

Povoľujem zapožičanie mojej diplomovej práce ku študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne citovať.

**Univerzita Karlova v Praze**

**Prírodovedecká fakulta**

Biológia

Genetika, molekulárna biológia a virológia



**Bc. Barbora Gomolčáková**

Stratifikácia rizika progresie ochorenia u pacientok s abnormálnym cytologickým nálezom krčka maternice pomocou molekulárno-genetickej analýzy vybraných biologických faktorov.

Stratification risk of disease progression in patients with abnormal cervical cytologic finding by means of molecular genetic analysis of selected biological factors

Diplomová práca

**Vedúci záverečnej práce: RNDr. Jana Kašpírková PhD.**

**Praha, 2015**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.04.2015

Podpis

## **PodĎakovanie**

Predovšetkým by som sa chcela poďakovať mojej školiteľke RNDr. Jane Kašpírkovej PhD. za možnosť vypracovania tejto práce pod jej vedením, za rady, trpezlivosť a podporu počas celej doby písania. Veľká vďaka patrí tiež celému tímu Bioptrickej laboratoře za ich pomoc a vytvorenie zázemia pre praktickú časť práce. Poďakovanie ďalej patrí doktorovi MUDr. Ondrejovi Ondičovi za konzultácie a rady v oblasti medicíny a v neposlednom rade mojim rodičom, za podporu počas celého štúdia.

## Abstrakt

Predmetom diplomovej práce bolo pomocou molekulárne - genetických techník sledovať vplyv vybraných herpesvírusov, polyomavírusov, *Chlamydie trachomatis* a metylácie promótorov tumor supresorových génov na vznik a progresiu ťažkých lézií u HPV pozitívnych pacientok. Potvrdenie prítomnosti týchto markerov u žien s ťažkými léziami na krčku maternice (KM) by pomohlo zvýšiť potrebnú špecificitu molekulárne genetického HPV testovania a tým ho odporučiť ako primárny *screeningový* test pre prevenciu karcinómu KM. HPV testovanie by tak mohlo nahradiť dnes prevládajúce cytologické vyšetrenie, ktoré vykazuje relatívne nízku citlivosť a tým aj množstvo falošne negatívnych výsledkov.

Analyzované vzorky tvorili cytologické stery KM odobraté do tekutého média od 51 HPV pozitívnych žien s histologicky potvrdenou prítomnosťou ťažkej lézie. Ako kontrola boli použité odbery od 51 žien bez infekcie.

Možný vplyv na progresiu ochorenia bol potvrdený iba pri metyláciách génových promótorov, ktorých prítomnosť bola detegovaná až u 26 pacientok. Je však veľmi nepravdepodobné, aby sa u všetkých týchto žien vyvinul karcinóm. Tento marker by teda mohol pomôcť stratifikovať pacientky v riziku, ale iba do istej miery. Napriek tomu, že samostatné pôsobenie zvyšných markerov v karcinogenéze karcinómu KM nebolo preukázané, nie je vylúčené ich vzájomné spolupôsobenie alebo úloha v spojení s pozitívnym metylačným statusom. Pre potvrdenie týchto hypotéz sú však potrebné ďalšie štúdie.

**Kľúčové slová:** krček maternice, karcinóm krčka maternice, HPV, HPV test, cytológia, biomarkery, koinfekcia, *screening*, špecificita, cervikálna intraepiteliálna neoplázia

## **Abstract**

The aim of this thesis was to track the impact of selected herpesviruses, polyomaviruses, *Chlamydia trachomatis* and methylation of tumor suppressor genes at the development and progression of high grade-lesion in HPV - positive patients by means of molecular-genetic techniques. Confirmation of these markers presence in women with severe lesions of cervix would help to raise necessary specificity of molecular genetics HPV testing and recommend it as a primary screening test for cervical carcinoma prevention. HPV testing could thus replace currently prevailing cytology which has relatively low sensitivity and therefore the number of false negative results.

The analyzed samples consisted of cytological cervical smears of 51 HPV positive women, with histologically confirmed presence of severe lesions, collected in liquid medium. Samplings from 51 women without infection were used as a control.

The possible effect on disease progress was confirmed only in the case of gene promoters' methylation whose presence was detected in up to 26 patients. It is, however, very unlikely that cancer would develop in all these women. This marker could thus help to stratify patients at risk but only to some extent. Although the individual effect of remaining markers has not been established in the carcinogenesis of cervical cancer, there is conceivable synergy between them or a role in conjunction with positive methylating status. To confirm these hypotheses other studies are needed.

**Keywords:** cervix, cervical cancer, HPV, HPV test, cytology, biomarkers, co-infection, screening, specificity, cervical intraepithelial neoplasia

# Obsah

1. Zoznam skratiek.....	7
2. Úvod.....	9
3. Ciele práce .....	11
4. Prehľad literatúry .....	12
4.1. Vírusy a ľudské nádory.....	12
4.2. Karcinóm krčka maternice.....	14
4.2.1. Incidencia a mortalita.....	15
4.2.2. Rizikové faktory .....	16
4.2.3. Prevencia.....	18
4.2.4. Diagnostika a liečba prekanceróz .....	21
4.3. Ľudský papilomavírus – HPV.....	22
4.3.1. Organizácia genómu ľudských papilomavírusov .....	23
4.3.2. Funkcie vírusových proteínov .....	24
4.3.3. Ochorenia asociované s infekciou ľudskými papilomavírusmi.....	28
4.3.4. Sídlo infekcie ľudských papilomavírusov .....	29
4.3.5. Prenos ľudských papilomavírusov.....	30
4.3.6. Vývojový cyklus ľudských papilomavírusov .....	31
4.3.7. Priebeh infekcie vysokorizikovými typmi ľudských papilomavírusov .....	32
4.4. Vybrané biologické markery a ich spojitosť karcinómom krčka maternice.....	34
4.4.1. Ľudské herpetické vírusy .....	34
4.4.2. Ľudské polyomavírusy.....	40
4.4.3. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	44
4.4.4. Metylácia hostiteľskej DNA .....	46
5. Materiál a metódy .....	48
5.1. Typy materiálu použité na analýzu .....	48
5.2. Izolácia DNA .....	48
5.2.1. Izolácia DNA z LBC nádoby ThinPrep® - detekcia vírusov a <i>CT</i> .....	48
5.2.2. Izolácia DNA z LBC nádoby ThinPrep® - detekcia metylácií .....	50
5.3. Meranie koncentracie a čistoty DNA.....	50
5.4. Konvenčná jednokolová PCR.....	51
5.5. Gélová elektroforéza.....	53
5.6. Sekvenácia .....	54
5.6.1. Prečistenie PCR reakcie .....	54
5.6.2. Sekvenačná reakcia.....	54
5.6.3. Prečistenie sekvenačnej reakcie.....	55
5.6.4. Kapilárna elektroforéza.....	55
5.6.5. Analýza sekvencií .....	55
5.7. real - time - kvantitatívna PCR (qPCR).....	55
5.8. Detekcia RNA.....	57
5.8.1. Detekcia mRNA.....	57
5.8.2. Detekcia rRNA .....	58
5.9. Detekcia metylácií .....	58

5.9.1. Bisulfidická konverzia .....	58
5.9.2. Multiplexová metylačne špecifická qPCR.....	59
5.10. Hybridizačné metódy .....	60
5.11. Štatistické spracovanie výsledkov .....	63
6. Výsledky .....	64
6.1. HPV testovanie .....	64
6.2. Detekcia vybraných biologických markerov – analyzované vzorky .....	64
6.3. Detekcia vybraných biologických markerov – kontrolná skupina .....	66
6.4. Štatistická analýza.....	68
7. Diskusia .....	69
7.1. Kvalita a kvantita DNA .....	69
7.2. Rozbor výsledkov .....	70
8. Súhrn.....	75
9. Literatúra.....	76



## 1. Zoznam skratiek

BC	bunkový cyklus	
BKV	BK vírus (iniciály pacienta)	
CDK	na cyklínoch závislé kinázy	cyclin dependent kinase
CIN	cervikálna intraepiteliálna neoplázia	
CMV	cytomegalovírus	
CNS	centrálna nervová sústava	
<i>CT</i>	<i>chlamydia trachomatis</i>	
EBV	vírus Epstein-Barrové	
F	priamy <i>primer</i>	Forward primer
FFPE	formalínom fixované tkanivá zaliate v parafínových blokoch	Formalin - Fixed, Paraffin-Embedded
HHV	ľudský herpes vírus	human herpes virus
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti	human immunodeficiency virus
HPV	ľudský papilomavírus	human papillomavirus
HR	vysoko rizikový	High Risk
HSV	ľudský herpesvírus	herpes simplex virus
JCV	JC vírus (iniciály pacienta)	
KKM	karcinóm krčka maternice	
KM	krčok maternice	
LBC	tekutá cytológia	Liquid Based Cytology
LCR	dlhý kontrolný región	Long Control Region

LR	nízko rizikový	Low Risk
MCC	Karcinóm z Merkelových buniek	Merkel cell carcinoma
MCPyV	polyomavírus Merkelových buniek	Merkel cell polyomavirus
MM	Master Mix	
OR	oplachovací roztok	
ORFs	otvorené čítacie rámce	Open Reading Frames
PR	premyváci roztok	
PV	papilomavírusy	
R	reverzný <i>primer</i>	Reverse primer
STM	transportné médium pre vzorky	Sample Transport Medium
TSG	tumor supresorové gény	
VLPs	vírusu podobné častice	Virus - Like Particles
VZV	varicela-zoster vírus	

## 2. Úvod

Malígna transformácia bunky a vznik zhubného nádoru patria medzi základné problémy v onkológii, molekulárnej biológii a aj genetike. Medzi dnes intenzívne študované typy nádorov patrí bezpochyby aj karcinóm krčka maternice (KKM). Toto smrteľné ochorenie je celosvetovo na tretej / štvrtej priečke v rebríčku najčastejších nádorových ochorení u žien (v závislosti od krajiny) a má ročne na svedomí viac ako 260 000 úmrtí. Jeho etiopatogenéza je spájaná s infekciou ľudským papilomavírusom (HPV), ktorý je prítomný u takmer všetkých prípadov tohoto ochorenia.

Boj s KKM spočíva najmä v prevencii, ktorá zahŕňa dobrovoľné očkovanie a pravidelný gynekologický *screening*. Celoplošný gynekologický - cytologický screening, založený na mikroskopickej identifikácii abnormálnych buniek krčka maternice (KM) (z tzv. PAP náterov) rapídne znížil incidenciu karcinómu. Je to časovo nenáročná diagnostická metóda, ktorá dokáže zachytiť už začínajúce patologické zmeny na bunkách KM, ktoré nie je možné vidieť pri bežnom gynekologickom vyšetrení. Problémom tohto testovania sú však viaceré obmedzenia. Jedným z nich je napríklad kvalita steru vykonaná gynekológom; bunky môžu byť prekryté hustým hlienom, hnisom alebo krvou, nátery nemusia obsahovať dostatočný počet buniek na analýzu alebo sú bunky nesprávne nafarbené. Ďalším obmedzením je nízka citlivosť pre detegovanie predrakovinových zmien a problematická diagnostika adenokarcinómu, ktorý sa nachádza až v zadnej časti KM. V neposlednom rade hrá dôležitú úlohu subjektívne hodnotenie cytológa a nevyhnutnosť opakovaného *screeningu* v relatívne krátkych časových intervaloch. Cytologické vyšetrenie je teda vysoko špecifické, ale relatívne málo citlivé. To môže zredukovať záchyt ohrozených žien potrebujuúcich liečbu.

