanými údaji⁵⁴. Výsledky naší studie ve shodě s dalšími tedy 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. Citlivost i specifita tohoto markeru však byla nízká – u HPV-negativních vzorků, u kterých bychom očekávali pozitivní p53 expresi ve většině případů, byla tato nalezena pouze v 50%. Jedním z možných vysvětlení může být omezená výpovědní hodnota imunohistochemické detekce exprese p53. Ta zřejmě nevypovídá zcela věrohodně o mutačním stavu genu TP53^{78, 79}. Souhrnně lze říci, že absence zvýšené exprese p53 není spolehlivým markerem 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 citlivost (74%) a specifitu (82%). Podobné výsledky popisují i další autoři^{3, 61}, zatímco autoři rozsáhlé mezinárodní studie popsali výskyt HPV DNA pozitivitu ve výplachu dutiny ústní stejný ve skupině pacientů s nádory dutiny ústní a orofaryngu jako ve skupině zdravých kontrol⁸⁰. Nicméně cytologická analýza byla v této studii provedena jen u části vzorků a studie navíc probíhala multicentricky, což nutně připouští rozdílnost v získávání cytologických vzorků, která může vést ke zkreslení.

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 probíhající onemocnění⁸¹. 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 infekce⁸².

V souladu s touto teorií byla v celém souboru 109 pacientů s TC nalezena statisticky významná korelace HPV DNA a/nebo RNA pozitivitu/negativitu se séropozitivitou/séronegativitou 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 autoři⁸³. 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 pacientů navíc nezávisí na markeru, který byl použit k identifikaci HPV positivity nádoru. I když pro menší soubor pacientů (limitovaný dostupností pro RNA analýzu) nebylo dosaženo statistické významnosti, oba typy markerů – přímé i nepřímé – korelovaly s lepším specifickým přežitím.

Jediný z dalších faktorů, u něhož se projevil vliv na prognózu, byla velikost tumoru, což se shoduje s výsledky jiných studií^{37, 84}. Rozsah uzlinového postižení (N-klasifikace) neměl pro náš soubor pacientů významný vliv na přežití, což souhlasí s našimi předešlými výsledky²⁴ a výsledky dalších studií³⁷, naproti tomu Hoffmann a spol. popisuje, že míra postižení uzlin v jejich souboru významně ovlivnila přežití a to nezávisle na HPV statusu⁸⁵.

Prognostická výhoda HPV-pozitivních pacientů byla potvrzena výsledky mnoha prací^{58, 84, 86}, zpracováno v metaanalýze⁸⁷. Důležité je v tomto bodě podotknout, že převážná většina studií hodnotících přežití ve vztahu k HPV byla koncipována retrospektivně, pouze dvě studie^{77, 88} 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 léčbu⁸⁹. Další možností je, že HPV pozitivní nádory stimulují imunitní systém, který se pak podílí na eliminaci nádoru. Existuje studie dokazující u myší, že pro prognostickou výhodu HPV pozitivních nádorů je nezbytná přítomnost funkčního imunitního systému⁹⁰.

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 ⁴⁶, ale zároveň značně podtrhuje HR HPV etiologii coby nejsilnější prognostický faktor pro karcinomy hlavy a krku.

6. ZÁVĚRY

Souhrnně lze říci, že bylo dosaženo těchto vytyčených cílů:

- Ve vysoce homogenní a přesně definované skupině pacientů s primárním dlaždicobuněčným karcinomem tonzily v České republice byla zjištěna prevalence HPV DNA v nádorové tkáni 65%.
- Použitím detekce exprese virové HPV16 E6-specifické mRNA, která je obecně přijímána jako zlatý standard pro stanovení transkripční aktivity viru, byla tato prokázána u (93%) HPV DNA-pozitivních případů.
- Na menším souboru pacientů se podařilo prokázat vysokou korelaci nepřímých markerů HPV infekce (p16; anti HPV16 E6/E7) s HPV DNA/RNA pozitivitou nádoru. Tyto markery se zároveň ukázaly jako vysoce citlivé i specifické.
- Mezi pacienty s HPV pozitivními a negativními tumory jsme našli celou řadu rozdílů v klinických i demografických charakteristikách.
- Zjistili jsme, že pacienti s HPV pozitivními dlaždicobuněčnými karcinomy tonzil statisticky významně lépe přežívají a že je tato prognostická výhoda nezávislá na dalších faktorech (kouření, věk, stádium tumoru, přítomnost pozitivních uzlin a další).

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 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. V případě nádorů hlavy a krku je nutné mít na paměti, že se jedná o onemocnění, jehož léčba je pro pacienta velmi zatěžující – ať už máme na mysli často mutilující chirurgické výkony či velké množství nežádoucích vedlejších účinků konzervativní onkologické terapie.

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

Obecně má problematika HPV asociovaných zhoubných nádorů v současnosti ještě další významný rozměr, vzhledem k nově vyvinutým vakcínám proti papillomaviróvé 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 s HPV infekcí by vybízelo k vakcinaci nejen dívek, ale i chlapců. Poměrem „cost-benefit“ této vakcinační strategie se dnes zabývá řada studií na celém světě.

