

Dlaždicobuněčný karcinom penisu – etiologie, imunitní mikroprostředí a nové prognostické markery

Squamous cell carcinoma of penis – etiology, immune microenvironment and prognostic markers

Nicolette Zavillová¹, Jan Hrudka², Roman Zachoval¹

¹Urologická klinika 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

²Ústav patologie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

Došlo: 29. 4. 2024

Přijato: 14. 5. 2024

Kontaktní adresa:

MUDr. Nicolette Zavillová, MBA
Urologická klinika 3. lékařské fakulty Univerzity
Karlovy a Fakultní Thomayerovy nemocnice,
Václavská 800
140 59 Praha 4 – Krč
e-mail: nicolette.zavillova@ftn.cz

Střet zájmů: Autoři prohlašují, že nejsou ve vztahu k článku ve střetu zájmů.

Podpora: Článek byl podpořen Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky, příjemce: FNKV, řešitel: MUDr. Jan Hrudka, Ph.D., číslo grantu NU21J-03-00019.

Hlavní stanovisko: Nádory penisu patří mezi poměrně vzácná onkologická onemocnění se značně variabilní prognózou. Aktuálně je nejdůležitějším ukazatelem prognózy postižení regionálních lymfatických uzlin, které nemusí být při klinickém vyšetření nalezeno. Toto sdělení shrnuje přehled aktuálních a nově zkoumaných prognostických a terapeuticko-

-indikačních markerů dlaždicobuněčného karcinomu penisu na histologické, imunohistochemické a molekulární úrovni.

Major statement: Penile cancer is a relatively rare malignancy with a highly variable prognosis. Currently, the most important prognostic indicator is the involvement of regional lymph nodes, which may not be identified during clinical examination. This review summarizes both established and emerging prognostic and therapeutic markers of penile squamous cell from the histological, immunohistochemical and molecular perspectives.

SOUHRN

Zavillová N, Hrudka J, Zachoval R. Dlaždicobuněčný karcinom penisu – etiologie, imunitní mikroprostředí a nové prognostické markery.

Nádory penisu patří mezi poměrně vzácná onkologická onemocnění se značně variabilní prognózou. Nejdůležitějším ukazatelem nádorově specifického přežití (cancer specific survival, CSS) je postižení regionálních lymfatických uzlin, které nemusí být při klinickém vyšetření či konvenčními zobrazovacími metodami identifikováno. Z toho důvodu jsou v současnosti zkoumány nové

prognostické a terapeuticko-indikační markery dlaždicobuněčného karcinomu penisu (penile squamous cell carcinoma, SCC) na histologické, imunohistochemické a molekulární úrovni. Ačkoliv WHO klasifikuje pSCC na HPV-asociovaný a HPV-independentní, vliv HPV statutu na prognózu je podle řady studií a našich dat sporný. V naší studii byl zjištěn negativní prognostický vliv nádorového grade buddingu na celkové přežití (overall survival, OS) i CSS. Nádorový budding byl u SCC asociován s metastatickým postižením regionálních lymfatických uzlin. Prognostický význam infiltrace imunitními buňkami u pSCC zkoumá jen málo relevantních studií. V naší studii byl řídký/chybějící lymfocytární lem signifikantně asociovaný s kratším OS i CSS. Mutovaný profil p53 koreluje s agresivním fenotypem a nepříznivou prognózou u mnoha typů nádorů včetně pSCC. V naší práci jsme potvrdili jeho negativní prognostický dopad na OS i CSS. Vysoká nádorová mutační nálož (tumor mutational burden, TMB) byla asociovaná s kratším OS, s vysokou expresí programmed death ligandu 1 (PD-L1) a HPV/p16 negativitou. Nález časté PD-L1 positivity u HPV-negativních nádorů s vysokým TMB ilustruje onkogenezi pSCC v souvislosti s chronickým zánětem, vysokým množstvím získaných mutací a produkcí neoantigenů (PD-L1) a činí z nemocných s HPV-independentními SCC kandidáty anti-PD-1/PD-L1 léčby. Popsané znaky, jako je nádorový budding, lymfocytární infiltrát a p53, korelují s přežitím významněji než pT stadium, histopatologický grade nebo morfologický subtyp karcinomu penisu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dlaždicobuněčný karcinom penisu, HPV, prognóza, budding, tumor infiltrující lymfocyty.

SUMMARY

Zavillová N., Hrudka J., Zachoval R. Squamous cell carcinoma of penis – etiology, immune micro-environment and prognostic markers.

Penile cancer is a relatively rare malignancy with a highly variable prognosis. The most important indicator of cancer specific survival (CSS) is the involvement of regional lymph nodes, which may

not be identified during clinical examination or by conventional imaging methods. For that reason, new prognostic and therapeutic markers of penile squamous cell carcinoma (SCC) are currently being investigated at the histological, immunohistochemical and molecular level. Although the WHO classifies penile SCC into HPV-associated and HPV-independent, the prognostic impact of HPV status remains questionable according to several studies and our data. In our study, a negative prognostic effect of tumour grade budding on overall survival (OS) and CSS was found. Tumour budding has been associated with the metastatic involvement of regional lymph nodes in penile SCC. A few relevant studies have investigated the prognostic significance of immune cell infiltration in pSCC. In our study, a non-brisk/absent lymphocyte infiltrate was significantly associated with shorter OS and CSS. Mutated p53 profile correlates with aggressive phenotype and poor prognosis in many tumour types including penile SCC. Our data confirmed its negative prognostic impact on both OS and CSS. High tumour mutational burden (TMB) was associated with shorter OS, with high programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and HPV/p16 negativity. The PD-L1 positivity enrichment in HPV-negative tumours harboring high TMB illustrates pSCC oncogenesis in association with chronic inflammation, high amount of acquired mutations, and neoantigen (PD-L1) production. This discovery suggests that patients with HPV-independent SCC could be suitable candidates for anti-PD-1/PD-L1 treatment. In summary, tumour budding, tumour lymphocytic infiltration and p53 show a stronger correlation with survival outcomes compared to factors such as pT stage, histopathological grade or morphological subtype in penile carcinoma.

KEY WORDS

HPV status, prognosis, squamous cell carcinoma, tumor budding, tumor infiltrating cells.

.....

ÚVOD

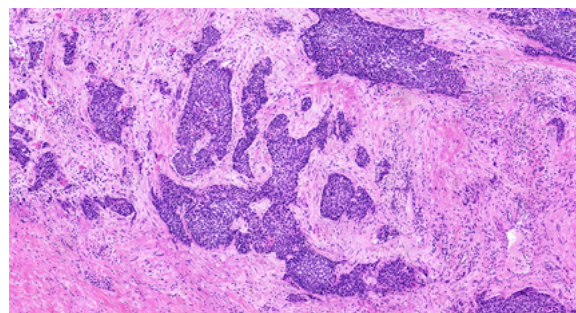
Zhoubné nádory penisu patří ve vyspělých zemích mezi poměrně vzácná nádorová onemocnění s celkovou incidencí 0,94/100 000 mužů v Evropě (1), incidence stoupá s věkem s maximem v šesté dekádě života (2). V naprosté většině případů jde o dlaždicobuněčný karcinom (squamous cell carcinoma, SCC) (3). Karcinom penisu je charakterizován značně variabilní prognózou a je spojen se signifikantní morbiditou (4). Často je diagnostikován v pokročilém stadiu s metastázami (5), u některých pacientů se však vyskytuje pouze lokální onemocnění. V posledních desetiletích nedošlo v západním světě k podstatnému zlepšení morbidity a mortality (6, 7). Některé studie popisují pomalu rostoucí incidenci a mortalitu zejména u mladých mužů, 5leté přežití je cca u 60 % (7). Nárůst výskytu může souviset se sexuálně přenosnou infekcí lidskými papilomaviry (HPV), která je etiologicky spojena s částí SCC penisu. Ve srovnání s jinými nádory jsou pacienti s karcinomem penisu mimo jiného zatíženi psychosexuální tísní, pocitem mutilace a ztrátou mužství. V současné době probíhá poměrně intenzivní výzkum prognostických znaků karcinomu penisu, které by vedle TNM stagingu a histopatologického gradingu umožnily efektivní stratifikaci nemocných a plánování terapie. Současná WHO klasifikace z roku 2022 rozlišuje HPV-asociovaný a HPV-independentní karcinom (8). HPV-asociovaný karcinom zahrnuje bazaloidní (Obr. 1), papilárně bazaloidní, bradavičnatý (warty), bradavičnatě-bazaloidní, světlobuněčný a lymphoepithelioma-like morfologické subtypy. Varianty HPV-independentního karcinomu penisu jsou dlaždicobuněčný karcinom obvyklého typu, pseudohyperplastický, pseudoglandulární, verukózní, carcinoma cuniculatum, papilární, adenoskvamózní, sarkomatoidní a smíšený karcinom (9) (Obr. 2).

HPV-asociovaný karcinom je charakterizován difúzní silnou expresí onkoproteinu p16, který lze detekovat imunohistochemicky, nádor je asociovaný s prekancerózní lézí s morfologií skvamózní intraepiteliální léze vysokého stupně (HSIL)/nediferencované (obvyklé) penilní intraepiteliální neoplazie (uPeIN) s pozitivitou p16. HPV-independentní

karcinom je p16-negativní, jeho prekurzorem je diferencovaná/simplexní penilní intraepiteliální neoplazie (dPeIN), rovněž p16-negativní. Prognostický význam HPV statutu je v karcinomu penisu diskutabilní (viz dále). Tento článek shrnuje aktuální trendy ve výzkumu nových prognostických a terapeuticko-indikačních znaků SCC penisu, které mohou být stanoveny histologickými, imunohistochemickými a molekulárně genetickými metodami.

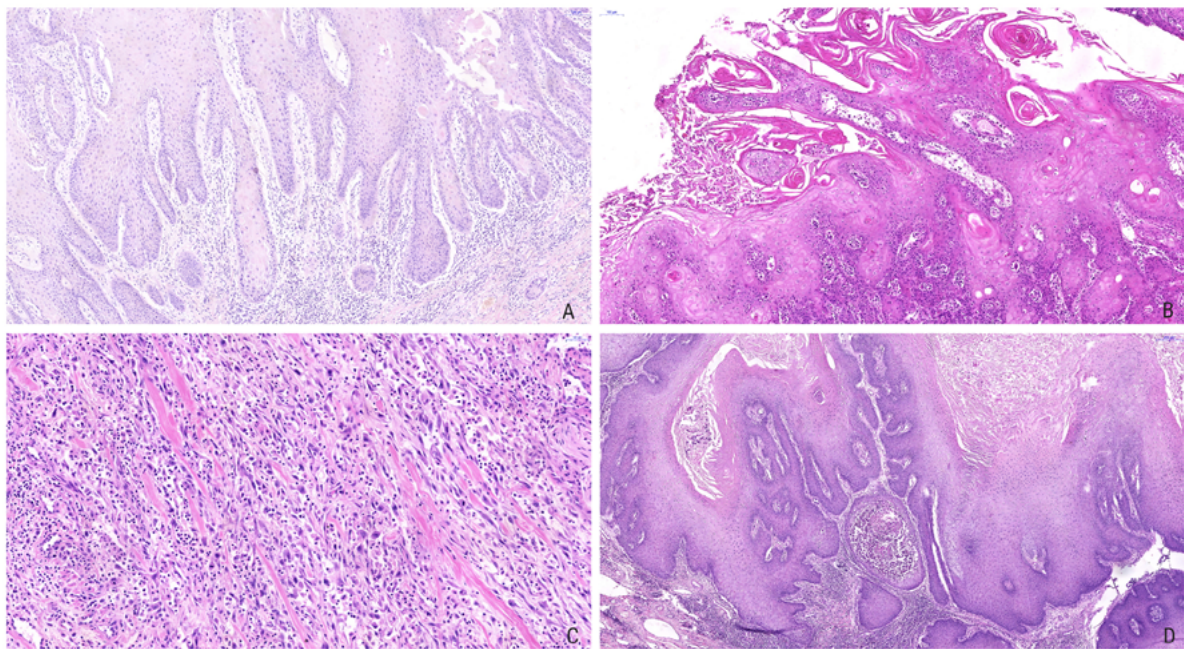
TRADIČNÍ PROGNOSTICKÉ MARKERY DLAŽDICOBUNĚČNÉHO KARCINOMU PENISU

Základním prognostickým faktorem karcinomu penisu zůstává histopatologický grading a staging v rámci TNM klasifikace (10). Zásadním a nejdůležitějším nepříznivým prognostickým znakem je přítomnost regionálních (tříselných) uzlinových metastáz (11, 12), při jejichž nálezů je doporučena adjuvantní chemoterapie po chirurgickém odstranění nádoru (13). Mezi další tradiční nepříznivé prognostické faktory patří lymfovaskulární invaze a vysoký histopatologický grade (4), který je tradičně třístupňový (1–3). SCC grade 1 (včetně verukózního karcinomu) vykazuje dobrou diferenciaci (podobá se epidermis), rohování a vyzrávání nádorového epitelu, jaderné atypie jsou mírné nebo chybí. SCC grade 2 je mezistupněm mezi G1 a G3 karcinomy, je uspořádán v neprá-

