

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

*Studijní obor: Biomedicína*

*Studijní program: Experimentální chirurgie*



**MUDr. Eva Lukešová**

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

*Immunoprofiling in patients with HPV-associated and non-associated head and neck squamous cell carcinoma*

Typ závěrečné práce: Dizertační práce

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

Praha, 2014

## **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.

Souhlasím – ~~Nesouhlasím~~ \*

V Praze, 28. 8. 2014

MUDr. Eva Lukešová

Podpis

## **Identifikační záznam**

LUKEŠOVÁ, Eva, *Imunofenotypizace pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku. [Immunoprofiling in patients with HPV-associated and non-associated head and neck squamous cell carcinoma]*. Praha, 2014. **Počet stran 95**, bez příloh. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice v Motole, Ústav hematologie a krevní transfúze, Oddělení Experimentální virologie. Školitel Klozar, Jan.

## Poděkování

Velice děkuji oběma svým školitelům RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. a Prof. 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, Ph.D., RNDr. Janě Šmahelové, Mgr. Zuzaně Sochorové, Blance Langové 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. Janu Boučkovi, Ph.D., MUDr. Elišce Rotnáglové, Ph.D., MUDr. Evě Košťabové a MUDr. Zdeňkovi Fíkovi, Ph.D.

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, Prof. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D. a MUDr. Petru Lukešovi, Ph.D. za cenné rady a osobní podporu během studia.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu IGA MZ ČR NT 12483 a 11542.

## SOUHRN

Karcinomy hlavy a krku (HNSCC) jsou s přibližně 550 000 každoročně nově diagnostikovanými případy celosvětově významnou příčinou nemocnosti a úmrtnosti. Mezi hlavní etiologické faktory patří kouření a konzumace alkoholu. Přibližně 25% karcinomů hlavy a krku je asociováno s infekcí lidskými papillomaviry (HPV). Velké epidemiologické studie popisují v posledních 40 letech vzestupný trend v incidenci karcinomů orofaryngu, zatímco incidence karcinomů v jiných lokalitách horních cest dýchacích a polykacích má sestupnou tendenci. Tato vzrůstající incidence je vysvětlována HPV infekcí. Z klinického hlediska je nejvýznamnější, že pacienti s HPV-asociovanými karcinomy mají lepší prognózu a nižší frekvenci recidivy onemocnění.

U pacientů s HNSCC byla detekovaná řada jak kvalitativních tak kvantitativních abnormalit buněk imunitního systému. Existuje jen několik málo prací, které porovnávají jak virologické, tak imunologické parametry a korelují 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 izolované z nádorové tkáně 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 a CD3- CD56+ CD16+) 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 v porovnání se skupinou HPV-negativních pacientů s nižšími hladinami CD4+ CD25+ Treg. U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy byly detekovány signifikantně zvýšené hladiny CD3+ CD56+ CD16+ NK buněk, CD8+ T lymfocytů a součet CD4+ CD8+ T lymfocytů.

Z výsledků vyplývá, že u pacientů s HPV-asociovanými HNSCC je imunitní systém modifikován. Kombinace virologických a imunologických parametrů by mohla zpřesnit prognostickou informaci a zároveň úzce profilovat léčebný postup s cílem dosáhnout maximálního terapeutického efektu a zlepšit prognózu pacientů s HNSCC.

## SUMMARY

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) remain a significant cause of morbidity worldwide, with approximately 550,000 new cases diagnosed each year. The main etiological factors include smoking and alcohol consumption. The incidence of non-oro-pharyngeal HNSCC is gradually decreasing while the incidence of squamous cell oro-pharyngeal carcinoma (OPSCC) is still on the rise. This increasing incidence can be most likely attributed to an increasing prevalence of human papillomavirus (HPV) infection. From the clinical point of view the most significant fact is that patients with HPV positive OPSCC have better prognosis.

HNSCC is linked to an alteration in the immune system. Only a limited number of studies have correlated both the immunological parameters and HPV status with patient prognosis.

Therefore, we focused on the research of the immunological profile of patients with HNSCC of viral and non-viral etiology.

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 detected in the tumor tissue. Basic lymphocyte subpopulations (CD3+, CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD4+, CD8+, CD19, and CD3- CD16+ CD56+ 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 Treg showed significantly better survival by comparison to the group of HPV-negative patients with lower levels of CD4+ CD25+ Treg. Furthermore, we observed significantly higher counts of CD3- CD56+ CD16+ NK cells, CD8+ T lymphocytes and CD4+ CD8+ sum in patients with HPV-associated carcinomas.

The immune system of HPV-associated HNSCC is modified. The combination of virological and immunological parameters might help to obtain precise prognostic information and eventually lead to modification of the therapeutic modalities.

# OBSAH

1. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY .....	3
1.1 Karcinomy hlavy a krku .....	3
1.2 HPV infekce.....	5
1.2.1 Klasifikace HPV.....	5
1.2.2 Stavba virionu.....	5
1.2.3 Virový genom.....	5
1.2.4 Životní cyklus HPV.....	7
1.2.5 Proces maligní transformace.....	8
1.3 HPV ve vztahu ke karcinomům hlavy a krku .....	15
1.4 Adaptivní a neadaptivní imunitní mechanizmy.....	17
1.5 Imunitní stav u pacientů s nádorovým onemocněním.....	19
1.5.1 Regulační T lymfocyty.....	27
1.5.2 Imunitní stav u pacientů s karcinomem hlavy a krku.....	33
1.5.2.1 Neadaptivní imunitní mechanizmy.....	34
1.5.2.2 Adaptivní imunitní mechanizmy.....	35
1.5.3 Imunitní stav u pacientů s HPV -asociovanými karcinomy.....	35
1.5.3.1 Specifické změny v imunitním systému u pacientek s karcinomem hrda děložního.....	36
1.5.3.1.1 Neadaptivní imunitní mechanizmy.....	36
1.5.3.1.2 Adaptivní imunitní mechanizmy.....	37
1.6 Imunitní stav u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku, vztah k prognóze.....	37
2. STANOVENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ.....	39
3. MATERIÁL A METODIKA.....	41
3.1 Soubor pacientů.....	41

3.2 Odběr materiálu a zpracování.....	42
3.2.1 Izolace DNA a RNA.....	43
3.2.2 PCR.....	44
3.2.3 Hybridizace.....	45
3.2.4 Reverzní transkripce.....	46
3.2.5 Imunohistochemie.....	47
3.2.6 Průtoková cytometrie.....	48
3.3 Statistická analýza.....	50
4. VÝSLEDKY.....	52
4.1 Demografické a klinicko-patologické charakteristiky.....	52
4.2 Detekce HPV DNA a HPV 16 E6 mRNA v nádorové tkáni.....	54
4.3 Detekce proteinu p16 v nádorové tkáni.....	54
4.4 Porovnání jednotlivých lymfocytárních subpopulací mezi pacienty s karcinomem a kontrolní skupinou.....	55
4.5 Imunitní profil u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku.....	63
4.6 Význam virologických, imunologických a klinicko-patologických parametrů pro prognózu pacientů s karcinomem hlavy a krku.....	71
5. DISKUZE.....	77
6. ZÁVĚRY.....	85
7. LITERATURA.....	86
8. PŘÍLOHA.....	96
8.1 Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace.....	96
8.2 Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace.....	97



# 1. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

## 1.1 Karcinomy hlavy a krku

S přibližně 550 000 každoročně nově diagnostikovanými případy zůstávají karcinomy hlavy a krku celosvětově významnou příčinou nemocnosti a úmrtnosti (Warnakulasuriya 2009; Zivile et al. 2013).

Mezi hlavní etiologické faktory patří kouření a konzumace alkoholu. Podle nejnovějších dat je prevalence HPV v orofaryngu přibližně 48 % (Mehanna et al. 2013). Velké evropské i americké epidemiologické studie v posledních 40 letech popisují vzestupný trend v incidenci karcinomů orofaryngu a to zejména u mladších jedinců (Hammarstedt et al. 2006; Zivile et al. 2013), zatímco incidence karcinomů v jiných lokalitách horních cest dýchacích a polykacích má sestupnou tendenci (Chaturvedi et al. 2008; Nasman et al. 2009). Vzestup počtu nově diagnostikovaných případů je přisuzován zvyšující se prevalenci vysoce rizikových typů HPV u mladších, sexuálně aktivních jedinců (Smith et al. 2004). Nejdůležitějším klinickým faktem je, že HPV pozitivní karcinomy jsou asociovány s lepší prognózou pacienta (Attner et al. 2011; Rotnaglova et al. 2011; Koslabova et al. 2013).

Mezi hlavní léčebné modalitty karcinomů hlavy a krku patří chirurgická a onkologická léčba, zejména radioterapie. Obecným pravidlem je, že u nádorů diagnostikovaných v časném stádiu se používá jedna léčebná modalita (Klozar et al. 2014). Léčba u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním využívá kombinaci léčebných postupů, tedy chirurgie s následnou adjuvantní onkologickou léčbou (Forastiere et al. 1999; Grandis et al. 2004). Užití této kombinované léčby bylo zahájeno v roce 1970, kdy Fletcher a Evers publikovali přesvědčivý důkaz výhody kombinace chirurgické léčby a radioterapie (Adelstein et al. 2003). Do léčebných protokolů karcinomů hlavy a krku bylo v sedmdesátých letech zařazeno chemoterapeutikum cisplatina. Publikované výsledky při použití kombinované adjuvantní onkologické léčby ve smyslu chemoradioterapie (CHRT) dokazovaly vysokou účinnost této léčby (Al-Sarraf et al. 1998). Studie rovněž poukázaly na vyšší lokoregionální kontrolu u pacientů, kterým byla podána adjuvantní CHRT ve srovnání s pacienty, kteří byli po operaci ozářeni bez současného podání chemoterapeutika (Cooper et al. 2004; Denis et al. 2004). Tato kombinovaná léčba je však spojená s nežádoucími toxickými účinky.

V poslední době je studován význam chemoterapeutika taxanu (Yared et al. 2012) a jeho využití v léčbě karcinomů hlavy a krku (Qin et al. 2012).

Přežívání pacientů s karcinomy hlavy a krku se liší v závislosti na stádiu onemocnění (TNM Classification of the UICC,1997). U pacientů se stádiem onemocnění 1a 2 je pětileté přežívání 70% - 90% nezávisle na lokalizaci tumoru (Forastiere et al. 1999). Zatímco pacienti s pokročilejším tumorem – stádium 3a 4, přežívají hůře (Forastiere et al. 1999).

I přes značný pokrok v diagnostice a léčbě jsou dvě třetiny karcinomů hlavy a krku diagnostikovány v pozdních stádiích onemocnění a přibližně 50% pacientů zemře na karcinom do dvou let od stanovení diagnózy (Duray et al. 2010).

V blízké budoucnosti lze předpokládat, že bude součástí diagnosticko-terapeutického schématu rovněž informace o začlenění HPV do procesu maligní transformace, což povede ke zpřesnění prognostické informace a modifikaci léčby ve smyslu deescalace léčebného postupu (Klozar et al. 2014).

V současnosti se pozornost zaměřuje na vliv imunitních parametrů na prognózu pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku (Wansom et al. 2010; Nasman et al. 2012; Wansom et al. 2012; Nordfors et al. 2013). Kombinace znalosti virologických a imunologických markerů by mohla ještě více zpřesnit prognostickou informaci, na základě které by bylo možné a modifikovat léčbu pacientů směrem k vývoji specifických protinádorových vakcín. Navíc by znalost imunitního profilu v součinnosti s HPV-pozitivitou mohla být využita v rámci screeningových programů.

## **1.2 HPV infekce**

Lidský papillomavirus je neobalený virus s cirkulární DNA patřící do čeledi *Papillomaviridae*. V současné době je známo více než 170 typů HPV z nich asi 40 typů má onkogenní potenciál (de Villiers 2013).

### **1.2.1 Klasifikace HPV**

Systém klasifikace papillomavirů zaznamenal v posledních letech významné změny. První systém vycházel z klinických projevů papillomavirové infekce. Na základě sekvence nejvíce konzervativního HPV genu L1 byly v roce 1991 stanoveny nové podmínky pro klasifikaci HPV typů (de Villiers et al. 2004).

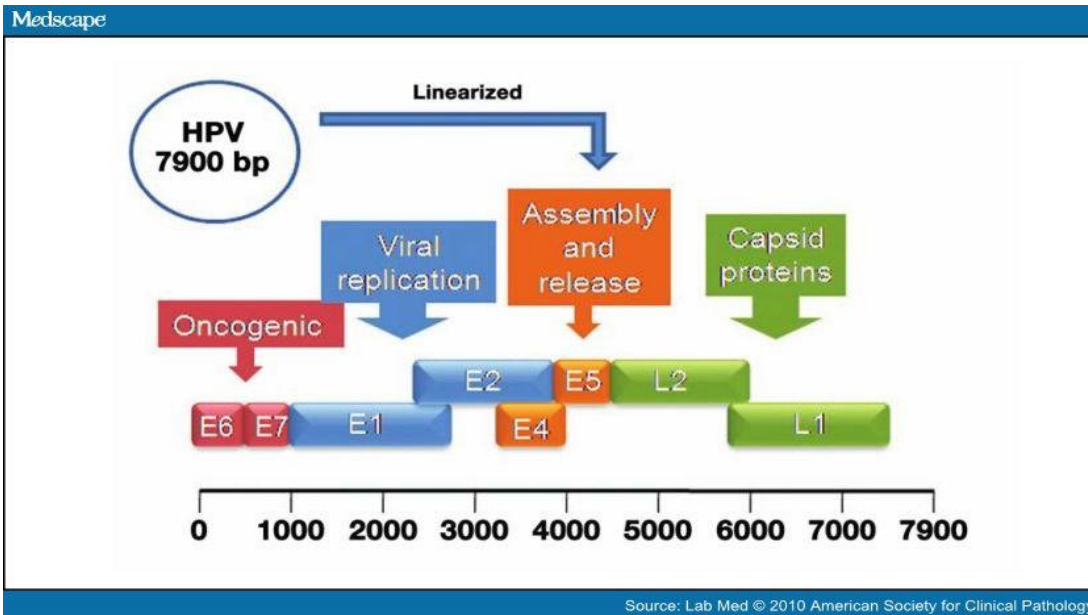
Dle schopnosti maligní transformace infikovaných buněk se HPV typy dále rozdělují na vysoce rizikové (high-risk, HR) a nízko rizikové (low-risk, LR). Mezi nízko rizikové patří například typy HPV 6, 11, 34, 40, 42, 43 a 44, mezi vysoce rizikové patří typy HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58 (Bernard et al. 2010). U karcinomů hlavy a krku se nejčastěji vyskytuje HPV typ 16 (Mirghani et al. 2014).

### **1.2.2 Stavba virionu**

Papillomaviry jsou malé viry s cirkulární dvouřetězcovou DNA, která je dlouhá přibližně 7900 pb. Velikost kapsidy je přibližně 52 až 55 nm. Kapsida je složená ze 72 kapsomer, z nichž 60 je hexavalentních a 12 pentavalentních a je tvořena dvěma strukturálními virovými proteiny. Majoritním (L1) a minoritním (L2). Zatímco L1 protein je nezbytný pro sbalení kapsidy, L2 protein zajišťuje specifickou enkapsidaci genomu a vytvoření infekčního virionu (Arney et al. 2010).

### **1.2.3 Virový genom**

Genom papillomavirů je tvořen časnou (E – early), pozdní (L – late) a nekódující oblastí LCR (z angl. **L**ong **C**ontrol **R**egion). Geny lokalizované v časně oblasti genomu se označují E1 – E8, v pozdní oblasti L1 a L2 (Obrázek 1) (Arney et al. 2010). L1 gen kóduje proteiny virové kapsidy a je hlavním cílem pro amplifikaci a detekci HPV DNA. Produkty genů časně fáze jsou zodpovědné za maligní transformaci buňky. Nekódující LCR oblast je cílem pro virové a buněčné regulační proteiny.

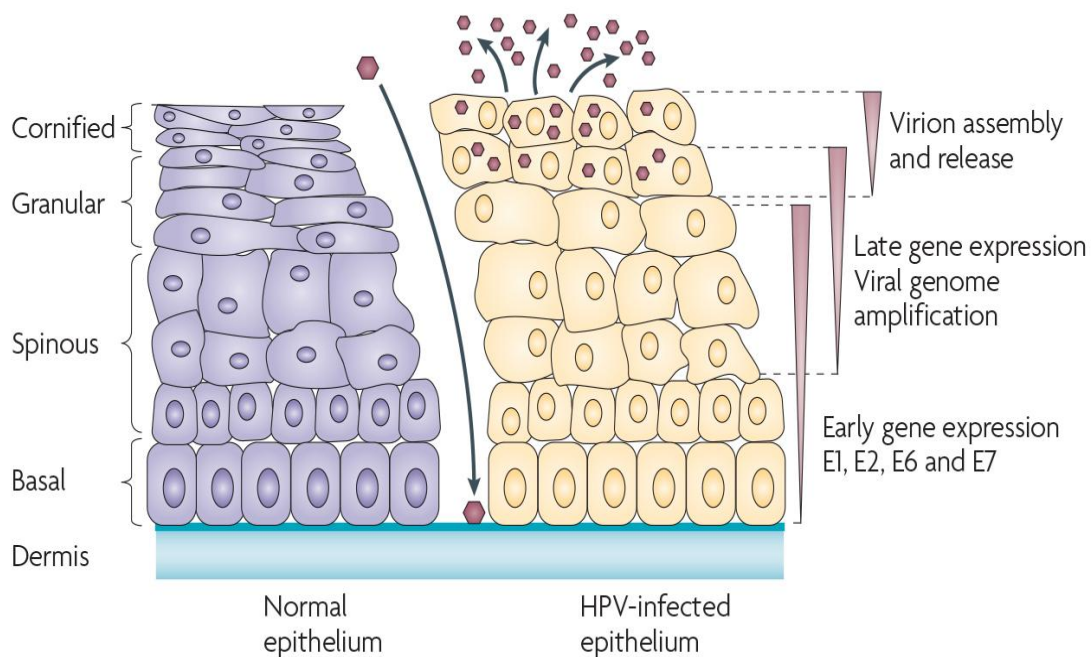


**Obrázek 1.** HPV genom, převzato Arney et al., 2010, (Arney et al. 2010)

*HPV genom: Schéma ukazuje přibližnou polohu 8 překrývajících se čtecích rámců v lineární orientaci.*

### 1.2.4 Životní cyklus HPV

Lidské papillomaviry infikují buňky bazální vrstvy vícevrstvého dlaždicového epitelu sliznic a kůže, které jsou charakteristické svou proliferační aktivitou (Moody et al. 2010). Vzhledem k tomu, že HPV genom nenesou geny kódující enzymy nezbytné pro replikaci viru, je množení viru závislé na regulačních proteinech hostitelské buňky (Moody et al. 2010). Exprese genů je rozdělena na fázi časnou a pozdní a tyto fáze jsou spojeny s konkrétním stupněm diferenciaci infikované buňky (Obrázek 2). Exprese časných virových genů, které jsou zodpovědné za transformaci infikovaných buněk a replikaci virové DNA, probíhá v bazálních buňkách vícevrstvého dlaždicového epitelu, zatímco exprese pozdních genů probíhá výlučně v terminálně diferencovaných buňkách. V horní epitelové vrstvě rovněž dochází k syntéze kapsidových proteinů, vegetativní syntéze DNA a vzniku a uvolnění funkčních virionů (Moody et al. 2010).



**Obrázek 2.** Životní cyklus HPV, převzato Moody et al. (Moody et al. 2010)

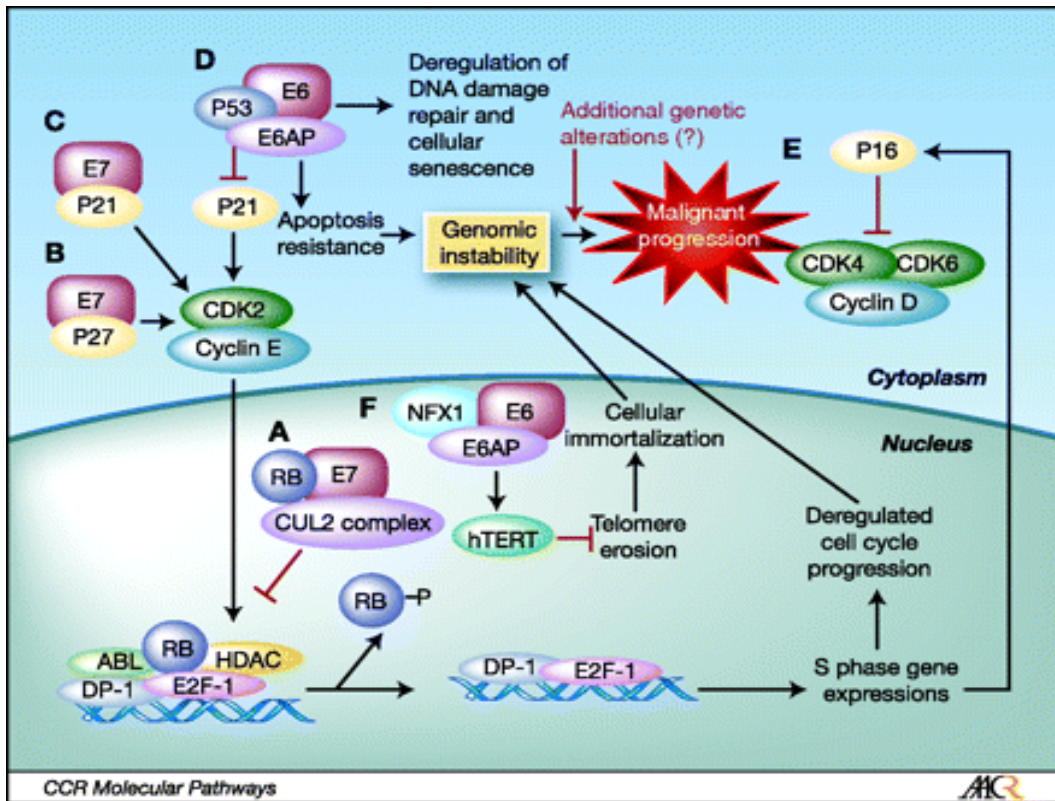
### 1.2.5 Proces maligní transformace

Za fyziologických okolností, dojde-li k poškození DNA, dochází v buňce k intenzivní expresi proteinu p53, který aktivuje gen p21. Produkt genu p21, protein p21, je inhibitor cyklin-závislých kináz, který zabraňuje fosforylaci retinoblastomového proteinu (pRB). Výsledkem těchto procesů je zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Dále tento protein aktivuje geny rodiny bax, což má za následek spuštění apoptózy.

Během maligní transformace dochází k vytvoření stabilního komplexu mezi onkoproteinem mdm-2 a proteinem p53. Mdm-2 protein takto zabraňuje transkripci genů regulované právě proteinem p53 (Momand et al. 1992). Tímto mechanismem dochází k potlačení reparace DNA.

Na procesu buněčné karcinogeneze se podílí několik mechanismů (Obrázek 3). Na rozdíl od karcinomů etiologicky spjatými s konzumací tabáku a alkoholu, kde k maligní transformaci buněk dochází na podkladě mutace genů regulujících buněčný cyklus, u HPV-asociovaných karcinomů se jedná o inaktivaci regulačních proteinů buněčného cyklu. Nejdůležitějšími virovými proteiny podílejícími se na regulaci buněčné proliferace infikovaných buněk jsou onkoproteiny E6 a E7. Onkoproteiny E6 a E7 ovlivňují metabolické dráhy proteinů p53 a pRb, interferony, signální dráhu P13K-mTOR a telomerázy (Moody et al. 2010).

Onkoproteiny E6 a E7 jsou po integraci virového genomu zodpovědné za nádorovou transformaci buňky. Onkoprotein E7 po vazbě na pRb potencuje zvýšenou proliferační aktivitu buňky, apoptóza je blokována onkoproteinem E6. Imortalizace nádorově transformovaných buněk je docíleno pomocí proteinu E5.



**Obrázek 3.** Maligní transformace buňky, převzato Chung et al., 2009 (Chung et al. 2009)

*Schéma maligní transformace způsobené HPV onkoproteiny E6 a E7; ve směru hodinových ručiček od; A) vytvoření komplexu E7 a Cullin 2 ubiquitin ligázy a pRb vede k degradaci pRb; B), interakce mezi E7 a proteinem p27 přispívá ke karcinogenezi; C), interakce mezi E7 a proteinem p21 přispívá ke karcinogenezi; D) vazba E6 onkoproteinu na ubikvitin ligázu E6AP vede k degradaci proteinu p53 a tím nedochází ke spuštění apoptózy E) zvýšená exprese p16INK4a v důsledku zpětné vazby z absence funkce pRb a F) degradace NFX1 transkripčního represoru sdružením E6 a E6AP, což má za následek aktivaci hTERT vedoucí k buněčné imortalizaci.*

Důležitým mechanismem uplatňujícím se při transformaci buněk je integrace virového genomu do hostitelské DNA. Detailně byl mechanismus maligní transformace studován u karcinomu děložního krčku, který je ve 100% etiologicky spjatý s infekcí HPV. Zatímco v prekancerózních lézích je HPV genom nejčastěji ve formě epizomální, u high-grade lézí je genom integrován do hostitelského chromozomu (Moody et al. 2010).

Integrace probíhá v oblasti virového genu E2. U lézí, které obsahují HPV genom v epizomální formě, protein E2 přímo potlačuje expresi časných onkogenů E6 a E7 (Stubenrauch et al. 1998). Integrace virové DNA narušuje expresi genu E2, což vede k deregulované expresi časných virových genů E6 a E7 (Schwarz et al. 1985; Baker et al. 1987). Role integrace u karcinomů hlavy a krku však není takto evidentní.

Onkoprotein E7 se váže na několik buněčných proteinů. Nejlépe charakterizovaná je vazba onkoproteinu E7 na pRb. Rodina proteinů pRb řídí přechod z G1 fáze do fáze S pomocí rodiny transkripčních faktorů E2F (Dyson 1998). Rodina E2F se skládá z 8 členů působících jak aktivaci transkripce, tak její potlačení (Moody et al. 2010). E2F vazebná místa se nacházejí v promotorech genů, které se podílejí na regulaci progresu buněčného cyklu, diferenciaci, mitóze a apoptóze (DeGregori et al. 2006).

Protein pRb se v buňce nachází ve dvou formách. Jako defosforylovaný v G0 fázi buněčného cyklu. V této fázi dochází k vazbě transkripčního faktoru E2F na pRb protein prostřednictvím konzervované sekvence genů na jeho amino-konci. Protein pRb pak působí jako aktivní represor transkripce probíhající z E2F závislých promotorů (nedochází k proliferaci a syntéze DNA) (Turek 1994). V pozdní G1 fázi je pRb fosforylován cyklin-závislou kinázou (CDK), což vede k uvolnění transkripčního faktoru E2F a přechodu do S fáze buněčného cyklu (Stevaux et al. 2002). E2F protein se stává aktivním a váže se na promotory genů pro DNA polymerázu, dihydrofolát- reduktázu, tymidin- kinázu a dalších uplatňujících se při proliferaci a syntéze DNA (Syrjanen et al. 1999).

Onkoprotein E7 přispívá k imortalizaci buněk také prostřednictvím klíčových proteinů buněčného cyklu. Inhibitory CDK – protein p21 a p27 jsou důležitými regulátory růstu během epiteliální diferenciace (Shin et al. 2009). Hlavním cílem proteinů p21 a p27 v lidských keratinocytech je CDK2, která je důležitá pro přechod z G1 do S fáze prostřednictvím interakce s cyklinem E a cyklinem A (Deshpande et al. 2005). Onkoprotein E7 disponuje řadou mechanismů, jak udržet vysokou hladinu CDK2. Karboxy-konec E7 se váže na

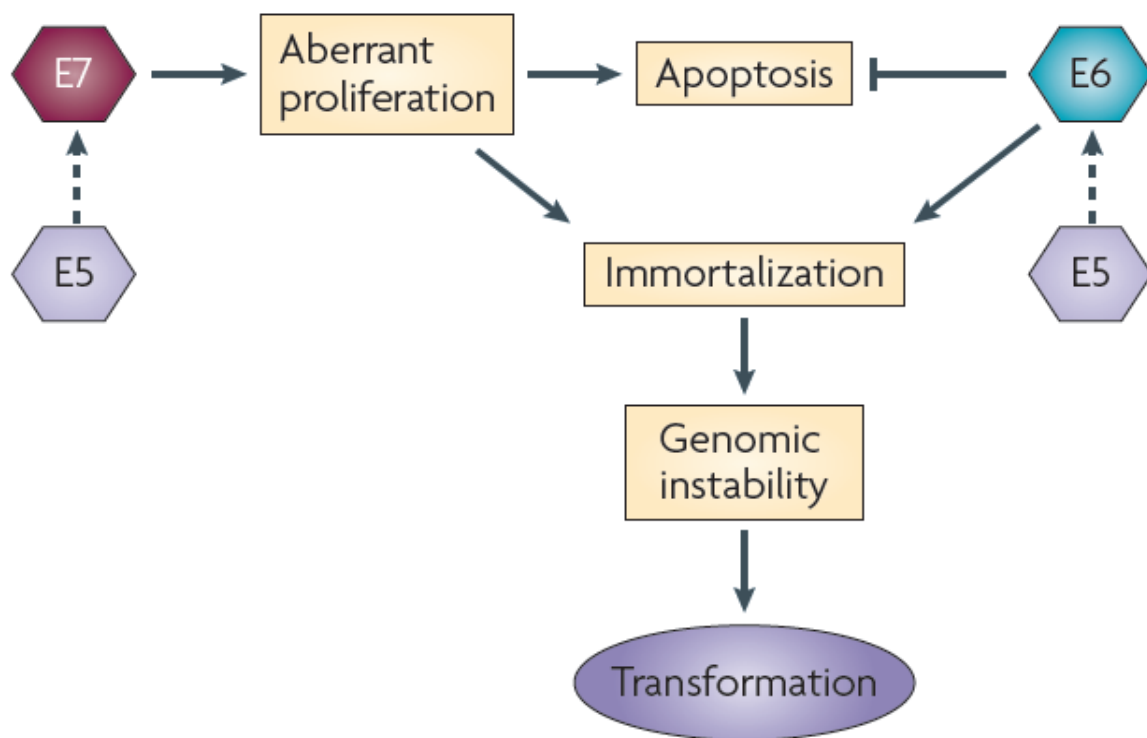


proteiny p21 a p27 a tím účinně neutralizuje jejich inhibiční účinky na cyklin E a cyklin A asociované kinázy (Zerfass-Thome et al. 1996; Jones et al. 1997).

