**LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Infekce dutiny ústní lidským papilomavirem**

Doktorandská disertační práce

Olomouc 2015 MUDr. Petr Michl

**Obsah:**

**Prohlášení**…............................................................................................4

**Seznam zkratek** ……………………………………………………………..5

**Úvod**…………………………………………………………………………....6

**Obecná část**…………………………………………………………………..7

1. Buněčný cyklus a jeho regulace………………………………………...7
   1. Základní fáze buněčného cyklu……………………………..7
   2. Maligní transformace buněčného cyklu…………………….8
      1. Protoonkogeny………………………………………...8
      2. Antionkogeny…………………………………………10

2.Spinocelulární karcinomy dutin ústní…………………………………….12

2.1. Teorie kancerogeneze………………………………………….12

2.1.1. Mechanismus kancerogenního účinku u kuřáků…..14

2.1.2. Kancerogenní efekt konzumace alkoholu………….14

2.1.3. Mechanické dráždění a malhygiena jako etiologické

faktory kancerogeneze……………………………….15

2.1.4 Vliv lidského papilomaviru na vznik OFK…………....15

2.2. Diagnostika karcinomu dutiny ústní…………………...……....16

2.2.1. Anamnéza……………………………………………...17

2.2.2. Klinické vyšetření………………………………….…..17

2.2.3. Histopatologické vyšetření……………………………17

2.2.4. Metastázy……………………………………………....18

2.2.5. Zobrazovací metody…...……………………………...21

2.3. Biologické vlastnosti a prognóza karcinomů……………….....21

2.3.1. Staging nádorového onemocnění…………………...21

2.3.1.1. TNM klasifikace………………………….......21

2.3.1.2. Stádium onkologického onemocnění……...22

2.3.2. Grading nádorového onemocnění…………………...23

3. Léčba tumorů dutiny ústní…………………………………………………24

3.1. Chirurgická léčba…………………………………………………24

3.1.1. Odstranění primárního ložiska tumoru……………....24

3.1.2. Krční bloková disekce………………………………....25

3.2. Radioterapie…………………………………………………..…..26

3.3. Chemoterapie……………………………………………………..28

3.4. Biologická léčba…………………………………………………..29

4. Lidské transformující viry…………………………………………………..29

5. Lidský papilomavirus…………………………………………………….....31

5.1. Přenos infekce………………………………………………...….33

5.2. Mechanismus infekce buňky virem HPV……………………....34

5.3. Charakteristika pacientů s HPV+ karcinomem………………..35

5.4. Detekce lidského papilomaviru……………………………….…37

5.4.1. Histologická detekce infekce lidským

papilomavirem…………………………………………..38

5.4.2. Laboratorní diagnostika HPV infekce…………….......38

**Speciální část**………………………………………………………………….42

6. Cíl práce……...……………………………………………………....42

7. Materiál a metodika………………………………………………….42

8. Výsledky………………………………………………………….......46

8.1. Výsledky statistického zpracování souboru pacientek......46

9. Diskuze…….……..……………….…………………………………..63

10. Závěr…………..……………………………………………………..68

**Poděkování**……………………………………………………………………..70

**Literatura**………………………………………………………………………...71

**Prohlášení**

Prohlašuji, že práci na přípravě této disertační práce jsem vykonal samostatně a že uvádím všechnu použitou literaturu a prameny, které jsem použil.

………………………………………………

MUDr. Petr Michl V Olomouci dne 13.4.2015

**Seznam zkratek:**

EBV virus Epstein-Baarové

EV Epidermodysplasia verruciformis

GTV gross tumor volume

HIV virus lidské imunodeficience

HR HPV vysoce rizikový typ HPV

HPV lidský papilomavirus

ISH in situ hybridizace

LCR locus control region

OFK orofaryngeální karcinomy

RLU relative light unit

STD sexuálně přenosná choroba

UICC Union for International Cancer Control

VAG+ pozitivní stěr na HR HPV na děložním čípku

VAG- negativní stěr na HR HPV na děložním čípku

**Úvod:**

Spinocelulární karcinomy dutiny ústní patří mezi nejčastější nádory horního aerodigestivního traktu. Jedná se o 6. nejčastější nádor na světě2. Incidence je v globálním měřítku asi 500.000 hlášených případů. Tradičně nejčastěji se tyto karcinomy vyskytují v jihovýchodní Asii, kde jejich podíl na celkovém množství maligních onemocnění činí asi 35-45% s incidencí 15 případů na 100.000 obyvatel. V České republice se OFK podílí na celkové onkologické problematice podílí asi 2 %. Jakkoliv se toto číslo může zdát marginální, mortalita vyjádřená v pětiletém přežití od stanovení diagnózy se pohybuje (v závislosti na stádiu onemocnění) mezi 40 %-50 %10, 11. I přes intenzivní výzkum a pokrok v léčbě zůstává mortalita takřka nezměněna po řadu desetiletí.

Vedle tradičních vyvolávajících nox, které jsou známy již po desetiletí, se od 80. let minulého století prosazuje názor, že určitá část OFK, respektive spincelulárního karcinomu dutiny ústní může být podmíněna infekcí lidským papilomavirem (HPV). Otevřenou otázkou zůstává, jaká je cesta této infekce do dutiny ústní. Obecně lze říci, že tento HPV patří do skupiny chorob sexuálně přenosných (Sexually Transmitted Diseases - STD). Jednou z možností vstupu infekce mohou proto být alternativní sexuální praktiky (nekoitální, orální sex) což ovšem někteří autoři považují za málo pravděpodobné.87

**Cílem předkládané práce je posoudit možnou souvislost mezi typy sexuálních praktik (koitálních vs. nekoitálních) a infekcí lidským papilomavirem v ústech a na děložním čípku.**

**Obecná část**

**1. Buněčný cyklus a jeho regulace**

Vývoj každého organismu je závislý na buněčném dělení. Charakeristika buněčného cyklu byla v roce 1953 představena Pelcem a Howardem. Tento cyklus končí rozdělením původní buňky na buňky dceřinné, což umožní jejich další růst a následně dochází k dalšímu dělení.

**1.1 Základní fáze buněčného cyklu:**

G0 -fáze: klidová fáze buněčného cyklu, buňka udržuje bazální metabolismus a plní své základní funkce.

G1 -fáze: probíhá syntéza všech typů RNA v jádře a proteosyntéza v cytoplazmě. Buňka roste. Je to interval mezi ukončením mitózy a začátkem syntézy DNA. Délku celého buněčného cyklu většinou určuje právě délka G1 -fáze.

S -fáze: v jádře se replikuje DNA a v cytoplazmě jsou syntetizovány histony. Po skončení S -fáze obsahuje buněčné jádro dvojnásobné množství DNA.

G2 -fáze: probíhá další růst buňky, proteosyntéza, a ve zvýšené míře jsou syntetizovány proteiny pro výstavbu mitotického aparátu, zvláště tubulin. Je to interval mezi koncem syntézy DNA a začátkem mitózy. V G2 -fázi probíhá kontrola ukončení replikace DNA před vstupem do mitózy.

M -fáze: mitotická, sestává ze šesti na sebe navazujících fází. Prvních pět (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze) představuje dělení jádra. Šestou fází je vlastní rozdělení buňky neboli cytokineze. Mitotickým dělením je zabezpečen vznik dvou geneticky identických buněk.

Kontrola buněčného cyklu je stěžejní záležitostí; její narušení může mít za následek přeměnu normální buňky v buňku nádorovou, která nepodléhá regulačním mechanismům a je schopna nekontrolovaného růstu.

Proliferační aktivita je kontrolována prostřednictvím inhibitorů, které mohou zastavit cyklus v kontrolních bodech. První kontrolní bod je v G1 fázi před vstupem buňky do S fáze, druhý kontrolní bod je v G2 fázi před zahájením mitózy. Vlastní regulace je řízena dvěma skupinami proteinů. Jedná se o cyklin-dependentní kinázy (cdk) a cykliny.

**1.2 Maligní transformace buněčného cyklu**

V rozvoji maligního onemocnění hrají hlavní roli 2 základní skupiny genů, jejichž poruchy vedou k neomezenému buněčnému dělení:

- protoonkogeny

- antionkogeny (tumor supresorové geny)

***1.2.1 Protoonkogeny***

První poznatky o onkogenech jsou spojeny se studiem RNA nádorových retrovirů. Jejich onkogeny jsou segmenty virového genomu, které vyvolávají neoplastickou buněčnou transformaci a podporují patogenezi nádorů. Obdobné sekvence byly nalezeny v genomu většiny eukaryotických buněk.

Prokázalo se, že DNA extrahovaná z nádorových buněk a přenesená do buněk „normálních“, vyvolala neoplastickou transformaci. Varianty těchto virových a buněčných genů mající transformační účinky a vyskytující se v normálních buňkách se nazývají *protoonkogeny*.

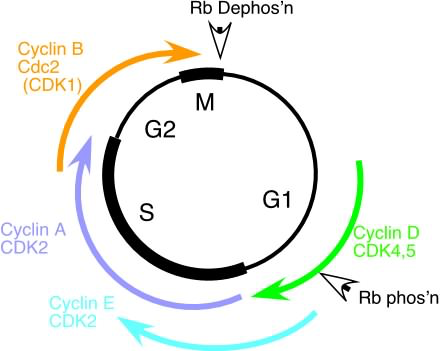
Je popsána řada genů, které se pod vlivem různých mechanismů (bodové mutace, translokace, genová amplifikace, inzerce retrovirové DNA) mohou chovat jako onkogeny.

Mechanismus aktivace protoonkogenů spočívá v narušení jejich struktury, nebo ve zvýšení exprese, které jsou vyvolány prostřednictvím retrovirů, mutace, genové amplifikace nebo chromozomální přestavby.

Mezi hlavní proonkogeny patří geny pro růstové faktory, geny pro receptory růstových faktorů, geny pro přenašeče signálů, jaderné transkripční faktory a také geny pro cykliny a cyklin dependentní kinázy (cdk).

Buněčný cyklus u savčích buněk je koordinován hlavně aktivitou cyklinů a cyklin- dependentních kináz. Mutace poškozující tuto regulační aktivitu podporují proces buněčné proliferace.

Cyklin D1 (CD1) a CDK4 byly objeveny jako první z potencionálních onkogenů (Obr. 1). Změněná exprese obou proteinů je častým jevem, se kterým se můžeme setkat u celé řady nádorů (nádory prsu, jícnu, jater, lymfomy, melanomy, sarkomy, glioblastomy).

*Obr. 1*

***Obr.1: Úloha cyklinů a cdk v procesu regulace buněčného cyklu (převzato z www-bcf.usc.edu/~forsburg/cclecture.html)***

***1.2.2. Antionkogeny***

Antionkogeny (tumor supresorové geny) kódují proteiny, které se podílejí na kontrole buněčného růstu a procesu diferenciace. Tímto způsobem inhibují buněčné dělení, účastní se oprav DNA, podporují apotózu, účastní se buněčné diferenciace.

Nejdůležitější antionkogeny:

Retinoblastomový gen (Rb) byl objeven jako první, a to u pacientů s nádorem retiny, kde jsou obě jeho alely na chromozómu 13q14 inaktivovány delecí nebo bodovou mutací. Později byla abnormální exprese produktu tohoto genu prokázána i v jiných typech nádorů (např. v osteosarkomech). Produktem tohoto genu je jaderný fosfoprotein, jehož funkce je závislá na stupni fosforylace. V aktivní formě je hypofosforylován, tvoří komplex s transkripčním faktorem E2F. Transkripční faktor E2F je nutný pro transkripci regulačních genů nezbytných pro průběh S-fáze. Čili hypofosforylovaný pRb působí jako *supresor buněčného dělení* a brání postupu buněk z G1 do S-fáze. 33,51,52

Gen p16 – inhibitor kinázy 4 – klasický antionkogen, na chromozómu 9p21. Za fyziologických okolností protein p16 odbourává komplexy cyklinD/cyklin dependentní kináza 4, které inaktivují protein pRb fosforylací. Naopak aktivní forma proteinu pRb (tj. nefosforylovaná) inhibuje transkripci proteinu p16. Tedy, systém pRb/p16 reguluje buněčný cyklus na přechodu z G1 do S fáze. Je inaktivován delecemi nebo mutacemi u celé řady malignit. Ztráta heterozygotiky na 9p21 bývá u karcinomů v oblasti hlavy a krku častější, a tedy se nabízí jako časná genetická událost při vývoji karcinomu v dutině ústní.53

K inaktivaci proteinu p16 dochází několika mechanismy: buď delecí homozygotního genu pro protein p16, transkripcí methylovaných promotorů nebo bodovou mutací.

p53 gen (strážce genomu) – kóduje jaderný fosfoprotein, který je negativním regulátorem přechodu G1/S-fáze a to regulací transkripce a DNA - replikace.

Následky vzniku nefunkčního genu p53:

- pokračování buněčného cyklu mutovaných buněk

- umožní poškozeným buňkám vyhnout se apoptóze

- vznik genetické instability, umožňující akumulaci mutací

Mutace genu p53 byly prokázány u více než 50 % typů lidských nádorů. Exprese normálního, nemutovaného proteinu p53 se zvyšuje jako fyziologická odezva na různé podněty indukující buněčný stres. Následuje zablokování buněčného cyklu a během této doby různé buněčné analyzátory vyhodnocují stupeň poškození DNA. Je-li defekt opravitelný, je pomocí proteinu p53 zahájen opravný proces poškozených úseků DNA. Pokud se jedná o závažnější defekty, spouští protein p53 mechanismy apoptózy. Je to velmi důležitý kontrolní systém, který se snaží zabránit přenosu chybné genetické informace do dceřiných buněk.

**2. Spinocelulární karcinomy dutiny ústní**

Z obecného hlediska lze zhoubný nádor definovat jako nově vzniklý tkáňový útvar nebo buněčnou populaci v organismu, které nevznikají jako fyziologická odezva na vnější i vnitřní podněty, jeví známky abnormality a více či méně se vymyká genetické regulaci fyziologických procesů v organizmu27 Jedná se o nekontrolované dělení, vycházející z mutací na úrovni kmenových buněk.

Specifické zvláštnosti nádorových buněk charakterizovali Hannahan a Weinberg1 na na základě poruch v šesti fyziologických procesech:

- autonomie v růstových signálech

- porušená apoptóza

- nekonečná replikace

- porušená citlivost na inhibiční růstové signály

- angiogeneze

- tendence k Invazivnímu růstu a metastazování

**2.1. Teorie kancerogeneze**

Za obecně uznávanou teorii kancerogeneze je považována teorie *genetická:* nádory vznikají na podkladě vrozeného nebo získaného genetického poškození. Názory na mechanizmus tohoto poškození nejsou zcela jednotné.

Somatická teorie vychází z předpokladu, že v buňce dochází ke kumulaci chyb genomu, vedoucí k nekontrolované proliferaci. Všechny buňky nádoru jsou proto ireverzibilně poškozeny (*dysregulace*), a proto při léčbě musí být každá alterovaná buňka odstraněna.

