

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Eliška Večeřová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Detekce cirkulujících biomarkerů u pacientů s HPV-pozitivními
nádory orofaryngu**

Bakalářská práce

Eliška Večeřová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Ondřej Bouška

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Eliška VEČEŘOVÁ
Osobní číslo: R21762
Studijní program: B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Detekce cirkulujících biomarkerů u pacientů s HPV-pozitivními nádory orofaryngu
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Součástí teoretické části bakalářské práce bude vypracování literární rešerše na téma asociace infekce lidským papilomavirem (HPV) s rozvojem nádorů hlavy a krku, zvláště pak nádorů orofaryngu. Teoretická část bude obsahovat podrobné seznámení s molekulární podstatou této skupiny nádorů, současnými možnostmi včasné detekce onemocnění a rizikovými a prognostickými faktory HPV-asociovaných i neasociovaných nádorů. Práce bude také zaměřena na možnosti sledování léčby pomocí biomarkerů a jejich potenciál pro stanovení prognózy a rizika recurence onemocnění. Praktická část bude zaměřena na retrospektivní stanovení HPV pozitivitu u skupiny pacientů s dříve diagnostikovaným orofaryngeálním karcinomem a genotypizace jednotlivých HPV typů ze vzorků nádorové tkáně. Dále bude testováno využití metody odběru tekutých biopsií (vzorky kloktání, stěry, venózní krev) pro sledování poléčebné dynamiky HPV infekce a hladiny plazmatické cirkulující HPV DNA (ctHPV DNA). Cílem práce je korelace dynamiky HPV infekce a hladiny ctHPV DNA s rizikem recurence onemocnění.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Taberna, M., Mena, M., Pavón, M. A., Alemany, L., Gillison, M. L., & Mesía, R. (2017). Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(10), 2386–2398. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx304>
2. Lechner, M., Liu, J., Masterson, L. et al. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol* 19, 306–327 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00603-7>
3. Haring, C. T., Dermody, S. M., Yalamanchi, P., Kang, S. Y., Old, M. O., Chad Brenner, J., Spector, M. E., & Rocco, J. W. (2022). The future of circulating tumor DNA as a biomarker in HPV related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 126, 105776. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.105776>
4. Kofler, B., Borena, W., Dudas, J., Innerhofer, V., Dejacó, D., Steinbichler, T. B., Widmann, G., Laer, D. V., & Riechelmann, H. (2020). Post-Treatment HPV Surface Brushings and Risk of Relapse in Oropharyngeal Carcinoma. *Cancers*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051069>
5. Cao, Y., Haring, C. T., Brummel, C., Bhambhani, C., Aryal, M., Lee, C., Heft Neal, M., Bhargale, A., Gu, W., Casper, K., Malloy, K., Sun, Y., Shuman, A., Prince, M. E., Spector, M. E., Chinn, S., Shah, J., Schonewolf, C., McHugh, J. B., Mills, R. E., ... Brenner, J. C. (2022). Early HPV ctDNA Kinetics and Imaging Biomarkers Predict Therapeutic Response in p16+ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 28(2), 350–359. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2338>

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Ondřej Bouška**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2024**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Eliška Večeřová

Název práce: Detekce cirkulujících biomarkerů u pacientů s HPV-pozitivními nádory orofaryngu

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Institut molekulární a translační medicíny, LF UPOL

Vedoucí práce: Mgr. Ondřej Bouška

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: Papilomavirus, HPV, nádory hlavy a krku, cirkulující nádorová DNA

Počet stran: 53

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

SOUHRN

Lidský papilomavirus (HPV) je DNA virus schopný infikovat kůži a sliznice a způsobovat různá benigní, ale i maligní onemocnění. Vysoce rizikové HPV typy mohou kromě rakoviny děložního čípku způsobovat i nádory orofaryngu. Incidence HPV-asociovaných nádorů orofaryngu se v posledních desetiletích zvyšuje. Cirkulující nádorová HPV DNA (ctHPV DNA), která je uvolňována z nádorových buněk do krevního oběhu ve formě různě dlouhých fragmentů DNA, představuje slibný způsob včasného zachytu HPV-asociovaných nádorů orofaryngu. Detekce ctHPV DNA však může být využita i pro predikci recidivy tohoto onemocnění.

Cílem této studie bylo testovat využití detekce cirkulující nádorové HPV DNA pro včasné odhalení recidivy při pravidelných kontrolách pacientů po dokončení léčby. Výsledky této studie dokázaly, že detekce ctHPV DNA je slibným biomarkerem včasného zachytu recidivy onemocnění. Tato metoda představuje slibný nástroj pro přesnější sledování pacientů po léčbě s HPV-asociovaným OPSCC a pro včasnou predikci případného rozvoje recidivy.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Eliška Večeřová

Title: Detection of circulating biomarkers in patients with HPV-positive oropharyngeal tumors

Type of thesis: Bachelor

Department: Institute of molecular and translational medicine, LF UPOL

Supervisor: Mgr. Ondřej Bouška

The year of presentation: 2024

Keywords: Papillomavirus, HPV, head and neck cancer, circulating tumor DNA

Number of pages: 53

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) is a DNA virus capable of infecting the skin and mucous membranes and causing various benign as well as malignant diseases. High risk HPV types can cause oropharyngeal tumors in addition to cervical cancer. The incidence of HPV-associated oropharyngeal tumors has been increasing in recent decades. Circulating tumor HPV DNA (ctHPV DNA), which is released from tumor cells into the bloodstream in the form of DNA fragments of various lengths, represents a promising method for the early detection of HPV-associated tumors of the oropharynx. However, the detection of ctHPV DNA can also be used to predict the recurrence of this disease.

The aim of this study was to test the use of detection of circulating tumor HPV DNA for the early detection of recurrence during regular check-ups of patients after completion of treatment. The results of this study proved that the detection of ctHPV DNA is a promising biomarker for the early detection of disease recurrence. This method represents a promising tool for more accurate follow-up of patients with HPV-associated OPSCC after treatment and for early prediction of the possible development of recurrence.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce
Mgr. Ondřeje Boušky a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování: Chtěla bych poděkovat všem, kteří obětovali svůj čas a pomáhali mi v laboratoři i doma s tímto nelehkým úkolem, především své rodině a svému vedoucímu Mgr. Ondřeji Bouškovi. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Zuzaně Horákové, Ph.D. za nábor pacientů a poskytnutí klinických dat, MUDr. Jaroslavu Michálkovi, Ph.D. za poskytnutí FFPE bločků a patologické výsledky. V neposlední řadě patří mé poděkování panu doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za možnost pracovat na své bakalářské práci v laboratořích Ústavu molekulární a translační medicíny LF UPOL.

Tato práce byla financována z projektu Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.



Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Papilomaviry	3
3.2	Genom papilomavirů	3
3.2.1	Strukturní proteiny	4
3.2.2	Regulační proteiny.....	5
3.3	Onkogeny	6
3.3.1	Onkogenní protein E5	6
3.3.2	Onkogenní protein E6	6
3.3.3	Onkogenní protein E7	7
3.4	Životní cyklus papilomavirů	8
3.4.1	Vstup HPV do buňky	8
3.4.2	Raná fáze replikačního cyklu	9
3.4.3	Pozdní fáze replikačního cyklu.....	10
3.5	Regulace genové exprese	10
3.6	Karcinogeneze vlivem HPV.....	11
3.7	HPV – Lidský papilomavirus.....	12
3.7.1	Nízce rizikové typy HPV	12
3.7.2	Vysoce rizikové typy HPV.....	13
3.7.3	Epidemiologie.....	13
3.7.4	Imunologie a očkování.....	14
3.8	Metody detekce HPV infekce	16
3.9	HPV-asociovaný karcinom orofaryngu.....	16
3.9.1	Anatomie OPSCC	17
3.9.2	Epidemiologie.....	18
3.9.3	Klinický obraz a diagnostika	22
3.9.4	Klasifikace TNM.....	22
3.9.5	Léčba a riziko recidivy	23
3.10	Cirkulující nádorová DNA	23
4	Materiál a metody	25
4.1	Biologický materiál	25
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	25
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	25

4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	25
4.4.1	Příprava plazmy pro izolaci ccfDNA	25
4.4.2	Purifikace cirkulující nukleové kyseliny z 2 ml plazmy	26
4.4.3	Izolace genomické DNA ze vzorků v parafínovém bločku	27
4.4.4	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	29
5	Výsledky	31
5.1.	Souhrnná charakteristika pacientů účastnících se studie	31
5.2	Věk pacientů v době diagnózy.....	32
5.3	Pohlaví pacientů	33
5.4	Charakteristika nádorů	34
5.5	HPV genotypizace v primární nádorové tkáni	36
5.6	Detekce cirkulující HPV DNA ve vzorcích plazmy	37
5.7	Detekce recidivy onemocnění	39
6	Diskuse.....	42
7	Závěr.....	45
8	Použitá literatura.....	46
9	Zdroje obrázků	53

Seznam symbolů a zkratek

HPV	Lidský papilomavirus, z angl. Human papillomavirus
OPSCC	Orofaryngeální dlaždicobuněčný karcinom, z angl. Oral pharyngeal squamous cell carcinoma
HNSCC	Dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku, z angl. Head and neck squamous cell carcinoma
FFPE	Formalínem fixovaný v parafinu vložený, z angl. Formalin-fixed paraffin-embedded
ctHPV DNA	Cirkulující nádorová HPV DNA, z angl. Circulating tumor HPV DNA
BPV	Bovinní papilomavirus, z angl. Bovine papillomaavirus
EcPV	Koní papilomavirus, z angl. Equine papillomavirus
CPV	Psí papilomavirus, z angl. Canine papillomavirus
FPV	Kočí papilomavirus, z angl. Feline papillomavirus
E	Časný region, kódující proteiny E, z angl. Early region
L	Pozdní region, kódující proteiny L, z angl. Late region
LCR	Dlouhá nekódující oblast
VLPs	Viru podobné částice, z angl. Virus-like particles
PML	Tělíska proteinu promyelocytové leukémie, z angl. Promyelocytic leukemia protein bodies
ori	Počátek replikace, z angl. Origin of replication
Brd4	Bromodomain-4
p53	tumor-supresorový protein p53
PDZ	Interkalační domény: PSD-95, Discs large, ZO-1
MAGUK	z angl. Membrane-associates guanylate kinase
DLG	z angl. Disk large
CDK	Cyklin-dependentní kináza
pRb	Retinoblastomový protein, z angl. Retinoblastoma protein
HSPG	Heparan sulfát proteoglykan
NCoR/SMRT	z angl. Nuclear receptor co-repressor/silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
PCNA	z angl. Proliferating cell nuclear antigen
MCM	z angl. Minichromosome maintenance protein complex
BRCA	z angl. Breast cancer susceptibility gene
LR-HPV	Nízce rizikové typy HPV, z angl. Low risk human papillomavirus

HR-HPV	Vysoce rizikové typy HPV, z angl. High risk human papillomavirus
HC2	z angl. Hybrid capture 2
rtPCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase, z angl. real-time polymerase chain reaction
PCR-EIA	z angl. Polymerase chain reaction – enzyme immunoassay
PET/CT	Pozitronová emisní tomografie – počítačová tomografie, z angl. Positron emission tomography – computed tomography
MRI	Magnetická rezonanční tomografie, z angl. Magnetic resonance imaging
TORS	Transorální robotická chirurgie, z angl. Transoral robotic surgery
TNM klasifikace	z angl. Tumor, node, metastasis classification
dNTPs	Deoxyribonukleotid trifosfáty, z angl. Deoxyribonucleotide triphosphates
MgCl ₂	Chlorid hořečnatý
H ₂ O	Voda
RFU	Relativní fluorescenční jednotka, z angl. relative fluorescence unit
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

Seznam Tabulek

Tabulka 1 - Objemy pufru ACL a nosičové RNA (rozpuštěné v pufru AVE) potřebné pro zpracování 2 ml vzorku plazmy.....	26
Tabulka 2 - Příprava směsi pro PCR reakci.....	30
Tabulka 3 - Souhrnná charakteristika pacientů účastníci se studie.....	32
Tabulka 4 - Věk pacientů v době diagnózy a jejich HPV status.....	33
Tabulka 5 - Pohlaví pacientů s OPSCC a jejich HPV status	33
Tabulka 6 - Souhrnná charakteristika nádorů.....	35
Tabulka 7 - Klasifikace OPSCC nádorů podle klinického stádia (* - u HPV-neasociovaných OPSCC rozlišujeme stádium 4 do tří skupin – 4A, 4b, 4c).....	35
Tabulka 8 - Detekce cirkulující nádorové HPV16 DNA u pacientů ve fázi sledování po léčbě, charakteristika primárního nádoru (HPV typ a HPV status) a výskyt recidivujícího onemocnění.	37
Tabulka 9 - Detekce cirkulující nádorové HPV16 DNA u pacientů s recidivou ve fázi sledování po léčbě, charakteristika primárního nádoru (HPV typ a HPV status) a výskyt recidivujícího onemocnění.	41

Seznam Grafů

Graf 1 - Incidence a mortalita orofaryngeálního karcinomu na území České republiky. Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro OPSCC.....	21
Graf 2 - Incidence u různých lokalizací OPSCC v České republice. Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet případů na 100 000 osob).....	21
Graf 3 - Věk pacientů v době diagnózy vyjádřen ve sloupcovém grafu	33
Graf 4 - Pohlaví pacientů s OPSCC a jejich HPV status vyjádřené ve sloupcovém grafu	34
Graf 5 - Charakteristika nádorů, rozdělená podle HPV statusu a TNM klasifikace: A – Rozsah primárního nádoru (T) u pacientů s OPSCC, B – přítomnost vzdálených metastáz (M), C – metastazování v regionálních mízních uzlinách (N), D – klinické stadium maligního.....	36

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Rozložení genů v genomu HPV 16.....	4
Obrázek 2 - Grafické znázornění vstupu virových částic papilomaviru do bazálních buněk epitelu.....	9
Obrázek 3 – Mapa světa, znázorňující postup v zavádění očkovacích programů proti HPV. Zelenou barvou jsou znázorněny země, které mají zavedený očkovací program proti HPV v celé zemi. Červeně vyznačené státy nemají rutinně zavedeno očkování proti HPV. Ve žlutě vyznačených zemích je očkovací program jen v určitých regionech. V zemích, které jsou vyznačeny šedou barvou nejsou k dispozici žádné data o očkovacím programu.	15
Obrázek 4 - Schématické znázornění epitelu krypty mandlí s narušenou bazální membránou a narušeným epitelem umožňující vystavení bazální buněčné vrstvy virovým částicím. [51]	18
Obrázek 5 - Uvolňování ctDNA do krevního oběhu [71]	24
Obrázek 6 - Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR).....	29
Obrázek 7 - Snímky z PET/CT vyšetření koronálního a axiálního řezu pacienta č. 41 s primárním HPV-pozitivním OPSCC nacházejícím se v oblasti mandlí/kořene jazyka (modré šipky) a s oboustrannými metastázemi v lymfatických uzlinách (žluté šipky).	39
Obrázek 8 - Snímky z PET/CT vyšetření koronálního a axiálního řezu pacienta č. 41 po ukončení léčby s kompletní remisí. Snímek byl pořízen dva roky od dokončení terapie)	40
Obrázek 9 - Snímky z PET/CT vyšetření koronálního a axiálního řezu pacienta č. 41 s potvrzenou lokoregionální recidivou BOT OPSCC (modré šipky) v čase druhé návštěvy, s detekovatelnou ctHPV16 DNA. Snímky byly pořízeny tři roky od CRT administrace.	41

1 Úvod

Lidský papilomavirus (HPV) je sexuálně přenosný DNA vir. HPV je přenášen genitálním a orogenitálním kontaktem a je považován za nejčastější sexuálně přenosnou infekci. Téměř každý sexuálně aktivní jedinec se alespoň jedenkrát za život nakazí tímto virem, avšak naprostá většina případů je asymptomatických. HPV můžeme rozdělit do dvou skupin, nízké rizikové typy, které mohou způsobovat benigní léze a vysoce rizikové typy, které mohou způsobovat určité typy rakoviny, například rakovinu děložního čípku či rakovinu orofaryngu.

Nádory orofaryngu v poslední době představují významný problém, a to především kvůli rostoucí incidenci tohoto onemocnění. Dříve byla za hlavní příčinu těchto nádorů považována konzumace alkoholu a kouření. V současné době je však většina nádorů orofaryngu spojena s jiným rizikovým faktorem, kterým je perzistentní infekce vysoce rizikovými HPV typy. Vysoká incidence HPV-asociovaných nádorů orofaryngu je převážně problémem rozvinutých zemí a častěji toto onemocnění postihuje muže ve věku od 45 do 70 let. Pacienti s HPV-asociovanými nádory orofaryngu mají vyšší šance na přežití a lépe odpovídají na onkologickou léčbu, než pacienti s HPV-neasociovanými nádory orofaryngu.

Posledním trendem ve výzkumu je využití cirkulujících biomarkerů v tekutých biopsiích, které mohou být využívány pro včasnou diagnostiku a stanovení prognózy. Tyto biomarkery jsou detekovatelné v krvi nebo v jiných tělních tekutinách. Diagnostika pomocí cirkulujících biomarkerů v tekutých biopsiích je minimálně invazivní, opakovatelná a spolehlivá metoda. Monitorováním přítomnosti těchto biomarkerů v průběhu léčby pacienta s nádorovým onemocněním lze sledovat efektivitu terapie, detekovat rezistenci na léčbu nebo progresi v léčbě onemocnění. V neposlední řadě je lze využít pro predikci recidivy nádorového onemocnění.

2 Cíle práce

Cílem této práce je v teoretické části seznámení s problematikou infekce lidským papilomavirem, s molekulární podstatou orofaryngeálních nádorů (OPSCC) asociovaných s HPV infekcí, popsat současné možnosti včasné detekce onemocnění a seznámení s rizikovými a prognostickými faktory HPV-asociovaných i neasociovaných OPSCC. Práce je také zaměřena na možnosti sledování léčby pomocí biomarkerů a jejich potenciál pro stanovení prognózy a rizika rekurence onemocnění.

Praktická část této práce bude zaměřena na retrospektivní stanovení HPV positivity u skupiny pacientů s dříve diagnostikovaným OPSCC. U HPV-asociovaných OPSCC bude současně provedena genotypizace jednotlivých HPV typů ze vzorků primární nádorové tkáně v FFPE bločcích. Dále bude testováno využití metody odběru tekutých biopsií (venózní krev) pro sledování přítomnosti cirkulující nádorové HPV DNA (ctHPV DNA) v plazmě pacientů po ukončení onkologické léčby. Cílem této práce tedy je – stanovit podíl HPV-asociovaných OPSCC, zjistit současnou distribuci různých HPV genotypů v HPV-asociovaných OPSCC a testovat využití monitorování ctHPV DNA pro rychlejší odhalení recidivy HPV-asociovaných OPSCC.

3 Literární přehled

3.1 Papilomaviry

Papilomaviry jsou DNA viry. Tato skupina je velmi rozmanitá a pravděpodobně se vyskytuje u většiny savců a ptáků. Tyto viry jsou většinou známé pro svou souvislost s rozvojem bradavic a jejich roli při rozvoji určitých typů rakoviny, zejména tedy rakoviny děložního čípku u lidí.

Papilomaviry jsou přizpůsobeny k replikaci u jednoho živočišného druhu. Existuje jen velmi málo důkazů o mezidruhovém přenosu. Papilomaviry mají velké množství hostitelů ve zvířecí říši od velkých savců (například primáti, koně, jeleni, psi, kočky, ...), přes malé savce (jako jsou například křečci syřští, krysa africká či myš obecná), až po ptáky.

Například existují bovinní papilomaviry (BPV), které infikují skot a jsou spojovány s vývojem nádorů na kůži a sliznicích. Equine papilomaviry (EcPV) napadají koně a způsobují bradavice a kožní léze. Dále se u psů vyskytují canine papilomaviry (CPV) a u koček feline papilomaviry (FPV). Papilomaviry jsou široká skupina virů a existuje mnoho různých typů infikujících zvířata. [1]

3.2 Genom papilomavirů

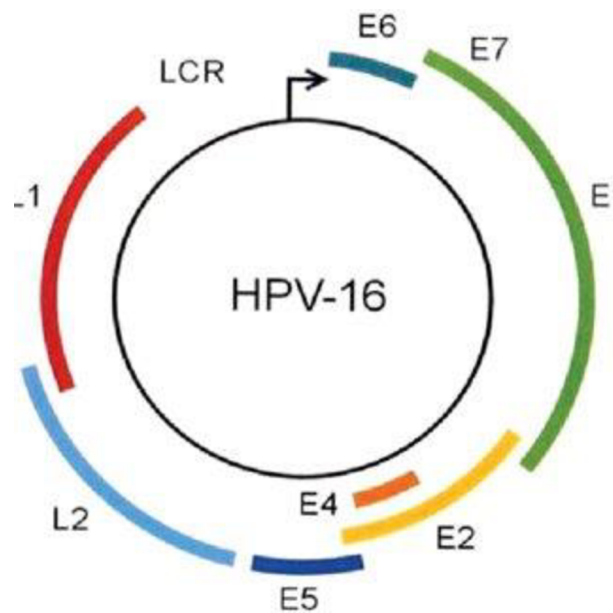
Papilomaviry mají kruhovou dvouřetězovou DNA o velikosti blízké 8 kb. Genom papilomavirů je organizován do tří oblastí, konkrétně je to raná oblast (E), pozdní oblast (L) a dlouhá kontrolní nekódující oblast (LCR). [2]

Raná oblast genomu zabírá více než 50 % genomu viru. Obsahuje geny, které jsou důležité k replikaci viru a následné kontrole cyklu replikace viru v hostitelských buňkách. Kóduje šest otevřených čtecích rámců (E1, E2, E4, E5, E6 a E7), které jsou překládány v proteiny. Proteiny E1 a E2 se podílejí na replikaci virové DNA a transkripční regulaci. Není zatím známo, že by protein E3 exprimoval nějaký protein. Proteiny E5, E6 a E7 jsou onkogeny, které mohou narušit regulaci hostitelských buněk a přispět k onkogenezi. Je nutné si však uvědomit, že ne všechny papilomaviry jsou patogenní nebo spojené s rakovinou. Mnoho papilomavirů je neškodných a mohou způsobovat benigní výrůstky, například bradavice.[2]

Pozdní oblast genomu obsahuje geny, které kódují strukturální kapsidové proteiny. Tato oblast pokrývá 40 % genomu viru. V této oblasti jsou kódovány strukturální proteiny, L1 a L2, které tvoří kapsidu. Kapsida je vnější obal viru a slouží k ochraně virového genomu. [3], [4]

Dlouhá kontrolní nekódující oblast je segment o velikosti přibližně 850 bp, což je 10 % genomu papilomaviru. Tato oblast nekóduje žádné proteiny, ale vyskytuje se zde počátek replikace a vazebná

místa pro transkripční faktory, která jsou důležitá při regulaci transkripce iniciované polymerázou II (viz obrázek 1).[2]



Obrázek 1 – Rozložení genů v genomu HPV 16

3.2.1 Strukturní proteiny

Protein L1 je hlavním strukturálním proteinem papilomavirů a tvoří kapsid virionu. Chrání a uchovává genetický materiál. L1 protein se samovolně sestavuje do pentamerických kapsomerů. Kapsomery poté vytváří ikosahedrální kapsidu, která se stabilizuje pomocí disulfidických vazeb. Je schopen spontánně vytvářet částice podobné virům, které se následně stávají silnými imunogeny a tvoří základ pro vakcíny proti lidským papilomavirům. Protein L1 je schopen se uchytit na povrchu hostitelských buněk, což následně umožňuje viru vstoupit do buňky a spustit infekci. Tento protein je klíčový pro vytvoření stabilního virionu. [4], [5]

Protein L1 je schopen se asociovat do struktur, které napodobují povrch přirozených papilomavirů. Při tomto procesu se vytváří virus-like particles (VLPs). Při vytváření virionu je důležitá flexibilita proteinu L1, díky které je umožněn selektivní vstup virového genomu do vnitřního prostoru virionu. Flexibilita proteinu L1 je tedy klíčová pro sbalení virálního genomu do virionu. Při procesu zrání virionu přechází virion z nestabilního do stabilního stavu, a to pomocí vytváření disulfidických vazeb mezi sousedními molekulami L1.