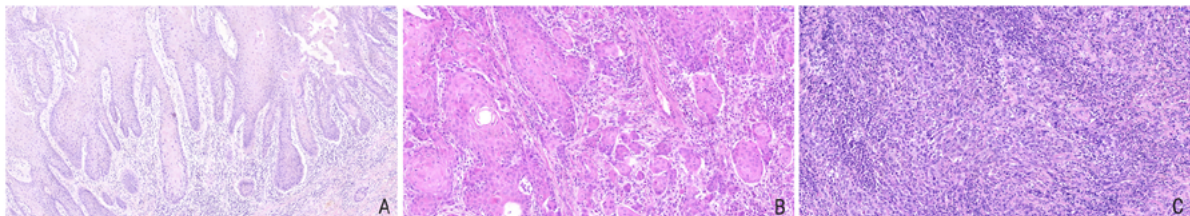


Obr. 1. HPV-asociovaný karcinom penisu – bazaloidní typ, barvení Hematoxilin-Eosin (HE), zvětšeno 10×

Fig. 1. HPV-associated penile carcinoma – basaloid type, Hematoxylin-Eosin staining, magnification 10×



Obr. 2. HPV-independentní karcinom penisu, barvení HE, A – dlaždicobuněčný karcinom, zvětšeno 10×, B – papilární karcinom, zvětšeno 10×, C – sarkomatoidní karcinom, zvětšeno 20×, D – verukózní karcinom, zvětšeno 5,9×
Fig. 2. HPV-independent penile carcinoma, HE staining, A – squamous cell carcinoma, magnified 10×, B – papillary carcinoma, magnified 10×, C – sarcomatoid carcinoma, magnified 20×, D – verrucous carcinoma, magnified 5.9×



Obr. 3. Grading karcinomu penisu, barvení HE, A – karcinom penisu G1, zvětšeno 10×, B – karcinom penisu G2, zvětšeno 20×, C – karcinom penisu G3, zvětšeno 20×
Fig. 3. Penile carcinoma grading, HE staining, A – penile carcinoma G1, magnified 10×, B – penile carcinoma G2, magnified 20×, C – penile carcinoma G3, magnified 20×

videlných čepech s rohověním a částečnou maturací. Grade 3 SCC (včetně basaloidních a sarkomatoidních) má solidní, trámčitou či disociovanou stavbu, rohovění/vyzrávání je ojedinělé nebo chybí a zastihujeme anaplastické buňky s výraznými jadernými atypiami a hojnou mitotickou aktivitou (14) (Obr. 3).

V naší studii, zahrnující 152 pacientů s penilním SCC, však nebyl prokázán signifikantní vliv pT stadia (binarizovaně pT1+2 versus pT3+4) ani morfologického subtypu na celkové přežití (overall survival, OS). Signifikantní vliv na krat-

ší OS měla invaze do lymfatik (hazard ratio / HR = 1,95, $p = 0,0099$) a žilní invaze (HR = 2,96, $p = 0,00047$). Přežití specifické pro nádor (cancer specific survival, CSS) bylo signifikantně kratší u případů s lymfatickou (HR = 4,25, $p < 0,001$), žilní (HR = 2,72, $p = 0,025$) a perineurální invazí (HR = 4,81, $p < 0,001$) a v pokročilém pT3+4 stadiu (HR = 3,02, $p = 0,006$) (15).

Metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin bylo jako zásadní independentní prediktor kratšího celkového přežití popsáno již dříve v univariální (HR = 8,24, $p = 0,047$) i mul-

tivariantní ($HR = 8,4$, $p = 0,045$) Coxově regresi na kohortě 103 pacientů s karcinomem penisu (16). Naše práce pak potvrzuje kratší OS ($HR = 2,45$, $p = 0,048$) i CSS ($HR = 5,1$, $p = 0,008$) při postižení regionálních lymfatických uzlin (15). Předpokládá se, že již při stanovení diagnózy má 25 % pacientů mikrometastázy v lymfatických uzlinách, které při základním klinickém vyšetření unikají (17).

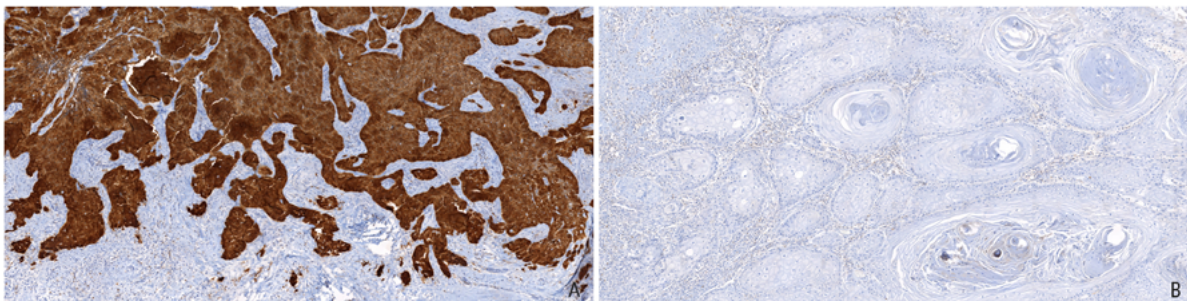
Pokud jde o histomorfologický subtyp, dosud největší sestava 333 pacientů s SCC penisu popisuje horší prognózu nemocných se sarkomatooidním, basaloidním a adenoskvamózním subtypem, naopak lepší u verukózního karcinomu (18). V našem souboru 152 pacientů, v němž byl z morfologických subtypů ve statisticky relevantním množství zastoupen pouze basaloidní+warty+warty-basaloidní ($n = 20$) a verukózní karcinom ($n = 19$), prognostický význam prokázán nebyl (15).

Léčebnou metodou časných stadií karcinomu penisu je co nejšetrnější odstranění nádorové masy při zachování orgánu. Pokud se ale toto onemocnění zachytí v pokročilém stadiu, chirurgická léčba není dostatečná a musí se kombinovat s onkologickou systémovou terapií (27). V současné době probíhá poměrně intenzivní výzkum genetického pozadí karcinomu penisu (20–22), prognostický význam jednotlivých genetických alterací dosud komplexně popsán nebyl.

HPV STATUS

WHO klasifikuje SCC penisu od roku 2022 dle HPV statutu, na HPV-asociovaný a HPV-independentní karcinom. Pro adekvátní klasifikaci je podle WHO vhodná imunohistochemie onkoproteinu p16(INK4a) nebo molekulární průkaz HPV metodou PCR (8) (Obr. 4).

Imunohistochemie na p16 dosahuje 79,6% senzitivity a 81,5% specifity, vztaženo k PCR na HPV v SCC penisu (23). SCC asociované s HPV tvoří v různých studiích asi 30–80 % karcinomů penisu (14, 24). Metaanalýza 52 studií na 4 199 nemocných popisuje HPV pozitivitu v 50,8 % karcinomů penisu (23), nejčastějším sérotypem je HPV16 (63,8 %), následovaný HPV6 (8,1 %) a HPV18 (6,9 %). HPV jsou malé (50 nm) dvouvláknové DNA viry složené z 8kbp genomu, který obsahuje několik časných genů (E1–7) odpovídající regulaci životního cyklu viru a pozdních genů kódujících kapsidové proteiny (25). Po úspěšné vazbě na heparan sulfátové proteoglykanové receptory dochází k internalizaci HPV do genomu epitelových buněk. Virové proteiny E6 a E7 narušují buněčný cyklus inhibicí inhibitorů cyklin dependentních kináz a degradací p53 proteinu. P53 je transkripční faktor startující klidovou fází buněčného cyklu, opravy DNA, aktivaci autofagie a apoptózy u buněk s poškozenou DNA. Fyziologicky je exprese p53 down-regulovaná ubiquitinací mediovanou MDM2 a MDMX (26). Ztráta funkčního p53, ať už na podkladě mutace



Obr. 4. HPV status stanoven imunohistochemicky expresí onkoproteinu p16(INK4a), barvení monoklonální protilátkou proti p16, zvětšeno 10×, A – HPV-asociovaný (p16 pozitivní) karcinom penisu, B – HPV-independentní (p16 negativní) karcinom penisu

Fig. 4. HPV status determined by immunohistochemical expression of oncoprotein p16(INK4a), staining with monoclonal antibody against p16, magnified 10×, A – HPV-associated (p16 positive) penile carcinoma, B – HPV-independent (p16 negative) penile carcinoma

nebo HPV-indukované degradace, vede k maligní transformaci buňky. Virový protein E7 pak inaktivuje Rb1 protein, což vede k overexpresi genu Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A (CDKN2A), jehož produktem je p16 protein, vysoce exprimovaný v HPV-asociovaných dysplaziích a karcinomech (27). CDKN2A je tumor supresorový gen, jeho produkt p16 protein se váže na cyklin dependentní kinázu 4 (CDK4) a inhibuje její interakci s cyclinem D. Tato inhibice brání fosforylaci Rb1 a výsledkem je narušený přechod buněčného cyklu z G1 (dělicí) fáze do S (klidové) fáze – toto vyústí ve zvýšenou proliferaci a vznik nádorové buňky. Stejně jako u SCC hlavy a krku nebo SCC vulvy, HPV-asociovaný SCC souvisí s nediferencovanou skvamózní intraepiteliální lézí (SIL) a expresí onkoproteinu p16. Pozitivní imunohistochemie p16 je spolehlivým a robustním znakem HPV asociovaných SCC (27).

HPV-negativní SCC (asi polovina nádorů) je asociovaný s diferencovanou dysplazií (d-PeIN), chronickým zánětem, špatnou hygienou genitálu a některými environmentálními faktory (chudoba, kouření). Chronický zánětlivý proces pak vede k produkci volných radikálů a oxidačnímu genotoxickému stresu, ke vzniku nádoru pak pravděpodobně vede kumulace mnohočetných sporadických mutací (28).