Regulační teorie předpokládá, že nádor je výsledkem *genetické nestability*, která je považována za reverzibilní. Nádor je tedy dynamický proces: léčbou musíme znovu nastavit rovnováhu mezi počtem buněk vstupujících do buněčného cyklu a počtem buněk přirozeně zanikajících. Není nutné zničit každou buňku nádorové populace28.

Předpokládá se, že kancerogeneze může být ovlivněna třemi faktory: *endogenními, exogenními a faktory synonkogeneze*.

Mezi *endogenní faktory* patří dědičnost, rasové, věkové a sexuální vlivy, genetická dispozice a porucha imunity.

K *exogenním* příčinám řadíme vlivy fyzikální, chemické a biologické.

Za faktory *synonkogeneze* jsou považovány disponující endogenní vlivy (imonudeficience), faktor determinující (chemické nebo biologické kancerogeny) a realizační faktor (vhodná tkáň).

U nádorových onemocnění existují dva základní typy genetického poš-kození. Prvním typem jsou dominantní poruchy, jejíchž cílem jsou protoonko-geny, druhým typem jsou recesivní poruchy u antionkogenů. Dominantní po-ruchy vyvolávají stimulační účinek, recesivní poruchy způsobují ztrátu inhibič-ní funkce antionkogenů.

Je známa silná vazba mezi kancerogenezí, životním prostředím a životním stylem. Chronicky známé jsou vlivy exogenní: kouření a konzumace alkoholu nebo expozice UV záření. V souvislosti s exogenními faktory je třeba zmínit vliv *virů - zejména HPV*. Z endogenních faktorů hrají důležitou roli genové aberace, podmiňující klinickou manifestaci různých syndromů (například Gorlin Goltzův syndrom) a náhodné genetické mutace.

U kouření a konzumace alkoholu působí benzopyren a benzantracen, které jsou obsažené v cigaretách , dále alkohol, kde se často vyskytují nitrosaminy, poškozují DNA buněk vytvořením elektrofilních meziproduktů, a tím buď vytláčí elektrony v nukleotidech uvnitř DNA, čímž poškodí párové vazby a sekvenci bází nebo se naváží přímo na DNA3.

**2.1.1. Mechanizmus kancerogenního účinku u kuřáků :**

* lokální dráždění (termické, chemické -polonium, benzpyreny)
* zvýšené procento mutací genu p53 s poruchou regulace apoptózy
* zvýšení potřeby vit. C ve tkáních, částečná blokáda jeho rezorbce ze zažívacího traktu
* snížení hladiny beta-karotenu v plasmě
* zvýšení hladiny nitritů a volných kyslíkových radikálů

**2.1.2. Kancerogenní efekt konzumace alkoholu :**

* lokální dráždění
* zvýšená exprese mutací genu p53 s poruchou regulace apoptózy
* snížení příjmu běžné stravy (až 45% denní energetické potřeby hrazeno alkoholem)
* deficit vit. C (zvýšená exkrece), malabsorbce vit. E
* snížení migrace granulocytů, snížení aktivity makrofágů
* snížení produkce cytokinů
* zvýšení hladiny acetaldehydu (produkt metabolismu etanolu považovaný za kancerogen)
* potenciace kancerogenních účinků tabákových zplodin (alkohol jako rozpouštědlo usnadňuje jejich rezorbci)

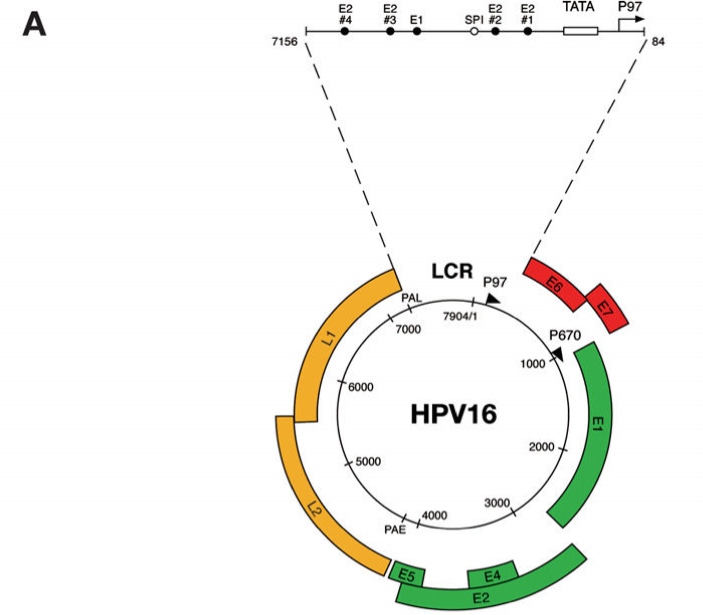
**2.1.3. Mechanické dráždění a malhygiena jako etiologické faktory kancerogeneze:**

Vliv chronického dráždění na potenciální vznik nádoru je známý. V ústech musíme zmínit chronické dráždění ostrými okraji zubů a zubních náhrad (fixních nebo snímatelných). Takové dráždění působí chronický zánět, který, zejména potencovaný kouřem a/nebo alkoholem, může vést k malignizaci epitelové buňky.

Vliv malhygieny na rozvoj onkologického onemocnění není zcela jasný. Důvodem k tomuto tvrzení je fakt, že většina pacientů s OFK holduje potátorství a tabakismu, kdy péče o hygienu nejen dutiny ústní nebývá primárním zájmem těchto pacientů.

**2.1.4. Vliv lidského papilomaviru na vznik OFK:**

U HPV tumorů se na deregulaci buněčného cyklu podílejí produkty virových onkogenů E6 a E711,12,13 (Obr. 2). E6 se naváže na p53 (buňky bez funkčního p53 nepodléhají apoptóze) a inaktivuje telomerázu. Vazba onkogenu E7 na pRb uvolní transkripční faktor, který aktivuje geny regulující buněčnou proliferaci. HPV+ tumory jsou charakterizovány sníženou hladinou retinoblastomového proteinu (pRb) a cyklinu D1, jejich další vlastností je obsah nemutovaného (divokého typu) genu p5314. Prevalence infekce orální HPV u asymptomatické populace se pohybuje v poměrně širokém rozmezí 0-10%. Předpokládá se, že ke klinické manifestaci dlaždicobuněčného karcinomu dochází teprve za 10-35 let od infekce virem15.



*Obr.2 Genom lidského papilomaviru s lokalizací hlavních onkogenů E6 a E7*

**2.2. Diagnostika karcinomu dutiny ústní**

Onkologická prohlídka úst stomatologem je v rámci preventivního pojišťovnou hrazeného vyšetření 1x za půl roku. Paradoxem zůstává, že i přes snadnou samovyšetřitelnost a výše zmíněné bezplatné prohlídky přicházejí pacienti velmi často v pokročilém stádiu nádorového onemocnění.

Diagnostika nádoru vychází z anamnézy, klinického vyšetření včetně využití zobrazovacích metod a histopatologického vyšetření bioptického materiálu.

**2.2.1. Anamnéza**

Velmi důležitým anamnestickým údajem je délka trvání obtíží. Dále nás zajímá celkový zdravotní stav v rámci osobní anamnézy anamnéza farmakologická, abuzus nikotinu a alkoholu a pracovní prostředí pacienta.

**2.2.2. Klinické vyšetření**

Při klinickém vyšetření se zaměřujeme na tvar, velikost, povrch, případnou infiltraci a poruchu funkce nádorem postižené tkáně. Jeho součástí je i vyšetření spádových lymfatických uzlin palpací - mnoha pacientů dochází k šíření nádorových buněk do regionálních lymfatických uzlin.

U 13 % pacientů nacházíme krční rezistenci jako první a jediný klinický projev nádorového onemocnění. 3 - 9 % primárních tumorů unikne pozornosti dokonce i po klinickém, radiografickém a případně endoskopickém vyšetření.

**2.2.3. Histopatologické vyšetření**

K určení přesné diagnózy a naplánování dalšího terapeutického postupu má toto vyšetření nezastupitelnou roli. Rozlišujeme biopsii části nebo odběr celé léze (v případě malých nálezů) - zde je nutno pečlivě zaznamenat přesnou polohu odběru pro případnou další chirurgickou terapii.

Dlaždicobuněčný (spinocelulární) karcinom bývá označován jako epidermoidní. Jeho histologická struktura napodobuje epidermis ve všech jejích vrstvách. Mezi nádorovými buňkami bývají intercelulární můstky. Dochází k více nebo méně zřetelnému rohovění. Růst nádoru probíhá v nepravidelných masách, rohové hmoty se nahodile hromadí v rohové koule, tzv. kankroidové perly. Rohovění je často nedokonalé, může tvořit jemné keratinové hrudky v jednotlivých buňkách – monocelulární keratinizace. Nezralé spinocelulární karcinomy nerohovějí vůbec. 33 Histopatolog hodnotí především buněčnou a jadernou polymorfii, počet mitóz, přítomnost atypických mitóz, přítomnost obrovských, mnohojaderných buněk, tvorbu intercelulárních můstků, invazi do hlubších struktur, dále perineurální propagaci, šíření intravaskulárně a hodnotí okraje resekátu z hlediska radikality provedené resekce. Součástí histopatologického vyšetření je také stanovení histopatologického gradingu, tj. stupně diferenciace nádoru.

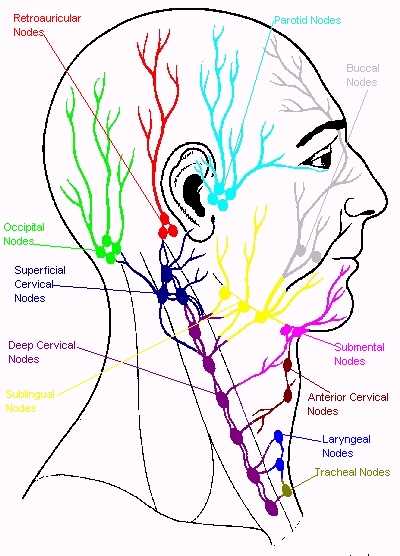
Specifika histopatologického nálezu u HPV+ tumorů viz kapitola 5.4. Detekce lidského papilomaviru.

**2.2.4. Metastázy**

Jednou z vlastností zhoubných nádorů je nekontrolovaně se šířit. Vedle lokálního, inflitrativního růstu mohou zakládat vzdálená ložiska, a to buď hematogenně, lymfogenně nebo kombinací obou způsobů.

Schopnost nádoru zakládat metastázy je složitý biologický děj, který probíhá v několika etapách. Začíná invazí přes bazální membránu epitelu a šířením mezi endoteliální buňky lymfatických nebo krevních cév za spolupůsobení některých enzymů (kolagenázy, heparinázy a stromelyzinu). Dalším krokem je vznik nádorových embolů uvnitř lymfatických nebo krevních cév, kde se nachází velmi silné ochranné prostředí zajišťované imunitním systémem. Při „nádorové kolonizaci“ regionálních lymfatických uzlin nebo jiných vzdálených tkání se znovu uplatňuje vliv výše zmíněných enzymů. Proces implantace nádorových buněk v nové tkáni s vytvořením samostatně fungujících buněčných klonů vyžaduje angiogenní a růstové faktory tak, aby bylo zajištěno krevní zásobení, stimulace k replikaci metastatických buněk a potlačení vlivu hostitelských buněk nebo jejich aktivace na straně druhé (např. osteoklastů k resorpci kosti). Odhaduje se, že pouze asi 1% pokusů o metastazování je pro nádorové buňky plně úspěšné3.

Spinocelulární karcinomy nejčastěji metastazují do regionálních lymfatických uzlin. V závislosti na lokalizaci nádoru existují určité predilekční lokality, ve kterých lze existenci metastáz předem předpokládat (Obr. 3).

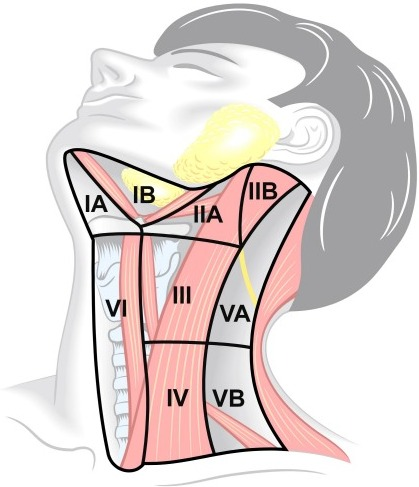


***Obr. 3 Metastazování karcinomu dutiny ústní do jednotlivých skupin lymfatických uzlin***

Z chirurgického hlediska jsou jednotlivé oblasti na krku rozděleny tzv. etážemi (I-VI) (Obr. 4).

Karcinom dutiny ústní převážně metastazuje do úrovně I - III, a to převážně ipsilaterálně, tj. do stejnostranných lymfatických uzlin jako je primární nádor. Karcinomy lokalizované při střední čáře jazyka nebo spodiny dutiny ústní mohou metastazovat i kontralaterálně nebo bilaterálně.

Do úrovně II - IV pak metastazují především karcinomy orofaryngu, hypofaryngu a laryngu.



***Obr. 4******Etáže lymfatických uzlin na krku:******Ia*** *– submentální oblast,* ***Ib*** *– submandibulární oblast,* ***II*** *- horní jugulární oblast,* ***III*** *– střední jugulární oblast,* ***IV*** *– dolní jugulární oblast,* ***V*** *- oblast zadního krčního trojúhelníku,* ***VI*** *– přední krční oblast*

**2.2.5. Zobrazovací metody**

V rámci stagingu onemocnění nádorem musíme k výše uvedeným vyšetřením doplnit zobrazovací metody. K základním by mělo sloužit CT vyšetření hlavy a krku s intravenózně aplikovanou kontrastní látkou. Některé odborné společnosti raději než CT doporučují MR pro jeho větší výpovědní hodnotu. Obligatorní součástí vyšetřovacího algoritmu je i zadopřední rentgenogram srdce a plic.

Jinou možností, kterou nám současné zobrazovací metody nabízejí je celotělový sken s využitím PET CT. Senzitivita PET CT vyšetření je odhadována na 93-100%, specificita na 90-100%. Dále je PET CT vyšetření možno zakomponovat do následného radioterapeutického plánu (Viz kapitola 3.2. Radioterapie).

**2.3. Biologické vlastnosti a prognóza karcinomů**

Základními deskriptivními metodami nádorového onemocnění jsou jeho staging (rozsah) a grading (stupeň diferenciace nádoru).

Při stanovení stadia (stagingu) nádorového onemocnění vychází klinik z výsledků TNM klasifikace. *Grading* určuje histopatolog na základě mikroskopického, resp. imunohistochemického vyšetření vzorku nádorové tkáně.

