

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2020**

**Kristýna Hanuláková**

[Sem zadejte text.]

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



# **Nádory asociované s lidským papilomavirem**

**Diplomová práce**

**Kristýna Hanuláková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2020    Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Kristýna HANULÁKOVÁ  
Osobní číslo: R180454  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Název tématu: Nádory asociované s lidským papilomavirem.  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování:

Součástí teoretické části diplomové práce bude vypracování literární rešerše na téma asociace positivity lidského papilomaviru s karcinogenezí různých nádorových onemocnění. Dále pak rešerše na téma skríningu cervikálního karcinomu a možností použití triážových testů. V praktické části se bude studentka věnovat porovnání HPV detekce u cervikálních a cervikovaginálních stěrů, triážovým testům a detekci miRNA u cervikálního karcinomu.

Rozsah grafických prací:


Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Araldi RP, Sant'Ana TA, Módolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, Cerutti JM, de Souza EB. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed Pharmacother.* 2018 Oct;106:1537-1556. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.149. Epub 2018 Jul 26. Review.
2. Tian Q, Li Y, Wang F, Li Y, Xu J, Shen Y, Ye F, Wang X, Cheng X, Chen Y, Wan X, Lu W, Xie X. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Sep 4;106(9). pii: dju241. doi: 10.1093/jnci/dju241.
3. Bonde J, Ejegod DM, Cuschieri K, Dillner J, Heideman DAM, Quint W, Pavon Ribas MA, Padalko E, Christiansen IK, Xu L, Arbyn M. The Valgent4 protocol: Robust analytical and clinical validation of 11 HPV assays with genotyping on cervical samples collected in SurePath medium. *J Clin Virol.* 2018 Sep 17;108:64-71. doi: 10.1016/j.jcv.2018.09.012.
4. Snoek BC, Verlaat W, Babion I, Novianti PW, van de Wiel MA, Wilting SM, van Trommel NE, Bleeker MCG, Massuger LFAG, Melchers WJG, Sie D, Heideman DAM, Snijders PJF, Meijer CJLM, Steenbergen RDM. Genome-wide microRNA analysis of HPV-positive self-samples yields novel triage markers for early detection of cervical cancer. *Int J Cancer.* 2018 Sep 7. doi: 10.1002/ijc.31855.

Vedoucí diplomové práce:

  
Mgr. Vladimíra Koudeláková, PhD.

Ústav molekulární a translační medicíny

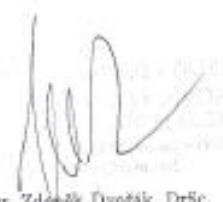
Datum zadání diplomové práce: **12. října 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2020**

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

L.S.

02-11-2018

  
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 27. března 2017

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Kristýna Hanuláková

Název práce: Nádory asociované s lidským papilomavirem

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: HPV, děložní hrdlo, rakovina děložního hrdla, triážové testy, miRNA

Počet stran: 70

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

## **SOUHRN**

Tématem předložené diplomové práce jsou nádory asociované s lidským papilomavirem (HPV). Obsahem teoretické části je literární rešerše o karcinomu děložního hrdla, morfologii a patogenezi HPV. V dalších kapitolách se práce zabývá screeningem děložního hrdla jak ve světě, tak v České republice. Podstatná část práce je také věnována již používaným screeningovým metodám, ale především těm, které využívají nové slibné biomarkery pro detekci prekanceróz děložního hrdla.

V praktické části byl testován soubor 41 vzorků primárních cervikálních karcinomů na přítomnost HPV pomocí testu PapilloCheck a také na přítomnost metylace vybraných genů pomocí Precursor M kitu. Z testovaného souboru bylo 40 vzorků dle Precursor M kitu pozitivních. Dále byla u toho souboru hodnocena exprese 8 miRNA, které byly vybrány na základě recentní literatury. Během experimentu se ale ukázalo, že vybraná normalizační miR-423-3p není stabilní napříč vyšetřovanými vzorky a není tedy optimální pro normalizaci exprese miRNA u cervikálních karcinomů. Srovnání exprese jednotlivých miRNA vzhledem k normalizační miR-423-3p z tohoto důvodu nebylo provedeno. Přesto byla u dvou testovaných miRNA, up-regulované miR-21-5p a down-regulované miR-34a-5p byla pozorována statisticky významná souvislost s HPV infekcí. Exprese miR-21-5p byla u HPV pozitivních vzorků zvýšena, naopak miR-34a-5p, byla u HPV pozitivních signifikantně snížena. Stejná závislost byla pozorována rovněž při hodnocení nádorů s pozitivitou HPV16

nebo HPV18. Pro miR-29a-3p byla zjištěna významná korelace mezi sníženou expresí a zasažením mízních uzlin. Získaná data ukazují na to, že by mohla mít exprese miR-29a-3p vliv na invazivitu a lokální šíření nádoru.

Statistická analýza na testovaném souboru 41 vzorků cervikálního karcinomu ukázala u některých miRNA významné rozdíly u sledovaných parametrů, jedná se však pouze o malé množství dat, ze kterého nelze dělat jednoznačné závěry. Tato studie bude rozšířena o další vzorky cervikálních karcinomů, aby bylo možné nalezené korelace potvrdit či vyvrátit.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Kristýna Hanuláková

Title: Tumors associated with human papilloma virus

Type of thesis: master

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: HPV, cervix, cervix cancer, triage tests, miRNA

Number of pages: 70

Number of appendices: 0

Language: czech

## **SUMMARY**

The topic of the master thesis is tumors associated with human papillomavirus (HPV). The content of the theoretical part is a literature research on cervical cancer, morphology and pathogenesis of HPV. In the next chapters thesis deals with cervical screening in the world and in the Czech Republic. A substantial part of the work is also devoted to already used screening methods, but especially to those that use new promising biomarkers for the detection of precancerous lesions of the cervix.

In the practical part a set of 41 samples of primary cervical carcinomas was tested for the presence of HPV using the PapilloCheck test and also for the presence of methylation of selected genes using the Precursor M kit. From tested set were 40 samples positive using the Precursor M kit. Furthermore, the expression of 8 miRNAs selected on the basis of recent literature was evaluated in this group. However during the experiment it was shown that the selected normalizing miR-423-3p is not stable across the examined samples and is therefore not optimal for the normalization of miRNA expression in cervical carcinomas. Therefore a comparison of the expression of individual miRNAs with respect to normalizing miR-423-3p was not performed. Nevertheless a statistically significant association with HPV infection was observed in two tested miRNAs, up-regulated miR-21-5p and down-regulated miR-34a-5p. The expression of miR-21-5p was increased in HPV positive samples, while miR-34a-5p was significantly decreased in HPV positive. The same

dependence was also observed when evaluating HPV16 or HPV18 positive tumors. For miR-29a-3p a significant correlation was found between decreased expression and lymph node involvement. The obtained data indicate that miR-29a-3p expression could affect tumor invasiveness and local spread.

Statistical analysis on a tested set of 41 cervical cancer samples showed significant differences in some miRNAs in the monitored parameters but it is only a small amount of data from which no clear conclusions can be made. This study will be extended to include additional samples of cervical cancers in order to confirm or refute the found correlations.



## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Mgr. Vladimíry Koudelákové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Moc ráda bych poděkovala mé vedoucí Mgr. Vladimíře Koudelákové, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a všechnen strávený čas, který mi věnovala při vedení a opravách diplomové práce a také za profesionální a zároveň přátelský přístup. Jmenovitě bych chtěla poděkovat Ing. Soni Gurské, Ph.D. za poskytnutí pomoci při práci s pipetovacími roboty, Mgr. Haně Jaworek, Ph.D. za provedení PapilloCheck® HPV-Screening testu a testu metylace tumor supresorových genů, Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. za statistické zpracování získaných dat a také celému týmu Ústavu molekulární a translační medicíny za poskytnutí příjemného zázemí při studiu. Závěrem moc děkuji mé rodině za velkou podporu po celou dobu studia.

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>X</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>X</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>2</b>
<b>3 KARCINOM DĚLOŽNÍHO HRDLA.....</b>	<b>3</b>
<b>4 LIDSKÝ PAPILOMAVIRUS (HPV) .....</b>	<b>5</b>
4.1 MORFOLOGIE A GENOM .....	5
4.2 INTEGRACE A REPLIKACE VIRU.....	7
4.3 PATOGENEZE.....	9
4.4 VAKCINACE PROTI HPV .....	10
<b>5 SCREENING KARCINOMU DĚLOŽNÍHO HRDLA .....</b>	<b>11</b>
5.1 SCREENING KARCINOMU DĚLOŽNÍHO HRDLA V EVROPĚ/SVĚTĚ .....	12
5.1.1 <i>Strategie screeningového programu .....</i>	<i>14</i>
5.1.2 <i>Screening karcinomu děložního hrdla pomocí samoodběru .....</i>	<i>15</i>
5.2 SCREENING KARCINOMU DĚLOŽNÍHO HRDLA V ČESKÉ REPUBLICE.....	16
5.3 METODY POUŽITELNÉ PRO SCREENING KARCINOMU DĚLOŽNÍHO HRDLA.....	17
5.3.1 <i>Cytologie .....</i>	<i>17</i>
5.3.2 <i>HPV detekční metody .....</i>	<i>17</i>
5.4 TRIÁŽOVÉ TESTY POUŽÍVANÉ VE SCREENINGU KARCINOMU DĚLOŽNÍHO HRDLA .....	23
5.4.1 <i>Triáž žen po primárním cytologickém screeningu .....</i>	<i>23</i>
5.4.2 <i>Triáž žen po primárním HPV screeningu.....</i>	<i>23</i>
5.5 DALŠÍ MOŽNOSTI TRIÁŽOVÝCH TESTŮ .....	27
5.5.1 <i>Virová metylace.....</i>	<i>27</i>
5.5.2 <i>Chromosomální nestabilita na numerické nebo strukturální úrovni .....</i>	<i>27</i>
5.5.3 <i>Aberantní exprese miRNA .....</i>	<i>28</i>
<b>6 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>32</b>
6.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	32
6.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY .....	32
6.2.1 <i>Použité chemikálie .....</i>	<i>32</i>
6.2.2 <i>Použité soupravy .....</i>	<i>32</i>

6.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ.....	32
6.4	SOFTWARE.....	33
6.5	METODIKA.....	33
6.5.1	<i>Analýza nádorových vzorků</i> .....	33
6.5.2	<i>Homogenizace cervikální tkáně</i> .....	33
6.5.3	<i>Izolace RNA z tkání</i> .....	33
6.5.4	<i>RT-PCR amplifikace</i> .....	34
6.5.5	<i>RT-qPCR</i> .....	35
6.5.6	<i>Analýza dat</i> .....	37
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>38</b>
7.1	CHARAKTERIZACE VZORKŮ.....	38
7.2	VÝSLEDKY RT-PCR.....	39
<b>8</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>52</b>

## Seznam zkratek

ASCUS	atypical squamous cells of underermined significance
cDNA	complementary DNA
CIN	cervikální intraepiteliální neoplazie
Ct	threshold cycle
EGFR	epidermal growth factor receptor
FAM	carboxyfluorescein
HPV	human papillomavirus
hrHPV	high-risk human papillomavirus
HSIL	high-grade squamous intaepithelial lesion
IARC	International agency for research on cancer
LBC	liquid-based cytology
LCR	long control region
lrHPV	low-risk human papillomavirus
LSIL	low-grade squamous intaepithelial lesion
NPV	negative predictive value
ORF	open reading frame
PPV	positive predictive value
SCC	squamous cell carcinoma
SIL	squamous intaepithelial lesion
VLP	virus-like particples

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1.:</b> Incidence a mortalita cervikálního karcinomu stanovená pro rok 2018 (upraveno podle Global cancer observatory; <a href="https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf">https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf</a> ). .....	3
<b>Obrázek 2.:</b> Klasifikace prekanceróz epitelu děložního hrdla a jeho přechod v karcinom in situ (převzato s úpravami od Lowy, 2006). .....	4
<b>Obrázek 3.:</b> Struktura genomu HPV16 (převzato od Naoko Kajitani <i>et al.</i> , 2012). .....	6
<b>Obrázek 4.:</b> Schéma dlaždicového epitelu kůže a jeho infekce HPV (převzato s úpravami od Lazarczyk <i>et al.</i> , 2012). Modré tečky znázorňují časně se replikující proteiny E1 a E2; červené tečky znázorňují proteiny E5, E6, E7; zelené tečky znázorňují protein E4; fialové tečky znázorňují kapsidové proteiny L1, L2. ....	9
<b>Obrázek 5.:</b> Algoritmus managementu cervikálního screeningu schválený pro USA (převzato s úpravami od Wentzensen <i>et al.</i> , 2017). .....	24
<b>Obrázek 6.:</b> Algoritmus managementu cervikálního screeningu vyvinutý na základě dodatků druhého vydání Evropských směrnic pro zajištění kvality při screeningu rakoviny děložního hrdla z roku 2015 (převzato od Chrysostomou <i>et al.</i> , 2018). .....	24
<b>Obrázek 7.:</b> Schéma pipetování master mixu do 96-jamkové destičky pro jednotlivé miRNA. Zde znázorněna jedna destička se třemi různými master mixy, celkem byly nachystány tři pro 9 vybraných miRNA. ....	36
<b>Obrázek 8.:</b> Schéma pipetování master mixu pro jednotlivé miRNA do 384-jamkové destičky. Zde znázorněna jedna destička se třemi různými master mixy, celkem byly nachystány tři pro 9 vybraných miRNA. ....	36
<b>Obrázek 9.:</b> Amplifikační křivky produktů ve vzorcích s cDNA se třemi miRNA (hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-21-5p). Zelené křivky – negativní vzorky; Červené křivky – pozitivní vzorky. ....	39

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1.:</b> Klasifikace HPV typů dle IARC. ....	6
<b>Tabulka 2.:</b> Přehled strategií screeningových programů probíhajících ve vybraných státech Evropy. ....	14

<b>Tabulka 3.:</b> Přehled testů pro detekci a genotypizaci HPV klinicky validovaných v Evropě dle Meijerových kritérií (upraveno dle Arbyn <i>et al.</i> , 2015; Ito <i>et al.</i> , 2019; Tuerxun <i>et al.</i> , 2016; Geraets <i>et al.</i> , 2014; Cuzick <i>et al.</i> , 2013).....	21
<b>Tabulka 4.:</b> Vybrané up/down-regulované miRNA a miRNA pro normalizaci u cervikálních tkání.....	31
<b>Tabulka 5.:</b> Podmínky polyadenylační reakce.....	34
<b>Tabulka 6.:</b> Podmínky reakce ligace adaptorů.....	35
<b>Tabulka 7.:</b> Reakční podmínky reverzní transkripce.....	35
<b>Tabulka 8.:</b> Reakční podmínky cDNA amplifikace.....	35
<b>Tabulka 9.:</b> Podmínky real-time kvantitativní PCR.....	37
<b>Tabulka 10.:</b> Počet analyzovaných vzorků v jednotlivých TNM kategoriích.....	38
<b>Tabulka 11.:</b> Klinická charakterizace všech analyzovaných vzorků, výsledky genotypizace HPV, včetně koncentrace vyizolované RNA z nádorových tkání.....	40
<b>Tabulka 12.:</b> Mediány a rozpětí Ct hodnot vybraných miRNA ve skupinách vzorků: T (1a-1b1; 1b2-1c; 2;4), N, HPV, HPV16, 18 (neg./poz.).....	45
<b>Tabulka 13.:</b> Proporce pozitivní exprese vybraných miRNA ve skupinách vzorků: T (1a-1b1; 1b2-1c; 2;4), N, HPV, HPV16, 18 (neg./poz.).....	47

## Seznam grafů

<b>Graf 1.:</b> Srovnání exprese miR-21-5p u HPV pozitivních (n = 33) a HPV negativních cervikálních nádorů (n = 8). .....	41
<b>Graf 2.:</b> Srovnání exprese miR-21-5p u cervikálních nádorů s HPV16/18 pozitivitou (n = 31) a nádorů s pozitivitou jiného HPV genotypu/HPV negativitou (n = 10). .....	42
<b>Graf 3.:</b> Srovnání exprese miR-34a-5p u cervikálních nádorů s HPV16/18 pozitivitou (n = 31) a nádorů s pozitivitou jiného HPV genotypu/HPV negativitou (n = 10). .....	42
<b>Graf 4.:</b> Srovnání exprese miR-29a-3p u cervikálních nádorů se zasaženými lymfatickými uzlinami (n = 13) a bez zasažení lymfatických uzlin (n = 23) .....	43
<b>Graf 5.:</b> Srovnání exprese miR-29a-3p u HPV pozitivních (n = 33) a HPV negativních cervikálních nádorů (n = 8). .....	43
<b>Graf 6.:</b> Srovnání exprese miR-29a-3p u cervikálních nádorů s HPV16/18 pozitivitou (n = 31) a nádorů s pozitivitou jiného HPV genotypu/HPV negativitou (n = 10). .....	44

# 1 Úvod

Rakovina děložního hrdla je jedním z nejčastěji se vyskytujících typů rakoviny, které ročně podlehnou až 300 000 žen. Toto onemocnění je ve většině případů spojováno s infekcí lidským papilomavirem, konkrétně jeho vysoce rizikovými typy. Nicméně až u 90 % žen dojde ke spontánnímu vymizení infekce. V opačném případě infekce přetrvává a dochází k rozvoji lézí nebo karcinomu. Existují však možnosti, jak se před vznikem HPV asociovaných onemocnění chránit. Primární prevenci představuje vakcinace. Vakcíny jsou cíleny především proti nejrizikovějším typům HPV16 a 18. Jejich nejvyššího účinku lze dosáhnout, pokud k vakcinaci dojde ještě před zahájením sexuálního života jedince. Další možností prevence je účast na programech screeningu karcinomu děložního hrdla. Součástí takového screeningu je cytologické vyšetření nebo detekce HPV DNA či také kombinace obou metod. Metody cervikálního screeningu umožňují identifikaci žen s nízkým či zvýšeným rizikem vzniku karcinomu.

K managementu žen po primárním screeningu slouží triážové testy, které jsou voleny dle metody použité v primárním screeningu. Jako triážový test tedy slouží jak cytologie, tak HPV testování. Vzhledem k tomu, že detekční testy na HPV jsou velice citlivé a detekují tedy i přechodné infekce, je potřeba ženu podrobit dalšímu testu, například cytologickému vyšetření. Cytologie má však limitovanou citlivost a nemůže být aplikována na vzorky odebrané samoodběrem. Z tohoto důvodu jsou stále vyvíjeny a testovány nové možnosti triážových testů. Jedním z nich je i detekce aberantní exprese miRNA. Změny v expresi jsou pozorovány již v časných prekancerózních lézích a proto jsou vhodné jako biomarkery.

Předložená diplomová práce si klade za cíl objasnit roli a vyhodnotit klinickou hodnotu miRNA v karcinomech cervixu.

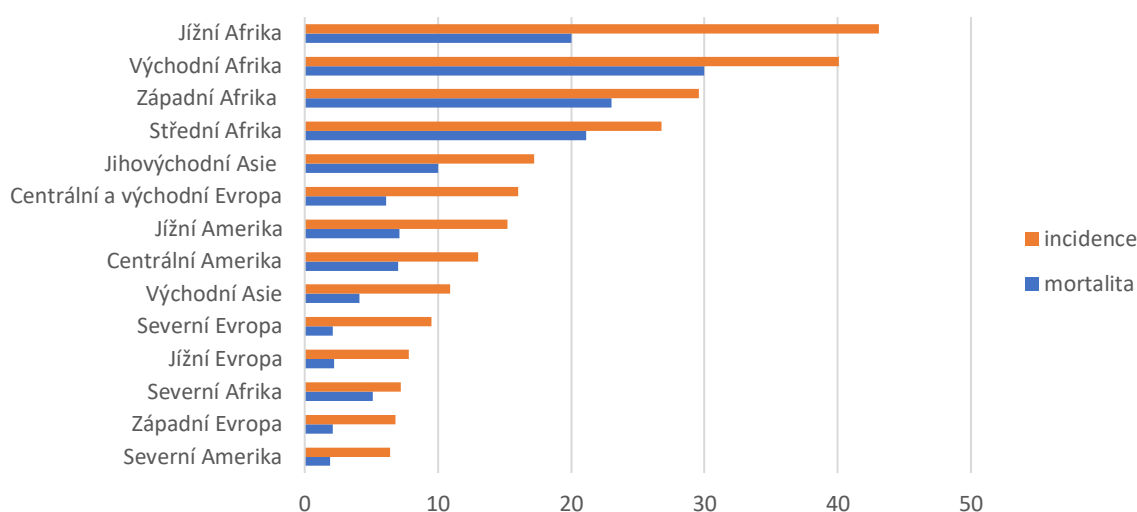


## 2 Cíle práce

- 1) Vypracovat literární přehled na téma asociace lidského papilomaviru s karcinogenezí různých nádorových onemocnění, screening cervikálního karcinomu a možnosti použití triážových testů.
- 2) Otestovat změny hladin exprese vybraných miRNA u vzorků cervikálních karcinomů.
- 3) Na základě získaných výsledků zohlednit testované miRNA jako možný biomarker pro následné použití v triážových testech.

### 3 Karcinom děložního hrdla

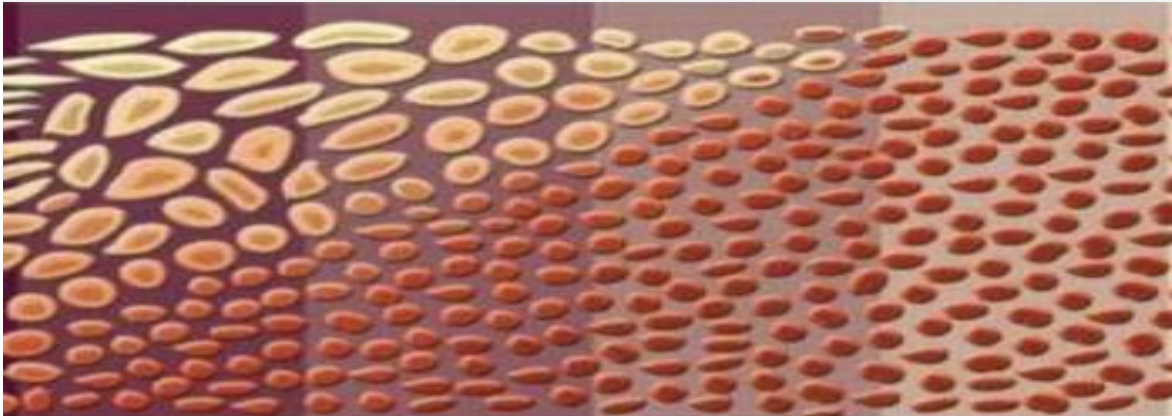
Rakovina děložního hrdla, též označovaná jako cervikální karcinom, je čtvrtou nejčastěji se vyskytující rakovinou, postihující ženy po celém světě (www.gco.iarc.fr, 2019). Každý rok je u více než půl milionu žen toto onemocnění diagnostikováno a více než 300 000 mu podlehnou (Bray, 2018). V České republice je každoročně diagnostikováno přibližně 1000 nových případů, z nichž 40 % končí smrtí pacientky (www.svod.cz, 2019). Výskyt i mortalita rakoviny děložního hrdla se celosvětově liší a je výrazně nižší ve vyspělejších zemích, kde jsou více rozšířeny programy cervikálního screeningu (obrázek 1).