Možnosťou na odstránenie časti týchto limitácií je používanie tzv. tekutých cytológií (LBC). Zaisťujú dobrú kvalitu preparátov, počítačové vyhodnocovanie, možnosť zopakovania analýzy bez nutnej ďalšej návštevy pacientky u gynekológa a najmä možnosť vykonania molekulárne – genetického HPV testu z jedného odberu.

Molekulárne genetické testy pre detekciu HPV zo steru KM ponúkajú oproti cytologickému vyšetreniu, ktoré momentálne prevažuje, mnohé výhody. Je to najmä vyššia citlivosť pre identifikáciu predrakovinových lézií, vrátane adenokarcinómu, lepšia reprodukovateľnosť výsledkov, menšie zaťaženie subjektívnym hodnotením a v prípade negatívneho výsledku dlhší časový interval ďalšej prehliadky bez rizika.

HPV testom však nie je možné odlíšiť neškodnú, prechodnú infekciu od perzistujúcej infekcie, spôsobujúcej malígne bunkové zmeny, pričom iba u zlomku žien s nálezom

vysokorizikového typu vírusu sa v budúcnosti vyvinú závažné predrakovinové lézie. Odoslanie všetkých pozitívnych pacientok na ďalšie, invazívnejšie zákroky (biopsia atď.) by spôsobilo zbytočnú záťaž žien prehnanou liečbou a tiež zvýšenie finančných nákladov. Z dôvodu nízkej špecificity testu v porovnaní s cytológiou nie je zatiaľ HPV testovanie doporučené ako primárny nástroj gynekologického *screeningu* a vykonáva sa iba v výnimočných prípadoch.

Vzhľadom na to, že vírus HPV je nevyhnutným, ale nie postačujúcim faktorom pre vývin karcinómu, sú pre zvýšenie citlivosti HPV testu predmetom výskumu ďalšie, aditívne markery, ktoré by mohli podporovať aktívnu onkogénnu úlohu vírusu v karcinogéze. Predpokladá sa, že by pomohli odlíšiť podskupinu žien s prechodnou HPV infekciou od tých s perzistujúcou infekciou, a tak s vysokou pravdepodobnosťou vývinu predrakovinových zmien. Tým by sa znížil počet žien odoslaných na ďalšie vyšetrenia.

Medzi študované možné kofaktory vo vývoji KKM patria najmä mikroorganizmy prenosné pohlavným stykom, slinami, vzduchom alebo dotykom. Ďalej sú to napríklad organizmy perzistujúce v tele v blízkosti KM. Patria medzi ne niektoré ľudské herpes vírusy, ľudské polyomavírusy, vírus imunitnej nedostatočnosti (HIV) alebo *Chlamydia trachomatis*. Z iných biologických markerov sú sledované najmä epigenetické zmeny ako metylácie tumor supresorových génov (TSG), modifikácie histónov alebo regulácia microRNA.

V diplomovej práci bol pomocou molekulárno – genetických metód sledovaný vplyv vybraných biologických markerov na vznik ťažkej lézie u 51 HPV pozitívnych pacientok, ktoré podstúpili LBC cytologický *screening*. Ťažké lézie boli u týchto žien histologicky potvrdené patológom na vzorkách z odobranej biopsie. Medzi pozorované markery boli vybrané vírusy z čeľade herpetických vírusov (herpes simplex vírus 1, herpes simplex vírus 2, varicella-zoster vírus, vírus Epstein - Barrovej, cytomegalovírus, ľudský herpesvírus 6 a ľudský herpesvírus 8), polyomavírusov (vírus BK, vírus JC, ľudský polyomavírus izolovaný z karcinómu Merkelových buniek), baktéria *Chlamydia trachomatis* a metylácie promótorov vybraných hostiteľských TSG. Bola hodnotená prítomnosť jednotlivých markerov a ich prípadné kombinácie.

Ak by sa podarilo nájsť vhodný biologický marker, ktorý by zvýšil špecificitu HPV testovania v rámci gynekologického *screeningu* a bol by zavedený do rutínnej praxe, pomohlo by to redukovať počet žien, ktoré by inak potenciálne unikli zaužívanému cytologickému vyšetreniu. Vyselektovanie žien s prechodnou infekciou HPV by obmedzilo ďalšie zbytočné zákroky na minimum.

### 3. Ciele práce

- použitím molekulárno-genetických metód sledovať v cytologických vzorkách krčka maternice prítomnosť metylácie troch tumor supresorových génov a infekciu vybraných vírusov a baktérií, v súvislosti so vznikom ťažkej predrakovinovej lézie u HPV pozitívnych žien
- nájsť vhodný biologický marker, ktorý by pomohol zvýšiť citlivosť HPV testovania a tým ho odporučiť ako hlavný nástroj gynekologického *screeningu*
- overiť predpoklad, že vybrané markery môžu mať vplyv na vznik ťažkých lézií krčka maternice

## 4. Prehľad literatúry

### 4.1. Vírusy a ľudské nádory

Nádory vznikajú autonómnym invazívnym rastom buniek do svojho okolia a ich rozšírením do iných častí tela – metastázovanie. Vznik a vývoj zhubného nádoru (karcinogéza) je u človeka multifaktorový a niekoľkostupňový proces, ktorý je podmienený nahromadením genetických zmien, spôsobujúcich vymknutie sa buniek z regulovaného bunkového cyklu. Zmeny genetickej informácie sú spôsobené rôznymi vnútornými (dedičnosť) a vonkajšími podnetmi (karcinogénmi). Okrem typických fyzikálnych a chemických karcinogénov je preukázané, že zhubné nádory môžu byť vyvolané aj pôsobením niektorých vírusov. Infekcia vírusmi je spájaná až s 15 – 20 % všetkých nádorových ochorení (Javier a Butel 2008). Výskum úlohy týchto vírusov, tzv. onkovírusov, v etiopatogenéze ľudských nádorov je však veľmi zložitý z dôvodu komplikovaného prenosu poznatkov získaných na experimentálnych modeloch na človeka.

Etiologickú úlohu vírusov pri tvorbe nádorov je ťažké dokázať aj z dôvodu, že vírusmi spôsobené nádory sa vyvíjajú niekoľko rokov až desaťročí a ich penetrancia nie je stopercentná. Iba u malého počtu nakazených jedincov dôjde k vzniku zhubného nádoru. U väčšiny infikovaných je vznik nádoru potlačený pôsobením obranných mechanizmov imunitného systému. Vo vzniknutých nádoroch tiež často nedochádza k tvorbe infekčných foriem vírusu (Klein a DiMaio 2006).

Na dokázanie príčinnej súvislosti medzi patogénom a ochorením sa vychádza z upravenej verzie Kochových postulátov, zohľadňujúcej molekulárne biologické techniky (Fredericks a Relman 1996).

1. Sekvencia nukleovej kyseliny podozrivého mikroorganizmu (patogénu) je prítomná vo väčšine prípadov ochorenia; genóm patogénu sa nachádza iba v známych postihnutých tkanivách.
2. V hostiteľovi alebo v tkanivách bez ochorenia sa nachádza menej, respektíve žiadna sekvencia nukleovej kyseliny mikroorganizmu.
3. Po vyliečení ochorenia sa zníži počet kópií genómu mikroorganizmu; v prípade návratu ochorenia naopak.
4. Genóm mikroorganizmu je detekovateľný pred vypuknutím ochorenia a počet jeho kópií koreluje s jeho závažnosťou.

5. Povaha mikroorganizmu identifikovaného detekciou sekvencie jeho genómu je v zhode s biologickými charakteristikami skupiny daných mikroorganizmov.
6. Genóm mikroorganizmu je detekovateľný v predpokladaných, konkrétnych miestach tkaniva.
7. Dôkaz mikrobiálnej príčiny ochorenia založený na sekvencii nukleových kyselín je reprodukovateľný.

Doteraz je známych šesť druhov vírusov, u ktorých bola preukázaná etiologická úloha pri vzniku nádorov u ľudí (Tabuľka č. 1):

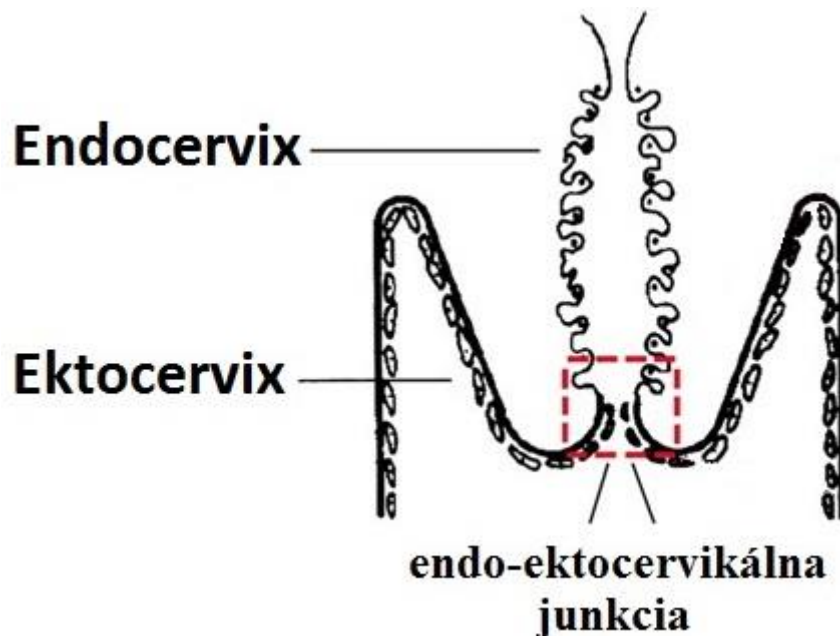
Tabuľka č. 1: Ľudské zhubné nádory spôsobené vírusmi (upravené podľa Laco 2012)

VÍRUS	NUKLEOVÁ KYSELINA	ZHUBNÝ NÁDOR
Ľudské papilomavírusy – HPV	DNA	karcinóm krčka maternice
		karcinóm vulvy
		karcinóm penisu
		karcinóm perianálnej oblasti
		karcinómy hlavy a krku
vírus hepatitídy B – HBV	DNA	hepatocelulárny karcinóm
vírus hepatitídy C – HCV	RNA	hepatocelulárny karcinóm
Ľudský herpesvírus 8 - HHV-8	DNA	Kaposiho sarkóm
		lymfóm serózných blán
vírus Ebsteina-Barrovej - EBV	DNA	karcinóm nosohltanu
		Hodgkinov lymfóm
		Burkittov lymfóm
Ľudský T-lymfotropný vírus 1 - HTLV1	RNA	T-bunková leukémia/lymfóm dospelých
Merkel cell polyomavírus - MCPyV	DNA	<i>Karcinóm z Merkelových buniek</i>

## 4.2. Karcinóm krčka maternice

Krčok maternice (KM), lat. *cervix uteri*, tvorí spodnú časť maternice a spája telo maternice s vagínou. Je tvorený dvoma časťami, vonkajším ektocervixom a vnútorným endocervixom.