Ačkoliv je role HPV v karcinogenezi nádorů penisu jednoznačná, prognostický význam samotného HPV statutu je u SCC penisu (na rozdíl od karcinomů hlavy a krku) sporný. Gunia et al. popisují v kohortě 102 pacientů příznivý prognostický vliv p16 (HPV) pozitivita s pětiletým přežitím 73 % versus 57 %, $p = 0,011$ (29). Ferrándiz-Pulido et al. dokumentují na 82 nemocných nesignifikanční trend příznivější prognózy u p16+ karcinomů (30). Steinestel et al. na 58 pacientech rovněž nenašli signifikantní vliv HPV na přežití (31), stejně tak ani Tang et al. na 119 nemocných (32) ani naše studie analyzující expresi p16 imunohistochemicky (15).

NÁDOROVÝ BUDDING

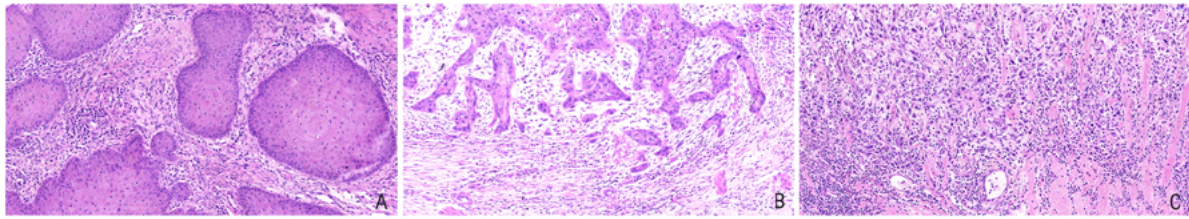
Nádorový budding znamená „odkapávání“ či „pučení“ jednotlivých nádorových buněk nebo malých

skupin (méně než 5 buněk) do okolního stromatu, většinou na invazním čele nádoru. Budding pravděpodobně představuje mechanismus, kterým se nádorové buňky dostávají do lymfatických a krevních cév na začátku metastatického procesu. Budding byl popsán v roce 2002 u kolorektálního karcinomu jako nepříznivý prognostický faktor (33). U kolorektálního karcinomu byl roku 2016 standardizován jako levný a efektivní prognostický marker, který má být obligátní součástí histopatologického nálezu (34). V řadě studií je nádorový budding popsán jako nepříznivý prognostický faktor dalších nádorů, např. jícnu, pankreatu nebo děložního čípku.

U karcinomu penisu je literatura zaměřená na budding zatím chudá. Nádorový budding popsal Derani et al. v asociaci s metastatickým postižením regionálních lymfatických uzlin na souboru 109 pacientů (35). V naší studii byl zkoumán vliv nádorového buddingu na OS a CSS. Byla použita standardní metoda používaná u kolorektálního karcinomu (34), kdy patolog hledá zorné pole 20x s největším počtem nádorových „budů“, tedy jednotlivých buněk nebo shluků obsahujících < 5 buněk (Obr. 5).

Při rozdělení dvoustupňovou (low budding < 5 nádorových buněk versus high budding ≥ 5 nádorových buněk) a třístupňovou (low budding [0–4] vs. moderate budding [5–9] vs. high-grade budding [> 9]) škálou byl zjištěn negativní prognostický vliv na OS u dvoustupňového (střední doba přežití = 5,5 vs. 8,1 roku, HR = 1,94, $p = 0,0067$) i třístupňového (střední doba přežití = 4,0 vs. 8,1 vs. 6,7 roku, $p = 0,011$) systému. High budding v dvoustupňovém systému byl asociovaný s kratším OS i CSS (HR = 2,87, $p = 0,008$) v univariantské i multivariantské analýze. High budding byl významně asociovaný s lymfatickou, žilní i perineurální invazí, pokročilým pT a pN stadiem, vysokým gradem a p53 mutovaným profilem (viz dále) (15) (Obr. 6).

Ačkoliv studií zaměřených na budding u SCC penisu je málo a metaanalýzy chybí, doporučujeme zařazení tumor buddingu do základního histopatologického vyšetření, protože v naší práci koreloval s prognózou více než pT stage a histopatologický grade.



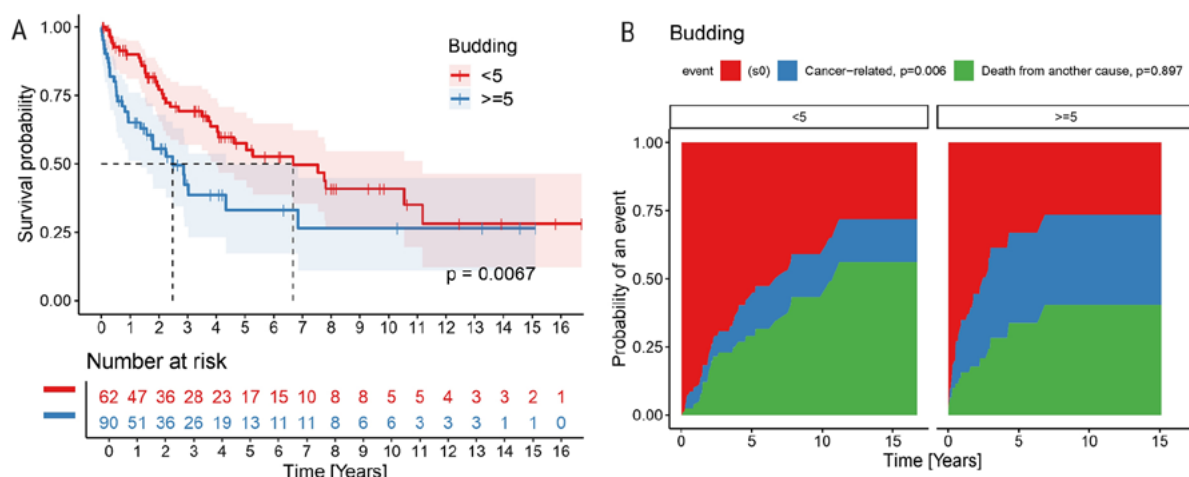
Obr. 5. Nádorový budding u karcinomu penisu, barvení HE, zvětšeno 20×, A – No budding, B – Low/moderate budding, C – High budding

Fig. 5. Tumor budding in penile carcinoma, HE staining, magnified 20×, A – No budding, B – Low/moderate budding, C – High budding

INFILTRACE IMUNITNÍMI BUŇKAMI

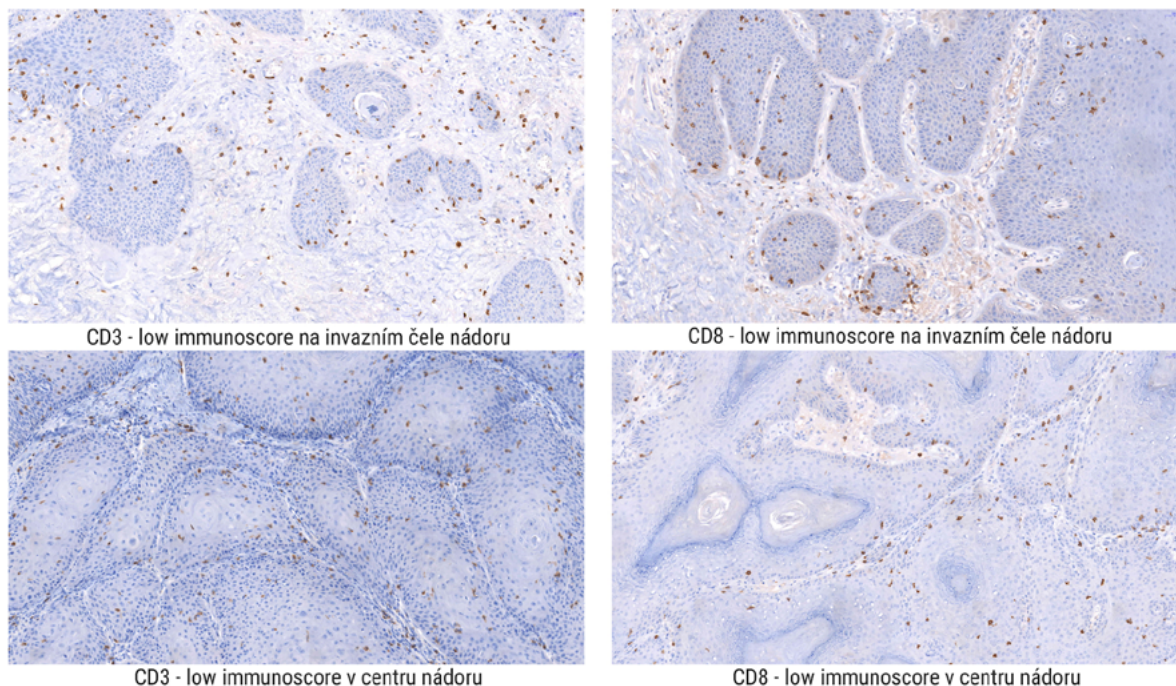
Obecně vzato, prognostický význam nádorového stagingu a gradingu stojí na předpokladu, že nádorová progresse záleží výlučně na nádorových buňkách. Již Rudolf Virchow, jeden ze zakladatelů moderní patologie, popsal v roce 1863 v nádorových tkáních „lymforetikulární infiltrát“, a stal se tak otcem myšlenky interakce mezi zánětlivým a nádorovým procesem (36). Nádory kromě morfologicky svérázných nádorových buněk samotných obsahují také imunitní buňky ve variabilním množství, od ojedinělých leukocytů po hustou zánětlivou

celulizaci. Solidní tumory jsou běžně infiltrovány různými typy imunitních buněk: B- i T-lymfocyty, NK buňkami, dendritickými buňkami, makrofágy, neutrofilů, eosinofilů či mastocytů. Ačkoliv chronický zánět s přítomností lymfocytů může být rizikovým faktorem či spouštěčem maligního nádoru, vysoké množství lymfocytů v nádorové tkáni bylo identifikováno jako znak příznivé prognózy, např. u karcinomu plic, prsu, ovaria, hlavy a krku, jícnu, močového měchýře či kolorekta, u maligního melanomu či různých lymfomů (37). Lymfocytární celulizaci v nádoru lze chápat spíše jako reakci na antigenní modulaci nádorových buněk, např. při produkci nových antigenů, či úchylnou strukturu



Obr. 6. Vliv nádorového buddingu na OS a CSS, A – Kaplan-Meierova křivka ukazující negativní prognostický význam high grade buddingu na dvoustupňové škále na celkové přežití, B – Aalen-Johansenova křivka ukazující dopad high grade buddingu na nádorově specifické přežití (15), proporci úmrtí asociovaných s karcinomem penisu vyjadřuje modrá plocha

Fig. 6. Impact of tumor budding on OS and CSS, A – Kaplan-Meier curve showing the negative prognostic significance of high grade budding on a two-tiered scale on overall survival, B – Aalen-Johansen curve showing the impact of high grade budding on cancer specific survival (15), the proportion of deaths associated with penile cancer is represented by the blue area



Obr. 7. Low immunoscore, barveno imunohistochemicky protilátkou proti CD3 a CD8, zvětšeno 20×