**Obrázek 1.:** Incidence a mortalita cervikálního karcinomu stanovená pro rok 2018 (upraveno podle Global cancer observatory; <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>).

Většina případů karcinomu děložního hrdla je diagnostikována u pacientek ve věku okolo 40 let (www.svod.cz, 2019). Za hlavní příčinu vzniku tohoto onemocnění a také za nejvýznamnější rizikový faktor je považován vysoce rizikový typ lidského papilomaviru (hrHPV), který je pohlavně přenosný. Epidemiologické studie ukazují přítomnost hrHPV u 99 % rakovin děložního hrdla. Mezi vlivy zvyšující riziko infekce HPV patří například imunosuprese, koinfekce s jinými pohlavně přenosnými chorobami, nedostatky mikronutrientů, vyšší sexuální aktivita, kouření, věk pacientky a také vyšší počet sexuálních partnerů, právě u mladších žen (Dempsey, 2008). HPV infekce je, ale také asociována i s jinými typy rakovin, jako jsou například karcinomy penisu (36–40 %), vulvy (40–51 %), vagíny (40 %), řitního otvoru (90–93 %) a orofaryngeální karcinomy (12–63 %; Thomas, 2017).

Přibližně u 90 % infikovaných žen je infekce pouze přechodná a spontánně vymizí (tzv. virová clearance). U zbylých 10 % se jedná o přetrvávající (tranzientní) infekci, která vede k rozvoji premaligních stavů, označované jako cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) či samotného karcinomu (Araldi *et al.*, 2018). Přednádorová stádia jsou ohraničená pouze na epitelární vrstvu bez schopnosti metastázovat. Mezi prekancerózy řadíme dysplazie a karcinom *in situ*. Rozdělení cervikálních dysplazií shrnuje obrázek 2 (Roztočil *et al.*, 2011; Citterbart *et al.*, 2001). Tato přednádorová stádia jsou asymptomatická, jsou však zjistitelná screeningem. Naopak mezi příznaky pokročilejšího stádia karcinomu patří vodnatý zakrvavělý výtok, včetně krvácení po sexuálním styku, bolest v malé pánvi nebo bedrech a lymfedém dolních končetin (Roztočil *et al.*, 2011).

Dysplazie			Karcinom
lehká	střední	těžká	<i>in situ</i>
<b>Cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN)</b>			
I.	II.	III.	
<b>Skvamózní intraepiteliální léze (SIL)</b>			
nízkého stupně (LSIL)		vysokého stupně (HSIL)	
			

**Obrázek 2.:** Klasifikace prekanceróz epitelu děložního hrdla a jeho přechod v karcinom *in situ* (převzato s úpravami od Lowy, 2006).

V případě cervikální intraepiteliální neoplazie I. typu (CINI) se jedná o lehkou dysplazii se změnami v dolní třetině epitelu. Jádra buněk nevykazují téměř žádné abnormality, počet mitóz je nízký. Tento typ dysplazie se většinou neléčí, velmi často dochází ke stagnaci či k regresi. Nicméně až třetina neléčených případů může přejít do neoplazie II. typu (CINII), kde buněčné změny dosahují dvou třetin epitelu. I v tomto stádiu dochází k regresi až u 80 % případů (Koeneman *et al.*, 2019). CINIII představuje nejtěžší

stupeň dysplazie. V této fázi již nedochází ke stratifikaci ani diferenciaci epitelu, jádra vykazují aneuploidii a dochází k atypickým mitózám. Neléčená CINIII může snadno přecházet do stádia invazivního karcinomu (Roztočil *et al.*, 2011; Sawaya *et Huchko*, 2017; [www.screening.iarc.fr](http://www.screening.iarc.fr), 2019)

Rakovinu děložního hrdla můžeme rozdělit do 5 stádií. Karcinom *in situ* (stádium 0), představují abnormální buňky nacházející se v nejnitrnější výstelce děložního hrdla, které se mohou stát buňkami rakovinotvornými. Stádium I, nádorové buňky se nacházejí pouze v děložním hrdle. Toto stádium lze diagnostikovat pouze mikroskopii a podrozdělit na IA (maximální hloubka invaze <5 mm) a IB (hloubka invaze ≥5 mm) v závislosti na velikosti rakovinových buněk. Ve stádiu II je karcinom rozšířen na první dvě třetiny vagíny. Ve stádiu III rakovina zasahuje i do spodní třetiny vagíny, na pánevní stěnu, postihuje pánevní a paraaortální uzliny a může narušit i funkci ledvin. Toto stádium rozdělujeme na podkategorie IIIA, IIIB a IIIC podle četnosti rozšíření. Ve stádiu IV je již rakovina rozšířena na pánev, močový měchýř či konečník, ale také může dojít k metastázování do sousedních orgánů (IVA) nebo jiných částí těla (IVB; Bhatla *et al.*, 2019).

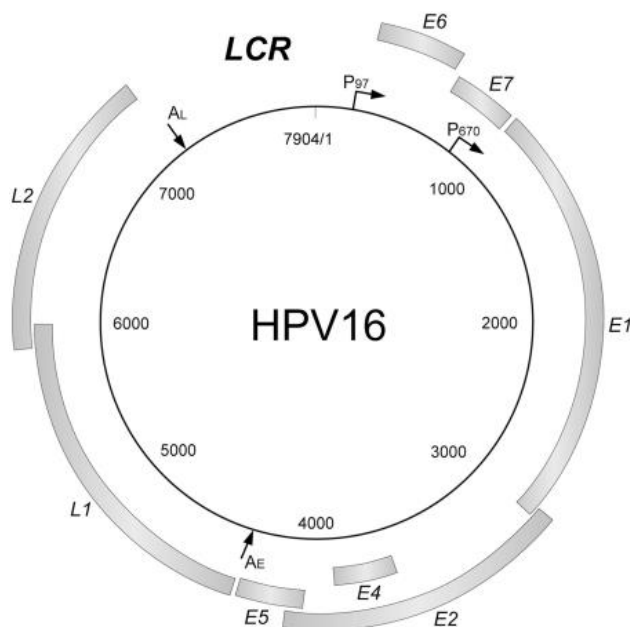
Nejčastějším typem nádoru představující zhruba 75 % případů karcinomu děložního hrdla je spinocelulární karcinom (SCC) vznikající z ektocervixu, tvořeného dlaždicovými (skvamózními) buňkami pokrývající povrch děložního čípku. Druhý typ nádorů představují adenokarcinomy vznikající z endocervixu, který je tvořen cylindrickým hlenotvorným epitelem. Zóna nacházející se právě mezi těmito dvěma typy epitelu je nejčastější oblast vzniku premaligních a maligních změn (tzv. tranzientní zóna). Mezi méně často objevující se nádory patří například adenosquamózní, neuroendokrinní a serózní papilární (Small *et al.*, 2017).

## 4 Lidský papilomavirus (HPV)

### 4.1 Morfologie a genom

Lidské papilomaviry se řadí do čeledi *papillomaviridae*. Do dnešní doby bylo kompletně sekvenováno více jak 200 lidských papilomavirů ([www.pave.niaid.nih.gov](http://www.pave.niaid.nih.gov), 2019). Jedná se o neobalené ikozahedrické viry s průměrem 50–55 nm a molekulovou hmotností  $5 \times 10^6$  Da. Jejich genom je představován dvouvláknovou kruhovou DNA, dlouhou 8 kbp a kódující 9–10 čtecích rámců (ORF). Genom těchto virů můžeme funkčně

rozdělit do tří oblastí obsahující: časně se replikující geny (*E1, E2, E4, E5, E6, E7*), pozdě se replikující geny (kapsidové proteiny *L1* a *L2*) a nekódující oblast neboli dlouhou kontrolní oblast (LCR). LCR obsahuje místo počátku replikace (*ori*) a regulační oblasti podílející se na replikaci a transkripci virové DNA, včetně sekvencí pro interakci s buněčnými transaktivačními proteiny (Araldi *et al.*, 2018; Rajčáni *et al.*, 2006).



**Obrázek 3.:** Struktura genomu HPV16 (převzato od Naoko Kajitani *et al.*, 2012).

HPV jsou na základě nukleotidové sekvence genu *L1* rozděleny do 5 hlavních rodů: alphapapillomavirus, betapapillomavirus, gamapapillomavirus, mupapillomavirus, nupapillomavirus (Bernard *et al.*, 2010). HPV nejčastěji infikují epitelální buňky kůže, ale také sliznice úst a genitálií. V rámci Alphapapillomavirů byly Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jednotlivé typy klasifikovány na vysoce rizikové HPV (high-risk; hrHPV) a nízko rizikové HPV (low-risk; lrHPV), dle jejich onkogenního potenciálu (Burd, 2016; IARC, 2007; tabulka 1).

**Tabulka 1.:** Klasifikace HPV typů dle IARC.

<b>Skupina 1</b> (kancerogenní pro člověka; hrHPV)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
<b>Skupina 2A</b> (pravděpodobně kancerogenní pro člověka)	68
<b>Skupina 2B</b> (potencionálně kancerogenní pro člověka)	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97
<b>Skupina 3</b> (nekancerogenní; lrHPV)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89

Přestože je HPV sexuálně přenosné onemocnění, existují důkazy i o vertikálním přenosu z matky na plod. HPV DNA byla detekována například v plodové vodě, placentě, fetálních membránách a mateřském mléce (Zouridis *et al.*, 2018).

## 4.2 Integrace a replikace viru

Infekce HPV viry začíná v bazálních epitelálních buňkách, ke kterým virus proniká prostřednictvím mikrotraumat nebo přímým kontaktem v místech přechodu dlaždicového a cylindrického epitelu. Po dosažení kontaktu viru s těmito buňkami dojde k navázání L1 proteinu virové kapsidy na proteoglykany heparan sulfátu lokalizované na buněčném povrchu, což způsobí konformační změnu virionu. Tato změna vystaví na povrch virionu N-koncovou část L2 proteinu a ta je proteolyticky štěpena furinem. Poté je virus internalizován mechanismem endocytózy za účasti obalových proteinů klathrinu či kaveolinu. Vlivem vazby lysozomů a následného snížení pH těchto vezikul dojde k rozpadu virové kapsidy a uvolnění virové DNA (Araldi *et al.*, 2018; Burd 2016; IARC, 2007).

Virový genom může v hostitelské buňce přetrvávat ve dvou formách. První formou je epizom, extrachromozomální kruhová DNA, která je replikována spolu s buněčnou DNA a na počátku životního cyklu viru je udržována v nízkém počtu kopií. V druhém případě může dojít k integraci do hostitelského genomu vlivem chromozomální nestability indukované onkoproteiny. Virový genom se může integrovat ve formě jediné kopie (integrant 1. typu) nebo ve formě vícenásobné kopie (integrant 2. typu; Meyers *et al.*, 2019). Místa integrace virové DNA jsou náhodně distribuovány po celém hostitelském genomu. Nicméně ke většině integrací dochází v tzv. fragile site regions. Jedná se o oblasti s velkou genomovou nestabilitou v rozmezí stovek kilobází do více než 9 megabází, hrající roli v translokacích, delecích a amplifikacích genů (Yu *et al.*, 2005).

Viry pro svou replikaci využívají DNA polymerázu hostitelské buňky nacházející se v S-fázi buněčného cyklu (Araldi *et al.*, 2018). Na počátku procesu amplifikace interaguje časně se replikující protein E1 se sekvencí Ori a asociuje s proteinem E2. Tento komplex E1-E2 přitahuje proteiny buněčného polymerázového komplexu (Small *et al.*, 2017). E2 protein hraje roli v remodelaci chromatinu (působí jako super enhancer) a spolu s proteinem Brd4 napomáhá distribuci virových kopií do dceřiných buněk (Jang *et al.*, 2014). Právě při integraci 1. typu často dochází k poškození genů *E1*, *E2* a tím i ke zvýšení exprese

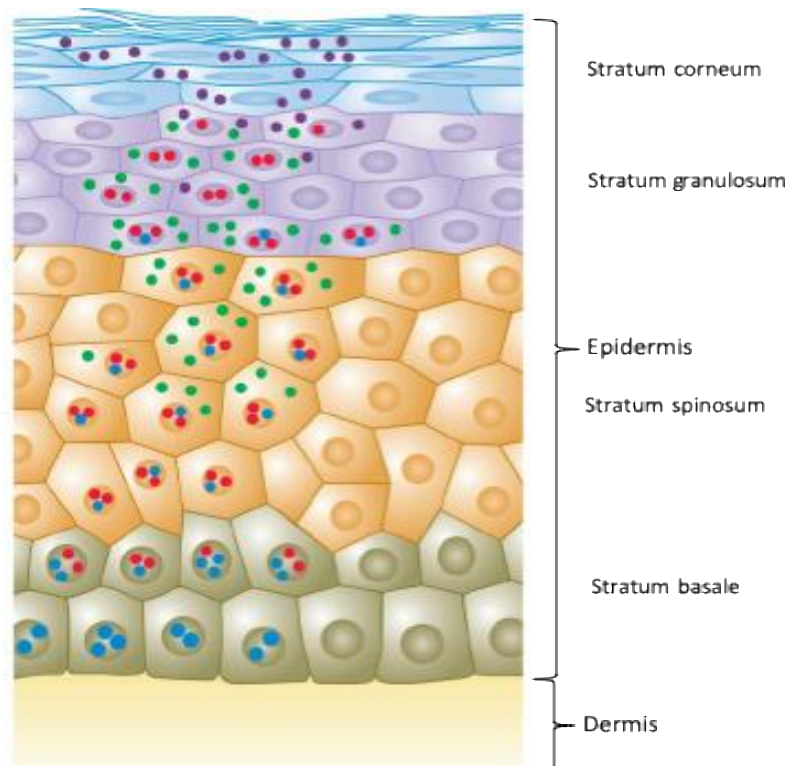
virových onkoproteinů E6 a E7. Naopak pokud je protein E2 přítomen, ve vyšších koncentracích působí jako represor exprese proteinů E6 a E7 (García-Vallvé *et al.*, 2005).

U vysoce rizikových HPV fungují proteiny E6 a E7 jako antagonisti tumor supresorových genů. V případě E6 se jedná o malý onkoprotein obsahující PDZ doménu (PSD-95/Dlg/ZO-1), která interakcí s jinými proteiny podporuje ztrátu polaritu buněk a mezibuněčné komunikace. Avšak nejzásadnější funkcí tohoto proteinu je schopnost vázat se na tumor supresorový protein p53, urychlovat jeho degradaci ubiquitinem a také degradovat další regulační proteiny jako *c-Myc*, DLG, McM7. Protein E7 působí synergicky s E6. Váže se na retinoblastomové proteiny (pRb a p107), p130 a stupňuje tak proliferaci hostitelské buňky. U nízkorizikových HPV se E6 a E7 na tumor supresorové geny váží se sníženou aktivitou (Rajčáni *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2012). Jako poslední z časně se replikujících proteinů se exprimují proteiny E4 a E5. Protein E5 je transmembránový protein umístěný nejen v buněčné membráně, ale také v golgiho aparátu a endoplazmatickém retikulu. Na buněčné membráně indukuje mitogenní signalizaci pomocí dimerizace receptorů epidermálního růstového faktoru (EGFR) a podílí se na perzistenci virové infekce (Cerasuolo *et al.*, 2017). Protein E5 se pravděpodobně podílí na inhibici apoptózy indukované peroxidem vodíku, prostřednictvím ubiquitinace a následné degradace proapoptického proteinu Bax. Nicméně působení proteinu E5 je omezeno pouze na raná stadia karcinomu děložního hrdla, protože při integraci HPV genomu často dochází k deletaci genu *E5* (Paolini *et al.*, 2017). Protein E4 je nejhojněji exprimovaným virovým proteinem a to především v suprabazálních a granulárních vrstvách (Stevenson *et al.*, 2018). E4 je syntetizován jako fúzní protein E1<sup>E4</sup> v důsledku sestřihu mRNA a obsahuje prvních pět kodonů E1 fúzovaných s celým ORF E4 (Biryukov *et al.*, 2017; Yajid *et al.*, 2017). Protein E4 ve formě E1<sup>E4</sup> obsahuje motiv „leucinového klastru“, který je nedílnou součástí proteinové asociace s keratinem a také je důležitý při asociaci proteinu E4 prostřednictvím interakce s C-terminální doménou jiného proteinu E4. Tato asociace umožňuje vytvářet struktury podobné amyloidním vláknům, což umožňuje manipulaci s organizací hostitelských buněk a tím napomáhání uvolnění virionů (Yajid *et al.*, 2017).

Replikace kapsidových proteinů L1 a L2 včetně sestavení infekční částice probíhá pouze v diferenciováných keratinocytech. Protein L2 v asociaci s E4 napomáhá agregaci proteinu L1 (Oxford *et al.*, 2016).

### 4.3 Patogeneze

Fáze životního cyklu lidského papilomaviru a exprese genů je striktně spojena s epiteliální diferenciací (obrázek 2). Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2, virové částice prostřednictvím mikrotraumat pronikají až k epiteliálním buňkám (stratum basale). V těchto buňkách dochází k replikaci episomálního genomu, expresi proteinů E1, E2 a proteinů E6, E7, které podporují progresi S-fáze v diferenciovaných buňkách a brání apoptóze. Tyto buňky tedy tvoří rezervoár infekce, která je vlivem jejich dělení a vytváření dceřiných buněk roznášena směrem k epiteliálnímu povrchu. V další nediferenciované vrstvě stratum spinosum je exprimován protein E4 a spolu s ostatními proteiny napomáhá amplifikaci virové DNA. V již diferenciovaných buňkách stratum granulosum, dochází k amplifikaci dříve nasyntetizované virové DNA a je iniciována exprese kapsidových proteinů L1 a L2. K uvolňování sestavených virionů dochází v nejvyšší vrstvě, stratum corneum (Rajčáni *et al.*, 2006; Lazarczyk *et al.*, 2009; Morse *et al.*, 2010).



**Obrázek 4.:** Schéma dlaždicového epitelu kůže a jeho infekce HPV (převzato s úpravami od Lazarczyk *et al.*, 2012). Modré tečky znázorňují časné se replikující proteiny E1 a E2; červené tečky znázorňují proteiny E5, E6, E7; zelené tečky znázorňují protein E4; fialové tečky znázorňují kapsidové proteiny L1, L2.



Infekce buněk epidermis způsobuje jejich ztluštění (akantóza) a rohovatění (hyperkeratóza) a může vést k až k tvorbě bradavic. Při vzniku bradavic dochází i k tvorbě tzv. koilocytů. Jedná se o velké světlé buňky s pyknotickým jádrem a perinukleárním projasněním. Tyto charakteristické buňky jsou často přítomny v horních vrstvách epidermis (Pennycook *et* McCready, 2019).

HPV nízko rizikového typu vykazují nízký onkogenní potenciál, ale jsou zodpovědné za benigní nebo malé abnormality cervikálních buněk, genitální bradavice (kondylomata) a hrtanové papilomy. Nejviditelnějším typem bradavice je condyloma acuminatum, což je masitá, vlhká vyvýšená polypoidní hmota. Tyto bradavice jsou vysoce infekční a mohou během těhotenství způsobit bolest, krvácení, obstrukci pohlavních orgánů nebo močových cest (Valentino *et* Poronski, 2016; Huether *et* McCance, 2012).

Vysoce rizikové typy HPV a to především HPV16, 18 jsou spojeny s přetrvávající infekcí a vznikajícími karcinomy. U těchto typů jsou proteiny E6 a E7 funkčně odlišné od typů s nízkým rizikem a slouží ke stimulaci proliferace infikovaných bazálních a suprabazálních buněk, což vede ke zvětšení lézí. Dlouhodobá perzistence HPV usnadňuje integraci virové DNA do chromozomu hostitelské buňky. Tento krok je spojen s další deregulací, nadměrnou expresí onkogenů E6 a E7 a karcinogenní progresí (Burd *et* Dean, 2016).

#### **4.4 Vakcinace proti HPV**

Primární prevencí vzniku HPV asociovaných onemocnění je vakcinace. V roce 2006 byla představena první schválená vakcína pro dívky Silgard/Gardasil a v roce 2009 byla tato vakcína schválena pro očkování i mužské populace (Valentino *et* Poronski, 2016). V současné době jsou na trhu dostupné již 3 vakcíny, bivaletní Cervarix, kvadrivalentní Silgard/Gardasil a nonavalentní Gardasil 9. Všechny tři vakcíny jsou účinné proti nejrizikovějším typům HPV, a to HPV16 a 18. Silgard/Gardasil chrání také proti nízkorizikovým typům HPV6 a 11. Gardasil 9 je účinná proti HPV16, 18, 6 a 11, navíc chrání proti typům HPV31, 33, 45, 52, 58 a dokáže zabránit až 90 % nádorů spojených s HPV infekcí (Thomas, 2016; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), 2020). Vzhledem k tomu, že vakcíny nechrání před všemi karcinogenními HPV typy, je i po vakcinaci velmi důležité docházet na pravidelné gynekologické prohlídky a účastnit se screeningového programu.

Vakcíny jsou vyráběny jako VLP (Virus-like-participles), tedy částice bez genetické informace, obsahující L1 kapsidový protein, které v imunitním systému organismu navodí tvorbu protilátek (Thomas, 2016). Nejvyššího účinku vakcín lze dosáhnout, pokud k očkování dojde ještě před zahájením sexuálního života. Tehdy je prokázána účinnost vakcíny nejméně po dobu 10 let. Dívky lze začít očkovat od 9–10 roku života. Bezplatná vakcinace pro dívky ve věku 13 let vakcínou Cervarix je v ČR zavedena od roku 2012 a pro chlapce od roku 2018 ([www.cervix.cz](http://www.cervix.cz), 2019). Očkovat je možné i dospělé jedince, nicméně tato vakcinace již není hrazena zdravotní pojišťovnou a její účinnost může být s vyšším věkem nižší kvůli předchozím infekcím (Meites *et al.*, 2019). Očkování se provádí i u chlapců/můžu, neboť i v jejich případě může dojít k rozvoji HPV asociovaných onemocnění (převážně orofaryngeálních karcinomů) a také představují potencionální přenašeče. Všechny tři vakcíny se aplikují intramuskulárně. U starších jedinců jsou aplikovány ve formě třídávkové řady, kdy druhá a třetí dávka se aplikuje v rozestupu dvou a šesti měsíců. Děti jsou očkovány ve dvoudávkovém schématu, druhá vakcína je podána 5–13 měsíců po první dávce (Valentino *et Poronski*, 2016). Jedná se o vakcíny profylaktické, nedokáží tedy zvrátit nebo léčit již získané infekce.

