



Univerzita Karlova v Praze

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát dizertační práce

**Imunofenotypizace pacientů s HPV-
asociovanými a neasociovanými karcinomy
hlavy a krku**

MUDr. Eva Lukešová

Praha 2014

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie.

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

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

Autor: MUDr. Eva Lukešová

Školitel: Prof. MUDr. Jan Klozar, CSc.

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

ABSTRAKT

Karcinomy hlavy a krku (HNSCC) jsou celosvětově významnou příčinou úmrtnosti. Mezi hlavní etiologické faktory patří kouření, konzumace alkoholu a infekce lidskými papillomaviry (HPV). Pacienti s HPV-asociovanými HNSCC mají lepší prognózu. U pacientů s HNSCC byla detekovaná řada abnormalit v imunitním systému. Jen několik málo prací porovnává jak virologické, tak imunologické parametry a koreluje je s prognózou pacienta.

Dizertační práce byla zaměřená na studium imunologického profilu u pacientů s HNSCC, který je či není etiologicky spjat s HPV.

Do souboru bylo zařazeno 110 pacientů s HNSCC. Na základě HPV 16 E6 mRNA byli pacienti rozděleni do skupiny HPV-pozitivních a HPV-negativních. Základní lymfocytární subpopulace v periferní krvi (PK) (CD3+, CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD4+, CD8+, CD19 B buňky a CD3- CD56+ CD16+ NK buňky) byly detekovány pomocí průtokové cytometrie. Pacienti s HPV-asociovanými HNSCC byli prognosticky zvýhodněni. Dále bylo přežívání ovlivněno hladinou CD4+ CD25+ Treg a nižším poměrem CD8+/ CD4+ CD25+ Treg v PK. Skupina pacientů s HPV-asociovanými karcinomy a vyšší hladinou CD4+ CD25+ Treg vykazovala signifikantně lepší přežívání. U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy byly detekovány signifikantní změny v zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací. Z výsledků vyplývá, že u pacientů s HPV-asociovanými HNSCC je imunitní systém modifikován.

ABSTRACT

The increasing incidence of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is associated with an infection caused by human papillomaviruses (HPV). Most significant feature of patients with HPV-positive HNSCC is a lower recurrence rate. HNSCC is linked to an alteration in the immune system. While many studies reported correlation of the level of T cell populations and patient prognosis only few of them analyzed both virological and immunological parameters. The aim of this study was to determine whether HPV infection and the immunological status influence patient prognosis individually or in concurrence.

In our study, 110 patients with HNSCC were enrolled. They were divided into HPV-positive and HPV-negative groups based on the expression of HPV 16 E6 mRNA. Basic lymphocyte subpopulations (CD3+, CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD4+, CD8+, CD19 B cells, and CD3- CD16+ CD56+ cells K cells) were determined by flow cytometry in the peripheral blood (PB).

We observed significantly better survival in patients with HPV-associated HNSCC. Moreover, survival was affected by the levels of CD4+ CD25+ Treg and a lower CD8+/ CD4+ CD25+ Treg ratio in the PB. Group of patients with HPV-associated carcinomas and higher level of CD4+ CD25+ Treg showed significantly better survival. Patients with HPV-associated carcinomas had significantly changes in the immune system. The immune system of HPV-associated HNSCC is modified.

OBSAH

1. Úvod.....	5
2. Stanovení cílů a hypotéz.....	6
3. Materiál a metodika.....	8
4. Výsledky.....	9
5. Diskuze.....	13
6. Závěry.....	16
7. Literatura.....	17
8. Příloha.....	18

1. ÚVOD

Karcinomy hlavy a krku (HNSCC) jsou s přibližně 550 000 každoročně nově diagnostikovanými případy celosvětově významnou příčinou nemoci a úmrtnosti (Warnakulasuriya 2009).