**2.3.1. Staging nádorového onemocnění**

**2.3.1.1. TNM klasifikace**

TNM systém pro klasifikaci zhoubných nádorů vypracoval Pierre Denoix v letech 1943 až 1952. V roce 1950 ustavila UICC (Union for International Cancer Control - *Výbor pro nomenklaturu nádorů a statistiku*) a přijala jako základ pro svou práci na klinické klasifikaci obecné definice lokálního nádorového postižení navržené WHO Subkomisí pro registraci nádorových onemocnění a jejich statistické zpracování. V roce 1953 měl výbor společné setkání s Mezinárodní komisí pro dělení nádorů a prezentaci výsledků léčby nádorů při příležitosti Mezinárodního radiologického kongresu. Bylo dosaženo souhlasu v obecném postupu při klasifikaci, vycházejícím z anatomického rozsahu onemocnění a používající TNM systém. V roce 1954 Výzkumná komise UICC sestavila Výbor pro klinickou klasifikaci a aplikovanou statistiku s cílem podpořit studie v této oblasti a rozšířit obecné zásady klasifikace nádorů na všechny orgánové lokalizace. Výbor v roce 1958 uveřejnil první doporučení pro klinickou klasifikaci rozsahu nádorového onemocnění mammy a laryngu a pro prezentaci výsledků. Druhé vydání v roce 1959 obsahovalo revidované návrhy pro mammu s cílem klinického použití a hodnocení v pětiletém období (1960 - 1964). V letech 1960 a 1967 publikoval Výbor devět příruček popisujících návrhy pro klasifikaci 23 lokalizací. Bylo doporučeno, aby návrhy klasifikace byly předmětem retrospektivních i prospektivních studií vždy po uplynutí pěti let.

Cíle TNM klasifikace by se daly shrnout do následujících bodů:

- pomoci klinikovi v naplánování léčby  
- dát určité informace o prognóze  
- pomoci při hodnocení výsledků léčby  
- umožnit výměnu poznatků mezi léčebnými centry --. přispět k pokračování onkologického výzkumu

Na základě TNM klasifikace je možno stanovit stádium onemocnění.

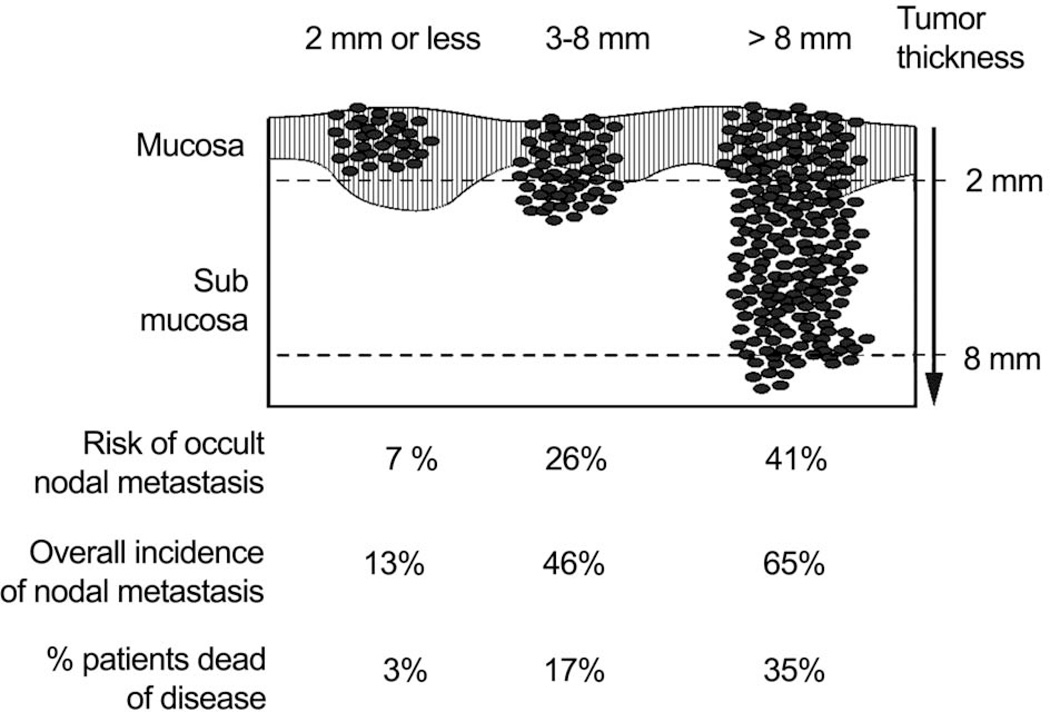
**2.3.1.2. Stádium onkologického onemocnění**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Stádium onemocnění** | T | N | | M | |
| Stádium 0 | TIS | N0 | M0 | |
| Stádium I | T1 | N0 | M0 | |
| Stádium II | T2 | N0 | M0 | |
| Stádium III | T1-2  T3 | N1  N0,1 | M0  M0 | |
| Stádium IVA | T1-3  T4a | N2  N0 – N2 | M0  M0 | |
| Stádium IVB | T(jakékoliv)  T4b | N3  N (jakékoliv) | M0  M0 | |
| Stádium IVC | T(jakékoliv) | N(jakékoliv) | M1 | |

**2.3.2. Grading nádorového onemocnění**

Při stanovení gradingu vychází histopatolog z růstového a invazivního potenciálu příslušného nádoru a současně i potenciálu metastatického. Prognóza maligního onemocnění spinocelulárních karcinomů orofaryngu závisí nejvíce na stupni diferenciace nádoru (histologická odlišnost stavby od předpokládané mateřské tkáně ) a na klinickém stádiu.

Velmi důležitým prognostickým faktorem u karcinomů hlavy a krku je hloubka invaze (Obr 5.), perineurální nebo intravaskulární šíření.



**Obr.5** *Souvislost mezi hloubkou invaze a pravděpodobností metastázování 80*

**3. Léčba tumorů dutiny ústní**

Léčba slizničních karcinomů dutiny ústní stojí na třech základních pilířích:

- radikální chirurgické odstranění nádoru

- radioterapie

- chemoterapie

**3.1. Chirurgická léčba**

Chirurgická léčba nádorů hlavy a krku spočívá v odstranění primárního ložiska tumoru pokud možno vcelku a s dostatečnou radikalitou a exenteraci spádových lymfatických uzlin.

**3.1.1. Odstranění primárního ložiska tumoru**

Chirurgický výkon stále zůstává nejefektivnějším typem léčby zhoubného onemocnění. Skládá se ze samotné excize nádoru spolu s okolní zdravou tkání tak, aby byl vlastní okraj extirpovaného zhoubného tumoru vzdálen minimálně 0,5 cm od resekční linie. Tento požadavek nelze vždy splnit, ale úkolem chirurga je pohybovat se co nejvíce ve zdravé, nádorem neinfiltrované krajině.

Vzniklý defekt je poté možno uzavřít místními posuny tkání anebo, pokud to není možné, využívat k rekonstrukci defektu vzdálených anebo rotačních laloků. Je nutno pamatovat na to, že onkochirurgické výkony jsou nejen velmi zatěžující pro pacienta, ale také časově a finančně náročné.

V rámci nutričního zajištění pacienta velmi často zavádíme perkutánní endoskopickou gastrostomii, jelikož prostá nazogastrická sonda nejenže paciety obtěžuje svou přítomností, ale po více jak 10 dnech může způsobit dekubity v místě kontaktu s trávicí trubicí, což vede k jizvení a strinkturám. Vzhledem k náročnosti výkonu a riziku pooperačních edémů v krajině ústní dutiny a horních dýchacích cest často volíme tracheostomii k zajištění průchodnosti dýchacích cest.

**3.1.2. Krční bloková disekce**

Vedle eliminace vlastního nádorového ložiska musíme přistoupit i k eradikaci metastáz v oblasti krčních lymfatických uzlin na krku.

Crile v roce 1906 navrhl tzv. *radikální krční blokovou disekci* s odstraněním lymfatických uzlin i přes klinicky negativní nález krčních metástaz. Tato operace ve své době znamenala průlom v léčbě nemocných nádory hlavy a krku, jimž umožnila výrazně delší přežití. Je nutné podotknout, že i v dnešní době má tato operace stále své místo v chirurgické léčbě krčních metastáz.

Podle současné klasifikace Výboru pro chirurgii hlavy a krku Americké akademie otolaryngologie - chirurgie hlavy a krku (*Committee for Head and Neck Surgery and Oncology of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*) rozlišujeme několik typů krčních blokových disekcí, které jsou založeny na následujcích principech:

Radikální krční bloková disekce - standardní zákrok k provedení krční lymfadenektomie, všechny ostatní operace reprezentují jednu nebo několik modifikací této operace.

Zákrok spočívá v en bloc odstranění tukově-lymfatické tkáně, která obsahuje lymfatické uzliny z etáží I-V a z okolí cauda parotis. Dále jsou resekovány n. accesorius, v. jugularis interna a m. sternocleidomastoideus.

Dnes je tato operace doporučena pouze u pacientů s vysokým N+ stádiem, při uzlinových recidivách po chemoradioterpii nebo u pacientů s rozsáhlým extrakapsulárním šířením směrem k n. accesorius, m. sternocleidomastoideus a/nebo v. jugularis interna.

Modifikovaná radikální krční bloková disekce zachovává jednu nebo několik nelymfatických struktur. Rozsahem je tedy stejná jako radikální bloková disekce, ale šetrnější vůči jedné nebo několika důležitým strukturám, např. n. accesorius, v. jugularis interna, nebo m. sternocleidomastoideus.

Selektivní krční bloková disekce se zaměřuje na skupinu uzlin, které jsou vzhledem k lokalitě primárního tumoru statisticky nejčastěji postiženy.

U této blokové disekce u karcinomů dutiny ústní exenterujeme úrovně I-III. Doporučována je u stádií N0 a N1, nicméně díky složité lymfatické drenáži jazyka někteří autoři doporučují rozsah etáží I-IV.

Extendovaná krční bloková disekce zahrnuje odstranění dalších tkání, postižených metastatickým šířením nádoru.

**3.2. Radioterapie**

Radioterapie u onkologicky nemocných může být využita v rámci primární terapie nádorů hlavy a krku, jako adjuvantní nebo neoadjuvatní součást chirurgické léčby anebo jako tzv. paliativní léčba.

Biologický účinek samotné radioterapie lze navýšit úpravou frakcionace (hyperfrakcionace, akcelerovaná frakcionace, concomitant boost atd.), konkomitantní chemoterapií nebo biologickou léčbou (anti-EGFR terapie). Od ostatních nádorů hlavy a krku se odlišují jednak karcinom nosohltanu, kde je obvyklým léčebným postupem radikální radio-chemoterapie s adjuvantní chemoterapií a karcinom slinných žláz, kde je základem léčby chirurgický zákrok.

Radioterapie se skládá ze 2 hlavních kroků, kterými jsou *plánování ozařovacího pole a vlastní radioterapie*.

Cílem plánování ozařovacího pole je co nejpřesněji zaměřit vlastní ložisko nádoru a co nejvíce minimalizovat poškození okolních zdravých tkání. Je známo, že při použití dat ze standardní plánovací počítačové tomografie (CT) dochází k poměrně významným rozdílům při zakreslování gross tumor volume (GTV) mezi jednotlivými lékaři.40,41

Výsledky moderních zobrazovacích metod (CT s kontrastní látkou, PET CT, MR) je za účelem stanovení ozařovacího plánu možno fúzovat se samotným plánovacím CT. Studie Daisneho a spol42 uvádí, že v tomto smyslu je PET CT nejpřesnější.

Při ozařování v oblasti hlavy a krku se nevyhneme zacílení na oblast primárního nádoru a jedno- nebo oboustranných lymfatických uzlin na krku, což dělá tento zákrok složitým díky přítomnosti četných životně důležitých orgánů. Donedávna byla nejčastěji používanou metodou *technika postupného zmenšování polí (shrinking field technique)*, kdy oblasti primárního tumoru a oboustranných krčních uzlin byly ozařovány ze dvou protilehlých bočních polí dávkami 40-44Gy. Avšak homogenita dávky není u tohoto typu radioterapie zcela optimální, navíc plánování je velmi složité.

Naproti tomu *radioterapie modulovanou intenzitou (IMRT)* optimálně distribuuje dávky záření díky optimálnímu rozložení intenzity záření v jednotlivých polích. Celkově je tato metoda velmi výhodná, protože umožňuje homogenní ozáření cílového objemu za šetření rizikových struktur. Další, a velmi podstatnou výhodou této léčebné modality je šetření oblastí velkých slinných žláz, čímž se pro pacienta minimalizuje jedna z velkých komplikací ozařování v oblasti hlavy a krku - xerostomie. Toto bylo potvrzeno i studií PARSPORT, která porovnávala výsledky konvenční/konformní radioterapie a IMRT u pacientů s nádory oro- a hypofaryngu a indikací krčních uzlin oboustranně. Výsledky ve smyslu lokální/regionální kontroly i celkového přežití byly srovnatelné, ale jednoznačně lepší byly výsledky IMRT ve smyslu snížení xerostomie za 1 rok po léčbě (p = 0,003)43. Podobný závěr přinesly i dvě randomizované studie s karcinomy nasofaryngu44,45.

Výhodou IMRT techniky je šetření struktur v okolí nádoru, jako jsou faryngeální konstriktory, oblast glottis a supraglotického laryngu se snahou snížit dysfagické obtíže po prodělané radioterapii47-48.

*Protonová terapie*

Jedná se aplikaci ozáření urychlenými protony. Výhoda této léčby spočívá v přesném ozáření cílového objemu za mnohem většího šetření okolních zdravých tkání ve srovnání s léčbou fotony. Nejčastější indikací této léčby jsou u sinonazální karcinomy, neboť protonová terapie nabízí snížení očních komplikací díky šetrnosti vůči očím a optickým nervům.49.

**3.3. Chemoterapie**

Ve spektru metod využívaných pří léčbě nádorů hlavy a krku má chemoterapie spíše pomocný, doplňující význam. V protokolech standardní léčby OFK rozlišujeme 3 druhy chemoterapie: neoadjuvantní, adjuvantní a konkomitantní radiochemoterapii.

Neoadjuvantní (indukční) chemoterapie může být podávána s cílem zlepšit výsledky léčby, nebo je součástí takzvaných záchovných protokolů. Záchovný protokol představuje alternativu k radikální chirurgické léčbě. V úvodu podaná chemoterapie má za úkol selektovat nádory vhodné pro primární radioterapii. Vychází se z předpokladu, že chemosenzitivní nádor bude i radiosenzitivní.54

Příkladem této léčby může být lokoregionální neoadjuvatní chemoterapie kanylací arteria temporalis superficialis, jejíž dlouhodobý efekt a význam pro dobu přežití nemocného nebyl potvrzen.55,56

Účelem adjuvantní chemoterapie je terapeuticky ovlivnit eventuální vzdálené mikrometastázy nádoru. V současné době se považuje za prokázané, že konkomitantní podání chemoterapie s radioterapií je účinnější než neoadjuvantní chemoterapie s následným zářením. Ukazují na to výsledky metaanalýz hodnotící velké množství pacientů, kterým byla chemoterapie podána55,56. Chemoterapie do jisté míry senzibilizuje nádorovou tkáň k účinku radiačního záření a tím zlepšuje výsledný efekt léčby. Nevýhodou konkomitantní chemoterapie je její toxicita, kterou pacienti zejména s pokročilým onemocněním nádory hlavy a krku nemusejí vždy tolerovat.

