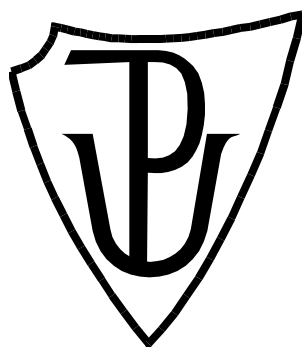


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Formy HPV infekcie u žien s rizikom cervikálneho
karcinómu**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:

Júlia Martinková

Študijný program:

B1501 Experimentální biologie

Študijný obor:

Experimentální biologie

Forma štúdia:

Prezenční

Vedúca práce:

Mgr. Hana Jaworek

Termín odovzdania práce:

29. 7. 2016

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Júlia Martinková
Názov práce: Formy HPV infekcie u žien s rizikom cervikálneho karcinómu
Typ práce: Bakalárska
Pracovisko: Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařska fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc
Vedúca práce: Mgr. Hana Jaworek
Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt:

Infekcia ľudským papilomavírusom (HPV) je najrozšírenejšia pohlavne prenosná nákaza. Perzistentná infekcia vysoko-rizikovými HPV typmi, predovšetkým HPV16 a HPV18, bola preukázaná ako príčina vzniku prednádorových cervikálnych lézií (CIN) a cervikálneho karcinómu (CCa). V tejto práci bolo analyzovaných 28 patientských vzoriek cervikálnych sterov, u ktorých bola pomocou HPV DNA testu cobas[®] 4800 HPV Test alebo PapilloCheck[®] HPV-Screening detekovaná infekcia HPV16 a alebo HPV18. Tieto vzorky boli pomocou multiplex real-time PCR testované na prítomnosť HPV16 a HPV18. Získané výsledky sa zhodovali s výsledkami cobas[®] 4800 HPV Test, ale PapilloCheck[®] HPV-Screening detekoval HPV DNA iba v 50 %. Ako dôvod tejto nezhody bola identifikovaná nízka virálna nálož v týchto diskrepantných vzorkách. Integrovaná a zmiešaná forma, predstavujúca zvýšené riziko vzniku prekarcerózných lézií a Cca, bola detekovaná v 25 % HPV16 pozitívnych vzoriek a v 100 % HPV18 pozitívnych vzoriek. Najvyššia virálna nálož bola detekovaná u zmiešanej formy HPV16 pozitívnych vzoriek a u integrovanej formy HPV18 pozitívnych vzoriek. Pre potvrdenie významu virálnej nálože a formy HPV ako markeru pre rozlíšenie žien s vyšším rizikom vzniku a progresie CIN a CCa by bolo potrebné vyšetriť väčšiu skupinu HPV16 a HPV18 pozitívnych žien a to predovšetkým s pokročilými CIN.

Kľúčové slová: HPV, cervikálny karcinóm, rakovina, PCR
Počet strán: 56
Počet príloh: 7
Jazyk: slovenský

Bibliographical identification

Author's name and surname: Júlia Martinková
Title of thesis: Forms of HPV infection in women at risk for cervical carcinoma
Type of thesis: Bachelor
Department: Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacky University and Faculty Hospital Olomouc
Supervisor: M.Sc. Hana Jaworek
The year of presentation: 2016

Abstract:

Human papillomavirus (HPV) infection is the most prevalent sexually transmitted infection. Persistent infection with high-risk HPV types, especially HPV16 and HPV18, has been recognized as a cause of cervical intraepithelial lesions (CIN) and cervical carcinoma (CCa). In this work 28 cervical smears were analyzed. In all these samples HPV16 or HPV18 DNA was detected by HPV DNA test cobas[®] 4800 HPV Test or PapilloCheck[®] HPV-Screening. These samples were analyzed for the presence of HPV16 and HPV18 by multiplex real-time PCR. Results of our assay agreed with results of cobas[®] 4800 HPV Test in all samples, but results of PapilloCheck[®] HPV-Screening were concordant only in 50 % of samples. Low viral load was identified as reason of this disagreement. Integrated and mixed form of HPV associated with an increased risk of precancerous lesions and CCa was detected in 25 % of HPV16 positive samples and in 100 % of HPV18 of positive samples. The highest viral load was detected in samples with mixed forms of HPV16 and in samples with integrated forms of HPV18. To confirm the importance of viral load and form of HPV as a marker distinguishing women with a higher risk of progression of CIN and CCa, examination of a larger group of HPV16 and HPV18 positive women, especially with the advanced CIN or CCa, would be needed.

Keywords: HPV, cervical carcinoma, cancer, PCR
Number of pages: 56
Number of appendices: 7
Language: Slovak

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu na tému Formy HPV infekcie u žien s rizikom cervikálneho karcinómu vypracovala samostatne pod odborným vedením Mgr. Hany Jaworek, za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

.....
Júlia Martinková

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcej bakalárskej práce Mgr. Hane Jaworek za cenné rady a pripomienky pri vypracovaní predloženej bakalárskej práce. Poďakovanie patrí taktiež Mgr. Veronike Věnskovéj za pomoc pri práci v laboratóriu.

Obsah

1	ÚVOD A CIEĽ PRÁCE	7
2	ĽUDSKÉ PAPILOMAVÍRUSY	8
2.1	Taxonómia a klasifikácia	8
2.2	Organizácia HPV genómu	9
2.3	Integrácia HPV do ľudského genómu	10
3	CERVIKÁLNY KARCINÓM	14
3.1	Prevalencia a incidencia HPV infekcie a CCa	14
3.2	Rizikové faktory	16
3.3	Prevenca	17
3.3.1	Očkovanie proti HPV	17
3.4	Cervikálne intraepiteliárne neoplázie	18
3.5	Cervikálny screening a možnosti liečby	21
3.5.1	Screening	21
3.5.2	Detekcia HPV DNA	22
3.5.3	Možnosti liečby	22
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	23
4.1	Materiál, pomôcky a prístrojové vybavenie	27
4.1.1	Použité chemikálie	27
4.1.2	Použitý biologický materiál	27
4.1.3	Použité pomôcky a prístrojové vybavenie	27
4.2	Zloženie roztokov	28
4.3	Vzorky patientských cervikálnych sterov	28
4.4	Použité metódy a pracovné postupy	28
4.4.1	Príprava <i>Escherichia coli</i> s plazmidom	28
4.4.2	Overenie úspešnosti transformácie <i>E. coli</i>	29
4.4.3	Izolácia plazmidovej DNA	31
4.4.4	Izolácia DNA z cervikálnych sterov	32
4.4.5	Príprava kalibračných rad pre real-time PCR	33
4.4.6	Real-time PCR	33
5	VÝSLEDKY	35
6	DISKUSIA	39
7	ZÁVER	41
	Zoznam použitej literatúry	42
	Zoznam skratiek	50
	Prílohy	52

1 ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

Cervikálny karcinóm (CCa; *cervical carcinoma*) je s 530 000 novo diagnostikovanými prípadmi ročne celosvetovo štvrtou najčastejšie sa vyskytujúcou formou rakoviny u žien. Každý rok na toto ochorenie zomiera približne 270 000 žien. Veľmi vysoká úmrtnosť na CCa (52 %) by mohla byť znížená predovšetkým pomocou efektívneho screening-u a liečby. Ako kauzálnou príčinou CCa bola identifikovaná perzistentná infekcia minimálne jedným vysokorizikovým genotypom ľudského papilomavírusu (HPV; *human papillomavirus*). V približne 70 % CCa je detekovaná infekcia HPV16 a alebo HPV18, na ktoré je zameraná táto bakalárska práca (WHO, 2016).

Medzi ciele predloženej práce patrilo vypracovanie literárnej rešerše na tému cervikálny karcinóm a ľudské papilomavírusy so zameraním na organizáciu HPV genómu a integráciu HPV do ľudského genómu.

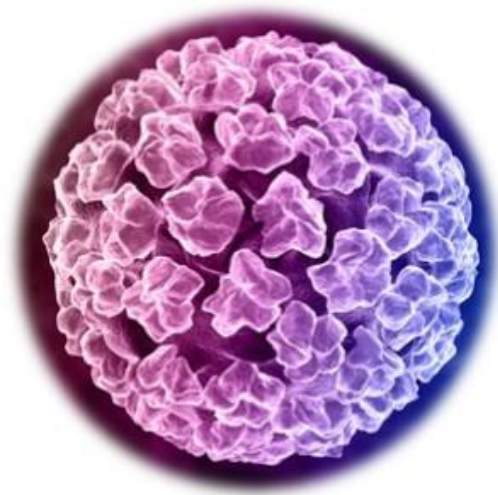
Cieľ experimentálnej časti spočíval v určení formy HPV infekcie vrátane kvantifikácie virálnej nálože (VL; *viral load*) HPV16 a HPV18 v cervikálnych steroch. Súčasťou bolo overenie ekvivalencie kvantifikácie DNA pomocou fluorometra Qubit za použitia Qubit dsDNA BR assay kit-u a multiplex real-time PCR (gén pre *GAPDH*, glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa). Medzi čiastkové ciele patrila príprava kalibračných rad plazmidov s génmi HPV16 a HPV18, ktoré zahrňovala transfekciu kompetentnej baktérie *Escherichia coli*, overenie úspešnosti transfekcie a izolácia plazmidovej DNA.

2 ĽUDSKÉ PAPILOMAVÍRUSY

Už v roku 1976, Harald zu Hausen zverejnil hypotézu, že ľudské papilomavírusy hrajú dôležitú úlohu pri vzniku CCa (zur Hausen, 1977). V priebehu nasledujúcich rokov určil so svojimi spolupracovníkmi vírusy HPV16 a HPV18 zodpovedné za vznik CCa (Morshed *et al.*, 2014). Za výskum preukazujúci asociáciu HPV so vznikom CCa, získal Harald zu Hausen v roku 2008 Nobelovu cenu za medicínu (The Nobel Prize, 2008).

2.1 Taxonómia a klasifikácia

Ľudské papilomavírusy radíme do čeľade *Papillomaviridae*, ktorá zahrňuje 29 rodov, tvorená 189 typmi papilomavírusu, z ktorých 120 bolo identifikovaných u človeka (Bernard *et al.*, 2010).



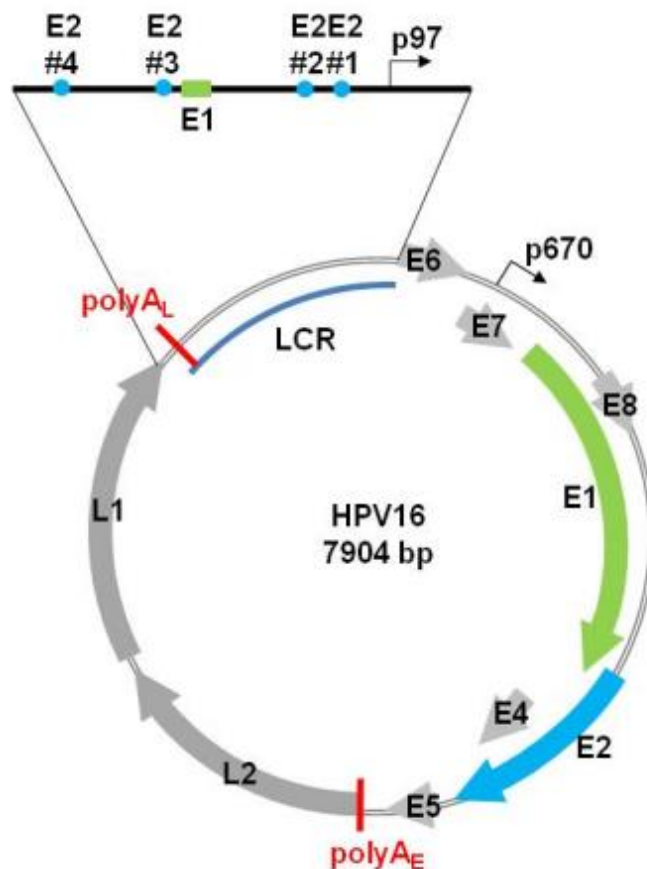
Obr. 1: HPV vírus (zdroj: <https://www.pinterest.com/>, stiahnuté 27.3.2016).

Ľudské papilomavírusy (Obr. 1) rozdeľujeme podľa onkogénneho potenciálu na vysoko-rizikové typy HPV (hrHPV; *high-risk HPV*): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82, ktoré môžu spôsobovať nádorové ochorenia krčka maternice, konečníka, pošvy, penisu, pažeráku, jazyka a hlasiviek. Medzi nízko-rizikové typy HPV (lrHPV; *low-risk HPV*) zapríčiňujúce genitálne bradavice, rekurentnú respiračnú papilomatózu, patrí: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 a CP6108. Ako pravdepodobné karcinogény sú klasifikované HPV26, 53 a 66. Medzi HPV s neurčitým rizikom patrí HPV34, 57 a 83 (Muñoz *et al.*, 2003; Ondryášová *et al.*, 2015). Celosvetovo najrozšírenejšie typy sú HPV16 a HPV18, ostatné typy HPV majú nerovnomerné geografické rozloženie (Touzé *et al.*, 2001).

2.2 Organizácia HPV genómu

HPV sú malé neobalené vírusy s ikosaedrálnou kapsidou o priemere 45-55 nm, tvorené 72 pentamerickými kapsomérmi (Castro *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 1991). Genóm HPV tvorí dvojláknová DNA o veľkosti 7 200-8 000 bp (párov báz; *base pairs*) (zur Hausen, 1996), z ktorých len jedno vlákno DNA kóduje všetky HPV gény (Morshed *et al.*, 2014).

Genóm HPV sa rozdeľuje na skorý a neskorý otvorený čítací rámec (ORF; *open reading frame*) a nekódujúcu dlhú kontrolnú oblasť (LCR; *long control region*) (Obr. 2). Skorý ORF (*E-early*), predstavujúci 50 % celého genómu, kóduje gény podieľajúce sa na replikácii HPV DNA a onkogenézii: *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7*. Ďalších 40 % genómu tvorí neskorý ORF oblasť (*L-late*) nesúc gény pre kapsidové proteíny L1 a L2. Zvyšných 10 % HPV genómu tvorí LCR (Morshed *et al.*, 2014).



Obr. 2: Organizácia genómu HPV16. Schéma genómu HPV16, zobrazuje usporiadanie kódujúcej oblasti tvorenej skorými génmi *E1-E7* a neskorými génmi pre kapsidové proteíny L1 a L2 a nekódujúcej oblasti (LCR) zostávajúcej zo skorého promotora, p97 s väzbovými miestami pre E1 a E2 proteíny. Genóm obsahuje skorý promotor p97, neskorý p670 a polyadenylačné miesta (polyA_E pre skoré a polyA_L pre neskoré) (Pittayakhajonwut, 2010).

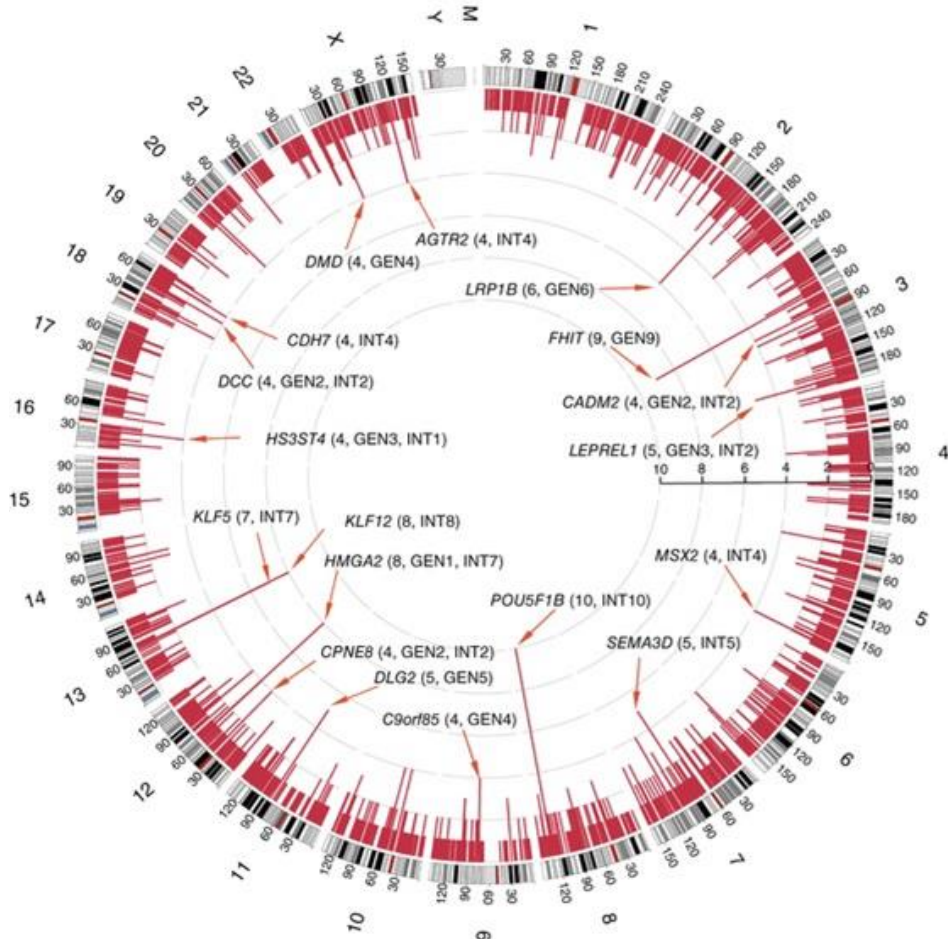
2.3 Integrácia HPV do ľudského genómu

Zo spomínaných 120 typov HPV, iba 40 HPV typov infikuje anogenitálnu oblasť (de Villiers *et al.*, 2004). Každý genotyp vírusu pôsobí ako nezávislý zdroj infekcie (Schiffman *et al.*, 2007). Vírus môže vstúpiť do organizmu drobnými poraneniami v koži či sliznici a to predovšetkým pri pohlavnom styku, ale bol tiež preukázaný prenos HPV z matky na dieťa (Morshed *et al.*, 2014).

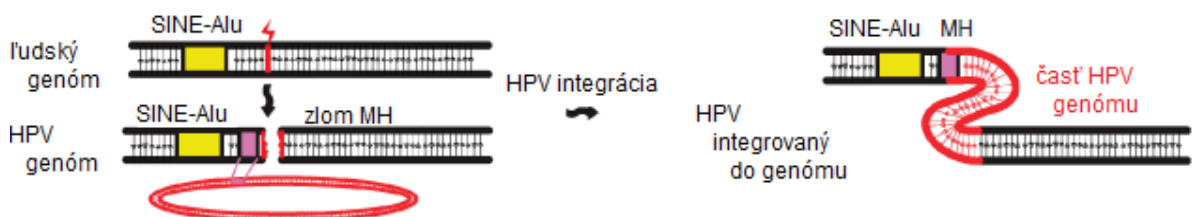
Vírus infikuje bazálne bunky, jediné deliace sa bunky normálneho mnohvrstevného dlaždicového epitelu, a využíva ich proteíny pre replikáciu vlastnej DNA. HPV infikované suprabazálne bunky zostávajú mitoticky aktívne i v priebehu diferenciácie. Infikované bunky opätovne vstupujú do S-fázy a amplifikujú HPV genóm. Následne dochádza v bunke k syntéze kapsidových proteínov, zoskupeniu viriónov a uvoľnenie virálnej častice (Blitzer *et al.*, 2014). Časový priebeh HPV infekcie od infikovania po rozvoj CCa trvá spravidla veľa rokov (Yu *et al.*, 2005). K rozvinutiu onkologického ochorenia môže dôjsť len v prípade, ak je epitel trvalo infikovaný jedným alebo viacerými hrHPV (Molijn *et al.*, 2005).