L1 proteiny se zapojují také do procesu vstupu virionu do hostitelské buňky a následného uvolnění virálního genomu uvnitř buňky. Tento proces začíná interakcí proteinu L1 s molekulami heparan sulfátu na povrchu buňky. Po této interakci nastává expozice N-terminální části proteinu L2, který je následně štěpen buněčnou proteázou furinem. Po štěpení L2 proteinu k dalším změnám konformace virionu a vazbě na sekundární receptory na povrchu hostitelské buňky pravděpodobně pomocí L1 proteinů. Proces endocytózy virionu do buňky není v současnosti plně objasněn, nicméně

jde pravděpodobně o proces nejvíce připomínající pinocytózu. Po interakci L1 proteinu s extracelulárními receptory a transportu virionu do buňky dochází v endozomu za nízkého pH k rozpadu kapsidy a k degradaci L1 proteinu. Po rozbalení kapsidy zůstává velmi malé množství L1 proteinu. L2 protein interaguje s virovou DNA a tím se tvoří L2/DNA komplex. Tento komplex je následně transportován do Golgiho aparátu a následně do jádra buňky. V jádře je tento komplex naveden na PML tělíska, což jsou místa, kde probíhá transkripce a translace. [4][6]

Protein L2 je minoritní kapsidový protein. Na C-terminálním konci proteinu L2 se nachází vazebná místa, která se vážou na protein L1 a pravděpodobně usnadňují jeho inkorporaci do virionů. Protein L2 má několik klíčových funkcí. Má schopnost se vázat na virální DNA a pravděpodobně hraje roli při zapouzdření virálního genomu do nově formovaných virionů. Dále je schopen organizovat ostatní strukturální složky virionu, jako jsou proteiny L1 a E2. Existuje hypotéza, že protein L2 může hrát roli při regulaci stability virionů, a to konkrétně pomocí cysteinových zbytků v proteinu. Mutace těchto cysteinových zbytků mohou ovlivnit infekční schopnost virionů. Protein L2 interaguje s hostitelskými buňkami během procesu infekce. Nejdůležitější role tohoto proteinu je však při vstupu papilomavirů do hostitelských buněk. [3]

3.2.2 Regulační proteiny

Regulační protein E1, také zvaný jako E1 helikáza, hraje důležitou roli v procesu replikace virální DNA a amplifikaci virální DNA v jádře buňky. E1 protein iniciuje replikaci virální DNA. E1 helikáza se po vstupu do hostitelské buňky naváže na místo *ori* (= *origin of replication*) a začne rozplétat dvouvláknovou strukturu DNA. Vzhledem k roli proteinu E1 při replikaci viru byly některé oblasti tohoto proteinu zkoumány jako potenciální cíle pro léčbu infekcí papilomaviry. Inhibitory E1 mohou blokovat replikaci viru a potenciálně omezit jeho schopnost se replikovat a způsobovat infekce, které mohou v krajních případech vést k rozvoji maligního onemocnění. [7]

E2 regulační protein má funkci transkripčního regulátoru, což znamená, že tento protein ovlivňuje, kdy a jakým způsobem jsou virální geny transkribovány v hostitelské buňce. Protein E2 je tedy schopen potlačit a následně aktivovat transkripci genů. Tento protein také usnadňuje vazbu E1 proteinu na místo počátku replikace (místo *ori*). Tento protein hraje důležitou roli i v procesu integrace DNA papilomavirů tím, že pomáhá integrovat virální genom do hostitelského genomu. K integraci je využit i protein známý jako bromodomain-4 (Brd4). [8]

Proteiny E4 mají u většiny typů HPV patrné významné strukturální podobnosti, jejich primární aminokyselinové sekvence se však významně liší, stejně jako byly popsány drobné rozdíly v úloze E4 proteinů u odlišných HPV typů. Ačkoliv se protein nachází v rané fázi virového genomu, primárně se exprimuje až během pozdní fáze infekce, až při počátku amplifikace genomu. Schopnost proteinu E4 narušovat buněčnou síť může usnadnit uvolňování či přenos viru. U několika typů HPV protein E4

inhibuje buněčnou proliferaci v G2 fázi buněčného cyklu. Tyto proteiny se dále účastní amplifikace genomu a skládání viru. Protein E4 může sloužit jako specifický HPV-biomarker pro detekci aktivní HPV infekce v lézích. [9]

3.3 Onkogeny

3.3.1 Onkogenní protein E5

Proteiny E5 jsou krátké transmembránové proteiny, které jsou kódovány mnoha zvířecími i lidskými papilomaviry. Gen E5 se nachází na 3' konci rané oblasti virového genomu. Tyto proteiny mají velikost přibližně 40 až 85 aminokyselin. Protein E5 je bohatý na hydrofobní aminokyseliny. Vzhledem k jejich malé velikosti a převážně hydrofobní povaze však proteiny E5 postrádají velké rozpustné, globulární domény, které obvykle zprostředkovávají specifické protein-proteinové interakce.

Přestože má HPV E5 slabou transformační aktivitu *in vitro*, může hrát důležitou roli v karcinogenezi, a to zejména u vysokorizikových typů HPV, což naznačuje, že protein E5 mohou přispívat k rozvoji malignit. E5 proteiny zesilují transformační aktivitu E6 a E7 proteinů, čímž přispívají k maligní aktivaci proliferace epitelových buněk. E5 proteiny mají samy o sobě slabou transformační aktivitu, přičemž některé HPV typy E5 protein ani neexprimují, nebo je gen pro E5 proteiny v procesu integrace virové DNA do hostitelského genomu štěpen. [10]

3.3.2 Onkogenní protein E6

Proteiny E6 společně s proteiny E5 a E7 stimulují buněčnou proliferaci a jsou to onkogeny. Tyto proteiny interagují s buněčnými proteiny prostřednictvím motivů LXXLL. [11] Ovlivňují různé buněčné procesy, včetně degradace proteinů a transkripční regulace. Hlavní funkce tohoto proteinu je zprostředkování degradace p53, což je hlavní tumor supresorový protein.

Onkogenní protein E6 je schopen vázat množství intracelulární cíle, které mají ve své sekvenci exprimovaný kyselý LXXLL peptid. Pomocí této vazby bylo možné identifikovat buněčnou ubiquitin protein ligázu E6AP (E6 asociovaný protein), který se váže do komplexu s E6 proteiny vysoce rizikových HPV a stabilizuje ho. Komplex E6-E6AP vyhledává a váže protein p53, který následně degraduje prostřednictvím ubiquitinace. Degradace proteinu p53 má přímý vliv na rozvoj maligních nádorových onemocnění. V nepřítomnosti HPV v hostitelské buňce je p53 regulován ubiquitin ligázou Mdm2. V HPV asociovaných buňkách je ubiquitin ligáza Mdm2 neaktivní a protein p53 je regulován HPV E6-E6AP. Tento proces způsobuje inhibici transkripční aktivity p53 a neschopnost apoptózy indukované tímto proteinem. Hostitelská buňka tak není schopna reagovat např. na poškození DNA v průběhu buněčného cyklu. E6AP dále slouží jako koaktivátor pro jaderné receptory a interaguje s dalšími ubiquitinovými ligázami. [11]

Bylo také prokázáno, že protein E6 je schopen cílit i na jiné buněčné proteiny a tím následně ovlivňuje několik metabolických drah v hostitelské buňce. Kromě proteinu p53 komplex E6-E6AP cílí i na další proteiny, jako jsou podjednotky proteasomu a P300/CBP. [12] Jeden z dalších cílů je protein NFX1-91. Tento protein za normálních okolností potlačuje produkci telomerázy, což je protein, který umožňuje buňkám se neomezeně dělit. Protein E6 degraduje protein NFX1-91, tím se zvýší hladina telomerázy v buňce a následně je inaktivován mechanismus udržující růst buněk pod kontrolou. [13]

Protein E6 ve své C-terminální struktuře obsahuje PDZ-vazebný motiv (PBM; z angl. *PDZ domain Binding Motif*), jenž je schopen se vázat na PDZ domény jiných proteinů a degradovat je pomocí E6AP. Tyto proteiny jsou zapojeny do signalizace a polarizace buněk. PDZ domény jsou malé oblasti proteinů schopné vázat se na peptidové ligandy na cílových proteinech. Nejčastěji se vyskytují v buněčných faktorech, které fungují při přenosu signálu. E6 je schopen se vázat na PDZ domény vyskytující se např. na proteinech rodiny MAGUK (z angl. *Membrane-Associated Guanylate Kinase Family*), která zahrnuje proteiny Dlg, MAGI-1, MAGI-2 a MAGI-3. Navázání proteinu E6 na PDZ domény DLG (z angl. *disk large homolog*) proteinu způsobuje narušení jeho supresorové funkce. MAGI1-3 proteiny mají obvykle strukturní funkci, ale zapojují se i při signalizaci. Po navázání proteinu E6 dochází k narušení jejich tvaru a tím je zabráněno jejich signalizační funkci. [14]

3.3.3 Onkogenní protein E7

Protein E7 má 98 aminokyselin a na C-konci má doménu vázající zinek. Tento protein obsahuje tři konzervované domény, CD1, CD2 a CD3. Většina charakteristických funkcí pro protein E7 je mapována v oblasti CD2 a CD3. CD1 doména je rozhodující pro schopnost E7 indukovat progresi S fáze a buněčnou transformaci. [15]

Primární funkce proteinu E7 je inaktivace členů rodiny nádorových supresorových proteinů pRb. Protein pRb hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, řídí fázový přechod mezi G1 a S fází. Za normálních podmínek je pRb v časně G1 fázi nefosforylován a poté je progresivně fosforylován směrem k S fázi. Nefosforylovaný pRb interaguje s transkripčními faktory E2F. Faktory E2F se podílejí na transkripční regulaci genů zapojených do syntézy DNA. V HPV-asociované buňce reaguje E7 s nefosforylovaným pRb a degraduje ho prostřednictvím ubikvitinové proteazomové dráhy. Narušením komplexu pRb-E2F se uvolní volný E2F, což vede k transkripci indukované E2F, která vede k upregulaci CDK2 a cyklinů A a E. Tato aktivita proteinu E7 je považována za kritickou pro řízení progresu buněčného cyklu v diferencujícím se epitelu, čímž poskytuje prostředí vhodné pro replikaci DNA. [16][17]

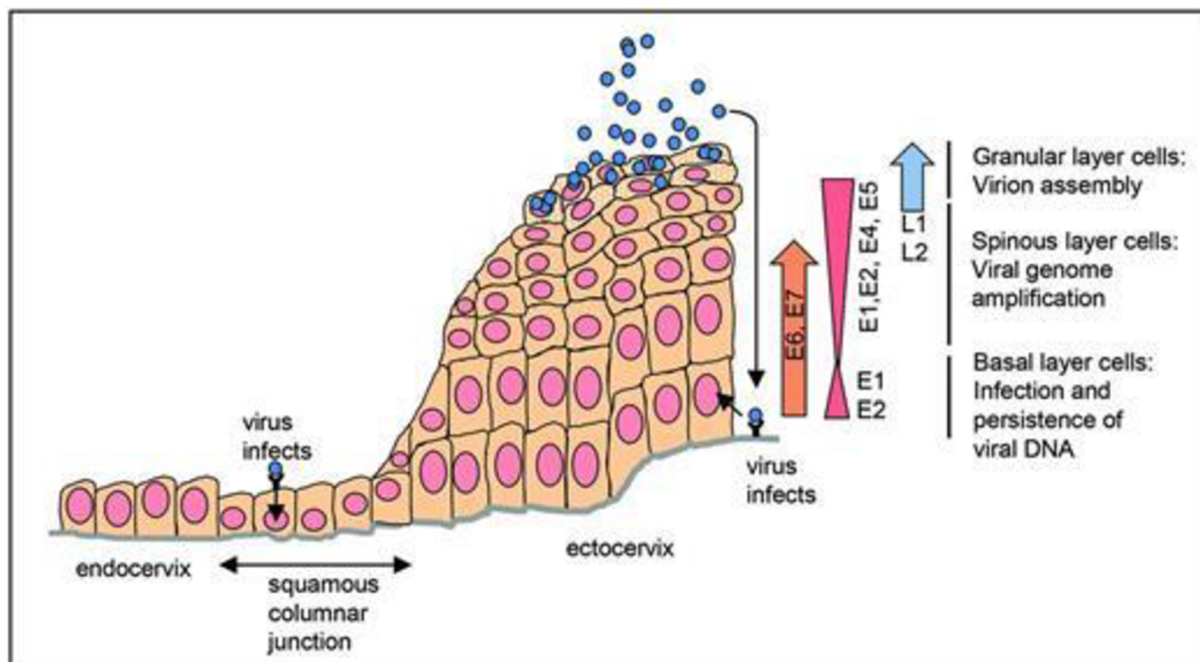
Mimo interakci s pRb proteinem se protein E7 váže také na další členy pRb proteinové rodiny – p107 a p130. Tyto dva proteiny jsou důležité pro regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. Negativně regulují přechody z G0 fáze a G1 fáze a do S fáze buněčného cyklu. [17] Nedávné studie navíc ukázaly, že E7 váže a inaktivuje E2F6 protein, což vede ke změnám v epigenetickém profilu spojeném s umlčováním genů. [18]

3.4 Životní cyklus papilomavirů

Replikační cyklus papilomavirů je spojen s epiteliálními buňkami a epiteliální diferenciací. HPV infikuje bazální epiteliální buňky s vysokou mitotickou aktivitou. Po proniknutí do buňky jsou papilomaviry následně schopny dokončit svůj životní cyklus v epitelové tkáni, ve které produkují infekční částice, a ty jsou následně vylučovány z epitelového povrchu.

3.4.1 Vstup HPV do buňky

Infekce započíná v okamžiku, kdy částice viru proniknou do bazální vrstvy epitelu. V této vrstvě se nacházejí buňky s vysokou mitotickou aktivitou. Vysoká mitotická aktivita je dána neustálým dělením buněk, čímž dochází k zajištění obnovy epidermální vrstvy. Virové částice pronikají do epitelové vrstvy pomocí poškození této vrstvy (mikroabrazí), v místě vlasového folikulu, nebo v místě, kde se setkávají sloupcové a vrstvené epitelové buňky (takové místo najdeme například v děložním hrdle nebo v řitním otvoru, tzv. přechodová zóna) (viz obrázek 2). V kapsidě viru se vyskytuje protein L1, který je schopen se vázat na buněčné receptory, které se vyskytují na bazální membráně. [4] Za primární receptory pro počáteční navázání viru se považují HSPG, což jsou heparin sulfátové proteoglykany. [19] Během interakce papilomaviru s HSPG dojde ke konformační změně, kdy N-konec složky L2 proteinu je přemístěn na povrch virionu. Následně proběhne štěpení N-konce L2 proteinu pomocí furinu a PC5/6. [20] Po tomto specifickém štěpení je virus schopen se navázat na sekundární receptory, které se nachází na plazmatické membráně hostitelské buňky.



Obrázek 2 - Grafické znázornění vstupu virových částic papilomaviru do bazálních buněk epitelu [27]

Papilomavirus po interakci s receptory vstupuje do buněk formou endocytózy. Následně probíhá transport virálního genomu do jádra pomocí tubulinu. Virální genom vstupuje do jádra buď během rozpadu jaderné membrány při mitóze anebo prostupuje jadernými póry. V jádře hostitelské buňky dojde k rozložení kapsidy a protein L2 s virálním genomem se spojují s jadernými tělisky PML (z angl. *promyelocytic leukemia protein*). [21] Poté následuje virální transkripce.

3.4.2 Raná fáze replikačního cyklu

Primární cíl viru, který doputoval do jádra hostitelské buňky je časná transkripce. Po jaderné infekci je možné jako první identifikovat proteiny E1 a E2, které slouží k počáteční replikaci virálního genomu.

Transkribovaný protein E2 tvoří homodimer, po vazbě s DNA a proteiny, který je schopen se vázat na čtyři palindromická místa v LCR. Protein E2 se následně váže na protein E1 a tím začíná replikaci virálního genomu. První fázi replikace ovlivňuje protein E8 a E2 a buněčný komplex NCoR/SMRT. [22] Replikace kruhové virové DNA probíhá současně s replikací DNA hostitelské buňky. Po replikaci je virová DNA pomocí vázání na chromozomy rovnoměrně rozdělena do dceřiných buněk. Virová DNA se na chromozomy váže pomocí E2 proteinu, který je vázán na virovém genomu v místě LCR a na chromozomy se váže pomocí vazebných proteinů. [8] Nejznámějším vazebným proteinem pro HPV je Brd4, ale mohou se zapojovat i jiné vazebné proteiny, například MKIp2, ChIR1 či TopBP1.[23]

Virové proteiny se během replikace exprimují v nízkých hladinách, a to z důvodu zabránění imunitní odpovědi organismu. Protein E2 je schopen potlačovat funkci promotéru P97.

Při této fázi hrají důležitou roli onkoproteiny E6 a E7, které svými účinky stimulují opětovný vstup buňky do buněčného cyklu. Exprese těchto proteinů je nezbytná pro replikaci HPV. Protein E6 mimo jiné slouží k udržení epizomálního genomu. Protein E7 aktivuje kontrolní bod přechodu z G1 do S fáze v keratinocytech. Za normálních okolností by se buňky dále nereplikovaly. Protein E7 interaguje s regulátorem buněčného cyklu pRb nebo s proteinem p107 či p130. [24] Při této reakci se uvolňuje transkripční faktor E2F. Transkripční faktor E2F podporuje replikaci DNA tak, že transaktivuje geny cyklin A a cyklin E. [25] Jakmile se dosáhne určité hladiny obsahu p21 a p27 buňka přechází do S-fáze buněčného cyklu, při které dochází k replikaci DNA. Pokud je v buňce přítomna příliš vysoká hladina p21 a p27, buněčný cyklus se zastaví před S fází. Ve fázi produktivní fáze infekce může být pro diagnostické účely využito detekce proteinů cyklin E, PCNA, Ki67, p16, MCM či survinin. [25]

Protein E6 napomáhá ve funkci proteinu E7, asociuje s proteinem p53 a degraduje ho pomocí ubikvitinace.[11] Protein E6 může narušit funkci proteinu p53 vázáním na histon-acyltransferázu CBP/p300. [26] Může taky způsobit konformační změnu p53, a tím inhibovat jeho transkripční vlastnosti. Stejně jako protein E7, i protein E6 inhibuje proces spuštění apoptózy.

Jednotlivé typy papilomavirů se liší nastartováním amplifikace virového genomu, u žádného HPV typu však nedochází k amplifikaci genomu přímo v bazální vrstvě. K amplifikaci dochází v buňkách vyšších vrstev epitelu, které diferenciují a jsou tlačeny směrem k povrchu epitelu. [27]

3.4.3 Pozdní fáze replikačního cyklu

V této fázi probíhá vegetativní replikace DNA a tvorba virionů. Prvně dochází ke zvýšení exprese proteinů E1, E2, E4 a E5. Pozdní fáze replikace probíhá pravděpodobně podle mechanismu otáčivé kružnice. V této fázi je u vysoce rizikových typů HPV nejhojnějším regulačním faktorem protein E4, který se produkuje dříve než kapsidové proteiny L1 a L2. [28]

Po úspěšné amplifikaci nastává sestavení a uvolnění nových virionů ve svrchních vrstvách epitelu. Kapsidové proteiny se exprimují až během pozdní fáze replikačního cyklu společně s E4 proteinem, který se také podílí na sestavování virionu. Prvně je exprimován protein L2 a až poté majoritní kapsidový protein L1. Proteiny L1 a L2 enkapsulují amplifikovaný HPV genom. Jakmile se buňka přesune do svrchních epiteliálních vrstev, dochází k uvolnění viru, čemuž napomáhá protein E4 interakcí s cytokeratiny. [29]

3.5 Regulace genové exprese

Regulace genové exprese u papilomavirů je řízena různými mechanismy na několika buněčných úrovních. Mezi hlavní regulační prvky se řadí např. regulace transkripce vazbou buněčných a virových transkripčních faktorů, předčasné ukončení transkripce, regulace na úrovni post-transkripční

modifikace mRNA, ale i regulace na úrovni translace. Velký vliv na regulaci genové exprese má změna stability některých virálních mRNA pomocí regulačních elementů. Aby byla regulace genové exprese úspěšná, musí proběhnout specifická exprese genů v závislosti na fázi diferenciaci epitelálních buněk. Zejména jde o expresi časných virových genů v nižších vrstvách epitelu, která je nahrazena expresí pozdních genů v diferenciovaných buňkách svrchního epitelu. Předčasná exprese L1 a L2 proteinů v nižších vrstvách epitelu by vyvolala mohutnou imunitní reakci a eliminaci infekce.[30]

Při regulaci genové exprese jsou klíčové proteinové faktory, které jsou vázány na cis-reaktivní elementy v LCR (z angl. *long terminal repeat*) viru. LCR zabírá asi 12 % virálního genomu a je dlouhé přibližně 800-900 bp. [30] LCR se dělí na tři segmenty, které mají odlišnou funkci. Segmenty rozlišujeme jako 5' segment, centrální segment a 3' segment.