Klinické studie prokázaly protilátkovou odpověď u více než 99 % HPV naivních žen proti všem složkám jedné vakcíny po dokončení třídávkové série. Také bylo zjištěno, že hladiny protilátek u všech vakcinárních typů HPV byly několikrát vyšší než hladiny dosažené přirozenou infekcí (Block *et al.*, 2006). Vakcíny tedy poskytují účinnou ochranu proti nově vznikajícím infekcím způsobených HPV typy, na které jsou vakcíny mířeny. U všech vakcín byla navíc prokázána i značná míra cross-protektce s ostatními nevakcinárními HPV typy.

## 5 Screening karcinomu děložního hrdla

Sekundární prevencí cervikálního karcinomu je cervikální screening. Cílem screeningových programů je plošné vyšetření asymptomatické populace za účelem odhalení nádorového onemocnění v jeho počátečních stádiích, umožňují tedy méně radikální a levnější léčbu. Vyšetření se provádí prostřednictvím rychle aplikovatelných testů nebo jiných postupů. Účelem cervikálního screeningu je odhalit prekancerózní změny nebo časná stádia karcinomu. V České republice celý proces začíná vyšetřením u gynekologa při pravidelných prohlídkách, kde se provádí i stěr buněk z děložního hrdla. Ten je následně

odeslán na akreditované cytologické pracoviště, kde je provedeno vyšetření vzorku. Výsledek je poslán zpět ošetřujícímu lékaři, který na základě získaných výsledků rozhodne o dalším postupu vyšetření.

Screening rakoviny děložního hrdla se v jednotlivých zemích výrazně liší. Screeningový program v jednotlivých zemích je ovlivňován například výši finančních prostředků uvolňovaných na zdravotní péči, existující lékařskou a ekonomickou infrastrukturou a vnímáním rizik a tolerancí společnosti (Wentzensen *et Arbyn*, 2017).

## 5.1 Screening karcinomu děložního hrdla v Evropě/světě

Provádění screeningu karcinomu děložního hrdla bylo v roce 2003 doporučeno Radou Evropské unie, která rovněž vydala další doporučení týkající se pravidel screeningu. Obecně se jedná o organizovaný vícestupňový proces zahrnující: identifikaci cílové populace; nábor vhodných žen; sběr cervikálních stěrů z Pap testů; vyšetření stěrů a reporting; obeznámení žen, jejichž vzorky nevykazovaly žádné abnormality a informování o dalším provedení testů; opět pozvat ženy s neuspokojivými výsledky vyšetření stěrů a nadále u nich sledovat průběh; a v neposlední řadě registrace, sledování a hodnocení celého programu (European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening, 2017).

V současné době probíhá screeningový program ve 22 státech Evropské unie (EU) z 28 členských států a ve 4 přidružených státech (Chrysostomou *et al.*, 2018). Ve většině členských státech EU je politika screeningového programu dána oficiálními doporučeními, pouze v šesti z nich je dána zákonem (Německo, Maďarsko, Itálie, Litva, Nizozemsko, Polsko). Mimo státy EU probíhají screeningové programy například v USA, Austrálii, Kanadě nebo Korei (Tae-Wook *et al.*, 2020). Programy screeningu karcinomu děložního hrdla se v jednotlivých státech liší používanou metodou. V některých státech se jako metoda primárního screeningu stále používá cytologie, ale v jiných státech může být doplněna nebo nahrazena citlivějším HPV testováním. Použití cytologie s HPV testováním současně je označováno jako tzv. kotestování (Arbyn *et al.*, 2018), které ale kvůli nedostatečnému přínosu není evropskými směrnici doporučováno (von Karsa *et al.*, 2015).

Mezi státy Evropské unie využívající pro primární screening pouze cytologii patří Česká republika, Rakousko, Německo, Belgie, Chorvatsko Řecko, Maďarsko, Irsko, Litva,

Lotyšsko, Lucembursko, Portugalsko, Slovensko, Slovinsko, Španělsko, Švýcarsko a přidružený stát Izrael. V Dánsku, Francii a Itálii je v závislosti na věku pacientky pro primární screening využívána cytologie nebo HPV testování (Chrysostomou *et al.*, 2018). Screeningový interval je ve většině státech tři až pět let. Pouze Česká republika společně s Německem zavedla jednoroční screeningový interval. Screening rakoviny děložního hrdla byl Radou Evropské unie doporučen pro věkovou skupinu od 25 nebo 30 let do 60 nebo 65 let. Toto věkové rozmezí pacientek se v jednotlivých státech liší. Nejčastější věkový interval je 25–64 let. Český screeningový program je jediný, který zve k účasti dívky již od 15. roku. Na Maltě je využívána metoda kotestování, která je doporučena ženám pouze od 25 do 35 let (Basu *et al.*, 2017).

V USA jsou doporučení pro screening rakoviny děložního hrdla vydávána dobrovolnou skupinou národních odborníků v oblasti prevence nemocí a medicíny United States Preventive Services Task Force (USPSTF), dále Americkou společností pro rakovinu (ACS) a Americkým kongresem porodníků a gynekologů (ACOG). Doporučení se zaměřují na ženy s průměrným rizikem, definované jako ženy bez předchozí diagnózy CIN2, závažnější léze nebo rakoviny děložního hrdla. Těmto ženám se doporučuje ve věku 21 až 65 let docházet na cytologické testy každé 3 roky. V roce 2012 byl v USA doporučen program screeningu karcinomu děložního hrdla, který zahrnuje kombinovanou cytologií a testování HPV u žen ve věku 30–65 let s pětiletým intervalem screeningu (Mariani *et al.*, 2016). Další doporučení se týká žen s vysokým rizikem (imunokompromitované ženy např. virem lidské imunodeficiency) a ženy vystavené expozici diethylstilbestrolu *in utero*. U žen s nízkým rizikem (po úplně hystektomii, bez předchozí diagnózy CIN2) je doporučeno screening neprovádět (Moyer, 2012; Sawaya *et al.*, 2017).

V Austrálii jsou zásady pro program screeningu děložního hrdla vydávány National Cervical Screening Policy (NCSP). Od roku 2017 se pro vyšetření asymptomatických žen ve věku 25 až 74 let jako primární screeningová metoda používá HPV testování s částečnou genotypizací v intervalu 5 let. Ženám od 25 do 70 roku jsou zasílány pozvánky k účasti na screeningovém programu. Ženy ve věku 70 až 75 let jsou vyzvány k ukončení screeningu, pokud jsou jejich výsledky testování HPV negativní (www.cancerscreening.gov.au, 2020).

V Kanadě se jako metoda primárního screeningu stále využívá cervikální cytologie. Canadian Task Force on Preventive Health Care vydala doporučení lišící se v závislosti na

věkové kategorii pacientek. Ženám do 24 let se nedoporučuje provádět rutinní cervikální screening. Ženám od 25 do 69 roku se doporučuje rutinní cervikální cytologický screening každé tři roky. Ženy starší 70 let, které měly 3 po sobě jdoucí výsledky Pap testů negativní, mohou cervikální screening ukončit (Peirson *et al.*, 2013).

### 5.1.1 Strategie screeningového programu

Screeningové programy můžeme rozdělit na základě strategie provádění screeningu na neorganizovaný oportunistický přístup a organizovaný přístup založený na populačních datech. Oba přístupy jsou každou zemí organizovány jiným způsobem a i v rámci jedné země se může vyskytovat kombinace obou přístupů, které jsou zaváděny na základě doporučení vydaných vládou dané země nebo národních gynekologických/lékařských společností (shrnutí v tabulce 2).

**Tabulka 2.:** Přehled strategií screeningových programů probíhajících ve vybraných státech Evropy.

Strategie screeningu	Státy EU	Přidružené státy EU
<b>Oportunistická</b>	Rakousko, Bulharsko, Kypr, Řecko, Lucembursko, Španělsko	Švýcarsko, Izrael
<b>Organizovaná</b>	Chorvatsko, Česká Republika, Dánsko, Estonsko, Finsko, Maďarsko, Irsko, Itálie, Lotyšsko, Litva, Nizozemsko, Polsko, Slovinsko, Švédsko, Spojené Království, (Francie, Německo, Slovensko) <sup>1</sup> , Malta <sup>2</sup>	Norsko, Turecko
<b>Organizovaná jen v určitých regionech</b>	Belgie, Portugalsko, Rumunsko	

1 přechod na organizovaný screeningový program do roku 2019

2 zaveden pouze zkušební organizovaný screeningový program

Neorganizovaný oportunistický screening rakoviny děložního hrdla má tendenci nižšího pokrytí, závisí totiž na iniciativě jednotlivce a na frekvenci návštěv u lékaře. Praktický lékař nebo gynekolog je při oportunistickém screeningu také zodpovědný za pečlivost vyšetření a především za odběr a shromažďování vzorků. V případech neorganizovaného screeningu není systematicky zvána celá cílová populace (Chan *et al.*, 2019). Tato strategie je často aplikována v rozvojových zemích, ale také v Rakousku, Švýcarsku, Lucembursku, Španělsku, Izraeli, dále pak ve středoasijských zemích, na Kavkazu a zemích východní Evropy – Řecko, Bulharsku a na Kypru. Oproti tomu organizované populační screeningové programy a personalizované přístupy k pozvání jsou

účinnější a zajišťují větší pokrytí a nákladovou efektivitu. V organizovaném prostředí může být vzorek odebrán nejen lékařem, ale také různými zdravotně kvalifikovanými osobami, jako jsou zdravotní sestry a porodní asistentky. V rámci tohoto přístupu jsou ženy v cílové populaci individuálně identifikovány a vyzvány k účasti na screeningu. Díky tomu může být v rámci organizovaných programů dosaženo vysoké účasti v pravidelných intervalech. Tato strategie je uplatňována především v zemích s vysokými příjmy, jako je Spojené Království, Austrálie, Kanada, Finsko, Nizozemsko a Singapur (Paulauskiene *et al.*, 2019; Basu *et al.*, 2017).

### **5.1.2 Screening karcinomu děložního hrdla pomocí samoodběru**

I přesto, že v některých zemích je zaveden organizovaný screening, který zajišťuje větší pokrytí populace, je stále evidována neúčast žen v těchto programech. Byla zjištěna řada emocionálních a praktických bariér, proč se ženy nechtějí/nemohou screeningu účastnit. Jedno z možných řešení, jak zvýšit účast těchto žen ve screeningovém programu, představují samoodběrové sady, tzv. self-sampling. Tyto sady jsou ženám doručovány do jejich domovů. Vlastní test obsahuje štěteček určený pro odběr vzorku z poševní sliznice. Odebraný vzorek poté žena odešle k vyhodnocení do laboratoře a výsledky testu jsou jí poslány zpět (Yeh *et al.*, 2019). Vzhledem k tomu, že se jedná o vaginální odběr, nelze u takto odebraných vzorků provést cytologické vyšetření, ale jsou určeny k HPV testování. Řada studií a recentní metaanalýza prokázala srovnatelné výsledky HPV testování u vzorků odebraných samoodběrovou sadou a vzorků odebraných lékaři, když byly použity HPV testy založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). Ve stejné studii byla také hodnocena účinnost samoodběrových strategií v populaci žen, které se nepravidelně účastnily nebo vůbec neúčastnily screeningového programu. Tato populace žen byla rozdělena na dvě skupiny, přičemž jedné byly pro odběr vzorku zaslány samoodběrové sady. Druhé skupině, sloužící jako kontrolní, byla pro odběr vzorku poslána pozvánka k lékaři. Po zaslání samoodběrových sad byla zaznamenána větší účast, než při zasílání pozvánek (Arbyn *et al.*, 2018). V současné době je možnost samoodběru součástí screeningového programu například v Nizozemsku a Austrálii (Wentzensen *et al.*, 2016).

## 5.2 Screening karcinomu děložního hrdla v České republice

Do roku 2009 probíhal v České republice oportunní screening rakoviny děložního hrdla. Nicméně incidence nemoci zůstávala stále poměrně vysoká. Z toho důvodu byl v roce 2009 zaveden pilotní screeningový program, který byl o rok později Ministerstvem zdravotnictví ČR nahrazen celorepublikovým plnohodnotným screeningovým programem zaměřeným na včasný záchyt karcinomu děložního hrdla. Do roku 2013 nebyl program založen na populačních datech (Cancer screening in the European Union, 2017). Ministerstvo zdravotnictví udává legislativu Národního programu screeningu rakoviny děložního hrdla a to vyhláškou č. 70/2012 Sb. o preventivních prohlídkách (Dušková *et al.*, 2014; [www.cervix.cz](http://www.cervix.cz), 2019).

V ČR je screening karcinomu děložního hrdla součástí bezplatné pravidelné gynekologické prohlídky, jejíž součástí je i vyšetření pohlavních orgánů pohmatem (někdy doplněno ultrazvukem) a mízních uzlin v jejich oblasti a to v intervalu 1 roku. K dosažení kvality screeningového vyšetření byly akreditovány vybrané laboratoře, které množství prováděných vyšetření, technickým zázemím a personálním obsazením odpovídají stanoveným kritériím programu. Tyto laboratoře vyhodnocují stěry z tkáně pacientek odebrané gynekologem při preventivní prohlídce. Podle získaných výsledků je následně zvolen další postup. V případě normálních výsledků se prohlídka opakuje opět za jeden rok. V případě abnormálního výsledku je pacientka sledována v kratším intervalu, poslána na externí kolposkopii, případně podrobena bioptickému vyšetření.

Od roku 2014 do roku 2017 probíhal ve spolupráci mezi Ministerstvem zdravotnictví ČR a zdravotními pojišťovkami projekt personalizovaných pozvánek k zúčastnění osob na programech screeningu rakoviny děložního hrdla s cílem zvýšení účasti. Tyto pozvánky byly zasílány pojišťovkami formou dopisů a to pouze pojištěncům, kteří se vyšetření doposud neúčastnili nebo v posledních 3–5 letech svou účast přerušili. Ke screeningu karcinomu děložního hrdla bylo celkem pozváno 1 937 901 žen ve věku 25–70 let. Po prvním adresném zvaní byla míra účasti 15,5 %, ale s opakujícím se zvaním došlo ke snížení účasti až na 4,9 % po čtvrtém adresném zvaní. Celková míra účasti žen pozvaných ke screeningu karcinomu děložního hrdla byla 30,7 % (Ngo *et al.*, 2019).

## 5.3 Metody použitelné pro screening karcinomu děložního hrdla

### 5.3.1 Cytologie

Nejčastější strategií pro detekci a kontrolu rakoviny děložního hrdla je cytologické vyšetření stěrů z děložního čípku, kdy je využíváno tzv. Papanicolaouovo barvení, známé také jako Pap test (Ushizima *et al.*, 2013). Buňky pro toto vyšetření se získávají z exocervixu pomocí kartáčku nebo tyčinky. Poté jsou nanášeny na sklo a barveny tak, aby je bylo možné pozorovat pod mikroskopem. Cytologické vyšetření lze provést i technikou Liquid-based cytology (LBC; např. ThinPrepPap test, firma Hologic), kdy jsou buňky odebírány do tekutého média a poté filtrovány, čímž je odstraněn hlen a zbytky krve (Ito *et al.*, 2019). Preparáty jsou připravovány tak, že jsou buňky v jedné vrstvě rozprostřeny na sklíčku. Hotové preparáty jsou odečteny pod mikroskopem pracovníky laboratoře. Ten hodnotí architekturu buněk, strukturu jader, buněčnou cytoplazmu a pozadí preparátu (Roztočil *et al.*, 2011). Pro kontrolu jsou ještě všechny preparáty, které byly označeny jako negativní, opět vyhodnoceny pomocí speciálního softwaru, což umožňuje daleko lepší hodnocení stěru. Další výhodou oproti klasickému Pap testu je možnost použití již odebraných buněk k dalšímu testování (např. HPV DNA diagnostice). V obou případech jsou získané výsledky hodnoceny systémem Bethesda (Ondryášová *et al.*, 2013; Gibb *et al.*, 2011).

Původně hojně využívaná cytologie, je ale postupně nahrazována HPV detekčními metodami s cytologií jako triážovým testem. Cytologické vyšetření prostřednictvím Pap testů nebo LBC má řadu nedostatků. Pap testy jsou poměrně časově náročné, celý proces přípravy není dobře reprodukovatelný a při přípravě preparátu dochází k nerovnoměrné distribuci buněk (Chrysostomou *et al.*, 2018). Tyto nedostatky mohou být příčinou relativně nízké citlivosti ve srovnání s HPV testy a některé vzorky tedy mohou být vyhodnoceny jako falešně negativní (Koliopoulos *et al.*, 2017; Bruhn *et al.*, 2018). Proto musí být cytologický screening opakován v kratších intervalech.

Potenciál k dalšímu zlepšování detekce preinvasivního onemocnění a také ke snížení výskytu lézí vysokého stupně představují detekční metody na HPV DNA.

### 5.3.2 HPV detekční metody

Metody založené na detekci HPV byly původně používány pouze pro triážové testování po abnormálním výsledku z cytologického vyšetření, které se podle systému



Bethesda II (z roku 2001) klasifikuje jako ASCUS (atypické skvamózní buňky neurčeného významu; Mayrand *et al.*, 2007). Postupně se ale tyto metody dostávají do popředí a stávají se součástí primárního screeningu. Řadou studií byla prokázána větší senzitivita HPV detekčních metod při detekci cervikálních intraepiteliálních neoplazií (CIN) ve srovnání s cytologií (Tae-Wook *et al.*, 2020; Rijkaart *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2020; Ronco *et al.*, 2010). Ačkoli je tedy screening založený na cytologii součástí prevence proti rakovině děložního hrdla několik let a vedl k podstatnému snížení mortality, screening založený na HPV poskytuje větší a delší ochranu proti invazivním karcinomům než screening cytologický.

V současnosti je primární screening založený na testování HPV implementován v Turecku (od roku 2014), Austrálii, Nizozemsku (od roku 2017) a Novém Zélandu (od roku 2018; Wentzensen *et al.*, 2016). V některých evropských státech jako Itálie, Švédsko, Finsko a Španělsko je implementace na regionální úrovni. Norsko, Dánsko, Anglie, Německo, Belgie a Malta jsou ve fázi implementace (Maver *et Poljak*, 2019). V České republice jsou HPV DNA testy používány pouze pro triáž nebo pro kontrolu po konizaci či ablaci a nejsou hrazeny z veřejného zdravotního pojištění.

Metody detekce HPV můžeme rozdělit na techniky využívající přímou hybridizaci virové DNA s RNA sondou (Southern blotting, hybridizace *in situ*, dot-blot hybridizace) nebo techniky amplifikační, které jsou založené na amplifikaci signálu nebo na amplifikaci cílového místa – polymerázové řetězové reakci (Koliopoulos *et al.*, 2017). Součástí některých HPV detekčních metod je také možnost genotypizace, což poskytuje informaci nejen o přítomnosti HPV infekce ve vzorku, ale také informaci o konkrétním typu HPV, které se liší svým karcinogenním účinkem. Klinicky významné jsou testy, které umožňují částečnou genotypizaci a to především nejvíce rizikových typů HPV16 a HPV18, které bývají spojovány s nejzávažnějšími prognózami.

Výzkumné a klinické laboratoře využívají k detekci a identifikaci HPV DNA hlavně testy založené na PCR. Pro tyto testy mohou být použity buď konsensuální nebo typově specifické sady primerů. Nejčastěji používané systémy konsensuálních primerů jsou cílené do oblasti vysoce konzervovaného genu *L1* a amplifikují různě dlouhé úseky nebo do oblastí časně se replikujících genů. Používá se směs primerů odvozených z degenerovaných primerů MY09/11 a označovaných jako PGMY09/11, dále jsou využívány obecné primery –

GP5+/6+, primery označované jako SPF10 a sada primerů CPI/IIIG, cílená do oblasti genu *E1* (Baay *et al.*, 1996; Abreu *et al.*, 2012; Eide *et al.*, 2012). Po amplifikaci mohou být genotypy HPV detekovány a analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu nebo typově specifickou analýzou pomocí metody RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů), přímého sekvenování, hybridizací s typově specifickými sondami nebo PCR s typově specifickými primery (Koliopoulos *et al.*, 2017). Další možností, jak lze identifikovat konkrétní HPV genotyp je real-time PCR, která využívá sekvenčně specifické fluorescenčně značené sondy nebo analýzu křivky tání SYBR Green I (Tsakogiannis *et al.*, 2017). Výhodou této metody je především reprodukovatelnost, rychlost, použitelnost pro klinické vzorky a také schopnost detekovat virovou zátěž (Roberts *et al.*, 2008).

#### 5.3.2.1 Komerčně dostupné HPV testy

Od července 2018 je na světovém trhu k dispozici nejméně 250 různých komerčních testů na detekci alfa HPV a nejméně 230 variant původních testů (Chrysostomou *et al.*, 2018). Problémem je, že většina testů není klinicky validována a výsledky výkonu testů nejsou zveřejněny v recenzované literatuře. Pro HPV detekci by měly být použity jen takové testy, které splňují pokyny vypracované Meijerem *et al.* v roce 2009. Kandidátské diagnostické testy jsou porovnávány s jedním ze standardních srovnávacích testů (Hybrid Capture II – Qiagen, GP5+/6+ PCR-EIA – Diassay), které byly validované v klinických studiích. Pro splnění kritérií by diagnostický test měl prokázat relativní citlivost a specifitu k detekci CIN2+ ve srovnání se standardními srovnávacími testy vyšší než 0,90 respektive 0,98 (Meijer *et al.*, 2009). Takové testy tedy prokazují reprodukovatelnou, trvale vysokou citlivost na CIN2+ a CIN3+ léze a pouze minimální detekci klinicky irelevantních přechodných HPV infekcí (Von Karsa *et al.*, 2015).

Od července 2019 pouze 15 HPV testů splňuje mezinárodní konsenzuální směrná kritéria pro primární screening karcinomu děložního hrdla. Podle Meijerových kritérií jsou testy klinicky validované pro použití v Evropě (tabulka 3; Meijer *et al.*, 2009; Arbyn *et al.*, 2015; Burd, 2014). V USA byly schváleny čtyři testy (Hybrid Capture 2 – Digene Corporation; Cervista – Hologic; Aptima – Gen-Probe; Cobas 4800 – Roche Molecular Systems) Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro použití při screeningu karcinomu děložního hrdla. Ale pouze Cobas 4800 v dubnu 2014 získal schválení pro primární cervikální screening (Mariani *et al.*, 2016).