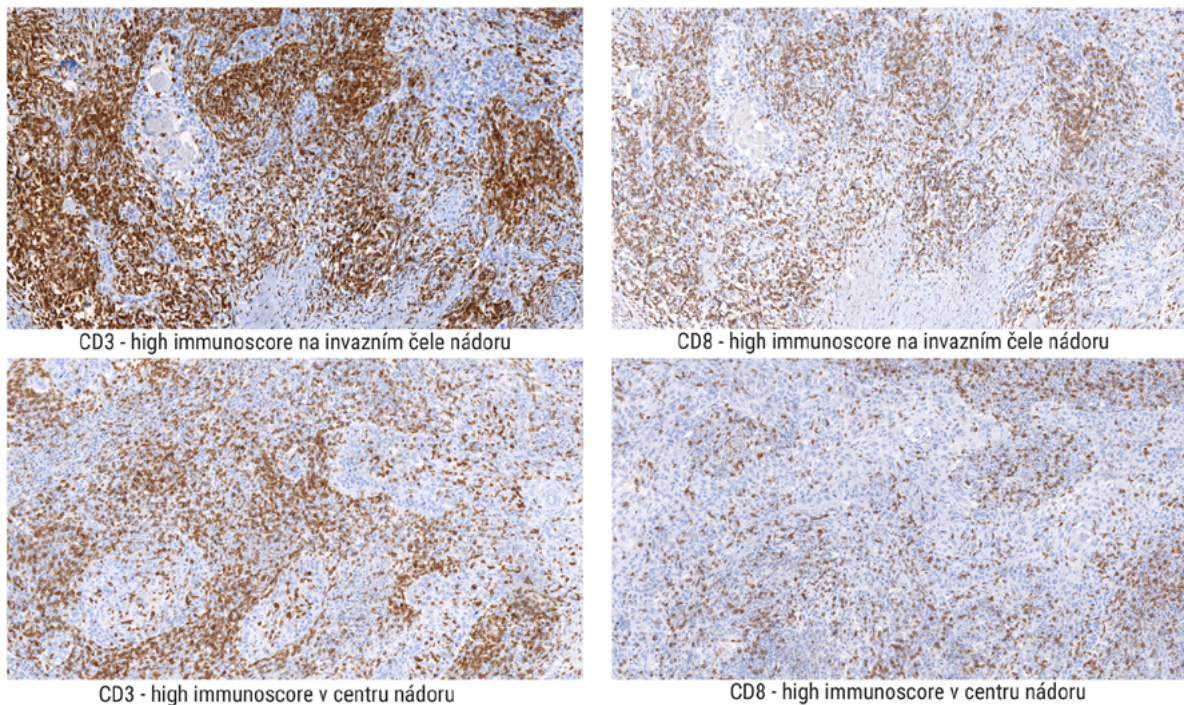
Fig. 7. Low immunoscore, stained immunohistochemically with antibody against CD3 and CD8, magnified 20×

major histocompatibility komplexu danou velkým množstvím somatických DNA mutací, než jako výraz aktivní kontroly nádorové progresy imunitním systémem hostitele (37). Příznivý prognostický vliv je pak u nádorů připisován CD8+ cytotoxickým T-buňkám, Th1 helpers produkujícím interferon- γ , M1 makrofágům, DC1 dendritickým buňkám a NK buňkám. Imunosupresivní efekt mají naopak Th2 helpery, M2 makrofágy, DC2 dendritické buňky a regulační FOXP3+ T-buňky produkující IL-10 a TGF β (38). Role B-lymfocytární imunity je oproti T-buněčné méně jasná. V posledních letech získává význam rovněž imunoterapie onkologických onemocnění, jejíž efekt je dán modulací protinádorové imunitní odpovědi hostitele. Charakter imunitního mikroprostředí hraje důležitou roli v určení chování nádoru, možné terapie a prognózy.

Studie zkoumající prognostický vliv tumor infiltrujících lymfocytů (zejména T-buněk) v solidních nádorech se vyznačují značnou variabilitou metod kvantifikace lymfocytů a jejich subpopulací, odlišnými skórovacími systémy s použitím semikvantitativních subjektivních schémat a také se značnou subjektivitou výběru zorného pole v mikroskopickém preparátu, kde jsou lymfocyty počítány. S cílem překonat tuto variabilitu byla na kolorek-

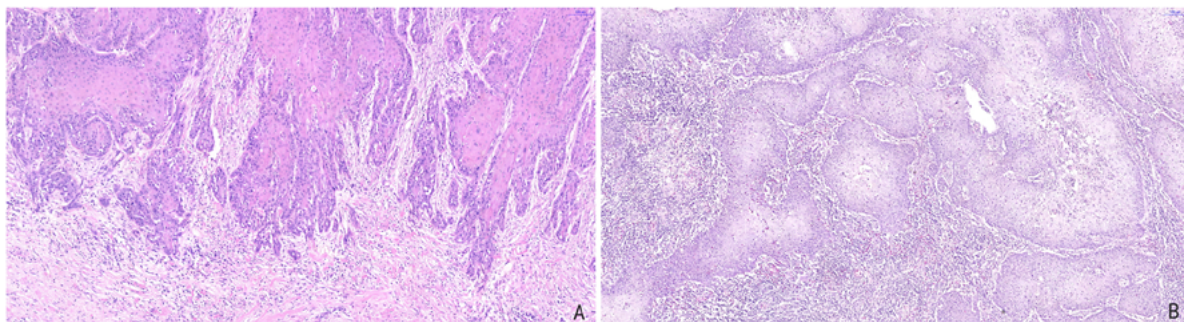
tálním karcinomu vyvinuta metoda Immunoscore, kdy jsou objektivně spočítány lymfocyty pomocí metod digitální patologie ve scanu imunohistochemického preparátu. Immunoscore pracuje vždy se dvěma lymfocytárními markery (např. CD3, CD8, CD45RO, ...), v preparátu jsou pak počítány buňky s jasnou membránovou pozitivitou na 1 mm² zvlášť v centru nádoru a zvlášť na invazním čele (Obr. 7, 8). Studovaná kohorta je pak rozdělena podle mediánu počtu lymfocytů/mm² na low/high v obou markerech a v obou oblastech nádoru (centrum/invazní čelo). Podle toho, jestli je konkrétní případ high ve všech čtyřech, ve třech, dvou, v jednom nebo v žádném, je zařazen do Immunoscore skupiny I0–I4 (39). Většina studií zaměřených na nádorové imunitní mikroprostředí, včetně naší, se zaměřuje na tumor infiltrující T-lymfocyty.

Jen málo relevantních studií se zaměřuje na prognostický význam imunitních buněk v SCC penisu. Mezi komponenty imunitního mikroprostředí, které mají vliv na prognózu SCC penisu, patří přítomnost tumor infiltrujících makrofágů a cytotoxických a regulačních T-lymfocytů (TILs) (40). V naší práci jsme se zaměřili na prognostický význam tumor infiltrujících lymfocytů u SCC penisu. Subjektivně byla hodnocena denzita



Obr. 8. High Immunoscore, barveno imunohistochemicky protilátkou proti CD3 a CD8, zvětšeno 20×

Fig. 8. High Immunoscore, immunohistochemically stained with antibody against CD3 and CD8, magnified 20×



Obr. 9. Lymfocytární lem, barvení HE, zvětšeno 20×, A – non-brisk, B – brisk

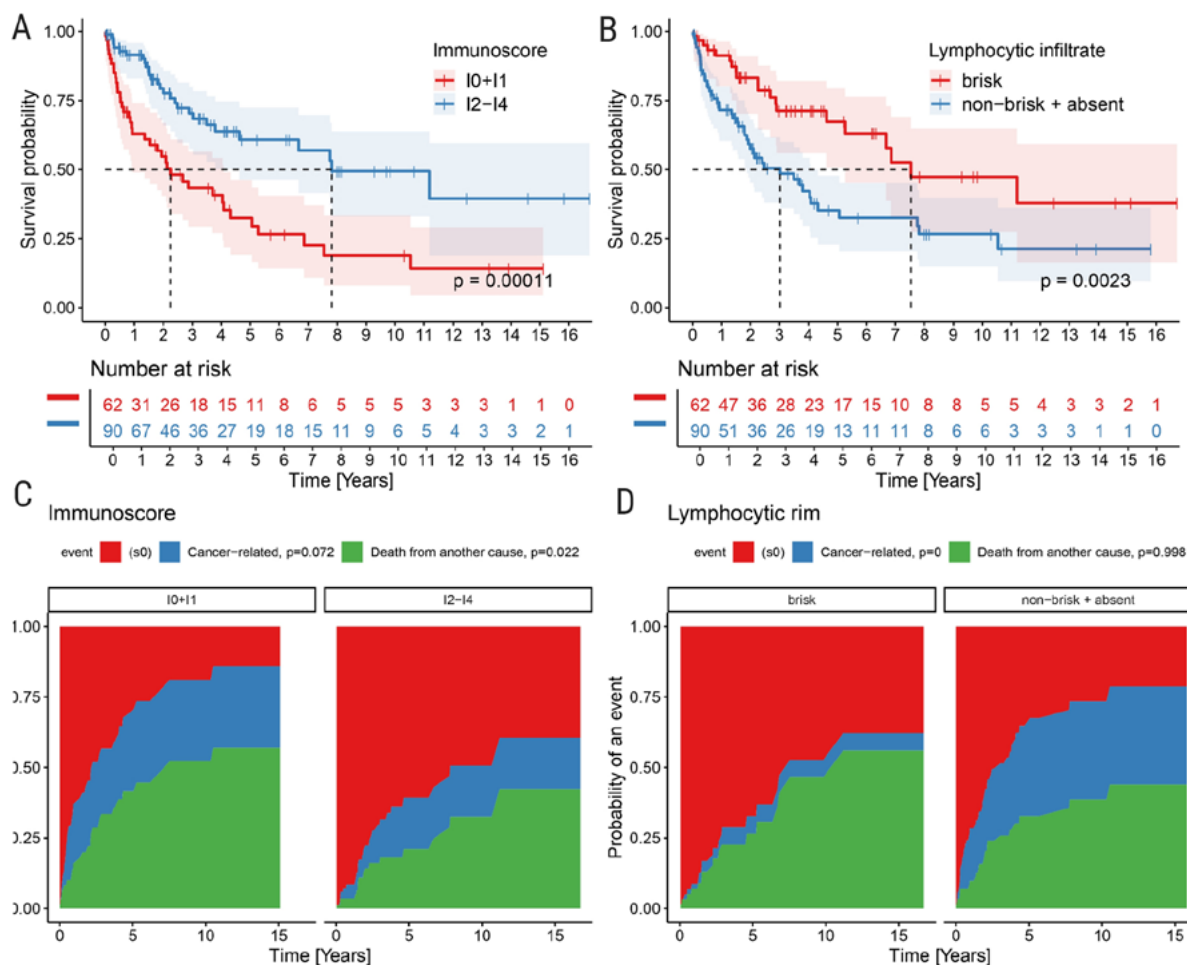
Fig. 9. Lymphocytic infiltrate, HE staining, magnified 20×, A – non-brisk, B – brisk

lymfocytárního lemu v hematoxylin-eosinem barvených řezech dvěma patologi s užitím Clarkova schématu u maligního melanomu (41), kdy patolog hodnotí lymfocytární lem jako denzní (brisk), řídký (non-brisk) nebo nepřítomný (absent) (Obr. 9).

Non-brisk/absent lymfocytární lem byl signifikantně asociovaný s kratším OS (střední doba přežití = 5,6 versus 9,4 roku, HR = 2,22, $p = 0,0023$) i CSS (HR = 6,37, $p = 0,002$) v univariantsní i multivariantsní analýze. Nízké immunoscore T-lymfocytů zobrazených imunohistochemicky (CD3, CD8) mělo při binarizaci (I0 + 11 vs. I2 - 4) signifikantní vliv na kratší

OS (střední doba přežití = 4,5 vs. 9,4 roku, HR = 2,5, $p = 0,00011$), nikoliv na CSS, pro což nemáme uspokojivé vysvětlení (Obr. 10). Řídký či nepřítomný lymfocytární infiltrát byl významně asociovaný s úmrtím do 5 let, lymfatickou invazí, pokročilým T-stadiem ($pT3 + 4$) a vysokým gradem (15).