Dlaždicovobunkový epitel pokrývajúci ektocervix prechádza v oblasti tzv. endo-ektocervikálnej junktie (skvamo-kolumnárna junktia) (Obrázok č. 1) na epitel cylindrický. Bunky endo-ektocervikálnej junktie sa vyznačujú výraznou proliferačnou aktivitou a môžu sa diferencovať na metaplastický dlaždicovobunkový epitel. Táto prechodná oblasť, tzv. transformačná zóna je preto najviac náchylná na nepriaznivé vplyvy vonkajšieho prostredia (Chow a kol. 2010).



Obrázok č. 1: Krčok maternice – cervix (upravené podľa Herfs a kol. 2012)

Ako kľúčový faktor pri vzniku karcinómu krčka maternice (KKM) bola preukázaná pretrvávajúca infekcia vysoko rizikovým typom ľudského papilomavírusu - HPV (HR - HPV) (Zur Hausen a de Villiers 1994). Genóm tohoto vírusu bol preukázaný u 99,7 % prípadov (Walboomers a kol. 1999).

Epitelové bunky vystielajúce krčok maternice pred vznikom samotného karcinómu prechádzajú rozličnými predrakovinovými štádiami (prekancerózy) delenými podľa ich závažnosti. Na ich histologické hodnotenie sa používa klasifikácia podľa stupňov CIN – cervikálna intraepitelová neoplázia (Richart 1967, 1990) (Tabuľka č. 2):



Tabuľka č. 2: Klasifikácia predrakovinových lézií (prekanceróz) podľa Richarta 1967, 1990

Richart 1967		Richart 1990
CIN I	mierna dysplázia	LG CIN
CIN II	stredne ťažká dysplázia	HG CIN
CIN III	ťažká dysplázia	

LG CIN – „low - grade“ CIN - cervikálna *intraepitelová* neoplázia nízkeho stupňa

HG CIN – „high - grade“ CIN - cervikálna *intraepitelová* neoplázia vysokého stupňa

Preinvazívne lézie môžu ustúpiť alebo postupovať až k invazívnemu karcinómu. Ich prítomnosť teda ešte neznamená stopercentnú istotu vývinu karcinómu.

KKM sa vyskytuje v najčastejšie dvoch hlavných formách; dlaždicovobunkový karcinóm a adenokarcinóm. Dlaždicovobunkový (skvamózny) karcinóm tvorí až v 80 – 90 %. Vyvíja sa v dlaždicových bunkách v mieste, kde sa ektocervix spája s endocervixom. Cervikálny adenokarcinóm vzniká z hlien produkujúcich žľazových buniek endocervixu. (<http://www.cancer.org/cancer/cervicalcancer/detailedguide/cervical-cancer-what-is-cervical-cancer>).

#### 4.2.1. Incidencia a mortalita

Karcinóm krčka maternice (cervikálny karcinóm) je celosvetovo 3. – 4. najčastejší typ rakoviny u žien, ktorého incidencia je výrazne spájaná s úrovňou vývoja krajiny. Krajiny s nižším indexom ľudského rozvoja majú aspoň 4-krát vyššiu incidenciu karcinómu v porovnaní s tými na vyšších priečkach. Podobne je to aj s prežívaním pacientov. Menej ako 20 % chorých v málo rozvinutých krajinách sa dožije 5 rokov, na rozdiel od viac ako 65 % v krajinách s rozvinutou kvalitnou zdravotníckou starostlivosťou. V roku 2012 bolo celosvetovo odhadovaných takmer 530 000 nových prípadov KKM. Z odhadovaných 266 000 úmrtí pripadá až 85 % na rozvojové krajiny. Je to najmä pre nedostupnosť prevencie vo forme pravidelného *screeningu*, ktorý odhaľuje predrakovinové zmeny v štádiách, kedy môžu byť ešte úspešne liečené. Včasná liečba zabraňuje vzniku až 80 % karcinómov. Vysoká úmrtnosť, globálne až 52 %, by mohla byť redukovaná efektívnym *screeningom* (Ferlay a kol. 2012, Forman a kol. 2012).

V Českej republike je ročne diagnostikovaných viac ako 1000 nových prípadov KKM ročne, z toho takmer 400 pacientok na toto ochorenie zomrie (Májek a kol. 2015)

#### **4.2.2. Rizikové faktory**

Infekcia HPV je nevyhnutná pre transformáciu epitelových buniek ale nie je postačujúca. Vývoj karcinómu ovplyvňujú mnohé ďalšie faktory.

##### ***Dedičnosť***

Genetická predispozícia môže ovplyvniť pravdepodobnosť infekcie HPV, citlivosť na infekciu a pretrvávanie HPV infekcie, tak ako aj rýchlosť vzniku nádoru (Magnusson a kol. 2000). Za jeden z možných rizikových dedičných faktorov sa považuje variabilita polymorfizmov v TSG (tumor supresorové gény). Jeden z kandidátnych génov je gén, kódujúci proteín TP53. U tohto proteínu sa predpokladá schopnosť ovplyvnenia onkogénneho potenciálu včasného HPV onkoproteínu E6. Jednotlivé dedičné polymorfizmy v kódujúcom géne (*p53*) by mohli vplývať na jeho citlivosť k E6 sprostredkovanej degradácii. To môže byť spájané so schopnosťou pretrvávania vírusu a s progresiou buniek k vzniku nádoru (Storey a kol. 1998).

##### ***Fajčenie***

Niektoré karcinogénne zložky cigaretového dymu, ako nikotín a jeho hlavný metabolit kotinín, sú značne zvýšené v hliene KM u fajčiarok (McCann a kol. 1992). V epitely krčka boli taktiež zdokumentované DNA poškodenia spájané s pôsobením cigaretového dymu (Phillips a Ni Shé 1993). Riziko vzniku dlaždicovobunkového karcinómu (nie adenokarcinómu) u pravidelných fajčiarov stúpa s počtom vyfajčených cigariet denne a taktiež u osôb, ktoré začali s fajčením v mladom veku (Appleby a kol. 2006).

##### ***Oslabená imunita***

Vírus nedostatku ľudskej imunity - HIV (Human Immunodeficiency Virus) spôsobujúci ochorenie AIDS ničí prirodzené obranné mechanizmy imunitného systému a tým u infikovaných osôb 5-krát zvyšuje pravdepodobnosť pretrvávajúcej infekcie HR - HPV. HIV pozitívne ženy majú až 40-krát vyššie riziko vzniku prekanceróz (Moodley a kol. 2006).

Ohrození sú aj pacienti po transplantáciách (Schneider a kol. 1983) a v posledných štádiách obličkových ochorení. Zvýšené riziko predrakovinových lézií sa zistilo aj pri autoimunitných chorobách liečených liekmi potlačujúcimi imunitu (Dugué a kol. 2013).

### ***Hormonálna antikoncepcia***

Dlhodobé užívanie hormonálnej antikoncepcie (> 5 rokov) alebo jej nedávne užívanie zvyšuje risk KKM na dvojnásobok. Toto vysoké riziko sa zníži na bežné hodnoty o cca 10 rokov po jej vysadení (La Vecchia a Boccia 2014).

### ***Striedanie sexuálnych partnerov***

S vyšším počtom sexuálnych partnerov stúpa aj šanca kontaktu s HR – HPV typmi. Ženy s 10 a viac sexuálnymi partnermi majú 3-krát vyššie riziko vzniku KKM (Brinton a kol. 1987).

### ***Nízky vek pri prvom pohlavnom styku a tehotenstve***

Prvý sexuálny styk vo veku pod 17 rokov a prvé tehotenstvo v takomto nízkom veku patrí medzi najvýznamnejšie riziká vzniku KKM. V priebehu puberty je ešte nezrelý KM vystavený zvýšenému množstvu hormonálnych zmien, ktoré stimulujú metaplastické zmeny v oblasti transformačnej zóny. V prípade HR – HPV infekcie sa tak zvyšuje pravdepodobnosť transformačných zmien vyúsťujúcich do predrakovinových lézií (Brinton a kol. 1987, Louie a kol. 2009).

### ***Opakované tehotenstvo***

Vyšší počet donosených tehotenstiev priamo súvisí so zvyšujúcim sa rizikom dlaždicovobunkového karcinómu u HPV pozitívnych žien (Brinton a kol. 1987, Muñoz a kol. 2002). Tento fakt môže mať súvis so zraneniami KM, ku ktorým dochádza v momente, keď dieťa pri pôrode opúšťa maternicu ([www.diseaseriskindex.harvard.edu/update/hccpquiz.pl?lang=english&func=show&quiz=cervical&page=risk\\_list#numberbirth](http://www.diseaseriskindex.harvard.edu/update/hccpquiz.pl?lang=english&func=show&quiz=cervical&page=risk_list#numberbirth)).

### ***Chudoba***

Socioekonomický status má značný vplyv na incidenciu a mortalitu u nádorových ochorení. V chudobnejších častiach sveta a rozvojových krajinách je pre nedostatočnú, prípadne nedostupnú zdravotnú starostlivosť riziko vzniku týchto ochorení výrazne zvýšené. V prípade KKM je problém najmä v chýbajúcej funkčnej prevencii vo forme celoplošného *screeningu* (Forman a kol. 2012).

### **4.2.3. Prevencia**

Neliečený invazívny KKM je vo väčšine prípadov fatálny. Akonáhle sa prejavia jeho symptómy, liečba je veľmi komplikovaná. Z tohto dôvodu sa kladie dôraz na jeho prevenciu.

Základnou prevenciou je vyhýbanie sa možným rizikovým faktorom ako je fajčenie, striedanie väčšieho počtu sexuálnych partnerov a ďalšie vyššie spomenuté. Iné formy prevencie sú dvojakého charakteru: zabránenie HPV infekcie prostredníctvom očkovania a sledovanie možných dysplastických zmien na epitely KM vo forme pravidelného *screeningu*.

#### **Očkovanie proti vysokorizikovým typom HPV**

Komerčne dostupné preventívne vakcíny chránia pred infekciou najčastejšími HR - HPV typmi (HPV16/18) a zabraňujú tak vzniku až 70 % KKM. Sú konštruované s použitím častíc podobných vírusu VLPs (virus-like particles) pozostávajúcich z obalového proteínu ľudského papilomavírusu - L1. Tieto vakcíny vyvolávajú protilátkovú odpoveď organizmu, ktorá je oveľa silnejšia (1 – 4 krát) ako odpoveď po prirodzenej infekcii. Imunogenicitu je dosiahnutá pridaním špecifických adjuvantov, silnou imunogenicitou samotného VLPs ako aj vnútro svalovým spôsobom podania. Ochrana pretrváva aj pri veľmi nízkych hladinách protilátky a jej trvanie, v závislosti od typu použitej vakcíny, sa odhaduje na 5 až 8,4 rokov. Nutnosť neskoršieho preočkovania však ešte nie je potvrdená. U aktuálne dostupných vakcín bola preukázaná aj krížová reaktivita proti ďalším, fyziologicky podobným HR – HPV typom, najmä proti HPV 31, 33 a 45 (Dochez a kol. 2014).