**3.4.Biologická léčba**

V posledních několika letech je věnována pozornost látkám, které zasahují pouze některé molekulární cíle. Tyto preparáty působí cíleně na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR - epidermal growth factor receptor). Jde o jeden z transmembránových signálních proteinů, který se podílí na kontrole normálního buněčného růstu a diferenciace, ale i na vzniku nádoru a jeho propagaci. EGFR je exprimován řadou nádorů, včetně karcinomů hlavy a krku, a jeho vysoká exprese koreluje s agresivitou nádoru, nižším přežitím a rezistencí vůči radioterapii57,58. Biologická léčba bývá zařazována zpravidla v kombinaci s radioterapií jako pooperační zajištění, nebo v případech pooperačních nádorových recidiv. Její nevýhodou zůstávají zatím zejména vysoké finanční náklady a časově omezené prodloužení doby přežití pacientů (v řádu měsíců). Lepších výsledků bylo dosaženo při léčbě u karcinomů orofaryngu a  lépe diferencovaných nádorů.59

**4. Lidské transformující viry**

Nejen HPV viry jsou zodpovědné za maligní transformaci buněk. Zvířecí viry bývají zodpovědné za akutní transformaci buněk, naproti tomu humanotropní viry k maligní transformaci potřebují delší dobu latence se spoluúčastí vnitřních a vnějších vlivů29.

V současné době (podle International Agency for Research on Cancer - IARC) je 7 lidských virů považováno za potenciálně karcinogenní pro člověka. Jde o virus Ebstein-Barrové (EBV, HHV4), některé typy lidských papilomavirů (HPV), virus hepatitidy B (HBV), virus hepatitidy C (HCV), lidský T- lymfotropní virus 1 (HTLV-1), lidský herpesvirus 8 (HHV-8, KSHV) a virus lidské imunodeficience (HIV) (Tabulka 1). Merkel cell polyomavirus (MCPyV) bude nejspíše do této skupiny v dohledné době rovněž zařazen30. Další skupiny virů jsou v podezření a to zejména polyomaviry (lidské i zvířecí) a adenoviry. Velká pozornost je také směřována k endogenním retrovirům, zejména roli evolučně poměrně mladého endogenního retroviru HERV v etiologii rakoviny prsu.31,19

|  |  |
| --- | --- |
| **Název viru** | **Malignita** |
| EBV | Burkitův lymfom  Hodgkinův lymfom  Karcinom nosohltanu  Posttransplantační lymfoproliferativní nemoc |
| HPV | Karcinomy anogenitální oblasti (děložní čípek, vulva, vagina, anus, penis) Karcinomy hlavy a krku |
| Lidský herpesvirus 8 | Kaposiho sarkom  Lymfom serózních blan  Primární efusní lymfom  Multicentrická Castlemanova choroba |
| Virus hepatitidy B | Hepatocelulární karcinom |
| Virus hepatitidy C | Hepatocelulární karcinom |
| Lidský T- lymfotropní virus -1 | T-buněčná leukemie/lymfom dospělých |
| HIV | Lymfomy |

*Tabulka . Přehled humanotropních kancerogenních virů 19*

Při hledání příčinné souvislosti mezi patogenem a onemocněním se vychází z upravené verze Kochových postulátů20, která zohledňuje molekulárně biologické techniky:

- Pouze nemocná tkáň by měla obsahovat genom podezřelého patogenu.

- Vyléčení nemoci je doprovázeno snížením počtu kopií genomu patogenu.

- Mikrobiální genom je možné detekovat před propuknutím onemocnění a měl by korelovat se závažností onemocnění.

- Povaha mikroorganismu detekovaného pomocí jeho nukleových kyselin by měla být ve shodě se známou biologickou charakteristikou onemocnění.

- Molekulární průkaz je reproducibilní.

**5. Lidský papilomavirus**

Virus lidského papilomaviru náleží do skupiny *Papovaviridae,* která zahrnuje přibližně 100 různých sérotypových druhů, a dále dělí do dvou dílčích skupin - *alfa a beta.* Jedná se o malé neobalené dvouvláknové DNA viry, které jsou mutačně stabilní a druhově specifické. Virus lze nalézt na mnoha místech těla - na sliznicích (děložním čípku, v ústech, oro- hypofaryngu), kůži - v oblasti genitálu nebo konečníku. HPV nacházíme v mnoha lézích, které mají charakter benigních (veruky, condylomata accuminata), ale i maligních solidních nádorů (karcinomy děložního čípku, pyje, kůže, dutiny ústní, orofaryngu).

Genom HPV se skládá ze 3 oblastí:

- regulační region (LCR) - obsahuje vazebná místa pro virové proteiny E1 a E2, zde začíná virová replikace, dále promotory (P1-P4) a vazebná místa pro transkripční faktory

- časný region (early region)

- pozdní region (late region).

Na základě rizika malignizace hostitelské buňky byly vytvořeny 3 skupiny, do nichž jsou jednotlivé typy HPV řazeny: low risk, intermediate risk a high risk (HR).

Skupina *alfa* HPV je jedinou, která je obsažena v skupině HR HPV tumorů, nejlépe probádanou a nejvíce diskutovanou s ohledem na riziko maligních transformací infikovaných buněčných struktur.

Prevalenci přítomnosti lidského papilomaviru v neopláziích16-19 vyjadřuje Tabulka 2:

|  |  |
| --- | --- |
| **Lokalizace** | **Prevalence** |
| Karcinom děložního čípku | 99.7 % |
| Karcinom anu | až 93 % |
| Karcinom pochvy | až 91 % |
| Adenokarcinom děložního čípku | 82 % |
| Karcinom penisu | až 82 % |
| Karcinom vulvy | 40 % |
| Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku | až 35 % |

**Tab. 2** *Prevalence přítomnosti lidského papilomaviru v různých neopláziích.*

Z pohledu OFK řadíme k HR-HPV typy 16, 18, 31, 33, 35. Jedná se o viry s dvouvláknovou DNA s přibližně 8000 nukleotidy, které kódují sedm časných (early) genů (E1-7), dva pozdní (late) L1, L2 a locus control region (LCR) (Obr. 1). Z výše uvedených je nejčastějším zástupcem typ 16, který se vyskytuje asi v 90-95% HPV+ nádorů, následovaný značně menší skupinou typů 18 a 33 (4-8).

Naproti tomu patogenetický význam HPV ze skupiny *beta* je v tomto směru ještě diskutabilnější21,22, neboť biologické chování těchto virů není dostatečně známo. Je proto zapotřebí hlubšího objasnění jejich molekulárních charakteristik a znalost epidemiologie, aby bylo možné lépe porozumět jejich roli v karcinogenezi.19

Většina HPV typů ze skupiny beta vytváří benigní proliferace, které spontánně regredují v horizontu 5 let23. Maligní transformace těchto lézí je spolehlivě prokázána jen u pacientů trpících vzácnou genetickou chorobou známou pod názvem epidermodysplasia verruciformis (EV)24. Ve vztahu s EV jsou beta HPV typy 5 a 8 klasifikovány jako vysoce rizikové25. Beta HPV byly detekovány ve velké části nemelanomových kožních malignit nejen u imunokompromitovaných, ale také u imunokompetentních pacientů26. Proto případná role beta HPV v karcinogenezi je předmětem výzkumu19.

**5.1. Přenos infekce**

Infekce lidským papilomavirem je považována za sexuálně přenosné onemocnění (STD). K přenosu infekce může dojít jakýmkoliv sexuálním stykem – koitálním, nekoitálním, hetero- nebo homosexuálním, a to obousměrně. Přenos infekce může nastat i líbáním nebo autoinokulací. Mechanizmus osídlení dutiny ústní je objasněn nejméně. Obecně se za nejpravděpdobnější považují alternativní koitální praktiky (orogenitální přenos). Nicméně často typ HPV v ústech a na genitálu není totožný a to jak u sexuálního partnera tak u osoby samotné62-65. Podle některých autorů není možné vyloučit přenos nepohlavní cestou: bylo prokázáno, že viry v keratinocytech mohou za vhodných podmínek přežívat až jeden týden61. Vzhledem k tomu, že virémie vzniká až po infekci virem HPV, je kontaminace krevní cestou spíše nemožná.66

Poslední možností přenosu infekce zůstává vertikální přenos z matky na dítě. Toto je teoreticky možné dvěma způsoby: v průběhu těhotenství nebo během porodu72. Tento přenos je sice možný, avšak dochází k němu relativně vzácně. Pokud dojde k infekci, většinou do několika měsíců vymizí73. K trvalé infekci dutiny ústní dochází u asi 10% infikovaných jedinců a ke genitální u méně než 2% takto infikovaných novorozenců.74

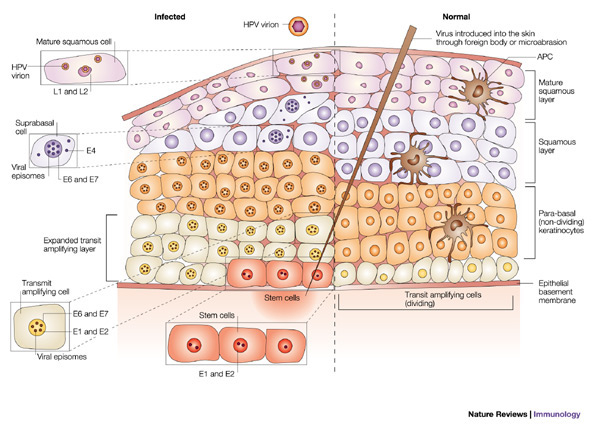
HPV jsou celosvětově nejčastěji přenášeným infekčním agens. Celoživotní riziko infekce u žen je až 80%60. Přenos pravděpodobně nastane kontaktem sliznic obou partnerů během sexuálního styku. Drobné ranky, které se na sliznici nebo kůži vyskytují pak slouží jako vstupní brána pro infekci virem, který se tak dostane ke slizniční bazální membráně.

**5.2. Mechanismus infekce buňky virem HPV**

Dlaždicobuněčný epitel sliznic lidského těla v místech *skvamo-kolumnární junkce* přechází v epitel cylindrický. V této lokalitě dochází k výrazné proliferační aktivitě; jedná se o oblast velmi náchylnou k infekci HPV.

Bazální nebo parabazální buňka skvamo-kolumnární junkce se může transformovat jak v keratinocyt, tak v buňku cylindrického epitelu. Proto případné dysplastické změny mohou být v oblasti obou zmíněných typů epitelu.67 HPV však k dokončení svého životního cyklu potřebuje diferenciační gradient, který je přítomen pouze v mnohovrstevném dlaždicovém epitelu, nikoliv však v jednovrstevném cylindrickém epitelu. To je důvod, proč v posledně uvedeném není primární sídlo HPV infekce.63

Virus se po proniknutí defektem v epitelu váže na jeho bazální membránu a následně na bazální keratinocyty68 (Obr. 6). Obě vazby jsou zprostředkovány virovým kapsidovým proteinem L170,71. Inkorporace viru je však mnohem složitější proces. Jedná buňka může být infikována několika typy HPV, do genomu hostitele se ale zpravidla zapíše pouze jeden.



***Obr. 6*** *Cesta infekce epitelu virem HPV 69*

**5.3. Charakteristika pacientů s HPV+ karcinomem**

HPV+ tumory byly v posledních 10 letech intenzivně studovány. Dnes víme, že dutina ústní a orofarynx jsou k infekci lidským papilomavirem náchylné, přičemž typ HPV 16 je nejčastějším zástupcem high risk skupiny78,79.

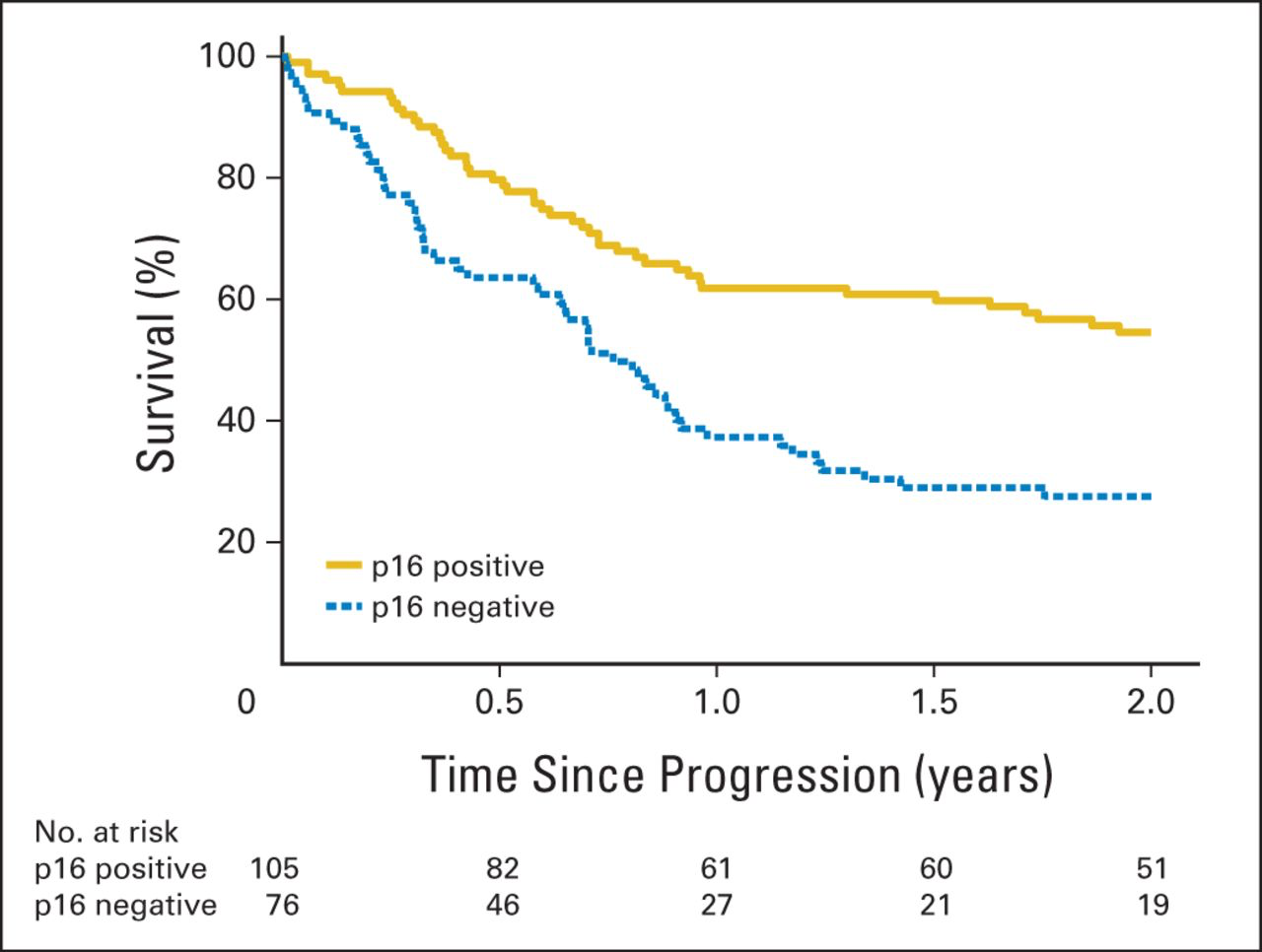
Nemocní s HPV tumorem jsou většinou v mnoha aspektech odlišní od "klasických" HPV negativních. Jedná se většinou o mladší pacienty, často s dobrým socioekonomickým zázemím a vyšším vzděláním (Tab. 3)