Dále jsme se zabývali prognostickým významem tumor infiltrujících T-lymfocytů, které exprimují common T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4). CTLA-4 je exprimován aktivovanými efektorovými CD8+ T-buňkami, jeho hlavní fyziologickou rolí je patrně modulace CD4+ T-buněk a posílení imunosupresivní aktivity regulačních



Obr. 10. Vliv Immunoscore a lymfocytárního lemu na OS a CSS, A – Kaplan-Meierova křivka ukazující negativní prognostický význam low immunoscore na celkové přežití, B – Kaplan-Meierova křivka ukazující negativní prognostický význam non-brisk/absent lymfocytárního lemu na celkové přežití, C – Aalen-Johansenova křivka ukazující dopad low immunoscore na nádorově specifické přežití, D – Aalen-Johansenova křivka ukazující dopad non-brisk/absent lymfocytárního lemu na nádorově specifické přežití (15), proporci úmrtí asociovaných s karcinomem penisu vyjadřuje modrá plocha

Fig. 10. Impact of Immunoscore and lymphocytic infiltrate on OS and CSS, A – Kaplan-Meier curve showing the negative prognostic significance of low immunoscore on overall survival, B – Kaplan-Meier curve showing the negative prognostic significance of non-brisk/absent lymphocytic infiltrate on overall survival, C – Aalen-Johansen curve showing the impact of low immunoscore on cancer specific survival, D – Aalen-Johansen curve showing the impact of non-brisk/absent lymphocytic rim on cancer specific survival (15), the proportion of deaths associated with penile cancer is expressed by the blue area

T-buněk – cílená terapeutická blokáda CTLA-4 receptoru tak může potencovat protinádorovou imunitu. Anti-CTLA-4 protilátka ipilimumab (Yervoy) byla první imunoterapeutickou substancí schválenou Food and Drug Administration (FDA), a to v roce 2010, pro léčbu maligního melanomu. Od té doby byl ipilimumab schválen pro léčbu renálního, kolorektálního, hepatocelulárního a nemalobuněčného plicního karcinomu a maligního

mezoteliomu pleury (42) v kombinaci s anti-PD-L1 léčbou (viz dále). V našem souboru 143 pacientů s penilním SCC bylo nízké množství CTLA-4+ buněk na invazivním čele nádoru signifikantním markerem kratšího OS (střední doba přežití = 5,7 vs. 10 let, HR = 2,56, p = 0,0033) v univariantní i multivariantní analýze. U CTLA-4+ buněk v centru nádoru byl obdobný nesignifikantní trend (5,4 vs. 7,7 roku, HR = 1,47, p = 0,16). Nízký počet

CTLA-4 buněk na invazivním čele nádoru byl signifikantním negativním markerem u CSS (HR = 3,33, $p = 0,046$) (43) (Obr. 11).

Příznivý prognostický vliv velkého tumor infiltrujících lymfocytů lze chápat jako výraz aktivní protinádorové imunity. Lymfocytární infiltrát hodnocený patologem v hematoxylin-eosinových řezech jako hustý/řídký pak podobně jako nádorový budding koreloval s prognózou lépe než pT stadium, histologický podtyp a grade. Podle našeho názoru je na místě zahrnout toto prosté a časově nenáročné hodnocení do standardních histologických popisů karcinomu penisu, podobně jako u maligního melanomu. Příznivý prognostický vliv vysokého immunoscore či vysokého množství CTLA4+ buněk lze chápat jako doprovodný jev či epifenomén denzního lymfocytárního lemu, přičemž imunohistochemické kvantifikující metody jsou finančně a časově příliš náročné pro rutinní použití v praxi. Mezi další možné směry výzkumu imunitního mikroprostředí v karcinomu penisu patří význam B-lymfocytární imunity a terciárních lymfoidních struktur. Novým cílem výzkumu v imunitní patologii je produkt lymfocytárního aktivačního genu 3 (protein LAG-3 / CD223) a jeho ligandu fibrinogen-like protein 1 (FGL1) na povrchu nádorových buněk, které jsou vedle osy PD-1/PD-L1 (viz dále) a CTLA-4 dalšími slibnými terčemi léčby immune checkpoint inhibitory (44).

p53

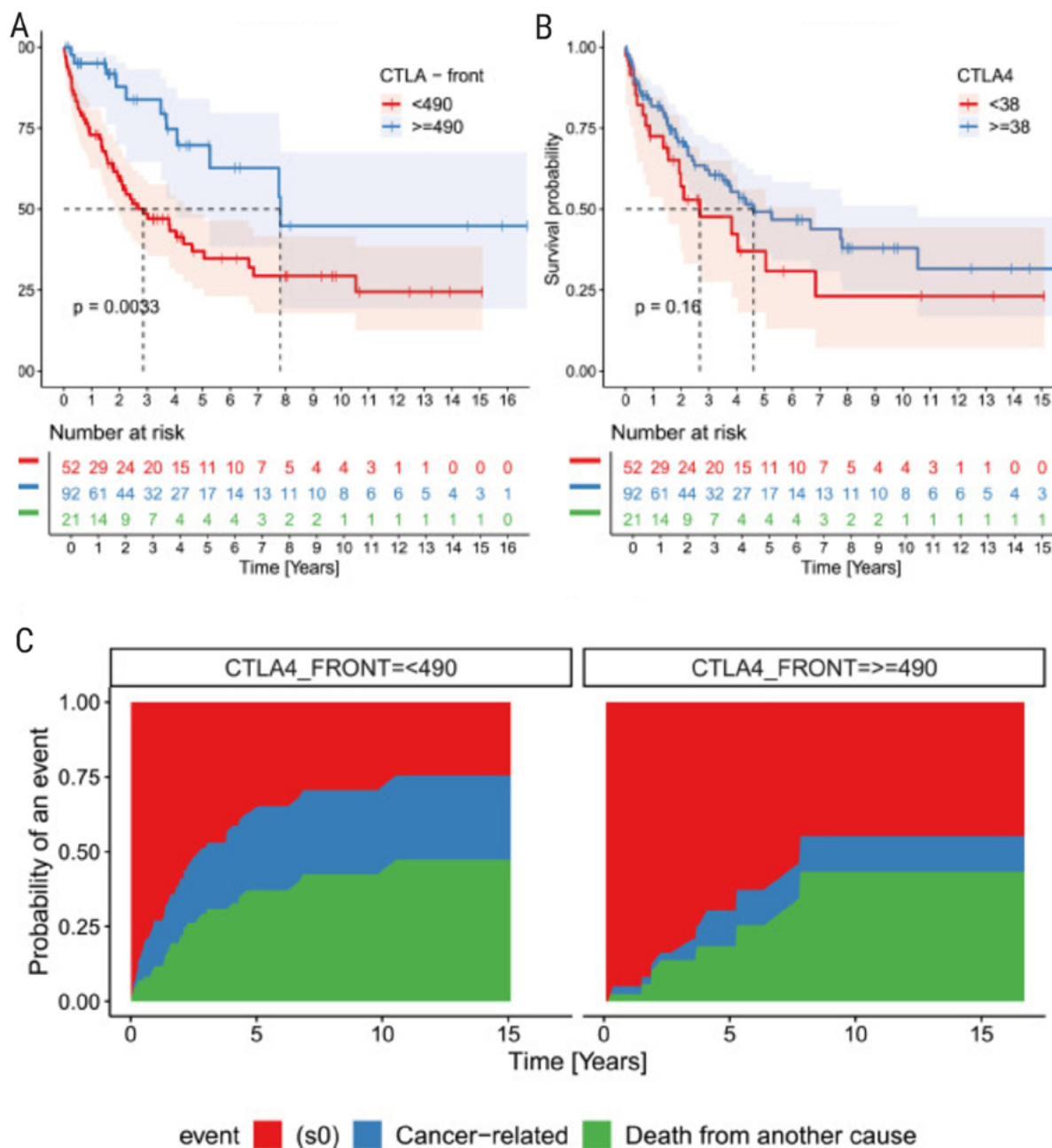
Protein p53, zkoumaný již přes 40 let, je známý jako „strážce genomu“ pro jeho klíčovou roli při zachování integrity jaderné DNA. Tento tumor supresor je kódovaný *TP53* genem, u člověka na 17. chromozomu. V normální buňce aktivují nejednodušší genotoxické stresory stabilizaci p53 proteinu prostřednictvím fosforylace a acetylace, což vede k zastavení buněčného cyklu, indukuje opravu poškozené DNA a v případě nemožnosti DNA opravy startuje programovanou buněčnou smrt. Tyto mechanismy pravděpodobně vedou k zástavě nádorové transformace a nádorového růstu v jeho časném stadiu u naprosté většiny latentně

vznikajících maligních buněk. Pokud je aktivita p53 eliminována při deleci či mutaci *TP53* genu, ztrácí buňka schopnost kontroly průběhu buněčného cyklu a dělení i regulace buněčné smrti, což vede k přežívání „nesmrtelných“ transformovaných buněk a následně ke vzniku nádoru. Recentně byla popsána transkripce genů spojených s epiteliálně-mezenchymální transicí u *TP53* mutovaných karcinomů penisu (45).

Germinální mutace *TP53* v jedné alele byla popsána v roce 1969 jako Li Fraumeniho syndrom (46), charakterizovaný celoživotním rizikem vzniku maligního nádoru manifestovaným vysokým výskytem nejednodušších malignit v dětském i dospělém věku. Somatická mutace *TP53* je přítomná zhruba u poloviny lidských malignit včetně těch epidemiologicky nejvýznamnějších. Většina nádorů (asi 90 %) vykazuje missense mutaci, která vede ke ztrátě funkce p53, k prodloužení jeho poločasu a akumulaci nefunkčního p53 proteinu v nádorových buňkách. Hudbou budoucnosti jsou léčebné strategie obnovující fyziologické funkce mutovaného p53, co může vést k zástavě buněčného cyklu s navozením syntetické letality pro buňky s mutovaným p53 (47). Zbývajících 10 % *TP53*-mutovaných nádorů pak vykazuje nonsense mutaci, kdy p53 v buněčném jádře zcela chybí (tzv. nulový fenotyp).

Profil exprese p53 lze detekovat imunohistochemicky komerčně dostupnými protilátkami. Fyziologické tkáně a *TP53* wild-type nádory obvykle vykazují nerovnoměrnou pozitivitu imunohistochemické reakce/heterogenní barvení buněčných jader, tzv. wild-type pattern. V buňkách s missense mutací *TP53* dochází k intranukleární akumulaci dysfunkčního p53 proteinu, výsledkem je difúzní silná rovnoměrná imunohistochemická reakce jader nádorových buněk, tzv. aberantní či mutovaný imunoprofil. V případě nonsense mutace (delece) *TP53* je výsledkem tzv. nulový fenotyp, kdy jsou jádra nádorových buněk zcela negativní.