Mezi hlavní etiologické faktory patří kouření a konzumace alkoholu. Přibližně 25% HNSCC je asociováno s infekcí HPV (Smith et al. 2012). Velké epidemiologické studie popisují vzestupný trend v incidenci karcinomů orofaryngu, zatímco incidence karcinomů v jiných lokalitách horních cest dýchacích a polykacích má sestupnou tendenci (Nasman et al. 2009). Tato vzrůstající incidence je vysvětlována HPV infekcí. Z klinického hlediska je nejvýznamnější, že pacienti s HPV-asociovanými HNSCC mají lepší prognózu (Koslabova et al. 2013).

U pacientů s HNSCC byla detekována řada abnormalit v imunitním systému (Duray et al. 2010).

V současné době je dobře známo, že vznik HNSCC je spjat s kouřením, konzumací alkoholu a HPV. Avšak růst

a progresu nádorů jsou asociovány se selháním imunitního systému. Recentní studie poukazují na specifické změny v imunitním systému pacientů s HNSCC (Duray et al. 2010). Klíčovou roli na poli protinádorové imunity hrají T lymfocyty (Badoual et al. 2013), které jsou nyní v souvislosti s nádorovými stavy detailně studovány. Bylo zjištěno, že T lymfocyty vyskytující se v nádorem postiženém organismu vykazují řadu nejen kvalitativních defektů, ale i kvantitativní změny a to jak v nádorovém mikroprostředí (NM), tak v periferní krvi (PK) (Hoffmann et al. 2002; Nordfors et al. 2013). HPV infekce aktivuje v napadaném organismu jak neadaptivní tak adaptivní imunitní mechanismy (Deligeoroglou et al. 2013). Z neadaptivních mechanismů se uplatňují zejména NK buňky, NKT buňky a makrofágy (Deligeoroglou et al. 2013). Z adaptivních imunitních mechanismů to jsou specifické Tc lymfocyty (Deligeoroglou et al. 2013). Ve většině případů dochází po aktivaci těchto mechanismů k potlačení infekce. HPV však disponuje řadou mechanismů, jak imunitnímu systému uniknout. Mnoho studií popisuje prognostický význam imunologických parametrů u epitelových nádorů (Salama et al. 2009), ale je jen pár studií zabývajících se vztahem mezi HPV infekcí, imunitním stavem a prognózou u pacientů s HNSCC (Wansom et al. 2012; Nordfors et al. 2013).

2. STANOVENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ

Dizertační práce je zaměřena na detekci jednotlivých lymfocytárních subpopulací v periferní krvi u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými HNSCC a na

vliv imunologických a virologických parametrů na prognózu pacienta.

Cíle dizertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- A) Stanovit prognostický význam HPV
- B) Ověřit, je-li možné pro průkaz HPV etiologie HNSCC nahradit detekci HPV 16 E6 mRNA detekcí kombinace markerů HPV 16 DNA a p16
- C) Určit, je-li imunofenotyp u pacientů s HNSCC v porovnání s imunitním systémem zdravých jedinců modifikovaný
- D) Porovnat případné změny v imunitním systému u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými HNSCC
- E) Zjistit, ovlivňuje-li imunitní stav pacientů s HNSCC jejich prognózu
- F) Určit, zda virologický či imunologický faktor je prognosticky významnější, zda tyto faktory působí v součinnosti, či nezávisle na sobě.

Cíle byly stanoveny na základě těchto hypotéz:

1H1 – HPV pozitivita je asociována s lepší prognózou pacientů s HNSCC

1H0 – Není pozorováno lepší přežívání v závislosti na HPV statutu

2H1 – Pro průkaz stanovení HPV- pozitivity je postačující detekce kombinace markerů HPV DNA + p16, není nutné detekovat HPV 16 E6 mRNA

2H0 – Kombinace markerů HPV DNA + p16 není dostatečná pro přesnou detekci etiologie HPV u HNSCC

3H1 – U pacientů nádorovým onemocněním dochází ke změnám v zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v PK v porovnání se zdravými osobami

3H0 – Nejsou pozorovány změny v zastoupení imunitních parametrů v PK u pacientů s nádorem v porovnání se zdravými osobami

4H1 Zastoupení jednotlivých imunologických parametrů v PK se liší v závislosti na etiologii nádoru (HPV-asociovaný/HPV-neasociovaný karcinom)

4H0 Změny v imunitním systému nejsou ovlivněny etiologickým agens

5H1 Imunitní profil pacientů s HNSCC ovlivňuje prognózu pacienta

5H0 Prognóza pacienta s HNSCC není ovlivněná imunitním stavem nemocné

3. MATERIÁL A METODIKA

Do souboru bylo zařazeno 110 pacientů s HNSCC.