Srovnání skupin pacientů s HPV pozitivním a negativním spinaliomem dutiny ústní a orofaryngu:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **HPV +** | **HPV –** |
| **Lokalizace** | tonzily, baze, kořen jazyka | kdekoliv |
| **Incidence** | vzestupná | stejná |
| **Věk** | mladší jedinci | starší jedinci |
| **Pohlaví** | M:Ž 3:1 | M:Ž 3:1 |
| **Socioekonomický status** | střední až vysoký | nízký |
| **Rizikové faktory** | sexuální promiskuita | alkohol, tabák |
| **Prognóza** | lepší | horší |

**Tab. 3** *Srovnání skupin pacientů s HPV pozitivním a negativním spinaliomem dutiny ústní a orofaryngu*

Pacienti, jejichž nádor je p16 pozitivní mají ve srovnání s pacienty p16 negativními signifikantně vyšší pravděpodobnost, že se u nich nerozvine recidiva tumoru po prodělané chemoradioterapii. Dále i přes progresi recidivy nádoru mají pacienti s p16 pozitivními karcinomy dutiny ústní signifikantně vyšší délku přežití než u skupiny p16 negativních, jak ukázal závěr studie Fakhryové z roku 2014.81 (Graf 1)

****

**Graf 1** *Graf ukazující srovnání 2 letého přežití od vypuknutí recidivy u pacientů p16 pozitivním a negativním karcinomem orofaryngu81.*

Chirurgická terapie u HPV+ tumorů má, stejně jako u HPV negativních, ve srovnání s ostatními léčebnými modalitami, nejlepší efekt. Fakhryová81 ve své studii hodnotí výsledky operací u lokoregionálních recidiv, ze kterých vyplývá, že operace i v případě recidivy HPV+ tumoru má prognosticky lepší výsledek než pouhá paliativní adjuvantní terapie.

Také paliativní chemoterapie HPV+ karcinomů vykazuje vyšší pravděpodobnost petiletého přežití než u HPV- 86. Důvodem proč HPV pozitivní karcinomy lépe reagují na léčbu, může být skutečnost, že ve sorvnání s HPV negativními vykazují rozdíly v expresi p5382, p1683, p2183 a EGFR84,85.

**5.4. Detekce lidského papilomaviru**

V současné době existuje celá řada metod umožňujících stanovení přítomnosti HPV v biologickém materiálu. Mezi metody nepřímé patří zejména cytologie, histologie bioptického materiálu a imunohistochemické vyšetření.

**5.4.1 Histologická detekce infekce lidským papilomavirem**

Histopatologický obraz HPV-pozitivního spinaliomu dutiny ústní nemá specifické rysy. Ve většině případů jde o nekeratinizující, špatně diferencovanou lézi. Mohou být přítomny některé histopatologické znaky jako koilocytóza, dyskeratóza, hyperkeratóza, akantóza a parakeratóza. Koilocytóza je nejčastější cytopatický efekt viru a je považována za hlavní histopatologický aspekt HPV infekce. Koilocytóza označuje přítomnost abnormálních koilocytů s pyknotickým jádrem a velkým perinukleárním projasněním. Nicméně studie34-38 zabývající se průkazem HPV suspektních karcinomů orofaryngu na základě histologického vyšetření ve srovnání s detekcí pomocí PCR prokázaly, že přítomnost koilocytů v biopsiích spinocelulárních karcinomů dutiny ústní nesvědčí vždy pro skutečnou virovou infekci.

**5.4.2. Laboratorní diagnostika HPV infekce**

Existuje několik testů, umožňujících určit HPV etiologii orofaryngeálních spinocelulárních karcinomů: HPV PCR, HPV in situ hybridizace (ISH) a imunohistochemický průkaz exprese nádorově asociovaného supresorického proteinu p16. V klinické praxi se posledně uvedená metoda používá nejvíce.

P16 protein je regulátor buněčného cyklu, jehož normální funkcí je potlačovat aktivitu cyklin dependentních kináz. Byl dokumentován jako marker transkripčně aktivních HPV u orofaryngeálních karcinomů. Overexprese p16 se dává do souvislosti s lepší odpovědí na terapii a lepší klinické výsledky u orofaryngeálních spinocelulárních karcinomů. Overexprese p16 proteinu se objevuje jako výsledek degradace Rb proteinu HPV E7 onkoproteinem. Protože p16 je tumor supresorový protein, jehož normální funkcí je inhibice cyklin dependentních kináz, chybí jeho exprese u většiny HPV negativních spinocelulárních karcinomů hlavy a krku, protože gen je mutovaný, deletovaný nebo metylovaný. Limitací proteinu p16 jako optimálního biomarkeru je, že není specifický jenom pro HPV infekci, protože může být overexprimovaný i jinými mechanizmy. Je prokázáno, že p16 pozitivní, HPV negativní spinocelulární karcinomy mají přežití srovnatelné s p16 pozitivními, HPV pozitivními tumory a statisticky signifikantně lepší než p16 negativní, HPV negativní spinocelulární karcinomy. P16 protein tak určuje největší kohortu orofaryngeálních spinocelulárních karcinomů s „dobrou prognózou“.

Využití serologických metod pro průkaz HPV infekce je sporné. papilomaviry neprocházejí totiž virémickou fází, a jsou jen velmi obtížně kultivovatelné na tkáňových kulturách. Kazuistiky z posledních let naznačují, že vzorky získané v čase diagnózy u nádorů orofaryngu, penisu a děložního čípku jsou velmi silně asociovány s HPV 16 E6 a E7 séropozitivitou 9.

V laboratorní praxi se nejčastěji používají molekulárně genetické HPV testy, dnes již komerčně dostupné, které umožňují detekci virové nukleové kyseliny ve vzorku. Odlišují se mezi sebou především senzitivitou a specifitou. Rozlišujeme zejména screeningové HPV testy, genotypizační HPV testy a HPV in situ hybridizační testy75**.** Volba metod detekce HPV závisí na požadovaném výsledku dané laboratoře. Pro rutinní preventivní a diagnostický screening cervikálních lézí obvykle plně postačuje určení HPV negativity nebo HPV pozitivity bez určení konkrétního HPV typu. V případě pozitivního výsledku lze některou z typizačních metod určit konkrétní genotyp ze skupiny HR (High risk – vysokého rizika) či LR (low risk – nízkého rizika) HPV. K tomuto účelu se využívá například PCR s typově specifickými primery, metoda RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) založená na rozlišení specifické délky restrikčních fragmentů či metodu hybridizace dot-blotu s typově specifickými oligopróbami. Komerčně dostupná je také metoda reverzní hybridizace.

Nejpoužívanější metodou stále je Hybrid Capture II systém (Digene), který používá pro hybridizaci RNA sondy jak pro skupinu HR HPV (typ 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68), tak pro skupinu LR HPV typů (6,11,42,43,44). Metoda je založená na přímé hybridizaci HPV DNA. Hybridy DNA-RNA, které vzniknou navázáním specifické skupiny sond, jsou detekovány pomocí specifických sekundárních protilátek konjugovaných s příslušným enzymem, který štěpí přidaný substrát za vyzáření chemiluminiscence. Chemiluminiscenční světlo je měřeno v luminometru a softwarem vyjádřeno jako relativní světelné jednotky (RLU - relative light unit) ve srovnání s kontrolami reakce. Pro zvýšení citlivosti detekce využívá metoda amplifikace signálu a stává se srovnatelně citlivou s detekcí založenou na bázi PCR. Některýé publikace uvádějí, že je takto možné detekovat přítomnost papilomavirů s citlivostí již od 1pg HPV DNA/ml. Metoda Hybrid Capture II je dobře reprodukovatelná. Vykazuje však určitou míru analytické nepřesnosti. Při analýze vzorků může docházet k tzv. křížové reaktivitě, která vzniká nežádoucí reakcí sondy s dalšími typy HPV a vede k falešně pozitivním výsledkům. Tento nedostatek je možné redukovat definováním šedé zóny testu a použitím vyšší cut-off hodnoty RLU pro stanovení jasně pozitivního nálezu. Výsledky ze šedé zóny jsou označeny za hraniční a je třeba je znovu testovat, aby bylo možno získat validní výsledek76.

Dalším možným způsobem detekce HPV s možností přesného určení genotypu je využití metod založených na polymerázové řetězové reakci – PCR (polymerase chain reaction). Metody PCR vykazují nejvyšší senzitivitu a jsou časově nenáročné. Při použití PCR je třeba vyloučit přítomnost inhibitorů DNA polymerázy a současně při každé reakci ověřit dostatečné množství DNA vstupující do reakce. Za tímto účelem se používá amplifikace kontrolního genu např. pro lidský beta-globin.

Podle výchozího materiálu lze volit různé systémy primerů v PCR. Nabízí se provedení jednostupňové nebo nested. Nested PCR je modifikace polymerázové řetězové reakce, kdy jsou použity dva páry primerů. První pár primerů amplifikuje požadovaný úsek stejně jako jednostupňová PCR. Druhý pár primerů nasedá na místo v PCR produktu amplifikovaném v první PCR reakci. Produkt druhé PCR reakce je ve srovnání s prvním produktem kratší. Hlavní výhodou nested PCR je, že zvyšuje specifitu amplifikace požadovaného úseku DNA a také zvyšuje výtěžek amplifikace.

Pro určení několika základních typů v jedné reakci je možné zvolit multiplexní PCR.

Výsledek PCR je vizualizován například pomocí elektroforézy nebo přímo metodou hybridizace a imunochemické detekce na mikrotitračních destičkách. V případě real time PCR je produkt detekován stanovením změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace.

Z dalších metod určení HPV typu je možné uvést kapilární sekvenaci, která může být i v provedení zahrnující předchozí klonováním amplikonů, nebo metodu SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Zvláštní skupinu tvoří testy detekující HPV na principu in-situ hybridizace (ISH). Testy jsou však poměrně náročné na provedení a vykazují nižší citlivosti detekce. Jedná se o navázání specifické sondy na genom HPV v buňce. Vzniklý hybrid je vizualizován pomocí systému protilátek s enzymatickým značením. Barevně změněný substrát v místě přítomné HPV infekce je pak detekován v histologickém kontextu pod mikroskopem. Rozdíly v barvení pozitivního signálu přibližně odlišují episomální infekci HPV od pokročilé infekce, kdy je virus již integrován do lidského genomu.

Nabídka molekulárně genetických testů pro detekci HPV je velmi široká. Při výběru správného testu může být nápomocná i Národní referenční laboratoř pro papilomaviry, která na svých stránkách uvádí přehledné hodnocení vybraných HPV testů.

Každá z metod má své výhody a svá rizika z hlediska citlivosti, specifity, rizika kontaminace, falešně pozitivních nebo negativních výsledků apod. Konečný výběr závisí vždy na účelu stanovení, přístrojových a prostorových možnostech laboratoře a zvážení rizik a výhod každé metody.

**Speciální část**

**6. Cíl práce**

Cílem předkládané práce je posoudit možnou souvislost mezi typy sexuálních praktik (koitálních vs. nekoitálních) a infekcí lidským papilomavirem v ústech a na děložním čípku.

**7. Materiál a metodika**

Ve spolupráci s Gynekologicko-porodnickou klinikou FN Olomouc a Katedrou mikrobiologie LF a FN Olomouc jsme vyšetřili 87 pacientek. Z nich 6 neudělilo souhlas se zařazením výsledků vaginálních, ale jen orálních stěrů do studie. U 81 pacientek z 87 jsme provedli stěry z dutiny ústní, orofaryngu a děložního čípku. Vyšetřované ženy byly seznámeny s cílem studie, podepsaly informovaný souhlasa vyplnily dotazník (Obr. 6), schválené Etickou komisí LF UP a FN Olomouc. Poté byly provedeny gynekologem stěry z děložního čípku a maxilofaciálním chirurgem z dutiny ústní z míst s nejpravděpodobnějším výskytem HPV infekce - tonzila, kořen jazyka a spodina dutiny ústní. Vzorky jsme poté odeslali do laboratoře ke zpracování metodou PCR.

Vzhledem k  možnosti přenosu infekce HPV do dutiny ústní a orofaryngu jinými než nekoitálními sexuálními praktikami, byly otázky v dotazníku (Obr. 6) směřovány také k hygienickým návykům (používání cizích zubních kartáčků), a také ke zlozvykům, kdy mohlo dojít k přenosu sliny do úst: při kouření marihuany, vodní dýmky či fajfky - což jsou aktivity, u kterých může docházet ve skupině ke sdílení náustku, případně cigarety samotné.

V naší práci jsme sledovali možný vztah infekce děložního čípku HPV HR a věkem, počtem orálních, koitálních, análních partnerů, dále kouřením a konzumací alkoholu. Za tímto účelem byla skupina probandek rozdělena na skupiny a to s HPV+ a HPV- nálezem na děložním čípku (VAG+ a VAG-).

Materiál, získaný stěry z oblasti děložního čípku z tonsily, kořene a spodiny jazyka byly zpracovány v laboratořích Katedry mikrobiologie LF UP a FN Olomouc metodou Real time PCR (HPV High Risk Screen Real-TM RG) firmy Sacace. Metoda byla detekována přítomnost HPV viru typů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) a jako pozitivní kontrola byl použit β-globinový gen používaný jako vnitřní kontrolu.

Pacientky byly rozděleny do skupin v závislosti na věkových dekádách (od 20 do 71 let) - viz graf 2. Nejpočetnější skupinou byly věkové kategorie 31-40 a 41-50 (po 14 respondentkách). Věkový průměr dotazovaných žen byl 43,2 let (min 22, max 83), medián 41 let.

**Graf 2** *Počet pacientek v decéniích*

Jméno a příjmení NEBO iniciály:………………

Datum narození NEBO rok narození:………………..