Mutovaný profil p53 stanovený jak genomickými, tak imunohistochemickými metodami souvisí s nádorovou progresí nádoru v důsledku nefunkční apoptózy. Mutovaný profil p53 koreluje s agresivním fenotypem a nepříznivou prognózou u mnoha typů nádorů včetně SCC penisu (48–53). Byla také



Obr. 11. Vliv tumor infiltrujících T-lymfocytů CTLA4 na OS a CSS, A – Kaplan-Meierova křivka ukazující významně nižší celkové přežití u nízkého počtu CTLA4+ T-lymfocytů na invazním čele nádoru při optimálním cut-pointu 490 buněk/mm², B – Kaplan-Meierova křivka ukazující významně nižší celkové přežití u nízkého počtu CTLA4+ T-lymfocytů v centru nádoru při optimálním cut-pointu 38 buněk/mm², C – Aalen-Johansenova křivka ukazující významně kratší nádorově specifické přežití při nízkém počtu CTLA4+ T-lymfocytů na invazním čele nádoru (43), proporcí úmrtí asociovaných s karcinomem penisu vyjadřuje modrá plocha

Fig. 11. Impact of tumor-infiltrating CTLA4 T-lymphocytes on OS and CSS, A – Kaplan-Meier curve showing significantly lower overall survival with low number of CTLA4+ T-lymphocytes at the invasive front of the tumor at an optimal cut-point of 490/mm², B – Kaplan-Meier curve showing lower overall survival with low CTLA4+ T-lymphocyte counts in the center of the tumor at an optimal cut-point 38/mm², C – Aalen-Johansen curve showing significantly shorter cancer specific survival with low CTLA4+ T-lymphocyte counts at the invasive front (43), proportion of deaths associated with penile carcinoma is expressed by a blue area

popsaná pozitivní asociace mezi expresí p53, postižením lymfatických uzlin a CSS (54). V naší práci na 152 pacientech s penilním SCC jsme porovnávali nádory s intaktní (wild-type) expresí p53 oproti nádorům s mutovaným p53 imunoprofilem. Exprese p53 byla hodnocena jako „mutovaná“, když nádorová tkáň vykazovala difúzní silnou jadernou pozitivitu nebo úplnou negativitu (nulový fenotyp) s heterogenní (wild-type) expresí ve stromálních buňkách; případy s heterogenním jaderným barvením nádorových buněk byly označeny jako „wild-type“ (Obr. 12).

Mutovaný profil p53 (tedy s pravděpodobnými missense i nonsense mutacemi dohromady) měl negativní prognostický dopad na OS (střední doba přežití = 5 vs. 7,7 roku, HR = 2,44, $p = 0,0023$) i CSS (HR = 3,33, $p = 0,004$) v univariantské i multivariantské analýze. Mutovaný p53 profil byl významně asociovaný s high grade buddingem (viz výše) a také s p16 (HPV)-negativitou (15) (Obr. 13).

Ačkoliv p16/HPV status má pouze sporný prognostický význam, jeho negativní korelace s p53 mutovaným profilem poskytuje vhled do etiologie karcinomu penisu. Jak bylo řečeno, virový protein E6 inhibuje aktivitu p53 proteinu, obvykle při intaktním *TP53* genu. Naopak, HPV independentní nádory vznikají patrně na podkladě kumulace získaných mutací při chronickém zánětu a působení rizikových faktorů (kouření, nedostatečná hygiena, nízký socioekonomický status, lichen sclerosus, fimóza). Ke vzniku nádoru pak nápadně často vede mutace právě *TP53* (15, 43). V onkogenezi obou HPV+ i HPV- typů se tedy uplatňuje ztráta funkčního p53, která je však způsobena různým mechanismem: u prvního v důsledku virem mediované inhibice, u druhého na podkladě mutace DNA. Naše práce potvrzuje nepříznivý vliv p53 na prognózu SCC penisu ve velké kohortě.

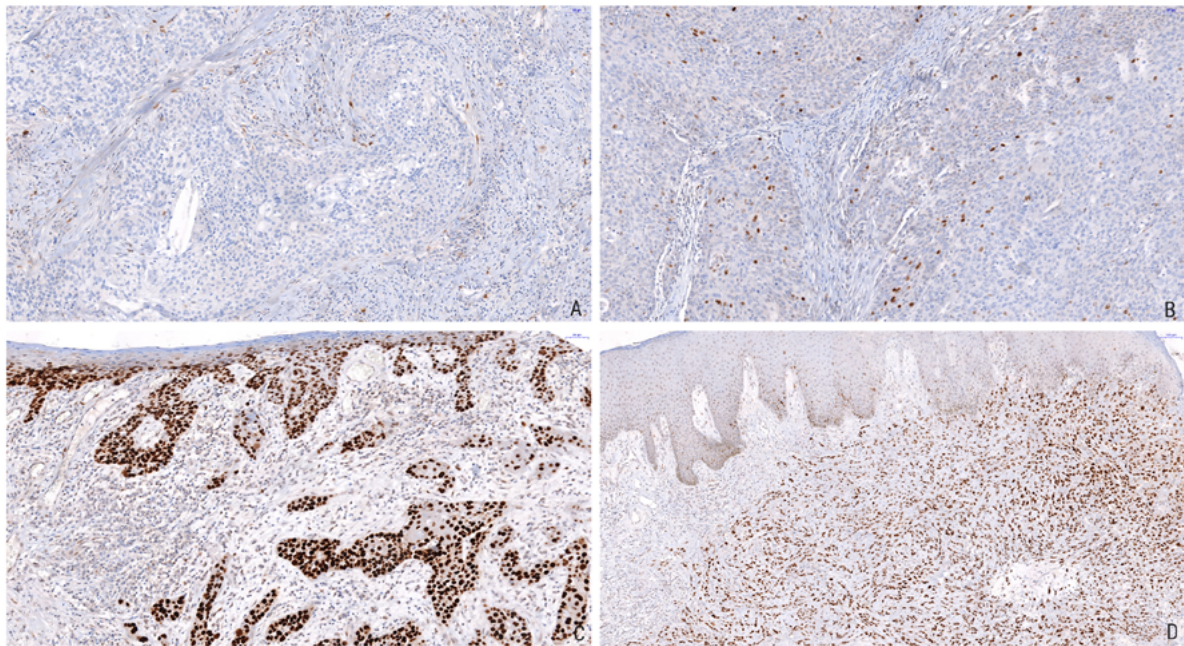
NÁDOROVÁ MUTAČNÍ NÁLOŽ (TMB)

Nádorová mutační nálož (tumor mutational burden, TMB) vyjadřuje kumulativní množství

získaných sporadických somatických mutací v genomu nádorových buněk. TMB lze vyšetřit metodami sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS) na úrovni sekvenování celého exomu, v praxi se používá sekvenování referenčních reprezentativních sekvencí velkého množství genů. Hodnota TMB je vyjadřována v množství mutací na megabázi (Mb = milion nukleotidů v řetězci DNA). V roce 2020 schválila FDA pembrolizumab v léčbě nemocných s neresekabilními nebo metastatickými solidními tumory s TMB ≥ 10 mut/Mb na podkladě doloženého klinického benefitu těchto pacientů (55). Dosavadní nečetné práce zaměřené na TMB v karcinomu penisu popisují obecně nízké TMB v SCC penisu v porovnání s karcinomy vyvolanými velkou dávkou mutagenů z prostředí – např. karcinom plicní (kouření) nebo SCC kůže (UV záření) (56).

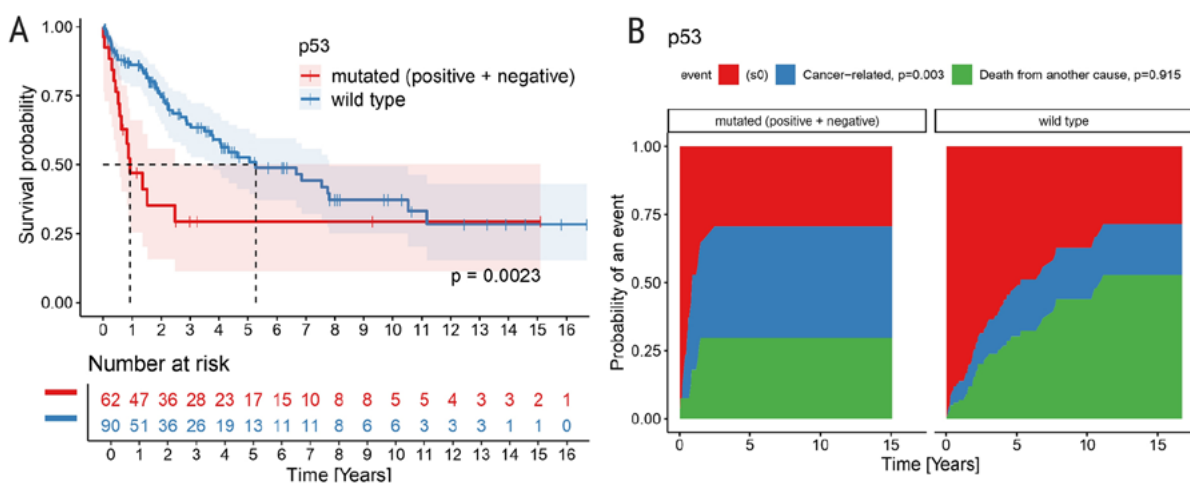
Naše práce analyzovala TMB v zatím největší sestavě 136 pacientů s penilním SCC s dostatečnou kvalitou DNA. Vysoká TMB byla prokázána jako významný znak kratšího OS, pokud byla binarizovaná na mediánu hodnoty TMB ve zkoumané kohortě (= 4,3 mut/Mb): low TMB ($n = 56$) vs. high TMB ($n = 80$), se střední dobou přežití 9 vs. 5,8 roku, HR = 1,72, $p = 0,047$ (43). Při binarizaci kohorty na arbitrární hodnotě 10 mut/Mb (schválené FDA pro léčbu) pak prognostický význam prokázán nebyl, a to patrně pro malé množství pacientů s nádory s TMB ≥ 10 mut/Mb ($n = 17$) při obecně nízké mutační náloži karcinomů penisu (56) (Obr. 14).

Vysoké TMB ≥ 10 mut/Mb bylo asociováno s vysokou expresí PD-L1 (ve ≥ 50 % nádorových buněk) a HPV/p16 negativním statutem (43). Tato korelace ilustruje onkogenezi karcinomu penisu: HPV-independentní karcinomy vznikají na podkladě relativně velkého množství získaných mutací při chronickém zánětu, vysoká variabilita DNA pak vede ke zvýšené produkci neoantigenů, např. PD-L1. Naopak, HPV-asociované karcinomy vznikají na podkladě narušení funkce několika málo klíčových genů virovými proteiny, a mají tak nízkou mutační nálož a produkují méně neoantigenů. Toto zjištění pak hypoteticky implikuje benefit léčby pembrolizumabem či jinými