V roce 2015 byly vyvinuty a zveřejněny doplňky evropských pokynů pro zajištění kvality při screeningu rakoviny děložního hrdla, včetně 36 doporučení zabývajících se různými aspekty screeningu založeného na HPV (Maver *et* Poljak, 2019). Tyto směrnice doporučují zahájit rutinní primární HPV screening u žen starších 30–35 let z důvodu výskytu častějších přechodných infekcí právě u mladších žen. Pro ukončení HPV screeningu není jasně definována optimální věková hranice, proto se HPV screening řídí doporučením pro cytologii. V Evropě je doporučený interval screeningu pro HPV-negativní ženy nejméně 5 let a může být prodloužen až na 10 let v závislosti na věku a historii screeningu (Von Karsa *et al.*, 2015).

**Tabulka 3.:** Přehled testů pro detekci a genotypizaci HPV klinicky validovaných v Evropě dle Meijerových kritérií (upraveno dle Arbyn *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2019; Tuerxun *et al.*, 2016; Geraets *et al.*, 2014; Cuzick *et al.*, 2013)

Test	Validované dle Meijerova protokolu	Typ amplifikace	Možnost genotypizace	Cílový gen/HPV typy	Interní kontrola	Klinická senzitivita pro CINII	Klinická specifita pro CINII
Hybrid capture 2 high risk HPV DNA test (Qiagen)	Ano	Signál	Ne	Celý genom; 13 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)	Ne	98,7 %	94,1 %
GP5+/6+ PCR-EIA	Ano	Cílové místo	Ne	<i>L1</i> ; 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	Ne	98,7 %	96 %
Cervista HPV HR and genfind DNA extraction kit (Hologic GenProbe, Inc.)	Ano	Signál	Ne	<i>L1, E6, E7</i> ; 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	Inertní kontrola; HIST2H2BE	89–98,4 %	85,2–91,2 %
Cobas HPV test (Roche Molecular System, Inc.)	Ano	Cílové místo	Pouze HPV16 a HPV18	<i>L1</i> ; 14 hrHPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), identifikuje HPV16 a 18	Inertní kontrola; $\beta$ -globin	90–98,3 %	86,2–94,6 %
PapilloCheck HPV (Greiner BioOne GmbH)	Ano	Cílové místo	Všech 18 podtypů	ORF <i>E1</i> ; 18 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82), 6 lrHPV (6, 11, 40, 42, 43, 44)	Inertní kontrola; ADAT1	95,8 %	96,7 %
Abbott real-time high-risk HPV test (Abbott Molecular GmbH&Co.)	Ano	Cílové místo	Samostatně identifikuje HPV16 a HPV18	<i>L1</i> ; 12 hrHPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	Inertní kontrola; $\beta$ -globin	95,6–100 %	92–93,3 %

**Tabulka 3. – pokračování:** Přehled testů pro detekci a genotypizaci HPV klinicky validovaných v Evropě dle Meijerových kritérií.

BD Onclarity (Becton, Dickinson and Company)	Ano	Cílové místo	8 HPV genotypů ve třech různých skupinách (33/58, 56/59/66, 35/39/68)	E6/E7 DNA; 14 hrHPV (16, 18, 31, 45, 51 a 52, 33, 58, 35, 39, 68, 56, 59, 66)	Inertní kontrola; $\beta$ -globin	92,9 %	87,7 %
HPV-Risk (Self-Screen BV)	Ano	Cílové místo	Samostatně identifikuje HPV16 a HPV18	E7 DNA; 15 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68)	Inertní kontrola; $\beta$ -globin	97,1%	94,3 %
Aptima HPV assay (Hologic GenProbe, Inc.)	Ano	Cílové místo	Ne	E6/E7 mRNA; 14 hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	Externí kontrola; neinfekční RNA transkript	95,5 %	94,5 %
qPCR (E6/E7)	Ano	Cílové místo	Samostatně identifikuje hrHPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; 53, 6, 11	E6/E7 DNA	Inertní kontrola; $\beta$ -globin	93,5 %	95,6 %
GP5+/6+–LMNX	Částečně	Cílové místo	Samostatně identifikuje hrHPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; 26, 53, 73, 82	<i>L1</i>	Interní kontrola; DNA fragment lokalizovaný na chromozomu 14	96,1 %	90,8 %
careHPV Test	Částečně	Signál	Ne	Celý genom	Ne	83,3 %	84,9 %
MALDI-TOF	Částečně	Cílové místo	Samostatně identifikuje hrHPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	<i>L1</i>	Inertní kontrola; $\beta$ -globin	94,3 % *	89,4 % *
Prelect HPV-Proofer	Částečně	Cílové místo	Samostatně identifikuje HPV 16, 18, 31, 33, 45	E6/E7 mRNA	Inertní kontrola; U1 ribonukleoproteinová specifická mRNA	71,4 %	95,2 %

\* relativní specifita a senzitivita pro CINIII

## **5.4 Triážové testy používané ve screeningu karcinomu děložního hrdla**

Triážové testy slouží k managementu žen po primárním screeningu a jsou voleny na základě metody, která byla v primárním screeningu použita. V případě cytologie slouží jako triáž HPV testování, naopak u HPV primárního screeningu může být pro triáž použita cytologie, HPV genotypizace (HPV16 a HPV18) a řada dalších testů jako například imunologické barvení p16-Ki67, detekce HPV mRNA genů *E6/E7*, testy buněčné/virové metylace (Chrysostomou *et al.*, 2018) a test aberantní indukce S-fáze buněčného cyklu (Sahasrabudde *et al.*, 2011). V současné době však není dostatek údajů, které by tyto triážové metody mohly upřednostnit před cytologií.

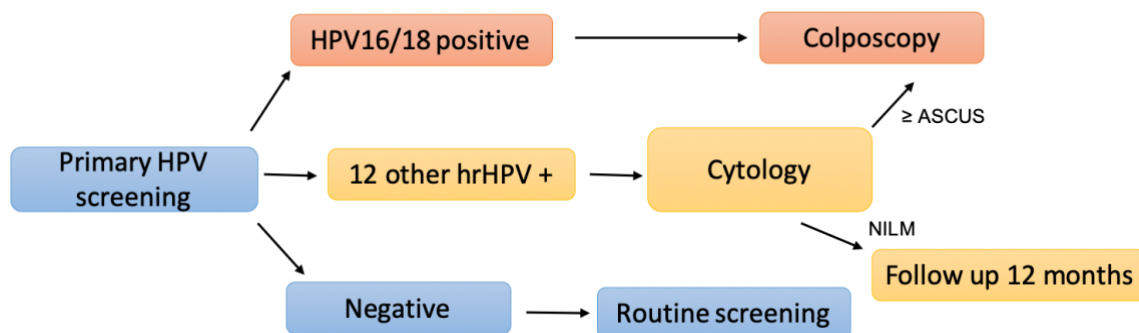
### **5.4.1 Triáž žen po primárním cytologickém screeningu**

V případě, kdy je výsledek cytologického vyšetření normální, je žena podrobena dalšímu cytologickému vyšetření v intervalu, který je dán screeningovým programem daného státu. Pokud je výsledkem ASCUS nebo opakované léze nízkého stupně, je jako triážový test použito HPV testování, které pomáhá vytrždit HPV-negativní vzorky a tím mnoho žen ušetřit kolposkopickému vyšetření. Proto jsou na kolposkopii okamžitě odeslány pouze ženy s cytologickými abnormalitami a HPV-pozitivním výsledkem nebo ženy s lézemi vysokého stupně (HSIL; Arbyn *et al.*, 2010).

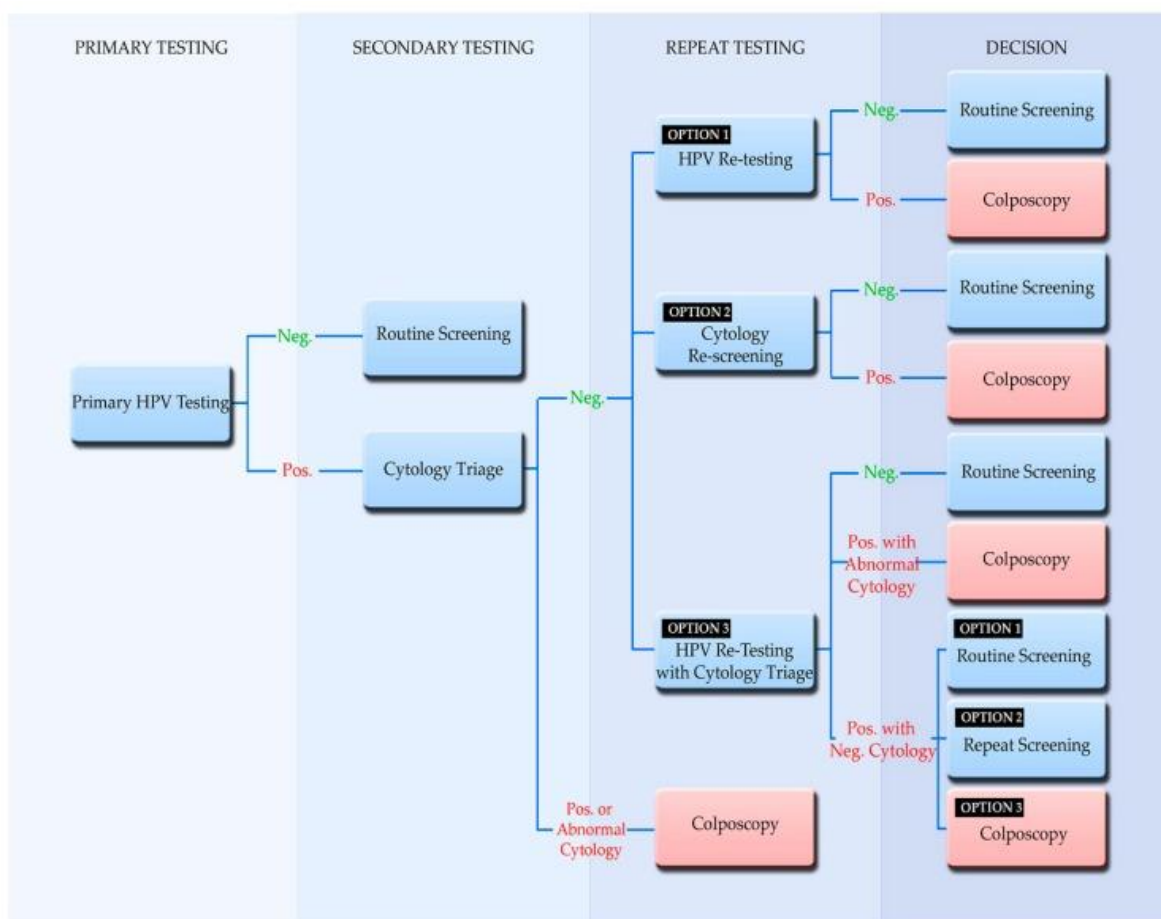
### **5.4.2 Triáž žen po primárním HPV screeningu**

U primárního HPV testování může být jako triážový test aplikováno cytologické vyšetření, které v případě pozitivních výsledků primárního HPV testování kompenzuje jeho nižší specifitu a může tak snížit počet žen doporučených ke kolposkopii. Pro management žen s pozitivním výsledkem primárního testu HPV a negativním výsledkem cytologie se doporučuje jiný postup než u cytologicky-pozitivních žen. Ženy infikované hrHPV, jsou stále ohroženy perzistující infekcí, i přes normální cytologické výsledky a proto vyžadují opakované testování v kratších intervalech než je rutinní screeningový interval, ale nejdříve po 6–12 měsících (Arbyn *et al.*, 2010). V souladu s evropskými směrnicemi, jsou všechny HPV-pozitivní ženy podrobeny cytologickému vyšetření. Organizace postupu/léčby u HPV pozitivních/negativních žen v případě HPV jako primárního screeningu, která je dána Evropskými směrnicemi je shrnuta na obrázku 6. V porovnání s Evropou je v USA

management HPV-pozitivním žen odlišný. Ženy pozitivní na podtypy HPV16 nebo HPV18 jsou okamžitě odeslány na kolposkopii, zatímco u žen pozitivních na jiné karcinogenní typy se provádí cytologie. Algoritmus pro primární HPV screening v USA shrnuje obrázek 5 (Wright *et al.*, 2015).



**Obrázek 5.:** Algoritmus managementu cervikálního screeningu schválený pro USA (převzato s úpravami od Wentzensen *et al.*, 2017).



**Obrázek 6.:** Algoritmus managementu cervikálního screeningu vyvinutý na základě dodatků druhého vydání Evropských směrnic pro zajištění kvality při screeningu rakoviny děložního hrdla z roku 2015 (převzato od Chrysostomou *et al.*, 2018).

#### 5.4.2.1 HPV genotypizace

Vzhledem k různým karcinogenním účinkům konkrétních typů HPV jsou využívány metody částečné nebo úplné genotypizace. Tyto metody mohou být použity, jak v primárním HPV screeningu, tak jako triážový test pro HPV-pozitivní ženy. V současné době je na trhu dostupných několik testů, které nabízí genotypizaci 13–14 HPV typů nebo rozlišují alespoň dva nejrizikovější typy HPV16 a 18 (viz tabulka 3; Cuschieri *et al.*, 2017). Tato triážová metoda je zahrnuta například v amerických směrnicích pro screening rakoviny děložního hrdla, kde je pro primární screening využíván Cobas test, poskytující okamžitou možnost třídění HPV-pozitivních žen (Wentzensen *et al.*, 2017).

#### 5.4.2.2 Imunologické barvení p16-Ki67

Metoda imunologického barvení p16-Ki67 je založená na koexpresi tumor supresorového proteinu p16 a buněčného markeru proliferace Ki67. Tato koexprese způsobuje deregulaci buněčného cyklu, která je indukována hrHPV a to zejména HPV16 a HPV18, proto může sloužit jako marker pro predikci buněčné transformace. Princip metody spočívá v detekci těchto proteinů protilátkami. Buňky, které jsou pozitivní na oba proteiny jsou charakteristické hnědou cytoplazmou při expresi p16 a tmavě červené až červeno-hnědé jaderné signály odrážejí kolokalizaci p16 a Ki67 ve stejné buňce (Yu *et al.*, 2019). Mnoho studií potvrzuje potenciální roli testu duálního barvení, neboť byla prokázána výrazně vyšší citlivost, 74,9 % při triážování HPV-pozitivních žen, než 51,9 % v Pap cytologii, ale specifická byla srovnatelná (Wright *et al.*, 2016). Pozitivita duálního barvení také silně indikuje CIN2+ nebo skvamózní intraepiteliální lézi vysokého stupně (HSIL), kdy se pozitivní míra zvýšila z 31 % u žen s negativní cytologií na 92 % u žen s HSIL. Podobně také i pozitivní míra koexprese proteinů p16-Ki67 u žen s CIN3 byla 86 %, což bylo významně více než 24 % u žen bez výsledků biopsie. Všechny pacientky s rakovinou děložního hrdla měly vzorky pozitivní na oba proteiny (Wentzensen *et al.*, 2015). Tato metoda představuje kvalitní marker pro stratifikaci HPV-pozitivních žen, včetně těch s normální cytologií a pro identifikaci CIN vysokého stupně u žen s diagnózou ASCUS nebo LSIL. Ve srovnání s Pap cytologií a detekcí HPV vykazuje vyšší citlivost a specifitu v detekci cervikálních prekancerózních lézí a rakoviny děložního hrdla. Kombinace duálního barvení p16-Ki67 a detekce hrHPV se doporučuje jako strategie pro sledování žen s cervikální intraepiteliální neoplazií vysokého stupně (Yu *et al.*, 2019).



#### 5.4.2.3 Detekce HPV mRNA genů E6/E7

Úroveň exprese HPV E6/E7 mRNA vysoce koreluje se závažností cervikálních lézí (Ho *et al.*, 2010). Onkogenní transkripty E6/E7 jsou při přechodné infekci obvykle exprimovány v nízkých hladinách. Pokud ale dojde k integraci virového genomu do hostitelského, transkripty onkogenů začnou být nadměrně exprimovány a vážou se na tumor supresorové proteiny p53 a pRb a řídí proliferaci a transformaci cervikálních buněk (Benevolo *et al.*, 2011; Castle *et al.*, 2007; Cuschieri *et al.*, 2008). Proto může být detekce HPV E6/E7 mRNA užitečná jako marker potenciálně progresivních infekcí hrHPV a může představovat užitečný nástroj pro screening nebo management pacientů (Sørbey *et al.*, 2011; Giorgi Rossi *et al.*, 2013). Pro detekci E6 proteinu z nejdůležitějších karcinogenních HPV typů (HPV18, 18, 45) byl vyvinut OncoE6 test (Wentzensen *et al.*, 2017). Studie vedená Yao *et al.* z roku 2017 ukázala, že metoda založená na detekci HPV E6/E7 mRNA v cervikálních exfoliovaných buňkách použitá jako triážový test pro HPV-pozitivní ženy dosáhla srovnatelných výsledků s cytologickým testem. Výsledky testu detekce mRNA byly v souladu s výsledky cytologických testů a oba triážové testy vedly k podobné citlivosti, specificitě, PPV a NPV při identifikaci HSIL+. Jiná studie ukázala vyšší prevalenci transkriptů E6 a E7 u pacientů s lézemi vyššího stupně (23,6 % u žen s CINI a 97,2 % žen s CIN2+; Bruno *et al.*, 2018).

#### 5.4.2.4 Buněčná metylace

Testování metylace DNA hostitelských tumor supresorových genů v cytologických vzorcích, je objektivní triážový test použitelný pro screening rakoviny děložního hrdla. Tyto epigenetické změny jsou důležitým mechanismem genové regulace a změna v metylaci DNA je časná a častá událost, ke které dochází během karcinogeneze (Hsu *et al.*, 2017). Tyto testy jsou robustní, mají potenciál pro různé stupně automatizace a mohou být snadno aplikovány na různé typy vzorků včetně vzorků získaných samoodběrem (Wentzensen *et al.*, 2017). Nyní jsou komerčně dostupné dva metylační testy, které mohou být použity pro triáž žen s hrHPV infekcí (GynTect® a QAIsure Methylation Test kit od firmy Qiagen). Mezi nejslibnější markery, které byly hodnoceny ve studiích screeningu rakoviny děložního hrdla patří: CADM1, MAL, miR-124, SOX1, TERT a EPB4113. Tyto markery byly srovnatelné s cytologií pro triážování HPV-pozitivních žen pro detekci závažných cervikálních prekanceróz a rakoviny (Clarke *et al.*, 2017). Slibně se jeví rovněž testování metylace *CDKN2A* (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A, gen kódující p16), u níž byla prokázána

rozdílná úroveň metylace u CIN nízkého stupně a CIN vysokého stupně (Wijetunga *et al.*, 2016).

## 5.5 Další možnosti triážových testů

Mimo již zmíněných používaných triážových testů, se rýsují další, které by bylo možné aplikovat pro detekci prekanceróz děložního hrdla. Jedním z markerů je virová metylace, dále pak chromosomální nestabilita na numerické nebo strukturální úrovni, která je charakteristickým znakem maligních nádorů (Duensing *et al.*, 2003). Biomarkery, které by v budoucnu mohly zlepšit screening rakoviny děložního hrdla, ale stále jsou ve fázi vývoje, jsou markery proteomické (Sahasrabudde *et al.*, 2011). Další potenciálně použitelný marker, který byl předmětem této práce je pozměněná exprese mikroRNA (miRNA, miR), která ovlivňuje expresi onkogenů, tumor supresorových genů a následně dereguluje důležité intracelulární dráhy (Babion *et al.*, 2018).

### 5.5.1 Virová metylace

Methylace HPV DNA se objevila jako nový diagnostický biomarker, který může pomoci odlišit benigní HPV infekce od těch, které postoupí až k prekanceróze. U řady karcinogenních typů byl pozorován charakteristický vzorec se zvýšenou metylací, zejména v genech *E2*, *L2* a *L1*. Jednotlivá CpG místa z těchto regionů vykazovala dobrou diskriminaci mezi infekcí HPV bez cytologických abnormalit a prekancerózou (Wentzensen *et al.*, 2017; Vinokurova *et al.*, 2011). Tyto práce ukazují, že by test metylace HPV DNA mohl sloužit pro triáž HPV-pozitivních žen. Jeho výhodou je možnost použití stejného vzorku, který byl použit pro test HPV. Nicméně stále mezi studii zkoumající virovou metylaci existují značné rozdíly. Úroveň metylace se mezi studii liší podle genotypu HPV, genu i mezi sousedními CpG místy. Metaanalýza Bowden *et al.* sledující úroveň metylace u HPV-pozitivních žen ukázala, že vyšší úroveň metylace HPV DNA je spojena se zvýšenou závažností onemocnění. Dále byla touto studií prokázána vysoká diagnostická přesnost metylace genů *L1*, *L2* genotypu HPV16 k detekci CIN vysokého stupně u HPV16-pozitivních žen (Bowden *et al.*, 2019).

### 5.5.2 Chromosomální nestabilita na numerické nebo strukturální úrovni

Mezi chromozomální abnormality patří delece, inserce, inverze a jiné přestavby buď celých chromozomů nebo jejich částí. Tyto změny jsou dobře detekovatelné fluorescenční

*in situ* hybridizací (FISH) nebo komparativní genomovou hybridizací (CGH). Mezi nejčastější chromozomální abnormality spojené s karcinomem děložního hrdla patří amplifikace regionu 1q, 3q, 5p, 8q a 20q (Hopley *et Gillespie*, 2016; Wentzensen *et von Knebel Doeberitz*, 2007). Většina studií popisovala zisk oblasti q26 chromozomu 3 (3q26), jako nejčastější abnormalitu spojenou s progresí premaligních lézí (Rodolakis *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2013; Koeneman *et al.*, 2019). V této oblasti jsou dva geny důležité pro karcinogenezi, gen pro telomerázu *TERC* (Telomerase RNA component) a katalytická podjednotka fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinázy (PIK3CA; Luhn *et al.*, 2013). Aktivace telomerázy je relativně časným procesem v karcinogenezi děložního hrdla a může tak být cenným markerem pro řízení a prognózu pacientů s cervikální intraepiteliální neoplazií (Jiang *et al.*, 2010). Další často popisovanou aberací je translokace regionu p15 chromozómu 5, neboť obsahuje katalytickou podjednotku genu *TERC* a translokace části dlouhého raménka chromozómu 20 obsahující kritické geny zapojené do patogeneze rakoviny děložního hrdla (Luhn *et al.*, 2013; Kudela *et al.*, 2014; Auslander *et al.*, 2019). Pro detekci 4 nejčastějších chromozomálních abnormalit vyskytujících se u rakoviny děložního hrdla slouží HPV-4C test (Cancer Genetics Inc) využívající 4 sondy pro 3q26, 5p15, 20q a centromeru 7. Použití tohoto testu může sloužit jako další triážová metoda, zejména pokud histologické nebo cytologické testy poskytují nejasné výsledky (Wentzensen *et von Knebel Doeberitz*, 2007).