Navíc E2F transkripční faktor indukuje zvýšenou expresi p16INK4a, což je inhibitor komplexu cyklin-závislých kináz. Cyklin-závislá kináza fosforyluje pRb, následně dochází k uvolnění E2F a progresi buněčného cyklu do fáze S, G2 a M. Je-li tato kináza inaktivní, nachází se pRb protein v trvale defosforylované formě a tím dochází k zablokování progresu buněčného cyklu. Protein p16 slouží jako nepřímý marker aktivní virové infekce.

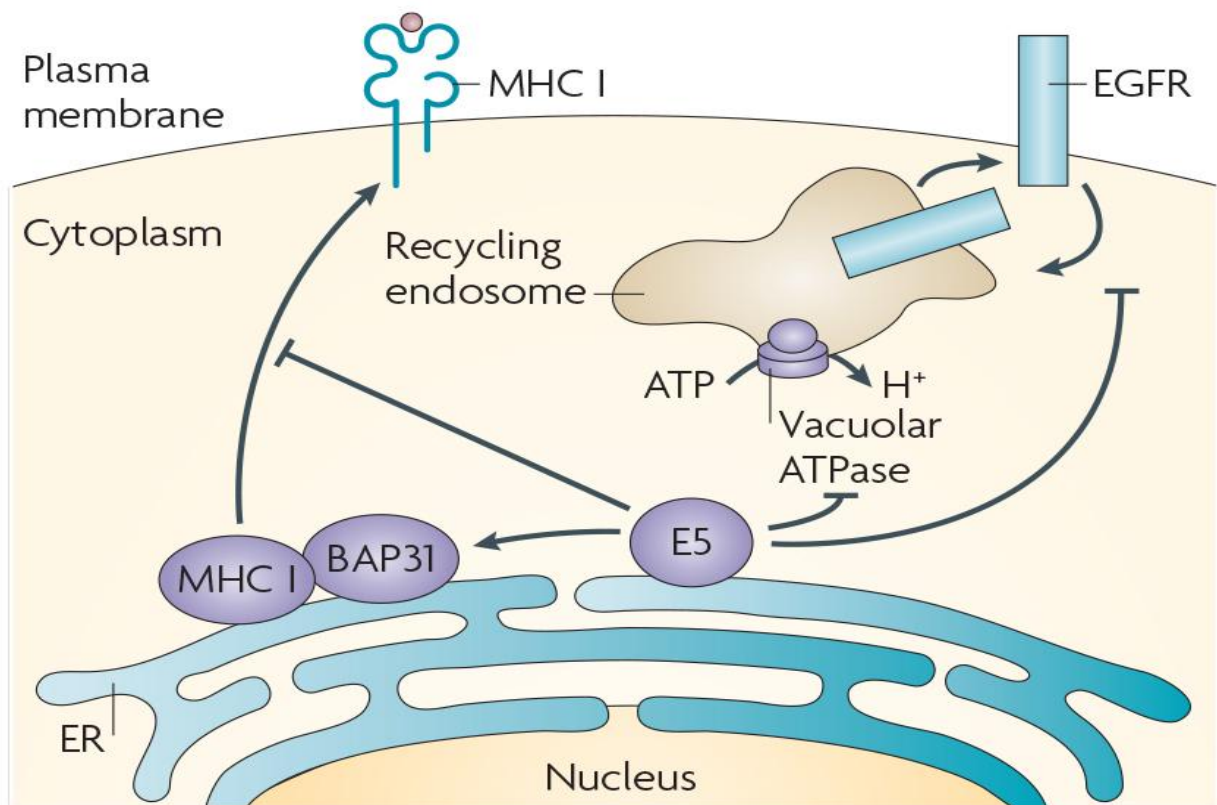
E6 onkoprotein se váže na ubiquiti- ligázu E6 asociovaný protein, což je typický člen rodiny HeCT a společně s proteinem p53 vytváří trimetrický komplex (Huibregtse et al. 1991). To vede k ubikvitinaci a proteozomální degradaci proteinu p53 (Scheffner et al. 1990). E6 protein se může vázat přímo na protein p53 a blokovat transkripci interferencí s jeho DNA (Lechner et al. 1994). Onkoprotein E6 také ovlivňuje funkci proteinu p53 tím, že se váže na histony acetyltransferázy P300 a CREB vázající protein, tím dochází ke snížené acetylaci proteinu p53 a jeho zvýšené stabilitě (Patel et al. 1999).

Aby byly buňky immortalizovány, musí dojít k expresi telomerázy, enzymu, který je důležitý pro replikaci konečných sekvencí DNA v nádorových buňkách (Artandi et al. 2010). Protein E6 aktivuje transkripci telomerázy reverzní transkriptázy (TERT), která je společně s inaktivací pRB proteinu základním krokem buněčné immortalizace (Wise-Draper et al. 2008) (Obrázek 4).



**Obrázek 4.** Imortalizace buněk infikovaných HPV, převzato Moody et al., 2010 (Moody et al. 2010)

Na transformaci buněk infikovanými HPV se podílí také protein E5, který potencuje funkci onkoproteinů E6 a E7 a přispívá tak k nádorové progresi (DiMaio et al. 2001) (Obrázek 5). U myších modelů bylo prokázáno, že protein E5 sám může transformovat buňky normální v buňky nádorové, což mu přisuzuje onkogenní potenciál (Maufort et al. 2010). E5 se uplatňuje zejména v časných fázích vzniku nádorového onemocnění (Bravo et al. 2004) a podporuje proliferaci diferencovaných buněk a produktivní replikaci viru (Moody et al. 2010). Na transformaci způsobenou E5 proteinem se u HPV podílí receptor pro epidermální růstový faktor (EGF). HPV E5 protein neaktivuje EGFR přímo, ale ovlivňuje jeho metabolismus. Kultury lidských keratinocytů exprimujících HPV 16 E5 protein mají na svém povrchu zvýšené množství EGFR, což je způsobeno sníženou schopností degradace EGFR v endozomech, protože HPV 16 E5 protein je schopen interagovat s velkou podjednotkou ATPázy (Conrad et al. 1993). Tato interakce má za následek inhibici transportu H<sup>+</sup> iontů do endozomu, nedochází tak k jeho okyselení a vysoké pH endozomu může zabránit degradaci endocytovaného EGFR a jeho prezentaci na buněčný povrch (Straight et al. 1993). Dále dochází prostřednictvím HPV E5 ke snížení exprese HLA I. třídy na buněčném povrchu infikovaných buněk (Supryniewicz et al. 2008).



**Obrázek 5.** Transformace způsobená HPV E5 proteinem a jeho asociace s EGFR, převzato Moody et al., 2010 (Moody et al. 2010)

### 1.3 HPV ve vztahu ke karcinomům hlavy a krku

V současné době je dobře známo, že přibližně 25% karcinomů hlavy a krku je etiologicky spjato s infekcí HPV (Gillison et al. 2000; Smith et al. 2004), Tyto HPV-asociované karcinomy jsou lokalizovány zejména v oblasti orofaryngu (Mehanna et al. 2013).

Z epidemiologického hlediska je zásadní, že přítomnost HPV infekce je příčinou vzrůstající incidence orofaryngeálních karcinomů (Hammarstedt et al. 2006; Genden et al. 2013).

HPV-pozitivní karcinomy hlavy a krku jsou diagnostikovány především u mladších osob (Mellin et al. 2000; Ang et al. 2010) s převahou mužského pohlaví (Kumar et al. 2007; Chaturvedi et al. 2008), z vyšší socioekonomické sféry a s vyšším maximálně dosaženým vzděláním (Gillison et al. 2008). Ve srovnání s HPV-negativními tumory má vyšší vliv na rozvoj nádorového onemocnění také sexuální chování. Je popisován vyšší počet orálních i genitálních sexuálních partnerů, nízký věk prvního pohlavního i orálního styku, nedostatečné používání bariérové ochrany, či anamnéza sexuálně přenosných chorob (Fakhry et al. 2008; Gillison et al. 2008).

Klinicky jsou HPV-pozitivní karcinomy většinou menší, ale častější je rozsáhlejší uzlinové postižení v době stanovení diagnózy (Mellin et al. 2000; Gillison et al. 2008). Uzliny mají zejména cystický charakter, což může vést k mylné diagnóze laterální krční cysty (Goldenberg et al. 2008; Cantrell et al. 2013). U celkem 25-50% pacientů s krčními uzlinovými metastázami s neznámým primárním tumorem se primární ložisko se nachází v orofaryngeální oblasti (El-Mofty et al. 2008). Detekce HPV v krčních lymfatických uzlinách při pátrání po tumoru nejasné primární lokalizace může být vodítkem, že tumor je lokalizován v oblasti orofaryngu (El-Mofty et al. 2008; Park et al. 2010).

Životní cyklus HPV je omezen na sliznici a kůži. Virus infikuje nejčastěji bazální vrstvy epitelu sliznice orofaryngu, zejména patrovou a jazykovou mandli. Tyto lymfatické orgány hrají zásadní roli v udržení imunitní rovnováhy v oblasti hltanu. Imunitní buňky v nich umístěné mají schopnost rozpoznat patogen a zahájit imunitní odpověď (Nave et al. 2001). HPV však disponuje řadou mechanismů, jak imunitnímu systému uniknout. Přispívá k tomu zejména životní cyklus viru, protože HPV infikuje buňky v bazální vrstvě epitelu sliznic a kůže a zde také zahajuje svůj životní cyklus. Jedná se tedy o místo mimo dosah dermálních buněk imunitního systému. Další způsob, jak uniká HPV imunitnímu systému je, že produkuje pouze nesekretované proteiny a většinu životního cyklu udržuje jejich nízkou produkcí. Velmi důležitým faktorem přispívajícím k úniku před imunitním systémem je

absence virémie a rozvoje zánětu, což vede k nedostatečné aktivaci antigen prezentujících buněk a pouze ke slabé imunitní reakci (Stanley et al. 2006). Navíc během replikace viru a při uvolňování virionů nedochází k lýze infikované buňky. Pokud již dojde k napadení infikovaných buněk imunitním systémem, zabraňují virové proteiny apoptóze a také zasahují do imunitní ochrany zprostředkované interferony. HPV i v epizomální formě snižuje produkci zánětlivých cytokinů a chemokinů, tím dochází ke snížené aktivaci Langerhansových a dendritických buněk. Dále je únik před neadaptivní i adaptivní imunitní odpovědí zprostředkován zejména virovými onkoproteiny, které ovlivňují zpracování antigenů a následnou prezentaci jejich epitopů molekulami HLA I. třídy na povrchu napadených buněk. U buněk infikovaných HPV dochází ke snížení exprese molekuly HLA-A a HLA-B, zatímco HLA-C a HLA-E jsou zachovány, tím je dosaženo necitlivosti napadených buněk k účinku NK buněk a cytotoxickým T lymfocytům (Tc Lymfocyty) (Tachezy et al. 2014).

Z klinického hlediska je nejdůležitější fakt, že pacienti s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku mají lepší prognózu a menší procento rekurencí než pacienti s HPV-negativními karcinomy (Fakhry et al. 2008; Rotnaglova et al. 2011; Koslabova et al. 2013; Klozar et al. 2014) (Lindquist et al. 2007; Fakhry et al. 2008; Attner et al. 2011). HPV-pozitivita je nejsilnějším nezávislým prognostickým faktorem orofaryngeálních karcinomů (Rotnaglova et al. 2011; Koslabova et al. 2013; Klozar et al. 2014). Rovněž se ukazuje, že u HPV-pozitivních karcinomů je prognostický význam regionálních metastáz podstatně nižší než u karcinomů nevirové etiologie (Straetmans et al. 2009; Klozar et al. 2014).

Mechanismus, díky kterému HPV-pozitivní karcinomy vykazují lepší léčebnou odpověď na chemoradioterapii ale i vyšší úspěšnost chirurgické léčby, je dosud nejasný. HPV-pozitivita je pravděpodobně příznivý prognostický faktor nezávisle na druhu zvolené léčebné modality (Klozar et al. 2014). Existují rovněž studie, které popisují vyšší senzitivitu HPV-pozitivních karcinomů k chemoterapii ve srovnání s HPV negativními karcinomy (Fakhry et al. 2008; Worden et al. 2008). Vysvětlení nabízí experimenty *in vitro*, které popisují vyšší sklon k apoptóze u HPV-pozitivních buněčných linií ve srovnání s HPV-negativními buněčnými liniemi (Gupta et al. 2009). Spanos a spol. (Spanos et al. 2009) v *in vitro* pokusech pozorovali vyšší rezistenci k chemoradioterapii u HPV-pozitivních buněčných linií potkanů ve srovnání s HPV-negativními buněčnými liniemi. Avšak jejich experiment *in vivo* prokázal vyšší senzitivitu HPV-pozitivních karcinomů k chemoterapii ve srovnání s HPV-negativními karcinomy. Tato senzitivita však byla pozorována jen u imunokompetentních myší. Spanos a

spol. (Spanos et al. 2009) proto zdůrazňují důležitost imunitního systému, který je modifikován chemoradioterapií, v eliminaci HPV infekce.

#### **1.4 Adaptivní a neadaptivní imunitní mechanismy**

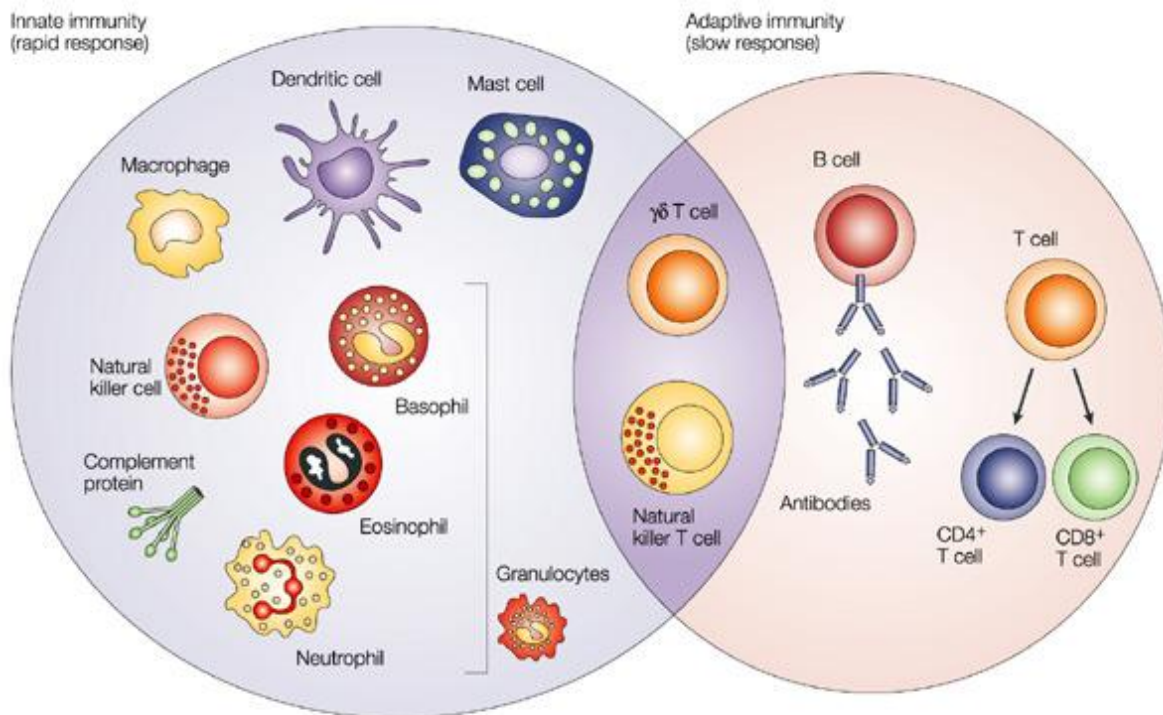
Hlavním úkolem imunitního systému je bránit organismus před cizorodými látkami zevního i vnitřního prostředí. Imunitní mechanismy lze rozdělit do dvou základních kategorií; neadaptivní (vrozené, nespecifické) a adaptivní (získané, specifické) (Obrázek 6).

Neadaptivní imunitní mechanismus je evolučně starší systém. Skládá se z rozpustných faktorů, jako jsou sérové proteiny zvané komplement, a různých buněčných komponent, granulocytů (bazofily, eozinofily a neutrofilny), žírných buněk, makrofágů, dendritických buněk a NK buněk.

Adaptivní imunitní reakce se rozvíjí pomaleji, ale projevuje se větší antigenní specificitou a imunologickou pamětí. Adaptivní imunitní systém je založen na protilátkové odpovědi (B lymfocyty) a buněčné odpovědi (CD4 + T lymfocyty; CD8 + T lymfocyty). T a B lymfocyty na svém povrchu exprimují T-buněčné receptory (TCR) a B-buněčné receptory (BCR, povrchové imunoglobuliny). Tyto povrchové receptory se liší detaily struktury vazebného místa pro epitop daného antigenu. Tím je dán hlavní rozdíl mezi neadaptivním a adaptivním imunitním systémem. Zatímco receptory buněk neadaptivní části rozeznávají hrubé strukturální rysy molekul na povrchu mikrobů, antigenně specifické receptory se zaměřují na rozeznání detailů struktury. Neadaptivní a adaptivní imunitní mechanismy spolu kooperují, existuje řada spojovacích článků umožňujících jim tuto spolupráci.

NK buňky (**N**atural **K**iller cells - „přirození zabíječi“) a gama-delta T lymfocyty patří do skupiny cytotoxických lymfocytů a leží na rozhraní neadaptivní a adaptivní imunity (Dranoff 2004).

Dendritické buňky (DC) jsou leukocyty, které jsou pojmenovány podle jejich povrchových výstupků, které se podobají dendritům neuronů. DC se hojně nacházejí ve tkáních, které jsou na rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím, např. kůži a sliznici trávicího traktu. Jejich funkcí je předkládat antigen a aktivovat T lymfocyty.



Nature Reviews | Cancer

**Obrázek 6.** Neadaptivní a adaptivní imunitní systém, převzato Dranoff et al., 2004 (Dranoff 2004)

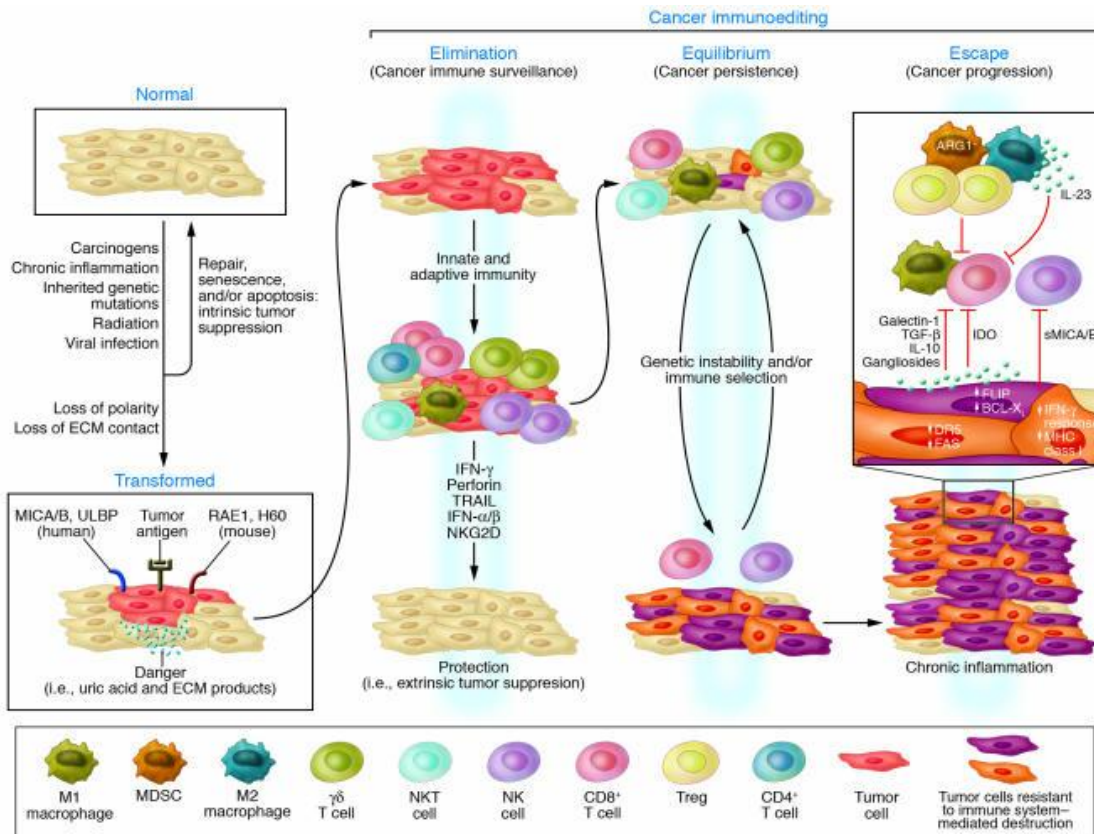


## **1.5 Imunitní stav u pacientů s nádorovým onemocněním**

Všechny nádory vznikají v důsledku genetické poruchy klíčových genů kontroly buněčného cyklu: protoonkogenů, supresorových genů a DNA reparačních genů. Tyto onkogeny a antionkogeny v nemutované formě kódují řadu signálních proteinů, transkripčních faktorů, proteinů regulujících buněčnou adhezivitu či apoptózu (Hořejší et al. 2005). Produkty mutovaných genů mohou mít abnormálně zvýšenou či sníženou aktivitu a vedou k procesu maligní transformace buňky.

Imunitní systém může rozeznat nádorové buňky dvěma způsoby. Pomocí nádorově specifických antigenů (TSA, molekul, které jsou exprimované pouze nádorovými buňkami) anebo pomocí s nádorem asociovaných antigenů (TAA), molekul, které jsou exprimovány jak na buňkách nádorových, tak na buňkách normálních (Graziano et al. 2005). TSA jsou produktem genů původně normálních buněk, které jsou změněné jedinečnou mutací (Srivastava et al. 1988).

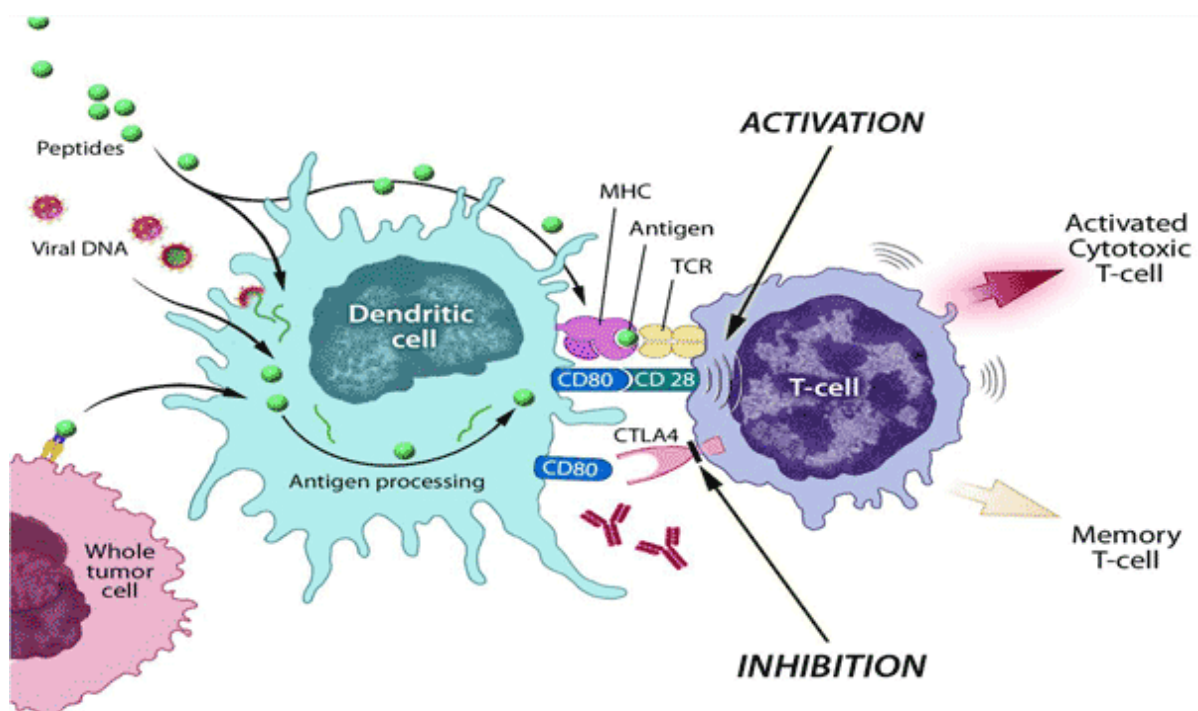
Základním předpokladem protinádorové imunitní odpovědi je rozpoznání antigenů na nádorově transformovaných buňkách imunitním systémem jako cizí a snaha o jejich odstranění. Kontrolní fyziologická funkce imunitního systému spočívá v rozpoznání a včasné eliminaci všech vzniklých transformovaných nádorových buněk (Obrázek 7) (Swann et al. 2007).



**Obrázek 7.** Princip imunitního dozoru, převzato Swann et al., 2010 (Swann et al. 2007)

Transformované buňky unikající vnitřní kontrole jsou rozpoznány imunitním systémem, který nádorově změněné buňky detekuje a eliminuje dříve, než se nádor klinicky projeví. Tato fáze se nazývá eliminační. Další fází se je tzv. „ekvilibrium“, ve kterém se nádorové a imunitní buňky nahází v dynamické rovnováze, která brání růstu nádoru. Převáží-li imunosupresivní mechanismy nádorových buněk, dojde k oslabení protinádorové imunitní reakce, což vede k růstu nádoru. Klinicky detekovatelné nádory již nemohou podléhat mechanismu imunitního dozoru a v jejich případě se hovoří o úniku z imunitního dozoru čili „escape“.

Apoptotickou smrt nádorových buněk lze rozdělit na imunogenní a neimunogenní. Neimunogenní, vede k eliminaci nádorové buňky bez současně aktivované zánětlivé reakce. Naproti tomu imunogenní smrt je vyvolána fyzikálními či chemickými podněty a je provázená imunitní reakcí, zejména maturací dendritických buněk, které jako antigen prezentující buňky (APC) zahajují imunitní odpověď (Obrázek 8) (Carlos et al. 2005; Aarnoudse et al. 2006; Zitvogel et al. 2008).



**Obrázek 8.** Nádorové antigeny vyvolají T-buněčnou odpověď, jsou-li prezentovány naivním T lymfocytům na povrchu APC, převzato (<http://myelomacinderella.net/2013/07/targeted-anticancer-therapy-iii-immune-checkpoint-molecules/>)

Nádorové buňky však disponují řadou mechanismů, jak imunitnímu dozoru uniknout (Obrázek 9). Unikne-li nádor obranným imunitním mechanismům, dochází k jeho růstu, invazi a metastazování. Únik je umožněn kvůli poklesu exprese jednotlivých markerů na povrchu nádorových buněk; dochází ke snížené expresi hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (MHC I.) a dále ke snížení exprese kostimulačních molekul zajišťujících dostatečný přenos signálu (Costello et al. 1999; Whiteside 2002; Hoskin et al. 2008). Navíc jsou nádorové buňky schopny produkovat imunosupresivní molekuly, jako jsou transformující růstový faktor (TGF  $\beta$ ), prostaglandin E2 (PGE2), adenosin a inhibiční cytokiny IL-6 a IL-10. Nádorově změněné buňky se rovněž prezentují zvýšenou rezistencí k apoptóze a v neposlední řadě zvýšenou expresí ligandu FasL, který po vazbě na receptor Fas na povrchu T lymfocytu spouští apoptózu cílové tumor-infiltrující buňky (Costello et al. 1999; Hoskin et al. 2008).