Celkem 52 zdravých jedinců tvořilo kontrolní skupinu.

Na základě HPV 16 E6 mRNA, která byla izolovaná z nádorové tkáně, byli pacienti rozděleni do skupiny HPV-pozitivních a HPV-negativních. HPV 16 E6 mRNA byla vyšetřena metodou reverzní transkripce a následně byla provedena PCR. HPV DNA byla izolována z tkáně karcinomu a byla detekovaná pomocí PCR. Typizace byla provedená metodou reverzní hybridizace (reverse line

blott hybridization). Exprese proteinu p16 byla stanovena na základě imunohistochemického vyšetření.

Základní lymfocytární subpopulace v periferní krvi (PK) (CD3+, CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD4+, CD8+, CD19 a CD3- CD56+ CD16+) byly detekovány pomocí průtokové cytometrie.

Průměrné hladiny imunologických parametrů byly porovnávány mezi skupinou pacientů s HNSCC a skupinou zdravých kontrol. Dále byly tyto průměrné hodnoty porovnávány mezi pacienty s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými karcinomy. Navíc byla zjišťována závislost imunitních buněk na věku pacienta s karcinomem a na věku zdravého jedince. Na základě hladiny Treg v PK byli pacienti rozděleni do skupiny Treg high, u kterých bylo detekováno více než 5,2% Treg v PK v porovnání se zdravými jedinci a do skupiny Treg low, u nichž bylo v PK méně než 5,2% Treg v porovnání s kontrolní skupinou. Cut off pro Treg byl stanoven na základě mediánu kontrolní skupiny. Přežívání bylo měřeno ve dnech od data diagnózy do data úmrtí nebo k datu poslední kontroly metodou Kaplan-Meier, Log-rank testem a Coxovou regresí. Pomocí Mann-Whitney testu byla zjišťována závislost mezi HPV a Treg.

4. VÝSLEDKY

Demografické a klinicko-patologické charakteristiky

Do studie bylo zařazeno 110 pacientů s HNSCC a kontrolní skupina sestávala z 52 zdravých osob. Většina pacientů byli muži (66,3%), průměrný věk pacientů ve studii byl 58,2 let. Většina byla v době zařazení do studie

aktivními kuřáky, kteří pravidelně konzumovali alkohol. Nejfrekventovanější byla orofaryngeální lokalizace karcinomu. Do studie byli zařazeni pacienti převážně s menšími karcinomy (T1 a T2) a častěji u nich byla detekována přítomnost lokoregionálních metastáz. Vzhledem k uzlinovému nálezu se nejčastěji jednalo o pokročilejší stádia onemocnění (stádium III a IV), a karcinomy byly častěji dobře diferencované

Detekce HPV DNA a HPV 16 E6 mRNA v nádorové tkáni

Ze 110 pacientů byla HPV DNA detekována u 44 (40,0%), zjištěny byly pouze vysoce rizikové typy HPV. Nejčastěji detekovaný byl typ HPV 16. Častěji byla HPV DNA detekována v orofaryngeální lokalizaci (93,2%). HPV DNA nebyla nalezena ani u hypofaryngeálních ani u laryngeálních karcinomů. HPV 16 E6 mRNA byla exprimována u 83,7% pacientů. Shoda mezi současnou pozitivitou HPV 16 DNA a pozitivitou HPV 16 E6 mRNA byla středně významná (Kappa =0,5848).

Detekce proteinu p16 v nádorové tkáni

Celkem v 55,0% případů byl detekován protein p16. Shoda mezi HPV 16 E6 mRNA pozitivitou a p16 pozitivitou a shoda mezi HPV 16 DNA pozitivitou a p16 pozitivitou byla středně významná (Kappa = 0,685 a Kappa=0,514). Detekce HPV DNA spolu proteinem p16 vykazovala 66,6% senzitivitu a 91,5% specificitu.