Povolání (v případě penze nebo více povolání, vyjmenujte prosím co nejvíce

povolání,které jste vykonával / vykonávala ) : ………………………….

Onkologie

Vyskytla se rakovina ženských orgánů u Vašich nejbližších přímých příbuzných?

Ano / Ne

Vyskytla se rakovina dutiny ústní u Vašich nejbližších přímých příbuzných?

Ano / Ne

 Kouření: Ano

Ne

Příležitostně

Pokud „ANO“ nebo „PŘÍLEŽITOSTNĚ“: Jak dlouho?.........

Zaškrtněte(možno i více): cigarety, doutník, fajka, joint, vodní dýmka

Kolik nejvíce za den:………

Drogy

Máte zkušenost s drogami: Ano / Ne

Pokud „ANO“, s jakými?

Užívala jste je pravidelně? Ano / Ne

Jak jste je aplikovala: Kouření: Ano/Ne

Do žíly: Ano / Ne

Tablety: Ano/ Ne

Dělila jste se někdy o pomůcky ke kouření nebo aplikaci drog (fajfka, viržínko,

injekční jehla)?: Ano / Ne

Péče o chrup

Dělila jste se někdy s někým o svůj zubní kartáček: Ano/Ne

Máte svého ošetřujícího stomatologa? Ano / Ne

Pokud ne: Jak dlouho?

Čistíte si zuby pravidelně? Ano/Ne

Pokud ano: kolikrát denně

Pijete alkohol? Ano / Ne

Pokud ano: Co (včetně piva)? ………………………………

Pravidelně?

Kolikrát denně?...............................................

Jak dlouho?.....................................................

 Sexuální partneři:

Jaká je Vaše sexuální orientace: Heterosexuální (osoby opačného pohlaví)

Homosexuální (osoby stejného pohlaví)

Bisexuální

 V jakém věku jste začala pohlavně žít?..............................................

Kolik sexuálních (i krátkodobých) partnerů jste doposud za celý život měla?...............

Prodělala jste nějakou sexuálně přenosnou chorobu? Ano / Ne

Pokud „ANO“, jakou?

 Sexuální praktiky:

Provozovala jste někdy:

A)    Orální sex: Ano (s kolika partnery)

Ne

B)    Anální sex: Ano (s kolika partnery)

Ne

**Obr. 6** *Dotazník*

**8. Výsledky**

Průměrné počty sexuálních partnerů uvádí Tab. 3, kde nám vychází, že nejvíce koitálních sexuálních partnerů se průměrně vyskytlo, podle předpokladů, ve vyšších věkových skupinách. Ovšem u probandek ve 3. deceniu bylo nevíce nekoitálních sexuálních partnerů ze všech věkových skupin.

Pozitivní high risk HPV výsledek by získán z úst pouze u jedné z 87 pacientek, tj v 1,1 % . Tato pacientka udávala 3 orální a 9 koitálních sexuálních partnerů, v tomto případě byl stěr z vaginy negativní na přítomnost HPV infekce. U 86 z 87 hodnocených tj. 98,9 % nebyla HPV infekce HR skupinou HPV prokázána.

Z našeho dotazníku vyplynulo, že 19 respondentek sdílelo cizí zubní kartáčky. 10 dotazovaných připustilo sdílení cigaretové špičky nebo fajfky s ostatními osobami. Mezi těmito ženami se nevyskytla ani jedna osoba drogově závislá, 11 z nich mělo zkušenost s kouřením kanabis. U žádné z těchto probandek nebyla HPV infekce v ústech nalezena.

U 10 z 81 (tj. 12,3 %) vyšetřovaných, byla zjištěna HPV HR infekce na děložním čípku, avšak v ústech se tato infekce neprokázala.

**8.1. Výsledky statistického zhodnocení souboru pacientek**

Z výsledků vyplývá, že pacientky ve skupině PCR VAG pozitivní byly signifikantně mladší a nacházelo se zde signifikantně více kuřaček, v jiných parametrech se vyšetřované skupiny významně statisticky nelišily. (Tab 5)

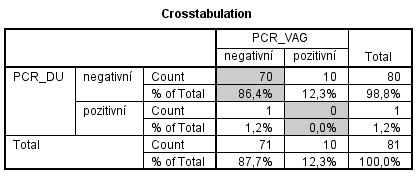
**Graf 3** *Průměrné počty sexuálních partnerů*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Celý soubor(n= 87)** | **Pacientky s pozitivním nálezem VAG (n=10)** | **Pacientky s negativním nálezem VAG (n=71)** | **P** |
| **Věk** | 35,0 (20-83) | 29,5 (21-37) | 36,0 (20-83) | **0,017** |
| **Pozitivita PCR DÚ** | 1 (1,1%) | 0 | 1 (1,4%) | 1,000 |
| **Počet orálních partnerů** | 5 (0-10) | 5 (0-7) | 4 (0-10) | 0,965 |
| **Počet koitálních partnerů** | 5 (0-13) | 5 (1-7) | 5 (0-13) | 0,393 |
| **Kouření** | 22 (25,3%) | 6 (60,0%) | 14 (19,7%) | **0,012** |
| **Alkohol** | 54 (62,1%) | 8 (80,0%) | 42 (60,0%) | 0,306 |
| **Anální sex** | 15 (17,2%) | 2 (20,0%) | 12 (16,9%) | 0,681 |

**Tab 5.***Statistické zpracování jednotlivých skupin respondentek*

Dále jsme posuzovali míru shody mezi pozitivitou PCR a z vaginálních stěrů a pozitivitou stěrů z dutiny ústní (Tab 6), kdy shoda mezi oběma testy je 86,4% (95%CI: 77,0%-93,0%).

95%CI je 95% interval spolehlivosti pro shodu metod.



**Tab 6** *Míra shody mezi pozitivitou PCR z vaginálních stěrů (PCR\_VAG) a dutiny ústní (PCR\_DU)*

Vnitřní kontrola betaglobinovým testem neodhalila chybnou metodiku odběru vzorku u žádného ze zpracovaných odběrů

Vyhodnocení dotazníku u všech respondentek ukazuje Tab. 4 :

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Pořadí pacientek** | **Věk** | **Místo stěru** | **PCR ze stěru** | **Poč. orálních sex. partnerů** | **Poč.koitál. sex. partnerů** | **1. sex. styk (léta)** | **Gyn onkol v OA** | **Onkol DÚ v OA** | **Kouření** | **kouření množství cigaret/den** | **Kouření jak dlouho (léta)** | **Drogy** | **Druh drogy** | **Sdíl. pomůcek k aplik drog** | **Dělení se o kartáček** | **Ošetřující stomatolog** | **Čištění chrupu(četnost/den)** | **Alkohol** | **Frekv. konz. alkoh. (x/týden)** | **Sexuální orientace** | **STD v OA** | **Anální sex(počet partnerů)** |
| **1.)** | 39 | DU | Negativní | 7 | 7 | 18 | N | N | Příl. | 2 | 6 | N |  |  | ne | Ano | 2 | A. | Příl | Hetero | ne | ne |
| **2.)** | 34 | DU | Negativní Negativní | 5 | 5 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
| **3.)** | 42 | DU | Negativní | 3 | 6 | 18 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A. | 3 | Hetero | ne | 1 |
| **3.)** | 38 | DU | Negativní | 6 | 8 | 18 | A | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A. | Příl | Hetero | ne | ne |
| **5.)** | 47 | DU | Negativní | 8 | 8 | 20 | A | N | A | 10 | 30 | N |  |  | ne | Ano | 6 | N |  | Hetero | ne | ne |
| **6.)** | 26 | DU | Negativní | 4 | 4 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A. | Příl | Hetero | ne | ne |
| **7.)** | 37 | DU | Negativní | 5 | 5 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A. | Příl | Hetero | ne | 2 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  | 17 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **8.)** | 27 | DU | Negativní | 3 | 3 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **9.)** | 35 | DU | Negativní | 5 | 5 | 16 | N | N | A | 5 | 15 | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **10.)** | 35 | DU | Negativní | 5 | 5 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **11.)** | 36 | DU | Negativní | 9 | 9 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 2 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **12.)** | 38 | DU | Negativní | 7 | 7 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **13.)** | 60 | DU | Negativní | 6 | 6 | 19 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **14.)** | 41 | DU | Negativní | 4 | 9 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **15.)** | 60 | DU | Negativní | 2 | 5 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **16.)** | 65 | DU | Negativní | 0 | 3 | 21 | A | N | A | 10 | 30 | N |  |  | ne | Ano | 0 (zubní náhrady) | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **17.)** | 56 | DU | Negativní | 4 | 6 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **18.)** | 25 | DU | Negativní | 6 | 5 | 16 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 1 | A | 1 | Hetero | ne | 2 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **19.)** | 49 | DU | Negativní | 3 | 10 | 15 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **20.)** | 22 | DU | Negativní | 6 | 6 | 16 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **21.)** | 36 | DU | Negativní | 5 | 7 | 17 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **22.)** | 36 | DU | Negativní | 7 | 7 | 19 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | 3 |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **23.)** | 30 | DU | Negativní | 3 | 5 | 15 | N | N | A | 2 | příl | A | Marihuana | A | Ano | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **24.)** | 37 | DU | Negativní | 7 | 3 | 17 | N | N | A | 5 | 15 | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **25.)** | 44 | DU | Negativní | 6 | 9 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **26.)** | 53 | DU | Negativní | 3 | 10 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **27.)** | 35 | DU | Negativní | 8 | 8 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **28.)** | 60 | DU | Negativní | 4 | 6 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **29.)** | 25 | DU | Negativní | 10 | 5 | 16 | N | A | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **30.)** | 45 | DU | Negativní | 5 | 4 | 16 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **31.)** | 35 | DU | Negativní | 6 | 10 | 15 | N | N | A | 3 | příl | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **32.)** | 24 | DU | Negativní | 7 | 3 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **33.)** | 51 | DU | Negativní | 5 | 13 | 15 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **34.)** | 69 | DU | Negativní | 0 | 7 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **35.)** | 57 | DU | Negativní | 1 | 6 | 19 | N | N | A | 15 | 35 | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **36.)** | 45 | DU | Negativní | 3 | 5 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **37.)** | 42 | DU | Negativní | 7 | 5 | 16 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **38.)** | 46 | DU | Negativní | 4 | 6 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
| **39.)** |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 41 | DU | Negativní | 8 | 8 | 16 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 2 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **40.)** | 30 | DU | Negativní | 6 | 9 | 16 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **41.)** | 40 | DU | Negativní | 5 | 9 | 15 | N | N | A | 10 | 25 | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **42.)** | 45 | DU | Negativní | 3 | 8 | 16 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **43.)** | 32 | DU | Negativní | 9 | 4 | 15 | N | N | N |  |  | A | Marihuana | A | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **44.)** | 49 | DU | Negativní Negativní | 0 | 7 | 19 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **45.)** | 75 | DU | Negativní | 0 | 6 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 0 (zubní náhrady) | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **46.)** | 51 | DU | Negativní | 5 | 5 | 21 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **47.)** | 41 | DU | Negativní | 6 | 5 | 19 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **48.)** | 46 | DU | Negativní | 6 | 10 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **49.)** | 83 | DU | HR pozit. pozitivní | 3 | 9 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **50.)** | 45 | DU | Negativní | 3 | 2 | 19 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 0 (zubní náhrady) | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **51.)** | 30 | DU | Negativní | 4 | 3 | 18 | N | N | N |  |  | A | Marihuana | N | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **52.)** | 28 | DU | Negativní | 4 | 4 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **53.)** | 26 | DU | Negativní | 8 | 7 | 16 | N | N | A | Příležitostně | 4 | A | Marihuana | A | ne | Ano | 2 | A. | 1 | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **54.)** | 36 | DU | Negativní | 5 | 5 | 17 | N | N | A | Příležitostně | 5 | N |  |  | ne | Ano | 2 | A. | Příl | Hetero | ne | 5 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **55.)** | 34 | DU | Negativní | 1 | 1 | 29 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 1 | N |  | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **56.)** | 31 | DU | Negativní | 3 | 3 | 17 | A | N | A | Příležitostně | | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **57.)** | 34 | DU | Negativní | 4 | 1 | 15 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **58.)** | 37 | DU | Negativní | 4 | 1 | 20 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **59.)** | 34 | DU | Negativní | 3 | 2 | 16 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **60.)** | 34 | DU | Negativní | 1 | 1 | 29 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **61.)** | 39 | DU | Negativní | 4 | 5 | 17 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **62.)** | 23 | DU | Negativní | 6 | 4 | 16 | A | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A. | 1 | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **63.)** | 35 | DU | Negativní | 2 | 1 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **64.)** | 32 | DU | Negativní | 5 | 2 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **65.)** | 21 | DU | Negativní | 0 | 4 | 18 | N | N | A | Příležitostně | | N |  |  | ne | Ano | 3 | A. | Příležitostně | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **66.)** | 34 | DU | Negativní | 6 | 6 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A. | Příl | Hetero | ne | 6 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **67.)** | 20 | DU | Negativní | 4 | 4 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | A. | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **68.)** | 34 | DU | Negativní | 5 | 6 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příležitostně | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **69.)** | 26 | DU | Negativní | 4 | 4 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **70.)** | 38 | DU | Negativní | 5 | 5 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **71.)** | 37 | DU | Negativní | 5 | 5 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **72.)** | 34 | DU | Negativní | 5 | 5 | 17 | N | N | A | Příležitostně | 12 | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **73.)** | 28 | DU | Negativní | 5 | 5 | 17 | N | N | A | 15 | neví | N |  |  | ne | Ano | 4 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **74.)** | 24 | DU | Negativní | 3 | 3 | 18 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 3 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **75.)** | 29 | DU | Negativní | 4 | 3 | 20 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **76.)** | 23 | DU | Negativní | 3 | 3 | 17 | N | N | N |  |  | A | Marihuana | A | Ano | Ano | 2 | A | Příl | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **77.)** | 36 | DU | Negativní | 0 | 4 | 17 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 |  |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **78.)** | 29 | DU | Negativní | 3 | 0 | 22 | A | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **79.)** | 20 | DU | Negativní | 8 | 8 | 15 | N | N | A | 4 | 4 | N |  |  | Ano | Ano | 2 | A | 4 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **80.)** | 33 | DU | Negativní | 6 | 6 | 21 | N | N | N |  |  | N |  |  | ne | Ano | 3 | N |  | Hetero | ne | 2 |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **81.)** | 31 | DU | Negativní | 4 | 2 | 20 | N | N | N |  |  | N |  |  | Ano | Ano | 2 | N |  | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **82.)** | 24 | DU | Negativní | 6 | 6 | 19 | N | N | A | 1 | 8 | A | Marihuana | Ano | ne | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **83.)** | 24 | DU | Negativní | 3 | 6 | 16 | N | N | A | 1 | 6 | A | Marihuana | Ano | Ano | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | 1 |
|  |  | VAG | HR pozitivní | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **84.)** | 23 | DU | Negativní | 2 | 4 | 16 | N | N | A | Příležitostně | 6 | A | Marihuana | Ano | Ano | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **85.)** | 24 | DU | Negativní | 3 | 2 | 18 | N | N | A | Příležitostně | 3 | A | Marihuana | Ano | Ano | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **86.)** | 24 | DU | Negativní | 4 | 4 | 19 | N | N | A | Příležitostně | 5 | A | Marihuana | A | Ano | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | ne |
|  |  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **87.)** | 23 | DU | Negativní | 7 | 7 | 16 | N | N | A | Příležitostně | 6 | A | Marihuana | Ano | Ano | Ano | 2 | A | 1 | Hetero | ne | 3 |
|  | VAG | Negativní |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Tab 4.** *Výsledek zpracování jednotlivých dotazníků*

**9. Diskuze**

Role tradičních kancerogenů u nádorů hlavy a krku spočívá především v indukci mutace genetických regulátorů buněčného cyklu. U HPV pozitivních tumorů se na deregulaci podílejí produkty virových onkogenů E6 a E711-13**.** E6 se naváže na p53 (buňky bez funkčního p53 nepodléhají apoptóze) a inaktivuje telomerázu. Vazba onkogenu E7 na pRb uvolní transkripční faktor, který aktivuje geny regulující buněčnou proliferaci. HPV+ tumory jsou charakterizovány sníženou hladinou retinoblastomového proteinu (pRb) a cyklinu D1. Jejich další vlastností je obsah nemutovaného (divokého typu) genu p5314. Problematickou zůstává otázka skutečné prevalence orální HPV infekce v asymptomatické populaci, jejíž podíl kolísá mezi 0-10%. Předpokládá se, že ke klinické manifestaci dlaždicobuněčného karcinomu dochází teprve s odstupem 10-35 let od infekce virem14.