První segment LCR se nazývá 5' segment. Vyskytuje se mezi terminačním kodonem translace genu L1 a prvním vazebným místem proteinu E2. [30] Tento region ovlivňuje připojování virového genomu k jaderné matrici. Obsahuje místa, které ukončují transkripci a polyadenylaci pro pozdní transkripty.

Centrální segment má funkci transkripčního enhanceru, což je úsek DNA, který může zvýšit transkripční aktivitu genu. Tento enhancer je často modulován fyziologickými faktory a intracelulárními signálními drahami. [30]

Třetí segment LCR se nazývá 3' segment a je ohraničen druhým vazebným místem proteinu E2 a iniciačním kodonem translace E6 genu. Tento segment obsahuje místo, na které se váže protein E1 a touto vazbou je identifikován počátek replikace. Společně s transkripčním faktorem Sp1, místem vázání E2 a TATA boxem je 3' segment schopen modulovat aktivitu promotérů E6/E7. [27]

Každý z těchto tří segmentů obsahuje jedno či více míst, kde je schopen se navázat faktor Yin Yang (YY1). Tento faktor je schopen potlačovat a stimulovat některé virové i buněčné promotory. Některá z těchto vazebných míst jsou schopná potlačit transkripci proteinu E6 nebo E7. Mutací v těchto vazebných místech může dojít ke snížení regulační kapacity, což následně vede ke vzniku mutantních genomů se zvýšenou karcinogenicitou. [31]

3.6 Karcinogeneze vlivem HPV

HPV viry nekódují enzymy nutné pro produktivní virový životní cyklus, tudíž musí využívat replikační aparát hostitelské buňky, včetně DNA polymeráz a buněčných transkripčních faktorů. Cílem HPV je virová replikace v diferenciovaných epitelálních buňkách, aniž by došlo k aktivaci imunitní odpovědi napadené buňky a eliminaci infekce. Během procesů, při kterých se HPV pokouší zabránit imunitní odpovědi, může dojít ke vzniku rakoviny, která však není cílem produktivního virového cyklu. Existuje totiž překryv mezi buněčnými funkcemi, které jsou potřebné pro úspěšnou replikaci viru

a buněčnými funkcemi, které zvyšují náchylnost hostitelských buněk k onkogenezi. Vzniklá rakovina je tedy vedlejším produktem během infekce. V okamžiku, kdy dojde k onkogenní transformaci hostitelských buněk, omezi se produkce infekčních virových částic.

Karcinogeneze je komplexní děj, při kterém se uplatňuje množství mechanismů, které přispívají k transformaci buněk a rozvoji rakoviny. Mezi něž patří např. integrace virového genomu do genomu hostitelské buňky a s ní spojená deregulace genové exprese virálních onkoproteinů, indukce nestability genomu nebo aktivace telomerázové aktivity. Zvýšená aktivita proteinů E6 a E7 může způsobit chromozomální nestabilitu, která následně vede k tumorogenezi. Tato zvýšená aktivita je většinou způsobena integrací genomu vysoce rizikového papilomaviru do genomu hostitelské buňky. Při integraci virového genomu do genomu buňky nejprve dochází k linearizaci virální DNA, což může vést k narušení některých genů. Integrací tak dochází např. ke štěpení genu, kódujícího protein E2, který již není exprimován, a není tak schopen regulovat expresi HPV onkoproteinů. Zvýšenou expresi onkoproteinů může způsobit i vytvoření Brd4-ovládaného super enhanceru. [32] Přibližně v 15 % případů rakoviny děložního čípku je však virální DNA přítomna v epizomální podobě. V takových případech je protein E2 exprimován, ale je i tak zvýšena exprese onkogenních proteinů. [33] Expresi proteinů E6 a E7 dochází k obejití G2-M kontrolního bodu, jehož úkolem je za normálních podmínek v případě poškození DNA zastavení buněčného cyklu a iniciace apoptotické buněčné smrti. [34] Funkce proteinů E6 a E7 jsou nezbytné pro normální infekční životní cyklus viru, ale v nadbytku onkoproteinů mohou všechny tyto interakce a regulační dráhy spojené s onkoproteiny vést k tvorbě nádorů.

3.7 HPV – Lidský papilomavirus

Lidský papilomavirus se řadí mezi DNA viry z čeledi Papilomaviridae. HPV virus je malý, neobalený a napadá bazální buňky epitelu. Ve skupině lidských papilomavirů je identifikováno přes 150 různých HPV typů, přičemž téměř polovina infikuje genitální trakt. HPV virus může způsobovat, jak benigní onemocnění kůže, kterými jsou např. genitální bradavice, tak onemocnění maligní. Mezi nejznámější a nejčastější maligní onemocnění, způsobená perzistentní infekcí HPV, patří karcinom děložního hrdla u žen, anogenitální nádory mužů i žen, nebo rakovina dutiny ústní a ústní části hltanu. Viry ze skupiny lidských papilomavirů dělíme, právě v závislosti na riziku rozvoje maligního onemocnění, na dvě skupiny – vysoce rizikové a nízké rizikové typy.

3.7.1 Nízce rizikové typy HPV

Nízce rizikové typy HPV (LR-HPV, angl. *low risk*) způsobují benigní léze (genitální bradavice, běžné bradavice, ploché bradavice, veruky a myrmecie a další kožní léze) nebo benigní papilomy, které mohou v organismu přetrvávat měsíce či roky, ale nakonec jsou odstraněny pomocí imunitního systému organismu. [35] Tuto skupinu můžeme také nazývat jako neonkogenní typy HPV. Nízce rizikové druhy

HPV lze výjimečně detekovat i u invazivních rakovin děložního čípku a konečníku, ale tyto případy jsou vzácné. [36] Mezi LR-HPV patří například HPV 6 nebo 11.

Jeden z hlavních rozdílů, díky kterým můžeme odlišit typy HPV s nízkým nebo vysokým rizikem je, že nízkorizikové typy neexprimují geny E6 a E7 k řízení rozsáhlé buněčné proliferace bazálních a parabazálních buněčných vrstvách. [37] To je způsobeno rozdílnou regulací transkripce těchto genů u nízkorizikových typů.

3.7.2 Vysoce rizikové typy HPV

Vysoce rizikové typy HPV, HR-HPV (z angl. *high risk human papillomavirus*), jsou častou příčinou několika známých druhů rakovin. HR-HPV způsobují naprostou většinu případů rakoviny děložního čípku, dále anogenitálních nádorů, nebo v poslední době stále častěji zapříčiňují vznik některých nádorů hlavy a krku. Vysoce rizikové lidské papilomaviry tvoří podskupinu rodu *Alphapapillomavirus*. Mezi vysoce rizikové typy HPV patří 13 typů, jsou to: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68. [38] Nejrizikovějšími typy jsou HPV 16 a 18, které jsou přítomné ve většině případů výskytu rakoviny děložního čípku, ale jsou přítomny také v ostatních typech rakovin, například u rakovin orofaryngu, konečníku, pochvy, vulvy a penisu. Vysoce rizikové typy HPV jsou schopny produkovat onkogenní proteiny a začleňovat svoji DNA do DNA hostitelské kmenové buňky. Díky tomu perzistentní infekce HR-HPV představuje vyšší riziko vzniku rakovinu. [38]

I přes vysoké riziko je většina infekcí vysoce rizikových typů HPV asymptomatická a postupem času (v průběhu 1 až 2 let) samovolně vymizí bez žádných příznaků a komplikací. Proti vysoce rizikovým typům HPV existují vakcíny, například vakcína Gardasil 9, která je konkrétně proti HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58 (a také proti nízkorizikovým typům 6 a 11) (viz kapitola Imunologie a očkování). [39]

3.7.3 Epidemiologie

Lidský papilomavirus je přenášen sexuálním kontaktem s infikovaným cervikálním, vaginálním, vulválním, penilním nebo análním epitelem. Přenos pravděpodobně probíhá prostřednictvím mikroskopických oděrek na sliznici nebo kůži. Lidský papilomavirus patří mezi nejčastěji sexuálně přenosné infekce po celém světě. Alespoň jednou za život se tímto virem nakazí přibližně 70–80 % všech sexuálně aktivních jedinců. Většina HPV infekcí je však asymptomatická a samovolně vymizí. Mezi rizikové faktory patří brzký začátek sexuálního života, vysoký počet sexuálních partnerů, věk, dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce [40], nutriční stav, kouření, mužská obřízka [41], genitální infekce a přítomnost mutace BRCA 1 a BRCA 2. [42]

Papilomavirus se přenáší nejen sexuálním kontaktem, ale lze přenést infekci i z rodiče na potomky, při těhotenství, konkrétně během porodu. [43] HPV pozitivní novorozenci nesou stejné typy HPV jako jejich matky. Perinatální přenos je však poměrně vzácnou událostí. [44]

Celosvětově je 4,5 % případů rakoviny způsobeno právě lidským papilomavirem. [45] Odhaduje se, že v roce 2018 bylo virem HPV infikováno 80 milionů Američanů a bylo způsobeno přes 14 milionů nových infekcí. [45] U rakoviny děložního čípku byla zjištěna až u 99 % případů přítomnost HPV. Rakovina děložního čípku se stala čtvrtým nejmrtelnějším nádorovým onemocněním u žen. [46]

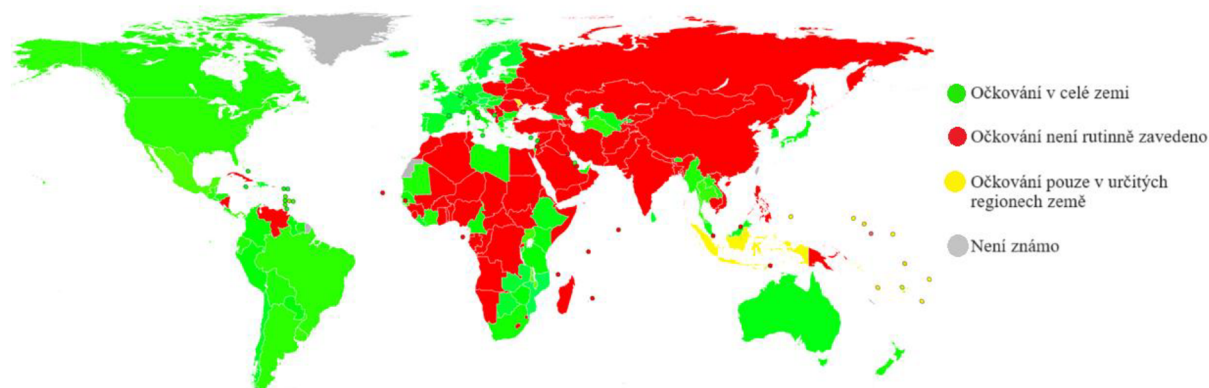
3.7.4 Imunologie a očkování

Dříve byly dostupné v České republice tři vakcíny, a to Cervarix, Gardasil a Gardasil 9. V současné době je nejvíce využívána vakcína Gardasil 9, v menší míře poté vakcína Cervarix. Vakcína Gardasil se přestala v ČR používat od 31. 5. 2023. Vakcíny slouží k prevenci snížení výskytu rakoviny asociované s HPV virem. Proočkovaností obyvatelstva proti HPV již vedlo ke snížení celosvětového výskytu rakoviny děložního čípku. [45]

Vakcína Cervarix je bivalentní vakcína, kterou vyrábí společnost GlaxoSmithKline Biologicals SA. Tato vakcína je cílená proti HPV 16 a 18. Vakcína Gardasil je kvadrivalentní vakcína od společnosti Merck. Tato vakcína je cílena proti dvěma vysoce rizikovým typům HPV 16 a 18, a dvěma níže rizikovým typům HPV 6 a 11, které způsobují genitální bradavice. Vakcína Gardasil9 je nonavalentní vakcína. Gardasil 9 má nejširší spektrum ochrany před infekcí HPV, mezi něž patří – HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58.

Vakcíny proti HPV jsou založeny na viru podobných částicích (VLP, z *angl.* virus-like particle), které jsou tvořeny HPV povrchovými složkami. VLP se spontánně sestavují ze 72 pentamerů L1 hlavního kapsidového proteinu. [39] VLP nejsou infekční, jelikož neobsahují virovou DNA. VLP jsou imunogenní, díky nim se tvoří v těle vysoké hladiny protilátek proti HPV. Vakcíny proti HPV jsou vysoce účinné. Nezabraňují však přenosu jiných pohlavně přenosných chorob, a také neléčí již v těle se vyskytující infekce HPV.

Ve vyspělých zemích jsou od roku 2007 zaváděny očkovací programy proti HPV. V rozvojových regionech světa však v naprosté většině případů očkovací programy proti tomuto viru stále neexistují, i přesto, že je v těchto zemích nejvyšší riziko infekce HPV (viz obrázek 3). V nejhudších regionech světa je největší riziko výskytu HPV asociované rakoviny děložního čípku, zatímco ve vyspělé části světa je nejvíce riziková HPV-asociovaná rakovina orofaryngu. [44] Očkovací programy se implementují již pod dobu téměř dvou desetiletí a od roku 2020 byla vakcína proti HPV zařazena do imunizačního programu ve více než 100 zemích světa. [39]



Obrázek 3 – Mapa světa, znázorňující postup v zavádění očkovacích programů proti HPV. Zelenou barvou jsou znázorněny země, které mají zavedený očkovací program proti HPV v celé zemi.

Červeně vyznačené státy nemají rutinně zavedeno očkování proti HPV. Ve žlutě vyznačených zemích je očkovací program jen v určitých regionech. V zemích, které jsou vyznačeny šedou barvou nejsou k dispozici žádné data o očkovacím programu.

Očkování proti HPV by mělo proběhnout před prvním možným setkáním s virem, což je období před zahájením sexuálního života. Toto očkování je tedy doporučováno dívkám i chlapcům ve věku od jedenácti do čtrnácti let. V České republice je v tomto věkovém rozmezí očkování proti HPV hrazeno zdravotní pojišťovnou.

Očkování vakcínou Gardasil 9 je v České republice nejčastější a nejvíce doporučované. Provádí se buď podle dvoudávkového, nebo třídávkového schématu, s ohledem na věk očkovaného. V případě očkování ve třech dávkách je její podávání naplánováno v časovém schématu 0, 2 a 6 měsíců. Všechny tři dávky musí být podány v intervalu jednoho roku.

Očkování proti viru HPV slouží především k prevenci výskytu rakoviny asociované s HPV. Podle výzkumu by plošné očkování mladých ročníků vakcínou Gardasil 9 mohlo zabránit více než 87,4 % případů rakoviny související s HPV postihující ženské genitálie. [44] V roce 2020 schválil americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv vakcínu Gardasil 9 i pro použití v rámci prevence proti HPV asociovaným orofaryngeálním nádorům. [47]

3.8 Metody detekce HPV infekce

V současné době jsou pro detekci HPV využívány především techniky molekulární biologie, které jsou založené na využití sond pro nukleové kyseliny. Tyto techniky jsou založeny na třech základních principech, kterými jsou hybridizace nukleových kyselin, zesilování signálu a cílená amplifikace s využitím značených sond. [48]

Do první skupiny metod se řadí detekce pomocí dvou základních technik – Southern blot a stanovení pomocí *in situ* hybridizace. Tyto techniky se využívaly především v počátečních studiích. Obě metody se využívají pro detekci specifického úseku DNA pomocí předem definovaných přímých sond. [48] Tyto přímé metody jsou však málo citlivé, metoda je časově náročná a ve vzorku musí být velké množství vysoce purifikované DNA, proto se tato metoda v současné době téměř nevyužívá.

Mezi metody, které jsou založeny na zesilování signálu řadíme například komerčně dostupný Hybrid Capture 2 test (HC2). Tyto metody jsou však založeny na principu metody z předešlé skupiny. V případě HC2 testu se využívají specifické sondy RNA, které jsou cíleny proti specifickým sekvencím HPV DNA. Následně jsou tyto hybridy DNA-RNA detekovány pomocí proprietárních protilátek. Tato metoda má vysokou citlivost a je považována jako zlatý standard pro detekci HPV. [49]

V současnosti je však HPV infekce nejčastěji detekována pomocí testů, založených na cílené polymerázové řetězové reakci v reálném čase (rtPCR; z *angl.* real-time polymerase chain reaction). Tyto testy využívají směsi primerů a značených sond proti jednomu konkrétnímu HPV genotypu nebo směs různých primerů a sond, umožňující detekci několika různými HPV typů v jedné multiplexní rtPCR reakci. Výhodou těchto testů, založených na PCR reakci, je jejich vysoká senzitivita, specifická a možnost okamžité genotypizace. [50]

Existuje velké množství detekčních kitů pro HPV, ne všechny se však mohou používat v klinické praxi. Mezi standardní srovnávací HPV testy patří test HC2 a GP5+/6+ PCR-EIA. Tyto testy jsou validovány prostřednictvím studií. Mezi další, běžně využívané testy pro detekci infekce vysoce rizikovými HPV typy patří detekční sady Abbott RealTime, Anyplex HPV HR, Cobas 4800, BD Onclarity, HPV-Risk, PapilloCheck a Xpert HPV. Nedávné studie ukázaly, že kritéria pro použití v praxi splnili například i testy Alinity a Cobas 6800. Americký ústav pro kontrolu potravin a léčiv schválil testy BD Onclarity, Cobas 4800, 6800, 8800, HC2, Cervista a APTIMA. [51] Mezi poslední komerčně dostupné novinky patří například test Allplex HPV 28, umožňující rychlou a citlivou detekci HPV infekce a současnou genotypizaci 28 různých vysoce i nízké rizikových HPV. [51]

3.9 HPV-asociovaný karcinom orofaryngu

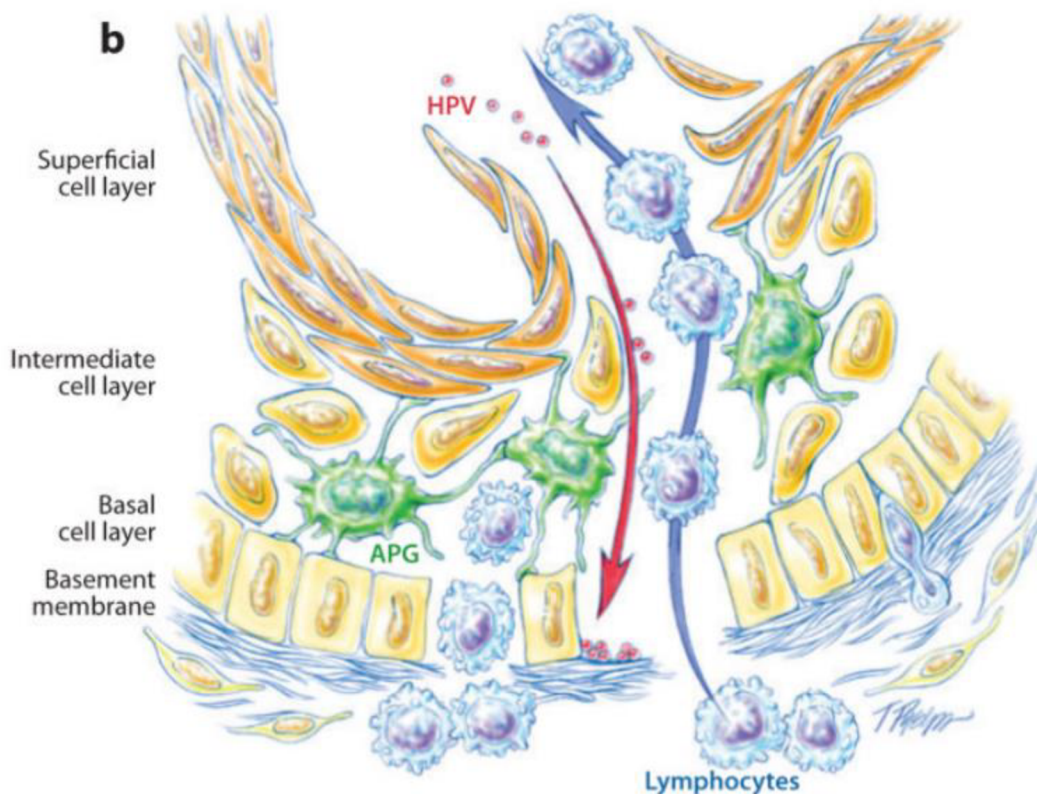
Orofarynx je střední (ústní) část hrdla neboli hltanu. Do orofaryngeální oblasti zahrnujeme patrové mandle, měkké patro, kořen jazyka (zadní 1/3 jazyka) a zadní/boční stěny ústní části hrdla.

Skupina nádorů orofaryngu asociovaných s HPV infekcí je dle nejnovějšího vydání TNM klasifikace zhoubných novotvarů (8. vydání z roku 2017) odlišována od skupiny nádorů orofaryngu negativních na HPV na základě stanovení exprese p16 proteinu. [52] HPV-asociovaný orofaryngeální karcinom může vznikát v jakékoliv sublokizaci orofaryngu, tím nejčastějším je však tonzilární nádor.