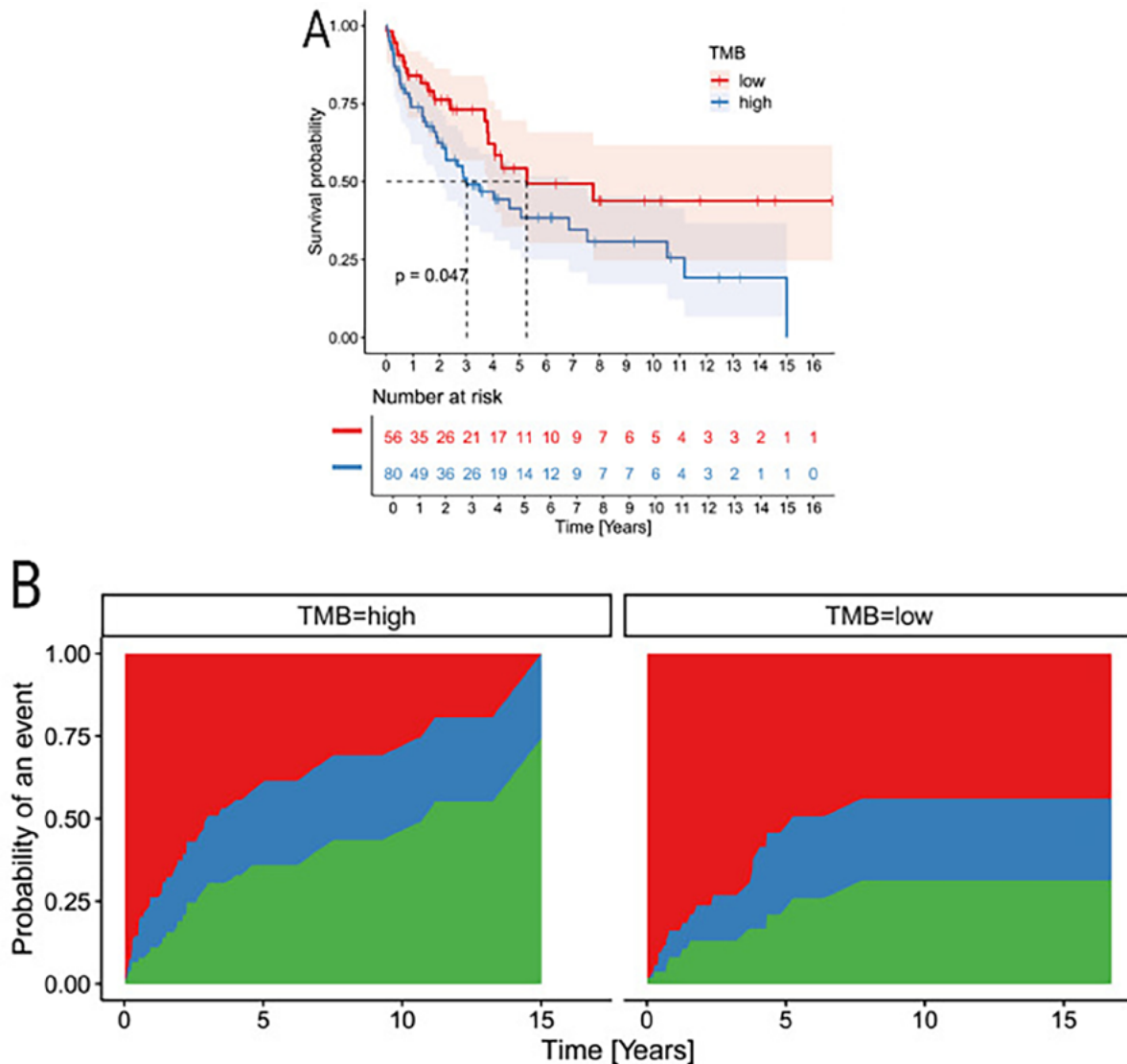
Obr. 12. Karcinom penisu, barveno imunohistochemicky protilátkou proti p53, A – nulový fenotyp, zvětšeno 20×, B – wild type exprese, zvětšeno 20×, C – difuzní silná pozitivita p53 v jádrech buněk invazivního karcinomu a v prekanceróze v povrchovém epitelu, zvětšeno 20×, D – difuzní silná jaderná pozitivita p53 v nádorových buňkách s wild-type expresí v přilehlém nenádorovém epitelu, zvětšeno 10×

Fig. 12. Penile carcinoma, stained immunohistochemically with an antibody against p53, A – null phenotype, magnified 20×, B – wild type expression, magnified 20×, C – diffuse strong p53 positivity in the nuclei of invasive carcinoma cells and in precancer in the surface epithelium, magnified 20×, D – diffuse strong p53 nuclear positivity in tumor cells with wild-type expression in adjacent non-neoplastic epithelium, magnified 10×



Obr. 13. Vliv p53 na OS a CSS, A – Kaplan-Meierova křivka ukazující negativní prognostický význam mutovaného profilu p53 na celkové přežití, B – Aalen-Johansenova křivka ukazující dopad profilu p53 na nádorově specifické přežití (15)

Fig. 13. Impact of p53 on OS and CSS, A – Kaplan-Meier curve showing the negative prognostic significance of the mutated p53 profile on overall survival, B – Aalen-Johansen curve showing the impact of the p53 profile on cancer specific survival (15)



Obr. 14. Vliv nádorové mutační nálože na OS a CSS, A – Kaplan-Meierova křivka ukazující signifikantně kratší celkové přežití u vysoké nádorové mutační nálože, B – Aalen-Johansenova křivka neukazující žádný významný dopad TMB na nádorově specifické přežití (43)

Fig. 14. Impact of tumor mutational load on OS and CSS, A – Kaplan-Meier curve showing significantly shorter overall survival with high tumor mutational burden, B – Aalen-Johansen curve showing no significant impact of TMB on cancer specific survival (43)

immune checkpoint inhibitory, zejména u pacientů s HPV-independentními karcinomy.

PD-L1

Jak bylo řečeno, nádorová progresse nezávisí pouze na samotných nádorových buňkách, ale také na imunitní reakci hostitele. Např. použití bacillus Calmette-Guerin (BCG) vakcíny, úspěšně používané k léčbě uroteliálního karcinomu

močového měchýře, dokumentuje roli zánětu ve zpomalení či zastavení nádorové progresse (57). V mikroevoLuci populace nádorových buněk v prostředí organismu hostitele dochází k přežívání a selekci klonů a subklonů buněk vybavených povrchovými molekulami, které mají deaktivaci účinek zejména na cytotoxické T-lymfocyty. V roce 1992 byla popsána molekula PD-1 (Programmed death 1) jako transkripční faktor s proapoptotickým účinkem na cílovou (nádorovou) buňku (58). PD-1 je exprimován na

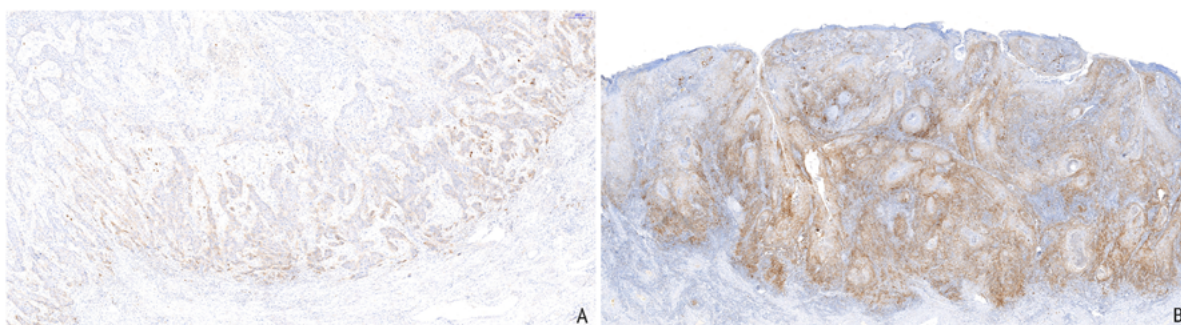
povrchu T-buněk, B-buněk, monocytů a dendritických buněk. Počátkem jednadvacátého století byla popsána klíčová role PD-L1 (Programmed death-ligand 1, homolog B7, CD274) v inhibici cytotoxické reakce nádorovou buňkou. PD-L1 je transmembránový glykoprotein exprimovaný na povrchu nádorových buněk nebo antigen-prezentujících buněk. Aktivace PD-1/PD-L1 osy vede ke snížení T-buňkami mediovaného imunitního dohledu a následně úniku nádorových buněk z imunitního dozoru. Řada schválených protilátek může terapeuticky blokovat vazbu PD-1/PD-L1. FDA dosud schválila šest léčiv interagujících s PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab) nebo PD-L1 (atezolizumab, durvalumab, avelumab). Podávání inhibitorů interakce PD-1/PD-L1 zaznamenává významné úspěchy v léčbě řady nádorů, kromě řady karcinomů též maligního melanomu, Hodgkinova lymfomu aj; v současnosti existují tisíce probíhajících nebo již ukončených klinických studií (59). Indikační kritéria nasazení anti-PD-1 a anti-PD-L1 léčby se u různých nádorů liší, variabilita se týká např. užití různých klonů protilátky diagnostické pro expresi PD-L1 v imunohistochemii, různých skórovacích systémů, hraničních hodnot apod.

Expresce PD-L1 umožňuje nádorové buňce uniknout z „imunitního dozoru“ hostitele a je u řady nádorů spojena s horší prognózou. Expresce PD-L1 je u karcinomu penisu poměrně častá, existují studie z různých zemí popisující pozitivitu PD-L1 přibližně u jedné až dvou třetin pacientů (60–63). V naší retrospektivní studii

jsme analyzovali prognostický vliv exprese PD-L1 na souboru 165 nemocných s SCC penisu, s použitím diagnostického kitu SP263 anti-PD-L1 protilátky. Tři patologové hodnotili procento nádorových buněk s jednoznačnou membránovou pozitivitou, tzv. tumor proportion score (TPS). U PD-L1 pozitivních nádorů bylo hodnoceno, zda je exprese PD-L1 difúzní, ložiskovitá či marginální, tedy akcentovaná na invazním čele nádoru (Obr. 15).

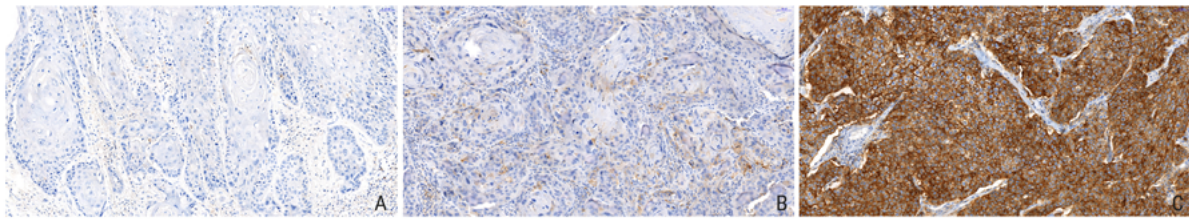
Byly použity hraniční hodnoty podle standardů u nemalobuněčných plicních karcinomů: negativní TPS < 1 %, slabě pozitivní TPS 1–49 %, silně pozitivní TPS 50–100 % nádorových buněk (Obr. 16); negativitou u 52 (31,5 %), slabou pozitivitou u 92 (55,8 %) a silnou pozitivitou u 21 (12,7 %) případů. Významný vliv na OS v žádné podskupině však nalezen nebyl (43).

Silná exprese PD-L1 (TPS > 50 %) byla významně asociovaná s vysokým TMB ≥ 10 mut/Mb, HPV negativním statutem, vysokým počtem intratumorálních CTLA4+ T-buněk a denzním (brisk) lymfocytárním infiltrátem (43). Ačkoliv PD-L1 není podle našich závěrů robustním prognostickým znakem u SCC penisu, nález časté PD-L1 positivity u HPV-negativních nádorů s vysokým TMB dobře ilustruje onkogenezi SCC penisu a činí z nemocných s HPV-independentními SCC kandidáty anti-PD-1/PD-L1 léčby. Nález asociace PD-L1 s HPV-negativitou dokumentuje silnou potřebu prospektivní klinické studie immune checkpoint terapie u nemocných s pokročilým či metastatickým karcinomem penisu.