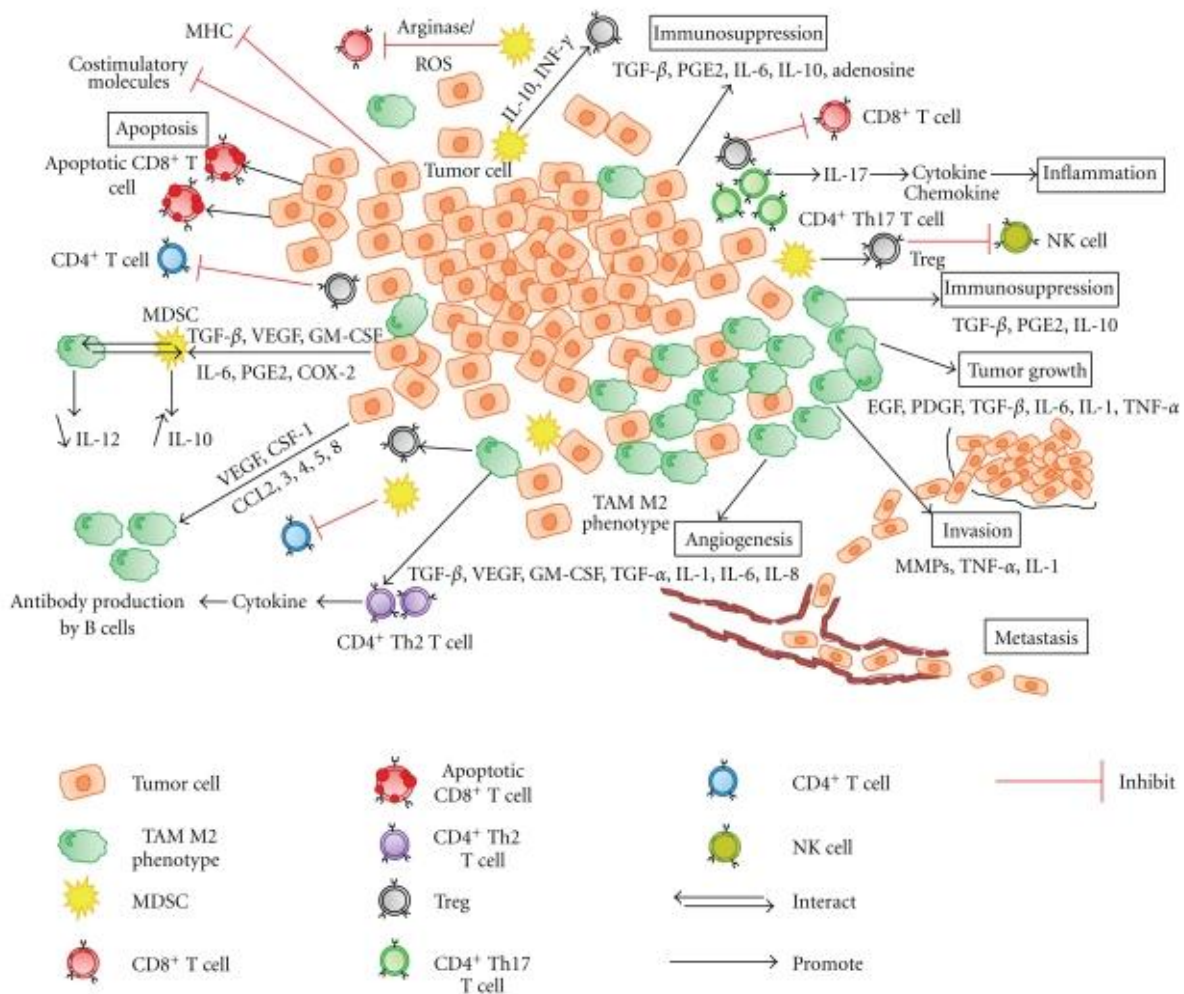
Působení neadaptivních imunitních mechanismů v protinádorové imunitní odpovědi je dnes již dobře známo. Detailně jsou studovány s tumorem-asociované makrofágy (TAM) a NK buňky.

Makrofágy jsou buňky diferencující se z myeloidní linie. Nejprve vznikají monocyty, které cirkulují v periferní krvi a poté se ve tkáních diferencují v makrofágy. Jejich hlavní funkcí je pohlcovat cizorodé látky a epitopy daných antigenů vystavovat na svém povrchu vázané na molekulu MHC II. třídy a tyto epitopy předkládat efektorovým buňkám.

TAM jsou hlavní komponentou imunitního systému v nádorovém mikroprostředí, ve kterém disponují unikátními vlastnostmi. Nádorové buňky mají schopnost atrahovat TAM. Děje se tak pomocí kolonie stimulujícího faktoru-1 (CSF – 1), chemokinů 2, 3, 4, 5, 8 (CCL 2, 3, 4, 5 a 8) a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (Lamagna et al. 2006; Lewis et al. 2006; Coffelt et al. 2009).

Jejich funkce je v současné době detailně studována a nejnovější poznatky poukazují na paradoxní působení TAM. To může být vysvětleno existencí dvou fenotypů, ve kterých se tyto buňky vyskytují. M1 fenotyp stimuluje aktivaci cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a diferenciaci naivních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů směrem k Th1 CD4<sup>+</sup> T lymfocytům a Th17 CD4<sup>+</sup> lymfocytům, což objasňuje lepší prognózu asociovanou s vyšší hladinou TAM (Bingle et al. 2002; Tsung et al. 2002; Laoui et al. 2011). Existují rovněž studie, které popisují horší prognózu u pacientů se zvýšenou hladinou TAM. V tomto případě se jedná o M2 fenotyp TAM. Tyto TAM iniciují diferenciaci naivních CD4<sup>+</sup> lymfocytů směrem k Th2 lymfocytům a regulačním T lymfocytům (Treg), dále potencují angiogenezi a remodelaci tkáně (Lamagna et

al. 2006; Coffelt et al. 2009). TAM usnadňují růst nádoru produkcí epidermálního růstového faktoru (EGF), destičkového růstového faktoru (PDGF), v hypoxických tkáních stimulují angiogenezi pomocí TGF- $\beta$ , VEGF, tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6, IL-8 a CSF. TAM také podporují invazi a migraci nádorových buněk tím, že produkují metaloproteinázy (MMP) degradující mezibuněčnou hmotu a dále produkcí cytokinů IL-1 a TNF- $\alpha$  (Duray et al. 2010). Jejich imunosupresivního účinku je dosaženo pomocí cytokinů TGF- $\beta$ , IL-10 a PGE2 (Duray et al. 2010). V mnoha studiích byla prokázána přímá souvislost mezi zvýšeným počtem TAM a horším přežíváním pacientů (Leek et al. 1996; Lewis et al. 2006). Hlavní marker charakterizující jak M1 tak M2 fenotyp je CD68 (Duray et al. 2010).



**Obrázek 9.** Imunosupresivní mechanismy v mikroprostředí nádoru, převzato Duray et al., 2010 (Duray et al. 2010)

Nádorové buňky disponují řadou mechanismů, jak uniknout imunitnímu systému. Patří mezi ně ztráta nebo snížení exprese MHC molekuly I. třídy a kostimulačních molekul, exprese ligandu FasL, který po vazbě na specifický receptor na povrchu cílových buněk spouští apoptózu efektorové buňky a v neposlední řadě produkují řadu imunosupresivních cytokinů včetně TGF- $\beta$ , PGE2, IL-6, IL-10, a adenosinu. Subpopulace naivních CD4 lymfocytů, tzv. CD4 + Th17 T lymfocyty produkují IL-17 a tím podporují zánětlivou reakci, zatímco CD4 + Th2 T lymfocyty stimulují B buňky k produkci protilátek. Treg podporují progresi nádoru inhibicí funkce CD4+ T lymfocytů, CD8+ T lymfocytů a NK buněk. TAM M2 fenotyp podporuje vývoj naivních CD4+ T lymfocytů směrem k CD4+ Th2 T lymfocytům a Treg. Navíc M2 fenotyp podporuje růst nádoru (EGF, PDGF, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ), angiogenezi (TGF- $\beta$ , VEGF, GM-CSF, TGF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, a IL-8), invazi nádoru (MMP, TNF- $\alpha$ , IL-1), imunosupresi (TGF- $\beta$ , PGE2, a IL-10) a metastazování.

Do skupiny neadaptivních imunitních mechanismů uplatňujících se v protinádorové imunitě patří také NK buňky. Jsou velké granulární lymfocyty, jejichž charakteristickým rysem je schopnost působit bez předchozího kontaktu s antigenem. NK buňky hrají důležitou roli v destrukci nádorových a virem infikovaných buněk. NK buňky rozeznávají buňky, které mají na svém povrchu abnormálně malé množství MHC glykoproteinu I. Jejich aktivace probíhá prostřednictvím vazby signálních molekul na stimulační nebo inhibiční receptory. Mezi stimulační receptory patří povrchové adhezivní molekuly NKR-P1 a Fc receptor CD16. Tyto receptory rozeznávají struktury na povrchu nejrůznějších typů buněk. Mezi inhibiční receptory řadíme imunoglobulinové receptory **KIR (Killer cells Immunoglobulin Receptor)** a lektinové receptory (několik typů heterodimerů CD94/NKG2) (Vivier et al. 2011). Inhibiční receptory reagují s MHC I glykoproteiny. V případě jejich absence nedostává NK buňka dostatečné množství inhibičních signálů, což vede k její aktivaci (Vivier et al. 2011), zatímco v případě absence zánětlivého či nádorového onemocnění je na povrchu buněk dostatečné množství MHC molekul I. třídy a NK buňky tak dostávají především inhibiční signály a nejsou aktivovány. V případě alterace organismu zánětlivým či nádorovým procesem získávají NK buňky převážně aktivační signály. Navíc jsou NK buňky aktivovány prozánětlivými cytokiny, jakou jsou  $\text{INF-}\alpha$ ,  $\text{INF-}\beta$  a IL-12, které jsou uvolňovány buňkou v případě virového postižení. Podle exprese povrchových receptorů CD56<sup>+</sup> a CD16<sup>+</sup> se NK buňky dělí do dvou podskupin. CD56<sup>bright</sup> NK buňky, které neexprimují povrchový marker CD16<sup>+</sup> a tvoří přibližně 10 % NK buněk v periferní krvi. Zbýlých 90% tvoří podskupina CD56<sup>dim</sup> NK buňky, které na svém povrchu exprimují receptor CD16<sup>+</sup> a jsou charakteristické svou cytotoxickou aktivitou.

V cytoplazmě NK buněk se vyskytují granula obsahující perforin (protein vytvářející póry v buněčné membráně) a proapoptotické proteázy zvané granzymy. Poté, co NK buňka rozezná pomocí svých povrchových receptorů buňku cílovou, cytotoxické granule migrují k cytoplazmatické membráně v místě kontaktu obou buněk, následně dochází k fúzi granul s membránou a obsah granul je uvolněn do úzké štěrbině mezi oběma buňkami. Perforin je schopen v cílové buňce tvořit póry, kterými je obsah granul vpraven do cytoplazmy cílové buňky. Granzymy pak v cytoplazmě cílové buňky štěpí prekurzory proteáz, tzv. kaspáz, které se tím aktivují a následně dochází ke spuštění kaskády reakcí, která vede k apoptotické smrti buňky.

Obecně lze říci, že zvýšené hladiny NK buněk u různých druhů malignit korelují s lepším přežíváním pacientů (Ishigami et al. 2000; Cao et al. 2005; Rosso et al. 2012).

Další podskupinou NK buněk jsou NKT buňky (NKT), které na svém povrchu nesou kromě stimulačních a inhibičních receptorů též TCR. Jsou proto součástí adaptivních imunitních mechanismů. Jejich funkcí je rovněž eliminovat virem infikované či nádorově transformované buňky a to jak prostřednictvím inhibičních cytokinů, tak pomocí cytotoxických proteinů granzymu a perforinu (Hořejší et al. 2005).

Mezi buňky uplatňující se v neadaptivní imunitě jsou řazeny také dendritické buňky. DC patří do skupiny antigen prezentujících buněk a hrají zásadní roli ve spolupráci mezi neadaptivní a adaptivní imunitní odpovědí (Steinbrink et al. 2009; Liu et al. 2010). Jsou známy dva druhy DC: myeloidní DC (mDC), které mají původ v kostní dřeni a plazmacytoidní DC (pDC) pocházející z lymfatických uzlin. Na sliznicích a v kůži se nachází mDC, které jsou dále rozděleny do dvou podskupin; Langerhansovy buňky, které se vyskytují v epidermis a v horní části aerodigestivního traktu a na buňky intersticiální a dermální, které se nachází v kůži (Valladeau et al. 2005). V krvi a lymfatických orgánech jsou detekovány pDC (Charles et al. 2010). V periferních tkáních se vyskytují zejména nezralé DC, které jsou charakterizovány vysokou antigenní kapacitou. Přítomnost mikrobiálních produktů a prozánětlivých cytokinů, jako IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  usnadňují vyžívání DC. Ty postupně ztrácejí schopnost vychytávat antigeny a zvyšuje se jejich schopnost prezentovat antigen a stimulovat efektorové T lymfocyty. Na povrchu zralých DC dochází ke zvýšené expresi kostimulačních molekul CD40, CD80, CD86 a DC produkují prozánětlivé cytokiny IL-1, IL-12 a TNF- $\alpha$  (Duray et al. 2010). Zralé DC pak migrují z nelymfoidní tkáně do sekundárních lymfatických orgánů, kde předkládají antigeny T lymfocytům, které se diferencují v efektorové T lymfocyty schopné eliminovat nádorové buňky (Steinbrink et al. 2009; Duray et al. 2010). Imunosupresivní cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$  mohou převést nezralé DC na tolerogenní DC, které mohou navodit toleranci T lymfocytů vůči cizorodým antigenům. Děje se tak zejména během aktivace Treg (Jonuleit et al. 2000; Hawiger et al. 2001; Yamazaki et al. 2006).

V protinádorové imunitě hrají svou nezastupitelnou roli také adaptivní imunitní mechanismy, zejména CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Většina CD8<sup>+</sup> T lymfocytů jsou prekurzory cytotoxických T lymfocytů (Tc lymfocyty), zatímco CD4<sup>+</sup> T lymfocyty jsou prekurzory pomocných T lymfocytů (Th lymfocyty). T lymfocyty se vyvíjejí ze svých prekurzorů v thymu, kde jsou jako nezralé T lymfocyty vystaveny antigenům buněk retikulárního epitelu. Přibližně v 95% dochází po interakci TCR s epitopem daného antigenu k příliš intenzivní nebo naopak k nedostatečné reakci a tyto T lymfocyty jsou zničeny. Pouze 5% T lymfocytů opouští thymus, dostává se do cirkulace a osídluje sekundární lymfatické



orgány (slezina, lymfatické uzliny). V těchto sekundárních lymfatických orgánech setrvávají v naivním stavu. K aktivaci T lymfocytů dochází po vazbě mezi TCR a komplexem MHC na povrchu APC. Dostatečně silný přenos signálu je zajištěn pomocí kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu APC a CD28 na povrchu T lymfocytů (Hořejší et al. 2005). Po aktivaci dochází k vývoji efektorové či paměťové buňky. Hlavní funkcí CD8<sup>+</sup> T lymfocytů je eliminace infikovaných či abnormálních nádorových buněk přes apoptotické receptory (Fas/CD95, TNF-receptor) nebo vpravením pro-apoptotických enzymů (granzym B) (Hořejší et al. 2005).

Mechanismus působení CD4<sup>+</sup> T lymfocytů je závislý na subtypu CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Podle jimi produkováných cytokinů se dělí na Th 1 lymfocyty (produkující zejména IL-2 a INF- $\gamma$ ), které podporují cytotoxickou buněčnou imunitu (Tc lymfocyty, makrofágy). Th 2 lymfocyty produkují zejména cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, a jejich hlavní funkcí je usnadnění protilátkové imunitní odpovědi (B lymfocyty, tvorba protilátek). Th 17 lymfocyty, které produkují IL 17, stimulují produkci dalších prozánětlivých cytokinů (Ostrand-Rosenberg 2008). Poslední podskupinu CD4<sup>+</sup> lymfocytů tvoří Treg, kterým je v současnosti věnována velká pozornost.

### 1.5.1 Regulační T lymfocyty

Existence supresorové regulace imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám byla poprvé zmíněna Sakaguchim a spol. v roce 1995, kteří demonstrovali mechanismus vlastní tolerance zajišťovaný podskupinou CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které začali nazývat Treg. (Sakaguchi et al. 2011). Funkcí Treg je potlačení proliferace a efektorové funkce širokého spektra imunitních buněk (Strauss et al. 2007).

V průběhu výzkumu zaměřujícího se na Treg došlo k značnému vývoji v detekci markerů charakterizujících Treg. Sakaguchi a spol. popisují Treg jako subpopulaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které na svém povrchu exprimují alfa řetězec IL-2 (CD25) (Sakaguchi et al. 2011). Použití povrchového markeru CD25<sup>+</sup> jako znaku definující Treg je však nedostatečné, jelikož receptor CD25<sup>+</sup> je exprimován také na aktivovaných efektorových T buňkách. Je však možné tyto buňky rozdělit do třech podkupin CD25<sup>+</sup> low/intermediate/high, přičemž skupina CD25<sup>+</sup>high s vysokou pravděpodobností exprimuje forkheadbox transcription factor (FoxP3), klíčový marker charakterizující Treg. FoxP3 hraje klíčovou úlohu pro Treg během vývoje v thymu a pro regulaci jejich funkce, bývá také označován jako „master regulator“. Jeho

funkcí je modulovat rozdílnou odpověď na stimulaci TCR u regulačních a u efektorových T lymfocytů (Sakaguchi et al. 2011).

Byla snaha přesněji charakterizovat CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3 Treg pomocí povrchového markeru CD127 (receptor pro alfa řetězec IL-7) (Sakaguchi 2000). Pro Treg je specifická snížená exprese CD127 na povrchu Treg, avšak snížená exprese tohoto povrchového markeru je detekována také u aktivovaných T lymfocytů. Proto detekce snížené exprese CD127 pro charakterizaci Treg nebyla dostačující (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006). Pomocným markerem by v tomto případě mohl být receptor CD62<sup>+</sup>, také známý jako L-selektin.

Regulační T lymfocyty, právě aktivované z naivních T lymfocytů, je tak možno charakterizovat jako CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> CD62<sup>+</sup> (Seddiki et al. 2006; Sakaguchi et al. 2011). Nové poznatky poukazují na ještě přesnější způsob detekce aktivních Treg. Treg exprimující na svém povrchu všechny receptory určující jejich zařazení k Treg nemusí být funkční, tozn. nepotlačují funkci efektorových buněk. Takové buňky se nazývají non-regulační Treg. Rozdíl mezi regulačními a non-regulačními Treg spočívá v úrovni metylace genu FoxP3. Non-regulační Treg mají nekompletně demethylovaný gen FoxP3, zatímco Treg mají kompletně demethylovaný gen FoxP3. Demethylace genu pro FoxP3 svědčí právě pro aktivitu Treg (Sakakura et al. 2006; Wieczorek et al. 2009).

V současnosti jsou definované dvě základní skupiny Treg; přirozeně se vyskytující, nTreg a indukované, Treg (Tabulka 1). nTreg jsou charakterizovány jak expresí transkripčního faktoru FoxP3, tak i mnoha dalších markerů, které nejsou výlučně spojeny se supresivní funkcí Treg. Mezi tyto molekuly řadíme GITR (Glucocorticoid-Induced Tumour-Necrosis Factor Receptor Related Protein). Ten je exprimován na povrchu Treg, ale je také v různé míře přítomen na efektorových T lymfocytech a APC (Ronchetti et al. 2004; Sakaguchi 2005).

Na povrchu Treg dále nacházíme CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4), což je tzv. counter-receptor (molekula vázající se na receptor cílové buňky) pro kostimulační molekuly CD80, CD86, které jsou exprimovány na povrchu APC. Po navázání molekuly CTLA-4 na CD80,CD86 dochází k produkci indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO) a výsledkem je katabolismus tryptofanu. Snížené množství tryptofanu negativně reguluje imunitní odpověď (Kronenberg et al. 2005).

Treg na svém povrchu exprimuje též kostimulační receptor CD28. Ten je nezbytný pro vývoj Treg v thymu, kde CD28 kostimulace vyvíjejících se thymocytů indukuje expresi FoxP3 (Tai et al. 2005; Randolph et al. 2006).

	n-Treg	i-Treg	
	n-Treg	Tr 1	Th 3
<b>Fenotyp</b>	CD4+ CD25+ FoxP3	CD4+ CD25+ IL10+	CD4+ CD25+ TGF- $\beta$
<b>Původ</b>	Thymus	Periferie	Periferie
<b>Působení</b>	Buněčný kontakt  Solubilní cytokiny IL-10, TGF- $\beta$	Solubilní cytokiny:  IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$	Buněčný kontakt  Solubilní cytokin: TGF- $\beta$

**Tabulka 1.** Podskupiny Treg

V současnosti se pozornost zaměřuje na mechanismus působení Treg. Existují čtyři hlavní možné varianty (Obrázek 10):

- 1) působení prostřednictvím sekrece inhibičních cytokinů
- 2) přímé působení kontaktem mezi regulační a cílovou buňkou
- 3) metabolická disrupce
- 4) nepřímé působení prostřednictvím ovlivnění dendritických buněk

Varianta první zahrnuje působení hlavních inhibičních cytokinů : IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35. Jejich imunosupresní efekt byl opakovaně prokázán v *in-vitro* i *in-vivo* experimentech (Strauss et al. 2007; Vignali et al. 2008).

V případě druhém - ovlivnění cílové buňky buňkou regulační, je stále častěji zdůrazňován význam těsného kontaktu (Thornton et al. 1998). Při přímém kontaktu buněk, který je zprostředkován molekulou granzymu A, B a perforinu s molekulou CD18, dochází k cytolýze cílové buňky.

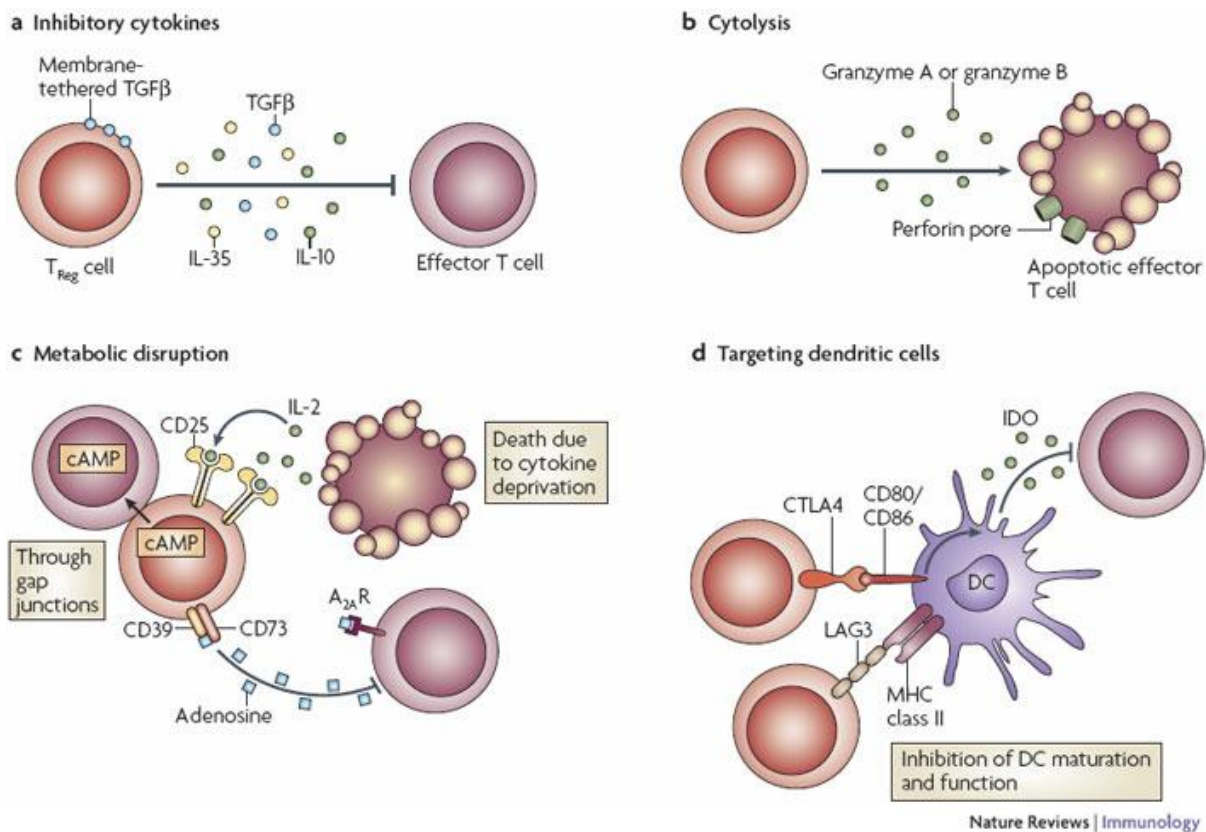
Velká pozornost je v poslední době věnována třetímu mechanismu - takzvané metabolické disrupci. Tento pojem zahrnuje konzumpci IL-2. Treg exprimují na svém povrchu trimetrickou formu receptoru pro IL-2, ke které má IL-2 mnohonásobně vyšší afinitu, což

vede k jeho vychytávání Treg, a tím dochází ke snížení lokální dostupnosti pro dělící se efektorové buňky (Shevach 2009).

Další studie zdůrazňují význam adenosinu pro funkci Treg. Aktivita cílové buňky je potlačena, dojde-li k přenosu cAMP (cyklický adenosin-monofosfát) do cytoplazmy cílové buňky prostřednictvím „gap junction“ (Bopp et al. 2007).

Druhá možnost využití adenosinu k potlačení funkce cílové buňky vychází z předpokladu, že na povrchu Treg jsou vázány enzymy CD73–ecto-5-nukleotidáza spolu s CD39–exonukleosid-trifosfát-difosfohydrolázou-1. Tyto enzymy produkují z extracelulárních nukleotidů vysokou koncentraci adenosinu (Deaglio et al. 2007). Adenosin se poté naváže na inhibiční A2A receptor na povrchu aktivovaných efektorových T lymfocytů a tím dochází ke snížení jejich aktivity (Deaglio et al. 2007).

Posledním možným mechanismem ovlivnění průběhu imunitní reakce je vzájemné ovlivňování Treg a plasmocytoidních dendritických buněk (pDC) a dalších antigen prezentujících buněk (Bordon 2010; Irla et al. 2010). Treg působí inhibičně prostřednictvím vazby CTLA-4 na kostimulační molekuly CD80 nebo CD86, což vede k produkciIDO. Tento enzym zvyšuje množství katabolitů tryptofanu, který působí inhibičně na efektorové buňky (Fallarino et al. 2003; Mellor et al. 2004).



**Obrázek 10.** Možné mechanismy účinku Treg, převzato z Vignali et al., 2008 (Vignali et al. 2008).

Na základě dostupných poznatků je působení Treg v protinádorové imunitní odpovědi nezpochybnitelné, avšak popisovaný vliv na prognózu pacientů dokladovaný v různých studiích je značně heterogenní (Obrázek 11). Vycházíme-li z předpokladu, že Treg potlačují protinádorovou imunitní odpověď, pak by měli být pacienti s nádorovým onemocněním a se zvýšenými hladinami Treg prognosticky znevýhodněni. Tento předpoklad je splněn u pacientů s ovariálním karcinomem (Curiel et al. 2004), karcinomem pankreatu (Vizio et al. 2012), karcinomu plic (Karagoz et al. 2010) karcinomu jater (Fu et al. 2012) a mnoha dalších. Existuje však i řada studií, které popisují paradoxně lepší prognózu u pacientů se zvýšenými hladinami Treg, např. pacienti s maligním melanomem (Ladanyi et al. 2004), kolorektálním karcinomem (Salama et al. 2009), Hodgkinovým lymfomem (Alvaro et al. 2005) a s karcinomem hlavy a krku (Nasman et al. 2012; Wansom et al. 2012; Badoual et al. 2013; Nordfors et al. 2013). Paradoxní role Treg může mít několik možných vysvětlení. Jak již bylo zmíněno výše, detekce markerů definujících Treg zaznamenala v posledních 20 letech rychlý rozvoj. Existují hypotézy, že skutečně funkčně aktivní Treg mají kompletně demethylovaný

úsek genu pro transkripční faktor FoxP3 (Wieczorek et al. 2009). Tento nový diagnostický postup posunul dále možnosti detekovat funkci Treg, což však znesnadňuje korelovat výsledky dřívějších studií, kde tento parametr nebyl vyšetřován, se studii současnými. Navíc, Wieczorek a spol. (Wieczorek et al. 2009) studoval hladiny Treg jak v periferní krvi, tak v nádorovém mikroprostředí a pozoroval signifikantně zvýšené hladiny Treg u pacientů s maligním melanomem, karcinomem plic a kolorektálním karcinomem, kteří byli léčeni IL-2 a naopak snížené hladiny Treg u pacientů, kteří absolvovali imunosupresivní léčbu po transplantaci.

Druhé vysvětlení vychází z faktu, že negativní efekt Treg je zprostředkován zejména jejich inhibičním působením na protinádorové CD8+ T lymfocyty. Proto se zdá být více vypovídajícím parametrem zejména poměr mezi CD8+ T lymfocyty a Treg (Sato et al. 2005; Gao et al. 2007). Hodnocení samotných Treg bez znalosti tohoto poměru může vést k mylné interpretaci výsledků.

V neposlední řadě může být prognóza pacienta ovlivněna součinností Treg a jiného biologického faktoru, jako je tomu v případě karcinomů hrdla děložního, etiologicky téměř ve 100% spjatých s HPV. Bylo prokázáno, že s progresí karcinomu hrdla děložního se zvyšuje exprese cytokinu IL-10 a zároveň byla pozorována statisticky významná korelace mezi hladinou IL-10 a HPV-pozitivitou, zejména typem HPV 16. Tyto výsledky poukazují na vztah mezi HPV infekcí, IL-10 a nádorovou progresí (Bhairavabhotla et al. 2007; Bermudez-Morales et al. 2008). Řada prací popisuje vyšší zastoupení Treg u pacientek s pokročilým stádiem onemocnění (Scott et al. 2009; Chen et al. 2012; Zeng et al. 2013). Vyšší hladiny Treg u pacientek s karcinomem hrdla děložního korelují s horším přežíváním (Jordanova et al. 2008).