Porovnání jednotlivých lymfocytárních subpopulací mezi pacienty s karcinomem a kontrolní skupinou

Analýza byla provedena u 110 pacientů a 52 zdravých jedinců.

Analýza těchto parametrů potvrdila statisticky významné rozdíly v zastoupení lymfocytárních parametrů mezi pacienty a kontrolami pro CD19 B buňky ($P < 0,001$), CD4+ CD25+ Treg ($P < 0,001$) a FoxP3 Treg ($P < 0,001$). Statistický významný rozdíl v zastoupení CD19 B buněk, CD4+ CD25+ Treg a FoxP3 Treg mezi pacienty a kontrolami zůstal zachován i po adjustaci na věk a kouření.

Dále bylo hodnoceno zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v závislosti na věku při srovnání pacientů a kontrolní skupiny a jednotlivé imunitní parametry byly adjustovány na kouření. Statisticky významné rozdíly mezi pacienty a kontrolní skupinou byly pozorovány jen u CD3- CD56+ CD16+ NK buněk.

Imunitní profil u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku

Průměrné zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v PK bylo porovnáváno mezi pacienty s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými karcinomy. Analýza těchto parametrů potvrdila statisticky významně zvýšené hladiny CD8 + T lymfocytů (průměr = 28,6; $P = 0,039$), CD3- CD56+ CD16+ NK buněk (průměr = 12,6%; $P = 0,033$) a snížené hladiny CD19 B buněk (průměr = 9,8%; $P = 0,035$) u HPV-asociovaných karcinomů ve srovnání s HPV-neasociovanými karcinomy. U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy

byla zvýšená i hodnota součtu CD4+ CD8+ T lymfocytů (průměr = 75,2%; P= 0,002). Po adjustaci na věk zůstal zachován statisticky významný rozdíl v zastoupení CD8+ T lymfocytů, CD19 B buněk a součtu CD4+ CD8+ T lymfocytů.

Dále bylo hodnoceno zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v závislosti na věku pacienta. Hladina CD8+ T lymfocytů, CD3- CD56+ CD16+ NK buněk a CD19 B buněk se s věkem zvyšovala, zatímco hladina CD4+ a CD4+ CD25+Treg se s věkem snižovala. Nicméně, až na CD3- CD56+ CD16+ NK buňky (P=0,007) byly hodnoty statisticky nevýznamné.

Význam virologických, imunologických a klinicko-patologických parametrů pro prognózu pacientů s karcinomem hlavy a krku

Za použití Kaplan Meierovy analýzy a log rank testu bylo pozorováno lepší specifické přežití (DSS- disease-specific survival) pacientů s HPV-asociovanými karcinomy ve srovnání s HPV- neasociovanými karcinomy (P=0,032).

V multivariantní Coxově analýze byly testovány následující proměnné a jejich vliv jak na DSS, tak na celkové přežití (OS-overall survival): velikost nádoru, přítomnost uzlinových metastáz, diferenciacie nádoru, kouření, konzumace alkoholu, přítomnost recidivy, poměr CD8+/CD4+ CD25+ Treg, hladina CD4+ CD25+Treg, CD3+ T lymfocytů, CD4+ T lymfocytů, CD8+ T lymfocytů, CD3- CD56+ CD16+ NK buněk a CD19 B buněk. Každý z těchto parametrů byl adjustován na HPV a věk pacienta.

Pro DSS bylo pozorováno statisticky významně lepší přežívání u pacientů bez recidivy (adj P= 0,001), bez přítomnosti lokoregionálních metastáz (adj P=0,020), s nižším poměrem CD8+/CD4+ CD25+ Treg (adj P=0,001) a vyššími hladinami CD4+ CD25+ Treg (CD4+ CD25+Treg high) (adj P=0,001). Na hranici statistické významnosti přežívání pacientů ovlivňovaly vyšší hladiny CD3- CD56+ CD16+ NK buněk (adj P=0,062) a kombinace parametrů HPV+/CD4+CD25+Treg high (adj P=0,063).