Obr. 15. Karcinom penisu, barvení imunohistochemicky protilátkou proti PD-L1, A – marginální, zvětšeno 5 $\times$, B – marginálně akcentovaná, zvětšeno 2,7 $\times$

Fig. 15. Penile carcinoma, immunohistochemical staining with anti-PD-L1 antibody, A – marginal, magnified 5 $\times$, B – marginally accentuated, magnified 2.7 $\times$



Obr. 16. Karcinom penisu, barveno imunohistochemicky protilátkou proti PD-L1, zvětšeno 20×, A – negativní, B – slabě pozitivní, C – silně pozitivní

Fig. 16. Penile carcinoma, immunohistochemically stained with anti-PD-L1 antibody, magnified 20×, A – negative, B – weakly positive, C – strongly positive

ZÁVĚR

Aktuálně je metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin nejdůležitějším prognostickým markerem u SCC penisu (11, 12). Vzhledem k tomu, že se jedná o pozdní znak, je třeba najít jiné prognostické markery na mikroskopické úrovni již při patologickém vyšetření tkáně z biopsie či excize primárního nádoru za účelem efektivnější stratifikace nemocných podle rizika a potřeby adjuvantní terapie. V našich studiích se podařilo najít významné a reprodučibilní nepříznivé prognostické markery: nádorový budding, řídký/chybějící lymfocytární infiltrát, mutovaný profil p53 a vysokou nádorovou mutační nálož (TMB). Budding, lymfocytární infiltrát a p53 korelují s přežitím významněji než pT stadium, histopatologický grade nebo morfologický subtyp SCC penisu. U exprese PD-L1 nebyl potvrzen žádný signifi-

kantní vliv na prognózu pacientů s SCC penisu. Výzkum našel vyšší mutační nálož (TMB) a častější expresi PD-L1 u HPV-independentních nádorů ve srovnání s HPV-asociovanými. Z nedávno schváleného podání pembrolizumabu v léčbě solidních nádorů s vysokým TMB vyplývá potřeba klinické studie u nemocných s SCC penisu, zejména HPV-independentním.

Závěry výzkumu ilustrují dvojí onkogenezi SCC penisu: 1. HPV-asociovaný SCC charakterizovaný nízkou TMB, méně častou expresí PD-L1 a nižším počtem tumor infiltrujících lymfocytů; 2. HPV-independentní SCC spojený s chronickým zánětem, který vede k vyššímu počtu získaných mutací (vysoké TMB) a zvýšené neoantigenní produkci (např. PD-L1) a vysoké infiltraci imunitními buňkami. Tito pacienti by mohli vzhledem k vyššímu TMB a časté PD-L1 expresi profitovat z imunoterapie.

LITERATURA

1. Fu L, Tian T, Yao K, et al. Global Pattern and Trends in Penile Cancer Incidence: Population-Based Study. *JMIR Public Health Surveill.* 2022; 8 (7): e34874.
2. Chaux A, Netto GJ, Rodríguez IM, et al. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. *World J Urol.* 2013; 31: 861–867.
3. Thomas A, Necchi A, Muneer A, et al. Penile cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7: 11.
4. Zekan DS, Dahman A, Hajiran AJ, et al. Prognostic predictors of lymph node metastasis in penile cancer: a systematic review. *Int Braz J Urol.* 2021; 47(5): 943–956.
5. D'Aniello C, Cavaliere C, Facchini BA, et al. Penile cancer: prognostic and predictive factors in clinical decision-making. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020; 24(23): 12093–12108.
6. Verhoeven RH, Janssen-Heijnen ML, Saum KU, et al. Population-based survival of penile cancer patients in Europe and the United States of America: no improvement since 1990. *Eur J Cancer.* 2013; 49(6): 1414–1421.
7. Hansen BT, Orumaa M, Lie AK, Brennhovd B, Nygård M. Trends in incidence, mortality and survival of penile squamous cell carcinoma in Norway 1956–2015. *Int J Cancer.* 2018; 142(8): 1586–1593.

8. **Amin MB, Menon S, Moch H.** Tumours of the penis and scrotum. in: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Urinary and Male Genital Tumours. 5th ed. IARC 2022; 372–379.
9. **Michalová K, Beniač P, Kacerovská D.** Tumor lesions of penis and scrotum according to WHO classification 2022. *Cesk Patol.* 2022; 67(4): 192–197.
10. **Cubilla AL.** The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World J Urol.* 2009; 27: 169–177.
11. **Horenblas S, van Tinteren H.** Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. *J Urol.* 1994; 151: 1239–1243.
12. **Srinivas V, Morse MJ, Herr HW, et al.** Penile cancer: relation of extent of nodal metastasis to survival. *J Urol.* 1987; 137: 880–881.
13. **Clark PE, Spiess PE, Agarwal N, et al.** National Comprehensive Cancer Network. Penile cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013; 11(5): 594–615.
14. **Cubilla AL, Velazquez EF, Amin MB, et al.** The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. *Histopathology.* 2018; 72: 893–904.
15. **Hrudka J, Prouzová Z, Kendall Bártů M, et al.** Immune cell infiltration, tumour budding, and the p53 expression pattern are important predictors in penile squamous cell carcinoma: a retrospective study of 152 cases. *Pathology.* 2023; 55(5): 637–649.
16. **Wen S, Ren W, Xue B, et al.** Prognostic factors in patients with penile cancer after surgical management. *World J Urol.* 2018; 36(3): 435–440.
17. **Naushad N, Deb AA, Agag AA, et al.** Prognostic Markers and Trials in Penile Cancer. *Urol Res Pract.* 2023; 49(3): 138–146.
18. **Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al.** Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. *J Urol.* 2009; 182(2): 528–534.
19. **Tang Y, Hu X, Wu K, Li X.** Immune landscape and immunotherapy for penile cancer. *Front Immunol* 2022; 13: 1055235.
20. **Wang Y, Wang K, Chen Y, et al.** Mutational landscape of penile squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int J Cancer.* 2019; 145(5): 1280–1289.
21. **Jacob JM, Ferry EK, Gay LM, et al.** Comparative Genomic Profiling of Refractory and Metastatic Penile and Nonpenile Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Implications for Selection of Systemic Therapy. *J Urol.* 2019; 201(3): 541–548.
22. **Zhou QH, Deng CZ, Li ZS, et al.** Molecular characterization and integrative genomic analysis of a panel of newly established penile cancer cell lines. *Cell Death Dis.* 2018; 9(6): 684.
23. **Olesen TB, Sand FL, Rasmussen CL, et al.** Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2019; 20(1): 145–158.
24. **May M, Burger M, Otto W, et al.** Ki-67, mini-chromosome maintenance 2 protein (MCM2) and geminin have no independent prognostic relevance for cancer-specific survival in surgically treated squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int.* 2013; 112(4): E383–390.
25. **Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B.** Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infect Agent Cancer.* 2016; 11: 59.
26. **Manfredi JJ.** Mdm² and MdmX: Partners in p53 Destruction. *Cancer Res.* 2021; 81(7): 1633–1634.
27. **Buonerba C, Pagliuca M, Vitrone FM, et al.** Immunotherapy for penile cancer. *Future Sci OA.* 2017; 3(3): FSO195.

28. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2001; 159: 1211–1218.
29. Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, et al. p16(INK4a) is a marker of good prognosis for primary invasive penile squamous cell carcinoma: a multi-institutional study. *J Urol.* 2012; 187(3): 899–907.
30. Ferrándiz-Pulido C, Masferrer E, de Torres I, et al. Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell carcinomas: correlation with pathologic subtypes, p16(INK4a) expression, and prognosis. *J Am Acad Dermatol.* 2013; 68(1): 73–82.
31. Steinestel J, Al Ghazal A, Arndt A, et al. The role of histologic subtype, p16(INK4a) expression, and presence of human papillomavirus DNA in penile squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2015; 15: 220.
32. Tang DH, Clark PE, Giannico G, et al. Lack of P16ink4a over expression in penile squamous cell carcinoma is associated with recurrence after lymph node dissection. *J Urol.* 2015; 193(2): 519–525.
33. Ueno H, Murphy J, Jass JR, et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology.* 2002; 40(2): 127–132.
34. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017; 30(9): 1299–1311.
35. Derani H, Becker AS, Hakenberg O, Erbersdobler A. Evaluation of the cellular dissociation grading, based on tumour budding and cell nest size, in squamous cell carcinoma of the penis. *Cancers (Basel).* 2022; 14: 4949.
36. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357(9255): 539–545.
37. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010; 29(8): 1093–1102.
38. Liu Y, Liu Z, Yang Y, et al. The prognostic and biology of tumour-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy of cancer. *Br J Cancer.* 2023; 129(7): 1041–1049.
39. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014; 232(2): 199–209.
40. Ottenhof SR, Djajadiningrat RS, Thygesen HH, et al. The Prognostic Value of Immune Factors in the Tumor Microenvironment of Penile Squamous Cell Carcinoma. *Front Immunol.* 2018; 9: 1253.
41. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81(24): 1893–1904.
42. Yervoy FDA approval history. (citované 08. 03. 2024). Available from: <https://www.drugs.com/history/yervoy.html>.
43. Hrudka J, Hojný J, Prouzová Z, et al. High tumour mutational burden is associated with strong PD-L1 expression, HPV negativity, and worse survival in penile squamous cell carcinoma: an analysis of 165 cases. *Pathology.* 2024; 56(3): 357–366.
44. Kopecký J. Potenciální checkpoint inhibitory využitelné v léčbě nádorů. *Onkologie.* 2022; 16(3): 115–117.
45. Elst L, Philips G, Vandermaesen K, et al. Single-cell Atlas of Penile Cancer Reveals TP53 Mutations as a Driver of an Aggressive Phenotype, Irrespective of Human Papillomavirus Status, and Provides Clues for Treatment Personalization. *Eur Urol.* 2024; Apr 25: S0302–2838(24)02266–8. Epub ahead of print. PMID: 38670879.
46. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969; 71(4): 747–752.
47. Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2015; 5: 288.
48. Prapiska FF, Warli SM. P53 and survival rate in penile cancer. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019; 7: 1170–1173.
49. Gunia S, Kakies C, Erbersdobler A, et al. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. *J Clin Pathol.* 2012; 65: 232–236.

50. Muneer A, Kayes O, Ahmed HU, et al. Molecular prognostic factors in penile cancer. *World J Urol.* 2009; 27: 161–167.
51. Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, et al. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol.* 2002; 168: 81–86.
52. Zargar-Shoshtari K, Spiess PE, Berglund AE, et al. Clinical Significance of p53 and p16(ink4a) status in a contemporary North American penile carcinoma cohort. *Clin Genitourin Cancer.* 2016; 14: 346–351.
53. Mohanty SK, Mishra SK, Bhardwaj N, et al. p53 and p16ink4a as predictive and prognostic biomarkers for nodal metastasis and survival in a contemporary cohort of penile squamous cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer.* 2021; 19: 510–520.
54. Bowie J, Singh S, O'Hanlon C, et al. A systematic review of non-HPV prognostic biomarkers used in penile squamous cell carcinoma. *Turk J Urol.* 2021; 47(5): 358–365.
55. Marcus L, Fashoyin-Aje LA, Donoghue M, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Tumor Mutational Burden-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2021; 27(17): 4685–4689.
56. Chahoud J, Gleber-Netto FO, McCormick BZ, et al. Whole-exome Sequencing in Penile Squamous Cell Carcinoma Uncovers Novel Prognostic Categorization and Drug Targets Similar to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2021; 27(9): 2560–2570.
57. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol.* 2008; 179(1): 53–56.
58. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992; 11(11): 3887–3895.
59. Upadhyaya S, Neftelinov ST, Hodge J, Campbell J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2022; 21(7): 482–483.
60. Davidsson S, Carlsson J, Giunchi F, et al. PD-L1 Expression in Men with Penile Cancer and its Association with Clinical Outcomes. *Eur Urol Oncol.* 2019; 2(2): 214–221.
61. Udager AM, Liu TY, Skala SL, et al. Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: potential opportunities for immunotherapeutic approaches. *Ann Oncol.* 2016; 27(9): 1706–1712.
62. Cocks M, Taheri D, Ball MW, et al. Immune-checkpoint status in penile squamous cell carcinoma: a North American cohort. *Hum Pathol.* 2017; 59: 55–61.
63. De Bacco MW, Carvalhal GF, MacGregor B, et al. PD-L1 and p16 Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma From an Endemic Region. *Clin Genitourin Cancer.* 2020; 18 (3): e254–e259.