<i>Malignancy</i>	<i>N pts</i>	<i>Prognostic value</i>
Breast carcinoma (Bates <i>et al.</i> , 2006)	237	Unfavorable
Breast carcinoma (Gobert <i>et al.</i> , 2009)	191	Unfavorable
Colorectal carcinoma (Salama <i>et al.</i> , 2009)	967	Favorable
Cervix carcinoma (Jordanova <i>et al.</i> , 2008)	115	Unfavorable
Esophagus carcinoma (Yoshioka <i>et al.</i> , 2008)	122	Not significant
Gastric carcinoma (Mizukami <i>et al.</i> , 2008)	80	Unfavorable (*)
Head & neck carcinoma (Badoual <i>et al.</i> , 2006)	84	Favorable
Hepatocellular carcinoma (Gao <i>et al.</i> , 2007)	302	Unfavorable
Kidney carcinoma (Siddiqui <i>et al.</i> , 2007)	170	Not significant
Lymphoma (B cell) (Carreras <i>et al.</i> , 2006)	98	Favorable
Lymphoma (Hodgkin) (Alvaro <i>et al.</i> , 2005)	257	Favorable
Ovary carcinoma (Curiel <i>et al.</i> , 2004)	104	Unfavorable
Pancreatic carcinoma (Hiraoka <i>et al.</i> , 2006)	198	Unfavorable

**Obrázek 11.** Prognostická role Treg v různých typech malignit, převzato Martin et al., 2010 (Martin et al. 2010)

### 1.5.2 Imunitní stav u pacientů s karcinomem hlavy a krku

V současné době je známo, že vznik karcinomů hlavy a krku je spjat např. s kouřením, konzumací alkoholu a infekcí lidskými papillomaviry. Avšak růst a progresse karcinomů jsou asociovány i se selháním imunitního systému karcinomem postiženého organismu. Recentní studie poukazují na specifické změny v imunitním systému pacientů s karcinomy hlavy a krku (Young 2006; Duray et al. 2010; Alhamarneh et al. 2011). Klíčovou roli na poli protinádorové imunity hrají T lymfocyty (Albers et al. 2005; 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, což omezuje jejich funkční schopnosti, ale i kvantitativní změny T lymfocytů jak v nádorovém mikroprostředí, tak v periferní krvi (Hoffmann et al. 2002; Whiteside 2002; Albers et al. 2005; Whiteside 2005; Badoual et al. 2013). Mezi funkční defekty patří mimo jiné nízká, nebo žádná, exprese CD3 zeta řetězce, který je klíčovou signální molekulou v přenosu signálu přes TCR receptor (Whiteside 2005), dále je to nevyváženost v cytokinovém profilu – absence IL-2 či nadprodukce INF- $\gamma$  (Reichert et al. 1998) či přítomnost povrchových apoptotických znaků (Young et al. 1996; Whiteside 2005). Studie popisující sníženou hladinu T lymfocytů v periferní krvi u pacientů s karcinomem hlavy a krku poukazují na schopnost T lymfocytů podléhat spontánní apoptóze (Hoffmann et al. 2002; Kuss et al. 2003). Apoptózu je možno detekovat pomocí následujících apoptotických znaků:

anexinu V, zeta řetězce vázícího se na TCR receptor a pomocí receptoru Fas (Hoffmann et al. 2002). Tyto kvalitativní a kvantitativní změny T lymfocytů umožňují nádorovým buňkám jejich vlastní přežívání a efektivní únik protinádorové odpovědi hostitelského organismu.

Specifické změny v imunitním systému mohou být detekovatelné jak v periferní krvi, tak v nádorovém mikroprostředí (Hoffmann et al. 2002; Whiteside 2005; Badoual et al. 2013). Pro snazší dosažitelnost byly primárně k vyšetření specifických imunologických změn u pacientů s nádorovým onemocněním vyšetřovány vzorky periferní krve a byly detekovány jak kvalitativní, tak kvantitativní změny v jednotlivých lymfocytárních subpopulacích (Saito et al. 1999; Schaefer et al. 2005; Lau et al. 2007; Strauss et al. 2007; Boucek et al. 2010). Několik studií prokázalo pozitivní korelaci v zastoupení jednotlivých buněk v periférii a nádorovém mikroprostředí (Liyanage et al. 2002; Lau et al. 2007; Green et al. 2013), nicméně práce Wansoma a spol. (Wansom et al. 2012) tuto korelaci nepotvrdila. Současné studie se zaměřují na vyšetření imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí (Nasman et al. 2012; Wansom et al. 2012; Nordfors et al. 2013).

### **1.5.2.1 Neadaptivní imunitní mechanizmy**

Mezi neadaptivní imunitní mechanizmy patří zejména aktivace NK buněk a makrofágů. NK buňky jsou charakteristické svou schopností destruovat cizorodou buňku bez předchozího kontaktu s antigenem (Kiessling et al. 1975) a jejich hlavní funkcí je účast v protivirové (Lee et al. 2007) a protinádorové (Smyth et al. 2002) imunitní odpovědi. U pacientů s karcinomem hlavy a krku jsou v periferní krvi detekovány zejména snížené hladiny NK buněk (Bose et al. 2008; Wulff et al. 2009; Chen et al. 2011; Accomando et al. 2012), avšak Botcher a spol. (Bottcher et al. 2013) popisují hladiny zvýšené. V současnosti existuje jedna studie zabývající se prognózou pacientů ve vztahu k NK buňkám. V práci Schneiderse a spol. (Schneiders et al. 2012) je popisována horší prognóza korelující se sníženými hladinami NK buněk.

Hlavní funkcí makrofágu je prezentovat antigen efektorovým T lymfocytům (Pollard 2009). Navíc jsou makrofágy zapojeny do tkáňové remodelace (Lewis et al. 2006). V současnosti se studie zaměřují především na jejich schopnost indukovat neoangiogenezi. Je popisována pozitivní korelace mezi úrovní neovaskularizace a počtem TAM a ta je asociována s horší prognózou (Leek et al. 1996; Lewis et al. 2006). TAM jsou rovněž ve vyšší míře detekovány v pokročilejších nádorových lézích (Li et al. 2002; Liss et al. 2002; Ritta et al. 2009). Dále jsou zvýšené hladiny popisovány u pacientů s pozitivním uzlinovým postižením (Marcus et al. 2004) a u nádorů s extrakapsulárním šířením (Marcus et al. 2004). Lze tedy shrnout, že



zvýšené hladiny TAM jsou nepříznivým prognostickým markerem u pacientů s karcinomem hlavy a krku.

### **1.5.2.2 Adaptivní imunitní mechanismy**

Součástí adaptivní protinádorové imunitní odpovědi jsou subpopulace T lymfocytů, zejména CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, Treg a v menší míře též CD4<sup>+</sup> T lymfocyty (Badoual et al. 2006; Boucek et al. 2010; Wansom et al. 2012; Badoual et al. 2013). Jejich zastoupení jak v periferní krvi, tak v nádorovém mikroprostředí je heterogenní. V periferní krvi jsou popisovány jak zvýšené hladiny T lymfocytů (Schaefer et al. 2005; Lau et al. 2007; Strauss et al. 2007; Boucek et al. 2010), tak hladiny snížené (Saito et al. 1999; Kuss et al. 2003). Překvapivé jsou výsledky ze studií detekující hladiny T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí, které ve všech dosud publikovaných případech popisují zvýšené hladiny subpopulací T lymfocytů, které korelují s lepší prognózou pacientů (Nasman et al. 2012; Wansom et al. 2012; Badoual et al. 2013; Nordfors et al. 2013; Park et al. 2013).

### **1.5.3 Imunitní stav u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy**

HPV infekce aktivuje v napadeném organismu jak neadaptivní, tak adaptivní imunitní mechanismy (Deligeoroglou et al. 2013). Jak již bylo zmíněno výše, vrozená neadaptivní imunita je založená na nespecifických obranných mechanismech, které zahrnují epitelové bariéry, komplex sérových proteinů zvaných komplement a buňky schopné pohltit antigen a prezentovat jej na svém povrchu (Deligeoroglou et al. 2013). V obraně proti HPV infekci se uplatňují zejména NK buňky, NKT buňky a makrofágy. V menší míře se na eliminaci HPV podílí také DC (Deligeoroglou et al. 2013). Z adaptivních imunitních mechanismů se v obraně vůči HPV podílí zejména specifické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty namířené proti E2 a E6 antigenům (Deligeoroglou et al. 2013). Ve většině případů dochází po aktivaci těchto mechanismů k potlačení infekce. HPV však disponuje řadou mechanismů, jak imunitnímu systému uniknout (viz. Kapitola 1.3)

### **1.5.3.1 Specifické změny v imunitním systému u pacientek s karcinomem hrdla děložního**

Karcinomy hrdla děložního jsou etiologicky téměř ve 100% případů spjaty s HPV infekcí (Parkin et al. 2006). Imunitní buňky přítomné v tumorózní tkáni hrdla děložního jsou důležitou součástí protinádorové imunitní odpovědi, zásadní roli přitom hrají CD8+ T lymfocyty a NK buňky (Patel et al. 2009). Aktivace těchto imunitních mechanismů vede ve většině případů k potlačení virem indukované léze. Udává se, že až 90 % lézí je eliminováno během dvou let (Renoux et al. 2011).

#### **1.5.3.1.1 Neadaptivní imunitní mechanismy**

Z neadaptivních komponent imunitního systému se uplatňují zejména NK buňky a makrofágy.

Renoux a spol. (Renoux et al. 2011) jako první popsal vztah NK buněk a HPV indukovaných lézí. Protilátky proti kapsidovému proteinu se naváží na CD16 receptor (receptor pro Fc-fragment imunoglobulinu IgG), který je exprimován na povrchu NK buněk (Perussia et al. 1984). Tím je spuštěn efektorový mechanismus zvaný cytotoxická reakce závislá na protilátkách (Lanier et al. 1986). Studie prováděná *in vitro* dokumentuje vyšší cytotoxicitu NK buněk v přítomnosti HPV VLP (virus like particles), která se projevuje jednak zvýšenou exocytózou granulí obsahujících molekuly granzym a perforin, jednak zvýšenou produkcí cytokinů TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  (Renoux et al. 2011). Zvýšené množství NK buněk je detekováno zejména u prekanceróz, zatímco u pacientek s maligními lézemi (Molling et al. 2007; Arreygue-Garcia et al. 2008) či u zdravých kontrol (Textor et al. 2008; Renoux et al. 2011) jsou detekovány snížené hladiny NK buněk.

Dle předpokladů, zvýšené hladiny TAM, detekované u karcinomů hrdla děložního, koreluje s nádorovým růstem (Bolpetti et al. 2010), nádorovou progresí (Bolpetti et al. 2010) či zvýšenou proliferací aktivitou tumoru (Bolpetti et al. 2010). Lepique a spol. (Lepique et al. 2009) ve své práci popisují schopnost TAM asociovaných s HPV efektivně potlačit T buněčnou odpověď.

### **1.5.3.1.2 Adaptivní imunitní mechanizmy**

Zastoupení jednotlivých komponent adaptivních imunitních mechanismů se liší v závislosti na stádiu onemocnění. Zatímco ve stromatu prekanceróz jsou detekovány zejména CD4+ T lymfocyty, u invazivních karcinomů to jsou zejména CD8+T lymfocyty (Monnier-Benoit et al. 2006). HPV se snaží uniknout imunitní kontrole snížením exprese molekul HLA I. třídy na povrchu infikovaných buněk, čímž je dosaženo snížení specifické imunitní odpovědi proti onkoproteinům E6 a E7 (de Boer et al. 2007). U karcinomů hrdla děložního jsou detailně studovány též Treg. Jejich zvýšené hladiny jsou detekovány u pacientek s prekancerózními lézemi a to jak v periferní krvi (Visser et al. 2007), tak v nádorovém mikroprostředí (Molling et al. 2007; Loddenkemper et al. 2009). Existují dva předpoklady vysvětlující zvýšení hladiny Treg u HPV indukovaných lézí hrdla děložního. V takto infikovaných tkáních jsou detekovány zvýšené hladiny inhibičního cytokinu IL-10, který aktivuje Treg (Bhairavabhotla et al. 2007; Bermudez-Morales et al. 2008). Navíc HPV16 E7 indukované léze produkují cytokin IL-2, který je zásadní pro aktivaci Treg (Molling et al. 2007).

### **1.6 Imunitní stav u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku, vztah k prognóze**

Mnoho studií popisuje prognostický význam imunologických parametrů u epitelových nádorů (Curiel et al. 2004; Ladanyi et al. 2004; Alvaro et al. 2005; Salama et al. 2009; Fu et al. 2012), ale je jen málo studií zabývajících se vztahem mezi HPV infekcí, imunitním stavem a prognózou pacientů s karcinomem hlavy a krku. Wansom a spol. (Wansom et al. 2012) detekovali zvýšené hladiny Treg v nádorovém mikroprostředí, které korelovaly s lepším přežíváním pacientů nezávisle na HPV statutu. Nasman a spol. (Nasman et al. 2012) popsali zvýšené hladiny CD8+ T lymfocytů a vyšší poměr CD8+/ Treg v nádorovém mikroprostředí korelující s lepší prognózou u pacientů s HPV-pozitivními i HPV-negativními tonzilárními karcinomy. Na jejich práci navázal Nordfors a spol. (Nordfors et al. 2013), kteří vyšetřili soubor 275 pacientů s diagnostikovaným orofaryngeálním karcinomem. Autoři detekovali zvýšené hladiny CD8+ T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí u HPV-pozitivních pacientů, což korelovalo s lepším přežíváním. Park a spol. (Park et al. 2013) vyšetřovali pokročilé tonzilární karcinomy a popsali, že zvýšená exprese p16 proteinu je asociována se zvýšenou hladinou Treg a lepší prognózou.

Jedno z možných vysvětlení paradoxní role Treg u karcinomů hlavy a krku vychází z předpokladu, že dochází k translokaci mikrobiální flóry přítomné v orofaryngu do tkáně

nádorové, stejně jako je to popisováno u kolorektálního karcinomu (Ladoire et al. 2011). Tato mikrobiální flóra stimuluje T buněčnou protizánětlivou odpověď, která zahrnuje rovněž aktivitu Th17 T buněk, které usnadňují růst nádoru. Aktivita Th 17 T buněk může být oslabená působením Treg, což by mohlo vysvětlovat lepší prognózu u pacientů s karcinomy hlavy a krku se zvýšenou hladinou Treg. Je také možné, že zvýšené hladiny Treg jsou stimulovány přítomnou HPV infekcí (Bermudez-Morales et al. 2008).

## 2. STANOVENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ

Dizertační práce je zaměřena na detekci jednotlivých lymfocytárních subpopulací v periferní krvi u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku 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 karcinomů hlavy a krku nahradit detekci HPV 16 E6 mRNA detekcí kombinace markerů HPV 16 DNA a p16
- C) Určit, je-li imunofenotyp u pacientů s karcinomem hlavy a krku v porovnání s imunitním systémem zdravých jedinců modifikovaný
- D) Porovnat případné změny v imunitním systému u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku
- E) Zjistit, ovlivňuje-li imunitní stav pacientů s karcinomem hlavy a krku 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 karcinomem hlavy a krku

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 karcinomů hlavy a krku

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

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

4H1 Zastoupení jednotlivých imunologických parametrů v periferní krvi 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 karcinomem hlavy a krku ovlivňuje prognózu pacienta

5H0 Prognóza pacienta s karcinomem hlavy a krku není ovlivněná imunitním stavem nemocného

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1 Soubor pacientů**

Do studie bylo zařazeno celkem 110 pacientů s primárním karcinomem hlavy a krku (MKN-10: C01-C06, C9-10, C12-13, C32), kteří byli léčeni v letech 2004-2012 na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN v Motole. Všichni zařazení pacienti podepsali informovaný souhlas. Dále pacienti obdrželi dotazník ke zjištění základních demografických údajů a informací ohledně rizikových faktorů souvisejících se vznikem karcinomu hlavy a krku. U každého zařazeného pacienta byl vyplněn navíc klinický formulář informující o zdravotním stavu jedince a patologický formulář obsahující kompletně zpracované údaje nezbytné pro klinicko-patologickou klasifikaci. Kontrolní skupinu tvořilo 52 dobrovolníků, kteří byli do studie zařazeni po podepsání informovaného souhlasu, od kterých byla odebrána periferní krev a formou dotazníku zjištěny základní demografické údaje a informace o rizikových faktorech souvisejících se vznikem karcinomu hlavy a krku.

Na počátku bylo do studie zařazeno 60 pacientů s primárním karcinomem hlavy a krku a 30 kontrol. V průběhu analýzy, kdy byly provedeny změny v metodice, byl následně soubor rozšířen na konečných 110 subjektů a 52 kontrol.

### 3.2 Odběr materiálu a zpracování

Odběry materiálu probíhaly na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole v letech 2005 – 2012. Od všech pacientů byl odebrán vzorek nádorové tkáně k detekci HPV. Celkem 106 pacientů podstoupilo chirurgickou léčbu a od těchto pacientů byla získaná nádorová tkáň během operace. U čtyř pacientů, kteří nepodstoupili operační výkon, byla nádorová tkáň odebrána během bioptického ověření nádoru. Tkáňové vzorky byly zpracovány na Ústavu patologie a molekulární biologie 2. LF UK. Z každého bločku byl zhotoven první řez pro histologickou analýzu a dva následné řezy (10-20  $\mu\text{m}$ ) pro detekci lidských papillomavirů metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), a další řez opět pro histologickou analýzu. Histologická analýza zjistila, zda v materiálu odebraném pro PCR detekci HPV a pro imunohistochemické vyšetření, je přítomno nejméně 10% nádorových buněk (zda nedošlo k prokrájení materiálu, buňky nebyly nekrotické, nejednalo se o zdravou tkáň přiléhající k lézi apod.). Pouze takové vzorky byly zařazeny do studie. Dva řezy pro HPV PCR detekci byly přeneseny do sterilní mikrozkušavky. Mezi tyto vzorky byly vřazeny kontrolní bločky (bločky bez tkáně, nebo s tkání neobsahující HPV), aby byl monitorován eventuální přenos kontaminace mezi klinickými vzorky v průběhu jejich přípravy. Nůž mikrotomu, použité nástroje a plocha v jeho nejbližším okolí byla po každém vzorku otírána xylenem. Pro každou sérii vzorků nařezaných z parafinových bloků byl vyplněn protokol s pořadovým číslem série, datem zpracování a pořadovým číslem a jemu odpovídajícím identifikačním číslem bloku.

Všem pacientům i kontrolám byla odebrána krev klasickou venepunkcí do zkumavek Vacuette (GBO, Kremsmunster, Austria) k vyšetření základních lymfocytárních subpopulací, které probíhalo na Klinice dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN v Motole.



### 3.2.1 Izolace DNA a RNA

DNA i RNA byly izolovány pomocí Ambion Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues kitu podle firemního protokolu (Applied Bioscience, Austin, TX, USA). Z řezů z nádorové tkáně byl xylénem odstraněn parafin. Po deparanizaci byl vzorek inkubován s 800 µl pufru Digestion Buffer a 8 µl Proteasy. Polovina vzorku pro izolaci RNA byla inkubována při teplotě 50°C po dobu 3 hod, zatímco k izolaci DNA byla druhá polovina vzorku inkubována při stejné teplotě 48 hodin. Po inkubaci o délce 3 hod při teplotě 50°C bylo odebráno ze vzorku 400 µl do nové mikrozkušavky a zbytek vzorku byl dále inkubován při teplotě 50°C. K odebranému vzorku bylo přidáno 480 µl Additive a po zvortexování ještě 1,1 ml 100% etanolu a všechny reakční složky byly opatrně promíchány pipetováním. Následně byly připraveny kolonky do dodaných zkumavek a vytvořená směs jednotlivých vzorků byla rozpipetována po 700 µl vzorku do připravených kolonek a centrifugována 30-60 s při 10 000 x g. Po centrifugování byla slita tekutina ze sběrné zkumavky a přidán zbytek vzorku, který byl opět centrifugován 30-60 s při 10 000 x g. Následovalo promytí 1x 700 µl roztoku Wash 1 centrifugace 30-60 s při 10 000 x g a poté 1x promytí v 500 µl Wash 2/3 a centrifugace 30-60 s při 10 000 x g. Po promývání následovala inkubace v 60 µl DNase mix, který se skládal ze 6 µl 10x DNase Buffer + 4 µl DNase + 50 µl Nuclease-free water při pokojové teplotě po dobu 30 min. Po inkubaci byly vzorky opět promývány jednou v 700 µl roztoku Wash 1 a dvakrát v 500 µl Wash 2/3. Na závěr byl vzorek eluován v 30 µl Elution Solution při pokojové teplotě 1 min a následně centrifugován 1 min při 15 000 x g. Eluce byla opakována dvakrát, výsledné množství eluovaného vzorku bylo 60 µl. Vzorek byl uskladněn při -70°C. Izolace DNA z druhé poloviny vzorku byla možná za 48 hod od zahájení inkubace. Probíhala stejně jako izolace RNA s výjimkou inkubace, která probíhala v 60 µl RNase mix, který se skládal z 10 µl RNase A + 50 µl Nuclease-free water.

### 3.2.2 PCR

Na izolované DNA z nádorové tkáně byla provedena amplifikace kontrolního genu za účelem zjištění, zda vzorek obsahuje dostatečné množství DNA a jestli neobsahuje inhibitory PCR. Jako cílová oblast pro amplifikaci byl vybrán fragment o délce 110 pb cílený do genu pro lidský beta globin. Tento fragment byl amplifikován pomocí primeru PC 03/04 (GREER 1991). 50  $\mu$ l reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný PCR reakční pufr (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 4,0 mM MgCL<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTS, 0,05 pmol.  $\mu$ l<sup>-1</sup> každého primeru PC 03 a 04 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2,5 U Taq-polymerázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania) a 4  $\mu$ l vzorku. Vzorky byly amplifikovány v PCR termocykleru PTC-200. (MJ Research Inc. Quebeck, Canada). Program se skládal z počáteční denaturace 5 min při 95°C, dále ze 40 cyklů skládajících se z denaturace 1 min při 95°C, reasociace primerů 2 min při 55°C a syntézy řetězců 2 min při 72°C. Následovala konečná inkubace 3 min při 72°C. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 3% agarózovém gelu NuSieve 3:1 (Lonza, Basel, Switzerland) při 150 V 55 min. U vzorků nádorové tkáně, které amplifikovaly kontrolní gen, byla HPV DNA detekována pomocí PCR s primery BS GP5+ / BS GP6 bio vymežující 150 pb dlouhý fragment virového genu L1 (van den Brule et al. 2002). Padesát  $\mu$ l reakční směsi obsahovalo 1 x koncentrovaný reakční pufr Ampli Gold (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 3,0 mM MgCl<sub>2</sub> Ampli Gold, 0,2 mM dNTS, 50 pmol.  $\mu$ l<sup>-1</sup> každého primeru BS GP5+ a BS GP6+ , 1U Taq – polymerázy AmpliGold a 4  $\mu$ l DNA. Vzorky byly amplifikovány v PCR termocykleru PTC-200 (MJ Research Inc. Quebeck, Canada). Program se skládal z počáteční denaturace 4 min při 94°C, dále ze 40 cyklů skládajících se z denaturace 20 s při 94°C, reasociace primerů 30 s při 38°C a syntézy řetězců 80 s při 71°C. Následovala konečná inkubace 4 min při 72°C. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 3% agarózovém gelu NuSieve 3:1 (Lonza, Basel, Switzerland) při 150 V 55 min.

### 3.2.3 Hybridizace

U analyzovaných vzorků byl následně určen HPV typ pomocí metody RLB (z angl. **R**everse **L**ine **B**lott hybridization), která umožňuje detekci 37 HPV typů. V reakci byly použity následující HPV typově specifické oligopróby; 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 72, 73, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), 82 (IS39), CP6108, 71 (8061), 81 (CP8304). Tyto próby byly kovalentně navázány na negativně nabitou membránu Biodyne C (Pall Bio-Support, East Hills, NY, USA).

Membrána byla aktivovaná použitím 16% (wt/vol) EDAC[1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide] (Sigma, St. Louis, MO, USA) a vložena do minibloteru MN 45 (Immunetics, Cambridge, MA, USA). Próby byly nanášeny paralelně, následovala inkubace 1 min, poté byly próby aspirovány a membrána inaktivována 100 mM NaOH, poté promyta ve 2xSSPE (1x SSPE je 0.18 M NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, a 1 mM EDTA [pH 7.7]); (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) s 0,1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (BDH, Dorset, England). Pro hybridizaci bylo použito 10 µl PCR produktu, který byl rozpuštěn ve 150 µl roztoku 2 x SSPE-0,1% SDS, následně byl vzorek denaturován 10 min při teplotě 96°C a poté ihned přenesen na led. PCR produkty byly na membránu nanášeny kolmo k oligopróbám.

Následovala hybridizace 1 hod při teplotě 42°C a poté byla membrána dvakrát promyta ve 2 x SSPE-0,5% SDS při 51°C. Dále byla membrána inkubována s konjugátem streptavidin-peroxidáza 60 min při 42°C (1:4,000 dilution in 2 x SSPE-0,5% SDS) (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), dvakrát promyta ve 2 x SSPE-0.5% SDS, 10 min při 42°C a dále promyta ve 2 x SSPE 5 min při pokojové teplotě. Detekce byla provedená pomocí ECL kitu (Amersham, Buckinghamshire, England). Membrána exponována na Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, England) 30 s, 1 min a 5 min. Na závěr byl film vyvolán.

### 3.2.4 Reverzní transkripce

cDNA byla připravená pomocí reverzní transkripce z 1 µg RNA. Nejprve bylo provedeno DNázování pomocí 2 µl RNase Free DNase (Promega, WI) a 2 µl 5x reakčního pufru (Promega, Fitchburg, WI, USA) 30 min při teplotě 37°C. Po skončení reakce byla RNase Free DNase inaktivována pomocí 1 µl Stop Solution (Promega, Fitchburg, WI, USA). Z reakční směsi o koncentraci 20 µl bylo odebráno 16,5 µl a inkubováno 10 min při 70°C, poté byly vzorky ihned přeneseny na led. Zbylých 3,5 µl vzorku bylo použito ke kontrolnímu ověření nepřítomnosti DNA v RNA po DNázování pomocí amplifikace kontrolního genu GAPDH. Reakční směs pro reverzní transkripci o koncentraci 13,5 µl obsahovala 0,0375 µl M-MLV reverse transcriptase (Promega, Fitchburg, WI, USA), 0,75 µl RNasin (Promega, Fitchburg, WI, USA), 1,5 µl Random Hexameru (Promega, Fitchburg, WI, USA), 1,5 µl 10x dNTPS, 6 µl 5x koncentrovaného reakčního pufru (Promega, Fitchburg, WI, USA) a 3,375 µl RNA vody. Inkubace probíhala 1 hod při 37°C.

K ověření přepsání mRNA do cDNA byl amplifikován gen pro beta-globin. Tento fragment byl amplifikován pomocí primeru PC 03/04 (Greer et al. 1991). Padesát µl reakční směsi obsahovalo 1x koncentrovaný PCR reakční pufr (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 4,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPS, 0,05 pmol. µl<sup>-1</sup> každého primeru PC 03 a 04 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2,5 U Taq-polymerázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania) a 4 µl vzorku. Vzorky byly amplifikovány v PCR termocykleru PTC-200 (MJ Research Inc. Quebec, Canada). Program se skládal z počáteční denaturace 5 min při 95°C, dále ze 40 cyklů skládajících se z denaturace 1 min při 95°C, reasociace primerů 2 min při 55°C a syntézy řetězců 2 min při 72°C. Následovala konečná inkubace 3 min při 72°C. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 3% agarózovém gelu NuSieve 3:1 (Lonza, Basel, Switzerland) při 150 V 55 min.

Dále byla provedená PCR specifická pro HPV 16E6\*I mRNA oncoprotein, která byla provedená na cDNA s primery amplifikující úsek o délce 86-pb. Cílový fragment byl amplifikován pomocí primeru E6 forward a E6 revers (Smeets et al. 2007). 25 µl reakční směsi obsahovalo 0,5x koncentrovaný PCR reakční pufr (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPS, 0,025 pmol. µl<sup>-1</sup> každého primeru (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,25 U Taq-polymerázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania) a 2 µl vzorku. Vzorky byly amplifikovány v PCR termocykleru PTC-200 (MJ Research Inc. Quebec, Canada). Program se skládal z počáteční denaturace 5 min při 95°C, dále ze 40 cyklů skládajících se

z denaturace 1 min při 95°C, reasociace primerů 2 min při 55°C a syntézy řetězců 2 min při 72°C. Následovala konečná inkubace 3 min při 72°C. PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 3% agarózovém gelu NuSieve 3:1 (Lonza, Basel, Switzerland) při 150 V 55 min.

### **3.2.5 Imunohistochemie**

Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno na 2- $\mu$ m řezu z parafinového bločku pomocí protilátky p16INK4a (Purified Mouse) Anti-Human p16, Clone G175-405, BD, dilution 1:100 (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Jako pozitivní kontrola byly použity dysplastické cervikální epitelové buňky. Vyhodnocen byl podíl obarvených buněk (určený v procentech) a intenzita zbarvení (rozdělená od jednoho + až po tři +++). Rovněž bylo specifikováno, zda se jedná o cytoplazmatický či jaderný signál. Jako p16 pozitivní buňky byly hodnoceny ty, které vykazovaly pozitivitu více než 50% v jádrech a/nebo cytoplazmě.