Vo vzniku CCa hrá kľúčovú úlohu integrácia HPV do ľudského genómu (Hu *et al.*, 2015). Až 55 % HPV16 pozitívnych CCa, 92 % HPV18, 83 % HPV45, 37 % HPV33 a 14 % HPV31 je spojených s integráciou vírusového genómu (Groves a Coleman, 2015). Pri integrácií HPV dochádza najčastejšie k fragmentácií génov *E1*, *E2* a génov pre kapsidové proteíny L1 a L2. Najmenej bývajú fragmentované oblasti génov *E6* a *E7* (Kulmala *et al.*, 2006; Arias-Pulido *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2015). HPV integrácia do ľudskej DNA je spojená s remodeláciou nielen HPV genómu, ale tiež oblastí obklopujúce miesta integrácie. Miesta integrácie vírusovej DNA sú zvyčajne genomicky nestabilné, bývajú spájané s chromozómovými deléciami a prestavbami. Celý proces integrácie nie je náhodný, dochádza k nemu predovšetkým v oblasti *FRA3B* (48 % HPV16 a 68 % HPV18) a oblasti génu pre protoonkogén *C-MYC*- (25 % HPV18). Integráciou do týchto miest alebo ich okolia môže zvyšovať riziko vzniku CCa prostredníctvom zmeny expresie génov nachádzajúcich sa v blízkosti integračných miest (Yu *et al.*, 2005). Najnovšia štúdia identifikovala ďalšie časti miesta integrácie: *POU5F1B* (9,7 %), *FHIT* (8,7 %), *KLF12* (7,8 %), *KLF5* (6,8 %), *LRP1B* (5,8 %) a *LEPREL1* (4,9 %), ako novo objavené sú *HMGA2* (7,8 %), *DLG2* (4,9 %) a *SEMA3D* (4,9 %) (Obr. 3). Mimo to sa Hu *et al.* podarilo odhaliť pravdepodobný mechanizmus integrácie HPV založený na princípe mikroholognej opravy dvojlákových

zlomov DNA (Obr. 4) (Hu *et al.*, 2015). Riziko integrácie HPV do genómu sa zvyšuje s poškodením DNA spôsobeným napr. reaktívnymi formami kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), ktoré sú produkované pri chronickom zápale podieľajúcom sa na progresii nádorových ochorení (Williams *et al.*, 2011).



Obr. 3: Distribúcia miest integrácie HPV16 v 135 vzorkách. Rozdelenie integračných miest v ľudskom genóme. Na vonkajšom kruhu každý stĺpec označuje miesto integrácie do 24 chromozómov. Histogram jednotiek osy predstavuje počet vzoriek a vonkajšie číslovanie DNA sú uvedené v miliónoch báz. Vo vnútornom kruhu, každý červený pruh zobrazuje frekvenciu integrácie HPV. Niektoré miesta s vysokou mierou integrácie sú označené (Hu *et al.*, 2015).



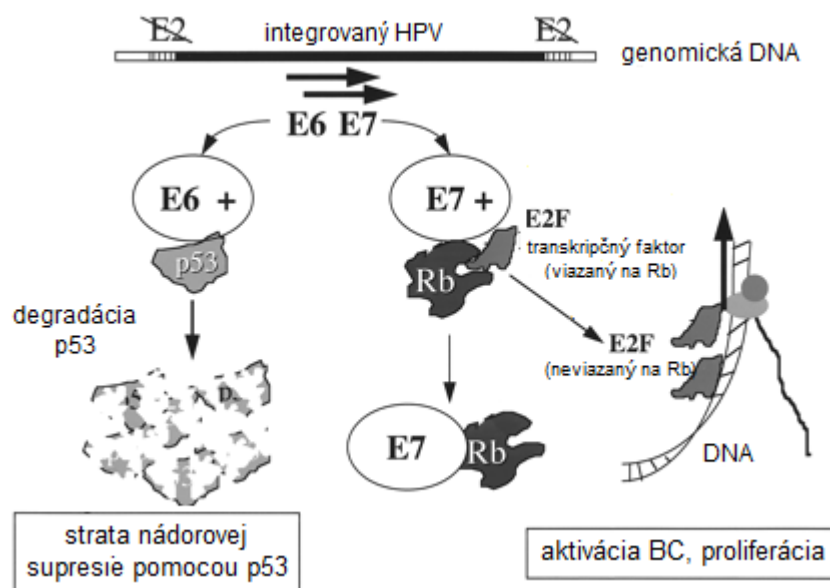
Obr. 4: Schéma mechanizmu spájania poškodeného ľudského genómu okolo SINE-Alu s integráciou HPV genómu. Žltá oblasť zobrazuje SINE-Alu, červená HPV sekvenciu, fialová mikrohomológnu sekvenciu (MH) (Hu *et al.*, 2015, upravené).

Pri vstupe HPV do bunky sú exprimované skoré vírusové regulačné gény *E1* a *E2*, uplatňujú sa pri replikácii vírusového genómu v jadre hostiteľskej bunky. *E1* a *E2* umožňujú replikáciu HPV DNA viackrát za jeden bunecný cyklus (BC) (Blitzer *et al.*, 2014; Kadaja, 2009; Morshed *et al.*, 2014). Celý proces replikácie trvá približne 3 týždne, dokiaľ keratinocyty nepodstúpia úplnú diferenciáciu. Vírusovou integráciou replikácia HPV DNA v napadnutej bunke nie je zastavená (Kadaja, 2009).

V prípade integrácie dochádza často k porušeniu funkcie *E2* génu, následkom je zvýšená expresia onkoproteínov *E6* a *E7*. *E6* indukuje degradáciu proteínu p53, ktorá je spôsobená napojením *E6* s asociovaným proteínom AP (*E6-AP*) spôsobujúcou proteolytickú degradáciu p53 (Obr. 5). Tým *E6* bráni v zastavení rastu a apoptóze hostiteľskej bunky. *E7* asociuje s pRB (retinoblastómový proteín; *retinoblastoma protein*), indukuje jeho postupnú degradáciu a narušuje interakciu pRB s E2F transkripčným faktorom, ktorý následne aktivuje transkripciu bunecných proteínov (napr. cyklin A a E) nevyhnutných pre replikáciu virálnej DNA. Následkom týchto procesov je nekontrolovaná proliferácia a malígna transformácia epitelových buniek spôsobená konkrétnym typom integrácie (Doorbar, 2006; Yu *et al.*, 2005; Morshed *et al.*, 2014). Zvýšený obsah proteínu *E7* bol detekovaný v epitelových bunkách s integrovanou formou HPV, oblasti kde mal gén nižšiu hodnotu sa nachádzal vírus výhradne v epizomálnej forme. Na základe toho je možné, že HPV onkoproteíny sú jedny z hlavných faktorov ovplyvňujúcich proliferáciu buniek v CCa (zur Hausen, 1996).

Expresia génu *E4* je spojená s diferenciáciou hostiteľských epitelových buniek v horných vrstvách epitelu. Biologická funkcia tohto proteínu je do značnej miery neznáma, doposiaľ bola preukázaná jeho schopnosť blokovat' BC v G2/M fázy, narúšať cytokeratiny a tým napomáhať uvoľneniu viriónov z odumretých keratinocytov (Kadaja, 2009).

Proteín *E5* spolu s *E6* a *E7* napomáha malígnej transformácii a umožňuje infikovaným bunkám, aby sa vyhli rozpoznaniu imunitným systémom (Morshed *et al.*, 2014).



Obr. 5: Vplyv overexpresie E6 a E7 génov v dôsledku HPV integrácie v bunkách CCa (zdroj: <https://www.fiercebiotechresearch.com/>, stiahnuté 1.7.2016, upravené).

L1 a L2 gény kódujú kapsidové proteíny vírusu, L1 je majoritný a L2 menší minoritný proteín (Morshed *et al.*, 2014; Burd, 2003). Tieto štrukturálne proteíny nehrajú žiadnu úlohu pri karcinogézi, ale zúčastňujú sa imunitnej odpovedi na infekciu HPV (Horvath *et al.*, 2010). Gén L1 je najviac konzervovaným génom v genóme, preto sa používa na identifikáciu nových typov HPV (de Villiers *et al.*, 2004).

V skorých štádiách cervikálnych intraepiteliálnych léziách (CIN) sa vírus často vyskytuje v epizomálnej forme, na rozdiel od CIN3 a CIS (karcinóm *in situ*), kde je v podobe integrovanej formy (Hudelst *et al.*, 2004). To naznačuje dlhú predrakovinovú fázu, kedy je integrovaná forma pozorovaná až v pokročilých štádiách cervikálnych lézií a invazívneho karcinómu sprevádzaných genomickými abnormalitami a nádorovou progresiou (Williams *et al.*, 2011).

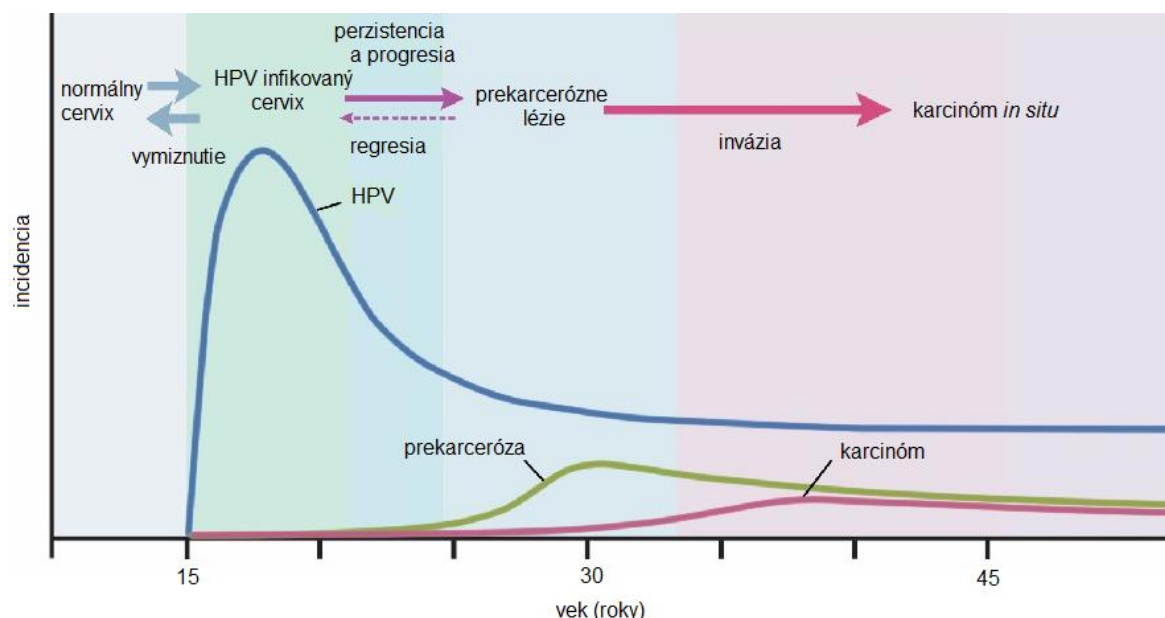
Prostredníctvom súčasnej amplifikácie E2 a E6 génov sa dá zistiť prítomnosť integrovanej (I), zmiešanej (Z) alebo epizomálnej (E) formy daného typu HPV použitím citlivej metódy real-time PCR. Táto metóda je užitočná na posúdenie rizika a identifikáciu CCa (Arias-Pulido *et al.*, 2006; Cricca *et al.*, 2007). Pri detekcii je možné sa orientovať tiež pomocou vírusových markerov ako je virálna nálož (VL; *viral load*), kde vysoké hodnoty VL v CIN značia až 60-násobné zvýšené riziko malígnej progresie (Kulmala *et al.*, 2006). Určenie VL a I/Z/E formy HPV boli jedným z cieľov predloženej bakalárskej práce.

3 CERVIKÁLNY KARCINÓM

Cervikálny karcinóm je nádorové ochorenie, spôsobené sexuálne prenosnou hrHPV infekciou (zur Hausen, 1996), ktorá môže viesť k nekontrolovateľnej proliferácii squamózových buniek krčka maternice. Infekcia aspoň jedným hrHPV bola detekovaná v 99,7 % prípadov CCa (Walboomers *et al.*, 1999), z ktorých je približne 70 % asociovaných s HPV16 a HPV18 (Blitzer *et al.*, 2014).

3.1 Prevalencia a incidencia HPV infekcie a CCa

Svetová zdravotnícka organizácia udáva celosvetovú prevalenciu HPV infekcie s 9-13 % (630 miliónov infikovaných ľudí) ako najrozšírenejšiu pohlavne prenosnú infekciu (WHO, 2011). Prevalencia je najvyššia u mladých žien do veku 20 rokov (Obr. 6), ktoré sa nakazia krátko po začiatku sexuálneho života (Molijn *et al.*, 2005). Vo väčšine prípadov je HPV infekcia bez akéhokoľvek klinického prejavu spontánne eliminovaná imunitným systémom do 24 mesiacov (Baseman a Koutsky, 2005). S narastajúcim vekom sa prevalencia HPV infekcie znižuje (Obr. 6) (Schiffman, 1992). Ak nedôjde k spontánnej regresii HPV, môže perzistentná infekcia viesť k vzniku cervikálnej intraepiteliárnej neoplázie (CIN). Najviac prípadov CIN je diagnostikovaných u žien vo vekovej skupine okolo 30 rokov. Od tohto veku dochádza k postupnému nárastu prevalence CCa (zur Hausen, 1996).



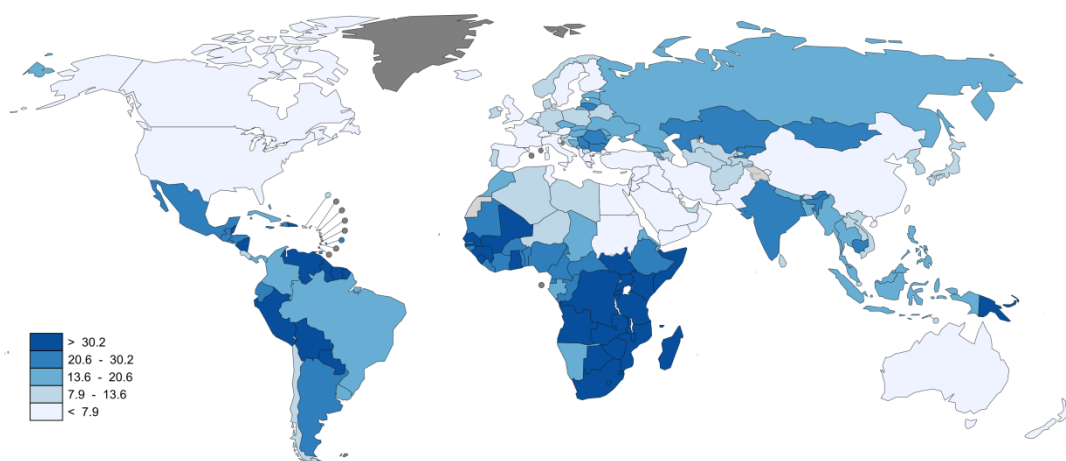
Obr. 6: Prevalencia HPV infekcie, cervikálnych prekarceróz a CCa. Prechodná hrHPV infekcia (modrá čiara) sa vyskytuje predovšetkým u žien vo veku do 25 rokov po začiatku sexuálneho života. Vrchol prevalence prekarceróz pozorujeme u žien okolo 30 roku života (zelená čiara). U približne o 10 rokov starších žien zaznamenávame najvyššiu prevalenciu CCa (červená čiara) (Schiffman a Castle, 2005, upravené).

Celosvetovo je zaznamenaný výrazný pokles incidencie CCa (Tab. 1) (IARC, GLOBOCAN 2012). Údaje o incidencii CCa (Obr. 7) sa značne líšia naprieč vyspelými krajinami, kde je výskyt ochorenia a mortalita nižšia, v porovnaní s krajinami rozvojovými (Redecha *et al.*, 2007). Takmer 9 z 10 (87 %) úmrtí na CCa sa vyskytujú práve v týchto oblastiach (Obr. 8) (IARC, GLOBOCAN 2012).

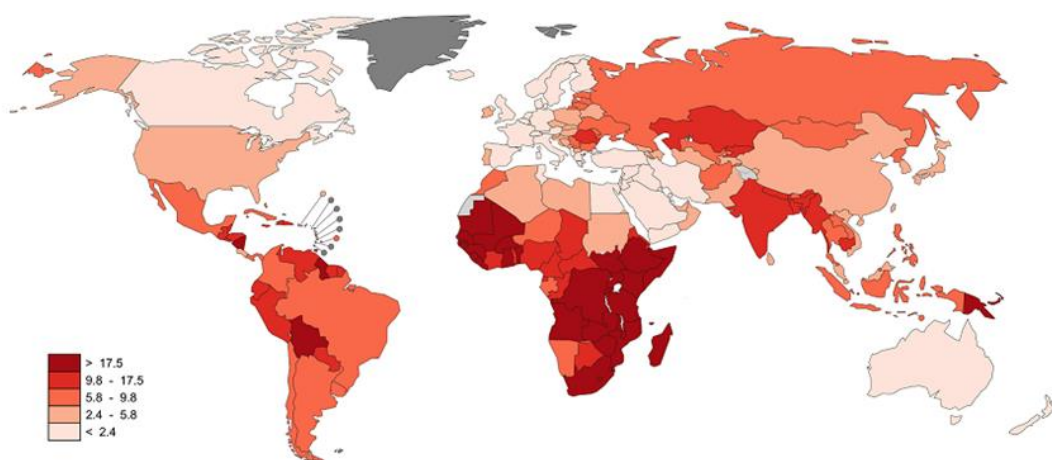
Tab. 1: Vývoj incidencie v rokoch 2007 a 2012.

	incidencia v r. 2007	incidencia v r. 2012
Svet	1 547 000	528 000
Európa	225 000	67 000

(zdroj: IARC, GLOBOCAN 2012)



Obr. 7: Celosvetová incidencia cervikálneho karcinómu v roku 2012 prepočítaná na svetový štandard (zdroj: IARC, GLOBOCAN 2012, stiahnuté 2.7.2016).



Obr. 8: Celosvetová mortalita cervikálneho karcinómu v roku 2012 prepočítaná na svetový štandard (zdroj: IARC, GLOBOCAN 2012, stiahnuté 28.3.2016).

Na území Českej republiky je incidencia za posledné obdobie stabilizovaná, zaznamenaný je i mierny pokles incidence a mortality CCa. V roku 2013 bolo diagnostikovaných 895 nových prípadov CCa a zomrelo 388 žien. V záznamoch s prevalenciou CCa medzi rokmi 2003-2013 bol zistený 21% nárast počtu žijúcich žien, u ktorých bol detekovaný CCa. V roku 2003 to bolo 14 667 prípadov o desať rokov neskôr už 17 796 prípadov žien s CCa (Mužík *et al.*, 2015).

Incidencia CCa závisí hlavne na uplatnení pravidelných screening-ových programoch zaručujúcich skorú diagnostiku a kvalite zdravotnej starostlivosti. Nesporný vplyv na incidenciu CCa má tiež obmedzenie rizikového sexuálneho chovania a zdravý životný štýl (Redecha *et al.*, 2004).