V současné době existuje celá řada metod umožňujících stanovení přítomnosti HPV ve tkáních. Mezi metody nepřímé patří zejména cytologie a histologie bioptického matriálu. Využití serologických metod pro průkaz HPV infekce je omezené. Papilomaviry neprocházejí viremickou fází a jsou jen velmi obtížně kultivovatelné ve tkáňových kulturách. Samotný průkaz HPV protilátek se pro běžné klinické účely nepoužívá.

Incidence HPV asociovaných nádorů v dutině ústní, orofaryngu a hrtanu se značně liší. To je možné vysvětlit mimo jiné rozdílnými metodami detekce virů. Tak široké rozpětí je možné vysvětlit rozdílnými metodami detekce viru, kdy in situ hybridizace má nižší senzitivitu než polymerázová řetězová reakce (PCR), kde také záleží na zvolených primerech pro identifikaci viru.

Převažující výskyt HPV+ tumorů v orofaryngu je možné vysvětlit histologickým uspořádáním epitelu (viz dříve) v této lokalizaci, které je podobné architektonice povrchových vrstev epitelu děložního hrdla. Také krypty tonzil s velkým povrchem mohou mít vliv na zvýšený výskyt HPV infekce v této lokalizaci**13,88**.

Nezodpovězenou otázkou zůstává mechanizmus přenosu HPV do ústní dutiny. Papilomaviry jsou obecně pokládány za sexuálně přenosné; proto (i když s určitými výhradami13,87) převládá domněnka, že k přenosu infekce do úst dochází při nekoitálních sexuálních praktikách89. Riziko orálního přenosu infekce je pak úměrné počtu sexuálních partnerů. D´Souza89 považuje za vysoce rizikový počet 6 takových partnerů. Smith90 uvádí, že více než sexuální 4 partneři v období před klinickou manifestací nádoru indikují vyšší riziko vzniku nádoru v dutině ústní nežli v orofaryngu (85% vs. 50%, p = 0,07). Přítomnost high risk HPV bývá nižší u kuřáků než u nekuřáků, a to pravděpodobně pro vyšší promiskuitu u posledně jmenované skupiny. Smith dále uvádí, že dalším rizikovým faktorem je high risk HPV pozitivita u mužů jejichž partnerky měly abnormální Pap stěr nebo dysplazii čípku. Neshledal však jiné demografické riziko, rizikové sexuální praktiky ani léze na genitálu či ústní sliznici, které by byly charakteristické pro HPV+ pacienty. Smith uvádí, že pro vznik HPV asociovaného tumoru, je rizikovější mladší skupina pacientů, která v dotaznících uvedla větší množství sexuálních partnerů a rizikovější alternativní sexuální praktiky. HPV + tumory nalezl převážně u mladších pacientů (≤55 let).

Stran možné infekce novorozence při porodu porodními cestami panuje spíše skepse. Pokud taková situace nastane, jedná se o latentní infekci**90,91**, která se klinicky manifestuje zpravidla až po zahájení sexuálního života jedince92,61. Navíc typy orálních HPV infekcí jsou odlišné od typu infekce v oblasti anogenitální u sexuálního partnera93. Naopak u jedné osoby se mohou nacházet stejné typy v obou oblastech, což je možné vysvětlit autoinokulací61,15.

Mezi HPV + karcinomy převládají nízce diferencované nádory s lokoregionálními metastázami do lymfatických uzlin94-97. HPV v ústní dutině a orofaryngu vyvolává téměř výhradně spinocelulární karcinomy, zatímco v anogenitální oblasti může iniciovat i adenokarcinomy nebo malobuněčné karcinomy čípku.

Zdá se, že podíl HPV pozitivních tumorů hlavy a krku postupně narůstá. Podle retrospektivní studie Chaturvediho et al. byl v letech 1984-1989 podíl HPV – pozitivních OKC 16,3% v porovnání s lety 2000-2004, kdy to již bylo 72,7%97.

Celosvětově je incidence OFK disproporcionální. Vzhledem k nejednotnému přístupu detekce viru HPV v tumorech není možno přesně určit incidenci HPV pozitivních OFK a nádorů dutiny ústní ve světě. O srovnávací studii na podkladě nepřímých důkazů se pokusil Chatuverdiho tým107. Náplní studie bylo porovnání četnosti výskytu OFK a maligních nádorů plic, které jsou spojeny s kouřením. V zemích, kde došlo k poklesu incidence novotvarů plic, usoudili, že za etiologií OFK je s nejvyšší pravděpodobností infekce HPV. Ze závěrů tohoto výzkumu, který zahrnoval 183.000 pacientů ze 23 zemí 4 kontinentů, sledovaných v období 1983-2002 vyplynulo, že nejčastěji se orofaryngeální HPV karcinomy vyskytují paradoxně v rozvinutých zemích, tedy tam, kde protikuřácké kampaně snižují počty kuřáků, ale sexuální promiskuita a rizikové sexuální chování u mladších kohohort jsou na vzestupu. Ve stejné studii autoři odhadují, že v USA je 60-70 % orofaryngeálních karcinomů způsobeno virem HPV89,107, naproti tomu v ekonomicky méně vyvinutých zemích jsou tyto typy nádorů zastoupeny pouze v 10 %107-109.

Na prognózu HPV pozitivních tumorů není v současné době jednoznačný názor. Většina autorů až na malé výjimky (např. Dahlgren88 a Dahlstrand98)vyjadřuje přesvědčení, že HPV pozitivní OFK jsou prognosticky příznivější. Analýzou klinických dat bylo zjištěno, že  HPV pozitivní nádory hlavy a krku mají lepší odpověď na léčbu a také delší dobu přežití nemocných 99-101. Fischer102 považuje přítomnost p16-pozitivního proteinu za nezávislý pozitivní prognostický faktor u pacientů s karcinomy hlavy a krku a to nejen s ohledem na radioterapii nebo radiochemoterapii, ale i extirpaci tumoru s nebo bez adjuvantní terapie.

Nedávno byly zveřejněné dvě mezinárodní studie, které porovnávaly v retrospektivní studii chemoradioterapii u místně pokročilých tumorů hlavy a krku ve stádiu III ve vztahu přežití a k pozitivitě tumorů na HPV99,103. Ang et al.99 zjistili, že 63.8% z 323 pacientů s nádory hlavy a krku mělo HPV 16 pozitivní karcinomy (potvrzené in situ hybridizací). Tito nemocní měli lepší 3-leté přežití (82.4% vs 57.1% ve srovnání s pacienty s HPV-negativními tumory; P <0.001) a po započítání faktorů, jako byly věk, rasa, TNM staging, tabakismus, měli pacienti s HPV pozitivními nádory o 58% lepší výsledky přežití. P16 pozitivita se jevila jako silný prognostický indikátor, kdy p16 pozitivní pacienti měli 3 leté přežití v 83.6 % ve srovnání s 51.3% u p16-negativních pacientů. Po započítání všech ostatních faktorů měli p16 pozitivní pacienti o 67% nižší riziko úmrtí.104

Příznivější prognózu HPV pozitivních spinalomů lze z části vysvětlit dosud ne zcela objasněnou silnou imunitní reakcí, indukovanou radio- nebo chemoterapií. Dalším vysvětlením je dle Vermeera50 postiradiační snížení povrchových CD47 receptorů u HPV pozitivních tumor, což vede i k redukci objemu tumoru50.

Jednoznačný průkaz lepší prognózy HPV pozitivních nádorů doposud chybí. Nejsou k dispozici prospektivní studie, zabývající se prognózou HPV+ vs. HPV- nádorů. Z těchto důvodů doposud nebyl standardizován léčebný protokol pro HPV+ tumory v National Comperhensive Cancer Network Guidelines (NCCN) 105.

Samotná přítomnost HPV viru není nezbytným předpokladem budoucí klinické manifestace onkologického onemocnění. Proces kancerogeneze je velmi komplikovaný a není ještě plně objasněn. Nicméně průkaz HPV pozitivity by s ohledem na zvýšené riziko manifestace nádorové choroby patrně měl být důvodem k onkologické dispenzarizaci pacienta. Kolonizaci epitelu onkogenními HPV lze předejít vakcinací nejen ženské, ale i mužské části populace a to ještě ve věku, kdy lze předpokládat, že jedinci jsou virga - tedy že nedošlo k infekci HPV.

V zásadě existují dva typy vakcín proti HPV infenkci:

* profylaktické
* terapeutické

Od roku 2006 byly na trh uvedeny 2  profylaktické vakcíny, sloužící k vakcinaci jedinců, kteří doposud s infekcí do styku nepřišli (tzv. *naivní jedinci*).

Vývoj vakcíny, která by potlačila eventuálně plně eradikovala HPV infekci je v současné době předmětem výzkumu.

Výsledky námi předložené studie ukazují na nízkou prevalenci viru v dutině ústní a to i navzdory vysokému počtu sexuálních partnerů, které mnohé naše pacientky měly. Názor, že kolonizace dutiny ústní a orofaryngu HPV je přímo úměrná počtu sexuálních koitálních anebo nekoitálních partnerů se v našem souboru nepodařilo potvrdit. Můžeme však vyloučit, že nízký počet pacientek s HPV+ nálezem v dutině ústní byl způsoben metodickou chybou.

V naší studii jsme prokázali HPV HR pozitivní nález na děložním čípku u 10 probandek z 81, tj.u 12,83 %. Caňadase et al.87 udává na vzorku 188 prostitutek HPV high risk děložního čípku až v 80 %. Takto vysoké číslo je vysvětlitelné promiskuitou jeho probandek.

HPV pozitivita v dutině ústní byla v naší studii prokázána jen u jediné pacientky z 87, tj, u 1,1 %. Tato čísla jsou porovnatelná s výsledky Kurose et al.106, který provedl kontrolní stěry na 662 zdravých dobrovolnících, kdy HPV infekci prokázal u 0,6 %.

Prokázali jsme, že pacientky VAG + byly signifikatně mladší než VAG-. Tento rozdíl je vysvětlitelný tím, že jak ženy, tak i jejich partneři v mladších věkových kategoriích měli větší počet sexuálních (koitálních / nekoitálních) partnerů, tedy že pravděpodonost nákazy HPV HR infekcí byla vyšší nežli u starších pacientek.

Vyšší promiskuitou u mladších *partnerů* si vysvětlujeme skutečnost, že jsme nezjistili signifikatntně vyšší počet všech sexuálních partnerů u VAG+ žen. Rovněž jsme prokázali statisticky vyšší počet kuřaček ve skupině VAG+ žen. To si vysvětlujeme tím, že tyto probandky se pravděpodobně rekrutovaly ze sociálně slabších skupin. Nemůžeme prokázat přímou etiologickou souvislost mezi kouřením a kolonizací děložního čípku tímto virem, ale tato etiologická souvislost nebyla v žádné dostupné práci zkoumána.

**10. Závěr**

V naší studii studii jsme nenalezi korelaci mezi sexuálním chováním a HPV pozitivitou v dutině ústní a orofaryngu. Řadíme se tak k těm několika autorům87,106, kteří popírají přímou korelaci mezi sexualitou a HPV nákazou dutiny ústní. Většina prací však tuto souvislost potvrzuje, tyto diskrepance mohou být vysvětlitelné rozdílnou prevalencí HPV infekce v jednotlivých zemích, způsobené rozdílným sexuálním chováním a promiskuitou v těchto zemích. Můžeme se však domnívat, že při vyšším počtu HPV+ probandek v dutině ústní by tato souvislost mohla být prokázána.

Z výsledků dizertace dále vyplývá, že pacientky s nálezem pozitivních stěrů z oblasti děložního čípku byly signifikantně mladší a nacházelo se zde významně vyšší počet kuřaček. Domníváme se, že oba tyto faktory nejsou nezávislými prediktory, ale mají vztah k sexuálním praktikám, životnímu stylu a HPV statusu v orální a genitální oblasti u partnerů, které jsme netestovali.

Vzhledem k neustále narůstající HPV asociovaných nádorů hlavy a krku bude této infekci nutno věnovat I do budoucna pozornost a v případě epidemiologicky závažné situace zvážit i preventivní vakcinaci dětí.

**Poděkování**

Chtěl bych touto cestou poděkovat svému školiteli panu prof. MUDr. Jindřichu Pazderovi, CSc., emeritnímu přednostovi KÚČOCH, za vlídné vedení a cenné rady po celou dobu mého studia.

V neposlední řadě chci vyjádřit své poděkování panu doc. MUDr. Martinovi Procházkovi, PhD., přednostovi Ústavu lékařské genetiky LF UP a FN Olomouc za umožnění spolupuráce při odběrech vzorků v rámci našeho výzkumu a také RNDr. Taťáně Štosové, PhD. z Katedry mikrobiologie LF UP a FN Olomouc za pomoc při zpracování vzorků stěrů.

Velké díky patří mé rodině, která mi umožnila svou tolerancí strávit čas psaním této práce.

**11. Použitá literatura**:

1.) Hannahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1):57–70.

2.)Kamangar F, Dores GM, Anderson WF: Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol 24: 2137-2150, 2006

3.) Marx ER, Stern D: Oral and Maxillofacial Pathology a Rationale for Diagnostic and Treatment, Quintessence Publishing Co, Inc, 2003.