### 3.2.6 Průtoková cytometrie

U všech pacientů zařazených do studie byly vyšetřeny následující lymfocytární subpopulace: CD3+, CD4+, CD8+, CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD19, CD4+CD45RA+, a CD3-CD56+CD16+. Po lýze erytrocytů za použití FACS Lysing Solution (BD, San Jose, CA, USA) a po obarvení protilátkami s fluorochrom konjugáty byly vzorky z periferní krve analyzovány průtokovou cytometrií BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Byly použity následující protilátky: anti-CD45 FITC/CD14 PE (pro správné nastavení výběru lymfocytů), anti-CD3 FITC/CD19 PE, anti-CD3 FITC/CD16CD56 PE, anti-CD4 FITC/CD8 PE, anti-CD45RA FITC/anti-CD4 PE a anti-CD3 FITC/CD4 PE/CD25 APC (Beckmann Coulter, Nyon, Switzerland). Exprese FoxP3 z CD4+CD25+ byla detekována za použití kitu Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA). Kit obsahoval protilátky anti-CD4 FITC, anti-CD25 APC a anti-FOXP3 PE, dále fixační koncentráty, diluční roztoky a pufry.

Pomocí lymfocytární brány bylo vybráno tisíc lymfocytů pro analýzu, která byla provedená pomocí softwaru Cell Quest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Výsledky byly vyjádřeny jako procentuální podíly jednotlivých buněčných subpopulací lymfocytů a regulační T lymfocyty byly vyjádřeny jako procenta CD25+ buněk z CD3+ CD4+ buněk. Průměrné hodnoty těchto parametrů byly porovnány mezi skupinami HPV-pozitivních a HPV-negativních tumorů a mezi pacienty s dobrou a špatnou prognózou. Na počátku analýzy byla za zvýšenou hladinu Treg považována hodnota větší než 10% Treg v periferní krvi ve srovnání se zdravými kontrolami, což vycházelo z průměrné hodnoty kontrolní skupiny stávající se ze 30 zdravých kontrol. U těchto 60 pacientů nebylo technicky možné detekovat marker FoxP3, proto k vyloučení vlivu akutního zánětu na imunologické parametry byly vyšetřeny standardní "zánětlivé parametry". Hodnota leukocytů (cut off  $\leq 10^9/L$ ) a C-reaktivní protein (CRP) ( $\leq 8$  mg/l) byly detekovány pomocí rutinních laboratorních vyšetření.

Po rozšíření souboru na 110 subjektů (u 50 z nich byl již FoxP3 detekován) byla nově definována kontrolní skupina o počtu 50 osob. Výběr kontrol byl vztažen na 50 nově zařazených pacientů, u kterých byl detekován marker FoxP3, tak aby byly kontroly stejného pohlaví a v pětiletém věkovém limitu. Podle mediánu kontrolní skupiny byli pacienti rozděleni do skupiny Treg high, jejichž hladiny CD4+ CD25+ v periferní krvi byly vyšší než 5,2% a Treg low, kdy hodnota CD4+ CD25+ byla nižší než 5,2%. U podskupiny s přesněji charakterizovanými regulačními T lymfocyty jako CD4+ CD25+ FoxP3 byl medián kontrolní

skupiny 4,2%, podle kterého byly pacienti rozdělení do skupiny Treg high a skupiny Treg low.

### 3.3 Statistická analýza

Průměrné hodnoty imunologických parametrů měřené v periferní krvi byly porovnány mezi skupinami pacientů s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými karcinomy a mezi skupinami pacientů s dobrou a špatnou prognózou. Mezi pacienty s dobrou prognózou byli zařazeni ti bez recidivy a žijící na konci sledování, mezi pacienty se špatnou prognózou patřili ti, kteří měli buď recidivu onemocnění, nebo zemřeli na nádor v době sledování. Lymfocyty detekované v periferní krvi byly považovány za kontinuální proměnnou ve všech provedených analýzách.

Regulační T lymfocyty byly rozděleny do dvou skupin: na začátku analýzy; skupina CD4+ CD25+ Treg high u pacientů s více než 10% Treg v periferní krvi (PK) a CD4+ CD25+ Treg low u pacientů s méně než 10% Treg v PK v porovnání se zdravými kontrolami. Po rozšíření souboru na 110 subjektů pak do skupiny CD4+ CD25+ Treg high u pacientů s více než 5,2% Treg v PK CD4+CD25+ Treg low u pacientů s hladinou Treg menší než 5,2% v porovnání se zdravými kontrolami. CD4+ CD25+ FoxP3 Treg byly rozděleny do skupiny CD4+ CD25+ FoxP3 Treg high a CD4+ CD25+ FoxP3 Treg low dle mediánu kontrolní skupiny, který byl 4,2 %.

U 50 pacientů byla korelována detekce CD4+ CD25+ FoxP3 Treg s CD4+ CD25+ Treg použitím Spearmanova testu.

Srovnání bylo provedeno pomocí t-testu s 95% intervalem spolehlivosti (CI) a P hodnot. Všechny testy byly oboustranné a hladina významnosti byla  $\alpha = 0,05$ . Přežití bylo měřeno ode dne stanovení diagnózy a potažmo zařazení do studie, do data úmrtí nebo k datu poslední kontroly anebo kdy bylo naposledy známo, že je pacient naživu. Pacienti, kteří zemřeli na jinou příčinu, než byl karcinom hlavy a krku, byli vyřazeni z pozorování pro specifické přežití (DSS- disease specific survival). Analýzy byly prováděny metodou Kaplan-Meier, Log-rank testem a Coxovou regresí. Interval spolehlivosti byly založeny na normální aproximaci. Následující proměnné byly analyzovány Coxovou regresí; přítomnost HPV, věk, pohlaví, kouření, konzumace alkoholu, velikost nádoru, přítomnost uzlin (T + N podle TNM klasifikace UICC, 1997), diference, lokalizace nádoru, hladina CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD4+, CD8+, CD4+ CD8+ součet, CD4+/ CD8+ poměr, CD8+/ CD4+ CD25+ Treg poměr, CD19 B buněk a CD3- CD56+ CD16+ NK buněk. Pro porovnání kvalitativních proměnných byl použit Pearsonův chí kvadrát test pro 2x2 kontingenční tabulky a k porovnání kvantitativních proměnných byl použit Mann-Whitney test. Analýzy



byly prováděny pomocí statistického programu SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). Kappa korelační koeficient byl vypočten pro míru současné positivity HPV DNA a expresi HPV E6 mRNA.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Demografické a klinicko-patologické charakteristiky

Do studie bylo zařazeno 110 pacientů s primárním karcinomem hlavy a krku a kontrolní skupina sestávala z 52 zdravých osob. Demografické charakteristiky jsou uvedené v tabulkách 2a a 2b. Většina pacientů byli muži 73/110 (66,3%), průměrný věk pacientů ve studii byl 58,2 let. Většina ze zařazených jedinců byla v době zařazení do studie aktivními kuřáky, kteří pravidelně konzumovali alkohol. Nejfrekventovanější byla orofaryngeální lokalizace karcinomu, nejčastěji se jednalo o karcinom tonzily, méně častý byl karcinom kořene jazyka. V menším množství byli do studie zařazeni pacienti s karcinomem dutiny ústní, hrtanu a hypofaryngu. Do studie byli zahrnuti pacienti převážně s menšími karcinomy (T1+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.

**Tabulka 2a.** Základní demograficko-klinicko-patologické charakteristiky pacientů (n=110)

<b>Charakteristiky</b>		<b>No (%)</b>
<b>Věk</b>	≤55	37 (33,6%)
	>55	73 (66,3%)
<b>Pohlaví</b>	Ženy	17 (15,5%)
	Muži	93 (84,5%)
<b>Kouření</b>	Současný kuřák	55 (50,9%)
	Bývalý kuřák	32 (29,6 %)
	Nekuřák	21 (19,4 %)
<b>Alkohol</b>	Současný konzument	80 (76,1%)
	Bývalý konzument	5 (6,0%)
	Abstinent	18 (17,1%)
<b>Velikost nádoru</b>	T1 + T2	77 (72,0%)
	T3 + T4	30 (28,0%)
<b>Uzlinové postižení</b>	N0	31 (28,7%)
	N1 – N3	77 (71,3%)
<b>Stádium</b>	I + II	27 (24,5%)
	III + IV	83 (75,5%)
<b>Diferenciace nádoru</b>	G1 + G2	71 (66,9%)
	G3	35 (33,1%)
<b>Lokalizace nádoru</b>	Orofarynx	81 (73,6%)
	Dutina ústní	16 (14,5%)
	Hrtan	10 (9,0%)
	Hypofarynx	3 (27,0%)

**Tabulka 2b.** Základní demografické charakteristiky kontrolní skupiny (n=52)

<b>Charakteristiky</b>		<b>No (%)</b>
<b>Věk</b>	≤55	20 (38,0%)
	>55	32 (62,0%)
<b>Pohlaví</b>	Ženy	13 (25,0%)
	Muži	39 (75,0%)
<b>Kouření</b>	Kuřák	10 (21,7%)
	Nekuřák	36 (78,2%)

#### **4.2 Detekce HPV DNA a HPV 16 E6 mRNA v nádorové tkáni**

Ze 110 pacientů byla HPV DNA detekována u 44 pacientů (40,0% ; 44/110), zjištěny byly pouze vysoce rizikové typy HPV. Nejčastěji detekovaný byl typ HPV 16, který byl nalezen u 97,6% karcinomů (42/43). U jednoho pacienta (2,3% ;1/43) byl detekován typ HPV 58 a pouze u jednoho pacienta (2,3%;1/43) byla pozorována vícečetná infekce typem HPV 16 a HPV 18. Častěji byla HPV DNA detekována v orofaryngeální lokalizaci než v dutině ústní (93,2% vs. 6,8%). HPV DNA nebyla nalezena ani u hypofaryngeálních ani u laryngeálních karcinomů. V orofaryngeální lokalizaci byly HPV DNA pozitivní nejčastěji karcinomy tonzily 65,8 % (27/41). U 42 HPV 16 pozitivních pacientů byla provedena detekce HPV16 E6 mRNA. Jeden vzorek nebyl pro tuto analýzu dostupný. HPV 16 E6 mRNA byla exprimována u 83,7% (36/42) pacientů. Shoda mezi současnou pozitivitou HPV 16 DNA a pozitivitou HPV 16 E6 mRNA byla středně významná (Kappa =0,5848). Pro další analýzu byly za HPV pozitivní považovány vzorky pozitivní na HPV 16 E6 mRNA. Vzorky pozitivní na jiné typy HPV nebyly do dalších analýz zařazené.

#### **4.3 Detekce proteinu p16 v nádorové tkáni**

Celkem v 55,0% (60/109) případů byl detekován protein p16 . Tři vzorky pozitivní na HPV 16 E6 mRNA měly negativní expresi p16. Jeden vzorek nebyl dostupný pro imunohistochemickou analýzu. 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 s onkoproteinem p16 vykazovala 66, 6% senzitivitu a 91, 5% specificitu.

#### **4.4 Porovnání jednotlivých lymfocytárních subpopulací mezi pacienty s karcinomem a kontrolní skupinou**

Analýza byla provedena u 110 pacientů a 52 zdravých jedinců.

Průměrné zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací (CD4+, CD8+, CD4+ CD25+ Treg, CD4+ CD25+ FoxP3 Treg, CD19 B buněk a CD3- CD56+ CD16+ NK buněk) v periferní krvi bylo porovnáváno mezi pacienty a kontrolami (Tabulka 3). 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 CD4+ CD25+ FoxP3 Treg ( $P < 0,001$ ). Statistický významný rozdíl v zastoupení CD19 B buněk, CD4+ CD25+ Treg a CD4+ CD25+ 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 (Obrázek 12a-f).

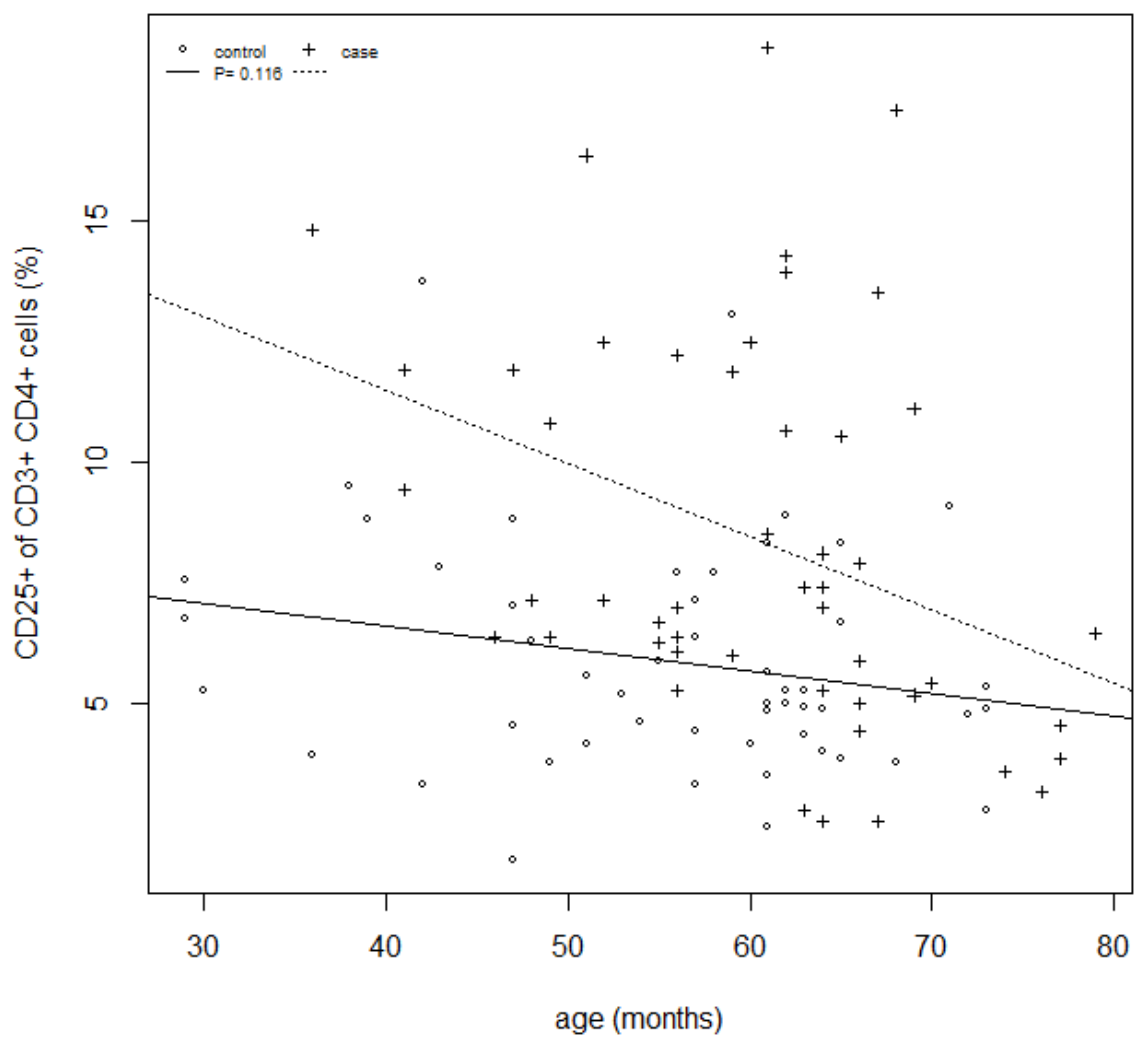
Klesající hodnoty v periferní krvi jak u pacientů, tak kontrolní skupiny byly pozorovány u těchto lymfocytárních subpopulací; CD4+ CD25+ Treg (adj  $P = 0,116$ ), CD4+ (adj  $P = 0,166$ ) a CD19 B buněk (adj  $P = 0,327$ ). Počty CD4+ CD25+ FoxP3 Treg (adj  $P = 0,074$ ) a CD3- CD56+ CD16+ NK buněk (adj  $P = 0,005$ ) u pacientů klesaly, zatímco u kontrolní skupiny se jejich zastoupení v periferní krvi v závislosti na věku zvyšovalo. Hladiny CD8+ T lymfocytů (adj  $P = 0,833$ ) se zvyšovaly u pacientů a klesaly u kontrolní skupiny. Avšak statisticky významné rozdíly mezi pacienty a kontrolní skupinou byly pozorovány jen u CD3- CD56+ CD16+ NK buněk.

**Tabulka 3.** Průměrné zastoupení lymfocytárních populací buněk u pacientů (n=50) a kontrolní skupiny zdravých jedinců (n=52)

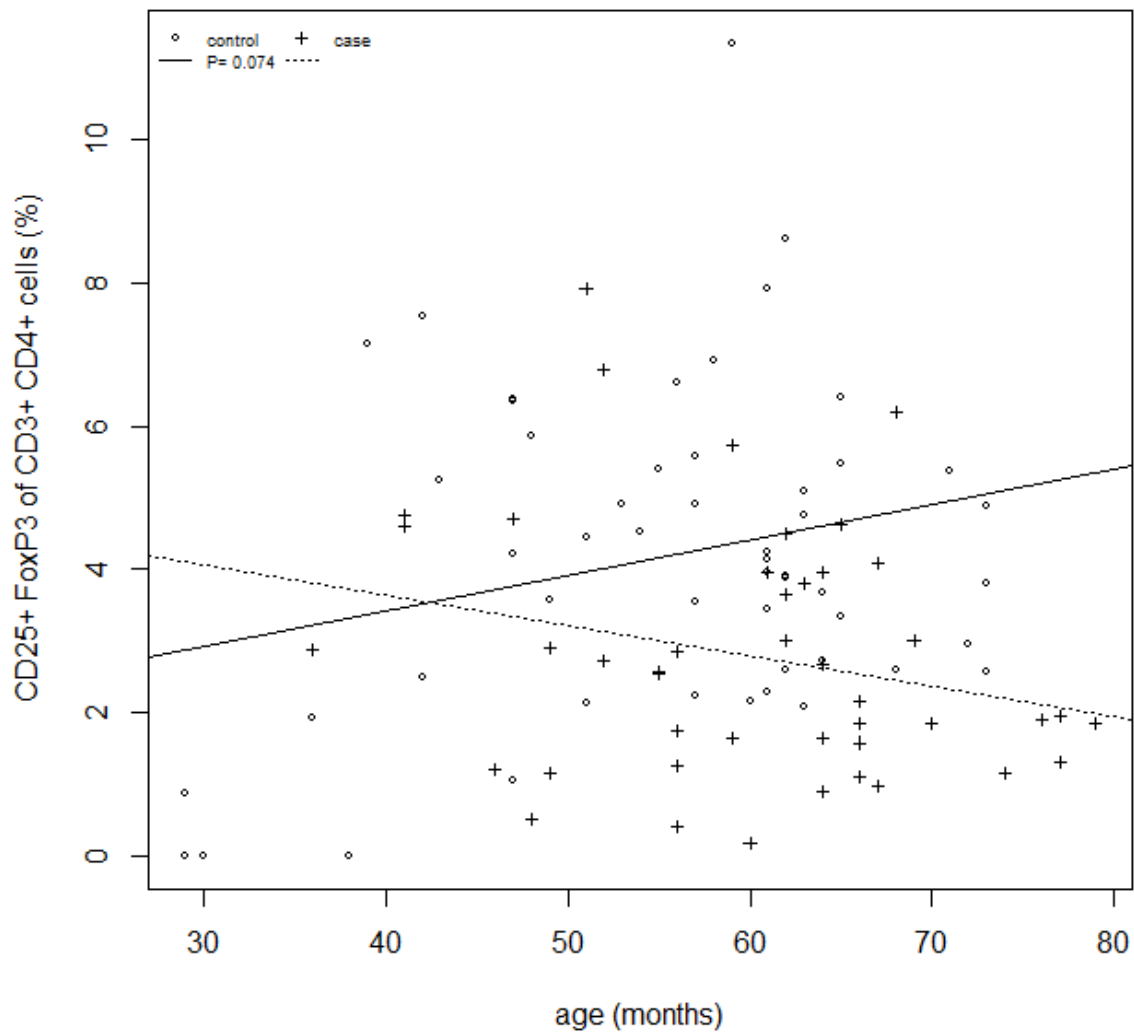
Lymfocytární subpopulace	Pacienti (průměr)	Kontroly (průměr)	P hodnota	95%CI	P hodnota adj*	95%CI adj*
<b>CD4+</b>	45,9	47,5	0,420	-2,3;5,5	0,376	-3,6;6,0
<b>CD8+</b>	27,5	25,1	0,160	-5,8;0,9	0,586	-5,4;3,0
<b>CD19+</b>	11,6	14,56	<b>&lt;0,001</b>	1,5;5,2	<b>0,013</b>	0,6;5,3
<b>CD3-CD56+16+</b>	11,23	10,63	0,582	-2,7;1,5	0,690	-3,1;2,0
<b>CD4+ CD25+ Treg</b>	8,4	5,8	<b>&lt;0,001</b>	-3,8;-1,2	<b>0,002</b>	-4,0;0,9
<b>CD4+ CD25+ FoxP3 Treg</b>	2,7	4,1	<b>&lt;0,001</b>	0,5;2,2	<b>&lt;0,001</b>	0,8;2,9

\*=adjustováno na věk a kouření

95% CI=konfidenční interval; P=významnost

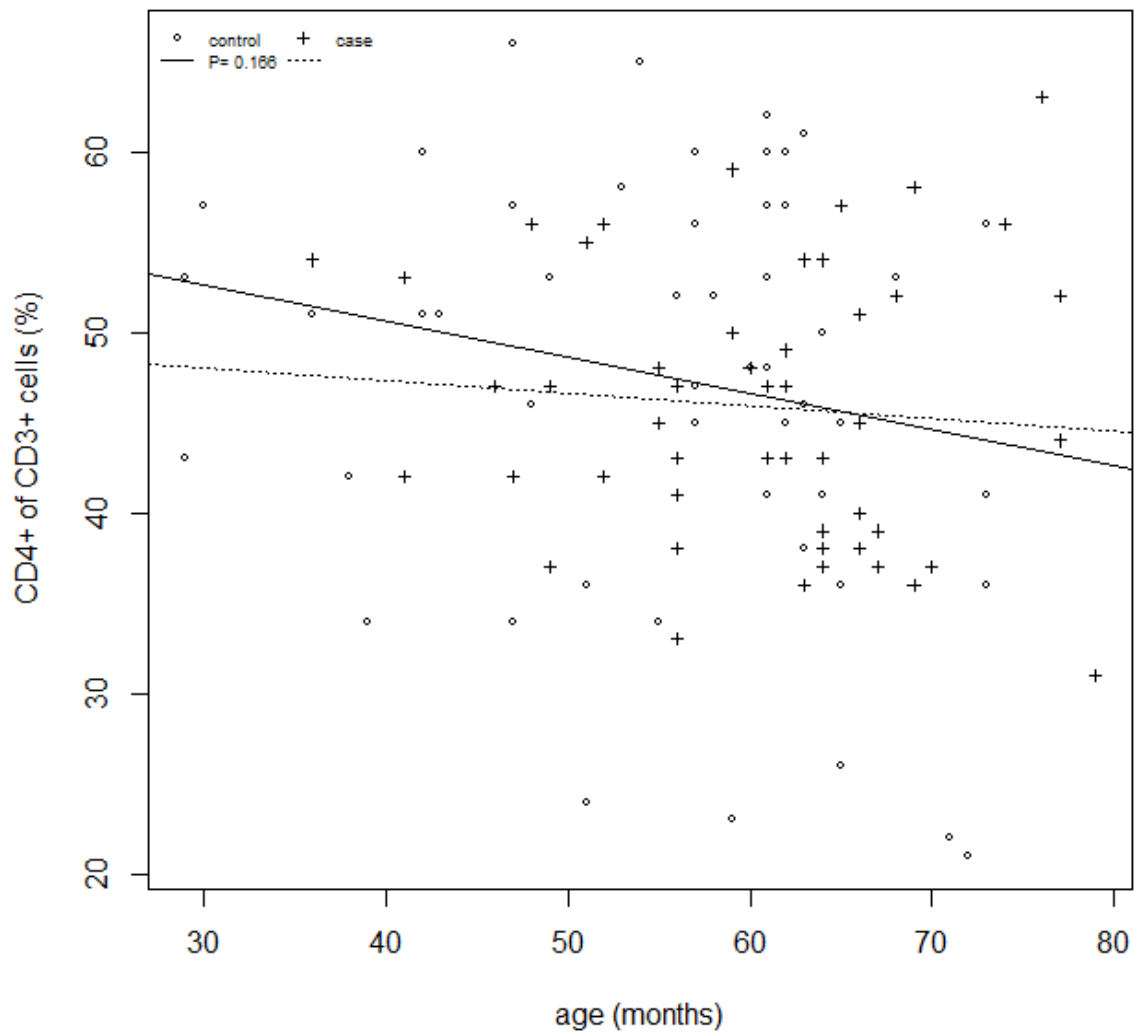


**Obrázek 12a.** Rozložení CD4+ CD25+ Treg (osa y) v závislosti na věku pacientů a kontrol adjustováno na kouření (osa x znázorňuje věk v měsících; P=významnost)

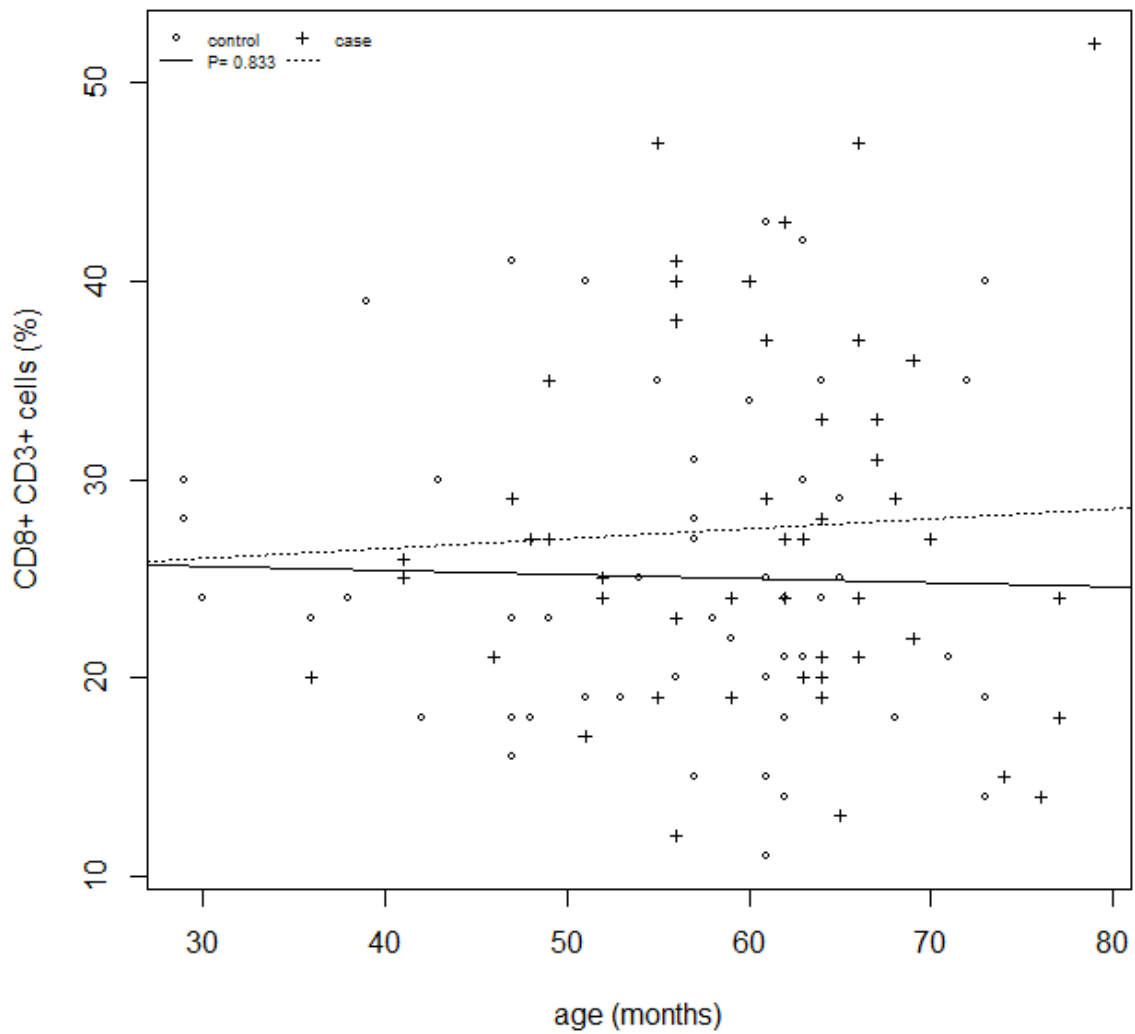


**Obrázek 12b.** Rozložení CD4+ CD25+ FoxP3 Treg (osa y) v závislosti na věku pacientů a kontrol adjustováno na kouření (osa x znázorňuje věk v měsících; P=významnost)