3.2 Rizikové faktory

Najvýznamnejším rizikovým faktorom vzniku CCa je hrHPV infekcia, ale na jeho vzniku sa podieľa aj rada ďalších faktorov. Medzi najdiskutovanejšie faktory patrí zvýšený počet a časté striedanie sexuálnych partnerov, pohlavný styk v nízkom veku, prítomnosť ďalších pohlavne prenosných ochorení, dlhodobé užívanie hormonálnej antikoncepcie (HA), fajčenie tabaku a viac tehotenstiev počas života žien (Muñoz *et al.*, 2006; The American Cancer Society (ACS), 2014).

Ženy, ktoré už boli v priebehu života infikované jedným z HPV majú väčšie riziko infekcie novým typom (typmi) HPV spojeným s novým sexuálnym partnerom (Woodman *et al.*, 2007). Taktiež ženy, ktoré mali dvoch sexuálnych partnerov majú 50 % riziko infekcie HPV, pri troch sexuálnych partneroch riziko výrazne narastá na 90 % (Cada, 2016). Používanie prezervatívov nemá 100% účinnosť. Na rozdiel od väčšiny sexuálne prenosných chorôb – používanie prezervatívov riziko HPV nákazy len redukuje, neeliminuje ho úplne (Manhart a Koutsky, 2002).

Nezanedbateľný vplyv na rozvoj CCa má taktiež imunitný systém. Jedinci so zníženou imunitou, ľudia trpiaci vírusom HIV (*human immunodeficiency virus*) alebo pacienti liečení imunosupresívami sú v porovnaní so zdravými osobami vystavení zvýšenému riziku HPV infekcie a vzniku CCa (Muñoz *et al.*, 2006; ACS, 2014).

Ani jeden zo zmienených faktorov však nemusí sám o sebe zvyšovať poprípade zapríčiniť riziko vzniku rakoviny, každý organizmus má odlišný imunitný systém a na infekciu reaguje inak (ACS, 2014).

3.3 Prevencia

Obdobne ako u ďalších nádorových ochorení bol aj u CCa pozorovaný možný ochranný účinok stravy bohatej na ovocie a zeleninu obsahujúci vitamín C, E, alfa- a beta-karotén, lykopén, lutein a kryptoxantin. Ako pravdepodobný protektívny účinok má kyselina listová, vitamín A, E a ako možný vplyv má tiež vitamín B12, C, alfa-karotén, lykopén, lutein/zeaxantin a kryptoxantin (Muñoz *et al.*, 2006).

3.3.1 Očkovanie proti HPV

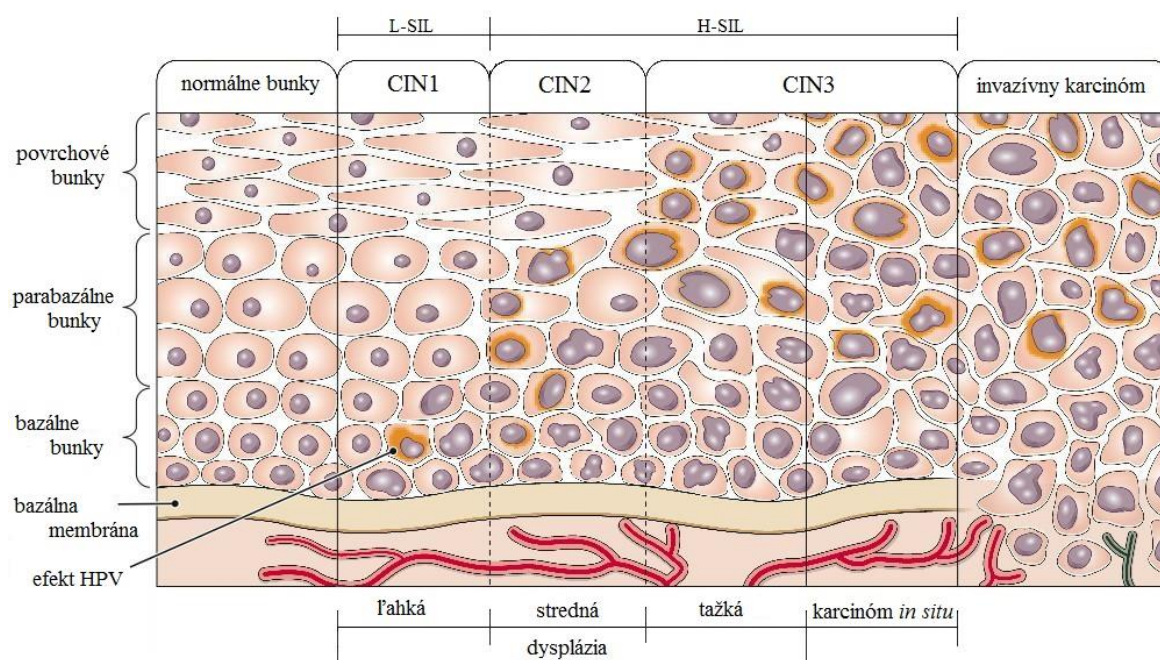
Aj keď zdravý životný štýl a vyvarovanie sa rizikovému správaniu môže znížiť riziko vzniku CIN a CCa, najefektívnejšou prevenciou je jednoznačne očkovanie a pravidelný cervikálny screening (Zhou *et al.*, 1991; Baseman a Koutsky, 2005). U mladých dievčat očkovaných pred prvým pohlavným stykom bola pozorovaná skoro 100% účinnosť proti vakcinárnym HPV genotypom (Arbyn *et al.*, 2010; Pandhi a Sonthalia, 2011). Odporúčaný vek na očkovanie je u dievčat 9-13 rokov, kedy sa predpokladá, že ešte neboli infikované vírusom (WHO, 2013). Taktiež je v rámci prevencie genitálnych bradavíc doporučené očkovať chlapcov a mužov vo veku 9-26 rokov (Pandhi a Sonthalia, 2011). Celoplošná vakcinácia proti HPV16 a HPV18 by mohla znížiť výskyt CCa až o 70 % a taktiež znížiť náklady na screening-ové programy. Je však pravdepodobné, že ani celoplošné očkovanie nebude viesť k vymiznutiu HPV asociovaných ochorení. Očkovanie pacienta ochráni len pred vakcinárnymi typmi HPV a jeho účinnosť je časovo obmedzená (Woodman *et al.*, 2007). Už po 3-5 rokoch by mladé ženy nemuseli byť chránené (Rosenthal, 2008). Pre ženy nakazené vírusom HPV, u ktorých sa prejavil CIN3 a CIS zatiaľ neexistujú vakcíny. Pomôcť by im mohli protizápalové činidlá, ktoré tlmia zápal a mohli by tak zabrániť integrácií HPV do ľudskej DNA (Williams *et al.*, 2011). Riziko vzniku nádoru navyše pretrváva u starších jedincov, ktorí sa vôbec nepodrobili očkovaniu. Taktiež zmeny v HPV genómoch môžu spôsobiť neúčinnosť vakcinácie (Woodman *et al.*, 2007).

V súčasnej dobe sú na trhu dostupné 3 vakcíny: Cervarix[®], Silgard[®] a Gardasil[®] 9. Vakcína Cervarix[®] (GlaxoSmithKline), tzv. bivalentná vakcína, chráni pred infekciou najrozšírenejšími hrHPV typmi HPV16 a 18. Vakcína Silgard[®] (Merck, Sharp & Dohme) chráni pred infekciou HPV16 a 18, ale taktiež pred HPV6 a 11 (WHO, 2013). Novinkou je tzv. 9-valentná vakcína Gardasil[®] 9, ktorá je schopná zabrániť infekcii nielen HPV16, 18, 6 a 11 ale i HPV31, 33, 45, 52 a 58 (Joura *et al.*, 2015).

3.4 Cervikálne intraepiteliárne neoplázie

Rozvoj cervikálneho karcinómu je viacstupňový proces, od nakazenia hrHPV cez vznik prekarceróznych zmien až po diagnostikovanie CCa obvykle ubehnú desiatky rokov (Molijn *et al.*, 2005; zur Hausen, 1996).

Prekarcerózy sú patologické zmeny tkaniva, ktoré za určitých okolností môžu smerovať k vzniku zhubného nádorového bujnenia (Toman a Feyereisl, 2001). Podľa kolposkopického vyšetrenia rozlišujeme dva typy prekarceróz: lézia ľahkého štádia (LGL; *low-grade lesion*), ktorá odpovedá cytologickému L-SIL (*low-grade squamous intraepithelial lesion*) a lézia stredného a ťažkého štádia (HGL; *high-grade lesion*), odpovedajúca cytologickému H-SIL (*high-grade squamous intraepithelial lesion*). Podľa histologického vyšetrenia sa L-SIL zhoduje s CIN1 a H-SIL s CIN2, CIN3 a CIS (Obr. 9) (Burd, 2003).



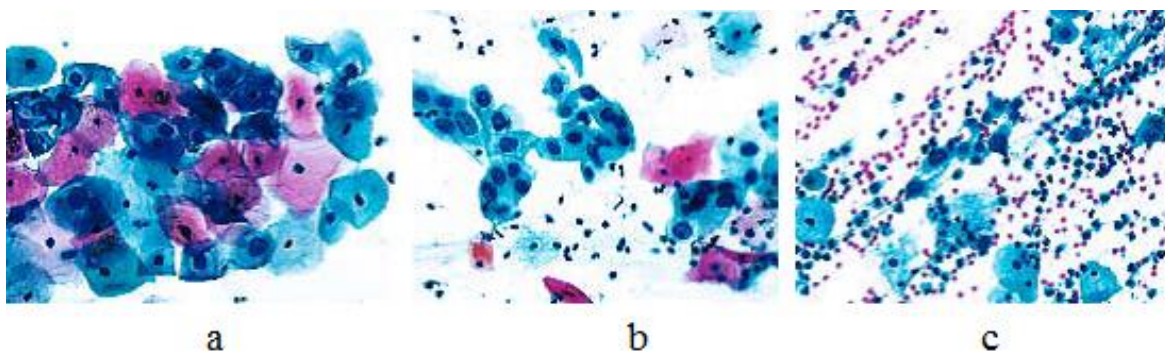
Obr. 9: Proces infekcie HPV z benígnej lézie cez CIN1, CIN2 do CIN3 až do invazívneho karcinómu (zdroj: <https://www.studyblue.com>, stiahnuté 31.3.2016, upravené).

Karcinóm *in situ* je (CIS) charakterizovaný ako lézia, ktorej nediferencované nádorové bunky vytvárajú hrubú vrstvu epitelu bez narušenia bazálnej membrány (Broder, 1932). Spojenie CIS s ťažkou dyspláziou do jednej fázy sa označuje ako CIN3, z dôvodu vysvetlenia situácie, kde je rozlíšenie CIS od invazívneho CCa pomerne ťažko rozlíšiteľné (Toman a Feyereisl, 2001).

U približne 60 % prípadov CIN1 dochádza k spontánnej regresii. Z 10 % CIN1 vzniká CIN3, z ktorých iba v 1 % dochádza k rozvoju invazívneho karcinómu (Ostor, 1993).

V rámci cervikálneho sceening-u sa využíva cytologické vyšetrenie (Obr. 10), tzv. Pap (*Papanicolaou*) test, založené na mikroskopickej analýze cervikálnych buniek farbených podľa *Papanicolaou*. Pri cytologickom vyšetrení sú hodnotené bunkové (jadrové a cytoplazmatické) zmeny, na ktorých je založené následné triedenie na L-SIL a H-SIL na rozdiel od histologického vyšetrenia (Obr. 11), kde sú na ofarbenom preparáte biopsie či excízie cervixu hodnotené tiež dozrievanie epitelu a podiel mitoticky aktívnych buniek naprieč hrúbkou epitelu (IARC. Sellors, Sankaranarazanan, 2003).

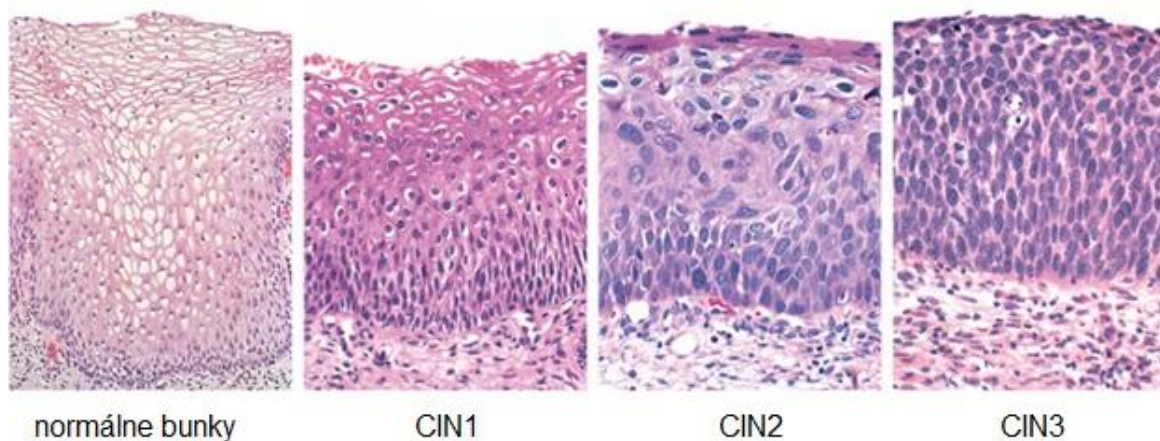
Ženy s H-SIL, opakovanými L-SIL alebo s nejednoznačným cytologickým výsledkom by mali podstúpiť kolposkopické vyšetrenie s prípadnou biopsiou a na základe ich výsledku sa rozhodnúť o nutnosti liečby (Arbyn *et al.*, 2010).



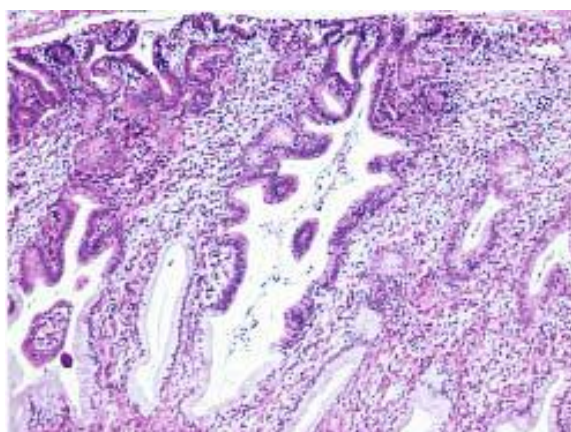
Obr. 10: Cytologické zmeny: (a) L-SIL (CIN1), (b) H-SIL (CIN 2), (c) H-SIL (CIN 3) (zväčšenie 20×), zvýšená intenzita farbenia (hyperchromasia), abnormálne jadrá indikujú CIN, pomer množstva cytoplazmy k veľkosti jadier je jedným zo základných faktorov pre posúdenie stupňa CIN, zväčšenie jadier na úkor cytoplazmy charakterizuje vážnejší typ CIN (IARC. Sellors, Sankaranarazanan, 2003).

V histologickej kategórii CIN1 sú charakteristické minimálne jaderné abnormality s niekoľkými mitotickými bunkami (Obr. 11). Nediferencované dysplastické bunky sa nachádzajú v hlbšej tretine vrstvy epitelu. CIN2 sa vyznačuje dysplastickými bunkovými zmenami obmedzenými do spodných dvoch tretín epitelu, s výraznými jadernými abnormalitami oproti CIN1. V CIN3 diferencované bunky epitelu úplne chýbajú, alebo sú prítomné len v štvrtine vrchnej časti epitelu, dysplastické bunky sa nachádzajú naprieč celou hrúbkou

epitelu. Pre CIS je charakteristické nahradenie normálneho epitelu abnormálnymi bunkami, strata polarity buniek v celej hrúbke epitelu, zvýšená veľkosť buniek a zvýšená veľkosť jadier na úkor cytoplazmy. Adenokarcinóm *in situ* býva vo väčšine prípadov spájaný s CIN (Obr. 12) (IARC. Sellors, Sankaranarazanan, 2003).



Obr. 11: Histologické zmeny: normálne bunky dlaždicového epitelu pre porovnanie; CIN1 s dysplastickými bunkami v strednom epiteli; CIN2 s progresívnou atypiou buniek v dolných dvoch tretinách epitelu; CIN3 (karcinóm *in situ*) dysplastické bunky distribuované vo všetkých vrstvách epitelu, strata polarity buniek; farbenie hematoxylinom-eosinom (H-E) (zdroj: <http://www.medicinesia.com/wp-content/uploads/2011/12/cin.jpg>, stiahnuté 17.6.2016, upravené).



Obr. 12: Adenokarcinóm *in situ* (zväčšenie 10×), normálny epitel je nahradený abnormálnym, viditeľná strata polarity, zvýšená veľkosť jadier na úkor cytoplazmy, farbenie H-E (IARC. Sellors, Sankaranarazanan, 2003).

3.5 Cervikálny screening a možnosti liečby

Zo všetkých malígnych nádorov je práve cervikálny karcinóm najúčinnnejšie kontrolovaný pomocou screening-u, kde sa cytologické abnormality detekujú pomocou mikroskopického vyšetrenia Pap test (*Papanicolaou, Pap smears*). Následne sú ženy, u ktorých boli preukázané značné cytologické abnormality podrobené liečbe zabraňujúcej rozvoju CCa (Miller, 1992).

3.5.1 Screening

Screening je najúčinnnejší spôsob na prevenciu CCa, pri ročnom screening-ovom intervale sa dá predísť 93 % skvamóznym CCa vo vekovej kategórii 20–64 rokov. V prípade 3-ročného intervalu 91 % a v päťročnom intervale 84 % (Tab. 2) (Sadovský, 2014). Výskyt rakoviny môže znížiť až o 80 %, jeho zanedbanie môže paradoxne viesť k zvýšeniu prípadov rakoviny a úmrtiam (IARC, 2005).

Tab. 2: Vekový rozsah a screening-ový interval v štátoch Európy.

Štáty	Cieľová skupina (vek)	Screening-ový interval (roky)
Belgicko	25 - 64	3
Dánsko	23 - 59	3
Fínsko	30 - 60	5
Írsko	25 - 60	5
Holandsko	30 – 60	5
Švédsko	20 - 59	3
Veľká Británia	20 - 65	3-5
Nemecko	od 20	1
Česká republika (do 2008)	25 - 70	1
Slovenská republika (od 2008)	23 – 64	1, 1, 3*

*Prvé dve cytologické vyšetrenia sú v ročnom intervale, nasledujúce v trojročnom (Sadovský, 2014).

Cervikálny screening je zameraný na ženy, ktoré nemajú žiadne klinické príznaky a veľakrát sa cítia úplne zdravé. Jeho cieľom je odhalenie prekarcerózných a nádorových lézií už v rannom štádiu a tým zvýšiť úspešnosť liečby (WHO, 2016). Hlavným problémom je nízka účasť žien na screening-ových programoch, v Českej republike sa screening-u zúčastňuje iba 55 % žien vo veku 25-69 rokov. Približne polovica CCa je diagnostikovaná práve ženám, ktoré nechodia na pravidelné screening-ové vyšetrenia (Ondryášová *et al.*, 2015). Tieto údaje naznačujú nedostatočnú informovanosť verejnosti o dôležitosti pravidelných screening-ových prehliadok (Harlan *et al.*, 1991).