3.9.1 Anatomie OPSCC

Povrch dutiny ústní i orofaryngu je tvořen nepřerušovaným vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Z historického hlediska byly karcinomy v této oblasti považovány za jediný typ a označovaly se souhrnně jako rakovina ústní dutiny. V současnosti jsou však nádorová onemocnění ústní dutiny a orofaryngu rozlišována na dvě samostatné skupiny s odlišným klinickým, epidemiologickým i molekulárním profilem. Výskyt nádorů orofaryngu se během posledních tří desetiletí významně zvýšil, zatímco karcinomy v ústní dutině mají četnost výskytu konstantní či dokonce klesající. [53] Nejvýznamnější rozdíl v ústní dutině a orofaryngu je přítomnost či nepřítomnost tkáně mandlí. HPV-asociované karcinomy nejčastěji vznikají právě z tonzilární tkáně orofaryngu, která je vůči HPV infekci velmi náchylná. Karcinomy neasociované s HPV vznikají z povrchového epitelu lemující nontonzilární místa. [54] Porovnáním OPSCC podle přítomnosti tonzilární tkáně v primárním ložisku bylo zjištěno, že pouze 3 % OPSCC vznikajících z netonzilárních míst jsou HPV-asociované, zatímco OPSCC vznikajících v lingválních a patrových mandlích jsou z 92 % asociované s infekcí vysoce rizikovým HPV typem. [53]

Mandle slouží jako první obranná linie proti vzdušným a požitým antigenům. Jako mandle orofaryngu jsou označovány mandle patrové a lingvální. Na povrchu mandlí se vyskytují tonzilární krypty, které zvětšují povrch mandle až 700x a vyskytuje se zde síťovaný vrstevnatý dlaždicový epitel. [54] Tento epitel usnadňuje transport cizích antigenů do tonzilární lymfoidní tkáně. Bazální buněčná membrána na mandlích je neúplná, díky čemuž mohou lymfocyty a buňky prezentující antigen přímo procházet touto vrstvou. Při deskvamaci, což je proces, při kterém se odlupují povrchové vrstvy kůže nebo sliznice, je vystavováno vnitřní prostředí mandlí vnějším patogenům (viz obrázek 4). Přirozená fenestrace dlaždicového epitelu mandlí tak vytváří vhodné prostředí pro infekci bazálních buněk epitelu. Při infekci děložního čípku virem HPV je pro infekci nutná přítomnost mechanické abraze, zatímco v tonzilách není pro napadení HPV tato abraze nutná. [54]



Obrázek 4 - Schématické znázornění epitelu krytky mandlí s narušenou bazální membránou a narušeným epitelem umožňující vystavení bazální buněčné vrstvy virovým částicím. [51]

3.9.2 Epidemiologie

Z dat Světové zdravotnické organizace vyplývá, že HPV je celosvětově nejčastější sexuálně přenosnou infekcí. Lidský papilomavirus se přenáší pohlavním stykem a orogenitálním kontaktem, který vede k orální i orofaryngální infekci papilomavirem. Tyto infekce jsou většinou asymptomatické a do dvou let samovolně vymizí. V každém momentě je možné u 6,9 % jedinců detekovat přítomnost HPV právě v ústní dutině či orofaryngu. [55] Existuje více než 150 typů lidských papilomavirů, z nichž onkogenní potenciál je znám u 13 typů. Většina orofaryngeálních spinocelulárních karcinomů (OPSCC) je však způsobena typem HPV 16 a vyskytuje se u více než 90 % případů OPSCC asociovaných s HPV. [56]

Dříve byly OPSCC i ostatní spinocelulární karcinomy hlavy a krku (HNSCC) spojeny s konzumací alkoholu a kouřením. Po poklesu intenzity kouření u obyvatelstva v zemích s vysokými příjmy došlo ke snížení výskytu HNSCC způsobeným kouřením a častou konzumací alkoholu. Avšak HPV infekce je dalším významným rizikovým faktorem, který vedl ke zvýšení počtu pacientů s orofaryngálním karcinomem. Ve spojených státech amerických je přibližně 60 % karcinomů orofaryngu spojeno s infekcí lidského papilomaviru. [57] V Evropě se podíl orofaryngálních

karcinomů spojených s HPV liší v rámci zemí, například ve Švédsku je HPV přítomen v 90 % případů OPSCC. V evropských zemích, kde je zaznamenána vyšší míra užívání tabákových výrobků se pohybuje podíl OPSCC spojených s HPV okolo 20 %. [58]

HPV-asociovaný karcinom orofaryngu patří mezi karcinomy s nejrychleji rostoucím výskytem v zemích s vysokými příjmy a jeho incidence se v posledních 3 dekadách více než ztrojnásobila. U pacientů s HNSCC se trend v incidenci liší v závislosti na anatomické sublokalizaci v ústní dutině nebo orofaryngu. Výskyt karcinomů v ústní dutině se snížil, ale výskyt karcinomů orofaryngu se zvýšil. Toto zvýšení pozorujeme především u mladších pacientů. [59] Dominantní roli ve zvyšujícím se výskytu rakoviny orofaryngu u mladších pacientů má persistentní HPV infekce, která může být výsledkem rizikového chování, jako je např. zvýšený počet sexuálních partnerů, anamnéza anogenitálních bradavic nebo začátek sexuálního života v nízkém věku.[59]

Na základě studií, testujících prevalenci HPV u OPSCC, bylo zjištěno, že se prevalence HPV-asociovaných OPSCC v jednotlivých studiích liší v rozmezí od 20 % do 90 %. Tyto rozdíly mohou být způsobené časovým obdobím studií, jelikož incidence výskytu stále roste.

Mezi lety 2002-2011 proběhla ve Spojeném království studie zahrnující 1 474 případů OPSCC. Průměrný věk pacientů při diagnóze byl 59,3 let, přičemž 75 % OPSCC bylo diagnostikováno u mužů. Z celkového počtu bylo 57,9 % OPSCC v oblasti mandlí. V Anglii bylo v letech 2002-2011 diagnostikováno 17 739 OPSCC, v této studii je tedy zahrnuto 8,3 % případů OPSCC. Celkově bylo HPV-asociovaných nádorů 51,8 % a podíl HPV-asociovaných případů byl vyšší u mužů. Nejvyšší prevalenci HPV vykazovaly nádory mandlí a nejnižší prevalenci nádory v oblasti měkkého patra. Ze 764 HPV-asociovaných OPSCC byl v 732 případech přítomen vysoce rizikový kmen HPV. V 710 případech byl detekován jeden typ HPV a v 22 případech bylo detekováno více typů HPV. HPV 16 a/nebo HPV 18 bylo identifikováno v 714 z 764 případů (93,5 %). HPV 33 bylo detekováno ve 20 případech (2,6 %). Incidence OPSCC se mezi lety 2002-2011 zvýšila o 100,6 %. [60]

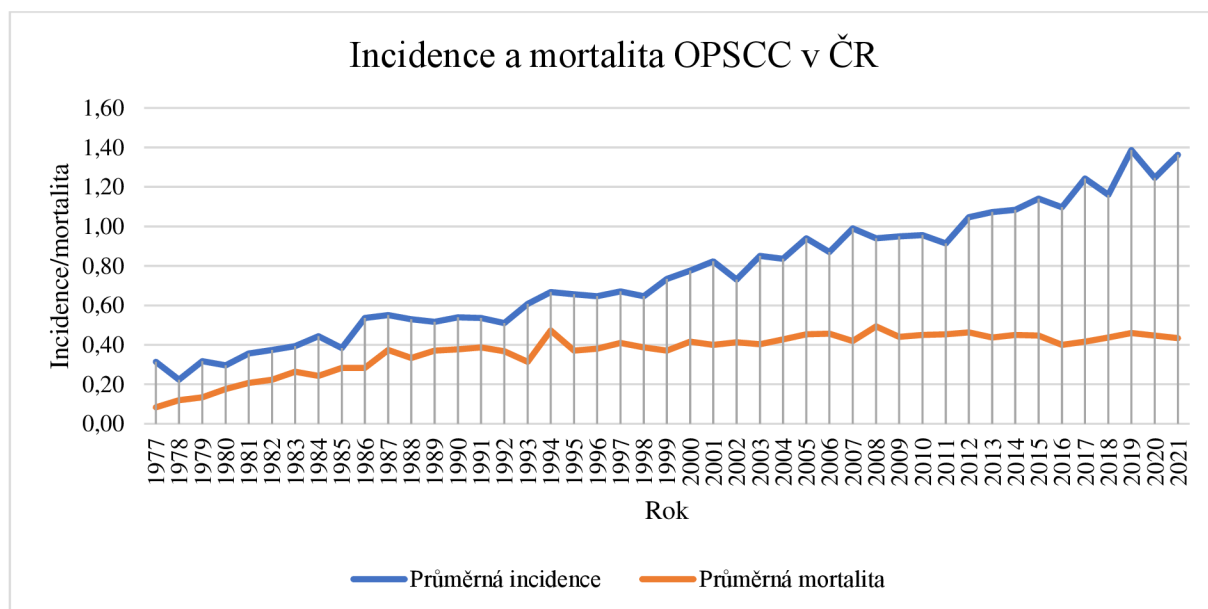
Podobná studie byla provedena mezi lety 1990-2010 v Nizozemsku. Tato studie zahrnovala 240 případů OPSCC. Celkem u 17,1 % pacientů byl diagnostikován HPV-asociovaný nádor v porovnání s 82,9 % případů, které nebyly spojeny s HPV infekcí. Z této studie vyplývá, že v průběhu let incidence HPV-asociovaných případů rostla. Mezi lety 1990-1995 bylo v rámci této studie zaznamenáno celkem 5 % HPV-asociovaných OPSCC, mezi lety 1996-2000 bylo HPV-asociovaných OPSCC 8 %, mezi lety 2001-2005 prevalence HPV-asociovaných OPSCC stoupla na 20 % a v období do konce studie už bylo HPV-asociovaných OPSCC celkem 29 %. Medián věku pacientů s HPV-asociovaných OPSCC byl 61,1 let a medián věku pacientů s HPV-neasociovaným OPSCC byl 61,5 let. V této studii bylo obdobná incidence OPSCC v oblasti mandlí (34,6 %), jako incidence OPSCC v oblasti kořene jazyka (27,9 %). [61]

Mezi lety 2011-2021 proběhla ve Francii studie, která zahrnovala 1 365 pacientů. Průměrný podíl pacientů s HPV-asociovaným OPSCC bylo 45,4 %. Podíl pacientů HPV-asociovaným OPSCC v jednotlivých letech se neustále zvyšoval. Zatímco v roce 2011 byl HPV-asociovaný OPSCC detekován u 43 % pacientů, v roce 2021 bylo pacientů s HPV-asociovaným OPSCC již 57,3 %. Podíl žen byl 21,3 % a v průběhu let se tato hodnota výrazně neměnila. V průběhu studie však docházelo ke změně průměrného stáří v čase diagnózy. Celkový průměrný věk pacientů byl 61,7 let, nicméně na začátku studie byl průměrný věk pacientů 60,2 let, který se až do konce studie zvyšoval na 63,6 let (v roce 2021). Podobně jako v předešlé studii, i v této bylo procentuální zastoupení OPSCC v oblasti mandlí a kořene jazyka podobné. V oblasti mandlí se vyskytovalo 42,6 % primárních nádorů. Na kořeni jazyka bylo nalezeno celkem 42,7 % nádorů. V oblasti měkkého patra bylo 9,6 % případů a v jiných částech orofaryngu pak 5 % všech případů. [62]

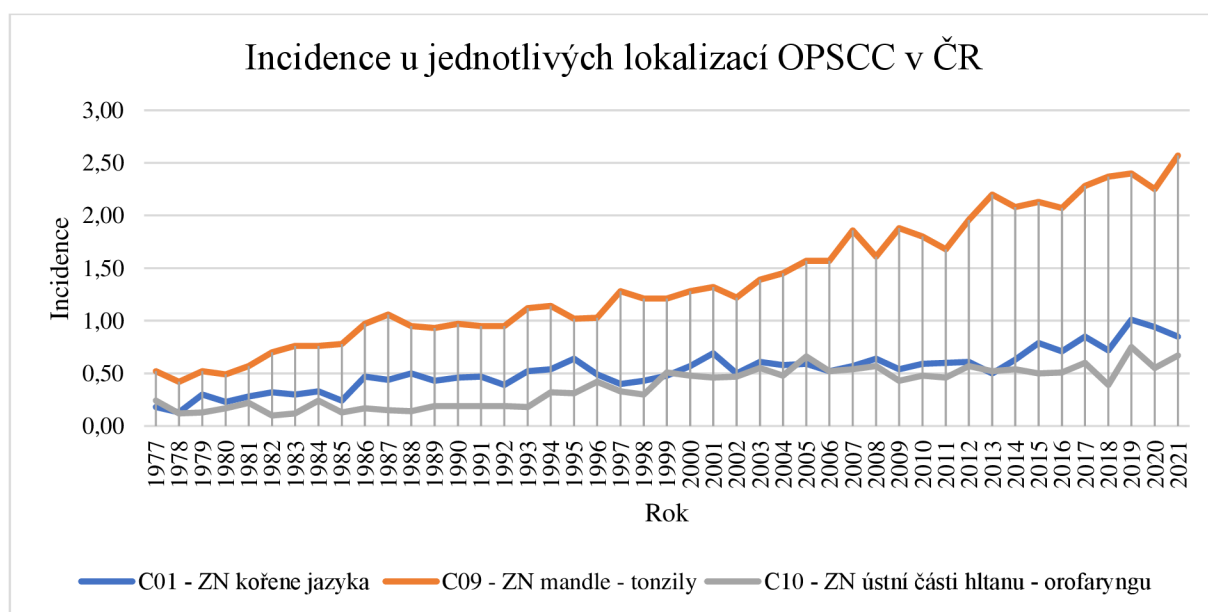
Z výsledků metaanalýzy, která zahrnovala studie z 11 různých zemí a ze 4 kontinentů, je patrné, že prevalence HPV-asociovaných OPSCC v jednotlivých částech světa se velmi liší. Studie zahrnuté v této metaanalýze měli od 55 do 1 474 pacientů s OPSCC. Celkově metaanalýza obsahuje data od 6 009 pacientů s OPSCC. Studie probíhaly v letech 1980-2016 a průměrná délka studií byl 11,3 let. Velká většina HPV-asociovaných případů byla způsobená typem HPV 16, který byl detekován ve více než 80 % HPV-asociovaných nádorů. Dále bylo možné ve zbytku nádorů detekovat typy HPV 33, 35 a 18. Velmi sporadicky byl zaznamenán výskyt HPV 26, 31, 45, 56, 58, 59 a 67. Celková prevalence HPV-asociovaného OPSCC v metaanalýze je 44,8 %, s tím že nejvyšší míra prevalence byla zjištěna na Novém Zélandu, kde bylo celkem 74,5 % nádorů asociovaných s HPV. Následující nejvyšší prevalence byly zjištěny ve Švédsku (70,0 %) a Dánsku (61,7 %). Nejnižší míra prevalence byla zjištěna v Brazílii (11,1 %). Nízké prevalence mělo také Německo (25,0 %) a Nizozemsko (30,3 %). Prevalence u mužů a žen byla podobná. U mužů byla prevalence HPV 45,7 % a u žen 42,2 %. Průměrný věk pacientů byl 59,1-67,1 let. Pacienti s HPV-asociovaným OPSCC měli průměrný věk 63,5 let a pacienti s HPV-neasociovaným OPSCC měli průměrný věk 55,7 let. [63]

V České republice je z dat webového portálu Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice (dostupné na www.svod.cz) v posledních třech desetiletích patrný nárůst incidence nově diagnostikovaných OPSCC (viz Graf 1). Nejvyšší nárůst incidence je u nádorů vyskytujících se na mandlích neboli tonzilách (viz Graf 2). Mortalita jednotlivých onemocnění je v posledních deseti letech téměř konstantní.

Graf 1 - Incidence a mortalita orofaryngeálního karcinomu na území České republiky. Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro OPSCC.



Graf 2 - Incidence u různých lokalizací OPSCC v České republice. Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet případů na 100 000 osob).



3.9.3 Klinický obraz a diagnostika

Klinická diagnostika orofaryngeálních dlaždicobuněčných karcinomů představuje i v dnešní době určitou výzvu. Velké množství těchto nádorů je v primárním stádiu velmi malá, nemanifestující žádné nebo minimální klinické příznaky. Zvětšení nádorového ložiska se v dalších fázích může projevovat zduřením na krku, pocitem cizího tělesa v hltanu, a s tím související bolestí v krku. Dalšími příznaky OPSCC může být např. dysfagie (potíže při polykání potravy), odynofagie (bolesti při polykání), či otalgie (bolesti v oblasti uší). U nálezu nových OPSCC hrozí záměna s nezávažnými benigními stavů, a proto by měla být při nálezu použita konfirmační ultrasonografie nebo jiné zobrazovací metody a následný odběr bioptického materiálu. [64], [65]

Nejčastějšími nádory orofaryngu jsou nádory mandlí a kořene jazyka, tvoří téměř 96 % všech orofaryngeálních nádorů. [66] Při vyšetřování podezřelých nálezů v oblasti orofaryngu se doporučuje provést flexibilní endoskopii horního aerodigestivního traktu, pozitronovou emisní tomografii a počítačovou tomografii (PET-CT) a magnetickou rezonanci (MRI). Tyto vyšetření se provádí kvůli určení rozsahu lokoregionálního šíření nádoru v měkkých tkání (např. metastazování do lymfatických uzlin), pro stanovení rozsahu onemocnění, pro zjištění případné kostní invaze a kvůli výskytu metastáz v oblasti plic a jater. [67]

3.9.4 Klasifikace TNM

K popisu charakteristiky nádorů slouží TNM klasifikace maligních nádorových onemocnění. [68] Písmeno T označuje velikost a rozsah primárního nádoru. Písmeno N označuje přítomnost a rozsah postižení regionálních lymfatických uzlin nádorem. Písmeno M označuje přítomnost a rozsah vzdálených metastáz. Metastázy jsou sekundární nádory vzdálené od primárního nádoru. [68] [69]

V osmém vydání TNM klasifikace proběhlo několik změn oproti předchozí verzi. Nové vydání bylo doplněno o změny, týkající se klasifikace p-16 pozitivních orofaryngeálních nádorů, klasifikace neznámých primárních nádorů v oblasti cervikálních uzlin, klasifikace karcinomů kůže hlavy a krku, klasifikace neuroendokrinních nádorů a dalších. Pro účely studie prezentované v této bakalářské práci je tou nejvýznamnější změnou právě striktní rozlišení HPV-asociovaných nádorů orofaryngu (p16 pozitivní OPSCC) od skupiny nádorů orofaryngu neasociovaných s HPV infekcí (p16 negativní OPSCC). [69]

Rozsah primárního nádoru, označované identifikátorem T, vyjadřuje míru pokročilosti nádoru. Rozsah primárního nádoru 0 je stádium, při kterém není možné identifikovat nádorové buňky a není zjevná jejich přítomnost. Rozsah primárního nádoru 1 a 2 označují nádory, které jsou malé a vyskytují se pouze v jedné oblasti. Rozsah primárního nádoru 3 označuje stav, kdy je nádor větší než 4 cm nebo je rozšířen na lingvální plochu epiglottis. Rozsah primárního nádoru 4 označuje rakovinu, která je již v pokročilém stádiu. [69]

Jednotlivé stupně charakteristiky N označují rozsah postižení regionálních lymfatických uzlin nádorem. Stupeň N0 znamená, že není přítomna žádná metastáze do regionálních lymfatických uzlin. Stupeň N1 označuje stav, kdy je přítomna jednostranná metastáze v lymfatických uzlinách a metastáze má průměr 6 cm nebo méně. Stupeň N2 označuje stav, kdy je diagnostikována kontralaterální nebo oboustranná metastáze do lymfatických uzlin, a tyto metastáze mají v průměru 6 cm nebo méně. Stupeň N3 označuje stav, kdy jsou diagnostikovány metastázy v lymfatických uzlinách s průměrem větším než 6 cm. [69]

Charakteristika M označuje přítomnost či nepřítomnost metastáz. Stupeň M0 označuje stav, kdy nejsou přítomny žádné známky vzdálených metastáz. Stupeň M1 označuje stav, kdy jsou přítomny vzdálené metastázy v jiných částech těla, než kde se vyskytoval primární nádor. [68][69]

3.9.5 Léčba a riziko recidivy

Léčba OPSCC probíhá obvykle pomocí chirurgické excize, chemoradioterapií nebo pomocí primární radioterapie. V dnešní době je již chirurgická excize ve velkém počtu případů nahrazena méně invazivní laserovou mikrochirurgií nebo ještě častěji transorální robotickou chirurgií (TORS). [57]

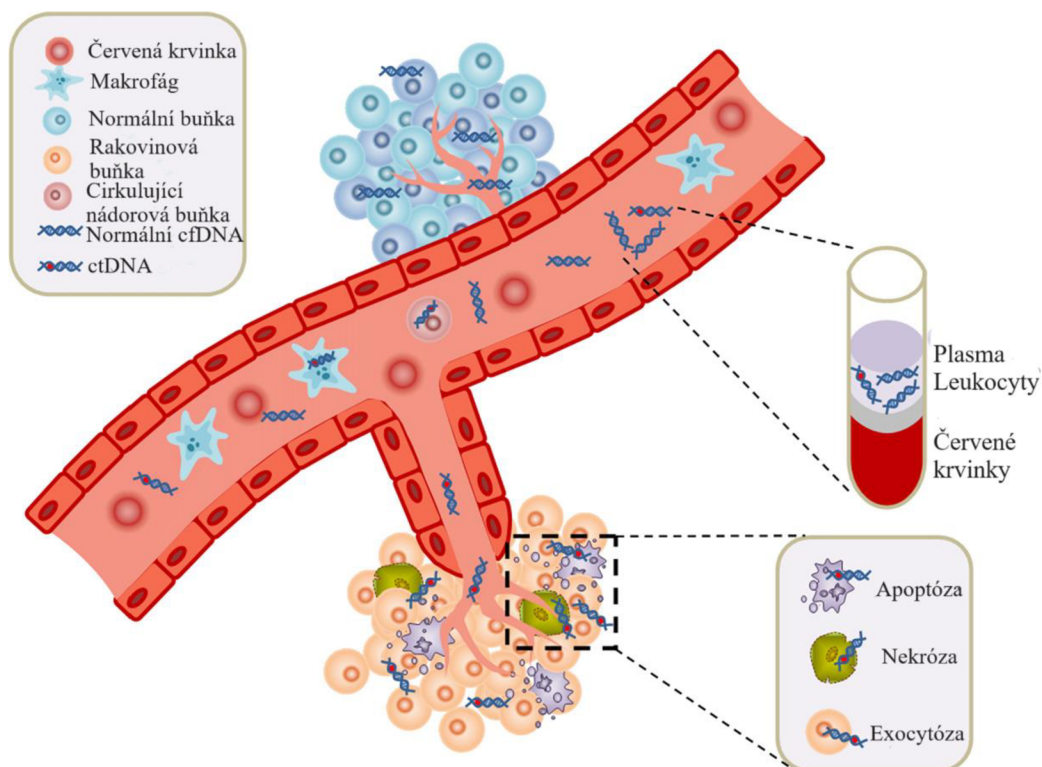
Největším rizikem u HPV-asociovaných OPSCC je recidiva onemocnění, která se objevuje v období 2-5 let od první diagnózy. Z toho důvodu jsou pacienti po dokončení onkologické léčby pravidelně sledováni. Podle klasického schématu dispenzarizace probíhají kontroly po dobu pěti let od ukončení onkologické léčby. První dva roky probíhají kontroly každé 3 měsíce, následující tři roky pak probíhají kontroly každého půl roku. Ačkoliv jsou do schématu dispenzarizace zařazeny i vyšetření pomocí zobrazovacích metod, četnost jejich použití není vysoká a hrozí tak riziko neodhalení recidivy v časném stádiu pomocí vizuálního vyšetření. [58], [70]