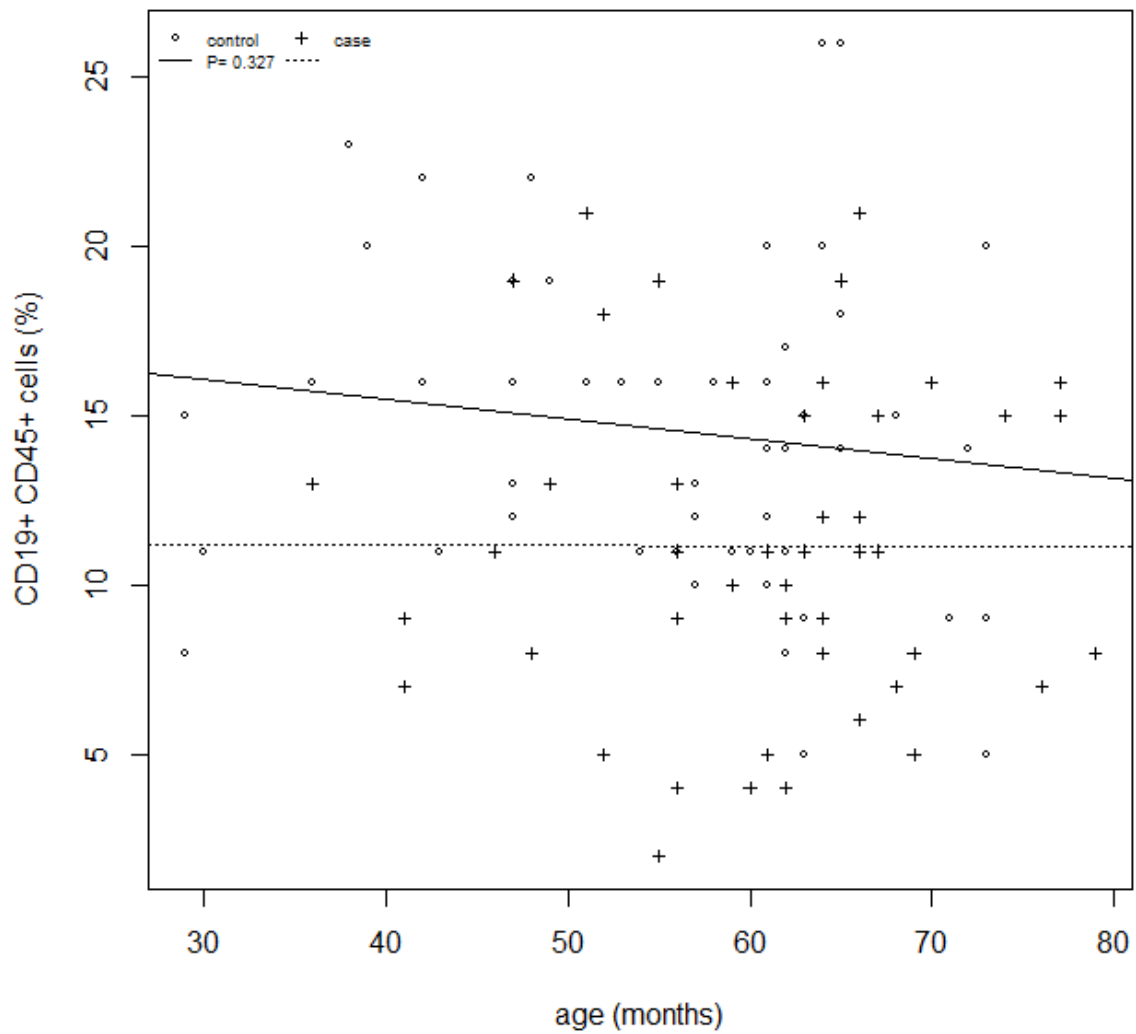




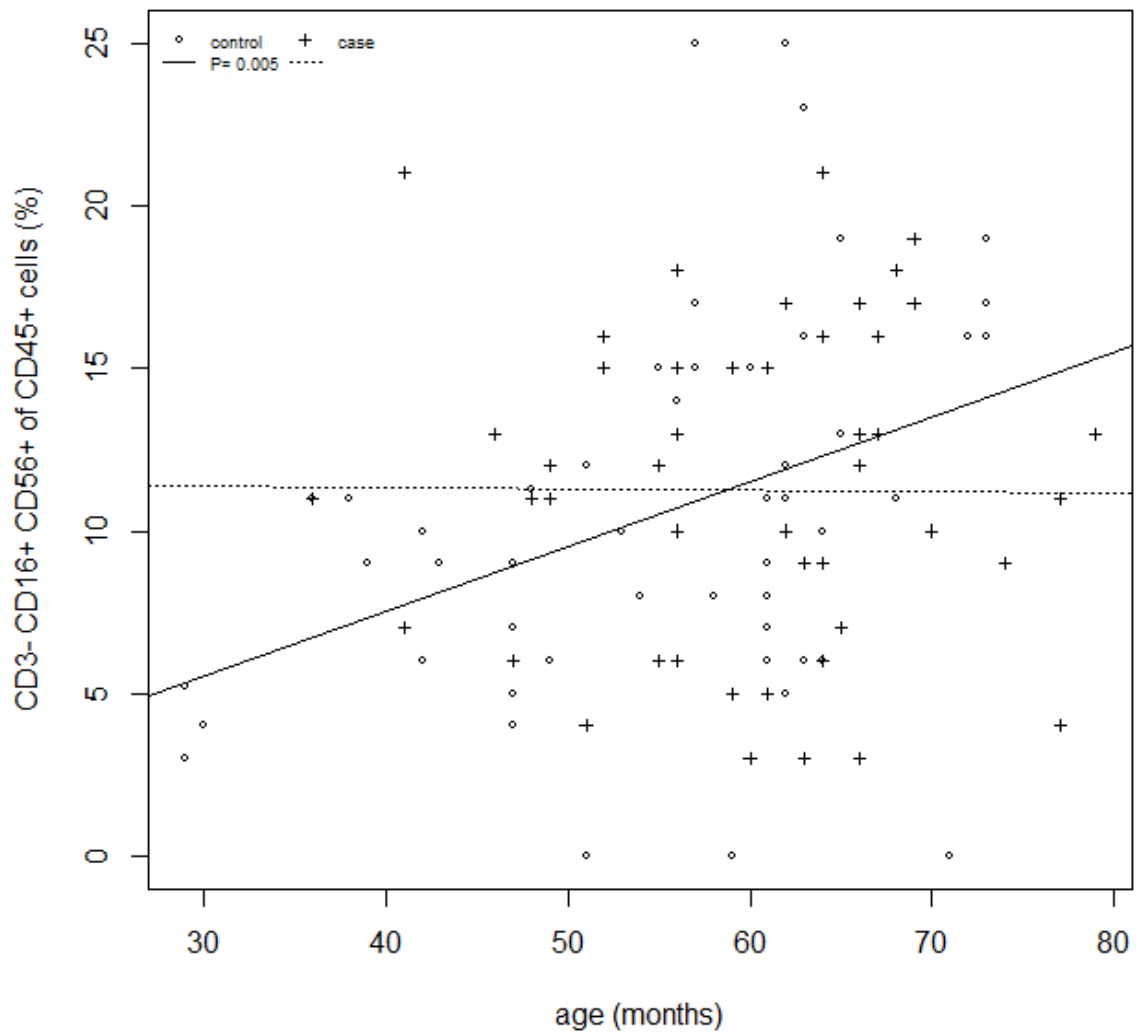
**Obrázek 12c.** Rozložení CD4+ T lymfocytů (osa y) v závislosti na věku pacientů a kontrol adjustováno na kouření (osa x znázorňuje věk v měsících; P=významnost)



**Obrázek 12d.** Rozložení CD8+ T lymfocytů (osa y) v závislosti na věku pacientů a kontrol adjustováno na kouření (osa x znázorňuje věk v měsících; P=významnost)



**Obrázek 12e.** Rozložení CD19+ B buněk (osa y) v závislosti na věku pacientů a kontrol adjustováno na kouření (osa x znázorňuje věk v měsících; P=významnost)



**Obrázek 12f.** Rozložení CD3- CD56+ CD16+ NK buněk (osa y) v závislosti na věku pacientů a kontrol adjustováno na kouření (osa x znázorňuje věk v měsících; P=významnost)

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

Průměrné zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací (CD4+, CD8+, CD4+ CD25+ Treg, CD19 B buněk a CD3- CD56+ CD16+ NK buněk) v periferní krvi bylo porovnáváno mezi pacienty s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými karcinomy (Tabulka 4). 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. Zvýšená byla u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy 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.

K určení prognostického významu imunologických markerů byly porovnávány jednotlivé lymfocytární subpopulace u pacientů s dobrou a špatnou prognózou (Tabulka 5). Analýza nepotvrdila statisticky významné rozdíly v zastoupení žádné ze studovaných lymfocytárních subpopulací buněk.

Dále bylo hodnoceno zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v závislosti na věku pacienta (Obrázek 13a-e). Hladina CD8+ T lymfocytů (počítáno z celkového počtu CD3+ lymfocytů), CD3- CD56+ CD16+ NK buněk (počítáno z celkového počtu CD3+ lymfocytů) a CD19+ B buněk (počítáno z celkového množství CD45+ lymfocytů) se s věkem zvyšovala, zatímco hladina CD4+ lymfocytů (počítáno z celkového počtu CD3+ lymfocytů) a CD4+ CD24+ Treg (počítáno z celkového množství CD4+ lymfocytů) se s věkem snižovala. Nicméně, až na CD3- CD56+ CD16+ NK buňky (P=0,007) byly hodnoty statisticky nevýznamné.

Hladiny zánětlivých parametrů nebyly elevované u pacientů s vyššími hladinami Treg.

**Tabulka 4.** Porovnání průměrných hodnot imunologických parametrů mezi pacienty s HPV-  
asociovanými a HPV-neasociovanými karcinomy

<b>Lymfocytární subpopulace</b>	<b>HPV + (průměr)</b>	<b>HPV - (průměr)</b>	<b>P- hodnota</b>	<b>95%CI</b>	<b>P-hodnota adj*</b>	<b>95%CI adj*</b>
<b>CD8+</b>	28,6	25,2	<b>0,039</b>	1,7;6,5	<b>0,027</b>	0,4;6,9
<b>CD4+</b>	46,5	45,4	0,476	-1,9;4,1	0,721	-2,5;3,6
<b>CD19+</b>	9,8	12,0	<b>0,035</b>	-4,1;-1,5	<b>0,033</b>	-4,2;-1,8
<b>CD3-CD56+16+</b>	12,6	10,3	<b>0,033</b>	-4,3;-1,9	0,114	-3,8;0,4
<b>CD4+CD8+součet</b>	75,2	70,7	<b>0,002</b>	1,6;7,2	<b>0,004</b>	1,3;7,1
<b>CD4+ CD25+Treg</b>	12,0	12,2	0,905	3,1;2,8	0,641	-3,7;2,3
<b>CD4+/CD8+ poměr</b>	1,8	2,0	0,480	-0,4;0,2	0,439	-0,4;2,1
<b>CD8+/CD4+ CD25+ Treg poměr</b>	3,8	2,9	0,178	-0,3;2,1	0,143	-0,3;2,2

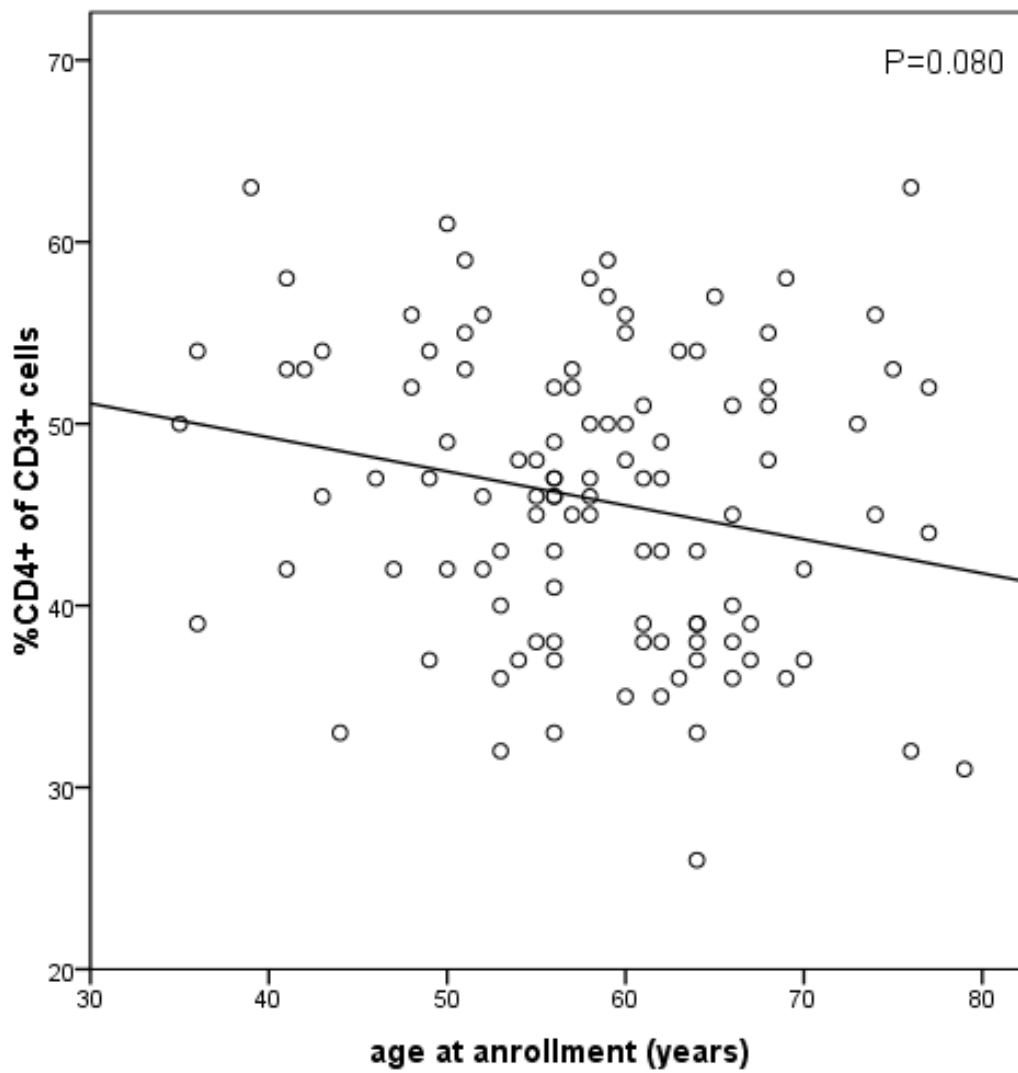
\*=adjustováno na věk

95% CI=konfidenční interval; P=významnost

**Tabulka 5.** Srovnání průměrných hodnot imunologických parametrů mezi pacienty s dobrou a špatnou prognózou (pro charakterizaci viz. Materiál a metodika).

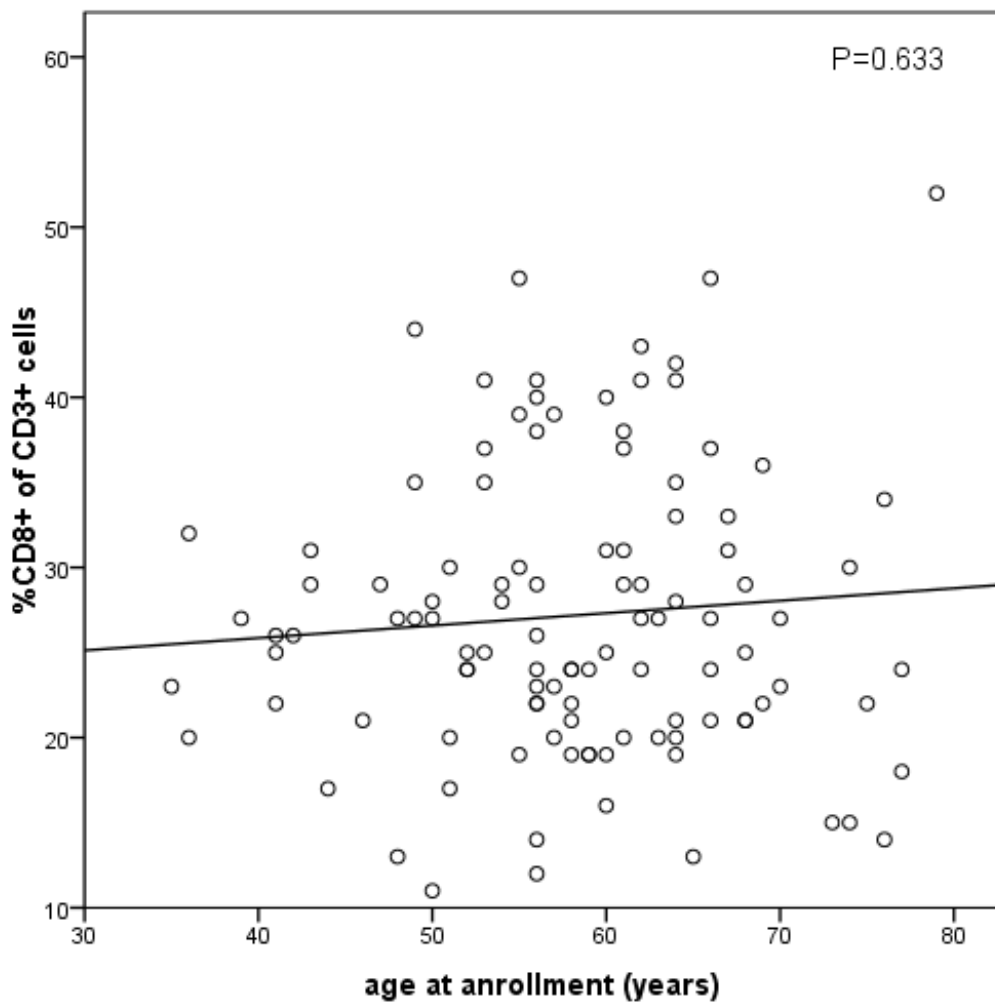
<b>Lymfocytární subpopulace</b>	<b>Dobrá prognóza (průměr)</b>	<b>Špatná prognóza (průměr)</b>	<b>P-hodnota</b>	<b>95% CI</b>
<b>CD8+</b>	26,5	27,7	0,494	-2,3;4,7
<b>CD4+</b>	46,2	45,7	0,788	-3,8;2,9
<b>CD19+</b>	10,8	10,8	0,951	-2,2;2,1
<b>CD3-CD56+16+</b>	11,6	10,8	0,476	-3,1;1,5
<b>CD4+/CD8+ poměr</b>	2,0	1,7	0,222	-0,6;0,1
<b>CD8+CD4+ součet</b>	72,8	73,5	0,638	-2,5;3,9
<b>CD4+ CD25+Treg</b>	11,3	13,9	0,172	-0,6;5,8
<b>CD8+/CD4+ CD25+ Treg poměr</b>	3,3	3,8	0,482	-0,8;1,8

95% CI=konfidenční interval; P=významnost

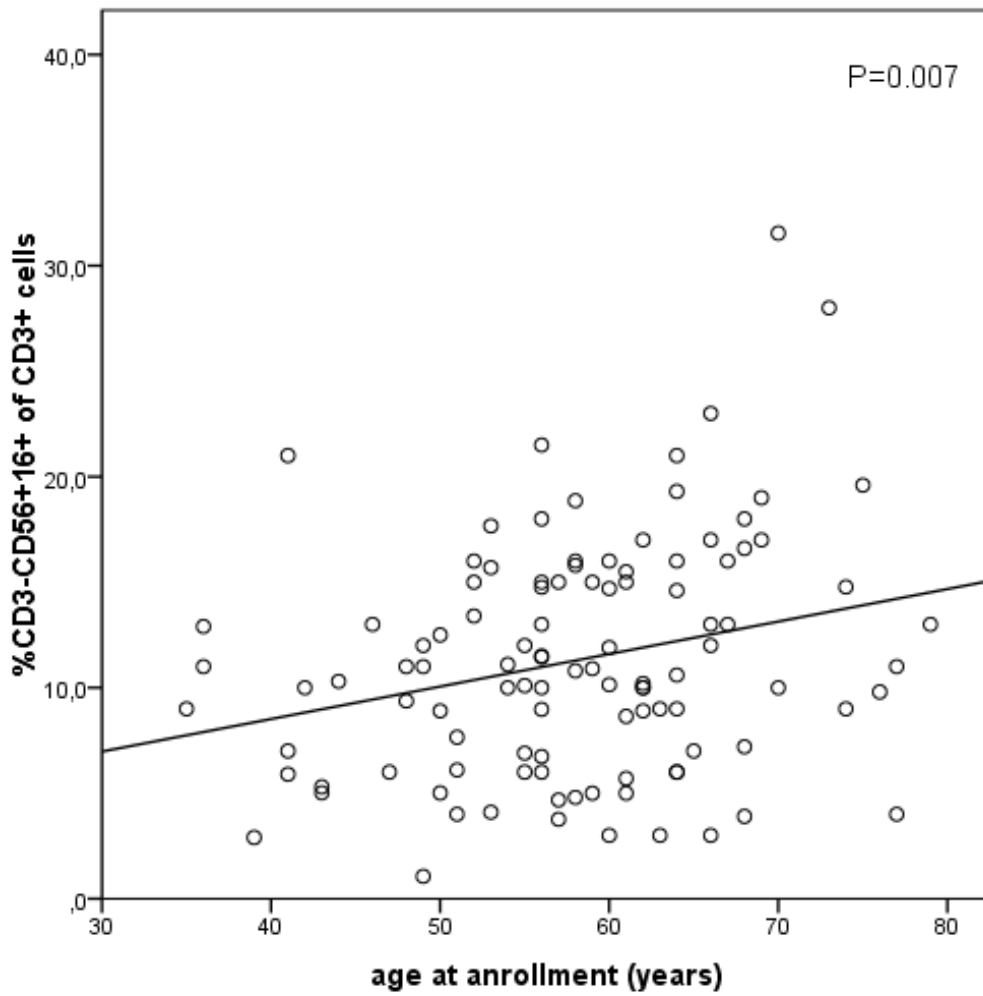


**Obrázek 13a.** Rozložení CD4+ T lymfocytů (osa y) v závislosti na věku pacienta v době zařazení do studie (osa x). P=významnost

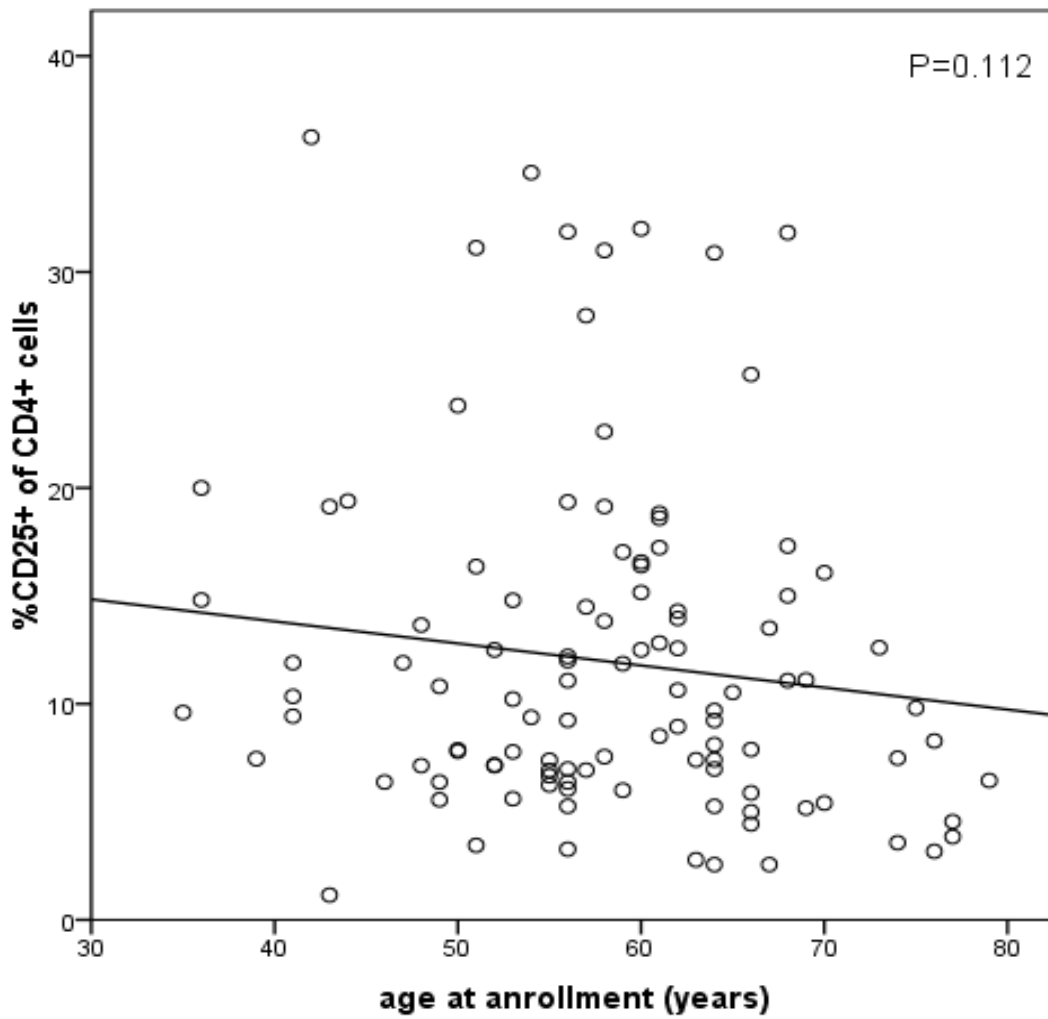




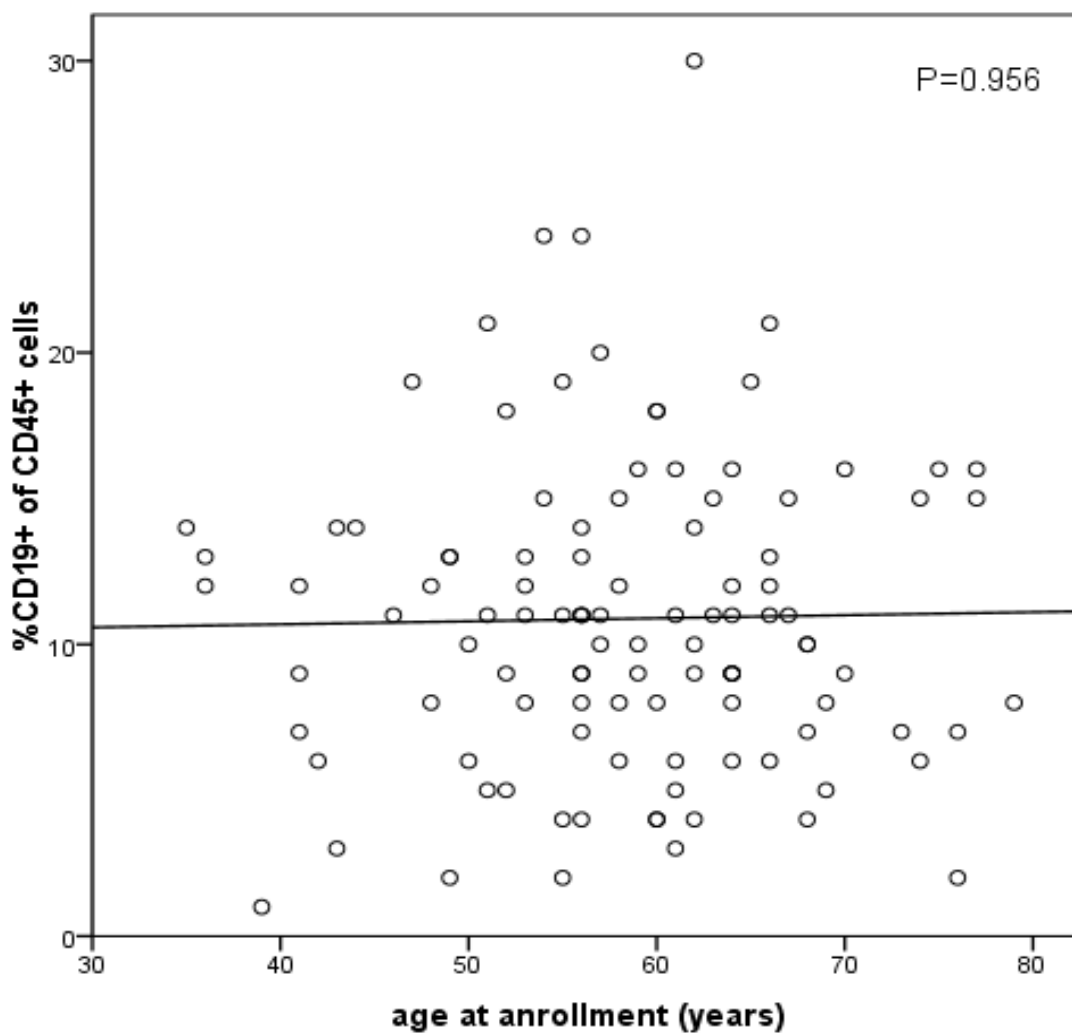
**Obrázek 13b.** Rozložení CD8+ T lymfocytů (osa y) v závislosti na věku pacienta v době zařazení do studie (osa x). P=významnost



**Obrázek 13c.** Rozložení CD3- CD56+ CD16+ NK buněk (osa y) v závislosti na věku pacienta v době zařazení do studie (osa x). P=významnost



**Obrázek 13d.** Rozložení CD4+ CD25+ Treg (osa y) v závislosti na věku pacienta v době zařazení do studie (osa x). P=významnost

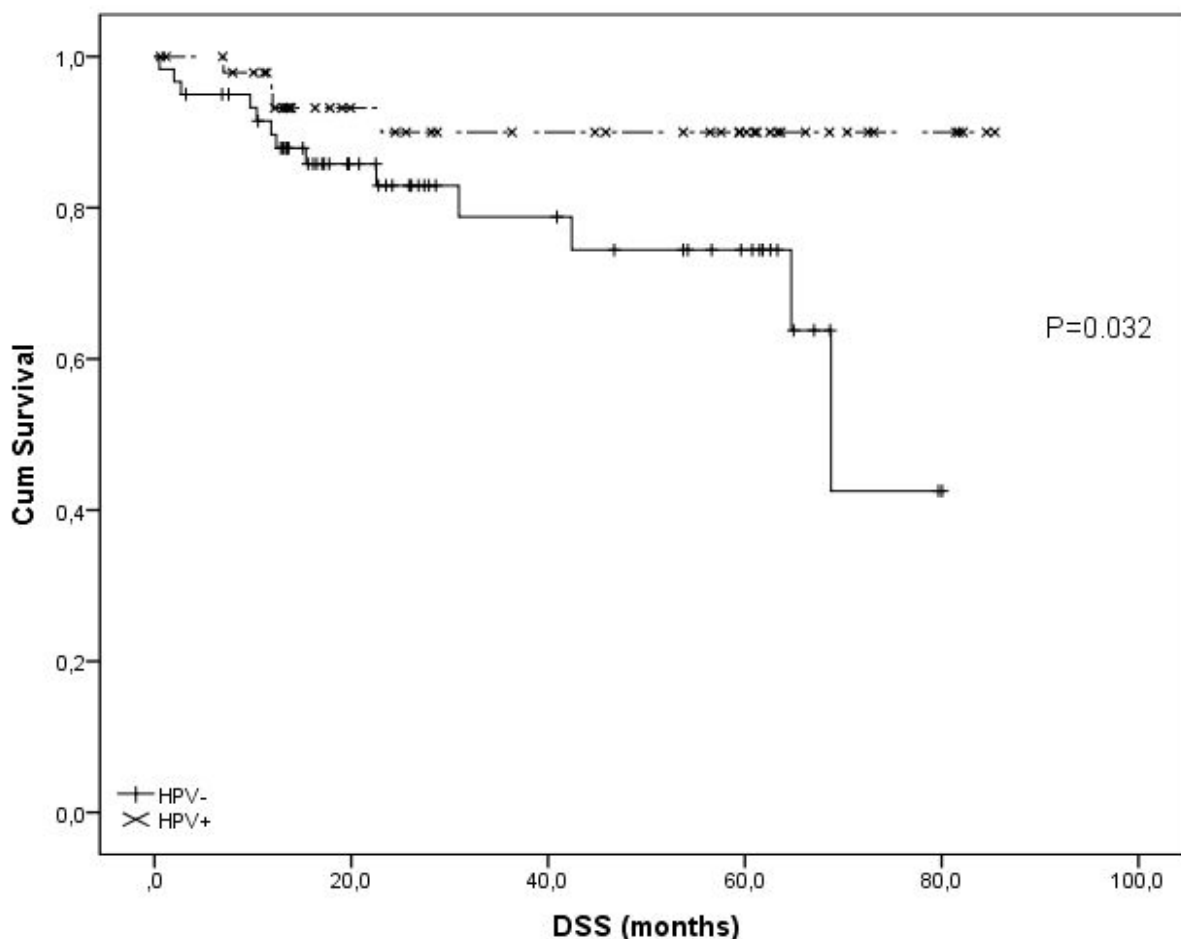


**Obrázek 13e.** Rozložení CD19 B buněk (osa y) v závislosti na věku pacienta v době zařazení do studie (osa x). P=významnost

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

Průměrná doba sledování v této studii byla 3 roky. Na konci sledování bylo 74 pacientů bez známek primárního onemocnění. Z 33 pacientů, kteří zemřeli, jich 21 podlehl primárnímu onemocnění a 12 zemřelo na chorobu nesouvisející s karcinomem. U tří pacientů nebyly k dispozici údaje pro statistické zpracování.