3.5.2 Detekcia HPV DNA

Prítomnosť hrHPV infekcie môže byť detekovaná prostredníctvom HPV testov, ktoré sa využívajú u žien s pozitívnym cytologickým nálezom na ASC-US (atypické dlaždicové bunky nejasného významu) (Levi *et al.*, 2003). HPV testy sú založené na detekcii HPV DNA alebo mRNA. HPV DNA detekujúce testy majú vysokú senzitivitu (až 100 %) a špecifitu (až 96 %). Problémom je zvýšená falošná pozitivita u zdravých žien do 30 rokov a neschopnosť detekcie HPV DNA rozlíšiť prechodnú hrHPV a infekciu asociovanú s CIN3, CIS. Vyriešiť by to mali nové testy CINtec[®] Plus (Roche) alebo PreCursor M-kit (Diassay) (Ondryášová *et al.*, 2015).

Ďalším spôsobom ako sa dajú odhaliť prekarcerózne lézie a CCa, je hodnotenie virálnej nálože a formy HPV, na ktoré je zameraná táto bakalárska práca.

3.5.3 Možnosti liečby

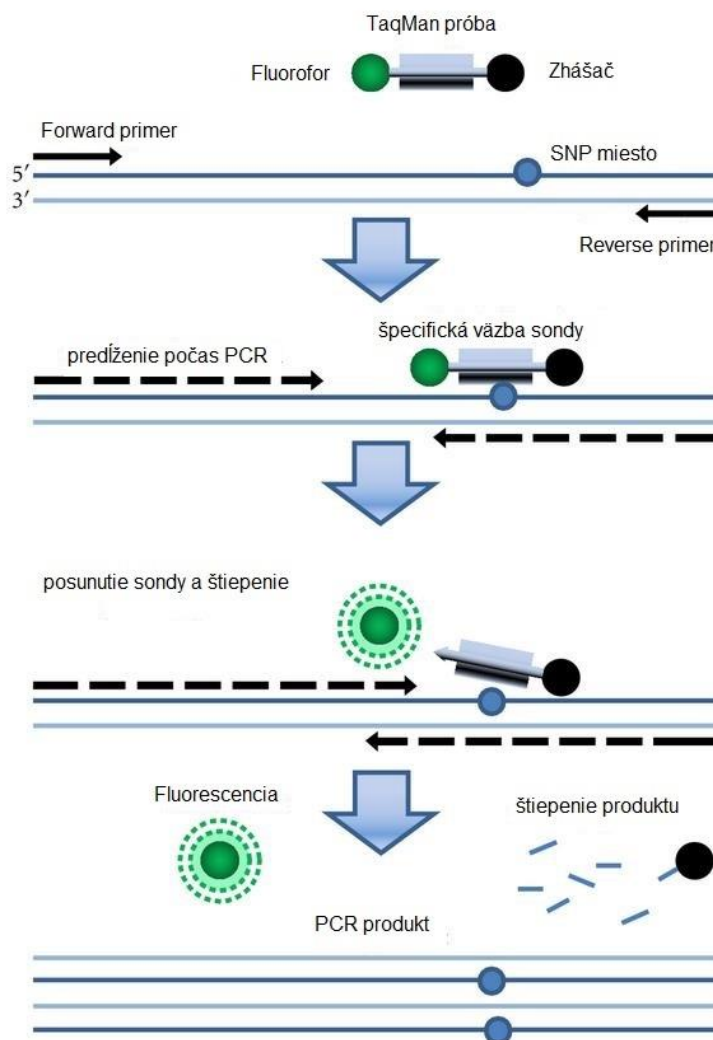
Pre úspešnú liečbu je v prvom rade potrebná včasná detekcia, ktorá určí štádium cervikálnej intraepiteliárnej neoplázie. Podľa typu CIN sa určí najlepší spôsob liečby: kryoterapia, laserová či chirurgická excízia, napriek odstráneniu dochádza v 20-30 % k ich opakovanému infikovaniu v mieste ošetrenia (Ondryášová *et al.*, 2015).

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

HPV DNA detekčné metódy sú veľmi senzitívne i špecifické, ich nevýhodou však zostáva neschopnosť rozlíšiť tranzitnú HPV infekciu od HPV infekcie spojenej so vznikom prednádorových či nádorových zmien v oblasti krčka maternice (Ondryášová *et al.*, 2015). Jednou z možností ako identifikovať ženy so zvýšeným rizikom vzniku prekancerózných lézií a CCa, je hodnotenie vírusového markeru virálnej nálože (*viral load*) a formy HPV, na ktoré je zameraná táto bakalárska práca. Jeden z cieľov experimentálnej časti spočíval v určení formy HPV infekcie vrátane kvantifikácie virálnej nálože HPV16 a HPV18 v cervikálnych steroch pomocou multiplex real-time PCR (polymerázová reťazová reakcia s detekciou v reálnom čase).

V experimentálnej časti bola využitá multiplex real-time PCR na identifikáciu formy vírusu a VL HPV16 a HPV18 pozitívnych vzoriek. Multiplex real-PCR je založená na súčasnej amplifikácii a detekcii *E2* a *E6* génov HPV a *GAPDH* za použitia špecifických TaqMan[®] sond (prób) v jednej PCR reakcii (Obr. 13; príloha 1-5) (Cañadas *et al.*, 2010). Detekcia *GAPDH* génu slúžila ku kvantifikácií množstva ľudskej DNA vo vzorke a ako vnútorná kontrola amplifikácie. Súčasťou experimentu bolo taktiež overenie ekvivalencie kvantifikácie DNA pomocou fluorometra Qubit (súčasťou Qubit dsDNA BR assay kit) a real-time PCR (gén pre *GAPDH*). PCR musí byť optimalizovaná tak, aby všetky páry primerov boli schopné pracovať pri rovnakej teplote annealingu. PCR reakcia sa zkladá z 3 fáz: denaturácia- reakčná zmes sa zahreje na teplotu 92 °C, dochádza k porušeniu vodíkových mostíkov medzi vláknami DNA. Ďalšou fázou (annealing) primery v nadmernom množstve nasadajú na sekvenciu na základe komplementarity pri 50-60 °C. V poslednej fáze (elongácia) sa znova zvýši teplota na 74 °C, kde enzým *Taq* DNA polymeráza nasyntetizuje nové vlákna DNA v smere od 5' ku 3' koncu. Cykly sa opakujú obvykle 25-30krát. Procesom vznikne viac než 50 miliónov nových dvojvláknových molekúl. Nežiadúcim javom je možná prítomnosť kontaminácie, najčastejšie z predchádzajúceho produktu alebo v sérii navzájom (Bauerová *et al.*, 2004; Brown, 2006). V tejto práci bola využitá dokonalejšia forma PCR, ktorou je real-time PCR. Táto kvantitatívna metóda je založená na podobnom princípe ako tradičná PCR, ale umožňuje detekovať amplifikáciu výsledného produktu v priebehu PCR (Heid *et al.*, 1996). Zdvojnásobenie množstva produktu je merané na základe zmien fluorescencie, vyvolané laserom a následne zaznamenané fotosenzitívnym čidlom. Amplifikáciou dilučnej rady

štandardu so vzorkou, vytvorením kalibračnej krivky sa umožňuje kvantifikácia množstva cieľovej sekvencie. Na vizualizáciu sa používa nešpecifické fluorescenčné značenie napr. SYBR green alebo špecifické fluorescenčné značenie pomocou hydrolyzačnej sondy napr. TaqMan[®] próba, ktorá počas priebehu reakcie emituje signál priamo úmerný narastajúcemu množstvu molekuly DNA pri postupnom zvyšovaní fluorescenčného signálu (Obr. 13). Výhodou tejto metódy je presnosť a reprodukovateľná kvantifikácia kópií génov, vysoká citlivosť detekcie, značné ušetrenie času, reagensí a predovšetkým množstva DNA potrebného k vyšetreniu (Heid *et al.*, 1996; HiMediaLaboratories; Srovnal, 2012; LabGuide, 2014).

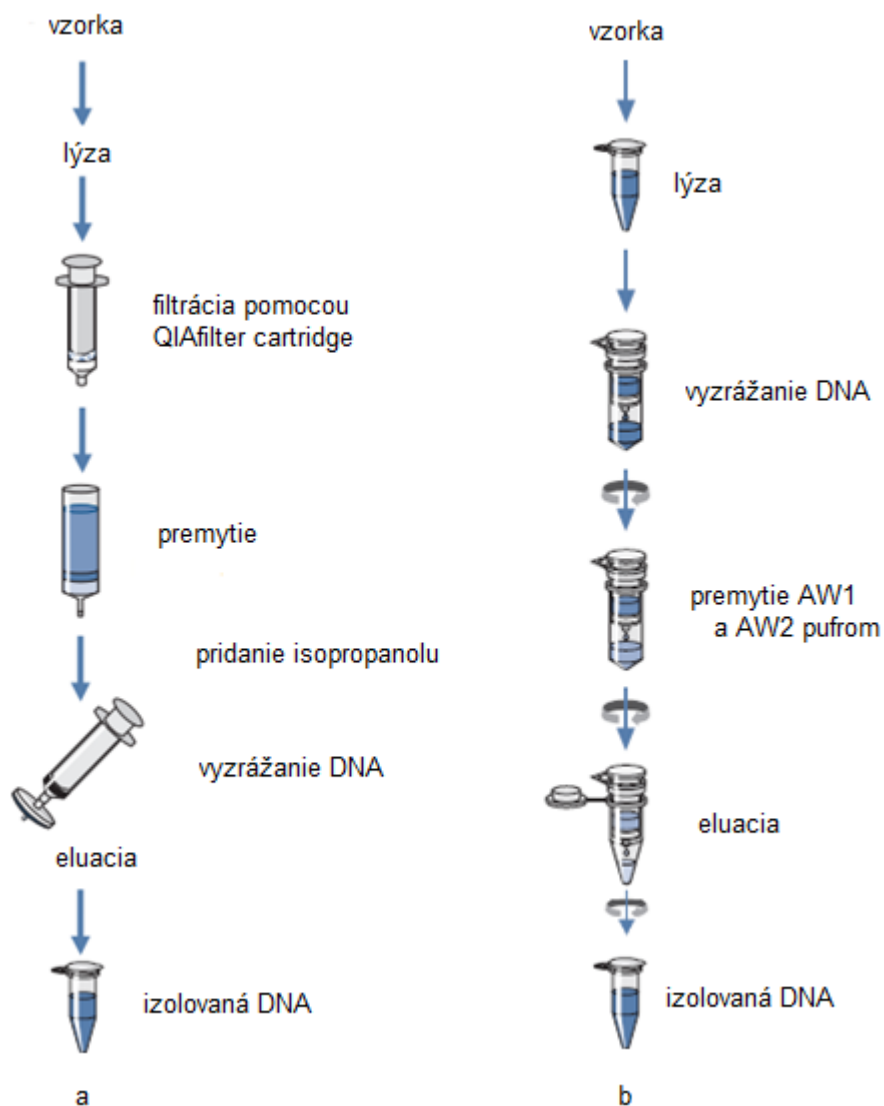


Obr. 13: Real-Time PCR genotypizácia SNP. Próba sa naviaže na sekvenciu DNA, zhášač je značený fluorescenčným farbivom. Taq DNA polymerasa špecificky spôsobuje odštiepenie fluoroforu a emisiu fluorescencie (zdroj: <http://www.hindawi.com/journals/mrt/2010/190434/fig1/>, stiahnuté 16.6.2016, upravené; LabGuide, 2014).

K analýze boli vybraté vzorky, v ktorých bola pomocou CE-IVD HPV DNA detekčných metód cobas[®] 4800 HPV Test a PapilloCheck[®] HPV-Screening detekovaná prítomnosť HPV16 alebo HPV18. Pre prevedenie kvantifikácie VL bola najprv potrebná príprava kalibračnej rady plazmidov s génmi HPV16 a HPV18, ktorá zahrňovala transfekciu kompetentnej baktérie *Escherichia coli*, overenie úspešnosti transfekcie skôr spomínanou real-time PCR detekujúcou *E2* a *E6* gény HPV16 alebo HPV18 a namnoženie baktérie nesúce plasmid.

Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli* prebiehala pomocou The HiSpeed[®] Plasmid Midi Kit (QIAGEN[®]) (Obr. 14). Pri izolácii plazmidovej DNA sa využíva toho, že pri lýze buniek a následným zrážaním proteínov je chromozomálna DNA zachytená spolu so zrazenými proteínmi, malé kruhové molekuly plazmidovej DNA zostávajú v rozpustnej frakcii a následne sa oddelia (Goldman a Green, 2008). Kit zabezpečuje oddelenie plazmidov alebo kozmidov do veľkosti 50 kb. Princíp izolácie spočíva v modifikovanej alkalickej lýze buniek nasledované naviazaním plazmidovej DNA na QIAQEN anex v prostredí s nízkym obsahom solí a nízkeho pH. Plazmidová DNA sa vymýva až roztokom s vysokým obsahom solí, následne dochádza k zahusteniu DNA, odsoleniu a vyzrážaniu pomocou isopropanolu. Po premytí je DNA zachytená na QIAprecipitator, ktorý zabezpečí dôkladné vysušenie stlačeným vzduchom skrz injekčnú striekačku, DNA je zachytávaná v mikroskúmavke s TE (Tris) pufrom alebo vodou. Tento kit je výhodný pre rýchlu izoláciu ultračistej DNA s plazmidmi s vysokým výťažkom, je vhodný na použitie i v náročnejších procesoch ako je transfekcia (QIAGEN[®], príbalový leták k The HiSpeed[®] Plasmid Midi Kit).

Genómová DNA bola z cervikálnych sterov izolovaná pomocou QIAamp[®] DNA Micro Kit-u od spoločnosti QIAGEN[®] (Obr. 14). Princíp kit-u spočíva v špecifickej väzbe DNA na membránu koloniek QIAamp MinElute, na báze oxidu kremičitého s elučným objemom v rozmedzí 20-100 μ l. DNA sa naväzuje na silikagél, zatiaľ čo nečistoty (RNA, proteíny a farbivá) prestúpia cez membránu a sú odstredivou silou centrifugy odstránené. Výsledný výťažok DNA závisí na objeme, veľkosti a kvalite pôvodnej vzorky (QIAGEN[®], príbalový leták k QIAamp[®] DNA Micro Kit).



Obr. 14: Schéma izolácie DNA: (a) pomocou The HiSpeed[®] Plasmid Midi Kit-u (zdroj: HiSpeed[®] Plasmid Purification Handbook 05/2012, stiahnuté 11. 3. 2016, upravené); (b) pomocou QIAamp[®] DNA Micro Kit-u (zdroj: QIAamp[®] DNA Micro Handbook 5/2010, stiahnuté 11. 3. 2016, upravené)

Analyzované vzorky cervikálnych sterov boli vybraté na základe positivity na HPV16 alebo HPV18 pomocou HPV DNA detekčných testov Cobas[®] 4800 HPV Test (Roche) alebo PapilloCheck[®] HPV-Screening (Greiner Bio-One). Cobas[®] 4800 HPV Test detekuje *L1* gén 14 hrHPV pomocou real-time PCR, z ktorých špecificky detekuje prítomnosť HPV16 a HPV18 (Roche, 2012). PapilloCheck[®] HPV-Screening, založený na PCR microarray systéme, je určený na detekciu a genotypizáciu 24 HPV typov (18 hrHPV a 6 lrHPV typov). Test využíva enzým Uracil-N-Glycosylasa (UNG) ako ochranu pred kontamináciou (Greiner Bio-One, 2011; Crosbie *et al.*, 2015).

4.1 Materiál, pomôcky a prístrojové vybavenie

4.1.1 Použité chemikálie

96% ethanol (Fargon, Česká republika); 70% ethanol (Fargon, Česká republika); PBS pufer; Ambion® DEPC-treated voda (Thermo Fisher Scientific, USA); Tris; LB médium (Amresco, USA); agarosa (Sigma-Aldrich, USA); ampicilin (AMP) (Thermo Fisher Scientific, USA); ľad; glycerol (Sigma-Aldrich, USA); isopropanol (PENTA, Česká republika); dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA); The HiSpeed® Plasmid Midi Kit (QIAGEN®, Nemecko), súčasť kitu: striekačky, cartridge, čiapočky na cartridge, precipitator, pufer: P1, P2, P3, QC, QF; QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN®, Nemecko), súčasť kitu: AW1, AW2, AL pufer; proteinasa K; Thermo-Start PCR pufer 10× (Thermo Fisher Scientific, USA); MgCl₂ (25 mM, Thermo Fisher Scientific, USA); Thermo-Start Taq DNA polymerasa (250 U, 50 U/µl, Thermo Fisher Scientific, USA); dNTP (100 mM, Promega, USA)

Primery a próby boli navrhnuté pomocou softwaru PrimerQuest Tool (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) a vyrobené firmou Geneti Biotech (Česká republika). Z dôvodu plánovaného patentovania tohto testu nie je možné sekvencie primerov a prób uviesť. Próby pre *E2* gén boli značené FAM- BHQ1, próby pre *E6* HEX-BHQ2 a próba pre *GAPDH* Cy5- BHQ2.

4.1.2 Použitý biologický materiál

baktérie: *Escherichia coli* (MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Thermo Fisher Scientific, USA)

bunečné línie: CEM (Thermo Fisher Scientific, USA)

plazmidy: HPV16 (ATCC® 45113™, UK), HPV18 (ATCC® 45152™, UK)

4.1.3 Použité pomôcky a prístrojové vybavenie

špičky s filtrom; pipety (Eppendorf®, Nemecko); eppendorfky (1,5 ml); kolony QIAamp® MinElute Column (QIAGEN®, Nemecko); stojany; chladené stojany; mikroskúmavky; stojan na PCR mikroskúmavky; PCR skúmavky; laboratórne váhy; lyžička; odmerný valec; sterilná sklenená nádoba; Petriho misky; nádoba s ľadom; sklenená hokejka; kahan; zápalky; parafilm (Bemis company, USA); Erlenmeyerova banka; bakteriologická klička; sklenená hokejka; pipetovací nástavec Pipetus (Hirschmann, Nemecko); falkony (50 ml); minicentrifuga (Biosan, Lotyšsko); termoblok (ThermoStat plus, Eppendorf®, Nemecko); Qubit®

Fluorometer 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA); centrifuga (5430 Eppendorf[®], Nemecko; Rotina 420 R, Hettich, Nemecko); flowbox (Herasafe KS, Thermo Scientific, USA a Mars Safety Classe 2, ScanLaf, Škandinávia); mikrovlnná rúra; inkubátor (memmert, Nemecko); termocycler (LighCycler 480 II, Roche, Švajčiarsko); trepačka (Edison, USA)

4.2 Zloženie roztokov

10× PBS pufer 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 8 mM KH₂PO₄, (pH 7,3)

AW1 pufer 25 ml 96% ethanol + 19 ml AW1 pufer

AW2 pufer 30 ml 96% ethanol + 13 ml AW2 pufer

LB médium 25 g LB, 1 l sterilná voda

Tris 40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 2 mM EDTA, (pH 8)

4.3 Vzorky patientských cervikálnych sterov

Pre analýzu bolo vybratých 28 patientských vzoriek cervikálnych sterov odobratých pri pravidelnej gynekologickej prehliadke. Pre analýzu boli vybrané vzorky, u ktorých bola pomocou HPV DNA testu cobas[®] 4800 HPV Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemecko) alebo PapilloCheck[®] HPV-Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemecko) detekovaná infekcia HPV16/HPV18.