### 5.5.3 Aberantní exprese miRNA

Z důvodu abnormální exprese miRNA u řady lidských malignit se v poslední době několik studií zaměřuje na miRNA jako na biomarkery pro diagnostiku, prognózování nebo predikci účinnosti léčby u nádorových onemocnění. Rozdíly v tumor-specifických expresních profilech miRNA by mohly být užitečné pro rozlišení různých cervikálních lézí (Pardini *et al.*, 2018). Změny v expresi jsou pozorovány v časných prekancerózních lézích a proto jsou vhodné jako biomarkery pro screening rakoviny děložního hrdla. Specifické miRNA jsou často umístěny v genomických oblastech souvisejících s rakovinou, zahrnující fragilní místa, kde dochází k integraci HPV nebo v jejich blízkosti (Nambaru *et al.*, 2009). miRNA jsou nekódující RNA dlouhé přibližně 19–24 nukleotidů, které hrají důležitou roli v posttranskripčním genovém umlčování cílových mRNA (Bartel, 2004). Jsou zapojeny do mnoha biologických procesů jako je buněčná proliferace, apoptóza, vývoj, diferenciace, metabolismus, imunita, stresová reakce, stárnutí a kontrola buněčného cyklu (Bartel, 2004;

Ambros *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2008; Plasterk, 2006). Také představují důležité regulátory genové exprese, zapojené do mnoha důležitých intracelulárních cest jako tumor supresorové geny nebo onkogeny (Bartel, 2004).

miRNA je v jádru transkribována RNA polymerázou II nebo III jako dlouhý, uzavřený, polyadenylovaný primární prekurzor (pri-miRNA) (Lee *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2003). Výsledná pri-miRNA je zpracována enzymem Drosha (ribonukleáza III) a dvouvláknovým proteinem Pasha (DGCR8) vázajícím se na DNA (Ambros *et al.*, 2004) za vzniku prekurzorové miRNA (pre-miRNA; Lee *et al.*, 2003). pre-miRNA je do cytoplazmy transportována exportinem 5, kde je zpracovávána endonukleázou Dicer za vzniku dvouřetězcové struktury RNA o délce cca 22 nukleotidů. Tento miRNA duplex se odvíjí do zralé jednovláknové formy a je začleněn do RNA-indukovaného umlčujícího komplexu (RISC). miRNA se váže na 3' UTR oblast (3' untranslated region – 3' nepřekládaná oblast) cílové mRNA, konkrétně na sekvenci komplementární k interferující RNA. Pokud dojde k dokonalému spárování, je cílová mRNA rozštěpena. V případech částečné komplementarity dochází k translační represi. Aberantní exprese jediné miRNA je schopna narušit expresi několika mRNA a proteinů (Chin *et al.*, 2008).

miRNA mohou být buď nadměrně exprimovány (up-regulovány; onkogenní funkce) nebo down-regulovány (tumor supresorová funkce). Tyto změny exprese jsou často asociovány s genetickými (např. delece, amplifikace a bodové mutace) a epigenetickými (histonovými modifikacemi a aberantní DNA metylací) změnami (Davis-Dusenbery *et al.*, 2010; Iorio *et al.*, 2012). Globálně změny expresí miRNA vedou k narušení několika hladin onkogenních nebo tumor supresorových proteinů, které mění buněčný růst tím, že podporují malignitu nádoru (Iorio *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015).

Pro tuto práci bylo na základě recenzování ve více relevantních článcích (Snoek *et al.*, 2018; Paradini *et al.*, 2018; Babion *et al.*, 2017) vybráno 6 up-regulovaných, 2 down-regulované a jedna miRNA pro normalizaci u cervikálních tkání (vybrané miRNA shrnuje tabulka 4). U všech těchto miRNA byla prokázána výrazná role při rozvoji cervikálního karcinomu. V mnoha studiích byla v tkáních rakoviny děložního čípku prokázána up-regulace hsa-miR-20a-5p, jejíž funkce souvisí s nadměrnou expresí TNKS2 (tankyrasa 2) a genů souvisejících s elk-tyrosin kinázou. Ty hrají roli v angiogenezi, proliferaci endometriálního karcinomu, migraci a invazi cervikálních rakovinových buněk (Huang *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2012). hsa-miR-93-5p cílí na skupinu antiproliferačních genů *BTG3* (BTG antiproliferační faktor 3), inhibice této miRNA vede k inhibici vývoje cervikálního karcinomu (Li *et al.*, 2019). Zvýšená exprese hsa-miR-21-5p inhibuje PDCD4 (protein programované buněčné smrti 4) a dále vede k downregulaci VHL (von Hippel-Linday) tumor supresorového proteinu, cílením na 3'UTR mRNA, což vede ke zvýšené proliferaci, migraci a invazivitě cervikálních rakovinových buněk (Cia *et al.*, 2018; Deftereos *et al.*, 2011). Cílem hsa-miR-10a-5p jsou *HOX* geny (rodina transkripčních faktorů, hrající roli v ontogenetickém vývoji) a 3'UTR mRNA genu *CHL1* (cell adhesion molecule L1-like), jehož potlačení exprese vede ke zvýšené tvorbě buněčných kolonií, migraci a invazivitě (Pereira *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2012). hsa-miR-16-5p cílí na apoptotický regulační protein BCL2 a transformační růstový faktor TGF- $\beta$  (Pereira *et al.*, 2010). hsa-miR-222-3p také hraje důležitou roli v tumorogenezi cervikálního karcinomu pravděpodobně down-regulací tumor supresorových genů *p27/Kip1* a *PTEN* (Song *et al.*, 2019). Naproti všem předchozím vybraným miRNA má hsa-miR-34a-5p antionkogenní funkci. Představuje hlavní cíl tumor supresorového proteinu p53, který svou aktivací indukuje transkripci miR-34a cílící na molekuly podílející se na buněčné transformaci a karcinogenezi. V normální tkáni tedy indukuje zastavení buněčného cyklu, inhibuje migraci a proliferaci nádorových buněk. V buňkách zasažených HPV infekcí, je ale tato miRNA down-regulována prostřednictvím E6 virového onkoproteinu destabilizující p53 (Córdova-Rivas *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2015). hsa-miR-29a-3p představuje další tumor supresorovou miRNA s funkcí zastavení buněčného cyklu a indukce apoptózy. Mezi potencionální cíle této miRNA patří transkripční faktor YY1 (Yin Yang) a CDK6 (cyklin-dependentní kináza) nezbytná pro přechod G1/S fáze buněčného cyklu (Sharma *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011). Jako normalizační miRNA pro stanovení relativní kvantifikace v cervikálních tkáních byla na základě literatury vybrána hsa-miR-423-3p (Babion *et al.*, 2017).

**Tabulka 4.:** Vybrané up/down-regulované miRNA a miRNA pro normalizaci u cervikálních tkání.

<b>Up-regulované</b>	hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-222-3p
<b>Down-regulované</b>	hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-29a-3p
<b>Normalizační</b>	hsa-miR-423-3p

## **6 Materiál a metody**

### **6.1 Biologický materiál**

Pro tuto práci bylo poskytnuto tkáňovou bankou (Národní centrum tkání a buněk, Brno) 41 vzorků nádorů cervixu dlouhodobě uchovávaných kryokonzervací v tekutém dusíku při -80 °C. Celý soubor nádorových tkání byl klinicky charakterizován (tabulka 11).

### **6.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky**

#### **6.2.1 Použité chemikálie**

- DEPC voda (diethyl pyrokarbonát) (Ambion)
- 99,8% ethanol (Sigma-Aldrich, kat.č. 51976)
- 99,5% chloroform (Sigma-Aldrich, kat.č. 288306)
- RNAsin ribonuclease inhibitor (Promega, kat.č. N2111)
- Qiazol lyzační činidlo (Qiagen, kat.č. 79306)
- TE pufr (pH 8; Thermo Fisher Scientific, kat.č. AM9861)

#### **6.2.2 Použité soupravy**

- miRNeasy Mini kit (Qiagen, kat.č. 217004)
- TaqMan advanced miRNA cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, kat.č. A28007)
- TaqMan advanced miRNA assay (Thermo Fisher Scientific, kat.č. A25576)

### **6.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

- chlazená centrifuga (Eppendorf)
- homogenizátor Mixer Mill 300 (Retsch)
- laminární box (BioAir)
- minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- mikrocentrifuga pro PCR stripy (GMCLab)
- nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Liquid Handler Echo 550 (LabCyte)
- pipetovací robot Freedom EVO (Tecan)
- vortex (Scientific Industries)
- LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche)
- Termocycler (Applied Biosystems)

- Vakuový centrifugační koncentrátor SpeedVac Eppendorf 5031 (Eppendorf)

## **6.4 Software**

- LightCycler 480 Software release 1.5.1 62 SP3
- Statistický software R version 3.5.0.

## **6.5 Metodika**

### **6.5.1 Analýza nádorových vzorků**

U všech vzorků nádorové tkáně byla Mgr. Hanou Jaworek, Ph.D. provedena HPV genotypizace pomocí systému PapilloCheck® HPV-Screening (dále jen PapilloCheck) a test metylace tumor supresorových hostitelských genů pomocí PreCursor-M kit metylačním testem (Self-screen).

### **6.5.2 Homogenizace cervikální tkáně**

Homogenizace vzorků nádorové tkáně probíhala v označených zkumavkách, do kterých byly přidány 2 sterilní skleněné kuličky o průměru 5 mm a 1 ml lyzačního činidla Qiazol. Z každého vzorku nádorové tkáně byl odebrán 0,5 cm segment, který byl následně nastříhán na malé kousky a vložen do zkumavky s lyzačním činidlem. Takto připravená tkáň byla homogenizována při rychlosti 30 Hz po dobu 8 minut. Po dokončení homogenizace následovala izolace RNA.

### **6.5.3 Izolace RNA z tkání**

Celková RNA byla izolována guanidinium thiokyanát-fenol-chloroformovou metodou pomocí miRNeasy Mini kit (Qiagen). Po homogenizaci byly vzorky 5 minut inkubovány při pokojové teplotě poté zvortexovány a opět 5 minut inkubovány, aby mohla proběhnout kompletní disociace nukleoproteinů. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl chloroformu, 3 minuty inkubováno při pokojové teplotě a centrifugováno při 12 000 g 15 minut. Následoval odběr svrchní vodné fáze do collection tube, ke které bylo přidáno 525 µl absolutního ethanolu. 700 µl směsi bylo přepipetováno na kolonku se zkumavkou a centrifugováno při 8 100 g 15 s (tento krok byl proveden 2x). Poté byla kolonka promyta 700 µl RWT pufru a centrifugována za stejných podmínek jako v předcházejícím kroku. Následovalo promytí kolonky 500 µl RPE pufru, centrifugace při 8 100 g 15 s a opět promytí stejným množstvím RPE pufru a centrifugace při 8 100 g 2 minuty. Kolonka byla přenesena



na novou collection tube a 1 minutu centrifugována při maximální rychlosti. Zachycená RNA byla z kolonky eluována do 60  $\mu\text{l}$  RNase-free vody.

Koncentrace vyizolované RNA byla měřena v přístroji NanoDrop ND 1000. Pro následnou RT-PCR amplifikaci byla vyizolovaná RNA naředěna na požadovanou koncentraci  $\leq 5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

#### 6.5.4 RT-PCR amplifikace

Získaná RNA byla převedena do cDNA templátu, což zahrnovalo několik kroků, od polyadenylační reakce, ligace adaptorů, reverzní transkripce až po zvýšení počtu kopií v miR-Amp reakci. Celý postup byl prováděn pomocí TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kitu (Thermo Fisher Scientific) podle pokynů výrobce.

Prvním krokem RT-PCR byla polyadenylační reakce, pro kterou byly na 1 vzorek připraveny 3  $\mu\text{l}$  reakční směsi v následujícím složení: 0,5  $\mu\text{l}$  10x Poly(A) pufru, 0,5  $\mu\text{l}$  ATP, 0,3  $\mu\text{l}$  Poly(A) enzymu, 0,3  $\mu\text{l}$  RNasinu, 1,4  $\mu\text{l}$  sterilní redestilované vody. K této reakční směsi byly přidány 2  $\mu\text{l}$  vyizolované naředěné RNA. PCR reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce 5.

**Tabulka 5.:** Podmínky polyadenylační reakce.

Proces	Teplota	Čas
Polyadenylace	37 °C	45 min
Stop reakce	65 °C	10 min
Hold (inkubace)	4 °C	$\infty$

V další reakci byly k miRNA s poly(A) koncem na 5'konec přiligovány adaptory sloužící jako vazebné místo pro forward primer v další reakci. Pro tuto reakci bylo na 1 vzorek připraveno 10  $\mu\text{l}$  reakční směsi v následujícím složení: 3  $\mu\text{l}$  5x ligačního pufru, 4,5  $\mu\text{l}$  50% PEG 8000, 0,6  $\mu\text{l}$  25x ligačních adaptorů, 1,5  $\mu\text{l}$  RNA ligázy, 0,4  $\mu\text{l}$  sterilní redestilované vody. Tato reakční směs byla přidána ke vzorkům z polyadenylační reakce. Ligace adaptorů probíhala za podmínek uvedených v tabulce 6.

**Tabulka 6.:** Podmínky reakce ligace adaptorů.

Proces	Teplota	Čas
Ligace	16 °C	60 min
Hold (inkubace)	4 °C	∞

Po předchozí modifikaci miRNA molekul byla provedena reverzní transkripce. Pro tuto reakci bylo na 1 vzorek připraveno 15 µl reakční směsi v následujícím složení: 6 µl 5x RT pufru, 1,2 µl dNTP, 1,5 µl 20x univerzálního RT primeru, 3 µl 10x RT enzym mix, 3,3 µl sterilní redestilované vody. Reverzní transkripce probíhala za podmínek uvedených v tabulce 7.

**Tabulka 7.:** Reakční podmínky reverzní transkripce.

Proces	Teplota	Čas
Reverzní transkripce	42 °C	15 min
Stop reakce	85 °C	5 min
Hold (inkubace)	4 °C	∞

Ke zlepšení následné detekce nízko-exprimujících se miRNA je zařazen krok miR-Amp reakce, který zvýší počet získaných cDNA molekul. Pro tuto reakci bylo na 1 vzorek připraveno 45 µl reakční směsi v následujícím složení: 25 µl 2x miR-Amp Master mixu, 2,5 µl 20x miR-Amp Primer mixu, 17,5 µl sterilní redestilované vody. K této reakční směsi bylo přidáno 5 µl cDNA. Amplifikační reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce 8.

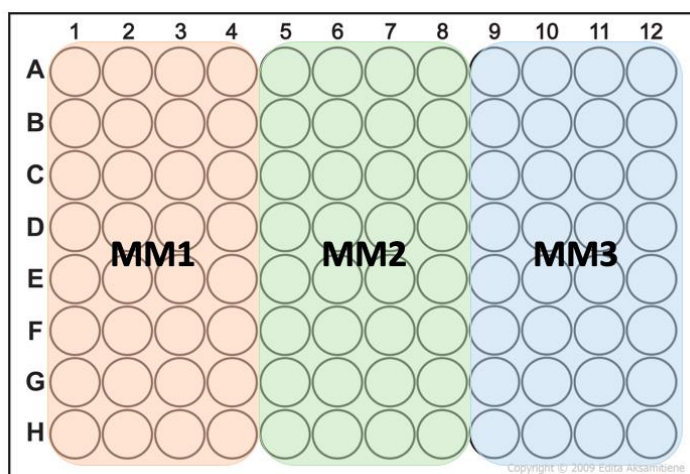
**Tabulka 8.:** Reakční podmínky cDNA amplifikace.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95 °C	5 min	1
Denaturace	95 °C	3 s	14
Annealing	60 °C	30 s	
Stop reakce	99 °C	10 min	1
Hold (Inkubace)	4 °C	∞	1

### 6.5.5 RT-qPCR

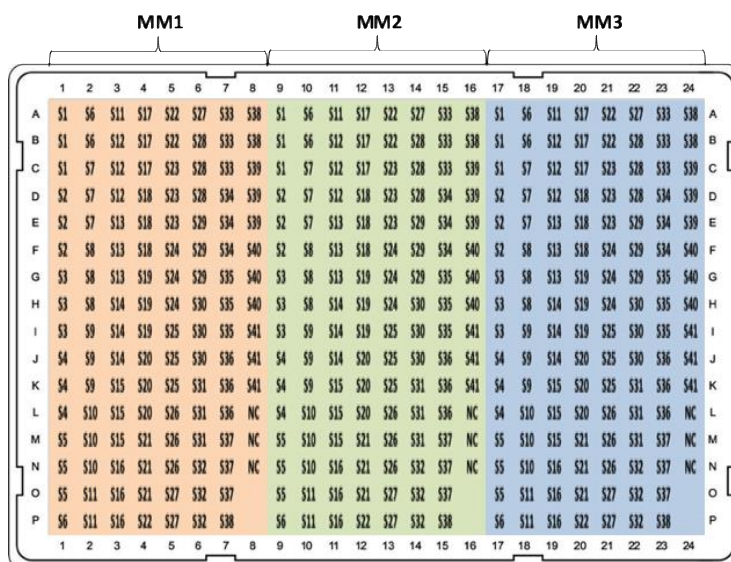
Kvantitativní real-time PCR byla provedena pomocí TaqMan Advanced miRNA assays (Applied Biosystems). Pro tuto reakci byla získaná cDNA 10x naředěna 0,1x TE puforem. Připravená cDNA pro každý vzorek byla pomocí liquid handleru Echo 550 po 2,5 µl

přenesena do tří 384-jamkových destiček. Vzorky cDNA byly nanášeny v triplikátech. Dále bylo pro tuto reakci na 1 vzorek připraveno 7,5 µl reakční směsi pro každou miRNA v následujícím složení: 5 µl 2x TaqMan Fast Advanced Master mixu, 0,5 µl 20x TaqMan Advanced miRNA assay, 2 µl sterilní redestilované vody. Tyto master mixy byly postupně připraveny pro všech 9 miRNA a dle schématu (uvedeného na obrázku 7) rozpipetovány do tří 96-jamkových destiček. Z těchto destiček byla reakční směs pro jednotlivé miRNA připipetována pomocí pipetovacího robotu Tecan do tří 384-jamkových destiček již obsahujících 2,5 µl cDNA (schéma na obrázku 8).



**Obrázek 7.:** Schéma pipetování master mixu do 96-jamkové destičky pro jednotlivé miRNA. Zde znázorněna jedna destička se třemi různými master mixy, celkem byly nachystány tři pro 9 vybraných miRNA.

MM – master mix, barevně a číselně odlišené jamky se stejným master mixem



**Obrázek 8.:** Schéma pipetování master mixu pro jednotlivé miRNA do 384-jamkové destičky. Zde znázorněna jedna destička se třemi různými master mixy, celkem byly nachystány tři pro 9 vybraných miRNA.

MM – master mix, barevně a číselně odlišené jamky se stejným master mixem; S1, 2, 3... (= sample) – jednotlivé vzorky v triplikátech; NC – negativní kontrola

Pro real-time PCR byl použit LightCycler 480 od firmy Rosche a celá reakce probíhala za reakčních podmínek uvedených v tabulce 9. Detekce fluorescence použitých TaqMan sond značených fluorochromem FAM probíhala při 498–580 nm. Pro analýzu výsledků a stanovení Ct hodnot (threshold cycle) byla použita metoda Abs Quant/2nd Derivative Max (Absolute quantification analyses using the second derivative maximum) a počítačový program LightCycler 480 Software release 1.5.1 62 SP3.

**Tabulka 9.:** Podmínky real-time kvantitativní PCR.

Proces	Teplota	Čas	Ramp rate	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95 °C	20 s	1,9 °C/s	1
Cycling	60 °C	40 s	1,6 °C/s	40
Hold	37 °C	1 s	2,5 °C/s	1

### 6.5.6 Analýza dat

Na základě klinických charakteristik byly jednotlivé vzorky rozděleny do skupin. V těchto skupinách byl pro naměřené Ct hodnoty stanoven medián včetně rozpětí min-max. Dále byly ve statistickém softwaru R ver. 3.5.0. provedeny testy nezávislosti pro počty exprimovaných miRNA vzhledem k jednotlivým faktorům. Při splnění předpokladů byl použit Pearsonův chí-kvadrát test a při nesplnění Fisherův exaktní test. Statisticky významná exprese miRNA u jednotlivých skupin vzorků byla graficky vyjádřena skládaným sloupcovým grafem. Jako statisticky významné byly hodnoceny hodnoty  $p < 0,05$ .

## 7 Výsledky

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je možné některé z vybraného souboru miRNA použít pro triáž HPV pozitivních žen. Dále vyhodnotit korelaci mezi zjištěnou expresí miRNA a přítomností HPV či konkrétního HPV genotypu v nádorových vzorcích a v neposlední řadě porovnat expresi miRNA s klinickými charakteristikami nádoru (stádium, zasažení uzlin).

### 7.1 Charakterizace vzorků

Soubor vzorků nádorových tkání byl patologicky charakterizován na základě TNM klasifikace sloužící k popisu anatomického rozsahu nádoru a určení stádia onemocnění (tabulka 10). Hodnota T označuje rozsah primárního nálezu, N označuje nepřítomnost či přítomnost a rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách, M označuje nepřítomnost či přítomnost vzdálených metastáz. Jednotlivé kategorie TNM se dále označují číslicemi od 0 do 4 a mohou být rozděleny i do podkategorií označených jak číslicí, tak písmenem ([www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)).

**Tabulka 10.:** Počet analyzovaných vzorků v jednotlivých TNM kategoriích.

TNM klasifikace	Počet vzorků
pT1	3
pT1N0	22
pT1N1	9
pT2N1	3
pT4	3

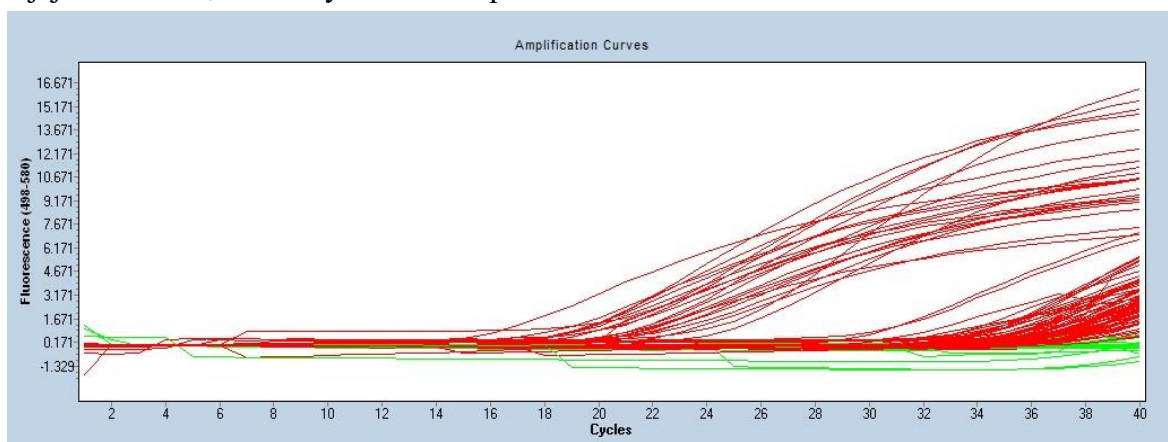
p – patologická klasifikace; T – tumor; N – mízní uzliny; 0–4 – velikost nádoru/rozsah postižení uzlin

Z celého souboru 41 nádorových tkání bylo 40 pozitivních na test metylace tumor supresorových genů provedený pomocí PreCursor-M kitu. U jednoho vzorku tento test opakovaně selhal. Dále byla u všech vzorků stanovována HPV pozitivita pomocí PapilloCheck testu. U 33 vzorků byl test detekce HPV pozitivní, přičemž u všech těchto vzorků byl detekován genotyp vysoce rizikových HPV (HPV16, 18, 31, 45 a 68). Zbylých 8 vzorků bylo HPV negativních i přesto, že se u všech 41 vzorků jednalo o nádorovou tkáň. Ze vzorků zamražené nádorové tkáně úspěšně izolována RNA o koncentraci v rozmezí 31,59–2244,29 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> (average 400,83; medián 226,39). Výsledky metylačního testu,

genotypizace i TNM klasifikace, včetně koncentrací vyizolované RNA všech analyzovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce 11. Pro následnou kvantitativní real-time PCR bylo potřeba získanou RNA naředit na požadovanou koncentraci  $\leq 5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  a procesem reverzní transkripce převést do podoby cDNA. Tento krok byl proveden pomocí TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kitu (Thermo Fisher Scientific).