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 ( $P=0,032$ ) (Obrázek 14).



**Obrázek 14.** Přežívání pro DSS u HPV-asociovaných a HPV-neasociovaných karcinomů.

P=významnost

V multivariantní Coxově analýze byly testovány následující proměnné a jejich vliv jak na DSS, tak na celkové přežití (OS-overall survival) (Tabulka 6): velikost nádoru, přítomnost uzlinových metastáz, diferenciace 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+/ 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+/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), 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 (Tabulka 7) (Obrázek 15). 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).

Tabulka 6. Faktory ovlivňující prognózu pacienta – A) DSS a B) OS

A)

DSS		P-value	HR	95%CI	Adjusted* P-value	Adjusted HR	95%CI
Pohlaví	Ženy	Referent					
	Muži	0,277	0,326	0,043-2,458	0,356	0,385	0,051-2,929
Věk		<b>0,035</b>	0,972	0,920 1,026	NA		
Kouření	Nekuřák	Referent					
	Kuřák	0,218	0,623	0,293-1,323	0,435	0,740	0,347-1,576
Konzumace alkoholu	Ano	Referent					
	Ne	0,971	1,010	0,586-1,741	0,837	1,059	0,615-1,822
Velikost tumoru	T1 + T2	Referent					
	T3 + T4	0,187	1,930	0,727-5,127	0,151	2,061	0,768-5,529
Uzlinové metastázy	N0	Referent					
	N1-N3	0,091	3,565	0,815-15,605	<b>0,020</b>	6,035	1,334-27,305
Diferenciace tumoru	G1	Referent					
	G2 + G3	0,980	1,006	0,627-1,616	0,932	1,018	0,683-1,516
Lokalizace tumoru	Orofaryngeální	Referent					
	Orální	0,631	1,363	0,386-4,814	0,993	1,006	0,277-3,653
Recidiva	Ano	Referent					
	Ne	<b>&lt;0,001</b>	12,208	4,591-32,460	<b>&lt;0,001</b>	10,503	3,843-28,705
CD4+ CD24+ Treg		<b>0,054</b>	0,917	0,840-1,001	<b>0,061</b>	0,920	0,843-1,004
CD4+ CD25+ Treg high	Low	Referent					
	High	0,001	0,102	0,027 - 0,388	0,001	0,107	0,027 - 0,417
HPV-/ Treg low		0,205	Referent		0,205	Referent	
HPV-/ Treg high		0,560	0,695	0,204-2,367	0,571	0,693	0,195-2,465
HPV+/ Treg low		0,953	1,068	0,119-9,585	0,952	1,072	0,114-10,124
HPV+/ Treg high		0,620	0,264	0,650-1,071	<b>0,063</b>	0,236	0,650-1,074
CD4+		0,929	1,003	0,946-1,063	0,772	0,991	0,936-1,051
CD8+		0,260	1,032	0,977-1,091	1,091	1,027	0,972-1,085
Součet CD4+ CD8+		0,202	1,038	0,980-1,098	0,472	1,021	0,964-1,082
Poměr CD4+/CD8+		0,274	0,701	0,371 1,325	0,246	0,693	0,373-1,288
Poměr CD8+/Treg		<b>&lt;0,001</b>	1,211	1,098-1,336	<b>&lt;0,001</b>	1,187	1,074-1,311
CD19		0,851	0,991	0,905-1,085	0,953	1,003	0,921-1,091
CD3-56+16+		<b>0,020</b>	0,885	0,798-0,981	<b>0,062</b>	0,905	0,815 1,005
HPV DNA	Negativní	Referent					
	Pozitivní	<b>0,035</b>	0,191	0,041 - 0,888	NA		

\*=adjustováno na HPV a věk; 95% CI=konfidenční interval; HR= relativní riziko;

P=významnost; prognosticky významné hodnoty jsou zvýrazněny

B)

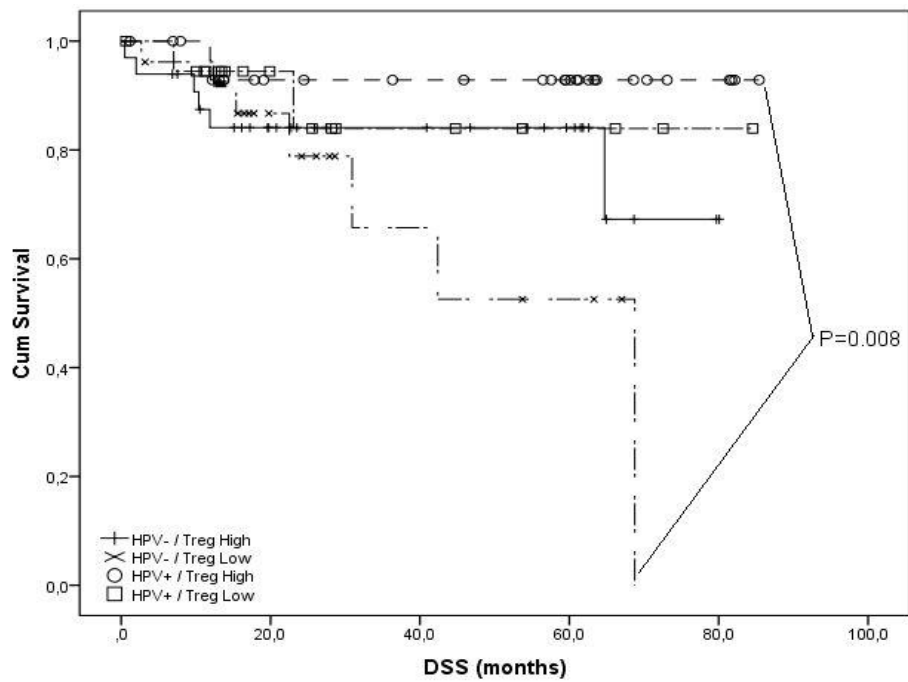
OS		P-value	HR	95%CI	Adjusted* P-value	Adjusted HR	95%CI	
Pohlaví	Ženy	Referent						
	Muži	0,099	0,300	0,072-1,253	0,126	0,327	0,078-1,370	
Věk		0,892	1,003	0,963-1,044	NA			
Kouření	Nekuřák	Referent						
	Kuřák	<b>0,019</b>	0,505	0,285-0,894	<b>0,021</b>	0,496	0,274-0,898	
Konzumace alkoholu	Ano	Referent						
	Ne	0,847	0,962	0,648-1,428	0,864	0,966	0,647-1,440	
Velikost tumoru	T1 + T2	Referent						
	T3 + T4	<b>0,027</b>	2,192	1,092-4,396	<b>0,021</b>	2,296	1,135-4,646	
Uzlinové metastázy	N0	Referent						
	N1-N3	0,188	1,700	0,771-3,747	<b>0,064</b>	2,228	0,955-5,194	
Diferenciace tumoru	G1	Referent						
	G2 + G3	0,408	1,102	0,875-1,388	0,498	1,080	0,864-1,350	
Lokalizace tumoru	Orofaryngeální	Referent						
	Orální	0,812	0,881	0,309-2,510	0,508	0,697	0,239-2,029	
Recidiva	Ano	Referent						
	Ne	<b>&lt;0,001</b>	6,936	3,372-14,268	<b>&lt;0,001</b>	6,711	3,192-14,111	
CD4+ CD24+ Treg		0,459	0,984	0,943-1,027	0,525	0,986	0,956-1,029	
CD4+ CD25+ Treg high	Low	Referent						
	High	0,040	0,284	0,088 - 0,942	0,043	0,288	0,086 - 0,961	
HPV-/ Treg low		0,342	Referent		0,361	Referent		
HPV-/ Treg high		0,945	0,961	0,305-3,031	0,089	0,923	0,284-2,997	
HPV+/ Treg low		0,901	1,150	0,128-10,338	0,860	1,222	0,131-11,369	
HPV+/ Treg high		0,242	0,482	0,142-1,638	0,236	0,993	0,140-1,623	
CD4+		0,815	0,995	0,956-1,036	0,615	0,990	0,951-1,030	
CD8+		0,199	1,026	0,987-1,066	0,236	10,023	0,985-1,063	
Součet CD4+ CD8+		0,272	1,023	0,982-1,065	0,443	1,017	0,974-1,061	
Poměr CD4+/CD8+		0,154	0,735	0,481- 1,122	0,129	0,725	0,479-1,098	
Poměr CD8+/Treg		<b>0,008</b>	1,135	1,033- 1,248	<b>0,012</b>	1,136	1,029-1,253	
CD19		0,617	0,986	0,924-1,052	0,853	0,994	0,932-1,060	
CD3-56+16+		0,295	0,968	0,911-1,029	0,409	0,974	0,915-1,037	
HPV DNA	Negativní	Referent				NA		
	Pozitivní	0,072	0,502	0,237 - 1,054				

\*=adjustováno na HPV a věk; 95% CI=konfidenční interval; HR= relativní riziko;

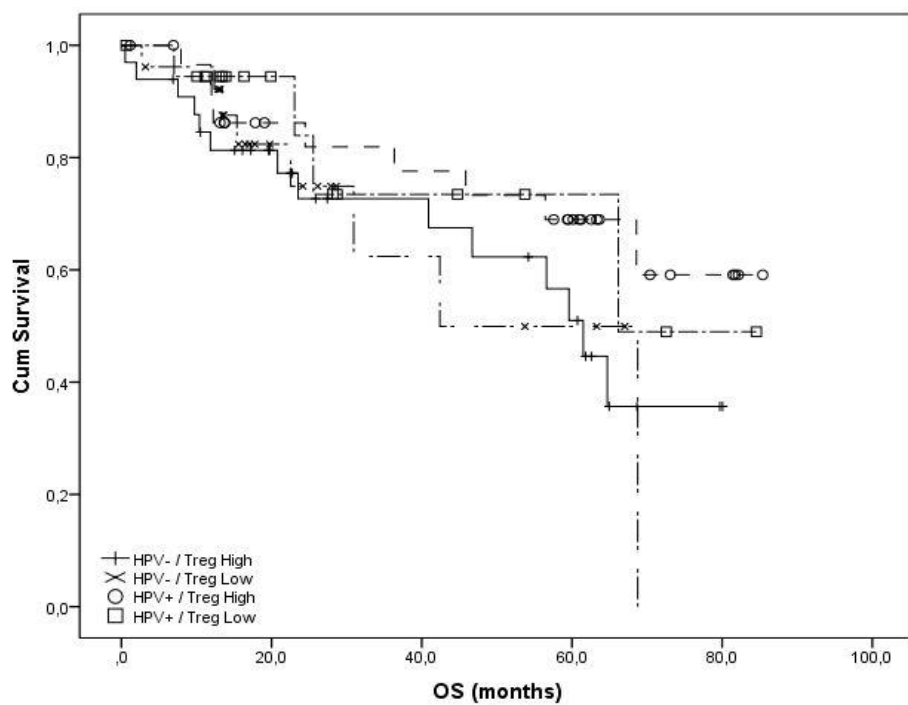
P=významnost; prognosticky významné hodnoty jsou zvýrazněny



A)



B)



**Obrázek 15.** DSS (A) a OS (B) v závislosti na detekci exprese HPV 16 E6 mRNA a hladině Treg buněk. P=významnost

**Tabulka 7.** Kombinace virologických a imunologických parametrů a jejich vliv na DSS (A) a OS (B).

A)

<b>DSS</b>	<b>HPV+/Treg high</b>
HPV+/Treg low	P= 0,505
HPV-/Treg high	P= 0,135
HPV-/Treg low	P= 0,008

B)

<b>OS</b>	<b>HPV+/Treg high</b>
HPV+/Treg low	P= 0,868
HPV-/Treg high	P= 0,139
HPV-/Treg low	P= 0,204

Použitím Mann-Whitneyho testu byla sledována vzájemná závislost mezi HPV a 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 karcinomy hlavy a krku.

Jedním z cílů práce bylo potvrdit hypotézu prognostického zvýhodnění pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku. Tato studie potvrdila, že pacienti s HPV-asociovanými karcinomy vykazují signifikantně lepší přežívání ve srovnání s pacienty s HPV-neasociovanými karcinomy hlavy a krku.

Výsledky této práce poukazují na to, že prognóza pacientů s karcinomem hlavy a krku je též ovlivněná změnami v zastoupení imunitních buněk u pacientů s karcinomem. Lepší přežívání bylo pozorováno u pacientů s vyššími hladinami Treg v periferní krvi a také u pacientů s nižším poměrem  $CD8^+ / CD4^+CD25^+$  Treg.

Studie naznačila, že vyšší hladiny  $CD4^+CD25^+$  Treg jsou detekovány v periferní krvi pacientů v porovnání se skupinou zdravých kontrol nezávisle na subpopulaci  $CD8^+$  T lymfocytů a paradoxně zvýšené hladiny  $CD4^+CD25^+FoxP3$  Treg byly pozorovány u kontrolní skupiny zdravých jedinců.

Dále byla práce zaměřena na změny v imunitním systému u pacientů s HPV-asociovanými a neasociovanými karcinomy hlavy a krku. U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy byly detekovány zvýšené hladiny  $CD8^+$  T lymfocytů, zatímco hladiny  $CD4^+CD25^+$  Treg se u jednotlivých podskupin pacientů nelišily.

Vliv virové etiologie na vznik karcinomů hlavy a krku a prognózu je dnes neoddiskutovatelný. Je však potřeba zkoumat další biomarkery, které by pomohly specifikovat terapeutický postup či prognózu pacientů s karcinomem hlavy a krku. Dále tyto faktory mezi sebou porovnat s cílem dosažení co nejpřesnější informace o vzájemném potencujícím, inhibičním či nezávislém vlivu na prognózu pacientů.

Horní cesty dýchací a polykací jsou místem, kde se ve velké míře akumuluje lymfatická tkáň, která je jednak organizována ve formě Waldeyerova mízního okruhu a jednak volně rozptýlená na sliznicích. Je místem koncentrace imunokompetentních buněk, které brání vstupu infekce ze zevního prostředí do organismu. Z toho důvodu je aktuálně věnována pozornost změnám v imunitním profilu u pacientů s nádorovým onemocněním orofaryngu, který je bohatý jak na organizovanou tak na disperzní lymfatickou tkáň (Nasman et al. 2012; Wansom et al. 2012; Nordfors et al. 2013).

Recentní studie popisují změny v zastoupení jednotlivých imunokompetentních buněk u pacientů se solidními nádory, a to jak v periferní krvi, tak v nádorovém mikroprostředí (Hoffmann et al. 2002; Whiteside 2005; Badoual et al. 2013; Nordfors et al. 2013). Otázka, zda místo nejpřesnější detekce imunokompetentních buněk ve vztahu k prognóze pacienta s nádorovým onemocněním je v nádorovém mikroprostředí, v jeho okolí, či v periferní krvi, je v současnosti velmi aktuální. Existují studie popisující korelaci mezi periferií a mikroprostředím nádoru (Liyanage et al. 2002; Lau et al. 2007; Green et al. 2013). Zatímco práce Wansoma (Wansom et al. 2012) a spol. tuto závislost nepotvrzuje. Vzhledem k tomu, že veškeré imunologické děje se odehrávají v lymfatických uzlinách a imunokompetentní buňky jsou následně transportovány do periferie, je možné považovat periferii za odraz aktuálního stavu imunitního systému. I z tohoto důvodu byla v naší studii zvolena pro detekci imunokompetentních buněk periferní krev. Mezi další výhody vyšetření periferní krve patří snadný odběr materiálu a rutinní zpracování vzorků průtokovou cytometrií.

V této práci byla nejprve provedena detekce zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací u pacientů s karcinomem hlavy a krku v porovnání se zdravými kontrolami. Aby bylo vyšetření co nejpřesnější, bylo k 50 pacientům s karcinomem vybráno 52 zdravých jedinců stejného pohlaví a v pětiletém věkovém horizontu. V analýze byl rovněž zohledněn věk a kouření. Byly prokázány statisticky významné změny v zastoupení CD4+ CD25+ Treg a CD4+ CD25+ FoxP3 Treg u pacientů s karcinomem ve srovnání se zdravými jedinci. Není možné však jednoznačně říci, jestli mají pacienti s karcinomem jen zvýšené či snížené hladiny imunitních buněk. 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, komorbidita, abusus alkoholu či tabáku, možný je též socioekonomický vliv.

Pozornost byla dále věnována tomu, jaký vliv na zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací v periferní krvi má věk pacienta v době stanovení diagnózy. V této práci 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 a spol. (Wansom et al. 2012) neprokázali změny v zastoupení jednotlivých imunologických parametrů v periferní krvi v závislosti na HPV statutu u pacientů s karcinomem hlavy a krku, v prezentovaném souboru byly pozorovány změny v zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací mezi pacienty s HPV-asociovanými a HPV-neasociovanými karcinomy. U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy byly detekovány zvýšené hladiny CD3- CD56+ CD16+NK buněk, CD8+ T lymfocytů a součet CD4+ CD8+ T lymfocytů. Změny v zastoupení imunitních buněk u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy jsou pravděpodobně vyvolány obranným imunitním mechanismem uplatňujícím se v eliminaci viru. Na eliminaci viru se uplatňují jak mechanismy specifické imunitní obrany, zejména CD8+ T lymfocyty, tak mechanismy nespecifické obrany, kde klíčovou roli hrají NK buňky. Toto může být jedno z možných vysvětlení zvýšených hladin CD8+ T lymfocytů a CD3- CD56+ CD16+NK buněk u pacientů s HPV-asociovanými karcinomy. Avšak statistická významnost CD3- CD56+ CD16+ NK buněk již nebyla pozorována po adjustaci na věk, což vyplývá ze silné závislosti NK buněk na věku pacienta. Zajímavá by byla korelace v zastoupení jednotlivých podskupin lymfocytů v periferní krvi a mikroprostředí nádoru.

Aby bylo zjištěno, jaký vliv na prognózu pacienta mají imunitní buňky, byly porovnány průměrné hodnoty počtu imunitních buněk mezi pacienty s dobrou prognózou (bez recidivy či naživu na konci sledování), anebo těch, kteří zemřeli. Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi těmito dvěma podskupinami, což potvrdilo výsledky práce Wansoma a spol. (Wansom et al. 2012).

Treg hrají klíčovou roli na poli protinádorové imunity. Jejich funkcí je udržovat periferní homeostázu. Uplatňují se v potlačení proliferace a efektorové funkce širokého spektra imunitních buněk (Strauss et al. 2007).

V průběhu výzkumu zabývajícího se optimalizací markerů nejpřesněji charakterizujících Treg došlo ke značně dynamickému a progresivnímu vývoji. V současnosti je Treg nejpřesněji možno charakterizovat jako subpopulaci CD4+ CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> CD62<sup>+</sup> (Seddiki et al. 2006; Sakaguchi et al. 2011), přičemž transkripční faktor FoxP3, zvaný též „master regulator“ je pro zařazení lymfocytární subpopulace k Treg nepostradatelný. FoxP3 je klíčový pro Treg během vývoje v thymu a pro regulaci jejich funkce, protože moduluje rozdílnou odpověď na stimulaci TCR u regulačních a u efektorových T lymfocytů.

Vzhledem k tomu, že specifická monoklonální protilátka pro FoxP3 byla dostupná až po roce 2006, mohly být takto detekované jen vzorky odebrané do studie po roce 2006. Z tohoto

důvodu byl marker FoxP3 detekován u 50 ze 110 vzorků zařazených pacientů. Pomocí Spearmanova testu, byla zjišťována korelace mezi subpopulací CD4+ CD25+ Treg a CD4+ CD25 + Treg FoxP3, která byla vysoce statisticky významná.

Receptor CD25+ a marker FoxP3 mohou být v průběhu zánětlivého procesu exprimovány na povrchu jak Treg, tak aktivovaných efektorových T lymfocytů. Z toho důvodu byly vyšetřovány též zánětlivé parametry (počet leukocytů a CRP) v periferní krvi u pacientů s nádorem. U žádného z pacientů zařazeného do studie nebyly detekovány zvýšené hodnoty CRP a WBC, což svědčí pro to, že v případě detekovaných CD4+ CD25+ T lymfocytů a CD4+ CD25+ FoxP3 T lymfocytů v této studii se jednalo o Treg (Sakaguchi et al. 2011).

Ve studii Boučka a spol. (Boucek et al. 2010) bylo zjištěno, že pacienti s karcinomem hlavy a krku mají v době stanovení diagnózy vyšší hladiny Treg v periferní krvi ve srovnání se zdravými kontrolami, což bylo potvrzeno i dalšími autory (Liyanage et al. 2002; Karagoz et al. 2010; Fu et al. 2012). Nicméně Hoffmann a spol. popsal nižší hladiny cirkulujících Treg u pacientů s karcinomem hlavy a krku (Saito et al. 1999; Hoffmann et al. 2002).

Z klinického hlediska je nejzajímavější a zároveň nejpřínosnější zkoumat vliv jednotlivých imunitních buněk, potažmo změny jejich hladin, na prognózu pacienta.

V tomto souboru bylo zjištěno, že přežívání je ovlivněno zvýšenou hladinou 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 s maligním melanomem (Seddiki et al. 2006), kolorektálním karcinomem (Salama et al. 2009) a Hodgkinovým lymfomem (Alvaro et al. 2005).

Tato paradoxní role je obtížně vysvětlitelná, nicméně množství Treg v periferní krve nemusí reflektovat funkčnost jednotlivých buněk. Tím by mohlo být přežívání ovlivněno zejména HPV infekcí. Nově je v souvislosti s funkcí Treg zvažována detekce kombinace markerů FoxP3 a CD39 (Hong et al. 2014; Muller et al. 2014; Schuler et al. 2014), která by zpřesnila selektivní detekci pouze funkčních Treg. Další hypotéza je, že skutečně funkčně aktivní Treg mají kompletně demetylovaný úsek genu pro transkripční faktor FoxP3 (Wieczorek et al. 2009). Úroveň metylace souvisí s možnou transkripcí genů. Je-li úsek genomu pro konkrétní gen methylovaný, nemůže být tento gen přepisován. Naopak, demetylovaný úsek je znakem možné transkripce genu pro FoxP3.

Existuje jen málo studií zabývajících se vzájemným působením imunologických a virologických parametrů u pacientů s karcinomem hlavy a krku a vlivem kombinace těchto dvou parametrů na pacientovu prognózu. Detailněji byl vztah mezi HPV infekcí a imunitním systémem studován u karcinomů cervixu. Bylo prokázáno, že s progresí karcinomu cervixu se zvyšuje exprese cytokinu IL-10 a zároveň byla pozorována statisticky významná korelace mezi hladinou IL-10 a HPV- pozitivitou, zejména HPV typem 16. Tyto výsledky poukazují na vztah mezi HPV infekcí, IL-10 a nádorovou progresí (Bhairavabhotla et al. 2007; Bermudez-Morales et al. 2008). Tyto práce dávají podklad pro hypotézu, že HPV může indukovat Treg skrze cytokin IL-10, který se uplatňuje jako jeden z aktivačních působků Treg.

V prezentovaném souboru byl také prokázán vliv CD3- CD56+ CD16+ NK buněk na prognózu pacientů s karcinomem hlavy a krku. Doposud žádná práce neporovnávala vliv NK buněk v periferní krvi na přežívání pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku. Vzhledem k protivirovému mechanismu NK buněk jsou zvýšené hladiny NK buněk pravděpodobně v důsledku infekce HPV, který by mohl být NK buňkami z organismu eliminován, což by přispívalo k lepšímu přežívání pacientů s HPV asociovanými karcinomy.

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 periferní krvi. Protože není stanovena jednoznačná hraniční hodnota pro hladinu Treg v periferní krvi, byla tato v naší studii stanovena jako medián přesně definované kontrolní skupiny, která odpovídala věkem i pohlaví skupině pacientů s karcinomem. V jiných studiích byla hladina zvýšené/snížené hladiny Treg stanovena na základě percentilů či průměrné hodnoty kontrolní skupiny. Tento fakt může být limitem studie, protože při neexistující jednoznačné hraniční hodnotě daného markeru je porovnání s jinými pracemi velmi obtížné.

V této studii bylo zjištěno, že pacienti s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku a vyšší hladinou CD4+ CD25+ Treg v periferní krvi 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, ale svědčí spíše pro přítomnost viru

ve tkáni karcinomu, HPV 16 E6 mRNA reflektuje zapojení viru do procesu maligní transformace. Tkáň karcinomu byla proto analyzována na přítomnost HPV16 E6 mRNA, jakožto nejpřesnějšího markeru pro detekci aktivní virové infekce. Tato práce potvrdila, že pacienti s HPV-asociovanými karcinomy přežívají signifikantně lépe v porovnání s pacienty s HPV-neasociovanými karcinomy hlavy a krku. Toto pozorování se shoduje jak s předešlými tuzemskými pracemi (Rotnaglova et al. 2011; Koslabova et al. 2013; Klozar et al. 2014), tak s výsledky mnoha dalších zahraničních studií (Lindquist et al. 2007; Fakhry et al. 2008; Attner et al. 2011).

Celkově byla HPV-pozitivita v této studii detekována u 40,0% pacientů s karcinodem orofaryngeální tak i neorofaryngeální lokalizace, což bylo menší procento pacientů, než v naší předešlé práci (Rotnaglova et al. 2011). Toto pozorování pravděpodobně souvisí s heterogenitou současného souboru. Do studie byli zařazeni kromě pacientů s tonzilárními, respektive orofaryngeálními karcinomy, též pacienti s karcinodem dutiny ústní, hypofaryngu, či laryngu. Ve studiích jiných autorů, ve kterých byla popisována vyšší prevalence HPV, byly markery HPV infekce vyšetřovány ve tkáni pocházející z orofaryngeální lokalizace a HPV pozitivita byla v těchto pracích stanovena na základě detekce HPV DNA (Nasman et al. 2012; Wansom et al. 2012), exprese nepřímého markeru aktivní virové infekce - proteinu p16 (Park et al. 2013), či na základě přítomnosti kombinace těchto dvou markerů (Kumar et al. 2007; Rotnaglova et al. 2011; Nordfors et al. 2013).

Podle recentní metaanalýzy je prevalence HPV v orofaryngu přibližně 48 % (Mehanna et al. 2013) a nejčastěji je HPV DNA detekována v tonzilárních karcinomech (Syrjanen 2004; Hammarstedt et al. 2006; Nasman et al. 2009). Toto pozorování bylo potvrzeno také v této práci, ve které byla prevalence HPV DNA ve tkáni tumoru 65,8%.