4.4 Použité metódy a pracovné postupy

4.4.1 Príprava *Escherichia coli* s plazmidom

Väčšina baktérií je schopná prijať DNA z média, na ktorom rastú. Pre klonovanie cudzorodej rekombinantnej plazmidovej DNA sa najčastejšie používa kmeň gramnegatívnych baktérií *Escherichia coli*, ktorá bola metódami génového inžinierstva upravená tak, aby umožnila prijímať externú DNA a jej následnú replikáciu. Schopnosť kompetencie (prijímanie DNA z vonku) sa zakladá v namnožení buniek *E. coli* v tekutom živnom médiu do exponenciálnej fázy rastu (Brown, 2006).

Všetky práce s geneticky modifikovanými organizmami (GMO) prebiehali výlučne v priestoroch určených pre prácu s GMO po preškolení o bezpečnosti práce s GMO. Pre minimalizáciu kontaminácií v priebehu experimentov bolo pri všetkých experimentoch dodržiavané členenie pracovného postupu na izoláciu DNA, pre-PCR a PCR. Každá časť pracovného postupu bola prevedená

v laboratóriách popr. laminárnych boxoch určených výhradne pre danú časť postupu.

Pre experiment bola pripravená živná pôda pre baktérie rozpustením 1,5 g agarosy v 100 ml LB média, zahriatím v mikrovlnnej rúre (30 s). Po ochladení (10 minút pri laboratórnej teplote a premiešaní) bolo pridaných 50 µl AMP o koncentrácii (100 mg/ml), premiešalo, obsah nádoby bol rovnomerne rozdelený do štyroch Petriho misiek, nechal sa stuhnúť. Z mrazničky (-80 °C) boli vybraté 2 eppendorfky s *E. coli* a z mrazničky (-20 °C) plazmid pre HPV16 a HPV18, ktoré boli ponechané v nádobe s ľadom. Vo flowboxe bol z plazmidu odpipetovaný 1 µl (1 µl~1 ng/µl) do eppendorfky s rozmrznutou baktériou, nechalo 20 minút inkubovať na ľade. Následne boli prenesené do termobloku na 40 sekúnd pri 42 °C, potom na ľad po dobu 2 minút. Do eppendorfiiek s *E. coli* a plazmidom bolo pridaných 200 µl LB média, inkubovalo 1 hodinu pri 37 °C. Na 2 Petriho misky bolo napipetovaných 200 µl média s *E. coli* a plazmidom pre HPV16, do ďalších dvoch pre HPV18. Vyžíhanou sklenenou hokejkou bolo médium rovnomerne rozotreté po celom povrchu agaru. Petriho misky boli následne zalepené parafilmom a inkubovali pri 37 °C.

4.4.2 Overenie úspešnosti transformácie *E. coli*

Prijatie plazmidu je možné detekovať sledovaním expresie génov, ktoré nesú plazmid, v prípade *E. coli* môžeme pozorovať na médiu s obsahom AMP, za normálnych okolností sú bunky baktérie citlivé na zmienené antibiotikum a tetracyklin inhibuje rast buniek. Jeden z prvých klonovacích vektorov plazmid pBR322 obsiahnutý v bunke je rezistentný. Pomocou génu kódujúceho enzým β-laktamasu, ktorá umožňuje zmeniť formu AMP na netoxickú pre baktérie *E. coli*. Obsahuje ďalšie dva gény, ktoré spôsobia detoxifikáciu tetracyklinu. Po transformácii plazmidom pBR322 sa na selektívnom médiu vytvoria len tie bunky, ktoré plazmid obsahujú (Brown, 2006).

Z dôvodu veľmi častého používania plazmidov s génmi pre rezistenciu voči AMP bola overená úspešnosť transfekcie bakterií taktiež pomocou real-time PCR detekcie génov *E2* a *E6* HPV16 a HPV18. Primer mixy na PCR reakciu boli pripravené nasledovne z DEPC vody a zásobných roztokov primerov a prôb o koncentrácií 100 µM.

Primer mix pre HPV16: 375 µl DEPC vody, 5 µl každého (forward a reverse primery pre gény *E2* a *E6*) roztoku primeru, 2,5 µl roztoku próby pre *E2* a pre *E6*.

Výsledný primer mix bol premiešaný na vortexe. Zvyšný primer mix bol riadne popísaný a uskladnený pri -20 °C pre ďalšie použitie.

Primer mix pre HPV18: 372,5 µl DEPC vody, 5 µl každého (forward a reverse primery pre gény *E2* a *E6*) roztoku primeru, 2,5 µl roztoku próby pre *E2* a 5 µl roztoku próby pre *E6*. Výsledný primer mix bol premiešaný na vortexe. Zvyšný primer mix bol riadne popísaný a uskladnený pri -20 °C pre ďalšie použitie. Koncentrácia primerov v PCR reakcii bola 0,2 µM, koncentrácia prób bola 0,1 µM, okrem próby pre detekciu HPV18 *E6*, ktorá mala koncentráciu 0,2 µM. Reakčná zmes bola pripravená podľa tabuľky 3.

Tab. 3: Schéma použitá na prípravu PCR mixu na 1 reakciu.

PCR mix	µl
Thermo-Start PCR pufer	2,5
MgCl ₂	3
Primer Mix	4
Thermo-Start <i>Taq</i> polymerasa	0,2
dNTP	0,5
DEPC H ₂ O	14,8
Celkový objem	25

Zmiešané reagentie pre real-time PCR boli rozpipetované do stripu po 25 µl PCR mixu pre daný typ HPV. Do prvej jamky bola napipetovaná pozitívna kontrola (PC, plazmid použitý k transfekcii), druhá jamka slúžila ako negatívna kontrola (NC, iba PCR mix). Na Petriho miskách bolo následne vyznačených 5 samostatných kolónií. Z každej kolónie bola pomocou špičky od pipety prenesená vzorka do 1 jamky stripu. Stripy boli stočené a presunuté do termocyclera, následne bol spustený real-time PCR program (Tab. 4).

Tab. 4: Program pre PCR reakciu.

PCR program		
Predenaturácia	95 °C	15 min
Denaturácia	95 °C	15 s
Annealing a elongácia	60 °C	60 s
Chladienie	4 °C	∞

Po overení úspešnosti transfekcie *E. coli* plazmidmi pre HPV16 a 18 boli pre ďalší experiment vybraté 2 kolónie pre každý HPV typ. Z kolónie vyrastenej na živnom agare s AMP bola odobratá vzorka vysterilizovanou bakteriologickou kličkou a inokulovaná do 150 ml LB média v Erlenmeyerových bankách, následne do 700 µl LB média v eppendorfke. Bakteriálna kultúra bola ponechaná rásť na trepačke cez noc pri 37 °C. Nasledujúci deň bola z kultúry v Erlenmeyerových bankách izolovaná plazmidová DNA pomocou The HiSpeed® Plasmid Midi Kit-u, bakteriálna kultúra v eppendorkách bola prevrstvená 300 µl glycerolu a zmrazená na -80 °C.

4.4.3 Izolácia plazmidovej DNA

Plazmidová DNA bola izolovaná pomocou The HiSpeed® Plasmid Midi Kit od spoločnosti QIAGEN® (Obr. 14). Izolácia prebiehala v laboratóriu určenému na prácu s geneticky modifikovanými organizmami (GMO) vo flowboxe (Herasafe KS, Thermo Scientific, USA).

Narastená bakteriálna kultúra bola rozdelená do 3 falkón po 50 ml, centrifugovaná pri 6 000 g (Rotina 420 R, Hettich, Nemecko) 15 minút pri 4 °C. Po centrifugácii bol odstránený supernatant a pelet bol rozsuspendovaný v 2 ml pufru P1 s činidlom *LyseBlue* v pomere 1:10 000 (10 µl *LyseBlue*: 10 ml P1), ktorý zabezpečil lýzu, obsah falkón bol spojený do jednej, výsledný objem pre jeden typ HPV bol 6 ml, následne bolo pridaných 6 ml pufru P2, 6× premiešaný, inkubovaný 5 minút pri laboratórnej teplote, potom bolo pridaných 6 ml pufru P3, 6× premiešaný, ponechaný inkubovať 10 minút.

Na spodok cartridge bola umiestnená čiapočka, obsah nádoby bol prefiltrovaný. Zvyšný objem bol pretlačený pomocou striekačky, supernatant bol odstránený. Sediment bol premytý 20 ml QC pufru, následne bolo pridaných 5 ml QF pufru. Vzorka bola vyzrážaná 3,5 ml isopropanolom, premiešaná, objem bol rovnomerne rozdelený do 5 eppendorfiiek, centrifugované 30 minút pri 4 °C, 15 000 g. Supernatant bol odstránený, pelet premytý 0,5 ml 70% ethanolom, centrifugovaný 10 minút pri 4 °C, 15 000 g. Supernatant bol odpipetovaný, vzniknutý pelet (plazmidová DNA) bol vysušený pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút, následne rozpustený v 200 µl DEPC vody.

Koncentrácia DNA bola stanovená fluorometricky na Qubit-e, po jeho kalibrácií. Meranie koncentrácie bolo prevedené podľa návodu k použitiu prístroja prostredníctvom dsDNA BR Assay Kit-u nasledovne: všetky vzorky boli

premiešané na vortexe a stočené, do eppendorfiiek bolo napipetovaných po 199 μ l Qubit pufru a 1 μ l fluorescenčnej farbičky, premiešané na vortexe, bol odobratý 1 μ l a pridaný 1 μ l DNA, 3 s premiešaný na vortexe a 2 minúty ponechaný pri laboratórnej teplote. Na takto pripravených vzorkách bola pomocou Qubit-u zmeraná koncentrácia (ng/ μ l). Pre HPV16 sa nám podarilo izolovať plazmidovú DNA o koncentrácii 56 ng/ μ l a 74 ng/ μ l. Pre HPV18 sa nám podarilo izolovať plazmidovú DNA o koncentrácii 41 ng/ μ l a 2 ng/ μ l.

4.4.4 Izolácia DNA z cervikálnych sterov

DNA bola izolovaná z 28 vzoriek cervikálnych sterov archivovaných pri -80 °C. Archivácia vzoriek spočívala v odstránení stabilizačného média cobas[®] PCR Cell Collection Media (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemecko), premytia a následného zmrazenia nasucho pri teplote -80 °C. Pre izoláciu DNA bol použitý kit QIAamp[®] DNA Micro Kit (Obr. 14).

Zo vzoriek v stabilizačnom médiu bol pre izoláciu odobratý 1 ml vzorky cervikálneho steru, ktorý bol následne centrifugovaný 5 min pri 11 000 g, supernatant bol odpipetovaný, bolo pridaných 500 μ l 1 % PBS, centrifugovaný 5 minút pri 11 000 g. Supernatant bol odstránený tak, aby v eppendorfke zostalo 100 μ l vzorky v 1% PBS.

Vzorky archivované pri -80 °C, sa nechali rozmraziť pri laboratórnej teplote. Pelet s tkanivom bol rozsuspendovaný v 1 000 μ l 1% PBS pufru, premiešaný na vortexe. Do novej eppendorfky bolo napipetovaných 50 μ l vzorky a následne bola doriedená PBS na 100 μ l.

Následne sa pokračovalo pre všetky vzorky rovnako. Bolo napipetovaných 10 μ l proteínasy K, ktorá štiepi bielkoviny vrátane histónov viažúcich sa na DNA. Následne pridaných 100 μ l AL (lyzačný) pufru, ktorý zabezpečí lýzu buniek, 15 sekúnd miešalo na vortexe a inkubovalo 10 minút pri 56 °C na termobloku. Kvapky na viečku boli odstránené pulznou centrifugáciou. DNA bola vyvrážaná pridaním 50 μ l 96% ethanolu, nasledovalo premiešanie na vortexe po dobu 15 sekúnd a inkubácia 3 minúty pri laboratórnej teplote. Vzorka bola nanesená na kolonku QIAamp[®] MinElute, DNA sa pri centrifugácii (1 minútu pri 8 000 rpm) naviazala na membránu koloniek. Nasledovalo premytie 500 μ l AW1 pufrom s centrifugáciou (1 minútu pri 8 000 rpm), premytie 500 μ l AW2 pufrom s centrifugáciou (1 minútu pri 8 000 rpm) a vysušenie kolonky (centrifugácia 3 minúty pri 14 000 rpm). Posledným krokom bola eluácia DNA do 40 μ l DEPC

vodou po 5 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote, kedy došlo k uvoľneniu DNA z povrchu membrány do DEPC vody (centrifugácia 1 minútu pri 14 000 rpm) v skúmavke.

Koncentrácia získanej DNA (ng/μl) bola zmeraná pomocou prístroja Qubit podľa postupu uvedeného v predchádzajúcej kapitole.

4.4.5 Príprava kalibračných rad pre real-time PCR

Na prístroji Qubit bola zmeraná koncentrácia DNA izolovanej z bunečnej línie CEM (258 ng/μl), ktorá bola použitá na prípravu kalibračnej rady pre gén *GAPDH*. Vypočítal sa počet kópií diploidného genómu v 1 μl genomickej DNA: 6,15 pg obsahuje 1 kópiu diploidného genómu, čo znamená, že v našej vzorke DNA je $4,20 \times 10^4$ kópií diploidného genómu v 1 μl a teda $8,4 \times 10^4$ kópií génu pre *GAPDH*. Následne sme pripravili kalibračnú radu o rozpätí 80 000-8 kópie génu pre *GAPDH*/μl. Každý ďalší bod vznikol nariedením predchádzajúceho bodu kalibračnej krivky faktorom 10. Pre prípravu kalibračných rad pre gény *E2* a *E6* HPV16 a HPV18 bola použitá plazmidová DNA. Kalibračná rada pre HPV16 bola pripravená zo vzorky DNA o koncentrácií 74 ng/μl, čo odpovedá $6,31 \times 10^9$ kópií plazmidu (10 866 bp; 7 062 900 g/mol) v 1 μl a pre HPV18 zo vzorky o koncentrácií 41 ng/μl, čo zodpovedá $3,11 \times 10^9$ kópií plazmidu (12 220 bp; 7 062 900 g/mol). Z týchto vzoriek boli pripravené kalibračné rady o koncentrácií 200 000-2 kópie plazmidu (= 1 kópia *E2* génu a 1 kópia *E6* génu)/μl.

4.4.6 Real-time PCR

Všetky použité reagenty boli skladované pri -20 °C a rozmrazované oddelene od materiálu obsahujúceho DNA. Polymerasa musí byť pri manipulácii na chladenom stojane.

Príprava mixu primerov a prób pre HPV16 a HPV18 je popísaná v kapitole 4.4.2. Mix primerov a prób pre detekciu génu pre *GAPDH*. Pre gén *GAPDH* bolo pripravených 154 μl DEPC vody, 2 μl 100 μM PFW, 2 μl 100 μM PRW a 4 μl próby. Po nariedení majú primery koncentráciu 2,5 μM a próby 1,25 μM. PCR mix bol rozpipetovaný do PCR doštičky a následne bola pridaná DNA (Tab. 5).

Tab. 5: Schéma použitá na prípravu PCR mixu na 1 reakciu.

PCR mix	Finálna koncentrácia	1 R (μ l)
Thermo-Start PCR pufer (10 \times)	1 \times	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	3
dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,5
Primer Mix	0,1/0,2 μ M*	2
<i>GAPDH</i> (1,25/1,25 mM)	0,1 μ M	2
DEPC H ₂ O		10,8
Thermo-Start <i>Taq</i> polymerasa (5 U/ μ L)	1 U	0,2
DNA		2
Celkový objem		25

* finálna koncentrácia próby pre gén *E6* HPV18 bola 0.2 μ M

Pri každom vyšetrení cervikálnych sterov bola testovaná celá kalibračná rada pre HPV16 alebo HPV18 a celá kalibračná rada pre gén pre *GAPDH*, každý bod kalibračnej krivky bol testovaný v duplikáte. Každý test taktiež zahrňoval testovanie negatívnej kontroly (PCR mix bez pridania DNA) taktiež v duplikáte. Každá vzorka DNA izolovaná z cervikálneho steru bola testovaná 3 \times v rámci jednej analýzy. Následne bola doštička zalepená fóliou, presunutá do termocyclera cobas z 480, kde bol spustený real-time PCR program uvedený v Tab. 4.

Po skončení PCR reakcie bola u jednotlivých vzoriek vyhodnotená prítomnosť HPV16 a HPV18 vrátane vypočítanej virálnej nálož a určenie formy HPV infekcie. Forma HPV infekcie bola hodnotená na základe pomeru počtu kópií génov *E2/E6*, ako epizomálna forma bola hodnotená vzorka s pomerom *E2/E6* väčším ako 0,8; integrovaná forma s pomerom väčším než 0,4 a zmiešaná medzi 0,4-0,8. Virálna nálož bola vyhodnotená ako počet kópií *E6* génu/ng DNA v 1 μ l vzorky DNA izolovane z cervikálneho steru. Predpokladáme, že 1 kópia *E6* génu odpovedá 1 kópii HPV genómu. VL je uvedený ako počet kópií HPV genómu v 1 ng DNA (kópie/ng).

Pre zistenie ekvivalencie kvantifikácie DNA pomocou fluorometra Qubit a pomocou real-time PCR bolo porovnané, že koncentrácia DNA vo vzorke nameraná prístrojom Qubit (viz. 4.4.3) rastie lineárne s počtom kópií *GAPDH* génu detekovaných real-time PCR (viz. 4.4.6).

5 VÝSLEDKY

V priebehu experimentálnej časti sa podarilo transfekovať kompetentné *E. coli* plazmidom nesúcim gény HPV16 i plazmidom nesúcim gény HPV18. Po overení úspešnosti transfekcie bola z bakteriálnej kultúry izolovaná plazmidová DNA, z ktorej boli následne pripravené kalibračné rady pre kvantifikáciu kópií *E2* a *E6* génov HPV16 a HPV18. Pomocou kalibračných rad sa overilo, že použitou multiplex real-time PCR je možné kvantifikovať počet kópií detekovaných HPV génov v rozmedzí 400 000 až 4 kópie (príloha 1-5).

Zo všetkých 28 cervikálnych sterov sa podarilo izolovať DNA, ktorá bola následne analyzovaná na prítomnosť génov *E2* a *E6* HPV16 a HPV18 pomocou multiplexovej real-time PCR. Podľa pomeru počtu kópií génu *E2* a *E6* sa určila prítomnosť I/E/Z formy príslušného typu HPV (tab. 6; Obr. 15). Integrovaná a zmiešaná forma predstavuje zvýšené riziko vzniku CCa.