Při odhalování recidivy můžete představovat HPV detekce důležitý nástroj, který by mohl být využit pro citlivou a včasnou detekci recidivy u HPV-asociovaných OPSCC v klinické praxi. Využívají se detekce orální a plazmatické cirkulující nádorové HPV DNA stejného typu jako v primárním nádoru. Při měření hodnot cirkulující HPV DNA ze vzorků z plazmy byla zjištěna nejvyšší citlivost pro detekci recidivy. [71] Tyto metody by mohly pomoci k časnější detekci recidiv a tím by se mohla zlepšit účinnost léčby. [72]

3.10 Cirkulující nádorová DNA

Cirkulující nádorová DNA (ctDNA) je součástí cirkulující volné DNA (cfDNA), která se vyskytuje v tělních tekutinách. Jedná se o fragmenty DNA, které pocházejí z nádorových buněk. Tyto fragmenty se následně uvolňují do krevního oběhu pacienta. Cirkulující nádorová DNA se využívá jako důležitý biomarker v různých typech onkologických onemocnění, jelikož je vysoce specifická. [71]

Pacienti s maligním nádorovým onemocněním mají výrazně vyšší hladiny ctDNA oproti zdravým pacientům. Čím větší je nádor, tím více se v krvi vyskytuje apoptotických a nekrotických buněk, které by měly být za normálních podmínek odstraněny fagocyty. [73] Rakovinové buňky mohou uvolňovat malé fragmenty volné DNA do oběhu třemi mechanismy. První způsob uvolňování je apoptóza neboli programovaná buněčná smrt. Druhý způsob je nekrotický rozklad buňky. A posledním způsobem je aktivní sekrece nádorových buněk (viz obrázek 5). Tyto procesy uvolňování mohou být zintenzivněny vlivem různých faktorů, kterými jsou například invaze do okolních tkání, či zakládání vzdálených metastáz. [74]



Obrázek 5 - Uvolňování ctDNA do krevního oběhu [71]

Cirkulující nádorovou DNA lze detekovat více způsoby, mezi hlavní a nejcitlivější metody detekce patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování DNA. [73] Výzkumy spojené s ctDNA mají v onkologické praxi mnoho využití. CtDNA může být využívána při diagnostice nádorových onemocnění. Mutační zátěž a genetická heterogenita ctDNA mohou poskytovat prognostické informace o průběhu rakoviny. Díky sledování ctDNA v průběhu léčby pacienta s nádorovým onemocněním lze sledovat efektivitu terapie, lze detekovat rezistenci na léčbu a případnou progresi v léčbě onemocnění. V neposlední řadě se detekce ctDNA využívá při predikci recidivy nádorových onemocnění. [73]

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál byl odebrán na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku (ORL), Fakultní nemocnice Olomouc. Odběr biologického materiálu proběhl po podepsání informovaného souhlasu pacienta s odběrem, zpracováním a skladováním biologického materiálu na Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM, Lékařská fakulta, UPOL). Primární nádorová tkáň byla vyžádána z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie, Fakultní nemocnice Olomouc. Odebraný materiál:

- Nesrážlivá venózní krev – 10 ml
- Nádorová tkáň v parafinovém bločku (FFPE, z *angl.* formalin-fixed paraffin-embedded)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Ethanol (96-100%), Isopropanol (100%), Xylen (100%), DNA sample preparation kit (DNA SP, Cobas, REF 05985536190), QIAamp circulating nucleic acid kit (QIAGEN, kat. č. 55114), PAXgene blood ccfDNA kit (PreAnalytiX, A QIAGEN/BD Company), HotStar Taq DNA Polymerase kit (QIAGEN, kat. č. 203203)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Sáňkový mikrotom (Slide 2003, PFM Medical), Vyhřívací blok (TBD-100, Biosan), Vyhřívací blok (ThermoStat plus, Eppendorf), Vortex (PV- 1, Grant-bio), Minicentrifuga (miniSpin Eppendorf), Systém vakuum 25anuály (QIAvac 24 plus connecting systém), Vyhřívací vodní lázeň (IntellMed), laminární box Herasafe KS (Trigon-plus), Chlazená centrifuga (Rotina 420R, Schoeller), Centrifuga (centrifuge 5430, Eppendorf), Real time PCR cykler – CFX96 Real-time systém (BioRad),

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Příprava plazmy pro izolaci ccfDNA

Pacientovi bylo odebráno 10 ml krve do speciální zkumavky PAXgene blood ccfDNA. Krev byla odebírána pomocí standartní venepunkční techniky do evakuované zkumavky. Ve zkumavce je přítomno 1,5 ml aditiva pro stabilizaci buněk v poměru 0,15 ml aditiva na 1 ml krve. Kvůli přítomným aditivům je potřebné zabránit zpětnému toku ze zkumavky. Zkumavky byly uchovány při pokojové teplotě (15-25 °C). Po odběru krve byly zkumavky okamžitě 8x otočeny, aby se krev promíchala s aditivem. Naplněné zkumavky byla transportována do laboratoře ÚMTM a skladována do doby zpracování při pokojové teplotě (15-25 °C).

Po odebrání krve byly zkumavky s krví centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 15 minut při 2500xg. Plazma byla odpipetována po 2 ml alikvotech do připravených a popsanych zkumavek.

Odebraná plazma byla skladována při -70 °C/ -80 °C. Před použitím byla plazma rozmrazena a temperována při laboratorní teplotě.

4.4.2 Purifikace cirkulující nukleové kyseliny z 2 ml plazmy

Mezi volně cirkulující nukleové kyseliny řadíme nádorově specifické fragmenty extracelulární DNA a mRNA. Tyto nukleové kyseliny jsou většinou krátké fragmenty menší než 1000 párů bází u DNA a 1000 nukleotidů u RNA. Cirkulující nádorové DNA jsou dlouhé několik desítek až stovek párů bází. Volně cirkulující miRNA má potenciál poskytovat biomarker pro určité druhy rakoviny. Volně cirkulující DNA se v plazmě člověka vyskytuje v koncentraci 1-100 ng/ml. [75] Tento postup slouží k izolaci a přečištění volně cirkulující DNA z lidské plazmy.

Před zahájením purifikace bylo potřeba udělat několik přípravných kroků. Vzorky plazmy byly rozmrazeny a vytemperovány na laboratorní teplotu. Vzorky, s objemem plazmy menším než 2 ml, byly doplněny do 2 ml příslušným množstvím fyziologického roztoku pufovaným fosfátem (1x PBS). Zařízení QIAvac 24 plus pro vakuovou izolaci bylo sestaveno a byla otestována dokonalé utěsnění systému, bylo zapnuto vyhřívání vodní lázně nebo vyhřívacího bloku na 60 °C pro 50 ml centrifugační zkumavky a nastaven vyhřívací blok na 56 °C pro 2 ml odběrové zkumavky. Pufr AVE byl vytemperován na pokojovou teplotu. Před prvním použitím byly připraveny pufrы ACB, ACW1 a ACW2 podle následujících pokynů. Přidat 200 ml isopropanolu (100%) do 300 ml pufru ACB, přidat 25 ml ethanolu (96 – 100%) do 19 ml pufru ACW1 a přidat 30 ml ethanolu (96 – 100%) do 13 ml pufru ACW2. Jako poslední přípravný krok bylo zapotřebí přidat nosičovou RNA rekonstituovanou v pufru AVE do pufru ACL podle pokynů v tabulce 1.

Tabulka 1 - Objemy pufru ACL a nosičové RNA (rozpuštěné v pufru AVE) potřebné pro zpracování 2 ml vzorku plazmy.

Počet vzorků	Pufr ACL [ml]	Nosičová RNA v pufru AVE [μl]	Počet vzorků	Pufr ACL [ml]	Nosičová RNA v pufru AVE [μl]	Počet vzorků	Pufr ACL [ml]	Nosičová RNA v pufru AVE [μl]
1	1,8	5,6	9	15,8	50,6	17	29,9	95,6
2	3,5	11,3	10	17,6	56,3	18	31,7	101,3
3	5,3	16,9	11	19,4	61,9	19	33,4	106,9
4	7,0	22,5	12	21,1	67,5	20	35,2	112,5
5	8,8	28,1	13	22,9	73,1	21	37,0	118,1
6	10,6	33,8	14	24,6	78,8	22	38,7	123,8
7	12,3	38,4	15	26,4	84,4	23	40,5	129,4
8	14,1	45,0	16	28,2	90,0	24	42,2	135,0

Po přípravě pufru ACL s nosičovou RNA rozpuštěnou v AVE pufru započal postup purifikace. Vzorky plazmy byly centrifugovány při 16 000x g po dobu 10 minut pro odstranění případných zbylých buněk a buněčných fragmentů. Bylo napipetováno 200 µl QIAGEN Proteinase K do 50 ml centrifugační plastové falkony. Do 50 ml falkony s Proteinazou K byly přidány 2 ml plazmy. Následně bylo přidáno 1,6 ml pufru ACL (obsahujícího 1,0 µg nosičové RNA). Falkony s připravenou lyzační směsí byly uzavřeny a zvortexovány po dobu 30 sekund. Bylo nezbytné, aby se ve zkumavce vytvořil viditelný vír, k zajištění účinného zlyzování. Falkony byly poté inkubovány ve vodní lázni nebo vyhřívaném bloku při 60 °C po dobu 30 minut.

Po inkubaci byly falkony umístěny do flowboxu a k lyzátu bylo přidáno 3,6 ml pufru ACB. Falkony byly uzavřeny a důkladně zvortexovány po dobu 15-30 sekund. V dalším kroku byly falkony se směsí inkubovány po dobu 5 minut na ledu. Během inkubace byly vloženy kolony QIAamp Mini do VacConnectoru na QIAvac 24 plus. Do otevřených QIAamp Mini kolonek byly vloženy 20 ml nástavce.

Po inkubaci byla směs lyzátu a pufru ACB přenesena do nástavce zkumavky QIAamp Mini. Bylo zapnuto vakuové čerpadlo a jakmile byly všechny lyzáty odsáty skrz kolonu, byla vypnuta vývěva a tlak byl uvolněn na 0 mbar. Nástavce na kolonách byly opatrně byly zlikvidovány, tak aby nedošlo ke kontaminaci mezi jednotlivými vzorky. Na kolonky bylo nanášeno 600 µl pufru ACW1. Víčko kolony bylo ponecháno otevřené a bylo zapnuto vakuové čerpadlo. Po projití veškerého pufru ACW1 přes kolonu QIAamp Mini bylo vypnuto vakuové čerpadlo a tlak byl uvolněn na 0 mbar. Následně bylo nanášeno 750 µl pufru ACW 2 a zopakoval se postup stejný jako při nanášení pufru ACW1. Po promývacích pufrech bylo na kolonky nanášeno 750 µl etanolu (96-100%), kterým byly kolonky finálně promyty.

Kolonka byla vyjmuta z vakuového systému. Kolonka QIAamp Mini byla umístěna do čisté 2 ml zkumavky a centrifugovány při plné rychlosti, což je 20 000x g po dobu 3 minut. QIAamp Mini kolonka byla umístěna do nové 2ml sběrné zkumavky a inkubována v zahřívacím bloku při 56 °C po dobu 10 minut do úplného vysušení membrán. Vysušená kolonka byla umístěna do čisté 1,5ml eluční zkumavky. Pro eluci navázané ctDNA bylo na střed kolonky napipetováno 55 µl pufru AVE. Kolonka byla inkubována se zavřeným víčkem po dobu 3 minut při laboratorní teplotě. V posledním kroku byla kolonka centrifugována při 20 000x g po dobu 1 minuty. Eluovaná ctDNA byla uchována do doby testování při 4 °C pro krátkodobé skladování a při -20 °C pro dlouhodobé uskladnění. [75]

4.4.3 Izolace genomické DNA ze vzorků v parafínovém bločku

Pro izolaci genomické DNA bylo pomocí manuálního sáňkového mikrotomu čerstvě nakrájeno 4-6 řezů/vzorek (10 µm) z příslušných FFPE bločků. Před izolací DNA byly nastaveny dva vyhřívací bloky na 56 °C a na 90 °C, byla rozmrazena připravená proteináza K, nebo byla proteináza K připravena

naředěním 4,5 ml RNA vody. Zkumavky s připravenými vzorky biopsií v parafinovém bločku byly nejprve zcentrifugovány, aby se usadil parafin na dně zkumavky a zamezilo se tak kontaminaci vzorků.

Do popsané zkumavky se vzorkem bylo přidáno 500 μ l xylenu. Obsah zkumavky byl zvortexován a byla provedena inkubace po dobu 5 minut. Do zkumavky bylo přidáno 500 μ l ethanolu, obsah zkumavky byl zvortexován a byla provedena další inkubace po dobu 5 minut. Obsah zkumavky byl zcentrifugován při 20 000x g po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl ze zkumavky odstraněn supernatant do odpadní falkony. K sedimentu byl přidán 1 ml ethanolu a obsah zkumavky byl důkladně zvortexován.

V dalším kroku byla provedena centrifugace při 20 000x g po dobu 2 minut. Ze zkumavky byl odstraněn supernatant. Sediment ve zkumavce byl vysušen na vyhřívacím bloku při 56 °C po dobu 10 minut. V případě, že ve vzorku bylo přítomno velké množství tkáně bylo potřeba v průběhu sušení odsát případnou vyskytující se vodu a sediment důkladně dosušit. Z kitu bylo do vysušených sedimentů přidáno 180 μ l DNA TLB. Následně bylo přidáno 70 μ l proteinázy K, obsah zkumavky byl zvortexován a zkumavky byly přeneseny do vyhřívacího bloku, kde proběhla inkubace při 56 °C po dobu 60 minut.

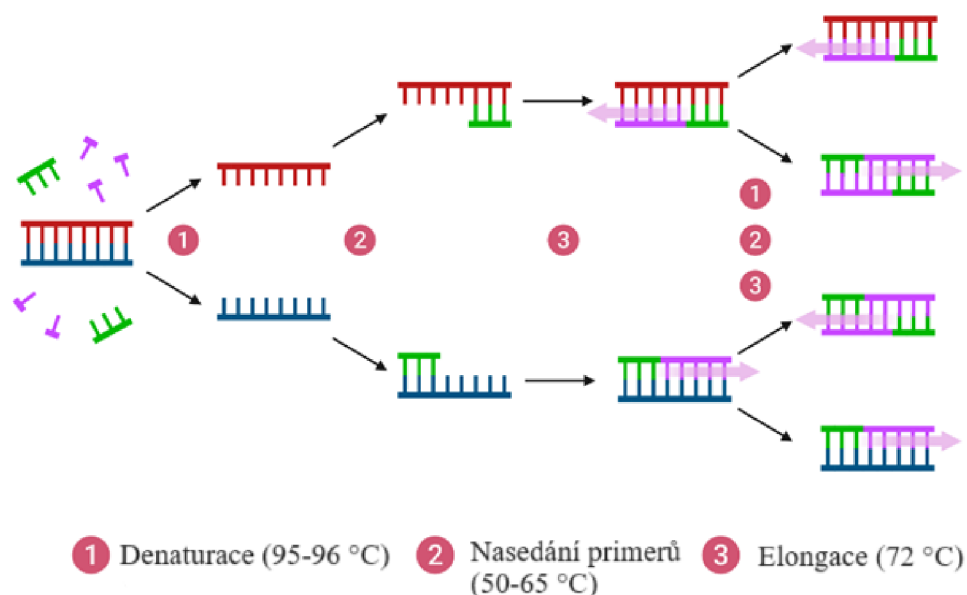
Po uplynutí inkubace byl obsah zkumavky zvortexován a zkumavky byly přemístěny do druhého vyhřívacího bloku, kde proběhla druhá inkubace při 90 °C po dobu 60 minut. Během inkubace byly připraveny promývací zkumavky z kitu a eluční zkumavky o objemu 1,5 ml. Byly připraveny 3 řady odpadních zkumavek z kitu, 1 řada 1,5ml zkumavek bez vršku a 1 řada popsaných zamrazovacích zkumavek. Zkumavky se po inkubaci nechaly zchladnout a následně byly zvortexovány a krátce zcentrifugovány. K obsahu zkumavky bylo přidáno z kitu 200 μ l PBB pufru. Obsah zkumavky byl zvortexován a následně inkubován po dobu 10 minut. Do zkumavky bylo přidáno 100 μ l isopropanolu, obsah byl propipetován a přenesen na kolonku. Jako další krok proběhla centrifugace při 8 000x g po dobu 1 minuty.

Kolonka byla přenesena do nové odpadní zkumavky a bylo přidáno 500 μ l pufru WB I. Při použití nového kitu je potřeba přidat k pufru WB I 15 ml ethanolu. Poté byla provedena centrifugace při 8 000x g po dobu 1 minuty. Kolonka byla přenesena do nové odpadní zkumavky a na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru WB II. Při použití nového kitu je potřeba přidat k pufru WB II 50 ml ethanolu. Následně byla provedena centrifugace při 8 000xg po dobu 1 minuty. Kolonka byla přenesena do nové odpadní zkumavky, která byla následně zcentrifugována při 16 000x g po dobu 1 minuty. Kolonka byla přenesena do nové 1,5ml zamrazovací zkumavky. Na kolonku bylo přidáno 100 μ l elučního pufru do středu membrán. Proběhla inkubace po dobu 5 minut a jako poslední krok byla provedena centrifugace při 8 000x g po dobu 1 minuty.

4.4.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z *angl.* polymerase chain reaction) se využívá k amplifikaci konkrétních sekvencí DNA. Při klasické PCR je amplifikovaný produkt detekován v koncovém bodu reakce např. pomocí elektroforetických metod, zatímco u PCR v reálném čase (real time PCR) se přítomnost amplifikačního produktu měří v průběhu reakce. Při PCR v reálném čase se kombinuje klasická PCR a fluorescenční reportérová chemie pro sledování amplifikace. Hlavní výhodou této metody PCR je, že je možné kvantifikovat vstupní počet kopií templátové DNA. Výsledky PCR v reálném čase dělíme na kvalitativní (zjišťuje se přítomnost nebo nepřítomnost sekvence) a kvantitativní (zjišťuje se počet kopií). [50], [76]

Průběh PCR reakce můžeme rozdělit do tří kroků. Prvním krokem při průběhu PCR reakce je denaturace. Vzorek DNA se zahřeje na vysokou teplotu, většinou se využívá teplota kolem 94-98 °C. Vysoká teplota způsobí rozdělení dvouvláknové DNA na jednovláknové řetězce rozrušením vodíkových můstků mezi vlákna DNA. Po denaturaci nastává krok, kdy na jednovláknovou DNA nasedají komplementární primery. Primery jsou krátké úseky DNA, které jsou komplementární k cílové sekvenci. V anglické literatuře se tato část nazývá *annealing*. Během tohoto kroku se teplota snižuje na 50-65 °C. Poslední část PCR se nazývá elongace. V této fázi se teplota opět zvyšuje, a to obvykle na 72 °C. Při této teplotě se aktivuje DNA polymeráza (viz obrázek 6). DNA polymeráza je enzym, který je schopen se vázat na primery a slouží k syntéze nového vlákna DNA. Výsledkem jednoho cyklu PCR reakce jsou dvě nové dvouvláknové molekuly DNA, které jsou identické s původní DNA. [76], [77]



Obrázek 6 - Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR)

Při PCR reakci musí být přítomno několik základních složek. Je nutné, aby směs obsahovala DNA vzorek, který obsahuje cílovou sekvenci, která bude následně amplifikována. Další složkou jsou

primery. Primery jsou krátké oligonukleotidy, které mají schopnost vázat se na cílové oblasti DNA. DNA polymeráza je enzym katalyzující syntézu nových vláken DNA. Nejčastěji se u PCR reakcí setkáme s Taq polymerázou. Další nezbytnou složkou PCR reakce jsou nukleotidy (dNTPs). Nukleotidy jsou stavební bloky DNA a účastní se syntézy nových DNA řetězců. Do reakční směsi se přidává pufr, který slouží k udržení optimálního pH a iontové síly. Poslední nezbytná složka je magnesium ($MgCl_2$). Magnesium je kofaktor pro aktivitu DNA polymerázy. [77]

Před PCR reakcí je potřeba si připravit master mix (viz tabulka 2). Master mix obsahuje 10x pufr, H_2O , dNTPs (25mM), HPV16 E6_v9 P/P (9/2,5 μM), GAPDH P/P (5/5 μM) a HotStart Taq polymerázu (5U). Do mikrozkušavky bylo přidáváno 15 μl master mixu a 5 μl DNA. Výsledný objem na reakci byl 20 μl . Po napipetování všech potřebných složek byl na PCR cyklu nastaven protokol na BioRad CFX 96 (FAM, HEX). V prvním kroku proběhla aktivace enzymu při 95 °C po dobu 15 min. Následovalo 45 cyklů denaturace (94 °C, 30 s) a annealingu/elongace (60 °C, 1 min). Na konci každého kroku byl odečten fluorescenční signál. Při vyhodnocení detekce ctHPV16 DNA byl použit neměnný tresh-hold pozitivní reakce pro všechny stanovení – 100 RFU (relativní fluorescenční jednotka).