Signifikantně lepší přežívání v OS bylo, dle předpokladů, pozorováno u pacientů s menšími karcinomy (T1 + T2), (adj P=0,021) a bez diagnostikované recidivy (adj P=<0,001). Dále u pacientů s nižším poměrem CD8+/CD4+ CD25+ Treg (adj P=0,012) a vyššími hladinami CD4+ CD25+Treg (CD4+ CD25+Treg high) (adj P=0,043).

Dále bylo hodnoceno přežívání pacientů v závislosti na kombinaci virologických a imunologických markerů. Byly porovnány čtyři skupiny pacientů: HPV+/ CD4+ CD25+Treg high, HPV-/ CD4+ CD25+ Treg low, HPV-/ CD4+ CD25+ Treg high, a HPV+/ CD4+ CD25+ Treg low. Signifikantně lepší přežívání v DSS bylo pozorováno u podskupiny pacientů s HPV-asociovanými karcinomy a vyššími hladinami CD4+ CD25+ Treg v porovnání se skupinou pacientů s HPV-neasociovanými karcinomy a nízkou hladinou CD4+ CD25+ Treg (P=0,008).

Použitím Mann-Whitneyho testu byla sledována vzájemná závislost mezi HPV a CD4+ CD25+Treg, která nebyla statisticky významná (P=0,901), což ukazuje, že

virologické a imunologické parametry ovlivňují prognózu pacienta nezávisle.

5. DISKUZE

Tato prospektivní studie byla zaměřená na detekci imunitních parametrů u pacientů s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými HNSCC. Nejprve byla provedena detekce zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací u pacientů s HNSCC v porovnání se zdravými kontrolami. Zatímco zvýšené hladiny CD4+ CD25+ Treg byly detekovány u pacientů s karcinomem, u zdravých kontrol byly pozorovány zvýšené hladiny CD4+ CD25+ FoxP3 Treg. Jistě se zde uplatňuje individuální variabilita imunitního systému, komorbidity, abusus alkoholu či tabáku, možný je též socioekonomický vliv.

Pozornost byla dále věnována tomu, jaký vliv na zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v PK má věk pacienta v době stanovení diagnózy. Byly pozorovány změny v zastoupení imunitních parametrů v závislosti na věku, nicméně pouze závislost CD3-CD56+ CD16+ NK buněk na věku byla statisticky významná. Vzhledem k absenci podobných studií nelze tyto výsledky porovnávat s jinými pracemi. Z hlediska vzájemné interakce mezi imunitním systémem a virem indukovaným karcinomem je studován imunitní profil u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy. Zatímco Wansom (Wansom et al. 2012) neprokázal změny v zastoupení jednotlivých imunologických parametrů v PK v závislosti na HPV statutu u pacientů s HNSCC, v prezentovaném souboru byly pozorovány

změny v zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací mezi pacienty s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými HNSCC. Tyto změny jsou pravděpodobně vyvolány obranným imunitním mechanismem uplatňujícím se v eliminaci viru. Z klinického hlediska je nejzajímavější a zároveň nejprínosnější zkoumat vliv jednotlivých imunitních buněk, potažmo změny jejich hladin, na prognózu pacienta.

Bylo zjištěno, že přežívání je ovlivněno zvýšenou hladinou CD4+ CD25+ Treg, dále kombinací markerů HPV+/CD4+ CD25+ Treg high a vysoce statisticky významný byl zejména nižší poměr CD8+/CD4+ CD25+ Treg. Tímto byly potvrzeny výsledky prací popisující paradoxně pozitivní vliv zvýšené hladiny Treg na prognózu pacientů (Salama et al. 2009). Nejzajímavější výsledky přináší kombinace virologických a imunologických parametrů a jejich vliv na prognózu pacienta. V naší studii byli poprvé pacienti rozděleni do podskupin na základě HPV statutu a hladiny CD4+ CD25+ Treg v PK. Bylo zjištěno, že pacienti s HPV-asociovanými HNSCC a vyšší hladinou CD4+ CD25+ Treg v PK přežívají významně lépe v porovnání s pacienty HPV-neasociovanými karcinomy a s nižší hladinou CD4+ CD25+ Treg. Zároveň nebyla pozorována statistická závislost mezi těmito dvěma parametry, z čehož vyplývá, že HPV infekce a CD4+ CD25+ Treg ovlivňují prognózu pacienta nezávisle. Studie byla dále zaměřená na ověření prognostického významu HPV. Zatímco přítomnost HPV DNA neprokazuje jednoznačnou etiologii HPV, HPV 16 E6 mRNA reflektuje zapojení viru do procesu maligní