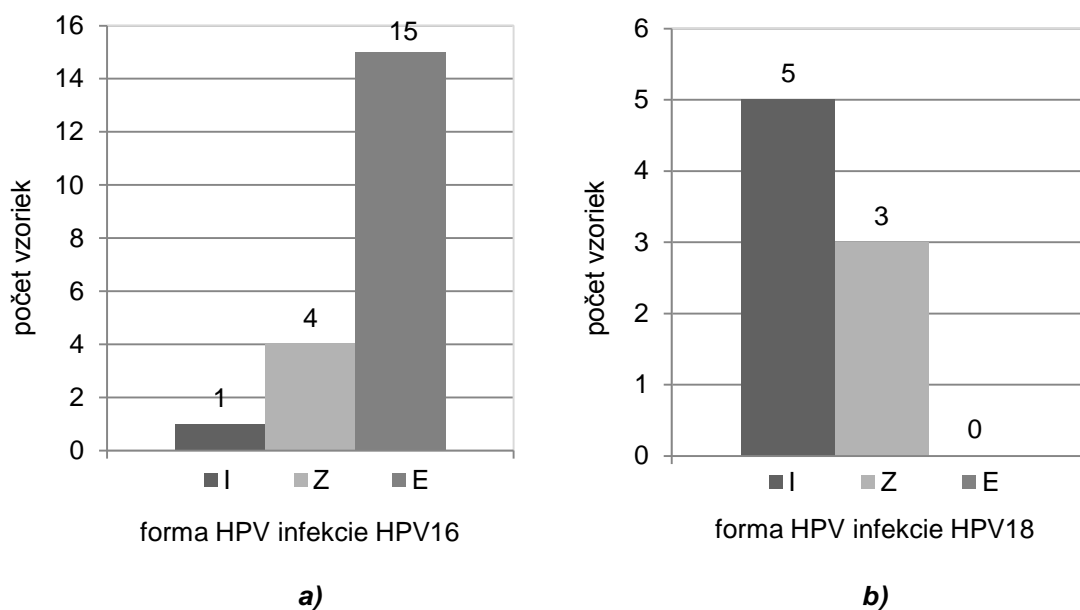
Všetkých 20 vzoriek, u ktorých bola pomocou HPV DNA testu cobas[®] 4800 HPV Test alebo PapilloCheck[®] HPV-Screening detekovaná infekcia HPV16 bola potvrdená prítomnosť HPV16. Analýza potvrdila prítomnosť infekcie HPV16, detekované cobas[®] 4800 HPV Test-om vo všetkých testovaných vzorkách. Osem z nich však bolo PapilloCheck[®] HPV-Screening testom vyhodnotené ako HPV16 negatívne. Integrovaná forma HPV16 bola detekovaná v 5 % vyšetovaných vzorkách, zmiešaná forma v 20 % prípadov a epizomálna forma 75 % (tab. 6). Klinická informácia o výsledkoch cytologického alebo histologického vyšetrenia prevedeného v krátkom časovom rozmedzí bola dostupná len u 60 % (12/20) vzoriek vyšetrených na prítomnosť HPV16. Z týchto 12 vzoriek bola v 3 prípadoch detekovaná zmiešaná forma HPV infekcie, z ktorých u 1 vzorky bola diagnostikovaná L-SIL a u ďalších 2 neboli nájdené žiadne neoplastické intraepiteliárne zmeny. V siedmých z 9 vzoriek s epizomálnou formou infekcie neboli nájdené žiadne neoplastické intraepiteliárne zmeny, v 1 prípade bola diagnostikovaná L-SIL a v ďalšom CIN1 (príloha 6).

Všetkých 8 vzoriek, u ktorých bola pomocou HPV DNA testu cobas[®] 4800 HPV Test alebo PapilloCheck[®] HPV-Screening detekovaná infekcia HPV18 bola potvrdená prítomnosť HPV18. Analýza potvrdila prítomnosť infekcie HPV18, detekované cobas[®] 4800 HPV Test-om všetkých testovaných vzoriek. Šesť z nich však bolo PapilloCheck[®] HPV-Screening testom vyhodnotené ako HPV18 negatívne. Integrovaná forma HPV18 bola detekovaná v 62,5 % vyšetovaných vzoriek, zmiešaná forma v 37,5 % prípadov a epizomálna forma nebola detekovaná

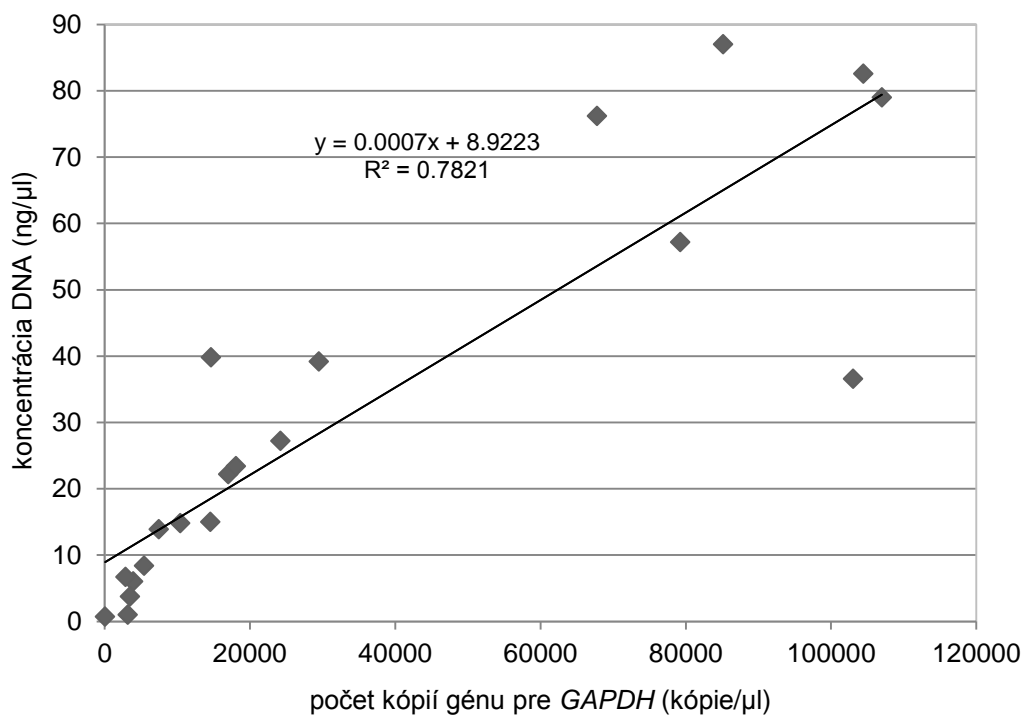
(tab. 6). Klinická informácia o výsledkoch cytologického alebo histologického vyšetrenia prevedeného v krátkom časovom rozmedzí bola dostupná u 87,5 % (7/8) vzoriek vyšetrených na prítomnosť HPV18. Z týchto 7 vzoriek bola v 4 prípadoch detekovaná integrovaná forma, z toho u 2 prípadov bol diagnostikovaný L-SIL, u 1 ASC-H a u 1 nebola nájdená žiadna neoplastická zmena. V 3 prípadoch bola detekovaná zmiešaná forma HPV infekcie, z ktorých u 2 vzoriek bola diagnostikovaná L-SIL a u ďalšej 1 neboli nájdené žiadne neoplastické intraepiteliárne zmeny (príloha 7).

Tab. 6: Detekcia 28 vzoriek na určenie integrovanej (I), zmiešanej formy (Z) a epizomálnej (E).

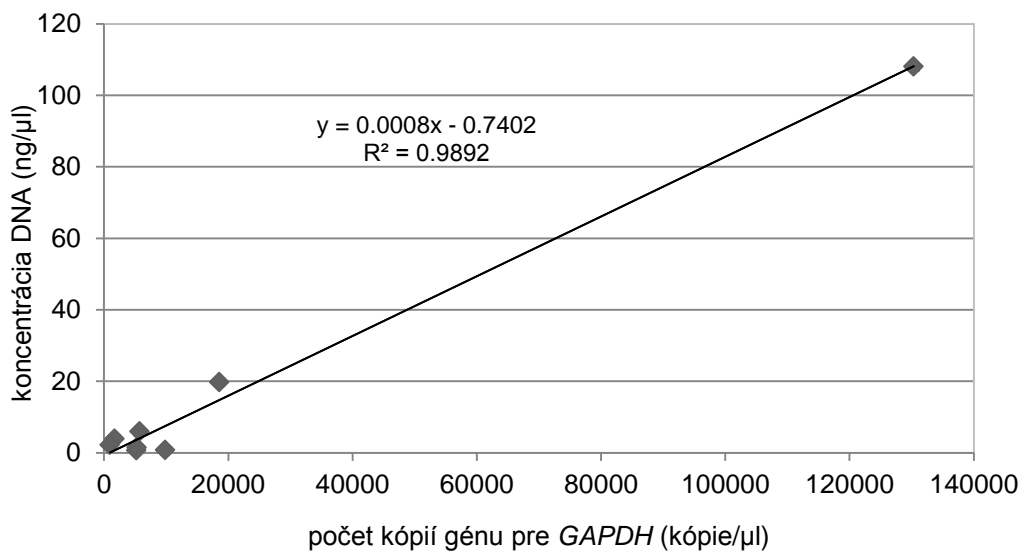
typ HPV	I	Z	E
HPV16	1	4	15
HPV18	5	3	-



Obr. 15: a) Detekované formy infekcie HPV16; b) Detekované formy infekcie HPV18.



Obr. 16: Zhodnotenie ekvivalencie kvantifikácie DNA izolovanej z cervikálnych sterov deložných čípkov pre HPV16 diagnostiku pomocou real-time PCR (génu pre *GAPDH*) a pomocou fluorometra Qubit za použitia Qubit dsDNA BR assay kit-u (ng/μl).



Obr. 17: Zhodnotenie ekvivalencie kvantifikácie DNA izolovanej z cervikálnych sterov deložných čípkov pre HPV18 diagnostiku pomocou real-time PCR (génu pre *GAPDH*) a pomocou fluorometra Qubit za použitia Qubit dsDNA BR assay kit-u (ng/μl).

Kvantifikácia množstva DNA v PCR reakcií pomocou fluorometra Qubit a pomocou kvantitatívnej multiplex real-time PCR pre *GAPDH* gén (Obr. 16, Obr. 17) bol približne ekvivalentný pre HPV16 ($R^2 = 0,7821$) a pre HPV18 ($R^2 = 0,9892$). Výsledky kvantifikácie DNA obidvoma metódami sú uvedené v prílohe 6 a 7.

Priemerná hodnota VL vo vzorkách s integrovanou formou HPV16 bola 5,70 HPV/ng, pre zmiešanú formu 187,56 kópií/ng a pre epizomálnu formu 64,94 kópií/ng. Najvyššiu virálnu nálož pre HPV16 dosahovala zmiešaná forma. Vzorky, ktoré boli pozitívne na cobas[®] 4800 HPV Test i PapilloCheck[®] HPV-Screening dosahovali VL = 142,04 kópií/ng, na rozdiel od vzoriek pozitívnych len na cobas[®] 4800 HPV Test a negatívnych na PapilloCheck[®] HPV-Screening mali VL = 3,20 kópií/ng (príloha 6).

Pre HPV18 bola VL detekovaná vo vzorkách s integrovanou formou 94,50 kópií/ng, so zmiešanou 40,23 kópií/ng, epizomálna forma u HPV18 nebola detekovaná. Najvyššiu VL pre HPV18 dosahovali vzorky s integrovanou formou HPV. Vzorky, ktoré boli pozitívne na cobas[®] 4800 HPV Test i PapilloCheck[®] HPV-Screening dosahovali VL = 262,19 kópií/ng, vzorky pozitívne len na cobas[®] 4800 HPV Test a negatívne na PapilloCheck[®] HPV-Screening dosahovali hodnotu VL = 11,47 kópií/ng (príloha 7).

6 DISKUSIA

V súbore 28 patientských vzoriek cervikálnych sterov, ktoré boli odobraté pri rutinej gynekologickej prehliadke bola potvrdená prítomnosť HPV16 alebo HPV18 pomocou HPV DNA testu cobas[®] 4800 HPV Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemecko) alebo PapilloCheck[®] HPV-Screening (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemecko). Obidva použité testy boli plne validované podľa tzv. Maijerova protokolu, podľa ktorého by mali byť validované všetky hrHPV detekčné metódy používané pre primárny cervikálny screening. Obidva testy detekujú CIN2+ so senzitivitou väčšou ako 90 % a špecificitou väčšou ako 98 %. A sú plne klinicky aj epidemiologicky validované (Arbyn *et al.*, 2015). Pre cobas[®] 4800 HPV Test je udávaný limit detekcie HPV16 300-600 kópií/ml cervikálneho steru a pre HPV18 600 kópií/ml cervikálneho steru (Roche, 2012). PapilloCheck[®] HPV-Screening udáva limit detekcie pre HPV16 50 kópií/reakciu a pre HPV18 300 kópií/reakciu (Greiner Bio-One, 2011). Pre porovnanie senzitivity metód by bolo vhodné určiť limit detekcie rovnakým spôsobom. Určenie senzitivity metód nebolo cieľom tejto bakalárskej práce. V našej analýze sa výsledky PapilloCheck[®] HPV-Screening pre HPV16 zhodovali len v 71,4 % a pre HPV18 v 28,5 % prípadoch. Vzorky, ktoré boli pozitívne obidvoma metódami mali vyšší VL (HPV16, 142,04 kópií/ng; HPV18 262, 19 kópií/ng) ako vzorky, v ktorých bol HPV detekovaný iba metódou cobas[®] 4800 HPV Test (HPV16 3,20 kópií/ng; HPV18 11,47 kópií/ng). Je zrejmé, že zvýšený obsah VL odráža vyššie riziko infekcie HPV (Kulmala *et al.*, 2006). U HPV testov nemusí nutne platiť, že test s vyššou analytickou senzitivitou je lepší ako test s nižšou senzitivitou. Naopak Snijders *et al.* udáva, že neustále zvyšovanie analytickej senzitivity HPV testov by mohlo viesť k zníženiu klinickej senzitivity testov (Snijders *et al.*, 2003). Otázne zostáva ako by mali byť interpretované výsledky týchto vzoriek.

Virálna nálož bola vyššia vo vzorkách so zmiešanou formou HPV16 než s integrovanou (Kulmala *et al.*, 2006), tento údaj síce analýza potvrdila (5,70 kópií/ng vs. 187,56 kópií/ng [I vs. Z]), ale s ohľadom na prítomnosť len jednej vzorky s I formou, nemôžeme tento výsledok hodnotiť ako objektívny. U HPV18 bola vyššia hodnota VL (94,50 kópií/ng) v integrovanej forme HPV než v zmiešanej forme HPV (40,23 kópií/ng). Akonáhle dosahuje VL viac ako $1,38 \times 10^6$ kópií na 300 ng celkovej DNA je možné identifikovať ženy s vysokým stupňom CIN (Cricca *et al.*, 2007). Hranica 4 600 kópií/ng nebola prekročená u žiadnej z našich vzoriek. Porovnaním hodnôt VL je možné odlíšiť prechodné infekcie (nízka

hodnota VL) od nožnej progresie infekcií, ktoré budú postupovať do štádia dlaždicovej intraepiteliárnej lézie (H-SIL) poprípade do CIS a invazívneho karcinómu, z tohto dôvodu je možná detekcia VL spôsob ako identifikovať ženy vystavené vysokou pravdepodobnosťou vzniku a progresie CIN do invazívneho karcinómu (Tábora *et al.*, 2008), aj to bol dôvod, prečo bola VL navrhnutá ako citlivý indikátor pre identifikáciu H-SIL (Kulmala *et al.*, 2006).

Integrácia hrHPV sa považuje za dôležitú udalosť v progresii ochorenia. Detekcia integrovaných foriem hrHPV predstavuje jeden z možných spôsobov ako určiť štádium CIN poprípade invazívneho karcinómu (Al-Shabanah *et al.*, 2013). Podľa pomeru *E2/E6* génu sa dá určiť prítomnosť integrovanej formy DNA, ktorá sa vyskytuje prevažne v CIN3 a CIS (Cricca *et al.*, 2007; Hudelist *et al.*, 2004). Epizomálna forma u HPV16 bola v analýze detekovaná v 75 %, integrovaná v 5 % a zmiešaná forma v 20 % prípadov. Detekcia epizomálnej formy HPV16 býva spájaná s výskytom L-SIL, nevyskytuje sa v H-SIL alebo v invazívnom karcinóme (Kulmala *et al.*, 2006). V analýze bola taktiež detekovaná epizomálna forma HPV16 iba vo vzorkách s L-SIL, CIN1 alebo vo vzorkách bez neoplastických intraepiteliárných zmien. Vzorky pozitívne na HPV18 bývajú detekované v integrovanej forme (Badaracco *et al.*, 2002; Woodman *et al.*, 2007). Analýza tento fakt potvrdila, v I forme v 62,5 % a v Z forme v 37,5 %, E forma nebola u HPV18 detekovaná (0 %). Iná štúdia detekovala HPV18 v integrovanej forme v 54,5 % (Al-Shabanah *et al.*, 2013). V našej analýze sme identifikovali prítomnosť HPV18 len L-SIL (5krát), jedenkrát CIN1 a jedenkrát ASC-H, nebolo možné porovnanie s vysokým stupňom CIN2, CIN3 poprípade prítomnosťou invazívneho karcinómu, ktorá by poskytla viac potrebných informácií o distribúcií CIN medzi I/E/Z formou HPV.

Kvantifikácia DNA prostredníctvom fluorometra či fotometra alebo kvantifikácia DNA prostredníctvom kópií house-keepingových génov ako je aj *GAPDH* sú užívané postupy, ktoré by mali byť ekvivalentné. Analýzou sa potvrdil lineárny priebeh kvantifikácie DNA izolovanej z cervikálnych sterov deložných čípkov pre HPV18 ($R^2 = 0,9892$), o niečo menej ekvivalentný priebeh bol potvrdený u HPV16 ($R^2 = 0,7821$), pomocou real-time PCR a Qubit-tu za použitia Qubit ds DNA BR assay kit-u. Napriek tomu Kulmana *et al.* uvádza, že ich trend nebol lineárny so zvyšujúcim sa počtom kópií pre HPV16 s narastajúcou abnormalitou epitelových buniek.

7 ZÁVER

Cervikálny karcinóm (karcinóm krčka maternice) je štvrtý najrozšírenejší typ onkologického ochorenia na svete u žien, spôsobený najčastejšie pohlavne prenosným hrHPV (najmä HPV16 a HPV18), ktorý dokáže spôsobovať nekontrolovateľnú proliferáciu epitelových buniek v krčku maternice (WHO, 2016; Walboomers *et al.*, 1999). V súčasnosti patrí problematika CCa, k jedným s najdiskutovanejších problémov v živote žien, ktoré sa vírusovou infekciou HPV nakazia v priebehu svojho sexuálneho života (Molijn *et al.*, 2005). Vo väčšine prípadov dochádza k regresii vírusu, ale v niektorých prípadoch dochádza k vzniku CIN, ktorý progresiou spôsobí vznik CCa (zur Hausen, 1996). Na karcinóm ročne zomiera 270 000 žien, z toho 388 v Českej republike. V súčasnosti je situácia vo svete i Európe stabilizovaná, dochádza i k poklesu incidencie a mortality, napriek prevalencii, ktorá sa neustále zvyšuje (WHO, 2016; Mužík *et al.*, 2015). Situácii napomáha celoplošná vakcinácia vo viacerých krajinách a pravidelné screening-ové prehliadky, ktoré znižujú riziko vzniku CIN a CCa (Zhou *et al.*, 1991; Baseman a Koutsky, 2005).

Opakovanou detekciou HPV16 a HPV18 u 28 cervikálnych sterov bola preukázaná 100% zhoda v detekcii s cobas® 4800 HPV Test. Výsledok PapilloCheck® HPV-Screening sa však s výsledkom cobas® 4800 HPV Test zhodoval iba v 50 %. Ako dôvod tejto nezhody bola identifikovaná nízka virálna nálož v týchto sporných vzorkách. Integrovaná a zmiešaná forma, predstavujúca zvýšené riziko vzniku prekarcerózných lézií a neskoršom štádiu vznik CCa (Al-Shabanah *et al.*, 2013), bola detekovaná v 25 % HPV16 pozitívnych vzoriek a v 100 % HPV18 pozitívnych vzoriek. Najvyššia VL bola detekovaná u zmiešanej formy HPV16 pozitívnych vzoriek a u integrovanej formy HPV18 pozitívnych vzoriek. VL by mohol slúžiť ako marker pre rozlíšenie žien s vyšším rizikom vzniku a progresie cervikálnej intraepiteliárnej neoplázie a CCa (Gravitt *et al.*, 2008). Pre potvrdenie významu virálnej nálože a formy HPV ako markeru pre rozlíšenie žien s vyšším rizikom vzniku CCa by bolo potrebné vyšetriť väčšiu skupinu HPV16 a HPV18 pozitívnych žien a to predovšetkým s pokročilými cervikálnymi léziami alebo CCa.