HPV 16 E6 mRNA, byla detekována v 81,8% vzorků pozitivních na HPV 16 DNA. V předešlé práci byla pozorována vyšší korelace (93%) mezi současnou přítomností HPV 16 DNA a virových onkogenů (Rotnaglova et al. 2011), kterou pozoroval také Lindquist a spol. (Lindquist et al. 2007) popisující 79% shodu mezi HPV 16 E6 mRNA a HPV 16 DNA u tonzilárních karcinomů. Jiné práce popisují současnou detekci těchto dvou HPV markerů u orofaryngeálních karcinomů v nižším procentu (Smeets et al. 2007; Hoffmann et al. 2012). Diskrepantní výsledky mohou být dány počtem zařazených subjektů, rozdílným zastoupením karcinomů z jednotlivých orofaryngeálních sublokalit, geografickými a socioekonomickými odlišnostmi a v neposlední řadě též metodikou vyšetření RNA.



Kromě markerů aktivní virové infekce a HPV DNA byla prováděna též detekce exprese p16, který slouží jako nepřímý znak aktivní virové infekce. Imunohistochemické vyšetření p16 se rutinně provádí na patologických pracovištích, zejména při vyšetření lézí hrdla děložního, což by mohlo být využito rovněž v rámci diagnostického schématu u karcinomů hlavy a krku a k upřesnění léčebné modalit. Protein p16 byl detailně studován u karcinomů hrdla děložního, kde je považován za nepřímý marker aktivního vlivu virového onkogenu v buňkách karcinomů (Cuschieri et al. 2008).

Studie věnující se etiologii karcinomů hlavy a krku ve vztahu k prognóze zdůrazňují význam vyšetření proteinu p16 v kombinaci s HPV DNA (Klussmann et al. 2003; Kumar et al. 2007; Hoffmann et al. 2010), protože samostatné vyšetření p16 nemůže sloužit jako surogátní marker aktivní virové infekce (Hoffmann et al. 2012).

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 karcinomy hlavy a krku, což bylo pozorováno v předešlé studii zaměřené na markery infekce HPV u tonzilárních karcinomů (Rotnaglova et al. 2011). 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 sublokality horních cest dýchacích a polykacích, což mohlo ovlivnit interpretaci dat. V prezentovaném souboru byla HPV DNA detekována v 93,2% u orofaryngeálních karcinomů a v 6,8% u karcinomů dutiny ústní. U karcinomů hypofaryngálních či laryngálních HPV DNA detekovaná nebyla. Stejně tak i jiní autoři prezentovali, že detekce markerů HPV je v jiných, (neorofaryngeálních) lokalitách nižší (Combes et al. 2014; Salazar et al. 2014; Upile et al. 2014).

Díky detekci imunologických parametrů by mohla být zpřesněna prognostická informace, která je významná pro volbu terapeutického postupu. V současné době, kdy se zvažuje deeskalace léčby na základě HPV statusu by mohla informace o znalosti imunitních parametrů ovlivňujících přežívání být velmi významná. Navíc, v budoucnosti by se do terapeutického protokolu u pacientů s karcinomy hlavy a krku mohla zařadit též imunoterapie, která je v současnosti ve fázi klinického zkoušení s prvotními slibnými výsledky (Whiteside et al. 2012).

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 karcinomem hlavy a krku, která by mohla přinést pacientům jak kvalitnější a plnohodnotnější život, tak zvýšit šanci na vyléčení.

## 6. ZÁVĚRY

Nejdůležitější závěry dizertační práce lze shrnout takto:

- A) HPV je prognosticky významným faktorem pro DSS u pacientů s karcinomy hlavy a krku
- 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 periferní krvi se liší u pacientů s karcinomem hlavy a krku a u zdravých jedinců.
- D) U pacientů s HPV-asociovanými karcinomy hlavy a krku byly v periferní krvi 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 periferní krvi ve srovnání s pacienty s HPV-neasociovanými karcinomy a nižší hladinou CD4+ CD25+Treg v periferní krvi.
- F) Virologické a imunologické parametry ovlivňují prognózu pacienta nezávisle.

## 7. PŘEHLED LITERATURY

- Aarnoudse, C. A., J. J. Garcia Vallejo, et al. (2006). "Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells." *Curr Opin Immunol* **18**(1): 105-111.
- Accomando, W. P., J. K. Wiencke, et al. (2012). "Decreased NK cells in patients with head and neck cancer determined in archival DNA." *Clin Cancer Res* **18**(22): 6147-6154.
- Adelstein, D. J., Y. Li, et al. (2003). "An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer." *J Clin Oncol* **21**(1): 92-98.
- Al-Sarraf, M., M. LeBlanc, et al. (1998). "Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099." *J Clin Oncol* **16**(4): 1310-1317.
- Albers, A., K. Abe, et al. (2005). "Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer Res* **65**(23): 11146-11155.
- Albers, A. E., R. L. Ferris, et al. (2005). "Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites." *Cancer Immunol Immunother* **54**(11): 1072-1081.
- Alhamarneh, O., F. Agada, et al. (2011). "Serum IL10 and circulating CD4(+) CD25(high) regulatory T cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma." *Head Neck* **33**(3): 415-423.
- Alvaro, T., M. Lejeune, et al. (2005). "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells." *Clin Cancer Res* **11**(4): 1467-1473.
- Ang, K. K., J. Harris, et al. (2010). "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer." *N Engl J Med* **363**(1): 24-35.
- Arney, A. and K. M. Bennett (2010). "Molecular diagnostic of human papillomavirus." *Laboratory medicine* **41**(9): 523-530.
- Arreygue-Garcia, N. A., A. Daneri-Navarro, et al. (2008). "Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions." *BMC Cancer* **8**: 16.
- Artandi, S. E. and R. A. DePinho (2010). "Telomeres and telomerase in cancer." *Carcinogenesis* **31**(1): 9-18.
- Attner, P., J. Du, et al. (2011). "Human papillomavirus and survival in patients with base of tongue cancer." *Int J Cancer* **128**(12): 2892-2897.
- 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.
- Badoual, C., S. Hans, et al. (2006). "Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers." *Clin Cancer Res* **12**(2): 465-472.
- Baker, C. C., W. C. Phelps, et al. (1987). "Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines." *J Virol* **61**(4): 962-971.
- Bermudez-Morales, V. H., L. X. Gutierrez, et al. (2008). "Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape." *Cancer Invest* **26**(10): 1037-1043.
- Bernard, H. U., R. D. Burk, et al. (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." *Virology* **401**(1): 70-79.
- Bhairavabhotla, R. K., V. Verm, et al. (2007). "Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer." *Indian J Biochem Biophys* **44**(5): 350-356.

- Bingle, L., N. J. Brown, et al. (2002). "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." *J Pathol* **196**(3): 254-265.
- Bolpetti, A., J. S. Silva, et al. (2010). "Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth." *BMC Immunol* **11**: 27.
- Bopp, T., C. Becker, et al. (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1303-1310.
- Bordon, Y. (2010). "Present and clear danger." *Nat Rev Immunol* **10**(9): 616.
- Bose, A., T. Chakraborty, et al. (2008). "Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients." *Cancer Immun* **8**: 10.
- Bottcher, A., J. Ostwald, et al. (2013). "Distribution of circulating natural killer cells and T lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma." *Auris Nasus Larynx* **40**(2): 216-221.
- Boucek, J., T. Mrkvan, et al. (2010). "Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Cell Mol Med* **14**(1-2): 426-433.
- Bravo, I. G. and A. Alonso (2004). "Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth." *J Virol* **78**(24): 13613-13626.
- Cantrell, S. C., B. W. Peck, et al. (2013). "Differences in imaging characteristics of HPV-positive and HPV-Negative oropharyngeal cancers: a blinded matched-pair analysis." *AJNR Am J Neuroradiol* **34**(10): 2005-2009.
- Cao, F. M., X. H. Zhang, et al. (2005). "[Prognostic significances of natural killer cells and dendritic cells infiltrations in esophageal squamous cell carcinoma]." *Ai Zheng* **24**(2): 232-236.
- Carlos, C. A., H. F. Dong, et al. (2005). "Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity." *J Immunol* **175**(3): 1628-1635.
- Coffelt, S. B., R. Hughes, et al. (2009). "Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression." *Biochim Biophys Acta* **1796**(1): 11-18.
- Combes, J. D. and S. Franceschi (2014). "Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers." *Oral Oncol* **50**(5): 370-379.
- Conrad, M., V. J. Bubbs, et al. (1993). "The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein." *J Virol* **67**(10): 6170-6178.
- Cooper, J. S., T. F. Pajak, et al. (2004). "Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck." *N Engl J Med* **350**(19): 1937-1944.
- Costello, R. T., J. A. Gastaut, et al. (1999). "Tumor escape from immune surveillance." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **47**(2): 83-88.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-949.
- Cuschieri, K. and N. Wentzensen (2008). "Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(10): 2536-2545.
- de Boer, M. A., E. S. Jordanova, et al. (2007). "Circulating human papillomavirus type 16 specific T-cells are associated with HLA Class I expression on tumor cells, but not related to the amount of viral oncogene transcripts." *Int J Cancer* **121**(12): 2711-2715.
- de Villiers, E. M. (2013). "Cross-roads in the classification of papillomaviruses." *Virology* **445**(1-2): 2-10.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." *Virology* **324**(1): 17-27.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1257-1265.
- DeGregori, J. and D. G. Johnson (2006). "Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis." *Curr Mol Med* **6**(7): 739-748.

- Deligeoroglou, E., A. Giannouli, et al. (2013). "HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy." Infect Dis Obstet Gynecol **2013**: 540850.
- Denis, F., P. Garaud, et al. (2004). "Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma." J Clin Oncol **22**(1): 69-76.
- Deshpande, A., P. Sicinski, et al. (2005). "Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective." Oncogene **24**(17): 2909-2915.
- DiMaio, D. and D. Mattoon (2001). "Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins." Oncogene **20**(54): 7866-7873.
- Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(1): 11-22.
- Duray, A., S. Demoulin, et al. (2010). "Immune suppression in head and neck cancers: a review." Clin Dev Immunol **2010**: 701657.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes Dev **12**(15): 2245-2262.
- El-Mofty, S. K., M. Q. Zhang, et al. (2008). "Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary carcinoma." Head Neck Pathol **2**(3): 163-168.
- Fakhry, C., W. H. Westra, et al. (2008). "Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial." J Natl Cancer Inst **100**(4): 261-269.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol **4**(12): 1206-1212.
- Forastiere, A. A. and A. Trotti (1999). "Radiotherapy and concurrent chemotherapy: a strategy that improves locoregional control and survival in oropharyngeal cancer." J Natl Cancer Inst **91**(24): 2065-2066.
- Fu, J., Z. Zhang, et al. (2012). "Impairment of CD4(+) cytotoxic T cells predicts poor survival and high recurrence rates in patients with hepatocellular carcinoma." Hepatology.
- Gao, Q., S. J. Qiu, et al. (2007). "Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection." J Clin Oncol **25**(18): 2586-2593.
- Genden, E. M., I. M. Sambur, et al. (2013). "Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know." Eur Arch Otorhinolaryngol **270**(2): 405-416.
- Gillison, M. L., G. D'Souza, et al. (2008). "Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers." J Natl Cancer Inst **100**(6): 407-420.
- Gillison, M. L., W. M. Koch, et al. (2000). "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers." J Natl Cancer Inst **92**(9): 709-720.
- Goldenberg, D., S. Begum, et al. (2008). "Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon." Head Neck **30**(7): 898-903.
- Grandis, J. R., J. A. Pietenpol, et al. (2004). "Head and neck cancer: meeting summary and research opportunities." Cancer Res **64**(21): 8126-8129.
- Graziano, D. F. and O. J. Finn (2005). "Tumor antigens and tumor antigen discovery." Cancer Treat Res **123**: 89-111.
- Green, V. L., A. Michno, et al. (2013). "Increased prevalence of tumour infiltrating immune cells in oropharyngeal tumours in comparison to other subsites: relationship to peripheral immunity." Cancer Immunol Immunother **62**(5): 863-873.
- Greer, C. E., J. K. Lund, et al. (1991). "PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies." PCR Methods Appl **1**(1): 46-50.
- Gupta, A. K., J. H. Lee, et al. (2009). "Radiation response in two HPV-infected head-and-neck cancer cell lines in comparison to a non-HPV-infected cell line and relationship to signaling through AKT." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(3): 928-933.

- Hammarstedt, L., D. Lindquist, et al. (2006). "Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer." *Int J Cancer* **119**(11): 2620-2623.
- Hawiger, D., K. Inaba, et al. (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." *J Exp Med* **194**(6): 769-779.
- 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, M., S. Tribius, et al. (2012). "HPV DNA, E6\*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker?" *Cancer Lett* **323**(1): 88-96.
- 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.
- Hong, C. S., L. Muller, et al. (2014). "Isolation and Characterization of CD34+ Blast-Derived Exosomes in Acute Myeloid Leukemia." *PLoS One* **9**(8): e103310.
- Hořejší, V. and J. Bartůňková (2005). *Základy imunologie*. Praha, Triton.
- Hoskin, D. W., J. S. Mader, et al. (2008). "Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review)." *Int J Oncol* **32**(3): 527-535.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." *EMBO J* **10**(13): 4129-4135.
- Charles, J., L. Chaperot, et al. (2010). "Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: focus on their role in autoimmunity and cancer." *Eur J Dermatol* **20**(1): 16-23.
- Chaturvedi, A. K., E. A. Engels, et al. (2008). "Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States." *J Clin Oncol* **26**(4): 612-619.
- Chen, W., X. Wang, et al. (2011). "[Analysis of serum T-lymphocyte subsets and NK cell activity in patients with squamous cell carcinoma of pharynx and larynx]." *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* **25**(24): 1105-1107.
- Chen, Z. F., Q. Xu, et al. (2012). "CD4+CD25+Foxp3+ Treg and TGF-beta play important roles in pathogenesis of Uygur cervical carcinoma." *Eur J Gynaecol Oncol* **33**(5): 502-507.
- Chung, C. H. and M. L. Gillison (2009). "Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications." *Clin Cancer Res* **15**(22): 6758-6762.
- Irla, M., N. Kupfer, et al. (2010). "MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity." *J Exp Med* **207**(9): 1891-1905.
- Ishigami, S., S. Natsugoe, et al. (2000). "Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma." *Cancer* **88**(3): 577-583.
- Jones, D. L., R. M. Alani, et al. (1997). "The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2." *Genes Dev* **11**(16): 2101-2111.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." *J Exp Med* **192**(9): 1213-1222.
- Jordanova, E. S., A. Gorter, et al. (2008). "Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients?" *Clin Cancer Res* **14**(7): 2028-2035.
- Karagoz, B., O. Bilgi, et al. (2010). "CD8+CD28- cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients." *Med Oncol* **27**(1): 29-33.
- Kiessling, R., E. Klein, et al. (1975). "'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." *Eur J Immunol* **5**(2): 112-117.
- Klozar, J. and R. Tachezy (2014). "What are the implications of human papillomavirus status in oropharyngeal tumors for clinical practice?" *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **22**(2): 90-94.

- Klussmann, J. P., E. Gultekin, et al. (2003). "Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus." *Am J Pathol* **162**(3): 747-753.
- Koslabova, E., E. Hamsikova, et al. (2013). "Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors." *Int J Cancer* **133**(8): 1832-1839.
- Kronenberg, M. and A. Rudensky (2005). "Regulation of immunity by self-reactive T cells." *Nature* **435**(7042): 598-604.
- Kumar, B., K. G. Cordell, et al. (2007). "Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **69**(2 Suppl): S109-111.
- Kuss, I., A. D. Donnenberg, et al. (2003). "Effector CD8+CD45RO-CD27-T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Br J Cancer* **88**(2): 223-230.
- Ladanyi, A., B. Somlai, et al. (2004). "T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma." *Clin Cancer Res* **10**(2): 521-530.
- Ladoire, S., F. Martin, et al. (2011). "Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer." *Cancer Immunol Immunother* **60**(7): 909-918.
- Lamagna, C., M. Aurrand-Lions, et al. (2006). "Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis." *J Leukoc Biol* **80**(4): 705-713.
- Lanier, L. L., J. H. Phillips, et al. (1986). "Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function." *J Immunol* **137**(9): 2735-2739.
- Laoui, D., K. Movahedi, et al. (2011). "Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions." *Int J Dev Biol* **55**(7-9): 861-867.
- Lau, K. M., S. H. Cheng, et al. (2007). "Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients." *Br J Cancer* **96**(4): 617-622.
- Lee, S. H., T. Miyagi, et al. (2007). "Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare." *Trends Immunol* **28**(6): 252-259.
- Leek, R. D., C. E. Lewis, et al. (1996). "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma." *Cancer Res* **56**(20): 4625-4629.
- Lechner, M. S. and L. A. Laimins (1994). "Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins." *J Virol* **68**(7): 4262-4273.
- Lepique, A. P., K. R. Daghanli, et al. (2009). "HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses." *Clin Cancer Res* **15**(13): 4391-4400.
- Lewis, C. E. and J. W. Pollard (2006). "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." *Cancer Res* **66**(2): 605-612.
- Li, C., S. Shintani, et al. (2002). "Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* **9**(6): 1219-1223.
- Lindquist, D., M. Romanitan, et al. (2007). "Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7." *Mol Oncol* **1**(3): 350-355.
- Liss, C., M. J. Fekete, et al. (2002). "Retinoic acid modulates the ability of macrophages to participate in the induction of the angiogenic phenotype in head and neck squamous cell carcinoma." *Int J Cancer* **100**(3): 283-289.
- Liu, K. and M. C. Nussenzweig (2010). "Origin and development of dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 45-54.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." *J Exp Med* **203**(7): 1701-1711.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *J Immunol* **169**(5): 2756-2761.
- Loddenkemper, C., C. Hoffmann, et al. (2009). "Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer." *Cancer Sci* **100**(6): 1112-1117.



- Marcus, B., D. Arenberg, et al. (2004). "Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma." *Cancer* **101**(12): 2779-2787.
- Martin, F., S. Ladoire, et al. (2010). "Human FOXP3 and cancer." *Oncogene* **29**(29): 4121-4129.
- Maufort, J. P., A. Shai, et al. (2010). "A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis." *Cancer Res* **70**(7): 2924-2931.
- Mehanna, H., T. Beech, et al. (2013). "Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region." *Head Neck* **35**(5): 747-755.
- Mellin, H., S. Friesland, et al. (2000). "Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival." *Int J Cancer* **89**(3): 300-304.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 762-774.
- Mirghani, H., F. Amen, et al. (2014). "Oropharyngeal cancers: Relationship between epidermal growth factor receptor alterations and human papillomavirus status." *Eur J Cancer*.
- Molling, J. W., T. D. de Gruijl, et al. (2007). "CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia." *Int J Cancer* **121**(8): 1749-1755.
- Momand, J., G. P. Zambetti, et al. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." *Cell* **69**(7): 1237-1245.
- Monnier-Benoit, S., F. Mauny, et al. (2006). "Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix." *Gynecol Oncol* **102**(1): 22-31.
- Moody, C. A. and L. A. Laimins (2010). "Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 550-560.
- Muller, L., C. S. Hong, et al. (2014). "Isolation of biologically-active exosomes from human plasma." *J Immunol Methods*.
- 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.
- Nasman, A., M. Romanitan, et al. (2012). "Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer." *PLoS One* **7**(6): e38711.
- Nave, H., A. Gebert, et al. (2001). "Morphology and immunology of the human palatine tonsil." *Anat Embryol (Berl)* **204**(5): 367-373.
- 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*.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2008). "Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity." *Curr Opin Genet Dev* **18**(1): 11-18.
- Park, J. M., C. K. Jung, et al. (2010). "The use of an immunohistochemical diagnostic panel to determine the primary site of cervical lymph node metastases of occult squamous cell carcinoma." *Hum Pathol* **41**(3): 431-437.
- Park, K., K. J. Cho, et al. (2013). "Importance of FOXP3 in Prognosis and Its Relationship with p16 in Tonsillar Squamous Cell Carcinoma." *Anticancer Res* **33**(12): 5667-5673.
- Parkin, D. M. and F. Bray (2006). "Chapter 2: The burden of HPV-related cancers." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/11-25.
- Patel, D., S. M. Huang, et al. (1999). "The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300." *EMBO J* **18**(18): 5061-5072.
- Patel, S. and S. Chiplunkar (2009). "Host immune responses to cervical cancer." *Curr Opin Obstet Gynecol* **21**(1): 54-59.

- Perussia, B., G. Trinchieri, et al. (1984). "The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies." *J Immunol* **133**(1): 180-189.
- Pollard, J. W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease." *Nat Rev Immunol* **9**(4): 259-270.
- Qin, H., J. Luo, et al. (2012). "Combination of taxanes, cisplatin and fluorouracil as induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancer: a meta-analysis." *PLoS One* **7**(12): e51526.
- Randolph, D. A. and C. G. Fathman (2006). "Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential." *Annu Rev Med* **57**: 381-402.
- Reichert, T. E., H. Rabinowich, et al. (1998). "Mechanisms responsible for signaling and functional defects." *J Immunother* **21**(4): 295-306.
- Renoux, V. M., B. Bisig, et al. (2011). "Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion." *Eur J Immunol* **41**(11): 3240-3252.
- Ritta, M., M. De Andrea, et al. (2009). "Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression." *Head Neck* **31**(3): 318-327.
- Ronchetti, S., O. Zollo, et al. (2004). "GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations." *Eur J Immunol* **34**(3): 613-622.
- Rosso, D., M. P. Rigueiro, et al. (2012). "[Correlation of natural killer cells with the prognosis of gastric adenocarcinoma]." *Arq Bras Cir Dig* **25**(2): 114-117.
- Rotnaglova, E., R. Tachezy, et al. (2011). "HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers." *Int J Cancer* **129**(1): 101-110.
- Saito, T., I. Kuss, et al. (1999). "Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **5**(6): 1263-1273.
- Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." *Cell* **101**(5): 455-458.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." *Nat Immunol* **6**(4): 345-352.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2011). "Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995." *J Immunol* **186**(7): 3808-3821.
- Sakakura, K., K. Chikamatsu, et al. (2006). "Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer Immunol Immunother* **55**(2): 151-159.
- 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.
- Salazar, C. R., R. V. Smith, et al. (2014). "Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment." *Head Neck Pathol* **8**(1): 77-87.
- Sato, E., S. H. Olson, et al. (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18538-18543.
- Scott, M. E., Y. Ma, et al. (2009). "Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3." *Int J Cancer* **124**(6): 1379-1383.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, et al. (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." *J Exp Med* **203**(7): 1693-1700.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." *Immunity* **30**(5): 636-645.

- Shin, M. K., S. Balsitis, et al. (2009). "Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis." *Cancer Res* **69**(14): 5656-5663.
- Schaefer, C., G. G. Kim, et al. (2005). "Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer." *Br J Cancer* **92**(5): 913-920.
- Scheffner, M., B. A. Werness, et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-1136.
- Schneiders, F. L., R. C. de Bruin, et al. (2012). "Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up." *J Clin Oncol* **30**(5): 567-570.
- Schuler, P. J., Z. Saze, et al. (2014). "Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells." *Clin Exp Immunol* **177**(2): 531-543.
- Schwarz, E., U. K. Freese, et al. (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." *Nature* **314**(6006): 111-114.
- Smeets, S. J., A. T. Hesselink, et al. (2007). "A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen." *Int J Cancer* **121**(11): 2465-2472.
- Smith, E. M., J. M. Ritchie, et al. (2004). "Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers." *Int J Cancer* **108**(5): 766-772.
- Smyth, M. J., Y. Hayakawa, et al. (2002). "New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(11): 850-861.
- Spanos, W. C., P. Nowicki, et al. (2009). "Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **135**(11): 1137-1146.
- Srivastava, P. K. and L. J. Old (1988). "Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors." *Immunol Today* **9**(3): 78-83.
- Stanley, M., D. R. Lowy, et al. (2006). "Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/106-113.
- Steinbrink, K., K. Mahnke, et al. (2009). "Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance?" *Hum Immunol* **70**(5): 289-293.
- Stevaux, O. and N. J. Dyson (2002). "A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 684-691.
- Straetmans, J. M., N. Olthof, et al. (2009). "Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas." *Laryngoscope* **119**(10): 1951-1957.
- Straight, S. W., P. M. Hinkle, et al. (1993). "The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes." *J Virol* **67**(8): 4521-4532.
- Strauss, L., C. Bergmann, et al. (2007). "The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Clin Cancer Res* **13**(21): 6301-6311.
- Strauss, L., C. Bergmann, et al. (2007). "A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." *Clin Cancer Res* **13**(15 Pt 1): 4345-4354.
- Stubenrauch, F., H. B. Lim, et al. (1998). "Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31." *J Virol* **72**(2): 1071-1077.
- Suprynovicz, F. A., G. L. Disbrow, et al. (2008). "HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells." *Oncogene* **27**(8): 1071-1078.
- Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." *J Clin Invest* **117**(5): 1137-1146.
- Syrjanen, S. (2004). "HPV infections and tonsillar carcinoma." *J Clin Pathol* **57**(5): 449-455.

- Syrjanen, S. M. and K. J. Syrjanen (1999). "New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation." *Ann Med* **31**(3): 175-187.
- Tachezy, R. and M. Šmahel (2014). "Imunoterapie onemocnění vyvolaných lidskými papillomaviry." *Acta Medicinæ*(2): 10-13.
- Tai, X., M. Cowan, et al. (2005). "CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2." *Nat Immunol* **6**(2): 152-162.
- Textor, S., M. Durst, et al. (2008). "Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer." *Int J Cancer* **123**(10): 2343-2353.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-296.
- Tsung, K., J. P. Dolan, et al. (2002). "Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection." *Cancer Res* **62**(17): 5069-5075.
- Turek, L. P. (1994). "The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer." *Adv Virus Res* **44**: 305-356.
- Upile, N. S., R. J. Shaw, et al. (2014). "Squamous cell carcinoma of the head and neck outside the oropharynx is rarely human papillomavirus related." *Laryngoscope*.
- Valladeau, J. and S. Saeland (2005). "Cutaneous dendritic cells." *Semin Immunol* **17**(4): 273-283.
- van den Brule, A. J., R. Pol, et al. (2002). "GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes." *J Clin Microbiol* **40**(3): 779-787.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 523-532.
- Visser, J., H. W. Nijman, et al. (2007). "Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia." *Clin Exp Immunol* **150**(2): 199-209.
- Vivier, E., D. H. Raulet, et al. (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." *Science* **331**(6013): 44-49.
- Vizio, B., A. Novarino, et al. (2012). "Potential plasticity of T regulatory cells in pancreatic carcinoma in relation to disease progression and outcome." *Exp Ther Med* **4**(1): 70-78.
- Wansom, D., E. Light, et al. (2012). "Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16--associated oropharyngeal cancer." *Laryngoscope* **122**(1): 121-127.
- Wansom, D., E. Light, et al. (2010). "Correlation of cellular immunity with human papillomavirus 16 status and outcome in patients with advanced oropharyngeal cancer." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **136**(12): 1267-1273.
- Warnakulasuriya, S. (2009). "Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer." *Oral Oncol* **45**(4-5): 309-316.
- Whiteside, T. L. (2002). "Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences." *Semin Cancer Biol* **12**(1): 43-50.
- Whiteside, T. L. (2005). "Immunobiology of head and neck cancer." *Cancer Metastasis Rev* **24**(1): 95-105.
- Whiteside, T. L., L. H. Butterfield, et al. (2012). "A short course of neoadjuvant IRX-2 induces changes in peripheral blood lymphocyte subsets of patients with head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Immunol Immunother* **61**(6): 783-788.
- Wieczorek, G., A. Asemisen, et al. (2009). "Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue." *Cancer Res* **69**(2): 599-608.
- Wise-Draper, T. M. and S. I. Wells (2008). "Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets." *Front Biosci* **13**: 1003-1017.
- Worden, F. P., B. Kumar, et al. (2008). "Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number." *J Clin Oncol* **26**(19): 3138-3146.

- Wulff, S., R. Pries, et al. (2009). "Decreased levels of circulating regulatory NK cells in patients with head and neck cancer throughout all tumor stages." Anticancer Res **29**(8): 3053-3057.
- Yamazaki, S., K. Inaba, et al. (2006). "Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity." Immunol Rev **212**: 314-329.
- Yared, J. A. and K. H. Tkaczuk (2012). "Update on taxane development: new analogs and new formulations." Drug Des Devel Ther **6**: 371-384.
- Young, M. R. (2006). "Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault." Head Neck **28**(5): 462-470.
- Young, M. R., M. A. Wright, et al. (1996). "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer." Int J Cancer **67**(3): 333-338.
- Zeng, C., Y. Yao, et al. (2013). "Up-regulation of Foxp3 participates in progression of cervical cancer." Cancer Immunol Immunother **62**(3): 481-487.
- Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, et al. (1996). "Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Oncogene **13**(11): 2323-2330.
- Zitvogel, L., A. Tesniere, et al. (2008). "[Immunological aspects of anticancer chemotherapy]." Bull Acad Natl Med **192**(7): 1469-1487; discussion 1487-1469.
- Zivile, G., D. Janina, et al. (2013). "Prevalence of human papillomaviruses in patients with head and neck squamous cell carcinoma in Lithuania and Belarus." J Med Virol.

## 8. PŘÍLOHA

### 8.1 Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace

#### A) 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., Špišek 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**

#### B) Publikace bez IF

0

## 8.2 Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

### A) 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**

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**

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**

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**

## **B) 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 <http://www.casopisendoskopie.cz/pdfs/end/2012/01/04.pdf>

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**