transformace. Tkáň karcinomu byla proto analyzována na přítomnost HPV16 E6 mRNA. Tato práce potvrdila, že pacienti s HPV-asociovanými karcinomy přežívají signifikantně lépe v porovnání s pacienty s HPV-neasociovanými HNSCC.

Studie věnující se etiologii HNSCC ve vztahu k prognóze zdůrazňují význam vyšetření proteinu p16 v kombinaci s HPV DNA (Hoffmann et al. 2010).

Senzitivita a specificita kombinace imunohistochemické detekce p16 a detekce HPV DNA byla v této práci 66,6% respektive 91,5%. Tyto výsledky nepotvrdily, že exprese p16 spolu s HPV DNA může sloužit jako jediná metoda ke spolehlivému určení pacientů s HPV-asociovanými HNSCC. Je nutné brát v úvahu, že v aktuálním souboru se nejednalo jen o pacienty s tonzilárním karcinomem, ale šlo o skupinu pacientů s heterogenním zastoupením karcinomů z jednotlivých sublokalit horních cest dýchacích a polykacích. Znalost kombinace imunologických a virologických parametrů a jejich působení na prognózu by mohla být v blízké budoucnosti velmi cenným vodítkem pro více specifickou léčbu pacientů s HNSCC.

6. ZÁVĚRY

Nejdůležitější závěry dizertační práce lze shrnout takto:

- A) HPV je prognosticky významným faktorem pro DSS u pacientů s HNSCC
- B) Detekci markeru aktivní virové infekce - HPV 16 E6 mRNA nelze nahradit kombinací markerů

- HPV 16 DNA + p16, především ne u karcinomů jiné, než orofaryngeální lokalizace
- C) Zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v PK se liší u pacientů s HNSCC a u zdravých jedinců
 - D) U pacientů s HPV-asociovanými HNSCC byly v PK detekovány zvýšené hladiny CD3- CD56+ CD16+ NK buněk, CD8+ T lymfocytů a součet CD4+ CD8+ T lymfocytů, až na CD3- CD56+ CD16+ NK buňky zůstaly hodnoty statisticky významné i po adjustaci na věk
 - E) Přežívání bylo ovlivněno hladinou CD4+ CD25+Treg, nižším poměrem CD8+/ CD4+ CD25+Treg a CD3- CD56+ CD16+ NK buňkami nezávisle na HPV statutu. Lepší prognózu měli pacienti s HPV-asociovanými karcinomy a vyšší hladinou CD4+ CD25+ Treg v PK ve srovnání s pacienty s HPV-neasociovanými karcinomy a nižší hladinou CD4+ CD25+ Treg v PK
 - F) Virologické a imunologické parametry ovlivňují prognózu pacienta nezávisle

7. LITERATURA

- Badoual, C., S. Hans, et al. (2013). "PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer." Cancer Res **73**(1): 128-138.
- Deligeoroglou, E., A. Giannouli, et al. (2013). "HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy." Infect Dis Obstet Gynecol **2013**: 540850.

- Duray, A., S. Demoulin, et al. (2010). "Immune suppression in head and neck cancers: a review." Clin Dev Immunol **2010**: 701657.
- Hoffmann, M., A. S. Ihloff, et al. (2010). "p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer." Int J Cancer **127**(7): 1595-1602.
- Hoffmann, T. K., G. Dworacki, et al. (2002). "Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance." Clin Cancer Res **8**(8): 2553-2562.
- Koslabova, E., E. Hamsikova, et al. (2013). "Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumours." Int J Cancer.
- Nasman, A., P. Attner, et al. (2009). "Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma?" Int J Cancer **125**(2): 362-366.
- Nordfors, C., N. Grun, et al. (2013). "CD8 and CD4 tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma." Eur J Cancer.
- Salama, P., M. Phillips, et al. (2009). "Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer." J Clin Oncol **27**(2): 186-192.
- Smith, E. M., L. M. Rubenstein, et al. (2012). "Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and

alcohol: a case for multifactor disease." J Oncol **2012**: 571862.