Zoznam použitej literatúry

Al-Shabanah, O. A.; Hafez, M. M.; Hassan, Z. K.; Sayed-Ahmed, M. M; Abozeed, W. N.; Al-Rejaie, S. S.; Alsheikh, A. A. 2013. Human papillomavirus genotyping and integration in ovarian cancer Saudi patients. *Virology*. **10**: 343.

Arbyn, M.; Anttila, A.; Jordan, J.; Ronco, G.; Schenck, U.; Segnan, N.; Wiener, H.; Herbert, A.; von Karsa, L. 2010. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition-Summary Document. *Annals of Oncology*. **21**: 448-458.

Arbyn, M.; Snijders, P. J. F.; Meijer, C.J.L.M.; Berkhof, J.; Cuschieri, K.; Kocjan, B.J.; Poljak, M. 2015. Which high-risk HPV assay fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clinical Microbiology and Infection*. **21**:817-826.

Arias-Pulido, H.; Peyton, C. L.; Joste, N. E.; Vargas, H.; Wheeler, C. M. 2006. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma *in situ* and in invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1755–1762.

Baker, T. S.; W. W. Newcomb; N. H. Olson; L. M. Cowser; C. Olson; J. C. Brown. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* **60**: 1445-1456.

Badaracco, G.; Venuti, A.; Sedati, A.; Marcante, M. L. 2002. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* **67**: 574-82.

Baseman, G.; J.; Koutsky, A. L. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology.* **32S**: S16-S24.

Bauerová, M.; Turčáni, M; Omelka, R. 2004. Polymerázová reťazová reakcia (PCR). Vysokoškolské učebné texty – multimediálne CD, FPV UKF Nitra.

Bernard, U. H.; Burk, D. R; Chen, Z.; van Doorslaer, K.; zur Hausen, H.; de Villiers, M. E. 2010. Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* **401**: 70-79.

Blitzer, C. G.; Smith, A. M.; Harris, L. S.; Kimple, J. R. 2014. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*. Vol 88. **4**: 761-70.

Brown, A. T. 2006. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction 5th edition*. Blackwell Science Ltd. 408 s. ISBN-13: 978-14051-1121-8. Preklad: **RNDr. Martin Fellner a kol.** *Klonování genů a Analýza DNA*. Olomouc: Vydavatelství UP v Olomouci. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

Broder, A. C. 1932. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *JAMA*. **99**: 1670–1674.

Burd, E. M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. **16 (1)**: 1-17.

Cada, S. 2016. HPV Vaccine – What Nebraska Women Need to Know. *Gynecology & Fertility, P.C.* (<http://www.gfertpc.com/2016/04/hpv-vaccine-what-nebraska-women-need-to-know/>, stiahnuté 5.7.2016)

Cañadas, M. P.; Darwich, L.; Sirera, G.; Cirigliano, V.; Bofill, M.; Clotet, B.; Videla, S. 2010. New molecular method for the detection of human papillomavirus type 16 integration. *Clin Microbiol Infect*. **16 (7)**: 836-842.

Castro, P. T.; Busolotti, I. 2006. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol*. **2**: 1-14.

Cricca, M.; Labate, A. M. M.; Venturoli, S.; Ambretti, S.; Gentilomi, G. A.; Gallinella, G.; Musiani, M.; Zerbini, M. 2007. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesion. *Gynecologic Oncology*. **106 (3)**: 549-557.

Crosbie, E. J.; Bailey, A.; Sargent, A.; Gilham, C.; Peto, J.; Kitchener, H. C. 2015. The PapilloCheck assay for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol*. **53 (11)**: 3553-3559.

de Villiers, E. M.; Fauquet, C.; Broker, T. R.; Bernard, H. U.; zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**: 17–27.

Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. **110**: 525-541.

Goldman, E.; Green, L. H. 2008. *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition: Edition 2*. CRC Press. 874 s. ISBN 9781420009330.

Gravitt, P. E.; Coutlée, F.; Iftner, J. W.; Sellors, J. W.; Quint, W. G.; Wheeler, C. M. 2008. New Technologies in cervical cancer screening. *Vaccine*. 26 Suppl. **10**: K42-K52.

Greiner Bio-One. GmbH. 2011. PapilloCheck® high-risk Instructions For Use. BQ-O65-01. Germany (<http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/English%20files%20for%20the%20OUK%20website/Instructions%20for%20use%20files/IFU%20Papillocheck%20HR.pdf>, stiahnuté: 18. 3. 2016).

Groves, I.; Coleman N. 2015. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *Journal of Pathology*. **235**: 527-538.

Harlan, L. C.; Bernstein, A. B.; Kessler, L.G. 1991. Cervical Cancer Screening: Who Is Not Screened and Why? *American Journal of Public Health*. **81 (7)**: 885-890.

Heid, A, Ch; Stevens, J.; Livak, J., K; Williams, M., P. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*. **6**: 986-994.

HiMediaLaboratories. příbalový leták k HiPer® Multiplex PCR Teaching Kit (<http://himedialabs.com/TD/HTBM023.pdf>, stiahnuté 6.7.2016).

Horvath, C.; Boulet, G.; Renoux, V., M.; Delvenne, P. O.; Bogers, J. P. J. 2010. Mechanism of cell entry by human papillomaviruses: An overview. *Virology*. **7**:11.

Hu, Z.; Zhu, D.; Wang, W.; Li, W.; Jia, W.; Zeng, X.; Ding, W.; Yu, L.; Wang, X.; Wang, L.; Shen, H.; Zhang, C.; Liu, H.; Liu, X.; Zhao, Y.; Fang, X.; Li, S.; Chen, W.; Tang, T.; Fu, A.; Wang, Z.; Chen, G.; Gao, Q.; Li, S.; Xi, L.; Wang, C.; Liao, S.; Ma, X.; Wu, P.; Li, K.; Wang, S.; Zhou, J.; Wang.; Xu, X.; Wang, H.; Ma, D. 2015. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet*. **47 (2)**: 158-163.

Hudelist, G.; Manavi, M.; Pischinger, K. I.; Watkins-Riedel, T.; Singer, C. F.; Kubista, E.; Czerwenka, K. F. 2004. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncolog.* **92 (3)**: 873-880.

IARC. GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. (http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_site_sel.aspx; <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>, stiahnuté 28.3.2016).

IARC. 2005. Handbook of Cancer Prevention. Vol 10: Cervix Cancer Screening. Lyon. France.

IARC. Sellors; W. J.; Sankaranarayanan; R. 2003. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual. Chapter 2: An introduction to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Lyon. (<http://screening.iarc.fr/doc/Colposcopymanual.pdf>; Chapter 2: <http://screening.iarc.fr/doc/colpochapter02.pdf>, stiahnuté 2.4.2016).

Joura, E. A.; Giuliano, A. R.; Iversen, O. E.; Bouchar, C.; Mao, C.; Mehlsen, J.; Moreira, E. D. Jr., Ngan, Y.; Petersen, L. K.; Lazcano-Ponce, E.; Pitisuttithum, P.; Restrepo, J. A.; Stuart, G.; Woelber, L.; Yang, Y. C.; Cuzick, J.; Garland, S. M.; Huh, W.; Kjaer, S. K.; Bautista, O. M.; Chan, I. S.; Chen, J.; Gesser, R.; Moeller, E.; Ritter, M.; Vuocolo, S. 2015. A 9-valent HPV vaccine against infection an intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med.* **372 (8)**: 711-23.

Kadaja, M. 2009. Papillomavirus replication machinery induces genomic instability in its host cell (<http://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/9043/Kadajameelis.pdf>, stiahnuté 4.7.2016).

Kulmala, S. M. A.; Syrjänen, S. M.; Gyllensten, U. B.; Shabalova, I. P.; Petrovichev, N.; Tosi, P.; Szrjänen, K. J.; Johansson, B. C. 2006. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol.* **59 (5)**: 513-517.

LabGuide. 2014. TaqMan sondy (<http://labguide.cz/taqman-sondy/>, stiahnuté 12.7.2016).

Levi, A. W.; Kelly, D. P.; Rosenthal, D. L.; Ronnet, B. M. 2003. Atypical squamous cells of undetermined significance in liquid-based cytologic specimens. *Cancer Cytopathology.* **99 (4)**: 191-197.

Manhart, L. E.; Koutsky, L. A. 2002. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* 29. **11**: 725–735.

Miller, B., A. 1992. *Cervical Cancer Screening Programmes: Managerial Guidelines*. Geneva. Switzerland: World Health Organisation.

Molijn, A.; Kleter, B.; Quint, Wim.; van Doorn J. L. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. **32S**: S43-S51.

Morshed, K.; Polz-Gruszka, D.; Szymański, M.; Polz-Dacewicz, M. 2014. Human Papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis. *Otolaryngologia Polska*. **68**: 213-219.

Muñoz, N.; Castellsagué, X.; Berrington, de González A.; Gissmann L. 2006. Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. *Vaccine*. **24 (S3)**: S1-S10.

Muñoz, N.; Bosch, F. X.; de Sanjosé, S.; Herrero R.; Castellsagué, X.; Shah, K. V.; Snijders, P. J.; Meijer, C. J. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. **348**: 518-527.

Mužik, J.; Šnajdrová, L.; Gregor, J. 2015. Epidemiologie karcinomu hrdla děložního v České republice (<http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-hrdla-delozniho>, stiahnuté 2.7.2016).

Ondryášová, H.; Koudeláková, V.; Vaněk, P.; Oborná, I.; Hajdúch, M. 2015. Lidský papilomavirus a s ním spojená onemocnění, *Practicus*. **4**: 11-15.

Ostor, A. G. 1993. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. **12**: 186–192.

Pandhi, D.; Sonthalia, S. 2011. Human papilloma virus vaccines: Current scenario. *Indian J Sex Transm Dis*. **32 (2)**: 75-85.

Pittayakhajonwut, Daraporn. 2010. DNA Replication and Genome Maintenance of Human Papillomavirus Type 16 in Mammalian Cells (<http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1006&context=bioscidiss>, stiahnuté 19.6.2016).

QIAGEN. príbalový leták The HiSpeed Plasmid Midi Kit (<https://www.qiagen.com/sk/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/blood-and-cell-culture-dna-midi-kit/#productdetails>, stiahnuté 18.6.2016).

QIAGEN. príbalový leták k QIAamp DNA Micro Kit (<https://www.qiagen.com/sk/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/qiaamp-dna-micro-kit/#orderinginformation>, stiahnuté 18.6.2016).

Redecha, Martin; Korbel, M.; Redecha, Mikuláš. 2007. Karcinóm krčka maternice a HPV infekcia. *Ambulantná terapia*. roč. **5 (3-4)**: 176-180.

Redecha, M.; Korbel, M.; Nižňanská, Z. 2004. Výskyt karcinómu maternicového krčka na Slovensku v rokoch 1990 – 2000. *Gynekol Prax*. **2**: 118-124.

Roche. GmbH RD. 2012. Cobas[®] 4800 HPV Test. Roche Molecular Systems Inc.

Rosenthal, E. 2008. Drug Makers' Push Leads to Cancer Vaccines' Rise. The New York Times (<http://www.nytimes.com/2008/08/20/health/policy/20vaccine.html>, stiahnuté 19.6.2016).

Sadovský, O. 2014. Skrining rakoviny krčka maternice na Slovensku. *Onkológia*. 9 (3): 144-148 (http://www.onkologiapreprax.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=6939&magazine_id=10, stiahnuté 2.7.2016).

Schiffman, M.; Castle, P. E.; Jeronimo, J.; Rodriquez, A. C.; Wacholder, S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. **370**: 890-907.

Schiffman, M.; Castle, P. E. 2005. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med*. **353**: 2101-2104.

Schiffman, M. 1992. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. **84 (6)**: 394-8.

Snijders, P. J. F.; van der Brule, A. J. C. and Meijer, C. J. L. M. 2003. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol*. **201**: 1-6.

Srovnal, J. 2012. Real-time PCR; Drábek, J.; Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři. Univerzita Palackého v Olomouci. 63-69.

Tábora, N.; Ferrera, A.; Bakkers, J. M. J. E.; Massuger, L. F. A. G.; Melchers, W. J. G. 2008. High HPV 16 Viral load is associated with increased cervical dysplasia in honduran women. *J Trop Me Hyd.* **78 (5):** 843-846.

The Amercan Cancer Society® (ACS). Cervical cancer. 2014. (<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.pdf>, stiahnuté 22.6.2016).

The Nobel Prize in Physiology or Medicine. 2008 [tlačová správa]. Stockholm, Sweden: The Nobel Assembly at Karolinska Institutet; October 6, 2008. (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/press.html, stiahnuté 25.3.2016).

Toman, J.; Fezereisl, J. 2001. Prekancerózy jsou patologické změny tkáně, které nelze definovat jako nádorové bujení, ale které za určitých okolností mohou ve zhoubné nádorové bujení přejít. Praha. (<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/prekancerozy-138909>, stiahnuté 7.10.2015).

Touzé, A.; de Sanjosé, S.; Coursaget, P.; Almirall, M. R.; Palacio, V.; Meijer, C. J.; Kornegaz, J.; Bosch, F. X. 2001. Prevalence od anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol.* **39 (12):** 4344-4348.

Walboomers, J. M. M.; Jacobs, M. V.; Manos, M. M.; Bosch, F. X.; Kummer, J. A.; Shah, K. V.; Snijders, P. J.; Peto, J.; Meijer, C. J.; Muñoz, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology.* **189:** 12-19.

Williams, V. M.; Filippova, M.; Soto, U.; Duerksen-Hughes, P. J. 2011. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* **6 (1):** 45-57.

Woodman, J. B. C.; Collins, I. S.; Young S. L. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews cancer.* **7:** 11-22.

World Health Organisation. 2016. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>, stiahnuté 17.6.2016).

World Health Organisation. 2013. HPV vaccine training materials for countries introducing Gardasil (or Silgard)TM (http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/gardasil_single-dose_vaccineEN/en/); Essential Training Package for HPV vaccine introduction for countries introducing CervarixTM (http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/cervarix2dose_vaccine/en/, stiahnuté 19.6.2016).

World Health Organisation. 2011. Vaccines against human papillomavirus. (<http://www.who.int/vaccines/en/hpvrd.shtml/shtml/shtml>, stiahnuté 19.6.2016).

Yu, T.; Ferber, J. M.; Cheung, H. T.; Chung, H. K. T.; Wong, F. Y.; Smith, I. D. 2005. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. **158**: 27-34.

zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1288**: F55-F78.

zur Hausen, H. 1977. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. **78**: 1-30.

Zhou, J.; Sun Y. X.; Stenzel, J. D.; Frazer, H. I. 1991. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. **185 (1)**: 251-7.

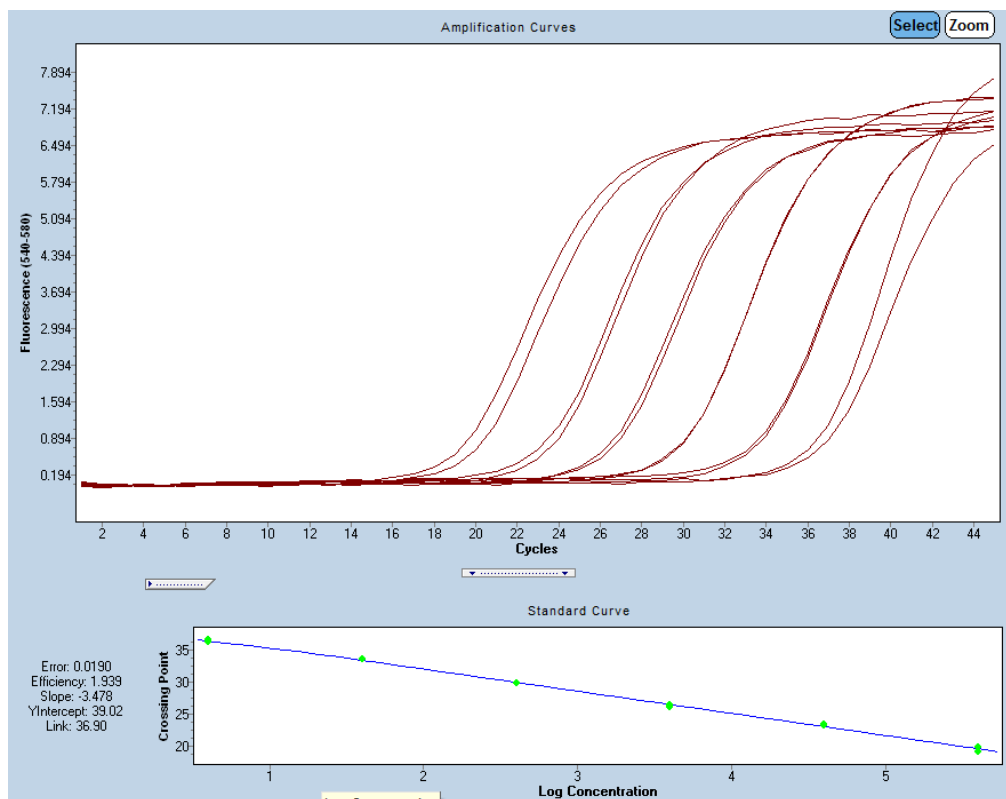
Zoznam skratiek

ACS	Americká spoločnosť pre výskum rakoviny, <i>The American cancer society</i>
AL	lyzačný pufer
AMP	ampicillin
ASC-H	lézia vysokého štádia atypických dlaždicových buniek, <i>high-grade lesion of atypical squamous cells</i>
BC	bunečný cyklus, <i>cell cycle</i>
bp	počet párov báz, <i>base pairs</i>
CCa	cervikálny karcinóm, <i>cervical carcinoma (cervical cancer)</i>
CIN	cervikálna intraepiteliárna neoplázia, <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
CIN1	ľahká dysplázia cervikálneho epitelu
CIN2	stredná dysplázia cervikálneho epitelu
CIN3	ťažká dysplázia cervikálneho epitelu
CIS	karcinóm <i>in situ</i> , <i>carcinoma in situ</i>
DEPC voda	voda ošetrená prídavkom diethyl-polykarbonát-u
dNTP	zmes deoxinukleotid- trifosfátov (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E	epizomálna forma, <i>episomal form</i>
E1	skorý proteín (gén) HPV, pri replikácii HPV genómu
E2	skorý proteín (gén) HPV, reguluje replikáciu a transkripciu
E2F	transkripčný faktor interagujúci s pRb
E4	skorý proteín (gén) HPV, pri uvoľňovaní viriónov
E5	skorý proteín (gén) HPV, znižuje degradáciu
E6	skorý onkoproteín (onkogén) HPV, deaktivuje p53
E7	skorý onkoproteín (onkogén) HPV, deaktivuje pRB
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
GMO	geneticky modifikovaný organizmus, <i>genetically modified organisms</i>
HA	hormonálna antikoncepcia
H-E	farbenie hematoxylinom-eosinom
HGL	ťažké štádium lézie, <i>high-grade lesion</i>
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti, <i>human immunodeficiency virus</i>
HPV	ľudský papillomavírus, <i>human papillomavirus</i>
hrHPV	vysoko-rizikový typ HPV <i>high-risk HPV</i>
H-SIL	ťažké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie, <i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>
I	integrovaná forma, <i>integral form</i>
IARC	Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny, <i>International Agency for Research on Cancer</i>