#### **Screening**

.KKM spĺňa všetky kritéria pre úspešný *screening*. Je to často sa vyskytujúce ochorenie, je známa jeho etiopatogenéza a existujú dobre definované, relatívne dlho sa vyvíjajúce predrakovinové štádiá, ktoré sa dajú relatívne spoľahlivo vyhľadávať a dobre liečiť.

#### **Cytológia**

Zavedenie pravidelného cytologického vyšetrenia zo sterov KM podľa Papanicolaou (Traut a Papanicolaou 1943) – Pap test, pomohlo značne znížiť incidencia cervikálnych karcinómov. Vyšetrenie spočíva v detegovaní abnormálnych buniek, ktoré by sa potenciálne mohli vyvinúť v karcinóm. Bunky sú klinicky odobrané pomocou odberovej kefy a následne pripravené na testovanie dvomi spôsobmi.

Pri klasickom Pap teste je ster nanosený na mikroskopické sklíčko s pridaním fixatíva. Pri automatizovanom Pap teste z tekutého média – LBC (liquid based cytology) je odobraný materiál vložený do odberovej nádoby s fixačným roztokom. Výhodou tohto odberu je možnosť použitia vzorky aj na ďalšie vyšetrenia (napr. HPV test) a aj jeho vyššia citlivosť oproti klasickému steru na sklíčku (Kinkorová Luňáčková 2013). Na hodnotenie buniek v odobratom materiáli sa používa najnovší terminologický systém Bethesda 2001 (Tabuľka č. 3) (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/Pap-HPV-testing>, Apgar a kol. 2003).

V Českej republike je cytologický *screening* ženám po začatí sexuálneho života nariadený vyhláškou Ministersva zdravotníctva ČR č.3/2010 Sb. jedenkrát ročne v rámci pravidelnej gynekologickej prehliadky. V prípade zistenia iného, ako negatívneho nálezu cytológie, sú podľa závažnosti zavedené ďalšie postupy (prehliadka v kratšom časovom intervale 3 – 6 mesiacov, špeciálne kolposkopické vyšetrenie, biopsia atď.) (Obrázok č. 2) (<http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-lekare--screeningovy-proces>).

Tabuľka č. 3: hodnotenie Pap testu systémom Bethesda 2001, vzťah ku klasifikácii CIN

<b>Pap test</b>	<b>CIN Richart 1967</b>	<b>Popis</b>	<b>Bethesda 2011</b>
	<b>histologický nález</b>		<b>cytologický nález</b>
I.	normálny	bez abnormálnych buniek	v medziach normy
II.	normálny	atypické dlaždicové / žľazové bunky (neznámeho pôvodu alebo typické pre HPV infekciu)	ASC-US, ASC-H, AGC-NOS, AGC-NEO
III.	CIN I	ľahká dysplázia	LSIL / LGSIL
III.	CIN II	stredne ťažká dysplázia	HSIL / HGSIL
III.	CIN III	ťažká dysplázia	HSIL / HGSIL
IV.	CIN III	karcinóm <i>in situ</i> , AIS	HSIL / HGSIL
V.	karcinóm	pozitívne na nádorové bunky	Karcinóm

ASC-US - atypické dlaždicové bunky neznámeho pôvodu (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance)

ASC-H - atypické dlaždicové bunky - nemožno vylúčiť HSIL (Atypical Squamous Cells - cannot exclude HSIL)

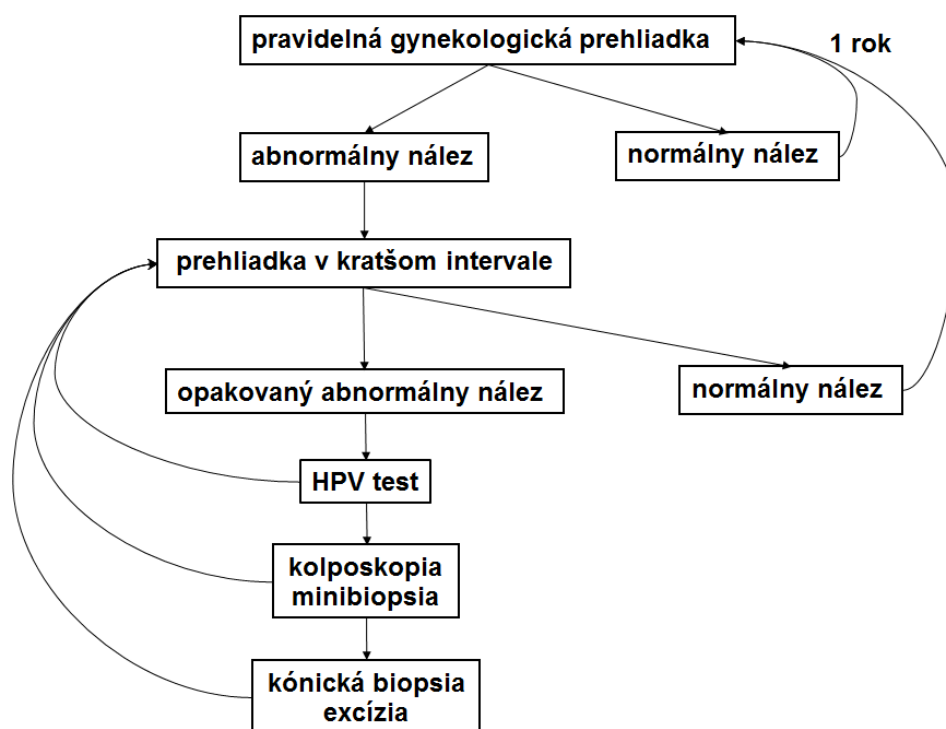
AGC-NOS - atypické žľazové bunky bez podozrenia (Atypical Glandular Cells - Not Otherwise Specified)

AGC-NEO - atypické žľazové bunky, nie je vylúčená neoplázia (Atypical Glandular Cells, suspicious for AIS or cancer)

LSIL/LGSIL - ľahká dlaždicová *intraepitelová* lézia (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion)

HSIL/HGSIL - ťažká dlaždicová *intraepitelová* lézia (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion)

AIS – Adenokarcinóm *In Situ*



Obrázok č. 2: Zjednodušené schéma gynekologického *screeningu* a s ním spojených odporých zákrokov

Špecifická cytologického vyšetrenia dosahuje takmer 97 %. To znamená, že takmer všetky cytologicky detegované abnormálne stery majú aj histologicky potvrdený nález dysplázie. Citlivosť tejto metódy však väčšinou nepresiahne hodnotu 60 % (v závislosti od konkrétnej štúdie a sledovanej krajiny) (Mayrand a kol. 2007, Cuzick a kol. 2006). Nie je teda možné zachytiť všetky pacientky s prítomnými dysplastickými léziami. To spôsobuje veľké množstvo falošne negatívnych výsledkov, čo má za následok únik žien s rizikom možného vývinu karcinómu. Falošná negativita cytologického vyšetrenia pri dlaždicovobunkovom karcinóme je 10 – 20 % a pri adenokarcinóme až 40 – 45 % (<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/prekancerozy-138909>).

### HPV testovanie

HPV testovanie spočíva v detekcii prítomnosti nukleových kyselín HR - HPV typov v bunkách z cytologických sterov. Testy môžu buď detegovať viaceré HR - HPV bez identifikácie konkrétneho typu alebo špecificky identifikovať najčastejšie a najnebezpečnejšie typy. Test odhalí HPV infekciu ešte pred možným vývinom prekanceróz. Odbery na preventívne vyšetrenie sa vykonávajú tak ako pri cytologickom *screeningu* s použitím LBC alebo odberovej nádoby s transportným médiom (STM - Sample Transport Medium). Test je ale možné vykonať z viacerých typov biologického materiálu, vrátane tkanív fixovaných vo formalíne a

zaliatych do parafínu (FFPE – Formalin-fixed, paraffin-embedded). Súčasné HPV testy sú založené na dvoch metódach: metódy amplifikujúce cieľ a metódy amplifikujúce signál (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/Pap-HPV-testing>, Brink a kol. 2007).

**Metódy amplifikujúce cieľ** spočívajú najmä v namnožení nukleových kyselín pomocou PCR, ich následnej vizualizácii a analýze. Základom reakcií sú špeciálne navrhnuté *primery*, komplementárne ku konzervatívnym úsekom genómu vybraným HPV typov. Výsledné amplicky sú sekvenované. Často už značené PCR produkty sú hybridizované s oligonukleotidovými sondami a konečný efekt je vizualizovaný kolorimetricky alebo fluorescenčne. Neznačené amplicky sa analyzujú sekvenovaním. V súčasnosti sa používajú aj metódy detegujúce mRNA vírusových onkoproteínov, ktoré využívajú RT – PCR alebo novšie izotermálne metódy (TMA, NASBA). Týmto spôsobom sa analyzujú vzorky z cytologických sterov, zamrazeného tkaniva aj z FFPE (Brink a kol. 2007).

**Metódy amplifikujúce signál** sa využívajú pri zisťovaní prítomnosti HPV DNA v cytologických steroch z LBC alebo STM. Princípom je hybridizácia špecifickej, často značenej sondy s vírusovou nukleovou kyselinou. Signál z naviazanej sondy je následne namnožený a vizualizovaný. Nevýhoda týchto metód oproti metódam amplifikujúcim cieľ je ich nižšia špecificita pre jednotlivé typy HPV (Brink a kol. 2007).

Citlivosť HPV testov pre lézie stupňa CIN II + oproti cytologickému *screeningu* je markantne vyššia, dosahuje hodnoty okolo 95 % (v závislosti od konkrétnej štúdie a sledovanej krajiny). Klinická špecificita s hodnotami okolo 21 - 43 % (v závislosti od použitej testovacej metódy) je však oveľa nižšia, ako pri cytologickom vyšetrení (Mayrand a kol. 2007, Cuzick a kol. 2006, Szarewski a kol. 2008), čo má za následok väčší počet žien odoslaných na kolposkopické, prípadne biopsické vyšetrenie. Týmto testovaním, pokiaľ nie je opakované, nie je taktiež možné od seba odlíšiť ženy s prechodnou a s pretrvávajúcou infekciou.

HPV testovanie v ČR nie je zatiaľ súčasťou ročných preventívnych prehliadok. Vykonáva sa na vyžiadanie lekára v sporných prípadoch (napr. ASC-US), čo predstavuje iba cca 4 % cytologicky vyšetrených pacientov z priemerného počtu vyšetrení za rok (<http://hpvinfo.cz/diagnoza-hpv>).