Tabulka 2 - Příprava směsi pro PCR reakci

	1 reakce [μl]	6 reakcí [μl]
10x pufr	2	12
H_2O	6,24	37,44
dNTPSs (25 mM)	0,16	0,96
HPV16 E6_v9 P/P (9/2,5 μM)	2	12
GAPDH P/P (5/5 μM)	0,4	2,4
HotStart Taq polymerázu (5U)	0,2	1,2
DNA	9	-
Výsledný objem	20	-

5 Výsledky

5.1. Souhrnná charakteristika pacientů účastnících se studie

Do studie bylo zařazeno celkem 59 pacientů s dříve diagnostikovaným orofaryngeálním nádorem, kteří byli ve fázi sledování po dokončení léčby. U pacientů byly v pravidelných intervalech odebrány vzorky krve a byly vyžádány FFPE bločky s primární nádorovou tkání pro určení HPV statusu a současnou genotypizaci HPV typů v HPV-asociovaných OPSCC. Z 59 pacientů, zařazených do studie, bylo 41/59 (69,5 %) mužů a 18/59 (30,5 %) žen (viz. Tabulka č. 2). Vzhledem k tomu, že byli pacienti zařazováni do studie v různých fázích sledování a vzorky nebyly shromažďovány před začátkem této práce, každý pacient podstoupil jiný počet lékařských prohlídek a odběrů vzorků. Celkově za dobu trvání této práce podstoupilo 23 pacientů jednu prohlídku (39 %), 17 pacientů dvě prohlídky (28,8 %), 10 pacientů tři prohlídky (16,9 %), 4 pacienti čtyři prohlídky (6,8 %) a 5 pacientů podstoupilo pět prohlídek (8,5 %).

Většina primárních nádorů byla lokalizována v oblasti mandlí (tonzil) a to konkrétně 43/59 nalezených nádorů (72,9 %). Nádor v oblasti kořene jazyka byl lokalizován u 9/59 pacientů (15,3 %). Nádor v oblasti boční stěny hltanu byl nalezen pouze u jednoho pacienta (1,7 %), stejně tak jak v případě nálezu v oblasti zadní stěny hltanu (1,7 %), horní části ústní dutiny (1,7 %) a dolní části ústní dutiny (1,7 %).

Na základě výsledků HPV testování v primární nádorové tkáni a detekce p16 pomocí imunohistochemie (viz Tabulka 2) bylo 52/58 (89,7 %) primárních OPSCC klasifikováno jako HPV-asociovaných OPSCC (HPV+/p16+) a 7/58 (10,3 %) bylo HPV-neasociovaných OPSCC (HPV-/p16-). U jednoho pacienta nebylo možné vyhodnotit HPV status, vzhledem k chybějícím údajům z analýzy p16 exprese, ačkoliv HPV detekce v primární tkáni byla negativní. Diskordantní výsledky HPV+/p16- a HPV-/p16+ nebyly ve zkoumané kohortě zaznamenány.

Tabulka 3 - Souhrnná charakteristika pacientů účastnících se studie

Charakteristika		Počet pacientů	%
Kohorta	Retrospektivní	59	100,0 %
Pohlaví	Muž	41	69,5 %
	Žena	18	30,5 %
Věk*	Medián věku	60,5 let	-
	Nejmladší pacient	40 let	-
	Nejstarší pacient	78 let	-
Kompletní prohlídky	Jedna	23	39,0 %
	Dvě	17	28,8 %
	Tři	10	16,9 %
	Čtyři	4	6,8 %
	Pět	5	8,5 %
Lokalizace tumoru	Tonzila	43	72,9 %
	Boční stěna hltanu	1	1,7 %
	Zadní stěna hltanu	1	1,7 %
	Kořen jazyka	9	15,3 %
	Horní část ústní dutiny	1	1,7 %
	Spodní část ústní dutiny	1	1,7 %
	Neznámé primární místo	3	5,0 %
HPV status	HPV+/p16+ **	52	89,7 %
	HPV+/p16- **	-	-
	HPV-/p16+	-	-
	HPV-/P16-	6	10,3 %
	Není známo	1	-

* Věk v čase diagnózy, ** HPV – asociovaný karcinom OPSCC

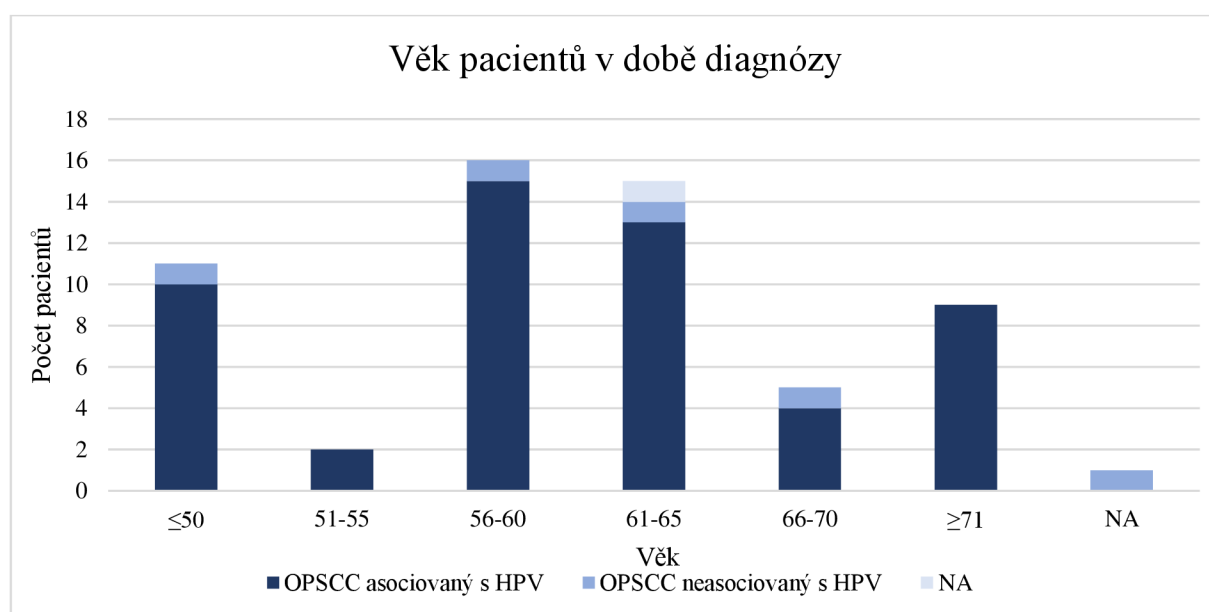
5.2 Věk pacientů v době diagnózy

Pacienti s dříve diagnostikovaným OPSCC byli k datu diagnózy ve věkovém rozpětí 40-78 let. Medián věku pacientů v době diagnózy byl 60,5 let. U jednoho pacienta nebylo možné kvůli chybějícím údajům určit přesný věk při diagnóze a z této analýzy byl vyřazen. Vyšetřených pacientů mladších než 50 let bylo 11 (19 %), z toho mělo 10 pacientů HPV-asociovaný OPSCC. Pacienti v rozmezí od 51 do 55 let byli 2 (3,4 %), oba měly HPV pozitivní nález. Pacientů ve věkovém rozmezí 56-60 let bylo 16 (27,6 %), z toho 15 pacientů měla HPV-asociovaný nádor. Pacientů ve věkovém rozmezí od 61 do 65 let bylo 15 (25,9 %), z toho mělo 13 pacientů HPV-asociovaný OPSCC, 1 pacient měl HPV-neasociovaný OPSCC a u jednoho pacienta nebyla HPV status určen. Pacientů ve věkovém rozmezí 66-70 let bylo 5 (8,6 %), z toho 4 pacienti byli s HPV-asociovaným OPSCC. Pacientů starších než 71 bylo 9 (15,5 %) a všichni měli HPV-asociovaný nádor (viz Tabulka 3 a Graf 3).

Tabulka 4 - Věk pacientů v době diagnózy a jejich HPV status

Věk	OPSCC asociovaný s HPV	OPSCC neasociovaný s HPV	NA	Počet pacientů celkem
≤50	10 (91 %)	1 (9 %)	-	11 (19 %)
51-55	2 (100 %)	-	-	2 (3,4 %)
56-60	15 (93,8 %)	1 (6,2 %)	-	16 (27,6 %)
61-65	13 (86,7 %)	1 (6,7 %)	1 (6,7 %)	15 (25,9 %)
66-70	4 (80 %)	1 (20 %)	-	5 (8,6 %)
≥71	9 (100 %)	-	-	9 (15,5 %)
NA	-	1	-	-

Graf 3 - Věk pacientů v době diagnózy vyjádřen ve sloupcovém grafu



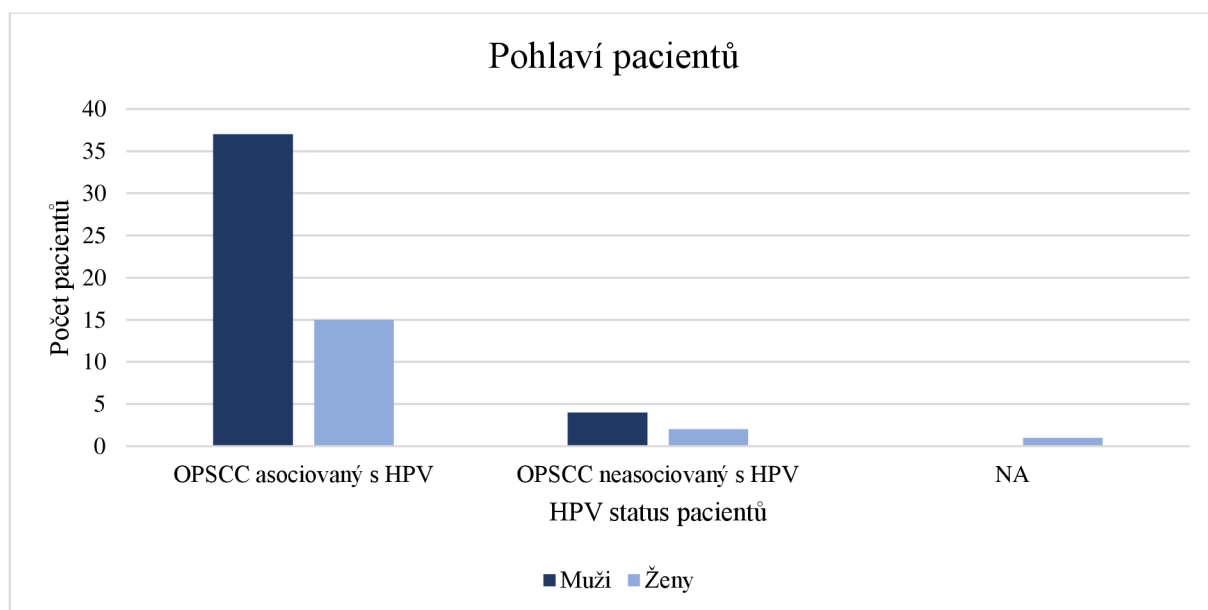
5.3 Pohlaví pacientů

Pacientů účastnících se studie bylo celkem 59, z toho bylo 41 mužů (69,5 %) a 18 žen (30,5 %). Z mužů mělo 37 pacientů HPV-asociovaný OPSCC (90,2 %) a 4 muži měli HPV-neasociovaný OPSCC (9,8 %). Z 18 žen mělo 15 HPV-asociovaný OPSCC (88,2 %), 2 ženy měly HPV-neasociovaný OPSCC (11,8 %) a u jedné ženy nebylo možné určit HPV status (viz Tabulka 4 a Graf 4).

Tabulka 5 - Pohlaví pacientů s OPSCC a jejich HPV status

Pohlaví	OPSCC asociovaný s HPV	OPSCC neasociovaný s HPV	NA
Muži	37 (90,2 %)	4 (9,8 %)	-
Ženy	15 (88,2 %)	2 (11,8 %)	1

Graf 4 - Pohlaví pacientů s OPSCC a jejich HPV status vyjádřené ve sloupkovitém grafu



5.4 Charakteristika nádorů

K popisu charakteristiky nádorů slouží TNM klasifikace maligních nádorových onemocnění. [68] Písmeno T označuje velikost a rozsah primárního nádoru. Písmeno N označuje přítomnost a rozsah postižení regionálních lymfatických uzlin nádorem. Písmeno M označuje přítomnost a rozsah metastáz. Metastázy jsou sekundární nádory vzdálené od primárního nádoru.

Studie se účastnilo 59 pacientů s OPSCC. U jednoho pacienta nebylo možné identifikovat rozsah primárního nádoru. U 7 pacientů byl zjištěn rozsah primárního nádoru 0 a všichni tito pacienti měli HPV-asociovaný karcinom. U 37 pacientů byl zjištěn rozsah primárního nádoru 1 nebo 2, 34 pacientů mělo HPV-asociovaný OPSCC, 2 pacienti měli HPV-neasociovaný OPSCC a u 1 pacienta nebylo možné určit HPV status. U 11 pacientů byl zjištěn rozsah primárního nádoru 3, kdy 8 pacientů mělo HPV-asociovaný OPSCC a 3 pacienti měli HPV-neasociovaný OPSCC. Rozsah primárního nádoru 4 byl zjištěn u 3 pacientů, kdy pouze jeden z nich měl HPV-neasociovaný OPSCC (viz Tabulka 5).

Z 59 pacientů měli 4 pacienti stupeň N0 (6,8 %), z toho měli 3 HPV-asociovaný OPSCC. Nejvíce pacientů mělo rakovinu ve stupni N1, konkrétně 34 pacientů (57,6 %). Všichni tito pacienti měli rakovinu asociovanou s virem HPV. Rakovinu ve stupni N2 mělo 16 pacientů (27,1 %), z toho 11 pacientů mělo HPV-asociovaný OPSCC, 4 pacienti měli HPV-neasociovaný OPSCC a u jednoho pacienta nebylo možné určit HPV status. U 4 pacientů byl zjištěn stav rakoviny N3 (6,8 %), z toho měli 3 pacienti HPV-asociovaný OPSCC. U jednoho pacienta nebylo možné určit N stupeň. (viz tabulka 5 a graf 5).

U 57 z 59 pacientů nebyly nalezeny metastázy v jiné části těla (96,6 %). Z těchto 57 pacientů mělo 51 pacientů HPV-asociovaný OPSCC, 5 pacientů mělo HPV-neasociovaný OPSCC a u jednoho

pacienta nebylo možné HPV status určit (1,7 %). U jednoho pacienta se vyskytovala metastáze a tento pacient měl HPV-neasociovaný OPSCC. U jednoho pacienta nebylo možné určit stupeň M (1,7 %) (viz tabulka 5 a graf 5).

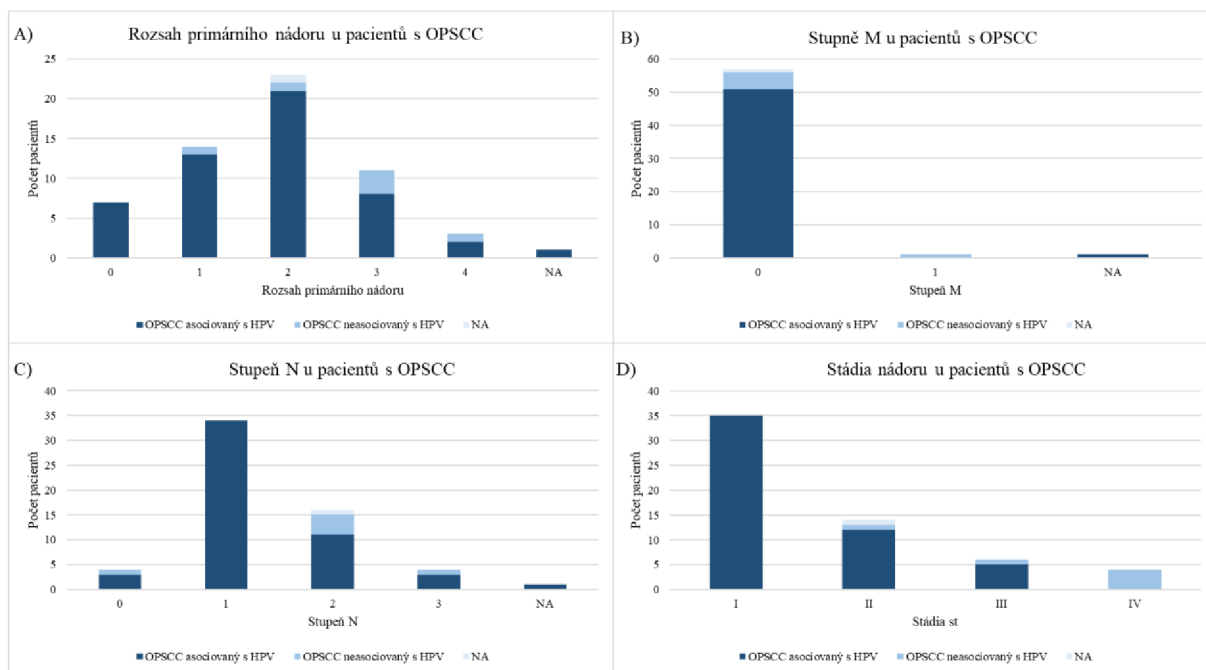
Tabulka 6 - Souhrnná charakteristika nádorů

Charakteristika nádorů		OPSCC asociovaný s HPV	OPSCC neasociovaný s HPV	NA	Počet pacientů celkem	Vyjádřeno v procentech
T	0	7	-	-	7	12,0 %
	1	13	1	-	14	24,1 %
	2	21	1	1	23	39,7 %
	3	8	3	-	11	19,0 %
	4	2	1	-	3	5,2 %
	NA	1	-	-	1	-
N	0	3	1	-	4	6,9 %
	1	34	-	-	34	58,6 %
	2	11	4	1	16	27,6 %
	3	3	1	-	4	6,9 %
	NA	1	-	-	1	-
M	0	51	5	1	57	98,3 %
	1	-	1	-	1	1,7 %
	NA	1	-	-	1	-

Z 59 pacientů mělo 35 pacientů tumor ve stádiu I (59,3 %), všichni tito pacienti měli HPV-asociovaný OPSCC. Ve stádiu II se nacházelo 14/59 (23,7 %) pacientů a 12 z nich mělo HPV-asociovaný OPSCC, 1 pacient měl HPV-neasociovaný OPSCC a u jednoho pacienta nebylo možné určit HPV status. Ve stádiu III se nacházelo 6/59 (10,2 %) pacientů a 5 z nich mělo HPV-asociovaný OPSCC. U 4/59 (6,8 %) bylo onemocnění diagnostikováno v různých stupních stadia IV. U všech čtyř pacientů byla zjištěna přítomnost HPV-neasociovaného OPSCC. U 2/4 pacientů s HPV-neasociovaným OPSCC bylo stadium IVa, u 1/4 OPSCC bylo stadium IVb a u 1/4 OPSCC bylo stadium IVc.

Tabulka 7 - Klasifikace OPSCC nádorů podle klinického stádia (* - u HPV-neasociovaných OPSCC rozlišujeme stadium 4 do tří skupin – 4A, 4b, 4c)

Stádium	OPSCC asociovaný s HPV	OPSCC neasociovaný s HPV	NA	Počet pacientů celkem	%
1	35	-	-	35	59,3 %
2	12	1	1	14	23,7 %
3	5	1	-	6	10,2 %
4	-	4*	-	4	6,8 %

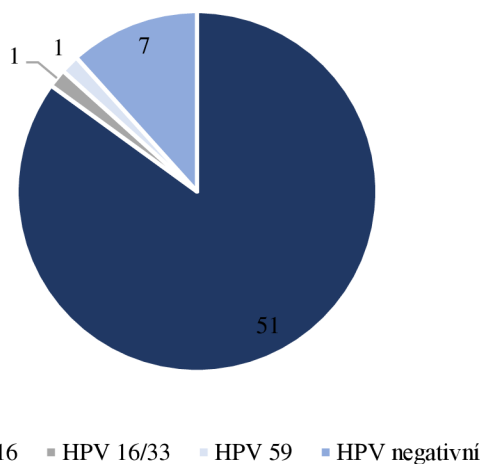


Graf 5 - Charakteristika nádorů, rozdělená podle HPV statusu a TNM klasifikace: A – Rozsah primárního nádoru (T) u pacientů s OPSCC, B – přítomnost vzdálených metastáz (M), C – metastazování v regionálních mízních uzlinách (N), D – klinické stadium maligního

5.5 HPV genotypizace v primární nádorové tkáni

Detekci HPV DNA v primárních nádorových tkáních bylo zjištěno, že 52 pacientů mělo HPV-asociovaný nádor a 7 pacientů mělo nádor HPV-neasociovaný (viz Tabulka 2). Ve skupině HPV-asociovaný OPSCC byl u 50/52 (96,2 %) HPV-asociovaný OPSCC detekována přítomnost HPV16 genotypu v primární nádorové tkáni. U 1/52 (1,9 %) HPV-asociovaný OPSCC byly detekovány současně dva vysoce rizikové HPV typy – HPV 16 a 33. U 1/52 (1,9 %) HPV-asociovaný OPSCC byl detekovaný genotyp HPV 59 (viz Graf č.6).