## 7.2 Výsledky RT-PCR

Připravená cDNA byla amplifikována pomocí real-time PCR ve třech 384-jamkových destičkách vždy se třemi master mixy vybraných miRNA. Pro vizualizaci nárůstu PCR produktu byly použity hydrolyzační TaqMan sondy, které byly součástí TaqMan Advanced miRNA assays kitu (Applied Biosystems). Během reakce byla sledována amplifikace produktů pomocí zaznamenávání amplifikačních křivek (obrázek 9). Jeden vzorek byl pro kontrolu pipetován ve třech opakováních (triplikát). Pomocí softwaru LightCycler 480 Software release 1.5.1 62 SP3 byla stanovena Ct hodnota každého vzorku pro jednotlivé miRNA a pro každý triplikát byla vypočítána průměrná Ct hodnota. Pro normalizaci dat v cervikálních tkáních byla na základě publikace Babion *et al.* vybrána hsa-miR-423-3p. Bohužel se tato miRNA opakovaně ukázala jako nevhodná pro hodnocení genové exprese v nádorových tkáních a proto nemohla být provedena relativní kvantifikace. hsa-miR-423-3p byla exprimována pouze u 28 vzorků ze 41. Z tohoto důvodu bylo hodnocení exprese miRNA provedeno pouze z naměřených absolutních Ct hodnot. Hodnocení exprese miRNA bylo analyzováno ve vztahu k jednotlivým nádorovým stádiím a jejich rozsahu, dále k výsledkům PapilloCheck testu.



**Obrázek 9.:** Amplifikační křivky produktů ve vzorcích s cDNA se třemi miRNA (hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-21-5p). Zelené křivky – negativní vzorky; Červené křivky – pozitivní vzorky.

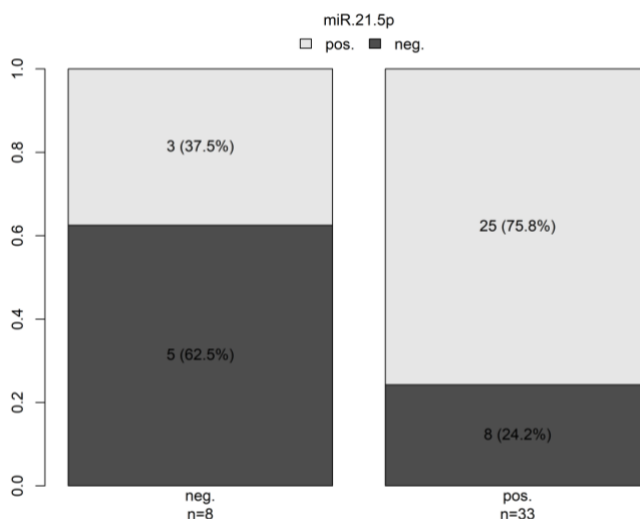
**Tabulka 11.:** Klinická charakterizace všech analyzovaných vzorků, výsledky genotypizace HPV, včetně koncentrace vyizolované RNA z nádorových tkání.

Označení vzorku	Druh vzorku	T	N	Kód diagnózy	PapilloCheck závěr	PreCursor-M kit závěr	Koncentrace [ng-μl <sup>-1</sup> ]
16/83	nádorová tkáň	pT1b2	pN1	C530	HPV16	pozitivní	217,28
15/638	nádorová tkáň	ypT4		C539	HPV16	pozitivní	65,01
15/349	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16	pozitivní	262,41
15/265	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C530	HPV16	pozitivní	620,02
14/839	nádorová tkáň	ypT4	ypN1	C530	HPV16	pozitivní	466,19
15/178	nádorová tkáň	ypT1b1 yp		C539	HPV16, 45	pozitivní	126,95
16/434	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C531	HPV16	pozitivní	102,12
15/566	nádorová tkáň	pT2a2	pN1	C539	negativní	pozitivní	97,53
16/56	nádorová tkáň	pT1b2	pN0	C531	HPV16	pozitivní	382,44
15/676	nádorová tkáň	pT1b1	pN1	C539	HPV16	pozitivní	399,81
16/348	nádorová tkáň	pT1c		C530	negativní	pozitivní	187,21
14/732	nádorová tkáň	pT2b	pN1	C539	HPV16	pozitivní	378,90
14/42	nádorová tkáň	pT1a1	pN0	C530	HPV16	pozitivní	964,59
14/440	nádorová tkáň	pT2b	pN1	C539	HPV16	pozitivní	201,54
14/208	nádorová tkáň	pT1b2	pN0	C538	HPV18	pozitivní	1113,26
14/186	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16	pozitivní	226,39
14/127	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16, 31	pozitivní	771,79
13/101	nádorová tkáň	pT1	pN0	C541	negativní	pozitivní	2244,29
13/347	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C531	HPV16	pozitivní	949,47
12/6	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C531	HPV16	pozitivní	1034,73
12/781	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16	pozitivní	440,20
12/604	nádorová tkáň	pT1b1	pN1	C531	HPV16, 45	pozitivní	770,35
12/550	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	negativní	pozitivní	750,67
12/42	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	negativní	pozitivní	741,52
12/385	nádorová tkáň	pT1b2	pN1	C531	HPV16	pozitivní	55,56
12/371	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C531	HPV16	pozitivní	383,95
11/557	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16	pozitivní	180,19
11/572	nádorová tkáň	pT1a	pN1	C531	HPV16	pozitivní	197,50
11/46	nádorová tkáň	pT1b1	pN1	C539	negativní	pozitivní	309,18
11/406	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16	pozitivní	72,21
11/352	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C531	HPV16, 45	pozitivní	280,34
11/350	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV18	pozitivní	255,70
11/30	nádorová tkáň	ypT4	ypN0	C539	HPV16	pozitivní	219,26
11/212	nádorová tkáň			C531	negativní	pozitivní	31,59
10/752	nádorová tkáň	pT1b2	pN1	C539	HPV45	pozitivní	101,03
10/742	nádorová tkáň	pT1b1	pN1	C531	negativní	pozitivní	103,69
10/607	nádorová tkáň	ypT1b1 yp		C539	HPV68	x	44,93
10/533	nádorová tkáň	pT1b1	pN1	C539	HPV16	pozitivní	148,12
10/530	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C530	HPV16, 18	pozitivní	149,05
10/497	nádorová tkáň	pT1b1	pN0	C539	HPV16	pozitivní	198,30
10/442	nádorová tkáň	pT1b2	pN0	C530	HPV16	pozitivní	188,59

T sloupec – stádium tumoru; N sloupec – zasažení mízních uzlin; p – patologická klasifikace; y – postterapeutická klasifikace; 0–4, a–c – velikost nádoru/rozsah postižení uzlin; C53 – zhoubný novotvar hrdla děložního (0 – endocervix, 1 – exocervix, 8 – léze přesahující hrdlo děložní, 9 – hrdlo děložní NS)

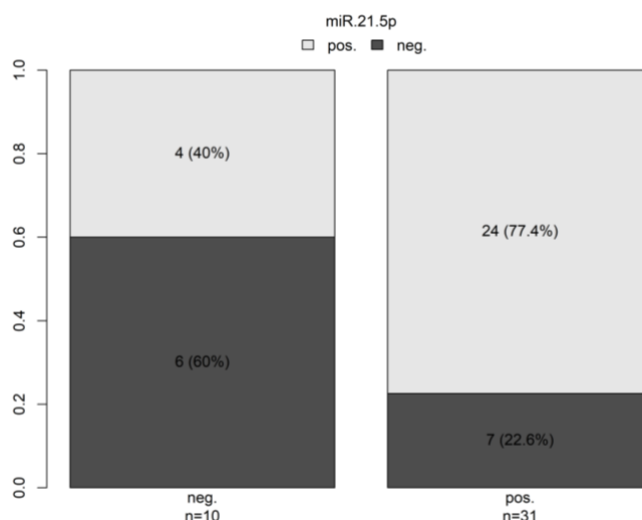
Na základě klinických charakteristik byly jednotlivé vzorky rozděleny do skupin dle stádia nádoru, zasažení mízních uzlin, přítomnosti HPV infekce, genotypu HPV16, 18 nebo jiných. V rámci T skupiny byly vzorky dále kategorizovány do 4 podskupin charakterizující rozsah nádoru. Pro jednotlivé skupiny byl z průměrných Ct hodnot triplikátů vypočítán medián Ct hodnoty a její celkové rozpětí (tabulka 12, str. 44). Dále byla ve stejných skupinách hodnocena proporce pozitivních vzorků (tabulka 13, str. 45, 46). Na základě získaných dat byla mezi skupinami vzorků srovnávána exprese vybraných miRNA a hodnocena statistická významnost.

Naměřená data ukazují, že nebyla zjištěna žádná statisticky významná korelace mezi stádiem nádoru a změnou exprese miRNA (T skupina vzorků; tabulka 13). Nicméně v ostatních hodnocených skupinách byla nalezena korelace mezi expresí miRNA a HPV pozitivitou/negativitou nebo zasažením mízních uzlin. Statisticky významná korelace byla nalezena u up-regulované miR-21-5p, která byla častěji detekována u skupiny HPV pozitivních a HPV16, 18 pozitivních vzorků ve srovnání se vzorky HPV negativními. Exprese miR-21-5p byla nalezena u 37,5 % HPV negativních nádorů v porovnání se 75,8 % u nádorů HPV pozitivních ( $p = 0,084$ ; graf 1). Podobně byla exprese miR-21-5p signifikantně nižší u HPV16/18 negativních oproti HPV16/18 pozitivním vzorkům (40% vs. 77,4 %;  $p = 0,049$ ; graf 2).



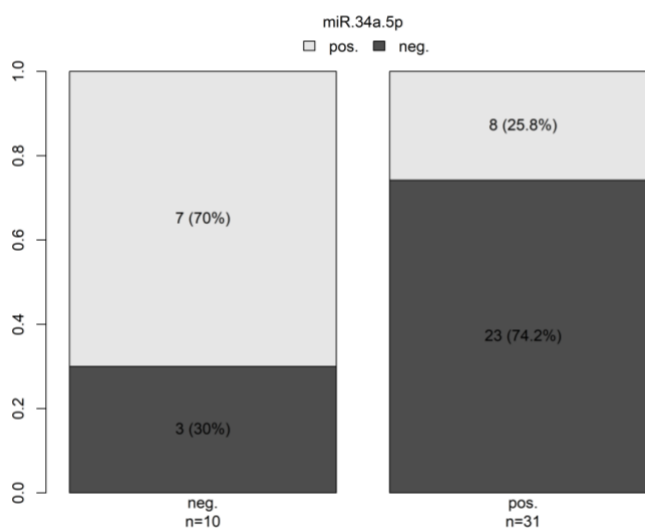
**Graf 1.:** Srovnání exprese miR-21-5p u HPV pozitivních (n = 33) a HPV negativních cervikálních nádorů (n = 8).





**Graf 2.:** Srovnání exprese miR-21-5p u cervikálních nádorů s HPV16/18 pozitivitou (n = 31) a nádorů s pozitivitou jiného HPV genotypu/HPV negativitou (n = 10).

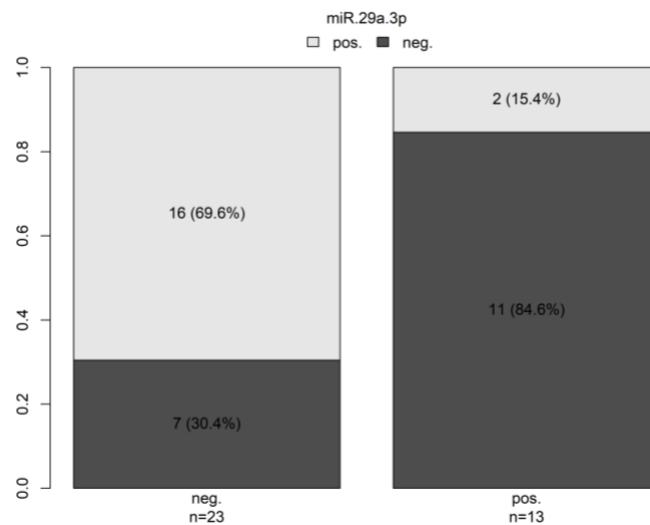
Další signifikantní změna byla nalezena u miR-34-5p, jejíž exprese bývá u HPV pozitivních nádorů down-regulována jako důsledek inaktivace p53. Exprese miR-34a-5p byla detekována pouze ve 25,8 % HPV16/18 pozitivních vzorků, což je o 44,2 % méně než u HPV16/18 negativních (p = 0,022; graf 3).



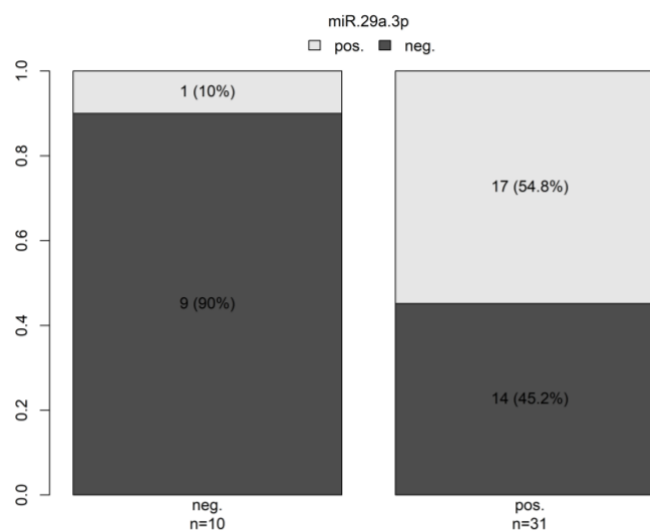
**Graf 3.:** Srovnání exprese miR-34a-5p u cervikálních nádorů s HPV16/18 pozitivitou (n = 31) a nádorů s pozitivitou jiného HPV genotypu/HPV negativitou (n = 10).

Pro další down-regulovanou miR-29a-3p bylo zaznamenáno statisticky významné snížení exprese u skupiny vzorků se zasažením mízních uzlin (N pozitivní skupina vzorků) z 69,6 % u negativních na 15,4 % u pozitivních (p = 0,006; graf 4). Naopak u HPV pozitivních vzorků byla exprimována více v porovnání s HPV negativními (51,5/21,5 %; p = 0,059; graf 5). Zvýšená exprese byla také zaznamenána u HPV16, 18 pozitivních oproti

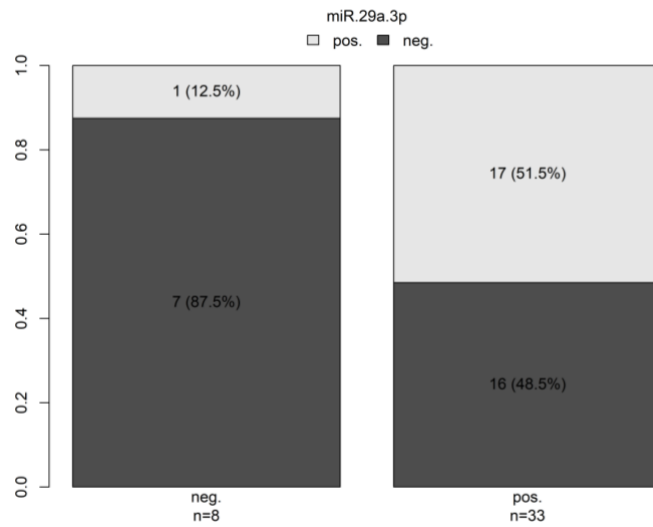
negativním (54,8/10 %;  $p = 0,025$ ; graf 6). Nalezené rozdíly naznačují souvislost snížené exprese miR-29a-3p s mikrometastázováním do přilehlých lymfatických uzlin, nikoli s HPV infekcí.



**Graf 4.:** Srovnání exprese miR-29a-3p u cervikálních nádorů se zasaženými lymfatickými uzlinami (n = 13) a bez zasažení lymfatických uzlin (n = 23)



**Graf 5.:** Srovnání exprese miR-29a-3p u HPV pozitivních (n = 33) a HPV negativních cervikálních nádorů (n = 8).



**Graf 6.:** Srovnání exprese miR-29a-3p u cervikálních nádorů s HPV16/18 pozitivitou (n = 31) a nádorů s pozitivitou jiného HPV genotypu/HPV negativitou (n = 10).

**Tabulka 12.:** Mediány a rozpětí Ct hodnot vybraných miRNA ve skupinách vzorků: T (1a-1b1; 1b2-1c; 2;4), N, HPV, HPV16, 18 (neg./poz.).

		miR-20a-5p		miR-93-5p		miR-21-5p		miR-10a-5p		miR-16-5p	
		N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)
<b>T</b>	<b>1a-1b1</b>	9	26.8 (25.64-31.06)	7	27.9 (25.07-35)	21	33 (18.56-35)	6	28 (24.78-30.51)	7	28 (20.55-35)
	<b>1b2-1c</b>	3	27.4 (26.72-29.94)	2	28.9 (27.82-29.91)	3	26.8 (21.14-34.29)	6	26.9 (22.36-30.61)	2	30.9 (29.77-32.09)
	<b>2</b>	2	30 (29.98-29.98)	1	26.5 (26.48-26.48)	3	34.7 (33.56-35)	1	26.2 (26.22-26.22)	1	26.6 (26.59-26.59)
	<b>4</b>	0	-	0	-	1	29.1 (29.08-29.08)	0	-	0	-
<b>N</b>	<b>neg.</b>	10	26.9 (25.64-31.06)	7	27.9 (25.07-35)	17	30.6 (18.56-35)	9	27.2 (22.36-30.51)	5	30.6 (20.55-35)
	<b>poz.</b>	4	29 (26.72-29.98)	2	27.1 (26.48-27.82)	10	34.8 (21.14-35)	4	26.4 (26.18-29.67)	4	28.2 (24.93-35)
<b>HPV</b>	<b>neg.</b>	3	28.8 (26.78-29.98)	3	26.5 (25.07-35)	3	33.6 (23.51-35)	3	27.2 (26.68-30.61)	3	28 (24.93-35)
	<b>poz.</b>	11	27 (25.64-31.06)	7	27.9 (25.46-30.53)	25	33 (18.56-35)	11	27.1 (22.36-30.51)	7	29.8 (20.55-35)
<b>HPV16, 18</b>	<b>neg.</b>	4	27.8 (26.72-29.98)	4	27.1 (25.07-35)	4	34.3 (23.51-35)	4	28.5 (26.68-30.61)	4	28.9 (24.93-35)
	<b>poz.</b>	10	27.2 (25.64-31.06)	6	28.5 (25.46-30.53)	24	32.1 (18.56-35)	10	26.9 (22.36-30.51)	6	28.6 (20.55-35)
<b>celkem</b>		14	27.2 (25.64-31.06)	10	27.9 (25.07-35)	28	33 (18.56-35)	14	27.2 (22.36-30.61)	10	28.9 (20.55-35)

T – stádium tumoru; 0–4, a–c – velikost nádoru/rozsah postižení uzlin; N – zasažení mizních uzlin; N neg. – nádory bez zasažení mizních uzlin; N poz. – nádory a zasažení mizních uzlin; HPV neg. – nádory s HPV negativitou; HPV poz. – nádory s HPV pozitivitou; HPV16, 18 neg. – nádory s pozitivitou na jiný HPV genotyp nebo HPV negativitou; HPV16, 18 poz. – nádory s pozitivitou na konkrétní genotyp HPV16, 18; miR-423-3p – normalizační; N – počet vzorků v dané skupině

**Tabulka 12. – pokračování:** Mediány a rozpětí Ct hodnot vybraných miRNA ve skupinách vzorků: T (1a-1b1; 1b2-1c; 2;4), N, HPV, HPV16, 18 (neg./poz.).

		miR-34a-5p		miR-29a-3p		miR-222-3p		miR-423-3p	
		N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)	N	medián (rozpětí)
<b>T</b>	<b>1a-1b1</b>	11	28.2 (24.1-32.73)	12	26.7 (21.7-35)	11	28.1 (25.6-31.96)	19	27.5 (24.09-31.49)
	<b>1b2-1c</b>	3	30.2 (27.98-33.35)	3	23.6 (22.17-28.45)	2	27.6 (27.22-27.91)	3	27.4 (24.63-30.43)
	<b>2</b>	0	-	1	22.9 (22.88-22.88)	1	26.2 (26.17-26.17)	3	29 (27.24-29.89)
	<b>4</b>	0	-	2	29.1 (23.29-35)	1	27.2 (27.19-27.19)	2	31.2 (27.42-35)
<b>N</b>	<b>neg.</b>	9	29.7 (24.1-33.35)	16	25.9 (21.7-35)	10	28 (25.6-31.96)	17	27.4 (24.09-31.49)
	<b>poz.</b>	4	27.3 (24.36-30.95)	2	28.9 (22.88-35)	5	27.2 (26.17-29.38)	8	28.5 (25.68-30.43)
<b>HPV</b>	<b>neg.</b>	5	27.9 (24.1-30.95)	1	22.9 (22.88-22.88)	3	28.3 (26.17-29.38)	6	26.9 (24.09-29)
	<b>poz.</b>	10	29 (24.36-33.35)	17	26.3 (21.7-35)	12	27.9 (25.6-31.96)	22	27.5 (24.63-35)
<b>HPV16, 18</b>	<b>neg.</b>	7	28 (24.1-30.95)	1	22.9 (22.88-22.88)	3	28.3 (26.17-29.38)	8	28.1 (24.09-30.43)
	<b>poz.</b>	8	30.6 (24.36-33.35)	17	26.3 (21.7-35)	12	27.9 (25.6-31.96)	20	27.4 (24.63-35)
<b>celkem</b>		15	28.2 (24.1-33.35)	18	25.9 (21.7-35)	15	28 (25.6-31.96)	28	27.5 (24.09-35)

T – stádium tumoru; 0–4, a–c – velikost nádoru/rozsah postižení uzlin; N – zasažení mizních uzlin; N neg. – nádory bez zasažení mizních uzlin; N poz. – nádory a zasažení mizních uzlin; HPV neg. – nádory s HPV negativitou; HPV poz. – nádory s HPV pozitivitou; HPV16, 18 neg. – nádory s pozitivitou na jiný HPV genotyp nebo HPV negativitou; HPV16, 18 poz. – nádory s pozitivitou na konkrétní genotyp HPV16, 18; miR-423-3p – normalizační; N – počet vzorků v dané skupině

**Tabulka 13.:** Proporce pozitivní exprese vybraných miRNA ve skupinách vzorků: T (1a-1b1; 1b2-1c; 2;4), N, HPV, HPV16, 18 (neg./poz.).