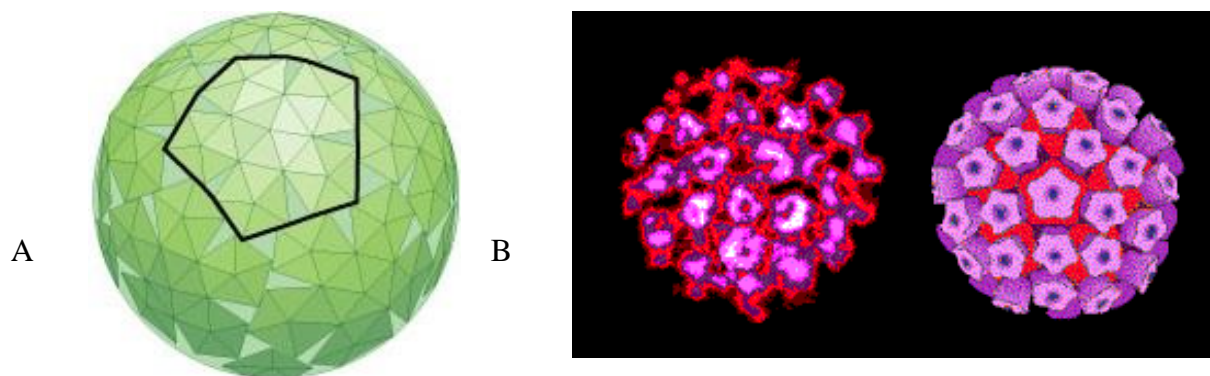
#### **4.2.4. Diagnostika a liečba prekanceróz**

Pri opakovaných abnormálnych cytologických nálezoch sú pacientky odoslané na kolposkopické vyšetrenie. Kolposkopom vďaka zväčšovacím šošovkám ošetrujúci lekár vidí

jasne z blízka celý krčok maternice. V prípade nálezu podozrivých buniek je vykonaná kolposkopická biopsia, pri ktorej sa odstráni kúsok tkaniva. Pokiaľ nie je transformačná zóna dobre viditeľná, je vykonaný zoškrab časti endocervixu pomocou kyrety. Na zistenie prítomnosti predrakovinových zmien je vzorka následne odoslaná na histologické vyšetrenie patológovi. Pri závažnom náleze sa vykonáva kónická biopsia (tzv. konizácia), spočíva v odstránení časti tkaniva KM v tvare kónusu, ktorý obsahuje transformačnú zónu. Bázická časť kónusu je tvorená vonkajšou časťou ektocervixu a vrchol pozostáva z endocervikálneho kanála. Odstránením prekanceróz a skorých štádií karcinómu, môže tento typ biopsie slúžiť ako jediná potrebná liečba. Keďže tento zákrok nesie so sebou riziko predčasného pôrodu, je nutné jeho indikáciu dôkladne zvážiť (<http://www.cancer.org/cancer/cervicalcancer/detailedguide/cervical-cancer-diagnosis>).

### 4.3. Ľudský papilomavírus – HPV

Papilomavírusy (PV) patria do samostatnej rodiny *Papillomaviridae*. Sú to malé, neobalené vírusy s priemerom okolo 55 nm a ikosahedrálnou (dvadsaťstenovou) symetriou kapsidu, pozostávajúceho zo 72 pentamérnych kapsomér (Obrázok č. 3). Fylogeneticky tvoria veľmi starú skupinu vírusov, ktorá sa vyvíjala spolu so svojimi hostiteľmi. Infikujú epitelové tkanivá obojživelníkov, plazov, vtákov a cicavcov. Infekcia PV je prísne druhovo a tkanivovo špecifická, pričom ich genómy sú veľmi stabilné. Mutácie alebo rekombinácie sa vyskytujú len vzácnne (Baker a kol. 1991).



Obrázok č. 3: A - Icosahedrálly kapsidový proteín ([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/804.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/804.html))  
 B - Stavba kapsidu HPV - schránka vírusu tvorená 72 pentamérmi hviezdicového tvaru (<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/retro.htm>)

Ľudské PV sú známe ako potenciálne onkogénne vírusy spôsobujúce ochorenia kože a slizníc. Najznámejšia je ich súvislosť s KKM a prekancerózami, kde HPV vystupuje ako hlavný, ale nie jediný etiologický faktor. Pre ich značnú genómovú stabilitu sú rozdiely



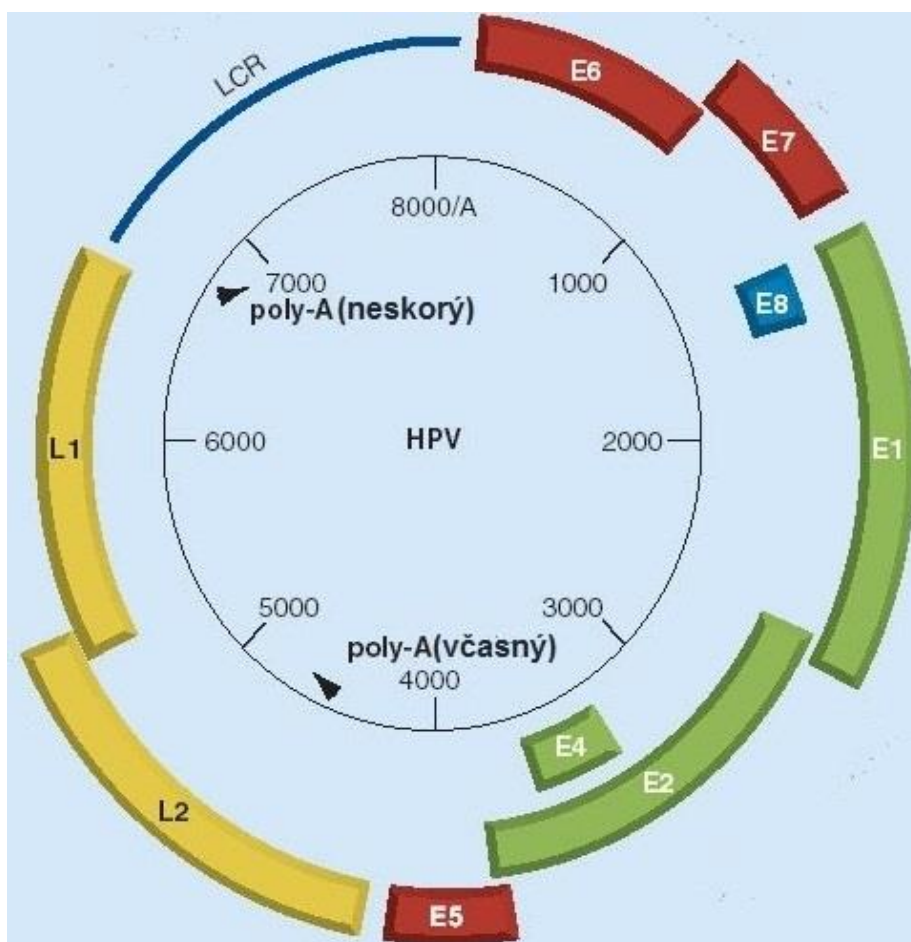
v najkonzervovanejších nukleotidových sekvenciách základom v taxonomickej klasifikácii jednotlivých typov vírusu. Viac ako 170 typov HPV už bolo kompletne sekvenovaných a podľa podobnosti konzervatívnych sekvencií rozdelených do piatich rodov: alfa, beta, gama, mu a nu (De Villiers 2013).

#### **4.3.1. Organizácia genómu ľudských papilomavírusov**

Genóm ľudských papilomavírusov pozostáva z jednej molekuly dvojvláknovej, cirkulárnej DNA, s dĺžkou okolo 8000 bázových párov a je tvorený tromi hlavnými oblasťami.

1. regulačný región (Upstream Regulatory Region – URR / Long Control Region - LCR) – 10 % genómu, s veľkosťou 400 – 700 bp – nekóduje proteíny
2. včasný región (early region) – 50 % genómu, 6 a viac čítacích rámcov (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8)
3. neskoré gény (late region) – 40 % genómu 2 čítacie rámce (majoritný L1, minoritný L2)

Regulačný región obsahuje väzbové miesta pre vírusové proteíny E1 a E2, promótoary, a väzbové miesta pre transkripčné faktory. Za včasným a neskorým regiónom sú včasné a neskoré polyadenylové (poly - A) oblasti (Laco 2012). Schéma HPV genómu je zobrazená na Obrázku č. 4.



Obrázok č. 4: Genomická organizácia HPV (upravené podľa Lie a Kristensen 2008)

#### 4.3.2. Funkcie vírusových proteínov

Genóm HPV kóduje 8 – 10 (podľa typu HPV) proteínov. ORFs (čítacie rámce - Open Reading Frames) včasných a neskorých génov sa značne prekrývajú, pokrývajú takmer celý genóm a mRNA sa exprimuje z viacerých promótorov. Na produkciu rôznych mRNA z primárneho transkriptu je využívaný alternatívny zostrih a polyadenylácia (Dimmock a kol. 2007).

##### ***Proteíny E1 a E2***

mRNA proteínov E1 a E2 vzniká z toho istého transkriptu (Deng a kol. 2003). Ich hlavnou úlohou je zaistenie replikácie vírusovej genetickej informácie.

Proteín E1 je ATP závislá DNA helikáza, ktorá zodpovedá za iniciáciu replikácie vírusovej DNA a spolupracuje s proteínom E2. Je to jediný enzým a najkonzervovanejší proteín kódovaný vírusovou DNA.

Proteín E2 zodpovedá za replikáciu DNA a reguláciu transkripcie. Umožňuje proteínu E1 naviazať sa na vírusový počiatok replikácie ORI (Origin Of Replication), ktorý leží v LCR oblasti. E2 kóduje regulačný proteín, ktorý sa viaže na LCR oblasť, čím reguluje transkripciu včasnej oblasti vírusového genómu (Bergvall a kol. 2013, Vojtaššák a Sadovský 2010).

### ***Proteín E3***

E3 je malý gén prítomný iba u niektorých HPV. Jeho funkcia je doposiaľ neznáma (Vojtaššák a Sadovský 2010).

### ***Proteín E4***

Zúčastňuje sa amplifikácie vírusového genómu a syntézy vírusových partikulí. Interaguje s cytokeratínom a je zodpovedný za rozpad cytokeratínovej matrix, čím narušuje cytoskelet (intermediárne filamenty) infikovanej bunky. Patrí medzi včasné gény, ale exprimuje sa až v neskorších štádiách infekcie (pred L1 a L2 proteínmi) vo vyšších vrstvách epitelu, kedy dochádza ku komplementácii nových viriónov. Je to najbohatšie exprimovaný proteín, preto môže slúžiť ako biomarker aktívnej infekcie a v prípade HR - HPV typov aj závažnosti priebehu ochorenia (Doorbar 2013).

### ***Proteín E5***

Je to transmembránový transformujúci proteín, ktorý aktiváciou tyrozínkinázových membránových receptorov pre rastové faktory (EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor, PDGFR - Platelet Derived Growth Factor Receptor, atď.) stimuluje proliferáciu bunky a syntézu DNA. Indukuje tiež zvýšenie aktivity MAP (Mitózu Aktivujúcich Proteínových) kináz, čím aktivuje bunkové protoonkogény (*c - Fos*, *c - Jun*). Tým E5 stimuluje rast a proliferáciu hostiteľských buniek; dochádza k zvýšeniu počtu vírusom infikovaných bazálnych a suprabazálnych keratinocytov. Spolu s proteínmi E6 a E7 tlmí imunitnú odpoveď hostiteľa. Narušením expresie povrchových proteínov hlavného histokompatibilného komplexu I. triedy (MHC I) umožňuje uniknúť infikovaným bunkám z imunitného dohľadu. Spolu s proteínom E6, je proteín E5 nevyhnutný pre vznik perinukleárnej vakuoly v hostiteľskej bunke, ktorá je príčinou typického perinukleárneho prejasnenia cytoplazmy buniek. Takto prejasnené keratinocyty s acentrickým, hyperchromatickým a zväčšeným jadrom sa nazývajú

koilocyty. Expresia proteínu E5 u HR - HPV býva po integrácii vírusového genómu počas progresie KKM často vypnutá. Ak teda hrá E5 rolu v karcinogenéze KM, predpokladá sa, že pôsobí v jej včasných štádiách. Čítací rámec E5 u niektorých PV úplne chýba. Nie je teda pravdepodobne pre životný cyklus vírusu nevyhnutný. (Laco 2012, Pedroza-Saavedra a kol. 2011).