Detekované HPV genotypy z FFPE u pacientů s OPSCC



Graf 6 - Detekované HPV genotypy z FFPE u pacientů s OPSCC v koláčovitém grafu

5.6 Detekce cirkulující HPV DNA ve vzorcích plazmy

Cirkulující nádorová HPV DNA (ctHPV DNA) může sloužit jako citlivý biomarker včasného zachytu recidivujícího onemocnění. Jestliže byl nádor vyskytující se u pacienta s HPV-asociovaným OPSCC, lze poté při pravidelných kontrolách po dokončení léčby na základě detekce ctHPV DNA predikovat riziko rozvoje nebo již existující recidivu. U pacientů byla provedena ve všech dostupných odběrech specifická detekce cirkulující nádorové HPV16 DNA. Recidiva onemocnění byla klinicky potvrzena u 5 pacientů s OPSCC účastnících se studie. Tři z těchto pacientů měli HPV16 pozitivní nádor a byla u nich detekována cirkulující nádorová HPV16 DNA v plazmě. Jeden pacient s recidivou měl HPV-neasociovaný nádor. A jeden pacient měl HPV16 asociovaný nádor, ale podstoupil pouze jeden krevní odběr, kde byl výsledek na cirkulující nádorové HPV16 DNA negativní (viz Tabulka 7). U dalších sedmi pacientů byla v alespoň jednom odběru detekována ctHPV16 DNA, ale nebylo klinicky potvrzeno recidivující onemocnění. U 4/7 těchto pacientů byla v následujících odběrech detekce ctHPV16 DNA negativní. U 3/7 pacientů byla detekce ctHPV16 DNA pozitivní v posledním dostupném odběru v rámci této studie.

Tabulka 8 - Detekce cirkulující nádorové HPV16 DNA u pacientů ve fázi sledování po léčbě, charakteristika primárního nádoru (HPV typ a HPV status) a výskyt recidivujícího onemocnění.

ID Pacienta	Odběr č.					HPV typ	HPV status	Recidiva
	1	2	3	4	5			
1	Neg.	NA	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
2	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
3	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-

4	Poz.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
5	Neg.	-	-	-	-	Neg.	HPV-/p16-	Ano
6	Neg.	NA	NA	Neg.	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
7	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16, 33	HPV+/p16+	-
8	NA	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
9	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
10	NA	Neg.	Neg.	Neg.	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
11	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	HPV 16	HPV+/p16+	-
12	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
13	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
14	Neg.	-	-	-	-	Neg.	HPV-/p16-	-
15	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
16	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
17	Poz.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
18	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
19	NA	Neg.	Neg.	Neg.	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
20	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
21	NA	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
22	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
23	NA	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
24	NA	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
25	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	-	Neg.	HPV-/p16(NA)	-
26	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	HPV-/p16-	-
27	NA	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
28	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
29	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
30	Neg.	NA	NA	Neg.	Neg.	HPV 16	HPV+/p16+	-
31	NA	Poz.	Poz.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
32	NA	Poz.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
33	NA	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
34	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
35	Poz.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
36	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
37	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
38	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
39	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
40	Poz.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
41	NA	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
42	NA	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
43	NA	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	HPV 16	HPV+/p16+	-
44	Poz.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
45	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
46	Poz.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
47	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
48	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
49	NA	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-

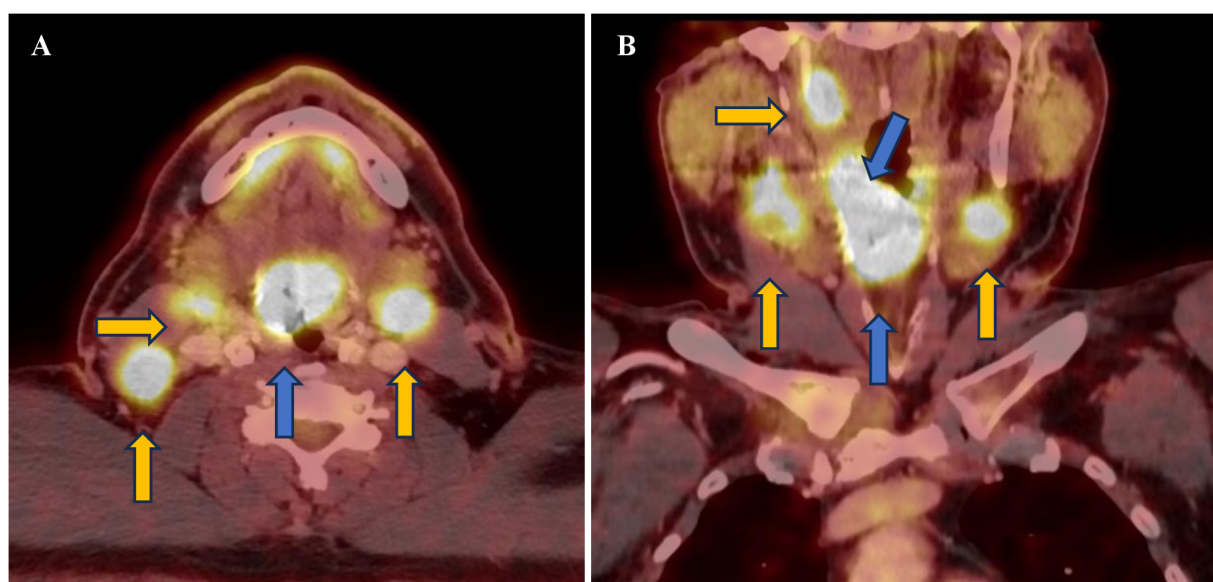
50	Neg.	-	-	-	-	Neg.	HPV-/p16-	-
51	Neg.	-	-	-	-	Neg.	HPV-/p16-	-
52	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
53	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 59	HPV+/p16+	-
54	Neg.	Neg.	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
55	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
56	Neg.	Neg.	Neg.	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
57	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-
58	Neg.	-	-	-	-	Neg.	HPV-/p16-	-
59	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	-

Legenda k tabulce č. 7

- Neg. – negativní detekce ctHPV16 DNA; Poz. – pozitivní detekce ctHPV16 DNA; NA – není dostupný; HPV-/p16- - HPV-neasociovaný nádor; HPV+/p16+ - HPV-asociovaný nádor

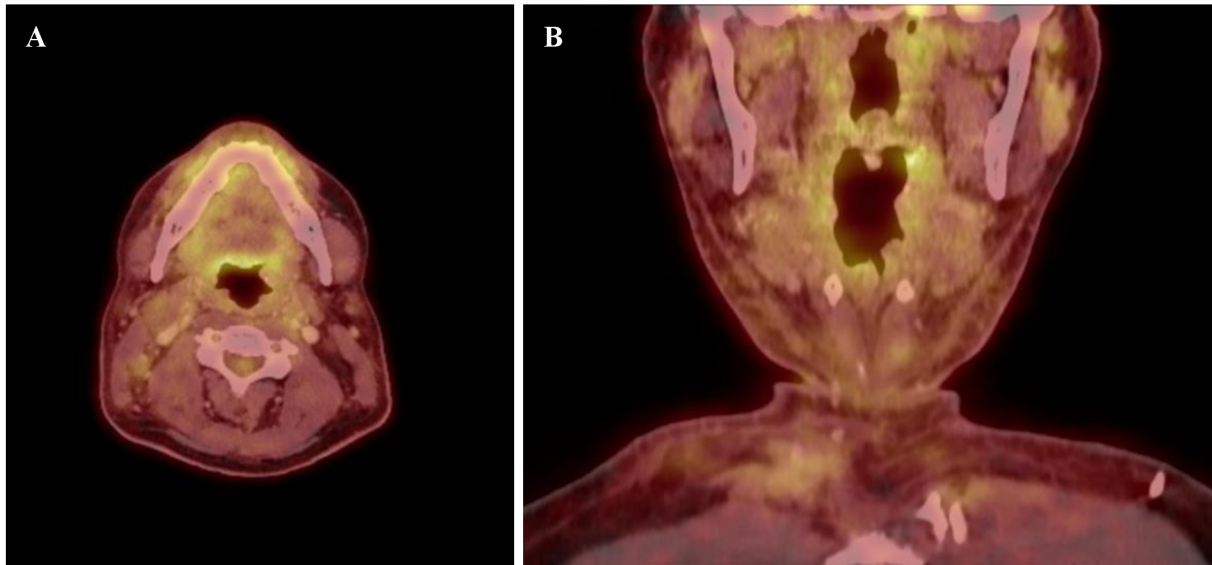
5.7 Detekce recidivy onemocnění

Na obrázku 7, 8 a 9 jsou snímky z pozitronové emisní počítačové tomografie (PET/CT) od pacienta s ID č. 41. U tohoto pacienta byl pozorován recidivující nádor kořene jazyka (BOT, z *angl. base of tongue*), který byl potvrzen v čase druhé návštěvy v rámci této studie, kdy byl taktéž pozitivně testován na přítomnost ctHPV16 DNA. Na obrázku 7 jsou zobrazeny snímky z PET/CT vyšetření pacienta č. 41, kde je zobrazen primární HPV-asociovaný OPSCC, který se nachází v oblasti pravé mandle/kořene jazyka (modré šipky) s oboustranným lokoregionálním šířením do lymfatických uzlinách (žluté šipky). Tyto snímky jsou pořízeny v čase diagnózy. U primárního OPSCC byla zjištěna HPV-pozitivita s přítomností HPV typu HPV16.



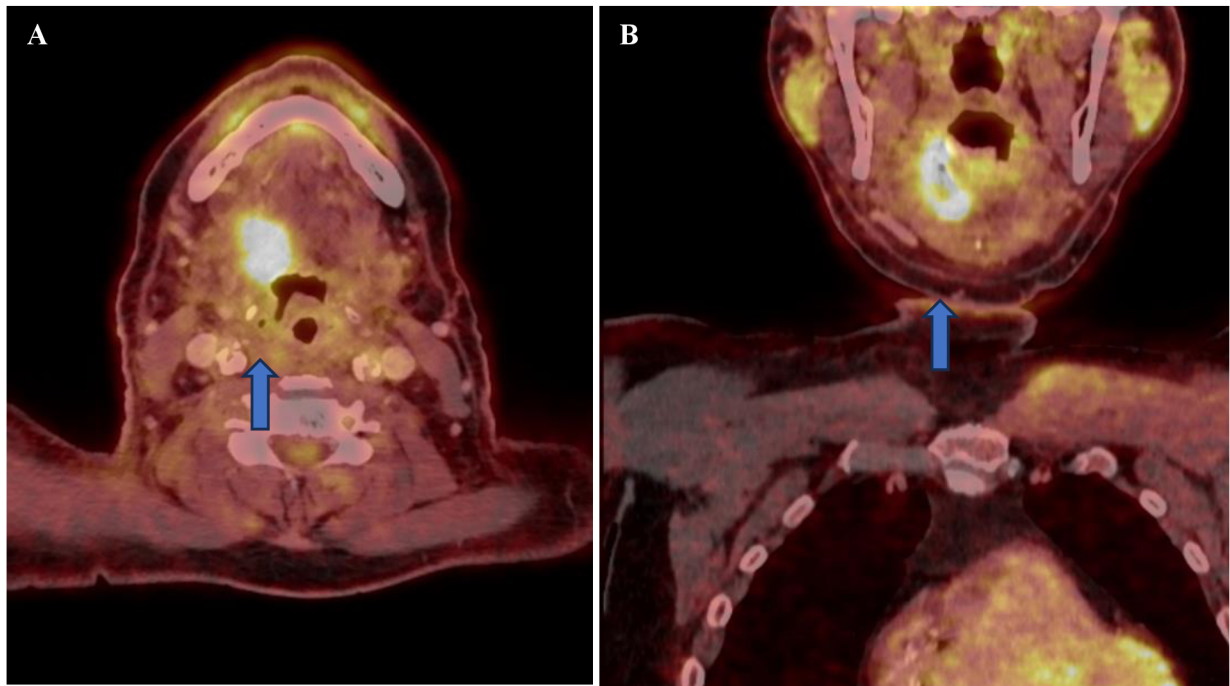
Obrázek 7 - Snímky z PET/CT vyšetření koronálního a axiálního řezu pacienta č. 41 s primárním HPV-asociovaným OPSCC nacházejícím se v oblasti mandlí/kořene jazyka (modré šipky) a s oboustrannými metastázemi v lymfatických uzlinách (žluté šipky).

Na obrázku 8 jsou zobrazeny snímky z kontrolního PET/CT pacienta č. 41, které byly pořízeny po dvou letech od diagnózy s kompletní remisí onemocnění. Na snímcích nejsou viditelné žádné ložiska recidivujícího onemocnění.



Obrázek 8 - Snímky z PET/CT vyšetření koronálního a axiálního řezu pacienta č. 41 po ukončení léčby s kompletní remisí. Snímek byl pořízen dva roky od dokončení terapie)

Na obrázku č. 9 jsou snímky z PET/CT od pacienta č.41 po třech letech od diagnózy. U tohoto pacienta byla v čase druhé návštěvy od zařazení do studie klinicky diagnostikována recidiva v oblasti pravé tonzily a zároveň detekována přítomnost ctHPV16 DNA (krevní odběr z první návštěvy není dostupný). U pacienta byl proveden odběr krve a chirurgická resekce v čase 3. návštěvy. Přítomnost ctHPV16 byla detekována v čase chirurgické resekce postižené tonzily i opakovaně při návštěvách č. 4 a 5, které byly provedeny v měsíčních intervalech po chirurgické resekci recidivy.



Obrázek 9 - Snímky z PET/CT vyšetření koronálního a axiálního řezu pacienta č. 41 s potvrzenou lokoregionální recidivou BOT OPSCC (modré šipky) v čase druhé návštěvy, s detekovatelnou ctHPV16 DNA. Snímky byly pořízeny tři roky od CRT administrace.

Pro lepší přehlednost jsou v tabulce č. 8 uvedeny souhrnné výsledky odběrů u pacientů s potvrzenou recidivou. U pacienta č. 4 byla zjištěna přítomnost ctHPV16 v plazmě a následně byla diagnostikována recidiva v krčních lymfatických uzlinách. U pacienta č. 31 byla detekovatelná ctHPV16 v plazmě, tento pacient měl v roce 2020 HPV-asociovaný OPSCC a v roce 2022 u něho byla zjištěna recidiva v lymfatických uzlinách. I po kompletní remisi onemocnění je však nadále detekovatelná ctHPV16, přestože nebyl pacientovi diagnostikován další viditelný recidivující nádor. Rozbor pacienta č. 41 viz výše. U pacienta č. 52 byl diagnostikován primární HPV-asociovaný nádor v oblasti kořene jazyka, kterému byla po dokončení onkologické léčby diagnostikována recidiva v oblasti lymfatických uzlin (v čase zařazení do studie). V čase zařazení do studie nebyla v plazmě detekovatelná přítomnost ctHPV16 DNA. Následné odběry u pacienta č. 52 nejsou dostupné.

Tabulka 9 - Detekce cirkulující nádorové HPV16 DNA u pacientů s recidivou ve fázi sledování po léčbě, charakteristika primárního nádoru (HPV typ a HPV status) a výskyt recidivujícího onemocnění.

ID pacienta	Odběr č.					HPV typ	HPV status	Recidiva
	1	2	3	4	5			
4	HPV 16	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
31	NA	HPV 16	HPV 16	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
41	NA	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV 16	HPV+/p16+	Ano
52	Neg.	-	-	-	-	HPV 16	HPV+/p16+	Ano

6 Diskuse

V rámci této bakalářské práce byly analyzovány vzorky pacientů s dříve diagnostikovaným OPSCC. U těchto pacientů byla provedena HPV detekce v primární nádorové tkáni, která byla uchována jako biopsie v parafinových bločcích (FFPE). U pacientů zařazených do studie byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky krve, z nichž byla izolována cirkulující nádorová DNA a provedena cílená detekce cirkulující nádorové HPV DNA, která je slibným biomarkerem včasného zachytu recidivujícího onemocnění.

OPSCC jsou ve větší míře diagnostikovány mužům. Z 59 pacientů účastníci se této studie bylo celkem 41 mužů (69,5 %) a 18 žen (30,5 %). Podíl diagnostikovaných OPSCC u mužů a žen se neliší od studií provedených v jiných regionech. Ve studii ze Spojeného království (z období 2002-2011), která zahrnovala 1 474 případů OPSCC, bylo 75 % těchto případů diagnostikováno mužům. [60] Ve studii z Nizozemska z let 1990-2010, která zahrnovala 240 pacientů s OPSCC, bylo 159/240 (66,25 %) pacientů mužského pohlaví. [61] Ve studii, která proběhla ve Francii v letech 2011-2021 byli 78,7 % z pacientů muži. [62] Můžeme tedy konstatovat, že poměr mužů a žen s OPSCC byl v naší studii byl podle očekávání, v souladu s pozorováním v jiných zemích a potvrzuje tím trend vyššího výskytu OPSCC u mužů než u žen.

Pacienti účastníci se této studie byly ve věku od 40 do 78 let v době diagnózy. Medián věku pacientů byl 60,5 let. Podle metaanalýzy je průměrný věk pacientů od 59-67,1 let. [63] Věkový průměr pacientů zahrnutých v této studii odpovídá celosvětovému věkovému průměru pacientů s OPSCC a potvrzuje tedy výsledky z této metaanalýzy. Této studii se účastnilo 11 pacientů (19 %) mladších 50 let, tento údaj nám naznačuje zvyšující se incidenci této formy karcinomu u mladší populace. Tento trend lze pozorovat i v jiných zemích světa, například v Severní Americe. [55], [59]

Prevalence HPV u OPSCC se v jednotlivých studiích liší a to od 20 % do 90 %. [58] Tyto rozdíly mohou být způsobené časovým obdobím, ve kterém byly studie provedeny, jelikož incidence výskytu je v rámci desetiletí dynamická a stále roste. Dalším faktorem, který může mít vliv na rozdíly v HPV-prevalenci u OPSCC napříč studiemi, je země, kde byla studie prováděna, jelikož HPV-asociovaný OPSCC se vyskytuje převážně v zemích s vysokými příjmy. V této studii byla prevalence HPV u OPSCC 89,7 %. Nejvyšší prevalence HPV u OPSCC byla zjištěna v severních zemích, například ve Švédsku. [55] Velmi vysoká prevalence HPV-asociovaný OPSCC v této studii může být dána hodnocením výsledků u malého souboru pacientů v rámci studie, provedené v jednom regionu České republiky. Předpokládáme však, že prevalence HPV u OPSCC se stále zvyšuje a aktuální výsledky v ostatních studiích by nejspíše měly také vyšší hodnoty prevalence.

Většina OPSCC je způsobována typem HPV 16 a vyskytuje se u více než 90 % případů OPSCC asociovaných s HPV. [56] V této studii bylo u 50 z 52 (96,2 %) pacientů s HPV-asociovaným OPSCC

diagnostikován genotyp HPV16. V jednom případě byl diagnostikován genotyp HPV 16 a HPV 33 a u jednoho pacienta byl přítomen genotyp HPV 59. V metaanalýze byla zjištěna přítomnost HPV 16 u 80 % HPV-asociovaných OPSCC. [63] Ve studii ze Spojeného království byla zjištěna přítomnost HPV 16/18 u 93,5 % pacientů. [60] V naší studii je procentuální přítomnost HPV 16 u pacientů s HPV-asociovaným OPSCC vyšší. Tento výsledek může být dán hodnocením výsledků u malého souboru pacientů. Každopádně naše výsledky potvrzují předpoklad, že většina HPV-asociovaných OPSCC je způsobována genotypem HPV 16. Důvod, proč je nejvíce případů spojováno s genotypem HPV 16 je, že genotyp HPV 16 je považován za jeden z nejnonkogennějších genotypů lidských papilomavirů. HPV 16 je velmi nakažlivý a přenáší se přímým kontaktem s infikovanými sliznicemi a má tendenci k lokalizaci v oblasti orofaryngu. To je dáno přítomností specifických slizničních buněk, které jsou náchylnější na infekci papilomaviry. Navíc je orofarynx vystaven vnějšímu prostředí a to znamená, že je zde vyšší pravděpodobnost setkání s lidskými papilomaviry prostřednictvím orálního sexu nebo dalších sexuálních praktik.

Většina primárních nádorů v této studii, konkrétně 43/59 (72,9 %), bylo lokalizováno v oblasti tonzil. Druhá nejčastější lokalizace primárních nádorů byla v oblasti kořene jazyka, v této oblasti se karcinom vyskytoval u 9/59 pacientů (15,3 %). Další zjištěné lokalizace, které byly zjištěny vždy u 1/59 pacientů (1,7 %), byly boční stěna hltanu, zadní stěna hltanu, horní část ústní dutiny, spodní část ústní dutiny. U třech pacientů nebylo možné primární nádor lokalizovat. Ve studii z Nizozemska z let 1990-2010 bylo 83/240 (34,6 %) nádorů lokalizováno v oblasti mandlí, na kořeni jazyka bylo lokalizováno 67/240 (27,9 %) nádorů, na měkkém patře se nacházelo 31/240 (12,9 %) nádorů a v oblasti orofaryngu bylo zjištěno 59/240 (24,6 %) nádorů. [61] Ve studii z Francie z let 2011-2021 bylo v oblasti mandlí lokalizováno 582/1365 (42,6 %) nádorů, v oblasti kořene jazyka bylo 583/1365 (42,7 %) nádorů, v oblasti měkkého patra bylo 131/1365 (9,6 %) nádorů a v oblasti dalších částí orofaryngu se nacházelo 69/1365 (5 %) nádorů. [62]

Jedním z cílů této práce bylo testovat využití monitorování ctHPV DNA pro rychlejší odhalení recidivy HPV-asociovaných OPSCC. V rámci této studie byla klinicky potvrzena recidiva u pěti pacientů, z nichž 4 měli primární HPV-asociovaný OPSCC. Jeden z těchto pacientů měl primární nádor HPV-neasociovaný. Cirkulující nádorová HPV DNA lze detekovat pouze v případě, že primární nádor byl HPV-asociovaný a uvolňuje tedy cirkulující nádorovou HPV DNA do krevního oběhu. U jednoho pacienta s HPV-asociovaným OPSCC nebyla při první návštěvě detekována přítomnost ctHPV16, i přesto byla u pacienta zjištěna recidiva v oblasti lymfatických uzlin. U třech pacientů, kteří měli diagnostikovanou recidivu, bylo možné detekovat ctHPV16 ze vzorků tekuté biopsie. U dvou pacientů odhalila detekce ctHPV16 DNA výskyt recidivujícího onemocnění ve stejném čase, jako bylo potvrzeno klinicky pomocí zobrazovacích metod. U těchto pacientů nejsou dostupné předešlé odběry z doby zařazení do studie, v nichž by bylo možné provést analýzu přítomnosti ctHPV16 DNA ještě před klinickým potvrzením recidivy. U jednoho pacienta byla opakovaně detekována přítomnost ctHPV16

DNA, i přesto že je pacient v celkové remisi. Detekce ctHPV DNA u pacientů v dlouhodobé remisi může poukazovat reziduální onemocnění nebo velmi časnou fázi recidivujícího onemocnění, které ještě není možné klinicky potvrdit ani pomocí nejmodernějších zobrazovacích metod. [69] Tyto pozorování potvrzují predikci, že cirkulující nádorová DNA může být využívána jako biomarker pro sledování nádorů. Může díky ní být monitorován výskyt recidivy u pacientů s HPV-asociovaným OPSCC. Tato studie byla prováděna na úzkém souboru pacientů, ve které bylo pouze u čtyř pacientů s primárním HPV-asociovaným OPSCC klinicky potvrzeno recidivující onemocnění. U 20 % pacientů dojde k rozvoji recidivy v rozmezí prvních dvou let po dokončení léčby. U některých pacientů účastnících se této studie ještě neuběhly dva roky od diagnózy a je tedy možné, že recidiva onemocnění se teprve objeví. To platí i u pacientů, u kterých byla detekována ctHPV v některých z odběrů, kde recidiva nebyla doposud klinicky potvrzena, ale recidiva se může teprve objevit.