7. 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.
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. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993;72:1369-75.
10. Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004;31:726-33.
11. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Munoz N, Herrero R, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108:741-9.
12. Marshall JR, Boyle P. Nutrition and oral cancer. *Cancer Causes Control* 1996;7:101-11.

13. Hashibe M, Mathew B, Kuruvilla B, Thomas G, Sankaranarayanan R, Parkin DM, Zhang ZF. Chewing tobacco, alcohol, and the risk of erythroplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:639-45.
14. Jacob BJ, Straif K, Thomas G, Ramadas K, Mathew B, Zhang ZF, Sankaranarayanan R, Hashibe M. Betel quid without tobacco as a risk factor for oral precancers. *Oral Oncol* 2004;40:697-704.
15. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256-63.
16. Novotvary 2006 ČR/ Cancer Incidence 2006 CR: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR ve spolupráci s Národním onkologickým registrem ČR 2009.
17. Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D, Onelov L, Ryott M, Luo J, Dalianis T, Ye W, Munck-Wikland E. The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol* 2007;127:988-92.
18. Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control* 2000;11:489-95.
19. Dušek L, MJ, Kubásek M., Koptíková J., Žaloudík J., Vyzula R. www.svod.cz Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online] Verze 7.0 [2007]: Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine and Faculty of Science, Masaryk University
20. Klozar J, Lischkeova B, Betka J. Subjective functional results 1 year after surgery and postoperative radiation for oropharyngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258:546-51.
21. Betka J, Černý E. Atlas chirurgie hlavy a krku, First ed. Praha: Triton, 2005.
22. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*;11:21-8.
23. Bourhis J, Lefebvre JL, Vermorken JB. Cetuximab in the management of locoregionally advanced head and neck cancer: expanding the treatment options? *Eur J Cancer*;46:1979-89.
24. 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.
25. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, Levine M, Zinreich E, Messing BP, Gold D, Wu AA, Niparko KJ, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 2009;119:1542-9.

26. Rous P, Beard JW. The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). *J Exp Med* 1935;62:523-48.
27. 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.
28. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
29. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
30. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.
31. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995;9:2335-49.
32. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004;92:873-80.
33. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 1995;69:2989-97.
34. 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.
35. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152-8.
36. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, Suuronen R, Lindqvist C, Auvinen E, Molijn 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.
37. 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.
38. 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.

39. 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.
40. Hafkamp H, Ernst JMS, Annick H, Fredrik JB, Winand NMD, Frans CSR, Anton HNH, Johannes JM. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16 and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8 *International Journal of Cancer*, 2003:394-400.
41. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehueling M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92:2875-84.
42. Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet* 1999;354:1442-3.
43. 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;26:612-9.
44. Attner P, Du J, Nasman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer*;126:2879-84.
45. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 2003;192:129-32.
46. 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.
47. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 2000;Dec;9:433.
48. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral Sexual Behaviors Associated with Prevalent Oral Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis* 2009.
49. 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;356:1944-56.
50. Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:836-40.
51. Duray A, Descamps G, Bettonville M, Sirtaine N, Ernoux-Neufcoeur P, Guenin S, Mouallif M, Depuydt CE, Delvenne P, Saussez S. High Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus in Palatine Tonsils from Healthy Children and Adults. *Otolaryngol Head Neck Surg*.

52. 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.
53. Rotnaglova E, Tachezy R, Salakova M, Prochazka B, Kosl'abova E, Vesela E, Ludvikova V, Hamsikova E, Klozar J. HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer*;129:101-10.
54. 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.
55. 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.
56. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.
57. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000;89:300-4.
58. 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 human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5630-6.
59. Straetmans JM, Olthof N, Mooren JJ, de Jong J, Speel EJ, Kremer B. Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 2009.
60. 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.
61. 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.
62. Agrawal Y, Koch WM, Xiao W, Westra WH, Trivett AL, Symer DE, Gillison ML. Oral human papillomavirus infection before and after treatment for human papillomavirus 16-positive and human papillomavirus 16-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:7143-50.

63. D'Souza G, Sugar E, Ruby W, Gravitt P, Gillison M. Analysis of the effect of DNA purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:5526-35.
64. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
65. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 2003;112:23-33.
66. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol* 2007;106:549-57.
67. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-75.
68. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000;20:1301-5.
69. 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.
70. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104:336-44.
71. 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.
72. Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SM, Klingenberg B, Voogd AC, Bot FJ, Klussmann JP, Hopman AH, Manni JJ, Kremer B, Ramaekers FC, Speel EJ. P21(Cip1/WAF1) expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Mod Pathol* 2009;22:686-98.
73. 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.
74. 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.

75. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:24-31.
76. Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, Turek LP. P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008;44:133-42.
77. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3128-37.
78. 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.
79. 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.
80. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-83.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.

87. 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.

88. 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.

89. 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.

90. Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, Hoover A, Hostager B, Gupta A, Anderson ME, Lee JH. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135:1137-46.

10. Příloha:

Publikace s IF:

- 1)Rotnáglóvá E, Tachezy R, Saláková M, Procházka B, Košlabová 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, Rotnáglóvá 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.; Rotnáglóvá E.; Košlabová 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)Rotnáglóvá E., Tachezy R., Saláková M., Košlabová 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