		<b>miR-20a-5p</b>	<b>miR-93-5p</b>	<b>miR-21-5p</b>	<b>miR-10a-5p</b>	<b>miR-16-5p</b>
<b>T</b>	<b>1a-1b1</b>	9/26 (34.6%)	7/26 (26.9%)	21/26 (80.8%)	6/26 (23.1%)	7/26 (26.9%)
	<b>1b2-1c</b>	3/7 (42.9%)	2/7 (28.6%)	3/7 (42.9%)	6/7 (85.7%)	2/7 (28.6%)
	<b>2</b>	2/3 (66.7%)	1/3 (33.3%)	3/3 (100%)	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)
	<b>4</b>	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33.3%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
	<b>p-hodnota</b>	0,433	0,932	<b>0,069</b>	<b>0,006</b>	0,932
<b>N</b>	<b>neg.</b>	10/23 (43.5%)	7/23 (30.4%)	17/23 (73.9%)	9/23 (39.1%)	5/23 (21.7%)
	<b>poz.</b>	4/13 (30.8%)	2/13 (15.4%)	10/13 (76.9%)	4/13 (30.8%)	4/13 (30.8%)
	<b>p-hodnota</b>	0,693	0,438	1,000	0,727	0,693
<b>HPV</b>	<b>neg.</b>	3/8 (37.5%)	3/8 (37.5%)	3/8 (37.5%)	3/8 (37.5%)	3/8 (37.5%)
	<b>poz.</b>	11/33 (33.3%)	7/33 (21.2%)	25/33 (75.8%)	11/33 (33.3%)	7/33 (21.2%)
	<b>p-hodnota</b>	1,000	0,378	<b>0,084</b>	1,000	0,378
<b>HPV 16, 18</b>	<b>neg.</b>	4/10 (40%)	4/10 (40%)	4/10 (40%)	4/10 (40%)	4/10 (40%)
	<b>poz.</b>	10/31 (32.3%)	6/31 (19.4%)	24/31 (77.4%)	10/31 (32.3%)	6/31 (19.4%)
	<b>p-hodnota</b>	0,712	0,222	<b>0,049</b>	0,712	0,222
<b>celkem</b>		14/41 (34.1%)	10/41 (24.4%)	28/41 (68.3%)	14/41 (34.1%)	10/41 (24.4%)

T – stádium tumoru; 0–4, a–c – velikost nádoru/rozsah postižení uzlin; N – zasažení mízních uzlin; N neg. – nádory bez zasažení mízních uzlin; N poz. – nádory a zasažení mízních uzlin; HPV neg. – nádory s HPV negativitou; HPV poz. – nádory s HPV pozitivitou; HPV16, 18 neg. – nádory s pozitivitou na jiný HPV genotyp nebo HPV negativitou; HPV16, 18 poz. – nádory s pozitivitou na konkrétní genotyp HPV16, 18; červeně vyznačeny statisticky významné p-hodnoty; tučně vyznačeny trendy p-hodnot

**Tabulka 13. – pokračování:** Proporce pozitivní exprese vybraných miRNA ve skupinách vzorků: T (1a-1b1; 1b2-1c; 2;4), N, HPV, HPV16, 18 (neg./poz.).

		<b>miR-34a-5p</b>	<b>miR-29a-3p</b>	<b>miR-222-3p</b>	<b>miR-423-3p</b>
<b>T</b>	<b>1a-1b1</b>	11/26 (42.3%)	12/26 (46.2%)	11/26 (42.3%)	19/26 (73.1%)
	<b>1b2-1c</b>	3/7 (42.9%)	3/7 (42.9%)	2/7 (28.6%)	3/7 (42.9%)
	<b>2</b>	0/3 (0%)	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)	3/3 (100%)
	<b>4</b>	0/3 (0%)	2/3 (66.7%)	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)
	<b>p-hodnota</b>	0,326	0,947	0,933	0,303
<b>N</b>	<b>neg.</b>	9/23 (39.1%)	16/23 (69.6%)	10/23 (43.5%)	17/23 (73.9%)
	<b>poz.</b>	4/13 (30.8%)	2/13 (15.4%)	5/13 (38.5%)	8/13 (61.5%)
	<b>p-hodnota</b>	0,727	<b>0,006</b>	1,000	0,475
<b>HPV</b>	<b>neg.</b>	5/8 (62.5%)	1/8 (12.5%)	3/8 (37.5%)	6/8 (75%)
	<b>poz.</b>	10/33 (30.3%)	17/33 (51.5%)	12/33 (36.4%)	22/33 (66.7%)
	<b>p-hodnota</b>	0,117	<b>0,059</b>	1,000	1,000
<b>HPV16, 18</b>	<b>neg.</b>	7/10 (70%)	1/10 (10%)	3/10 (30%)	8/10 (80%)
	<b>poz.</b>	8/31 (25.8%)	17/31 (54.8%)	12/31 (38.7%)	20/31 (64.5%)
	<b>p-hodnota</b>	<b>0,022</b>	<b>0,025</b>	0,720	0,458
<b>celkem</b>		15/41 (36.6%)	18/41 (43.9%)	15/41 (36.6%)	28/41 (68.3%)

T – stádium tumoru; 0–4, a–c – velikost nádoru/rozsah postižení uzlin; N – zasažení mízních uzlin; N neg. – nádory bez zasažení mízních uzlin; N poz. – nádory a zasažení mízních uzlin; HPV neg. – nádory s HPV negativitou; HPV poz. – nádory s HPV pozitivitou; HPV16, 18 neg. – nádory s pozitivitou na jiný HPV genotyp nebo HPV negativitou; HPV16, 18 poz. – nádory s pozitivitou na konkrétní genotyp HPV16, 18; červeně vyznačeny statisticky významné p-hodnoty; tučně vyznačeny trendy p-hodnot; miR-423-3p – normalizační

## 8 Diskuze

Předmětem této práce bylo vyhodnotit expresi 8 vybraných miRNA u vzorků primárních cervikálních karcinomů. Změny exprese vybraných miRNA byly v recentní literatuře popsány v souvislosti s rozvojem cervikálního karcinomu. Cílem práce bylo objasnit, zda by bylo možné některé z vybraného souboru miRNA, případně kombinaci vybraných miRNA, použít pro triáž HPV pozitivních žen. Expese miRNA byla sledována na souboru 41 tkání primárních nádorů cervixu. Soubor byl primárně testován na přítomnost HPV pomocí testu PapilloCheck, všechny tkáně byly rovněž testovány na přítomnost metylace vybraných genů pomocí Precursor M kitu. Prekurzor M kit byl vybrán jako komerčně dostupný triážový test, 40/41 vzorků z testovaného souboru bylo pomocí Precursor M kitu pozitivních.

Na základě článku Babion *et al.*, který se zabýval výběrem nejvhodnější normalizační miRNA pro testování cervikálních tkání a cervikálních/vaginálních stěrů byla vybrána normalizační miRNA miR-423-3p a RNU24 (small nucleolar RNA; Babion *et al.*, 2017). Normalizační RNU24 však bohužel nebyla v systému TaqMan dostupná, byla tedy použita pouze miR-423-3p. Tato miRNA se však v průběhu analýzy neukázala jako příliš vhodná pro normalizaci, vzhledem k tomu, že její expese byla detekovatelná pouze v 68,3 % vzorků. Expese normalizační miR-423-3p nebyla v rámci experimentu stabilní napříč vyšetřovanými vzorky a není tedy optimální pro normalizaci exprese miRNA u cervikálních karcinomů. Srovnání exprese jednotlivých miRNA vzhledem k normalizační miR-423-3p z tohoto důvodu nebylo provedeno. Další práce se bude zabývat výběrem optimálních miRNA, které by byly kompatibilní se systémem TaqMan a budou použitelné pro normalizaci exprese sledovaných miRNA.

U dvou testovaných miRNA, up-regulované miR-21-5p a down-regulované miR-34a-5p byla pozorována statisticky významná souvislost s HPV infekcí. Role těchto miRNA byla v rozvoji cervikálního karcinomu popsána ve více než třech studiích (Bumrunghai *et al.*, 2015; Gocze *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015; Shishoida *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015), které shrnuje publikace Paradini *et al.*, 2018. Expese miR-21-5p byla u HPV pozitivních vzorků zvýšena, naopak miR-34a-5p, která je ovlivněna hladinou tumor supresorového proteinu p53, byla u HPV pozitivních signifikantně snížena.



Stejná závislost byla pozorována rovněž při hodnocení nádorů s pozitivitou HPV16 nebo HPV18. HPV16/HPV18 jsou nejvíce rizikové genotypy, které mají nejvyšší karcinogenní potenciál a jsou zodpovědné za více než 70% všech cervikálních nádorů. Nižší exprese miR-34a-5p a vyšší exprese miR-21-5p u HPV pozitivních obecně i HPV16/HPV18 pozitivních ukazuje na dysregulaci buněčného cyklu, způsobenou inaktivací tumor supresorového genu p53, a proliferaci. Zvýšená exprese miR-21-5p u HPV pozitivních nádorů byla popsána rovněž v práci Han *et al.*, 2015.

Pro další testovanou miR-29a-3p byla zjištěna významná korelace mezi sníženou expresí a zasažením mízních uzlin. Získaná data ukazují na to, že by mohla mít exprese miR-29a-3p vliv na invazivitu a lokální šíření nádoru. Podobné závěry byly publikovány v práci Gong *et al.*, která u cervikálních nádorů prokázala významnou roli miR-29a – DNMT1-SOCS1 dráhy při invazivitě a metastázování (Gong *et al.*, 2019). Dle našich výsledků není miR-29a-3p down-regulovaná u HPV pozitivních vzorků, ale naopak up-regulovaná. Tyto výsledky jsou v rozporu se studií provedenou Li *et al.*, kde byla exprese miR-29a-3p v HPV infikovaných vzorcích snižena (Li *et al.*, 2011). U dalších testovaných miRNA nebyla zjištěna žádná statisticky významná korelace mezi expresí a HPV infekcí nebo stádiem nádoru.

Statistická analýza na testovaném souboru 41 vzorků cervikálního karcinomu ukázala u některých miRNA významné rozdíly u sledovaných parametrů, jedná se však pouze o malé množství dat, ze kterého nelze dělat jednoznačné závěry. Tato studie, která představuje pilotní projekt, bude rozšířena o další vzorky cervikálních karcinomů, aby bylo možné nalezené korelace potvrdit či vyvrátit.

## 9 Závěr

V teoretické části práce byl vypracován literární přehled na téma asociace lidského papilomaviru s karcinogenezí různých nádorových onemocnění a možnosti screeningu cervikálního karcinomu. Podrobně byly zpracovány metody, použitelné v rámci cervikálního screeningu, včetně metod triážových a možnosti použití aberantní exprese miRNA pro triáž HPV pozitivních žen.

Cílem experimentální části bylo optimalizovat detekci exprese 8 vybraných miRNA v nádorových tkáních a pokusit se objasnit jejich roli v rozvoji cervikálního karcinomu. Získaná data naznačují souvislost mezi aberantní expresí miR-21-5p a miR-34a-5p a HPV pozitivitou a aberantní expresí miR-29a-3p a zasažením lokálních uzlin. Exprese normalizační miR-423-3p nebyla v rámci experimentu stabilní napříč vyšetřovanými vzorky a není tedy optimální pro normalizaci exprese miRNA u cervikálních karcinomů. Další práce se bude zabývat výběrem optimálních miRNA, které by byly použitelné pro normalizaci exprese sledovaných miRNA.

Tato studie představovala pilotní projekt, soubor vzorků cervikálních karcinomů bude rozšířen, aby bylo možné nalezené korelace potvrdit či vyvrátit. Navazující práce se bude věnovat optimalizaci normalizačních miRNA tak, aby byly použitelné pro normalizaci sledovaných markerů a přesnější kvantifikaci. V případě, že budou nalezeny významně změněné miRNA, které by se ukázaly dostatečně specifické pro predikci cervikální karcinogeneze, budou následně vybrané miRNA testovány u cervikálních stěrů tak, aby jejich detekce byla použitelná pro triáž HPV pozitivních pacientek v rámci primárního HPV screeningu, což by představovalo novou objektivní alternativu k dosud používanému cytologickému vyšetření.

## 10 Použitá literatura

Abreu A. L. P., Souza R. P., Gimenes F., Consolaro M. E. L. (2012): A review of methods for detect human Papillomavirusinfection: *Virology journal* 9: 262.

Ambros V., Lee R. C. (2004): Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning: *Methods in molecular biology* 265: 131–158.

Araldi R. P., Sant’Ana T. A., Módolo D. G., de Melo T. C., Spadacci-Morena D. D., de Cassia Stocco R., Cerutti J. M., de Souza E. B. (2018): The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106: 1537–1556.

Arbyn M., Anttila A., Jordan J., et al. (2008): *European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening*, 2nd edn. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

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(3): 448–458.

Arbyn M., Smith S. B., Temin S., Sultana F., Castle P. (2018): Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: updated meta-analyses. *BMJ* 363: k4823.

Arbyn M., Snijders P. J. F., Meijer C. L. J. M., Berhof J., Cuschieri K., Kocjan B. J., Poljak M. (2015): Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?: *Clinical microbiology and infection* 21(9): 817–826.

Arbyn M., Verdoodt F., Snijders P. J. F., Verhoef V. M. J., Suonio E., Dillner L., Minozzi S., Bellisario C., Banzi R., Zhao F. H., Hillemanns P., Anttila, A. (2014): Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *The Lancet Oncology* 15(2): 172–183.

Auslander N., Heselmeyer-Haddad K., Patkar S., Hirsch D., Camps J., Brown M., Bronder D., Wei-Dong Ch., Lokanga R., Wangsa D., Wangsa D., Yue H., Lischka A., Braun R., Emons G., Ghadimi B. M., Gaedcke J., Grade M., Montagna Ch., Lazebnik Y., Difilippantonio M. J., Habermann J. K., Auer G., Ruppin E., Ried T. (2019): Cancer-type specific aneuploidies hard-wire chromosome-wide gene expression patterns of their tissue of origin. *bioRxiv* 563858.

Baay M. F. D., Quint W. G. V., Koudstaal J., Hollema H., Duk J. M., Burger M. P. M., Stolz E., Herbrink P. (1996): Comprehensive Study of Several General and Type-Specific Primer Pairs for Detection of Human Papillomavirus DNA by PCR in Paraffin-Embedded Cervical Carcinomas: *Journal of clinical microbiology* 34(3): 745–747.

Babion I., Snoek B. C., Novianti P. W., Jaspers A., van Trommel N., Heideman D. A. M., Meijer Ch. J. L. M., Snijders P. J. F., Steenbergen R. D. M., Wilting S. M. (2018): Triage of high-risk HPV-positive women in population-based screening by miRNA expression analysis in cervical scrapes; a feasibility study: *Cinical epigenetics* 10: 76.

Bartel D. P. (2004): MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function: *Cell* 116: 281–297.

Basu P., Ponti A., Anttila A., Ronco G., Senore C., Vale D. B., Segnan N., Tomatis M., Soerjomataram I., Žakelj M. P., Dillner J., Elfström K. M., Lönnberg S., Sankaranarayanan R. (2017): Status of implementation and organization of cancer screening in The European Union Member States - Summary results from the second European screening report: *International journal of cancer* 142(1): 44–56.

Benevolo M., Vocaturo A., Caraceni D., French D., Rosini S., Zappacosta R., Terrenato I., Ciccocioppo L., Frega A., Giorgi Rossi P. (2011): Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test: *Journal of clinical microbiology* 49(7): 2643–2650.

Bernard H. U., Burk R. D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E. M. (2010): Clasification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments: *Virology* 1: 70–79.

Bhatla N., Berek J. S., Fredes M. C., Denny L. A., Grenman S., Karunaratne K., Kehoe S. T., Konishi I., Olawaiye A. B., Prat J., Sankaranarayanan R. (2019): Revised FIGO staging for carcinoma of cervix uteri: *International journal of gynecology and obstetrics* 145(1): 129–135.

Biryukov J., Myers J. C., McLaughlin-Drubin M. E., Griffin H. M., Milici J., Doorbar J., Meyers C. (2017): Mutations in HPV18 E1<sup>E4</sup> impact virus capsid assembly, infectivity competence, and maturation: *Viruses* 9(12): 385.

Block S. L., Nolan T., Sattler C., Barr E., Giacoletti K. E. D., Marchant C. D., Castellsegué X., Rusche S. A., Lukac S., Bryan J. T., Cavanaugh P. F., Reisinger K. S. (2006): Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like particle vaccine in male and female adolescents and young adult wome. *Pediatrics* 118(5): 2135–2145.

Bowden S. J., Kalliala I., Veroniki A. A., Arbyn M., Mitra A., Lathouras K., Mirabello L., CHadeau-Hyam M., Paraskevaidis E., Flanagan J. M., Kyrgiou, M. (2019): The use of human papillomavirus DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine* 50: 246–259.

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A cancer journal of clinicians* 68(6): 394–424.

Bruhn L. V., Andersen S. J., Hariri J. (2018): HPV-testing versus HPV-cytology co-testing to predict the outcome after conization. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 97(6): 758–765.

Bruno M. T., Ferrara M., Fava V., Rapisarda A., Coco A. (2018): HPV genotype determination and E6/E7 mRNA detection for management of HPV positive women. *Virology journal* 15(1): 52.

Bumrunghai S., Ekalaksananan T., Evans M. F., Chopjitt P., Tangsiriwatthana T., Patarapadungkit N., Kleebkaow P., Luanratanakorn S., Kongyingyoes B., Worawichawong S., Pientong Ch. (2015): Up-regulation of miR-21 is associated with cervicitis and human papillomavirus infection in cervical tissues. *PLoS One* 10(5):e0127109.

Burd E. M. (2014): Updated Guidelines for Cervical Cancer Screening: *Clinical microbiology newsletter* 36(13): 95–103.

Burd E. M. (2016): Human papillomavirus laboratory testing: the Changing Paradigm: *Clinical microbiology reviews* 29(2): 291–319.

Burd E. M., Dean Ch. L. (2016): Human papillomavirus: *Microbiology spectrum* 4(4).

Cai L., Wang W., Li X., Dong T., Zhang Q., Zhu B., Zhao H., Wu S. (2018): MicroRNA-21-5p induces the metastatic phenotype of human cervical carcinoma cells in vitro by targeting the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Oncology letters* 15(4): 5213–5219.

Cai Q., Lv L., Saho Q., Li X., Dian A. (2012): Human papillomavirus early proteins and apoptosis: *Archives gynecology obstetrics* 287: 541–548.

Castle P. E., Dockter J., Giachetti Ch., Garcia F. A. R., McCormick M. K., Michell A. L., Holladay E. B., Kolk D. P. (2007): A Cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer: *Clinical cancer research* 13(9): 2599–2605.

Cerasuolo A., Annunziata C., Tortora M., Starita N., Stellato G., Greggi S., Maglione M. G., Ionna F., Losito S., Botti G., Buonaguro L., Buonaguro F. M., Tornesello M. L. (2017): Comparative analysis of HPV16 gene expression profiles in cervical and in oropharyngeal squamous cell carcinoma: *Oncotarget* 8(31): 34070–34081.

Citterbart K., Martan A., Rob L. (2001): Gynekologie. Gelén – Univerzita Karlova v Praze, Praha, ČR.

Clarke M. A., Luhn P., Gage J. C., Bodelon C., Dunn S. T., Walker J., Zuna R., Hewitt S., Killian J. K., Yan L., Miller A., Schiffman M., Wentzensen N. (2017): Discovery and validation of candidate host DNA methylation markers for detection of cervical precancer and cancer: *International journal of cancer* 141(4): 701–710.

Córdova-Rivas S., Fraire-Soto I., Mercado-Casas Torres A., Servín-González L. S., Granados-López A. J., López-Hernández Y., Reyes-Estrada C. A., Gutiérrez-Hernández R., Castañeda-Delgado J. E., Ramírez-Hernández L., Varela-Silva J. A., López J. A. (2019): 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* 20(3): 545.

Cuschieri K., Ronco G., Lorincz A., Smith L., Ogilvie G., Mirabello L., Carozzi F., Cubie H., Wentzensen N., Snijders P., Arbyn M., Monsonego J., Francesch S. (2017): Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *International journal of cancer* 143(4): 735–745.

Cuschieri K., Wentzensen N. (2008): Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 17(10): 2536–2545.

Cuzick J., Cadman L., Mesher D., Austin J., Ashdown-Barr L., Ho L. , Terry G., Liddle S., Wright C., Lyons D., zarewski A. (2013): Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *British Journal of Cancer* 108: 908–913.

Davis-Dusenbery B. N., Hata A. (2010): MicroRNA in Cancer: the involvement of aberrant MicroRNA biogenesis regulatory pathways. *Genes Cancer* 1(11): 1100–14.

Deftereos G., Corrie S. R., Feng Q., Morihara J., Stern J., Hawes S. E., Kiviat N. B. (2011): Expression of mir-21 and mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer. *PLoS One* 6(11): e28423.

Dempsey A. F. (2008): Human Papillomavirus: The Usefulness of Risk Factors in Determining Who Should Get Vaccinated. *Reviews in obstetrics & gynecology* 1(3): 122–128.

Duensing S., Münger K. (2003): Mechanisms of genomic instability in human cancer: Insights from studies with human papillomavirus oncoproteins: *International journal of cancer* 109(2): 157–162.

Dušková J., Beková A., Dvořák V., Májek O., Dušek L. (2014): Výsledky Národního programu screeningu karcinomu děložního hrdla v České republice: *Klinická onkologie* 27(2): 2S79–2S86.

Eide M. L., Debaque H. (2012): HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer: *Annales de pathologie* 32: e15–e23.

García-Vallvé S., Alonso A., Bravo I. (2005): Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends in microbiology* 13(11): 514–521.