Analýzou dat této práce byly zjištěny podobné trendy v problematice orofaryngeálních nádorů jako v jiných zahraničních studiích. V testované skupině pacientů, dříve diagnostikovaných s orofaryngeálním nádorem (medián věku v čase diagnózy - 60,5 let), bylo zastoupeno větší množství mužů v porovnání s ženami (69,5 % muži vs. 30,5 % ženy). Se zjištěnou prevalencí 89,7 % HPV-asociovaných OPSCC (v rámci testované kohorty) se řadíme mezi státy s vyšším zastoupením HPV-asociovaných OPSCC v porovnání s HPV-neasociovanými OPSCC, které jsou nejčastěji spojovány s rizikovými faktory, jako je kouření a konzumace alkoholu. Dle jiných studií je většina HPV-asociovaných OPSCC vyvoláno genotypem HPV 16, což bylo potvrzeno i v případě naší studie. Bylo totiž zjištěno, že 96,2 % z HPV-asociovaných OPSCC bylo způsobeno právě tímto vysoce rizikovým onkogenním genotypem. Bylo také potvrzeno, že cirkulující nádorová HPV DNA by mohla v budoucnu sloužit jako důležitý biomarker v klinické praxi onkologické diagnostiky pro rychlý záchyt recidivy onemocnění. Pro dosažení přesnějších výsledků, nezbytných pro možné zavedení tohoto testování v klinické laboratorní praxi, je však žádoucí rozšíření testované kohorty v rámci multicentrické studie.

7 Závěr

Výsledky prezentované v této bakalářské práci jsou důkazem toho, že je možné identifikovat pacienty s recidivou HPV-asociovaných OPSCC nebo pacienty, u nichž je pravděpodobně přítomné reziduální onemocnění, pomocí detekce ctHPV DNA z tekutých biopsií, konkrétně z krevní plazmy.

Do studie byli zařazeni pacienti s diagnostikovaným OPSCC, u nichž byly testovány vzorky primární nádorové tkáně a pravidelně odebírány vzorky krevní plazmy. U těchto vzorků byla provedena detekce HPV DNA v primární nádorové tkáni a genotypizace onkogenních HPV typů. Ze vzorků plazmy byla izolována a následně detekována cirkulující nádorová HPV DNA. V testované kohortě pacientů bylo převažující množství mužů (69,5 %) v porovnání se zastoupením žen (30,5 %) s dříve diagnostikovaným OPSCC. U 89,7 % pacientů byl diagnostikován HPV-asociovaný OPSCC. V 96,2 % případů HPV-asociovaný OPSCC byla zjištěna přítomnost vysoce rizikového genotypu HPV16. U zbylých dvou případů byla detekována koinfekce genotypy HPV 16/33 a HPV 59. U 72,9 % pacientů se vyskytoval primární nádor v oblasti tonzil.

V období mezi dokončením onkologické léčby a vyhodnocením výsledků této práce byla u 5 pacientů diagnostikována recidiva onemocnění. Celkem čtyři pacienti s potvrzenou recidivou měli diagnostikovaný primární HPV-asociovaný OPSCC a jeden pacient měl primární HPV-neasociovaný OPSCC. U dvou pacientů byla detekována ctHPV DNA ve vzorcích plazmy ve stejném termínu, jako klinické potvrzení recidivy onemocnění pomocí zobrazovacích metod. U jednoho pacienta byla opakovaně detekovatelná přítomnost ctHPV DNA, i přesto, že byla klinicky potvrzena remise recidivujícího onemocnění. Přítomnost cirkulující nádorové HPV DNA u takových pacientů je možným vodítkem pro odhalení reziduálního onemocnění, které v budoucnu může způsobit recidivu. CtHPV DNA nebyla detekovatelná u jednoho pacienta v čase potvrzení recidivujícího HPV-asociovaného OPSCC.

I přesto, že výsledky byly hodnoceny u malého souboru pacientů, a pouze u velmi nízkého počtu z nich byl prokázán výskyt recidivy, lze konstatovat, že detekce ctHPV DNA je slibným biomarkerem včasného zachytu recidivy onemocnění. Tato metoda představuje slibný nástroj pro přesnější sledování pacientů po léčbě a pro včasnou predikci případného rozvoje recidivy, které ještě může být ve fázi, kdy nemusí být klinicky rozpoznatelné.

8 Použitá literatura

- [1] A. Rector a M. Van Ranst, „Animal papillomaviruses", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 213–223, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.007.
- [2] Z.-M. Zheng a C. C. Baker, „Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation", 2006.
- [3] J. W. Wang a R. B. S. Roden, „L2, the minor capsid protein of papillomavirus", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 175–186, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017.
- [4] C. B. Buck, P. M. Day, a B. L. Trus, „The papillomavirus major capsid protein L1", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 169–174, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
- [5] M. J. Conway a C. Meyers, „Replication and assembly of human papillomaviruses", *Journal of Dental Research*, roč. 88, č. 4. s. 307–317, 2009. doi: 10.1177/0022034509333446.
- [6] P. M. Day, C. C. Baker, D. R. Lowy, a J. T. Schiller, „Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression". [Online]. Dostupné z: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0404229101
- [7] M. Bergvall, T. Melendy, a J. Archambault, „The E1 proteins", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 35–56, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.07.020.
- [8] A. A. McBride, „The Papillomavirus E2 proteins", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 57–79, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006.
- [9] J. Doorbar, „The E4 protein; structure, function and patterns of expression", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 80–98, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008.
- [10] D. DiMaio a L. M. Petti, „The E5 proteins", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 99–114, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.006.
- [11] S. B. Vande Pol a A. J. Klingelhutz, „Papillomavirus E6 oncoproteins", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 115–137, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.
- [12] D. Patel, S.-M. Huang, L. A. Baglia, D. J. Mccance, D. Patel, a S.-M. Huang, „The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300", 1999.
- [13] M. L. Kelley, K. E. Keiger, C. J. Lee, a J. M. Huibregtse, „The Global Transcriptional Effects of the Human Papillomavirus E6 Protein in Cervical Carcinoma Cell Lines Are Mediated by the E6AP Ubiquitin Ligase", *J Virol*, roč. 79, č. 6, s. 3737–3747, bře. 2005, doi: 10.1128/jvi.79.6.3737-3747.2005.

- [14] B. A. Glaunsinger, S. S. Lee, M. Thomas, L. Banks, a R. Javier, „Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins", *Oncogene*, roč. 19, č. 46, s. 5270–5280, lis. 2000, doi: 10.1038/sj.onc.1203906.
- [15] V. Tomaić, „Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites", *Cancers*, roč. 8, č. 10. MDPI AG, 1. říjen 2016. doi: 10.3390/cancers8100095.
- [16] K. Huh *et al.*, „Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor", *J Virol*, roč. 81, č. 18, s. 9737–9747, zář. 2007, doi: 10.1128/jvi.00881-07.
- [17] A. Roman a K. Munger, „The papillomavirus E7 proteins", *Virology*, roč. 445, č. 1–2, s. 138–168, říj. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013.
- [18] J. M. Trimarchi, B. Fairchild, R. Verona, K. Moberg, N. Andon, a J. A. Lees, „E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor", 1998. [Online]. Dostupné z: www.pnas.org.
- [19] J. T. Schiller, P. M. Day, a R. C. Kines, „Current understanding of the mechanism of HPV infection", *Gynecologic Oncology*, roč. 118, č. 1 SUPPL. 1. červen 2010. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004.
- [20] R. C. Kines, C. D. Thompson, D. R. Lowy, J. T. Schiller, a P. M. Day, „The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding The data are consistent with a dynamic model of in vivo HPV infection in which a conformational change and PC cleavage on the BM allows transfer of virions from HSPG attach-ment factors to an L1-specific receptor on basal keratinocytes migrating into the site of trauma. furin HSPG mouse model proprotein convertase". [Online]. Dostupné z: www.pnas.org/cgi/content/full/
- [21] P. M. Day, C. C. Baker, D. R. Lowy, a J. T. Schiller, „Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression". [Online]. Dostupné z: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0404229101
- [22] M. Dreer, S. van de Poel, a F. Stubenrauch, „Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein", *Virus Res*, roč. 231, s. 96–102, bř. 2017, doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2016.11.005.
- [23] T. Iftnar, J. Haedicke-Jarboui, S. Y. Wu, a C. M. Chiang, „Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle", *Virus Research*, roč. 231. Elsevier B.V., s. 76–82, 2. března 2017. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.006.

- [24] B. Zhang, W. Chen, a A. Roman, „The E7 proteins of low-and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation", 2005. [Online]. Dostupné z: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510012103
- [25] J. Doorbar, „Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection", IOS Press, 2007.
- [26] H. Zimmermann, R. Degenkolbe, H.-U. Bernard, a M. J. O'connor, „The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Can Down-Regulate p53 Activity by Targeting the Transcriptional Coactivator CBP/p300", 1999.
- [27] S. V. Graham, „The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review", *Clinical Science*, roč. 131, č. 17. Portland Press Ltd, s. 2201–2221, 2017. doi: 10.1042/CS20160786.
- [28] J. Doorbar *et al.*, „Characterization of Events during the Late Stages of HPV16 Infection in Vivo Using High-Affinity Synthetic Fabs to E4", 1997.
- [29] G. Cardone *et al.*, „Maturation of the human papillomavirus 16 capsid", *mBio*, roč. 5, č. 4, s. 1–11, 2014, doi: 10.1128/mBio.01104-14.
- [30] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. a International Agency for Research on Cancer., *Human papillomaviruses*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2007.
- [31] A. Warowicka, J. Broniarczyk, M. Węglewska, W. Kwaśniewski, a A. Goździcka-Józefiak, „Dual Role of YY1 in HPV Life Cycle and Cervical Cancer Development", *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 23, č. 7. MDPI, 1. duben 2022. doi: 10.3390/ijms23073453.
- [32] K. E. Dooley, A. Warburton, a A. A. McBride, „Tandemly integrated HPV16 can form a brd4-dependent super-enhancer-like element that drives transcription of viral oncogenes", *mBio*, roč. 7, č. 5, zář. 2016, doi: 10.1128/mBio.01446-16.
- [33] I. J. Groves a N. Coleman, „Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease", *Journal of Pathology*, roč. 235, č. 4, s. 527–538, bře. 2015, doi: 10.1002/path.4496.
- [34] D. Patel a D. J. McCance, „Compromised Spindle Assembly Checkpoint due to Altered Expression of Ubch10 and Cdc20 in Human Papillomavirus Type 16 E6- and E7-Expressing Keratinocytes", *J Virol*, roč. 84, č. 21, s. 10956–10964, lis. 2010, doi: 10.1128/jvi.00259-10.
- [35] N. Egawa a J. Doorbar, „The low-risk papillomaviruses", *Virus Research*, roč. 231. Elsevier B.V., s. 119–127, 2. březem 2017. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.017.

- [36] J. T. Schiller, P. M. Day, a R. C. Kines, „Current understanding of the mechanism of HPV infection", *Gynecologic Oncology*, roč. 118, č. 1 SUPPL. 1. červen 2010. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004.
- [37] N. Egawa a J. Doorbar, „The low-risk papillomaviruses", *Virus Research*, roč. 231. Elsevier B.V., s. 119–127, 2. březen 2017. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.017.
- [38] N. Muñoz *et al.*, „Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer", 2003. [Online]. Dostupné z: www.nejm.org
- [39] L. E. Markowitz a J. T. Schiller, „Human Papillomavirus Vaccines", *Journal of Infectious Diseases*, roč. 224, s. S367–S378, říj. 2021, doi: 10.1093/infdis/jiaa621.
- [40] R. P. Araldi *et al.*, „The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, roč. 106. Elsevier Masson SAS, s. 1537–1556, 1. říjen 2018. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.149.
- [41] M. Schiffman a S. K. Kjaer, „Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia". [Online]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jncimono/article/2003/31/14/951055>
- [42] P. Mohtasebi *et al.*, „Detection of Human Papillomavirus Genotypes and Major BRCA Mutations in Familial Breast Cancer", *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, roč. 35, č. 3, s. 135–140, čer. 2016, doi: 10.1089/mab.2015.0081.
- [43] C. E. Condrat, L. Filip, M. Gherghe, D. Cretoiu, a N. Suci, „Maternal HPV infection: Effects on pregnancy outcome", *Viruses*, roč. 13, č. 12. MDPI, 1. prosinec 2021. doi: 10.3390/v13122455.
- [44] L. Mariani, M. Preti, P. Cristoforoni, C. M. Stigliano, a A. Perino, „Overview of the benefits and potential issues of the nonavalent HPV vaccine", *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, roč. 136, č. 3. Wiley Blackwell, s. 258–265, 1. březen 2017. doi: 10.1002/ijgo.12075.
- [45] B. R. Roman a A. Aragonés, „Epidemiology and incidence of HPV-related cancers of the head and neck", *Journal of Surgical Oncology*, roč. 124, č. 6. John Wiley and Sons Inc, s. 920–922, 1. listopad 2021. doi: 10.1002/jso.26687.
- [46] A. J. Kombe Kombe *et al.*, „Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation", *Frontiers in Public Health*, roč. 8. Frontiers Media S.A., 20. leden 2021. doi: 10.3389/fpubh.2020.552028.

- [47] „FDA-Approves-Mercks-GARDASIL-9-for-the-Prevention-of-Certain-HPV-Related-Head-and-Neck-Cancers-2020“.
- [48] R. A. Hubbard, „Human Papillomavirus Testing Methods“, 2003.
- [49] M. T. Sandri *et al.*, „Comparison of the digene HC2 assay and the roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples“, *J Clin Microbiol*, roč. 44, č. 6, s. 2141–2146, čer. 2006, doi: 10.1128/JCM.00049-06.
- [50] J. Williams, M. Kostiuk, a V. L. Biron, „Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers“, *Frontiers in Oncology*, roč. 12. Frontiers Media S.A., 27. duben 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.864820.
- [51] M. Bell *et al.*, „Comparison between the Roche Cobas 4800 Human Papillomavirus (HPV), Abbott RealTime High-Risk HPV, Seegene Anyplex II HPV28, and Novel Seegene Allplex HPV28 Assays for High-Risk HPV Detection and Genotyping in Mocked Self-Samples“, *Microbiol Spectr*, roč. 11, č. 4, srp. 2023, doi: 10.1128/spectrum.00081-23.
- [52] S. H. Huang a B. O’Sullivan, „Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer“, *Current Treatment Options in Oncology*, roč. 18, č. 7. Springer New York LLC, 1. červenc 2017. doi: 10.1007/s11864-017-0484-y.
- [53] R. L. Ferris a W. Westra, „Oropharyngeal Carcinoma with a Special Focus on HPV-Related Squamous Cell Carcinoma“, 2023, doi: 10.1146/annurev-pathmechdis.
- [54] S. I. Pai a W. H. Westra, „Molecular pathology of head and neck cancer: Implications for diagnosis, prognosis, and treatment“, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, roč. 4. s. 49–70, únor 2009. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158.
- [55] A. K. Chaturvedi, E. A. Engels, W. F. Anderson, a M. L. Gillison, „Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States“, *Journal of Clinical Oncology*, roč. 26, č. 4, s. 612–619, úno. 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.14.1713.
- [56] C. Pan, N. Issaeva, a W. G. Yarbrough, „HPV-driven oropharyngeal cancer: current knowledge of molecular biology and mechanisms of carcinogenesis“, *Cancers Head Neck*, roč. 3, č. 1, pro. 2018, doi: 10.1186/s41199-018-0039-3.
- [57] M. Lechner, J. Liu, L. Masterson, a T. R. Fenton, „HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management“, *Nature Reviews Clinical Oncology*, roč. 19, č. 5. Nature Research, s. 306–327, 1. květen 2022. doi: 10.1038/s41571-022-00603-7.

- [58] S. Marur, G. D'Souza, W. H. Westra, a A. A. Forastiere, „HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic", *The Lancet Oncology*, roč. 11, č. 8. s. 781–789, srpen 2010. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.
- [59] M. T. Canto a S. S. Devesa, „Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975–1998", *Oral Oncol*, roč. 38, č. 6, s. 610–617, zář. 2002, doi: 10.1016/S1368-8375(01)00109-9.
- [60] A. G. Schache *et al.*, „HPV-related oropharynx cancer in the United Kingdom: An evolution in the understanding of disease etiology", *Cancer Res*, roč. 76, č. 22, s. 6598–6606, lis. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0633.
- [61] M. M. Rietbergen *et al.*, „Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm", *Int J Cancer*, roč. 132, č. 7, s. 1565–1571, dub. 2013, doi: 10.1002/ijc.27821.
- [62] P. Gorphe *et al.*, „2011–2021 rising prevalence of HPV infection among oropharyngeal carcinoma in France", *BMC Cancer*, roč. 22, č. 1, pro. 2022, doi: 10.1186/s12885-022-10091-8.
- [63] B. A. L. A. Mariz *et al.*, „Global prevalence of human papillomavirus-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma following the ASCO guidelines: A systematic review and meta-analysis", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, roč. 156. Elsevier Ireland Ltd, 1. prosinec 2020. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103116.
- [64] W. R. McIlwain, A. J. Sood, S. A. Nguyen, a T. A. Day, „Initial symptoms in patients with HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer", *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, roč. 140, č. 5, s. 441–447, 2014, doi: 10.1001/jamaoto.2014.141.
- [65] M. Lechner, J. Liu, L. Masterson, a T. R. Fenton, „HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management", *Nature Reviews Clinical Oncology*, roč. 19, č. 5. Nature Research, s. 306–327, 1. květen 2022. doi: 10.1038/s41571-022-00603-7.
- [66] A. F. Carlander *et al.*, „A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide", *Viruses*, roč. 13, č. 7, čvc. 2021, doi: 10.3390/v13071326.
- [67] K. L. Gage, K. Thomas, D. Jeong, D. G. Stallworth, a J. A. Arrington, „Multimodal Imaging of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma", 2017.
- [68] „TNM Classification of Malignant Tumours-8 th edition", 2018.

- [69] S. H. Huang a B. O'Sullivan, „Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer", *Current Treatment Options in Oncology*, roč. 18, č. 7. Springer New York LLC, 1. červenc 2017. doi: 10.1007/s11864-017-0484-y.
- [70] M. R. Timbang, M. W. Sim, A. F. Bewley, D. G. Farwell, A. Mantravadi, a M. G. Moore, „HPV-related oropharyngeal cancer: a review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection", *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, roč. 15, č. 7–8. Taylor and Francis Inc., s. 1920–1928, 3. srpen 2019. doi: 10.1080/21645515.2019.1600985.
- [71] B. S. Chera *et al.*, „Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer", 2020, doi: 10.1200/JCO.19.
- [72] M. R. Timbang, M. W. Sim, A. F. Bewley, D. G. Farwell, A. Mantravadi, a M. G. Moore, „HPV-related oropharyngeal cancer: a review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection", *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, roč. 15, č. 7–8. Taylor and Francis Inc., s. 1920–1928, 3. srpen 2019. doi: 10.1080/21645515.2019.1600985.
- [73] L. A. Diaz a A. Bardelli, „Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA", *Journal of Clinical Oncology*, roč. 32, č. 6. American Society of Clinical Oncology, s. 579–586, 20. únor 2014. doi: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
- [74] Q. Dong *et al.*, „Clinical application of molecular residual disease detection by circulation tumor DNA in solid cancers and a comparison of technologies: review article", *Cancer Biology and Therapy*, roč. 24, č. 1. Taylor and Francis Ltd., 2023. doi: 10.1080/15384047.2023.2274123.
- [75] „Sample to Insight __ QIAamp ® Circulating Nucleic Acid Handbook", 2019.
- [76] R. Harshitha a D. R. Arunraj, „Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification", *Biochemistry and Molecular Biology Education*, roč. 49, č. 5, s. 800–812, zář. 2021, doi: 10.1002/bmb.21552.
- [77] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, a P. M. Williams, „Real Time Quantitative PCR".

9 Zdroje obrázků

Obrázek č. 1 - HPV-related HNC – new challenge and hope for head and neck cancer subjects – Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Genomic-map-of-HPV-16-structure_fig1_332067524 [accessed 8 Jan, 2024]

Obrázek č. 2 – S. V. Graham, „The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review“, *Clinical Science*, roč. 131, č. 17. Portland Press Ltd, s. 2201–2221, 2017. doi: 10.1042/CS20160786.

Obrázek č. 4 - S. I. Pai a W. H. Westra, „Molecular pathology of head and neck cancer: Implications for diagnosis, prognosis, and treatment“, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, roč. 4. s. 49–70, únor 2009. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158.

Obrázek č. 5 - L. A. Diaz a A. Bardelli, „Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA“, *Journal of Clinical Oncology*, roč. 32, č. 6. American Society of Clinical Oncology, s. 579–586, 20. únor 2014. doi: 10.1200/JCO.2012.45.2011.

Obrázek č. 6 - PCR – BioRender (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR). <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5cf004269cf1ff003377d8cd-polymerase-chain-reaction-pcr>