Wansom, D., E. Light, et al. (2012). "Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16-- associated oropharyngeal cancer." Laryngoscope **122**(1): 121-127.

Warnakulasuriya, S. (2009). "Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer." Oral Oncol **45**(4-5): 309-316.

8. PŘÍLOHA

8.1 Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace

Publikace s IF

Koslabova E, Hamsikova E, Salakova M, Klozar J, **Foltynova E**, Salkova E, Rotnaglova E, Ludvikova V, Tachezy R., Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer*. 2013 Oct 15;133(8):1832-9. IF 6,19

Lukesova E, Boucek J, Rotnaglova E, Salakova M, Koslabova E, Grega M, Eckschlager T, Rihova B, Prochazka B, Klozar J, Tachezy R., High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Biomed Res Int*. 2014;Apr 23., 2014:303929 IF 2,88

Partlová S., Bouček J., Kloudová K., **Lukešová E.**, Zábrodský M., Grega M., Fučíková J., Truxová I.,

Tachezy R., Špíšek R., Fialová A., **Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma**, 2014, Přijato k publikaci v Oncoimmunology, **IF 6,28**

Publikace bez IF

0

8.2 Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

Publikace s IF

Špatenka J, Seeman T, **Foltynová E**, Burkert J, Dušek J, Vondrák K, Janda J, Habrmanová A, Krejčová J, Matoušovic K., Effect of donor/recipient body weight ratio, donor weight, recipient weight and donor age on kidney graft function in children. Nephrol Dial transplant. 2012 Feb;27(2):820-4. IF 3, 37

Fík Z, Valach J, Chovanec M, Mazánek J, Kodet R, Kodet O, Tachezy R, **Foltynová E**, André S, Kaltner H, Gabius HJ, Smetana K Jr., Loss of adhesion/growth-regulatory galectin-9 from squamous cell epithelium in head and neck carcinomas. J Oral pathol Med. 2013 Feb; 42(2):166-73. IF 2, 05

Lukeš P, Pavlík E, Potuznikova B, Nartova E, **Foltynova E**, Plzak J, Katra R, Sterzl I, Bartunkova J, Betka J, Astl J., Detection of Helicobacter pylori in oropharyngeal lymphatic tissue with real-time PCR and assessment of

its carcinogenic potential. Eur Arch Otorhinolaryngol.
2013 Jun 7. IF 1,45

Lukes P, Zabrodsky M, **Lukesova E**, Chovanec M, Astl J, Betka JA, Plzak J., The role of NBI HDTV magnifying endoscopy in the prehistologic diagnosis of laryngeal papillomatosis and spinocellular cancer. Biomed Res Int. 2014 Jun 17, 2014:285486. IF 2,88

Zabrodsky M, Lukes P, **Lukesova E**, Boucek J, Plzak J., The role of narrow band imaging in the detection of recurrent laryngeal and hypopharyngeal cancer after curative radiotherapy. Biomed Res Int. 2014 Jun 30,2014:175398. IF 2,88

Publikace bez IF

Lukeš, P., Zábrodský, M., Plzák, J., Chovanec, M., Foltynová, E., Betka, J.jr., Kastner, J., Betka, J., Úloha NBI v endoskopické diagnostice dlaždicových karcinomů hlavy a krku, Endoskopie 2012, 21(1): 16–20

Lukeš P., Zábrodský M., Lukešová E., Plzák J., Chovanec M., Astl J., Betka J. jr., Betka J., Narrow Band Imaging (NBI) - endoskopická metoda pro diagnostiku karcinomů hlavy a krku. Otorinolaryngologie a Foniatrie. 62, 2013, č.4, s. 173-179