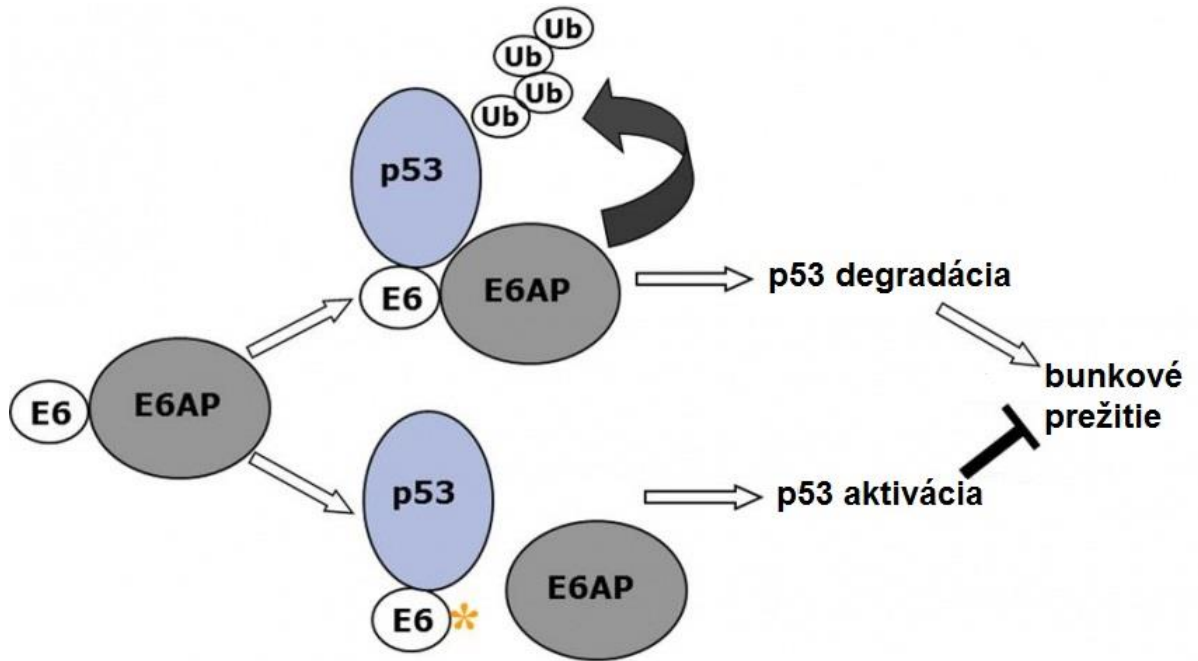
### ***Proteíny E6 a E7***

E6 a E7 sú hlavné vírusové onkoproteíny, nevyhnutné a postačujúce na malígnu transformáciu ľudských keratinocytov.

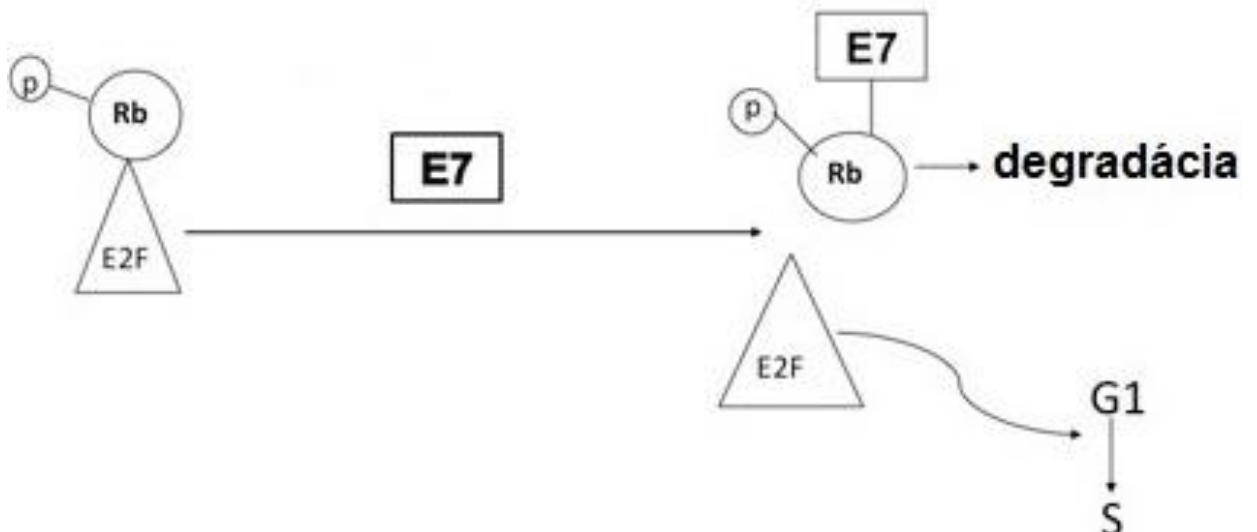
Hlavnou úlohou proteínu E6 je inhibícia funkcie tumor supresorového proteínu p53, ktorý kontroluje integritu bunkového genómu a podľa stupňa poškodenia aktivuje opravu zistených zmien a / alebo indukuje apoptózu. p53 môže byť inaktivovaný rôznymi spôsobmi. Interakciu s E6 je inhibované jeho naviazanie na špecifické miesto DNA, prostredníctvom ubikvitín - ligázy E6AP môže byť inaktivovaný ubikvitínom sprostredkovanou degradáciou v proteazómoch (Obrázok č. 5) alebo je blokována jeho acetylácia proteínom p300 a hAda3. Ďalšou funkciou E6 je degradácia proteínov GAP, čo má za následok narušenie prenosu signálu G – proteínmi. Reaktivuje katalytickú podjednotku telomerázy hTert a tak dokáže immortalizovať bunky hostiteľského tkaniva. Proteín E6 degradáciou v proteazómoch destabilizuje aj niekoľko membránových proteínov obsahujúcich PDZ doménu, ktoré regulujú bunkovú polaritu a sú súčasťou rôznych signálnych dráh (Pedroza-Saavedra a kol. 2011, Laco 2012).

Proteín E7 má za úlohu najmä reaktiváciu bunkového delenia v už diferencovaných keratinocytoch dlaždicovobunkového epitelu, ktoré tak opäť vstupujú do S fázy. Viazajú sa na kľúčové regulačné proteíny potrebné pre zablokovanie bunkového cyklu (BC) (hypofosforylovaná forma proteínu pRb a jeho príbuzné proteíny p107 a p130), ktoré vyvážajú a tak inaktivujú transkripčné faktory rodiny E2F. Interakciu proteínu E7 sú regulačné proteíny destabilizované, transkripčné faktory sa uvoľnia, bunka prekročí restriktívny bod na hranici S fázy a stratí schopnosť kontroly proliferácie (Obrázok č. 6). Hlavný regulačný proteín pRb je degradovaný ubiquitínom sprostredkovanou degradáciou v proteazómoch. V mitoticky aktívnych nediferencovaných bunkách je ďalej E7 schopný narušiť funkciu inhibítorov na cyklínoch závislých kináz (CDK – cyclin dependent kinase) p21<sup>CIP1</sup> a p27<sup>KIP1</sup> a tým aktivovať CDK 2, 4 a 6 nezávisle od cyklínu D a rastových faktoroch. Destabilizácia proteínov pRb, p107 a p130 spôsobuje zvýšenie expresie proteínu p16<sup>INK4a</sup>, ktorý za normálnych okolností zastavuje BC v G1 fáze inhibovaním CDK 4 a 6. Jednou z ďalších úloh proteínu E7 je narušenie

mitotického delenia bunky väzbou na  $\gamma$  – tubulín a dislokáciou dyneínu. Toto má za následok poruchy rozchodu chromozómov a aneuploidie (Pedroza-Saavedra a kol. 2011, Laco 2012).



Obrázok č. 5: Degradácia proteínu p53 naviazaním onkoproteínu E6 s ubivitín - ligázou E6AP (upravené podľa <http://www.priaxon.com/content/priaxon-technology/protein-interactions/services-programs/index.php>)



Obrázok č. 6: Degradácia proteínu pRb naviazaním onkoproteínu E7 (upravené podľa <http://www.slu.edu/114-topics-in-pathology>).

### ***Proteín E8***

E8 je krátky proteín podobný proteínu E5, prítomný iba u niektorých typov HPV. Alternatívny fúzny proteín E8<sup>E2C</sup> u HPV typu 31 hrá rolu v kontrole počtu kópií vírusového genómu (negatívny regulátor transkripcie a replikácie) a udržiavaní HPV v epizomálnej podobe (Stubenrauch a kol. 2000, Vojtaššák a Sadovský 2010).

### ***Proteíny L1 a L2***

L1 a L2 sú neskoré gény, kódujúce proteín vírusového kapsidu. Proteín L1 zabezpečuje zbalovanie namnožených vírusových DNA do proteínového obalu. Vytvára 72 pentamerických kapsomér kapsidu, ktorých tvar pomáha udržiavať proteín L2. Jednotlivé L1 kapsidové proteíny sú navzájom viazané pomocou disulfidických väzieb. Väčšina aminokyselinových sekvencií proteínu L1 je konzervatívna medzi rôznymi typmi HPV, preto je *in vitro* vytvorený kapsid využívaný pri tvorbe vakcín. Priestorová štruktúra kapsidu hrá tiež významnú úlohu pri naviazaní vírusu na hostiteľskú bunku. L2 proteín je zodpovedný najmä za aktivovanie bunkovej endocytózy, transport viriónu k jadru bunky a rozbalenie genómu vírusu (Laco 2012, Vojtaššák a Sadovský 2010).

### **4.3.3. Ochorenia asociované s infekciou ľudskými papilomavírusmi**

HPV sú pôvodcovia rôznych typov ochorení, začínajúc nezhubnými bradavicami až po zhubné karcinómy. Infekcia je striktno tkanivovo špecifická. Vírusy sú schopné infikovať výhradne mitoticky aktívne bunky bazálneho epitelu kože alebo slizníc. Podľa tejto špecificity sa rozlišujú typy kožné a slizničné.

Najznámejšia a najlepšie preštudovaná je súvislosť infekcie HPV s KKM, kde je vírus prítomný takmer v 100 % prípadov (Walboomers a kol. 1999).

Podľa schopnosti vírusu navodiť onkogénnu transformáciu buniek, na základe štúdií etiopatogenézy KKM, sa typy HPV delia na tri skupiny (IARC 2012, Tachezy a kol. 2013):

1. Nízkorizikové typy (low - risk HPV, LR - HPV), spôsobujúce najmä nezhubné nádory ako niekoľko typov bradavíc, dlaždicovobunkové papilómy a kondylómy. Zaradujú sa medzi ne typy 6, 11, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 72, 74, 81, 90 a 114.
2. Vysokorizikové typy (high - risk HPV, HR - HPV), spôsobujúce rôzne druhy karcinómov, prevažne v oblasti anogenitálneho traktu (karcinóm krčka maternice, vulvy, vagíny, penisu, rekta) a hlavy a krku (karcinóm dutiny ústnej, faryngu,

orofaryngu, laryngu). Preukázané boli aj lézie na prieduškách, očných spojivkách a pažeráku. Ako HR – HPV sú klasifikované typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 59.