4.) Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 2000; 92:709–720.

5.) Mork L, Lie AK, Glattre E, et al. Human papillomavirus infec- tion as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 2001; 344:1125–1131.

6.) Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst S, et al. Detection of type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil. J Clin Pathol 1990; 43:918–921.

7.) Adams V, Schmid S, Zariwala M, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in head and neck cancer carrying wild type or mutant p53 tumor suppressor genes. Anticancer Res 1999; 19:1–6.

8.) Zang ZY, Sdek P, Cao J, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33:71–74.

9.)Pfister DP, Fury MG. New Chapter in Understanding of Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer JCO October 20, 2014;32: 3349-3352.

10.) Krüger M, Pabst AM et al.The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: A retrospective analysis of 88 patients and literature overview. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2014; 42:1506-1514.

11 Chen, R., Aaltonen, L.M., Vaheri, A. Human paillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. Rev. Med. Virol., 2005; 15: 351-363.

12 Schlecht, N.F. Prognostic value of human papillomavirus in the survival of head and neck cancer patients: an overview of the evidence. Oncol. Rep. 2005; 14: 1239-1247.

13 Klozar, J., Zabrodsky, M., Kodet, R., et al. Human papillomaviruses in etiology of carcinoma in oral cavity and oropharynx, Otorinolaryng. a Foniat (Prague), 2007; 56 No.2:73-81.

14 Andl, T., Kahn, T., Pfuhl, A., et al. Etiological involvment of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomsas lacking retinoblastoma cell cycle control. Cancer Res 1998; 58: 5-13.

15 Novakova, V., Laco, J. Úloha lidského papilomaviru v karcinogenezi nádorů hlavy a krku. Klin Onkol 2008; 21:141 – 148.

16 Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, et al.: Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, 2006;31,24: Suppl 3:S3/1-10.

17 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al.: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol., 1999; 189:12-9.

18 Katzenellenbogen RA, Galloway DA: Human papillomavirus-associated cancers. In:Viral Oncology-Basic Science and Clinical Applications, 2009;1:1-23.

19 Kašpírková J: Molekulárně biologická detekce virových a bakteriálních patogenů a jejich vztah k nádorovým a pseudonádorovým jednotkám, Doktorská dizertační práce, Plzeň 2012.

20 Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. Clin Microbiol., 1996;9(1):18-33.

21 Forslund O, Antonsson A, Nordin P et al.: A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. J Gen Virol., 1999;80:2437-43.

22 zur Hausen H: The search for infectious causes of human cancers: where and why. Virology. 2009;15(392):1-10.

23 Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C et al.: The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. Microbiol Mol Biol., 2009;73:348-70.

24 Majewski S, Jablonska S: Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. J Am Acad Dermatol, 1997;36:659-85.

25 Orth G: Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. Semin Immunol, 2006;18:362-74.

26 Harwood CA, Surentheran T, Sasieni P et al.: Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. Br J Dermatol, 2004;150:949-57.

27 Kolář Z, et al. Molekulární patologie nádorů. 1. vydání Olomouc. Epava 2003; 15 – 96.

28 Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kajman S. Influence of single nukleotide polymorphism in H – Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. Oral Oncology 2006; 42:607– 613.

29 Martin D, Gutkind JS: Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. Oncogene. 2008;27(2): 31-42.

30 Sihto H, Kukko H, Koljonen V et al.: Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2011; 15(17):4806-13.

31 Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL et al.: Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. Clin Cancer Res, 2001;7:1553-60.

32 Rejthar A, Vojtěšek B.: Obecná patologie nádorového růstu. 1. vydání, Grada Publishing, spol. s.r.o., Praha, 2002

33 Čáslava T.: Abnormální exprese regulátorů buněčného cyklu jako prediktivní faktor u spinocelulárního karcinomu jazyka a spodiny dutiny ústní. Disertační práce, Brno.

34 Al-Qahtani K, Brousseau V, Paczesny D, et al.. Koilocytosis in oral squamous cell carcinoma: what does it mean? J Otolaryngol 2007;36: 26-31.

35 Löning T, Meichsner M, Milde-Langosch K, et al.. HPV DNA detection in

tumours of the head and neck: a comparative light microscopy and DNA

hybridization study. ORL J Otorhinolaryn­gol Relat Spec 1987; 49: 259-269.

36 Salvia PN, Bergo SM, Bonesso-Sabadini PI, Tagliarini EB, et al. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. Int J Gynecol Cancer,2004; 14: 126-132.

37 Zuna RE, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. Comparison of human papillomavirus distribution in cytologic subgroups of low-grade squamous intraepithelial lesion. Cancer, 2006;108:288-297.

38 Miyahara GI et al. Correlation between koilocytes and human papillomavirus detection by PCR in oral and oropharynx squamous cell carcinoma biopsies, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, March 2011;106(2):166-169.

39 Hanuš, M., Matoušková, M. TNM klasifikace zhoubných nádorů, obecná část, 5. revize, 1997.

40 Vošmik M. et al. Moderní technologie v radioterapii nádorů hlavy a krku, Onkologie 2012; 6(5): 247–251.

41 Hermans R, Feron M, Bellon E, et al. Laryngeal tumor volume measurements determined with CT: a study on intra- and interobserver variability. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 40: 553–557.

42 Daisne JF, Duprez T, Weynand B, et al. Tumor volume in pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma: comparison at CT, MR imaging, and FDG PET and validation with surgi- cal specimen. Radiology 2004; 233: 93–100.

43 Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, et al. Parotid spa- ring intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neckcancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial, Lancet Oncol 2011; 12: 127–136.

44 Kam MK, Leung SF, Zee B, et al. Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients. J Clin Oncol 2007; 25: 4873–4879.

45 Pow EH, Kwong DL, McMillan AS, et al. Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: Initial report on a randomized controlled clinical trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; 66: 981–991.

46 Eisbruch A, Schwartz M, Rasch C, et al. Dysphagia and aspiration after chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: which anatomic structures are affected and can they be spa- red by IMRT? Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 60: 1425–1439.

47 Feng FY, Kim HM, Lyden TH, et al. Intensity-modulated radiotherapy of head and neck cancer aiming to reduce dys- phagia: Early dose-effect relationships for the swallowing structures. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 68: 1289–1298

48 Roe JW, Carding PN, Dwivedi RC, et al. Swallowing out- comes following intensity modulated radiation therapy (IMRT) for head&neck cancer – a systematic review. Oral Oncol 2010; 46: 727–733.

49 Weber DC, Chan AW, Lessell S, et al. Visual outcome of accelerated fractionated radiation for advanced sinonasal malignancies employing photons/protons. Radiother Oncol 2006; 81: 243–249.

50 Vermeer DW,Spanos WC,Vermeer PD et al: Radiation-induced loss of cell surface CD47 enhances immune-mediated clearance of human papillomavirus-positive cancer, Int. J. Cancer, 2013; 133: 120–130.

51 Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, et al: Cyclin D1 and p16 (INK4A) expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. Clin.Cancer Res. 1999; 5: 2810- 2819.

52 Rotterova P, Nenutil R, Rotter L et al. The detection of p16 protein in uterine cervix lesions. Ceska Gynekol 2005; 70: 295-298.

53 Lin SC, Chang KW, Chang CS, et al. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. J Oral Pathol Med. 2000; 29: 159- 166.

54 Klozar J.: Role chemoterapie v léčbě karcinomů hlavy a krku. Otorinolaryng. a Foniat. /Prague/, 2008, 57(3):159-164.

55 Lignin, J. P., Bourhis, J., Domenge, C., Designe, L.: Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet, 2000;355:949-955.

56 Lignin, J. P., le Maitre, A., Bourhis, J.: Meta-analyses of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys , 2007;69: 112-114.

57 Liang, K., Ang, K. K., Milas, L., Hunter, N., Fan, Z.: The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 2003; 57: 246-254.

58 Magne N,Pivot X,Bensadoun RJ,et al.: The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemo-radiotherapy. Eur. J. Cancor,2001;37: 2169-2177.

59 Vermorken, J., Mesia, R., Vega, V., et al. Cetuximab extends survival of patients with recurrent or metastatic SCCHN when added to first line platinum based therapy: Results of a randomized phase III (Extreme) study. In ASCO 2007 (Abstract No 6091; updated information presented).

60 Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, et al Epidemiological and clinical aspekts of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. Rev Med Virol 2004;14:95-105.

61 Laco J. Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu, Galen, 2012, ISBN 978-80-7262-874-2

62 Haddad R, Crum C, Chen Z, et al HPV 16 transmission between a couple with HPV related head and neck cancer. Oral Oncol 2008;44:812-815.

63 Manden BS, van den Brule AJ, Jensen HL, et al. Risk faktors for squamous cell carcinoma of the penis: population-based case-control study in Denmark. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17:2683-2691.

63 Rintala MA, Grenman SE, Puranen MH, et al Natural history of oral papillomavirus infection in spouses: a prospective Finnish HPV family study. J Clin Virol 2006;35:89-94.

65 Scully C. Oral Cancer: the evidence for sexual transmission. Br Dent J 2005;199:203-207.

66 Bodaghi S, Wood LV, Roby G, et al. Could human papillomaviruses be spread through blood? J Clin Microbiol 2005; 43: 5428-5434.

67 Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosa epithelia. APMIS 2010; 118: 422-449.

68 Culp TD, Budgeon LR, Marinkowich P, et al. Human papillomavirus bind a basal extracellular matrix component sected by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. Virology 2006;347: 147-159.

69 Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination, Nat Rev Immunol 2004; 4: 46-55.

70 Mueller M, Gissmann L, Cristiano RJ, et al. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. J Virol 1995;69: 948-954.

71 Roden RB, Kirnbauer R, Jenson AB, et al. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. J Virol 1995;69: 948-954.

72 Bruck LR, ZEE S, Poulos B, et al. Detection of cervical human papillomavirus infection by in situ hybridization in fetuses from women with squamous intraepitelial lesions. J Low Genit Tract Dis 2005; 9: 114-117.

73 Arena S, Marconi M, Ubertosi M, et al.: HPV and pregnacy: diagnostic methods, transmission and evolution. Minerva Ginecol 2002;54: 225-237.

74 Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infection in children. APMIS 2010; 118: 494-509.

75 Poljak, M., Cuzik, J., Kocjan., BJ., et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. Vaccine, 2012; 30(Suppl. 5):100–106.

76 Szarewski A., Ambroisine L., Cadman L., et al. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008; 17: 3033–3042.

77 Flanagan, JJ., Ma, XJ., et al. Highrisk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngealsquamous cell carcinoma. Am J Surg Pathol, 2011;35:1343–1350.

78 Fakhry C, Gillison ML: Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. J Clin Oncol 2006;24:2606-2611.

79 Mork J, Lie AK, Glattre E, et al: Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 2001;344:1125-1131.

80 Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer – surgery, Oral Oncol. 2009 Apr-May; 45(0): 394–401.

81 Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol,2014; 32:3365-3373.

82 Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, et al: Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. Cancer Res, 2013;73:4791-4800,

83Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SM, et al: P21 Cip1/WAF1 expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. Mod Pathol,2009; 22:686-698.

84 Kong CS, Narasimhan B, Cao H, et al: The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2009; 74:553-561.

85 Young RJ, Rischin D, Fisher R, et al: Relation- ship between epidermal growth factor receptor status, p16(INK4A), and outcome in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Bio- markers Prev,2011; 20:1230-1237.

86Argiris A, Li S, Ghebremichael M, et al. Prognostic signficance of human papillomavirus in recurrent or metastatic head and neck squamous cell cancer: An analysis of Eastern Cooperative Group trials. Ann Oncol [epub ahead of print on May 5, 2014]

87 Caňadas, M.P., Bosch, F.X., Junquera, M.L, et al. Concordance of Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Anogenital and Oral Infections in a High-Risk Population. J Clin Microbiol, Mar 2004; 42(3): 1330-1332.

88 Dahlgren, L., Dahlstrand, H.M., Lindquist, D., et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients, Int J Cancer, 2004;112(6):1015-1019.

89 D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med 2007; 356:1944–1956.

90 Smith, E.M., Ritchie, J.M., Summersgill, K.F., et al.:  Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers.  Int J Cancer, 2004; 108:766-772.

91 Koch, A., Hansen, S.V., Nielsen, N.M., et al. HPV detection in children prior to sexual debut. Int J Cancer 1997; 73: 621-624.

92 Sinal, S.H., Woods, C.R. Human papilomavirus infections of the genital and respirátory tracts in young chidern. Sem Pediatr Infect Dis 2005; 16:306-316.

93 Shah, J. Head and neck surgery and oncology. Mosby 2004

94 Schwartz, S.M., Daling, J.R., Doody, D.R., et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. J Natl Cancer Inst, 1998; 90:1626-36.

95 Klussmann, J.P., Weissenborn, S.J., Wieland, U. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. Cancer, 2001;92:2875-84.

96 Wilczynski, S., Lin, B., Xie, Y., Paz B. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. Am J Pathol 1998;152:145-156.

97 Wilczynski, S., Lin, B., Xie, Y., Paz B. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. Am J Pathol 1998;152:145-156.

98 Dahlstrand, H.M., Dalianis, T. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in tonsillar cancer. Adv Cancer Res, 2005;93:59-89.

99 Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R., et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. N Engl J Med, 2010 Jul 1; 363(1):24-35.

100 Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. J Natl Cancer Inst., 2008 Feb 20;100(4):261-269.

101 Gillison, M. L.,Harris, J.,Westra,W. et al. Survival outcomes by tumor human papillomavirus (HPV) status in stage III-IV oropharyngeal cancer (OPC) in RTOG 0129 (Abstract). J Clin Oncol 2009;27(Suppl 15), Abstrakt 6003.

102 Fischer, C.A., Zlobec I., Green E., et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? Int. J. Cancer 2010;126:1256–1262.

103 Rischin D, Young RJ, Fisher R et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. J Clin Oncol 2010; 28(27): 4142–4148.

104 Psyrri A, Cohen E. Oropharyngeal cancer: clinical implications of the HPV connection. Annals of Oncology 2011; 22: 997–999.

105 NCCN Guidelines Version 2.2013. National Comperhensive Cancer Network, Inc. 2013.

106 Kurose K, Terai M, Soedarsono N, et al.: Low prevalence of HPV infection and its natural history in normal oral mucosa among volunteers on Miyako Island, Japan. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 98:91-6.

107Chaturvedi AK, Anderson WF,Lortet-Tieulent J, et al. Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers, J Clin Oncol 2013; 31:4550-4559.

108 Herrero R, Castellsague´ X, Pawlita M, et al: Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. J Natl Cancer Inst 2003; 95:1772-1783.

109Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, et al: Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: Results from two large case-control studies in highincidence regions. Int J Epidemiol 2011;40:489-502.

110 Klozar J, Tachezy R, Rotnáglová E, et al. Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. Wien Med Wochenschr 2010;160/11:305-309.