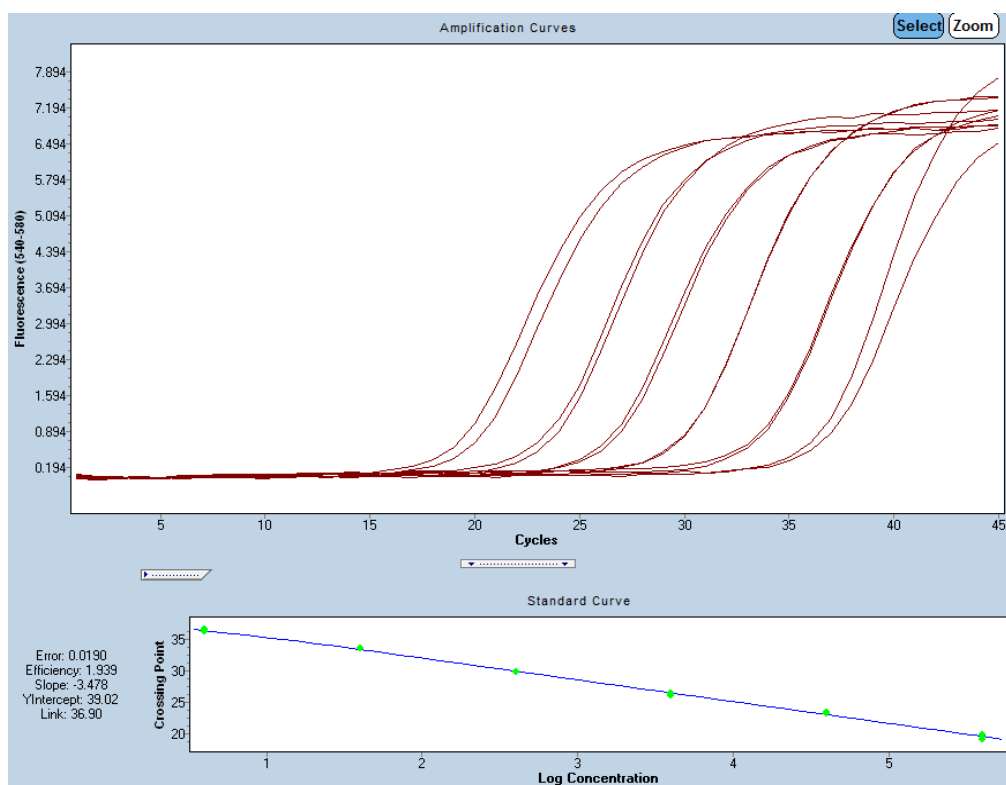
L1	neskorý proteín HPV, hlavný majoritný kapsidový proteín
L2	neskorý proteín HPV, malý minoritný kapsidový proteín
LB médium	<i>lysogeny broth medium</i>
LCR	dlhá kontrolná oblasť, <i>long control region</i>
LGL	ľahké štádium lézie, <i>low-grade lesion</i>
lrHPV	nízko-rizikový typ HPV, <i>low-risk HPV</i>
L-SIL	ľahké štádium dlaždicovej intraepiteliárnej lézie, <i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
MH	mikrohomológia sekvencia, <i>microhomology</i>
NC	negatívna kontrola
ND	nedefinovaná/nedetekovaná forma, <i>not defined/detected form</i>
NZ	neoplastická zmena
ORF	otvorený čítací rámec, <i>open reading frame</i>
p53	tumorsupresorový proteín, transkripčný faktor
p97	skorý promotor HPV
p670	neskorý promotor HPV
Pap test	<i>Papanicolaou test</i>
PBS	fosfátový roztok, <i>phosphate buffered saline</i>
PC	pozitívna kontrola
PCR	polymerázová reťazová reakcia, <i>polymerase chain reaction</i>
Pfw	primer forward
polyA _E	polyadenylačné miesto pre skoré gény
polyA _L	polyadenylačné miesto pre neskoré gény
pRb	retinoblastómový proteín, <i>retinoblastoma protein</i>
PRw	primer reverse
real-time PCR	kvantitatívna PCR s detekciou v reálnom čase
RNS	reaktívne formy dusíka, <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	reaktívne formy kyslíka, <i>reactive oxygen species</i>
rpm	počet otáčok za minútu, <i>revolution per minute</i>
Tris (TE)	Tris (hydroxymethyl) - aminomethan
UNG	enzým <i>Uracil-N-Glycosylasa</i>
VL	virálna nálož, <i>viral load</i>
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia, <i>World Health Organisation</i>
Z	zmiešaná forma, <i>mixed form</i>

Prílohy

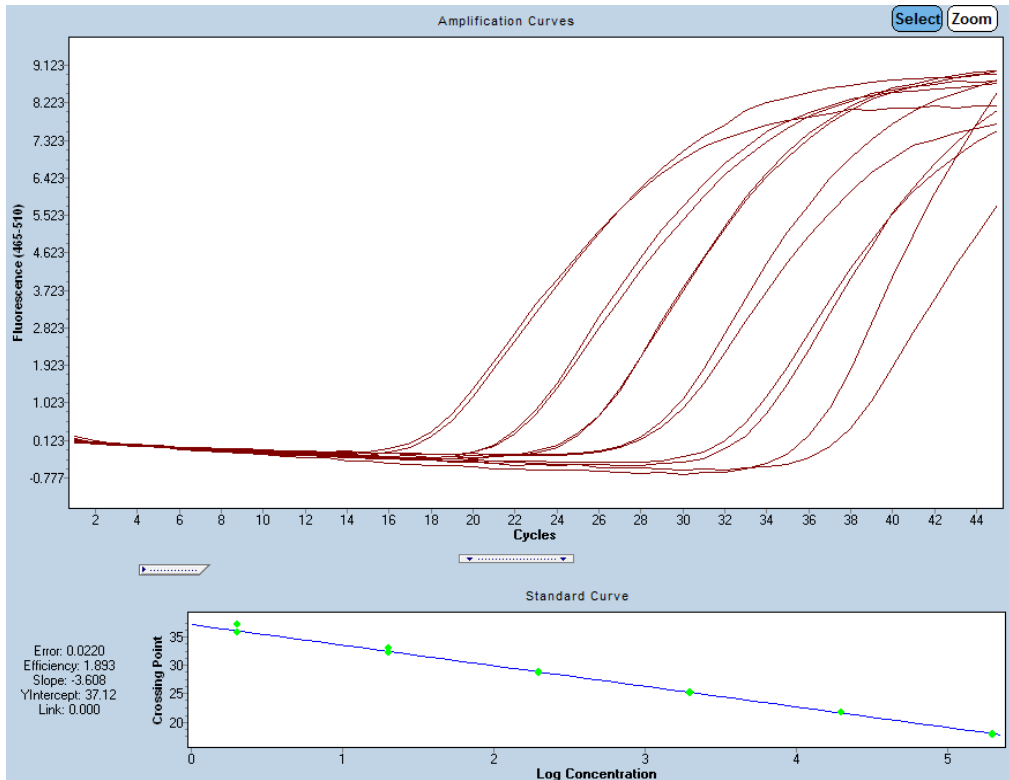
Príloha 1: Kalibračná rada použitá pre kvantifikáciu génov *E2* a *E6* HPV16 (na obrázku vyhodnotenie PCR reakcie pre gén *E2* HPV16, 200 000-2 kópie *E2*/μl).



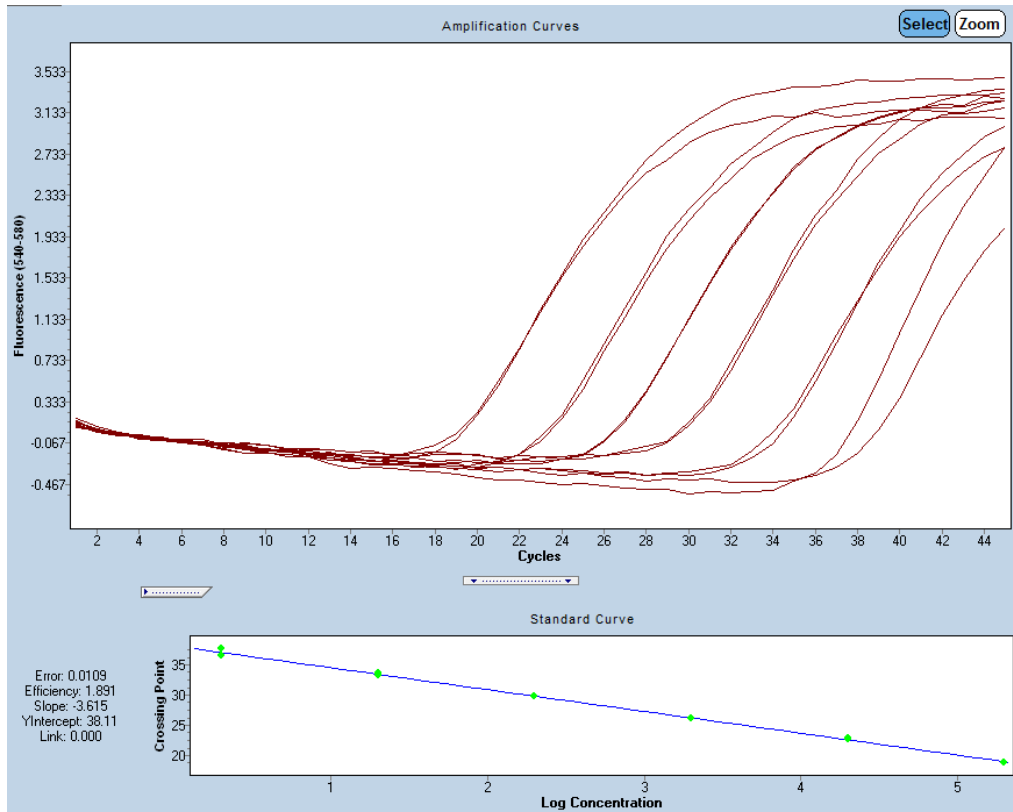
Príloha 2: Kalibračná rada použitá pre kvantifikáciu génov *E2* a *E6* HPV16 (na obrázku vyhodnotenie PCR reakcie pre gén *E6* HPV16, 200 000-2 kópie *E6*/μl).



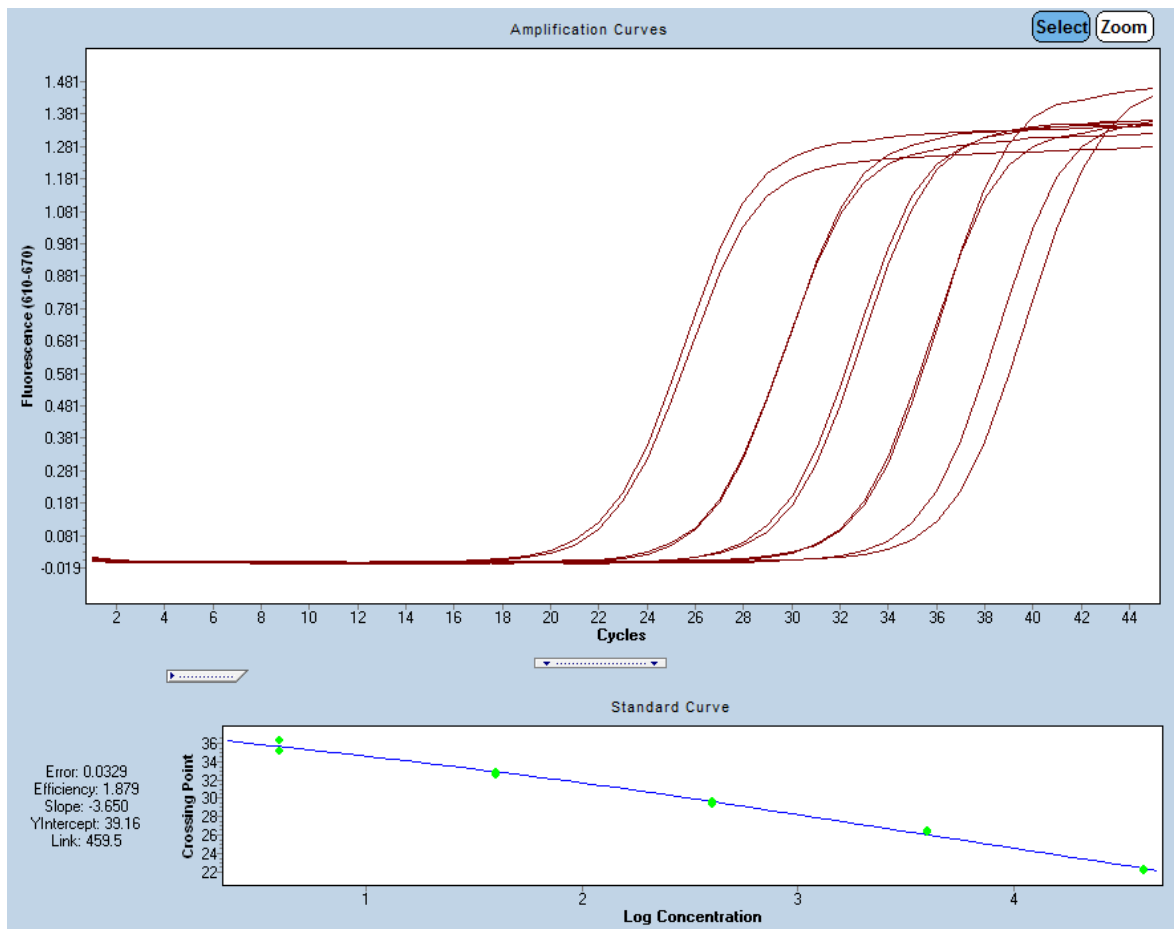
Príloha 3: Kalibračná rada použitá pre kvantifikáciu génov *E2* a *E6* HPV18 (na obrázku vyhodnotenie PCR reakcie pre *E2* gén HPV18, 200 000-2 kópie *E2*/μl).



Príloha 4: Kalibračná rada použitá pre kvantifikáciu génov *E2* a *E6* HPV18 (na obrázku vyhodnotenie PCR reakcie pre *E6* gén HPV18, 200 000-2 kópie *E6*/μl).



Príloha 5: Kalibračná rada pre kvantifikáciu *GAPDH* génu, 80 000-8 kópií *E6*/μl).



Príloha 6: Súhrnná tabuľka a výsledky cervikálnych sterov testovaných na HPV16.

č. vzorky	cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV-Screening	Koncentrácia DNA (ng/μl)	počet kopii génu pre GAPDH (kópie/μl)	E2 (kópie/μl)	E6 (kópie/μl)	E2/E6	Forma HPV infekcie (I/S/E)	virálna nálož (kópie/ng DNA)	výsledok cytologického alebo histologického vyšetrenia
1	HPV16, ďalší HPV	N	82,6	104467	1,10E+01	9,38E+00	1,17	E	0,11	
2	HPV16	N	0,736	75	1,02E+00	2,07E+00	0,49	Z	2,81	bez NZ
3	HPV16	HPV16	6,04	3963	6,25E+02	7,77E+02	0,81	E	128,59	bez NZ
4	HPV16, 18	HPV16, 33, 53	8,42	5420	2,97E+03	4,02E+03	0,74	Z	477,83	
5	HPV16, ďalší HPV	HPV39	6,72	2870	6,97E-01	4,28E-01	1,63	E	0,06	bez NZ
6	HPV16	HPV16	13,9	7463	5,82E+01	6,73E+01	0,86	E	4,84	bez NZ
7	HPV16, ďalší HPV	HPV51	14,8	10410	2,01E+02	2,62E+02	0,78	Z	17,73	L-SIL
8	HPV16	N	22,2	17033	7,60E+01	8,33E+01	0,91	E	3,75	
9	HPV16	HPV16	79	107000	1,26E+03	1,36E+03	0,93	E	17,22	bez NZ
10	HPV16, ďalší HPV	HPV16, 56	15	14567	3,47E+03	4,06E+03	0,86	E	270,3	bez NZ
11	HPV16, ďalší HPV	HPV52	23,4	18100	8,38E+00	9,22E+00	0,90	E	0,39	
12	HPV16, ďalší HPV	HPV39, 66, 6	39,8	14667	3,50E+01	2,57E+01	1,37	E	0,64	
13	HPV16	HPV42	39,2	29500	5,54E+00	2,32E+00	2,37	E	0,06	
14	HPV16, ďalší HPV	HPV16, 82, 66	3,78	3517	8,83E+02	1,11E+03	0,8	E	292,77	bez NZ
15	HPV16	HPV16	57,2	79267	1,15E+04	9,22E+03	1,25	E	161,13	CIN1
16	HPV16	HPV16	27,2	24233	5,35E+03	6,85E+03	0,78	Z	251,84	bez NZ
17	HPV16	HPV16, 70	1	3187	6,30E+01	7,38E+01	0,85	E	73,83	L-SIL
18	HPV16, ďalší HPV	HPV16, 56, 66	87	85167	1,33E+03	1,51E+03	0,88	E	17,38	
19	HPV16	HPV16	36,6	103067	ND	2,09E+02	ND	I	5,7	
20	HPV16, ďalší HPV	HPV16, 39	76,2	67800	2,63E+02	2,28E+02	1,156	E	2,99	bez NZ

Ďalšie HPV zahrňujú HPV31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

I- integrovaná forma HPV, E-epizomálna forma HPV, Z-zmiešaná forma HPV, ND- not detected, L-SIL- low grade squamous intraepithelial lesion, CIN1- cervical intraepithelial neoplasia, NZ – neoplastická zmena.

Príloha 7: Súhrnná tabuľka a výsledky cervikálnych sterov testovaných na HPV18.

č. vzorky	cobas® 4800 HPV Test	PapilloCheck® HPV-Screening	Koncentrácia DNA (ng/μl)	počet kopíí génu pre GAPDH (kópie/μl)	E2 (kópie/μl)	E6 (kópie/μl)	E2/E6	Forma HPV infekcie (I/S/E)	virálna nálož (kópie/ng DNA)	výsledok cytologického alebo histologického vyšetrenia
1	HPV18, 56	HPV56	3,88	1709,55	4,05E+00	6,99E+00	0,58	Z	1,8	bez NZ
2	HPV18, 82	N	2,18	939,75	ND	2,78E+00	ND	I	1,27	ASC-H
3	HPV18	N	19,7	18550,63	3,65E+01	1,21E+02	0,3	I	6,14	bez NZ
4	HPV18	HP18, 33, 53	5,92	5712,12	5,36E+02	6,93E+02	0,77	Z	117,12	L-SIL
5	HPV31	HPV31, 51, 11	0,618	5210,41	1,95E+00	1,10E+00	1,78	Z	1,77	L-SIL
6	HPV18	N	0,704	9865,05	2,94E-01	2,85E+01	0,01	I	40,48	L-SIL
7	HPV18	N	1,4	5261,65	8,67E-01	2,43E+01	0,036	I	17,36	L-SIL
8	HPV18	HPV18	108	130332,66	ND	4,40E+04	ND	I	407,25	L-SIL

Ďalšie HPV zahrňujú HPV31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68.

I- integrovaná forma HPV, E-epizomálna forma HPV, Z-zmiešaná forma HPV, ND- not detected, L-SIL- low grade squamous intraepithelial lesion, ASC-H- high-grade lesion, atypical squamous cells, NZ – neoplastická zmena.