3. Pravdepodobné vysokorizikové typy (probably high - risk HPV) a možné vysokorizikové typy (possibly high – risk HPV) medzi ktoré sa aktuálne zaraďujú typy 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 a 82. U týchto typov sa predpokladajú vlastnosti HR - HPV typov, ktoré však boli dokázané iba u malého množstva prípadov.

Bolo detegovaných až 47 slizničných typov HPV infikujúcich oblasť KM (Bzhalava a kol. 2013), z čoho celosvetovo najviac frekventované a najagresívnejšie z nich sú typy 16 a 18, spôsobujúce približne 70 % všetkých prípadov KKM (Muñoz a kol. 2004).

V Českej republike majú najväčšiu prevalenciu HR - HPV typy 16, 56, 39, 45, 18 a 51, pričom vo vyvinutých KKM sú to najmä typy 16, 18, 31, 33 a 45. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce LR - HPV patria typy 42, 54, 6 a 44 (Tachezy a kol. 2013).

Hlavný rozdiel v odlišnom onkogénnom potenciály LR - HPV a HR - HPV je v rôznej efektívite narušenia BC vírusovými onkoproteínmi E6 a E7. U oboch skupín sú zamerané rovnaké cieľové molekuly, ale u LR typov s menšou intenzitou. Proteín E6 u LR typov nie je schopný degradovať proteíny s PDZ doménami ani proteín hAda3 a nedokáže aktivovať katalytickú podjednotku telomerázy. Hlavným „nedostatkom“ proteínu E7 u LR je neschopnosť indukovať degradáciu proteínov pRb a p130 v proteazómoch. Rozdiel spočíva taktiež v schopnosti integrovať sa do genómu hostiteľskej bunky (Pim a Banks 2010).

#### **4.3.4. Sídlo infekcie ľudských papilomavírusov**

Prirodzeným sídlom HPV infekcie sú keratinocyty rohovatejúceho dlaždicovobunkového epitelu kože a nerohovatejúceho dlaždicovobunkového epitel slizníc. Nerohovatejúci dlaždicovobunkový epitel slizníc vystieľa orgány blízke vonkajšiemu prostrediu a v oblasti tzv. skvamo – kolumnárnej junkcie prechádza na epitel cylindrický. Toto miesto je proliferačne veľmi aktívne a preto je veľmi náchylné na škodlivé vplyvy prostredia. Tieto bunky sa následne môžu diferencovať na metaplastický epitel. Jedná sa teda o miesto s najvyššou pravdepodobnosťou HPV infekcie. Pri infekcii HR - HPV typmi môžu tieto za určitých podmienok v metaplastickom epitely spôsobiť zmeny vyúsťujúce do invazívneho dlaždicovobunkového karcinómu. Skvamo - kolumnárna junkcia sa nachádza v nosnej dutine, v hrtane, v oblasti prechodu medzi pažerákom a žalúdkom, v močovej trubici, na čípku

maternice a v oblasti anorektálneho prechodu. Nádory v týchto lokalitách preto môžu mať príčinnú súvislosť s infekciou HPV (Chow a kol. 2010).

HPV infikujú bazálne alebo parabazálne keratinocyty dlaždicovobunkového epitelu najmä pokiaľ je nerušená ich integrita. Bazálne keratinocyty sú v kontakte s bazálnou membránou, po onkogénnej transformácii sú schopné tvorbou matrixových metaloproteáz bazálnu membránu degradovať a vytvoriť tak predpoklady pre vznik invazívneho dlaždicovobunkového karcinómu. Za normálnych okolností sa však často nedelia, pretrvávajú v kľudovej fáze. Parabazálne bunky sú naopak mitoticky aktívne, delia sa približne jedenkrát za deň a prežívajú celý diferenciačný cyklus (Zhai a kol. 2005, Laco 2012).

#### **4.3.5. Prenos ľudských papilomavírusov**

Ľudské papilomavírusy sú celosvetovo najčastejšou pohlavne prenášanou infekciou. Infekčné vírusové partikule sa prenášajú prostredníctvom priameho kontaktu medzi epitelmi kože a slizníc. Celoživotné riziko infekcie u žien dosahuje hodnotu až 80 %, pričom najviac náchylné sú ženy v prvých rokoch po zahájení sexuálneho života. Pravdepodobnosť infekcie vírusom HPV je teda niekoľkonásobne vyššia ako pri iných vírusových infekciách. Vo väčšine prípadov je však táto infekcia iba prechodná a neznamena žiadne zdravotné riziko (Bekkers a kol. 2004).

Prevalencia genitálnej infekcie HR - HPV u mladých, sexuálne aktívnych žien (21 – 25 rokov) s normálnou cytológiou, sa v Českej republike pohybuje okolo 35 %. Toto percento je vyššie ako v iných krajinách východnej Európy (Tachezy a kol. 2013).

Z tohto vyplýva, že najvýznamnejším spôsobom prenosu infekcie anogenitálnych HPV je pohlavný styk (vaginálny aj análny). V jeho priebehu dochádza k priamemu kontaktu infikovaného epitelu - penilného, vulvárneho, vaginálneho, cervikálneho alebo análneho. Infekciu je možné preniesť aj pri orálno - genitálnom *styku*. Používanie prezervatívov môže prenos infekcie iba znížiť, ale nie vylúčiť. Oblasti genitálií, ktoré nie sú chránené, na prenos HPV stačia (<http://www.hpvinfos.ca/health-care-professionals/what-is-hpv/transmission-of-hpv/>).

HPV dokážu v odlúčených keratinocytoch prežiť až týždeň. Ďalší možný spôsob infekcie, aj keď oveľa menej častý, je preto prenos infikovanými predmetmi, ako napríklad sexuálne pomôcky, gynekologické nástroje, spodné prádlo. Prítomnosť vírusových častíc bola preukázaná aj na plochách gynekologických ordinácií, v školských šatniach a sprchách, vo fitness a plaveckých bazénoch. Infekcia je možná aj autoinokuláciou alebo bozkávaním (Strauss a kol. 2002, Laco 2012).



Vertikálny prenos z matky na dieťa je možný, ale dochádza k nemu len zriedka a infekcia behom niekoľkých mesiacov väčšinou vymizne (Arena a kol. 2002). K trvalej orálnej infekcii dochádza u menej ako 10 % infikovaných novorodencov a k trvalej genitálnej infekcii u menej ako 2 %. Perinatálny prenos HPV typov 6 a 11 však vzácnne môže spôsobiť rekurentnú respiračnú papilomatózu u detí (Syrjänen 2010).

#### **4.3.6. Vývojový cyklus ľudských papilomavírusov**

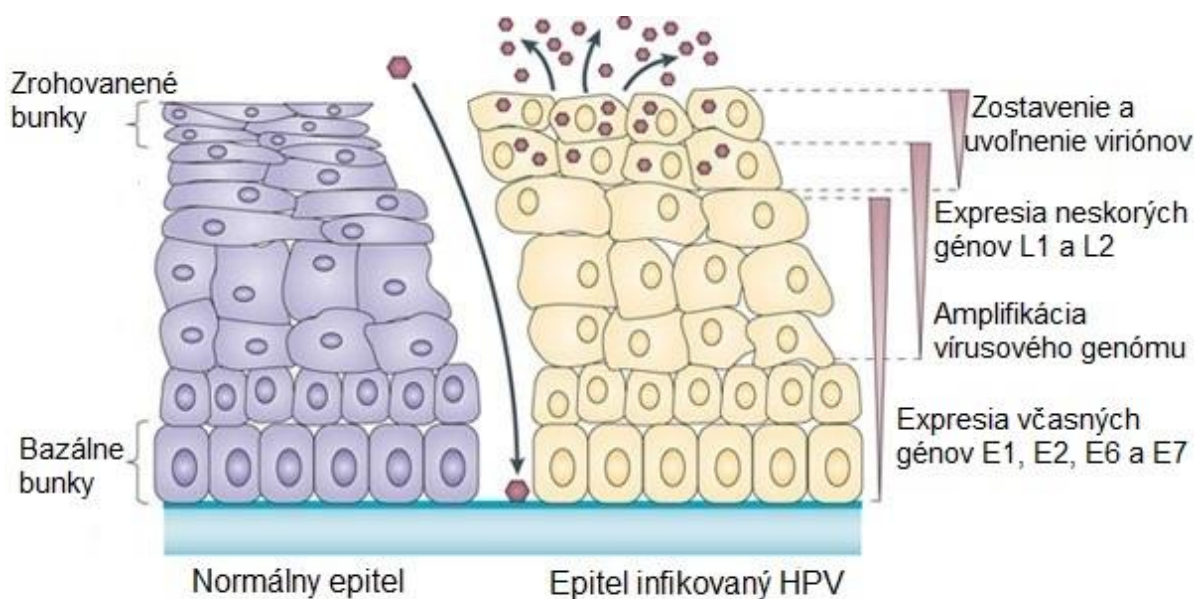
Ľudské papilomavírusy infikujú bunky epitelu a ich životný cyklus závisí od epitelovej diferenciácie (schéma vývojového cyklu HPV je znázornená na Obrázku č. 7). Pre vstup vírusu do bunky je nutná jeho väzba na primárny receptor, prítomný v bunkovej membráne bazálnych keratinocytov. Vírus je najprv naviazaný na bazálnu membránu epitelu a následne na bazálne keratinocyty prostredníctvom proteínu L1. Väzba vírusu spôsobí nevratné zmeny v štruktúre vírusového kapsidu, ktoré vedú k uvoľneniu z primárnych receptorov, naviazaniu na sekundárne receptory a následnej internalizácii vírusu do bunky. Proces vstupu vírusu dovnútra keratinocytu trvá niekoľko hodín. Virión je cytoplazmou do jadra transportovaný vo forme endozómu. Keďže je virión HPV príliš veľký na to, aby v celku prešiel jadrovými pórami, v priebehu cytoplazmatického transportu dochádza k rozrušeniu kapsidu hydrolytickým štiepením disulfidických mostíkov a proteolýze vírusového proteínu L1. Predpokladá sa, že proteín L2 uvoľňuje vírusovú DNA z neskorého endozómu v blízkosti jadra, po čom je vírusový genóm transportovaný do jadra (Laco 2012).

Expresia vírusových proteínov je regulovaná postupným migrovaním bazálnej bunky smerom k povrchu epitelu. V bazálnych a suprabazálnych keratinocytoch je intenzita replikácie vírusovej DNA nízka (jedenkrát za BC), pričom počet vírusových DNA sa pohybuje okolo 20 až 50 kópií. Regulácia expresie vírusových proteínov je zaistená proteínom E2 (Steger a Corbach 1997).