Geraets D.T., Cuschieri K., de Koning M. N. C., van Doorn L. J., Snijders P. J. F., Meijer C. J. L. M., Quint W. G. V., Arbyn M. (2014): Clinical Evaluation of a GP5+/6+ -Based Luminex Assay Having Full High-Risk Human Papillomavirus Genotyping Capability and an Internal Control. *Journal of Clinical Microbiology* 52(11): 3996–4002.

Gibb R. K., Martens M. G. (2011): The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer: *Obstetrics & Gynecology* 4(1): S2–S11.

Giorgi Rossi P., Benevolo M., Vocaturo A., Caraceni D., Ciccocioppo .L, Frega A., Terrenato I., Zappacosta R., French D., Rosini S. (2013): Prognostic value of HPV E6/E7 mRNA assay



in women with negative colposcopy or CIN1 histology result: a follow-up study: PLoS On 8(2): e57600.

Gocze K., Gombos K., Kovacs K., Juhasz K., Gocze P., Kiss I. (2015): MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Research* 35(1):523–30.

Gong Y., Wan J. H., Zou W., Lian G. Y., Qin J. L., Wang Q. M. (2019): MiR-29a inhibits invasion and metastasis of cervical cancer via modulating methylation of tumor suppressor SOCS1. *Future oncology* 15(15): 1729-1744.

Han Y., Xu G. X., Lu H., Yu D. H., Ren Y., Wang L., Huang X. H., Hou W. J., Wei Z. H., Chen Y. P., Cao Y. G., Zhang R. (2015): Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 8(6): 7131–7139.

He L., Hannon G. J. (2004): MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation: *Nat. Rev. Genet.* 5: 522–531.

Ho Ch. M., Lee B. H., Chang S. F., Chien T. Y., Huang S. H., Yan Ch. Ch., Cheng W. F. (2010): Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia: *International journal of cancer* 127(3): 622–632.

Hopley R., Gillespie A. (2016): Cervical FISH testing for triage and support of challenging diagnoses: A case study of 2 patients: *Laboratory Medicine* 47(1): 52–56.

Hsu Y. W., Huang R. L., Su P. H., Chen Y. C., Wang H. C., Liao C. C., Lai H. C. (2017): Genotype-specific methylation of HPV in cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of gynecologic oncology* 28(4): e56.

Huang Y., Yang N. (2018): MicroRNA-20a-5p inhibits epithelial to mesenchymal transition and invasion of endometrial cancer cells by targeting STAT3. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 11(12): 5715–5724.

Huether S. E., McCance K. L. (2012): *Understanding pathophysiology* (5th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.

Chan K. Ch., Aimagambetova G., Ukybassova T., Kongrtay K., Azizan A. (2019): Human papillomavirus infection and cervical cancer: Epidemiology, screening, and vaccination – Review of current perspectives: *Journal of oncology*: 11.

Chan K. K. L., Liu S. S., Wei N., Ngu S. F., Chu M. M. Y., Tse K. Y., Lau L. S. K., Chueng A. N. Y., Ngan H. Y. S. (2020): Primary HPV testing with cytology versus cytology alone in cervical screening – a prospective randomized controlled trial (RCT) with two rounds of screening in a Chinese population. *International journal of cancer*.

Chin L. J., Slack F. J. (2008): A truth serum for cancer—microRNAs have major potential as cancer biomarkers: *Cell research*. 18(10): 983–984.

Chrysostomou A. C., Stylianou D. C., Constantinidou A., Kostrikis L. G. (2018): Cervical cancer screening programs in Europe: The transition towards HPV vaccination and population-based HPV testing: *Viruses* 10(12): 729.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Biological Agents (2007): *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; 90: 1–636.

Iorio M. V., Croce C. M. (2012): Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer Journal* 18:215–222.

Ito K., Kimura R., Konishi H., Ozawa N., Yaegashi N., Ohashi Y., Suzuki M., Kakizoe T. (2019): A comparison of liquid-based and conventional cytology using data for cervical cancer screening from the Japan Cancer Society. *Japanese journal of clinical oncology*: 1–8.

Jang M. K., Shen K., McBride A. A. (2014): Papillomavirus Genomes Associate with BRD4 to Replicate at Fragile Sites in the Host Genome: *Plos Pathogens* 10(5): e1004117.

Jiang J., Wei L. H., Li Y. L., Wu R. F., Xie X., Feng Y. J., Zhang G., Zhao C., Zhao Y., Chen Z. (2010): Detection of TERC amplification in cervical epithelial cells for the diagnosis of high-grade cervical lesions and invasive cancer: a multicenter study in China. *The Journal of molecular diagnostics* 12(6): 808–817.

Kajitani N., Satsuka A., Kawate A., Sakai H. (2012): Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation: *Frontiers in Microbiology* 3: 152.

Kang H.W., Wang F., Wei Q., Zhao Y.F., Liu M., Li X., Tang H. (2012): miR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells. *FEBS Letters* 586: 897–904.

Kato M., Slack F. J. (2008): microRNAs: Small molecules with big roles—C. elegans to human cancer: *Biology of the cell* 100: 71–81.

Koeneman M. M., Hendriks N., Kooreman L. F., Winkens B., Kruitwagen R. F., Kruse A. J. (2019): Prognostic factors for spontaneous regression of high-risk human papillomavirus-positive cervical intra-epithelial neoplasia grade 2. *International Journal of Gynecologic Cancer* 29: 1003–1009.

Koeneman M. M., Ovestad I. T., Janssen E. A. M., Ummelen M., Kruitwagen R. F. P. M., Hopman A. H., Kruse A. J. (2019): Gain of Chromosomal Region 3q26 as a Prognostic Biomarker for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: Literature Overview and Pilot Study. *Pathology & oncology research* 25(2): 549–557.

Koliopoulos G., Nyaga V. N., Santesso N., Bryant A., Martin-Hirsch P. P. L., Mustafa R. A., Schünemann H., Paraskevaidis E., Arbyn M. (2017): Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 8: 1–110.

Kudela E., Farkasova A., Visnovsky J., Balharek T., Sumichrastova P., Sivakova J., Plank L., Danko J. (2014): Amplification of 3q26 and 5p15 regions in cervical intraepithelial neoplasia: *Acta obstetricia et gynecologica scandinavica* 93(10): 997–1002.

Lazarczyk M., Cassonnet P., Pons Ch., Jacob Y., Favre M. (2009): The ever proteins as a natural barriers against Papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infection: *Microbiology and molecular biology reviews* 73(2): 348–370.

Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N. (2003): The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processin: *Nature* 425: 415–419.

Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. (2002): MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization: *The EMBO journal* 21: 4663–4670.

Li J., Chu Z. P., Han H., Zhang Y., Tian F., Zhang J. Q., Huang X. H. (2019): Suppression of miR-93-5p inhibits high-risk HPV-positive cervical cancer progression via targeting of BTG3. *Human Cell* 32(2): 160–171.

Li Y., Wang F., Xu J., Ye F., Shen Y., Zhou J., Lu W., Wan X., Ma D., Xia X. (2011): Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *Journal of pathology* 224(4): 484–495.

Long M. J., Wu F. X., Li P., Liu M., Li X., Tang H. (2012): MicroRNA-10a targets CHL1 and promotes cell growth, migration and invasion in human cervical cancer cells. *Cancer letters* 324(2): 186–96.

Lowy D. R. (2006): Prophylactic human papillomavirus vaccines: *Journal of Clinical Investigation* 116(5): 1167–1173.

Luhn P., Houldsworth J., Cahill L., Schiffman M., Castle P. E., Zuna R. E., Dunn S. T., Gold M. A., Walker J., Wentzensen N. (2013): Chromosomal gains measured in cytology samples

from women with abnormal cervical cancer screening results. *Gynecologic oncology* 130(3): 595–600.

Mariani L., Igidbashian S., Sandri M. T., Vici P., Landoni F. (2016): The clinical implementation of primary HPV screening: *International journal of Gynecology & Obstetrics* 136(3): 266–271.

Maver P.J., Poljak M. (2019): Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clinical microbiology and infection*.

Mayrand M. H., Duarte-Franco E., Rodrigues I., Walter S. D., Hanley J., Ferenczy A., Ratnam S., Coutlée F., Franco E. L. (2007): Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer: *The new England journal of medicine* 357: 1579–1588.

Meijer C. J. L. M., Berkhof J., Castle P. E., Hesselink A., Franco E. L., Ronco G., Arbyn M., Bosch F. X., Cuzick J., Dillner J., Heideman D. A. M., Snijders P. J. F. (2009): Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women of 30 years and older. *The International Journal of Cancer* 124(3): 516–520.

Meijer C. L. J. M., Berhof H., Heideman D. A. M., Hesselink A. T., Snijders P. J. F. (2009): Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening: *Journal of clinical virology* 46: S1–S4.

Meites E., Szilagyi P. G., Chesson H. W., Unger E. R., Romero J. R., Markowitz L. E. (2019): Human Papillomavirus Vaccination for Adults: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *Morbidity and Mortality weekly report* 68(32): 698–702.

Meyers J. E., Guidry J. T., Scott M. L., Zwolinska K., Raikhy G., Prasai K., Bienkowska-Haba M., Bodily J. M., Sapp M. J., Scott R. S. (2019): Detecting episomal or integrated human papillomavirus 16 DNA using an exonucleas V-qPCR-based assay: *Virology* 537: 149–156.

Morse S. A., Ballard R. C., Holmes K. K., Moreland A. A. (2010): *Atlas of sexually transmitted diseases*. Saunders Elsevier, Nizozemsko.

Moyer V. A. (2012): Screening for cervical cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement: *Annals of Internal Medicine* 156: 880–891.

Nambaru L., Meenakumari B., Swaminathan R., Rajkumar T. (2009): Prognostic significance of HPV physical status and integration sites in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 10(3):355–360

Ngo O., Chloupková R., Ambrožová M., Suchánek Š., Zavoral M., Seifert B., Dvořák V., Daneš J., Skovajsová M., Dušek L., Májek O. (2019): Vyhodnocování adresného zvaní českých občanů do screeningových programů: *Časopis lékařů českých* 158 (3-4): 147–150.

Ondryášová H., Koudeláková V., Hajdůch M. (2013): Karcinom cervixu – možnost detekce lidského papilomaviru: *Česká gynekologie* 78(3): 289–294.

Oxford J., Kellam P., Collier L. (2016): *Human virology*. Fifth edition. Oxford university press, United Kingdom.

Paolini F., Curzio G., Cordeiro M. N., Massa S., Mariani L., Pimpinelli F., de Freitas A. C., Franconi R., Venuti A. (2017): *Human vaccines & immunotherapeutics* 13(2): 291–297.

Pardini B., De Maria D., Francavilla A., Di Gaetano C., Ronco G., Naccarati A. (2018): MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC cancer* 18: 696.

Paulauskiene J., Ivanauskiene R., Skrodeniene E., Petkeviciene P. (2019): Organised Versus Opportunistic Cervical Cancer Screening in Urban and Rural Regions of Lithuania: *Medicina* 55(9): 570.

Peirson L., Fitzpatrick-Lewis D., Ciliska D., Warren R., Elit L., Dickinson J., Dunfield L., Tsakonas E., Connor Gorber S., Birtwhistle R., Joffres M., Lewin G., Shaw E., Singh H., Mai V., McLachlin C. M. (2013): Canadian Task Force on Preventive Health Care: recommendations on screening for cervical cancer. *CMAJ* 185(1): 35–45.

Pennycook K. B., McCready T. A. (2019): Condyloma Acuminata. [Updated 2019 Oct 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Pereira P. M., Marques J. P., Soares A. R., Carreto L., Santos M. A. (2010): MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PloS one* 5(7): e11780.

Plasterk R. H. (2006): Micro RNAs in animal development: *Cell* 124: 877–881.

Poljak M., Kocjan B. J., Oštrbenk A., Keme K. (2016): Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update: *Journal of clinical virology* 76(1): S3–S13.

Ponto A., Anttila A., Ronco G., et al. (2017): Cancer screening in the European Union. Report on the implementation of council recommendation on cancer screening. Brussels: European Commission.

Rajčáni J, Feror Č.(2006): *Lékařská virologia*. VEDA, Bratislava, Slovensko.

Ribeiro J., Marinho-Dias J., Monteiro P., Loureiro J., Baldaque I., Medeiros R., Sousa H. (2015): miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *BioMed research international* 304584.

Rijkaart D. C., Berkhof J., Rozendaal L., van Kemenade F. J., Bulkman N. W., Heideman D. A., Kenter G. G., Cuzick J., Snijders P. J. F., Meijer, C. J. (2012): Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 13(1): 78–88.

Roberts I., Ng G., Foster N., Stanley M., Herdman M. T., Pett M. R., Teschendorff A., Coleman N. (2008): Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR: *BMC Biotechnology* 8: 57.

Rodolakis A., Biliatis I., Symiakaki H., Kershner E., Kilpatrick M. W., Haidopoulos D., Thomakos N., Antsaklis, A. (2012): Role of Chromosome 3q26 Gain in Predicting

Progression of Cervical Dysplasia. *International Journal of Gynecological Cancer* 22(5): 742–747.

Romano P., Ottenheimer D., Kilpatrick M. W., Tsipouras P., Walat R. J. (2013): 3q26 Gene amplification in a woman with abnormal cervical cytology unconfirmed by cervical biopsies. *Laboratory Medicine* 44(3): 267–270.

Ronco G., Giorgi-Rossi P., Carozzi F., Confortini M., Palma P. D., Del Mistro A., Ghiringhello B., Girlando S., Gillio-Tos A., De Marco L., Naldoni C., Pierotti P., Rizzolo R., Schincaglia P., Zorzi M., Zappa M., Segnan N., Cuzick, J. (2010): Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 11(3): 249–257.

Roztočil A., Báca V., Bartoš P., Cvrček P., Doucková P., Dvořák D., Čepický P., Feyereisl J., Hlaváčková L., Hořín P., Hořínová V., Kepák J., Krofta L., Kučera M., Líbalová Z., Peschout R., Roztočilová S., Řežábek K., Skovajsková M., Slaviček L., Šafář P., Šimetka O., Valová A., Zavadil M. (2011): *Moderní gynekologie*. Grada, Praha, ČR.

Sahasrabudde V. V., Luhn P., Wentzensen N. (2011): Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts: *Future microbiology* 6(9): 1083–1098.

Sawaya G. F., Huchko M. J. (2017): Cervical cancer screening: *Medical clinics of north America* 101(4): 743–753.

Sharma G., Dua P., Agarwal S. M. (2014): A Comprehensive Review of Dysregulated miRNAs Involved in Cervical Cancer. *Current genomics* 15(4): 310–323.

Sharma S., Mehrotra R., Das B. C., Bharti A. C. (2015): Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis. *Molecular Cancer* 14:116.

Small W., Bacon M. A., Bajaj A., Chuang L. T., Fisher B. J., Harkenrider M. M., Jhingran A., Kitchener H. C., Mileskin L. R., Viswanathan A. N., Gaffney D. K. (2017): Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer* 13: 2404–2412.



Song Q., An Q., Niu B., Lu X., Zhang N., Cao X. (2019): Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. *Journal of oncology* 7252013.

Sørbye S. W., Arbyn M., Fismen S., Gutteberg T. J., Mortensen E. S. (2011): HPV E6/E7 mRNA testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy. *PloS one* 6(10): e26022.

Stevenson A., Kavanagh K., Pan J., Stevenson L., griffin H., Doorbar J., Scott E., Deeny M., Cuschieri K., Graham S. V. (2018): Risk stratification of cervical disease using detection of human papillomavirus (HPV) E4 protein and cellular MCM protein in clinical liquid based cytology samples: *Journal of clinical virology* 108: 19–25.

Tae-Wook K., Miseon K., Young-Han K., Yong Beom K., Jayeon K., Jae-Weon K., Mi Hye P., Joo Hyun P., Jeong Ho R., Myong Cheol L., Joon-Seok H. (2020): High-risk human papillomavirus testing as a primary screening for cervical cancer: position statement by the Korean Society of Obstetrics and Gynecology and the Korean Society of Gynecologic Oncology. *Journal of Gynecologic Oncology* 31(1): e31.

Thomas T. L. (2016): Cancer prevention: HPV Vaccination: *Seminars in onkology nursing* 32(3): 273–280.

Tian Q., Li Y., Wang F., Li Y., Xu J., Shen Y., Ye F., Wang X., Cheng X., Chen Y., Wan X., Lu W., Xie X. (2014): MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. *Journal of the National Cancer Institute* 106(9): dju241.

Tsakogiannis D., Gartzonika C., Levidiotou-Stefanou L., Markoulatos P. (2017): Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status: *Expert Reviews in Molecular Medicine* 19: E1.

Tuerxun G., Yukeasier A., Lu L., Aierken K., Mijiti P., Jiang Y., Abulizi A., Zhang Y., Abuduxikuer G., Abulizi G., Li, H (2016): Evaluation of careHPV, Cervista Human

Papillomavirus, and Hybrid Capture 2 Methods in Diagnosing Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2+ in Xinjiang Uyghur Women. *The Oncologist* 21(7): 825–831.

Ushizima D. M., Gomes A. H., Carneiro C. M., Bianchi A. G. C. (2013): Automated Pap Smear Cell Analysis: Optimizing the Cervix Cytological Examination. In: 12th International Conference on Machine Learning and Applications, December 4–7, 2013, Miami, FL, USA, pp. 441–444.

Valentino K., Poronsky C. B. (2016): Human papillomavirus infection and vaccination: *Journal of pediatric nursing* 31(2): 155–166.

Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. (2011): Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PloS one* 6(9): e24451.

Von Karsa L., Arbyn M., De Vuyst H., Dillner J., Dillner L., Francesch, S., Patnick J., Ronco G., Segnan N., Suonio E., Törnberg S., Anttila, A. (2015): European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Research* 1: 22–31.

Wentzensen N., Arbyn M. (2017): HPV-based cervical cancer screening – facts, fiction, and misperceptions: *Preventive Medicine* 98: 33–35.

Wentzensen N., Arbyn M., Berkhof J., Bower M., Canfell K., Einstein M., Farley Ch., Monsonego J., Franceschi S. (2016): Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *International journal of cancer* 140(10): 2192–2200.

Wentzensen N., Fetterman B., Castle P. E., Schiffman M., Wood S. N., Stiemerling E., Tokugawa D., Bodelon C., Poitras N., Lorey T., Kinney W. (2015): p16/Ki-67 Dual stain cytology for detection of cervical precancer in HPV-positive women: *Journal of the National Cancer Institute* 107(12): dvj257.

Wentzensen N., Schiffman M., Palmer T., Arbyn M. (2017): Triage of HPV positive women in cervical cancer screening: *Journal of clinical virology* 76(1): S49–S55.

Wentzensen N., von Knebel Doeberitz M. (2007): Biomarkers in cervical cancer screening: *Diseases markers* 23(4): 315–330.

Wijetunga N. A., Belbin T. J., Burk R. D., Whitney K., Abadi M., Grealley J. M., Einstein M. H., Schlecht N. F. (2016): Novel epigenetic changes in CDKN2A are associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic oncology* 142(3): 566–573.

Wright T. C., Behrens C. M., Ranger-Moor J., Rehm S., Sharma A., Stoler M. H., Ridder R. (2016): Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial: *Gynecologic oncology* 144(1): 51–56.

Wright T. C., Stoler M. H., Behrens C. M., Sharma A., Zhang G., Wright T. L. (2015): Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecologic Oncology* 136(2): 189–197.

Yajid A. I., Zakariah M. A., Zin A. A. M., Othman N. H. (2017): Potential role of E4 protein in human papillomavirus screening: a review: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18(2): 315–319.

Yeh P. T., Kennedy C. E., de Vuyst H., Narasimhan M. (2019): Self-sampling for human papillomavirus (HPV) testing: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Global Health* 4:e001351.

Yu L., Fei L., Liu X., Pi X., Wang L., Chen S. (2019): Application of p16/K-67 dual-stainig cytology in cervical cancer: *Journal od cancer* 10(12): 2654–2660.

Yu T., Ferber M. J., Cheung T. H., Chung T. K. H., Wong Y. F., Smith D. I. (2005): The role of viral integration in the development of cervical cancer: *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1: 27–34.

Zeng K., Zheng W., Mo X., Liu F., Li M., Liu Z., Zhang W., Hu X. (2015): Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm. *Archives Gynecology Obstetrics* 292(4):905–13.

Zeng Y., Yi R., Cullen B. R. (2003): MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms: *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 100: 9779–9784.

Zhao J. L., Zhang L., Guo X., Wang J. H., Zhou W., Liu M., Li X., Tang H. (2015): miR-212/132 downregulates SMAD2 expression to suppress the G1/S phase transition of the cell cycle and the epithelial to mesenchymal transition in cervical cancer cells. *IUBMB Life* 67(5): 380–394.

Zheng Z. M., Baker C. C. (2006): Papillomavirus genome structure, expresion, and post-transcriptional regulation: *Frontiers in Bioscience* 1(11): 2286–2302.

Zouridis A., Kalampokas T., Panoulis K., Salakos N., Deligeoroglou E. (2018): Intrauterine HPV transmission: a systematic review of the literature 298(1): 35–44.

Cervikální screening v České republice. [online] [navštíveno dne 12.11.2019] Dostupné z <https://www.cervix.cz/index.php?pg=cervikalni-screening--ceska-republika>

Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual, Edited by J.W. Sellors and R. Sankaranarayanan: Chapter 2: An Introduction to Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). [online] [navštíveno dne 6.11.2019] dostupné z <https://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2>

Epidemiologie zhoubných nádorů v české republice: incidence a mortalita – vývoj v čase. [online] [navštíveno dne 24.10.2019] dostupné z <https://www.svod.cz>

European medicines agency. Cervarix, Gardasil9, Silgard. [online] [navštíveno 8.1.2020] Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR>

International agency for research on cancer: Estimated number of incident case worldwide, females, all ages. [online] [navštíveno dne 24.10.2019] dostupné z <http://gco.iarc.fr>

National cervical screening program: National cervical screening policy. [online] [navštíveno dne 8.1.2020] dostupné z: <http://www.cancerscreening.gov.au/internet/screening/publishing.nsf/Content/national-cervical-screening-policy>

Papillomavirus Episteme. [online] [navštíveno 25.10.2019] Dostupné z [https://pave.niaid.nih.gov/#search/search\\_database/kw?dbNamespace=Genomes&refCloneOnly=false&sort=Locus\\_ID&sortType=true&page=600&start=1&showTable=1&](https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database/kw?dbNamespace=Genomes&refCloneOnly=false&sort=Locus_ID&sortType=true&page=600&start=1&showTable=1&)

Rakovina děložního čípku: prevence. [online] [navštíveno dne 5.11.2019] dostupné z <https://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-verejnost--rakovina-delozniho-cipku--prevence>

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Národní onkologický registr. Metodika sběru dat. [online] [navštíveno dne 14.5.2020] dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/file/registry/nor/nor-metodika-010-20180817-1.pdf>