Diferencujúce sa keratinocyty strednej a hornej časti tkaniva dlaždicovobunkového epitelu neprechádzajú BC a preto musí vírus opäť aktivovať syntézu a replikáciu bunkovej DNA. Po reaktivácii BC môže prebehnúť samotná replikácia a transkripcia vlastného vírusového genómu. Pri tomto procese sa zúčastňujú včasné proteíny. Vírusové onkoproteíny E5, E6 a E7 nepriamo podporujú reaktiváciu BC inaktiváciou TSG a moduláciou imunitného systému hostiteľa. Takto navodené deliace sa bunky strednej a hornej časti predstavujú ideálne podmienky pre replikáciu vírusu a bunkovú proliferáciu. Proteíny E1 a E2 sa potom priamo zúčastňujú replikácie vírusovej DNA. Transkripcia replikačných génov v týchto bunkách už

nie je závislá na proteíne E2 a v jednej hostiteľskej bunke tak vznikajú až tisíce kópií vírusovej DNA (Chow a kol. 2010, Laco 2012).

Proteíny vírusového kapsidu L1 a L2 sa exprimujú v cytoplazme malého počtu terminálne diferencovaných keratinocytov, kde sú obidva proteíny dopravené do jadra. Tam sa naviažu na vírusovú DNA a kompletne vytvorená vírusová častica je spolu s apopticky odumretým keratinocytom uvoľnená do vonkajšieho prostredia (Chow a Broker 2006).



Obrázok č. 7: Schéma vývojového cyklu HPV po infekcii epitelu (upravené podľa Moody a Laimins 2010)

#### 4.3.7. Priebeh infekcie vysokorizikovými typmi ľudských papilomavírusov

Priebeh HPV infekcie v epitelových bunkách závisí od aktivity a účinnosti imunitného systému. K tomu, aby infikované bunky podstúpili transformačnú zmenu je potrebná pretrvávajúca infekcia vysokorizikovým typom HPV. Iba prechodná prítomnosť vírusu teda nie je pre vznik malígnych zmien dostačujúca (Zur Hausen a de Villiers 1994) a väčšinu infekcií (cca 80 %) imunitný systém zničí skôr, ako sa stihnú prejaviť akékoľvek príznaky. U LR - HPV je infekcia eliminovaná v rozpätí 4 - 8 mesiacov. U HR – HPV trvá odstránenie infekcie dlhšie, pri HPV 16 je to približne 8 - 16 mesiacov. Priebeh infekcie v ľudských epiteloch môže prebiehať niekoľkými spôsobmi (Trottier a Franco 2006).

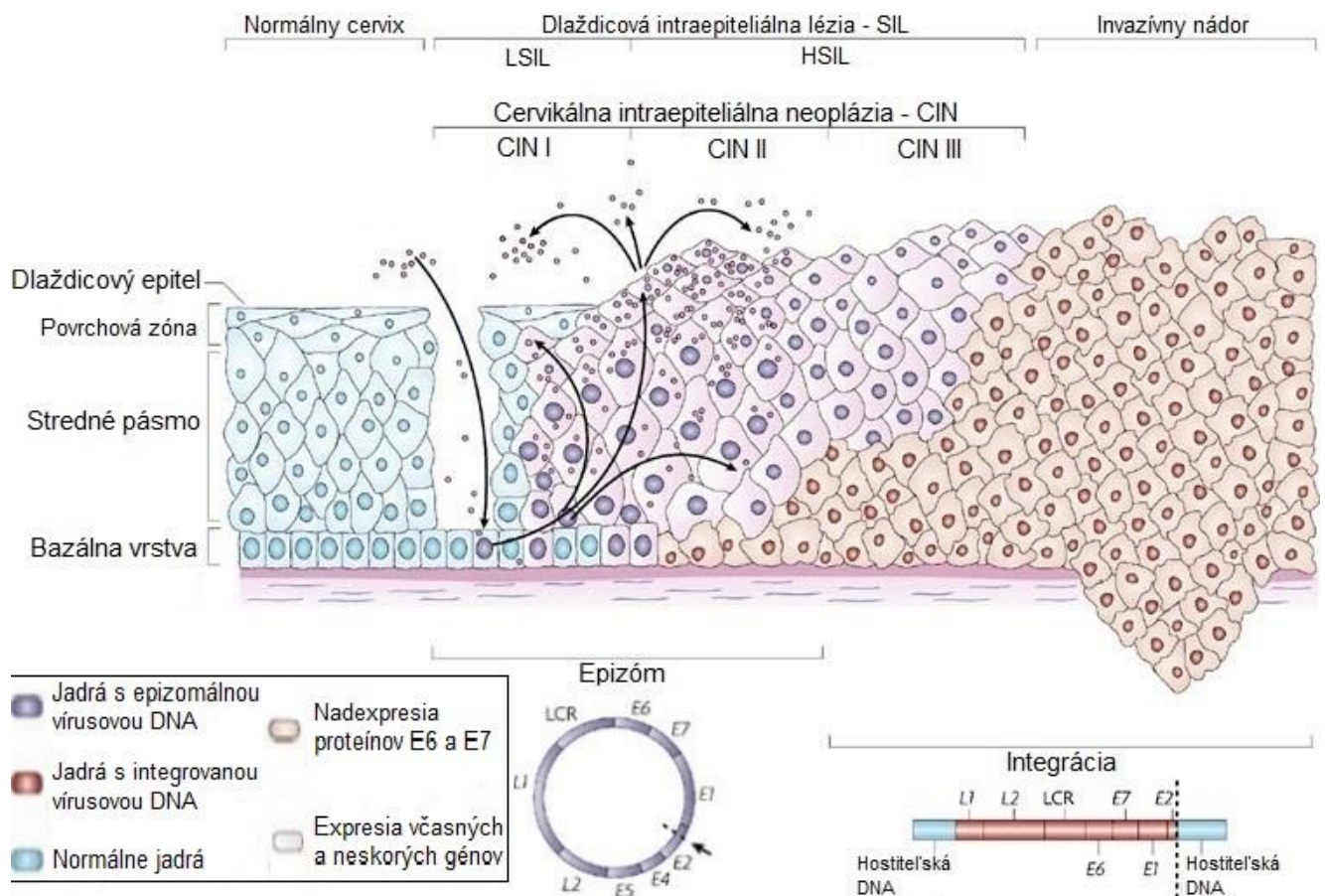
U 70 % je HPV infekcia úplne eliminovaná do jedného a u 90 % prípadov do dvoch rokov *prostredníctvom* imunitného systému hostiteľa (Cubie 2013).

Ďalšou možnosťou je pretrvávajúca infekcia, ktorá je bez klinických príznakov a môže byť v tele skryte prítomná až niekoľko rokov. Vírusový genóm sa v bazálnych keratinocytoch nachádza v kruhovej epizomálnej forme (ako extrachromozomálny plazmid) a funguje ako nezávislá, autonómne sa replikujúca kruhová molekula DNA. Imunitný systém má v tomto prípade nad infekciou kontrolu. Vírus môže byť reaktivovaný len vo výnimočných prípadoch, najmä pri potlačení imunity (Cubie 2013, Laco 2012).

Pri aktívnej (produktívnej) infekcii dochádza k replikácii vírusovej DNA a k syntéze maturovaných infekčných partikul v jadrách určitého počtu keratinocytov. DNA hostiteľských buniek je často tetraploidná a bunky tak majú tvar tzv. koilocytov. Koilocyty sa vyznačujú zväčšeným, nepravidelným, hyperchrómnym jadrom s perinukleárnym prejasnením. Prejavom toho typu infekcie sú dlaždicovobunkové papilómy, kondylómy (bradavice) a intraepitelové neoplázie ľahkého a stredného stupňa. Vírusový genóm má epizomálnu formu a imunitný systém je schopný kontrolovať infekciu len čiastočne (Cubie 2013, Laco 2012).

Posledná a najnebezpečnejšia forma infekcie je neproduktívna - transformujúca. Pri tomto type infekcie sú exprimované iba včasné proteíny a pri infekcii HR - HPV môže dôjsť k nádorovej transformácii hostiteľských buniek, ktorá cez niekoľko štádií môže vyústiť až do invazívneho karcinómu. U viac ako 60 % karcinómov (v závislosti od konkrétneho HR - HPV typu) je prítomná linearizovaná forma fragmentu vírusovej DNA, ktorú nadobúda po integrovaní do genómu hostiteľskej bunky. Jedna hostiteľská bunka môže byť infikovaná viacerými typmi vírusu. Do bunkovej DNA sa ale väčšinou integruje iba genóm jedného typu (ostatné ostávajú v epizomálnej forme) a miesto integrácie je relatívne náhodné. Vírusová DNA sa však viaže takmer výlučne v oblastiach génov E1 a E2 – strata regulácie replikácie (Vinokurova a kol. 2008, Laco 2012).

Vznik a vývoj bunkových dysplastických zmien je ovplyvnený mnohými rizikovými faktormi (viď. podkapitola Rizikové faktory), samotná infekcia vírusom na ich vznik nestačí. Schéma vývoja infekcie HPV je zobrazená na Obrázku č. 8.



Obrázok č. 8: Schéma vývoja HPV infekcie (upravené podľa Woodman 2007)

## 4.4. Vybrané biologické markery a ich spojitosť karcinómom krčka maternice

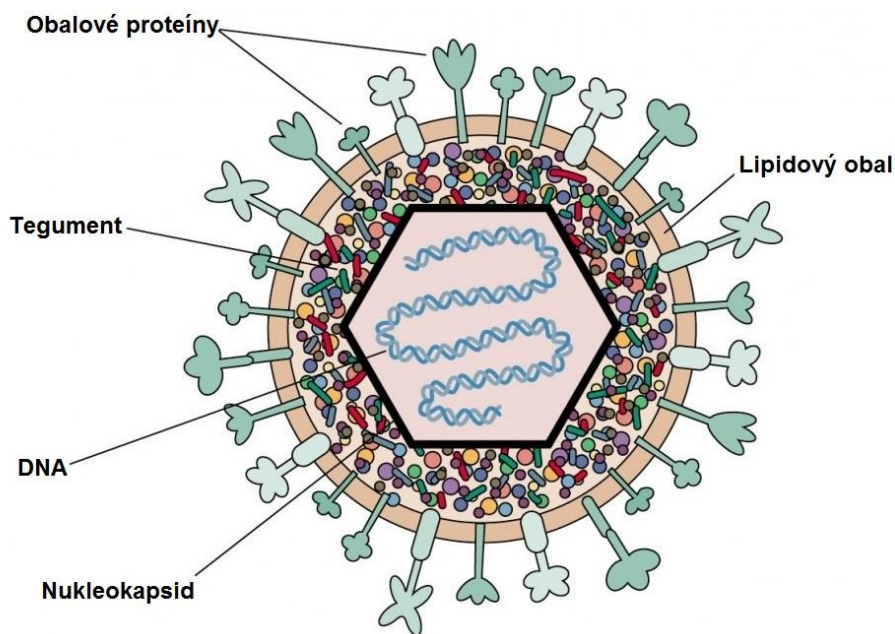
### 4.4.1. Ľudské herpetické vírusy

Z viac ako 100 známych herpetických vírusov (herpesvírusov), čeľaď *Herpesviridae*, je u človeka bežne nachádzaných 8 z nich: herpes simplex vírus 1, herpes simplex vírus 2, varicella-zoster vírus, vírus Epstein - Barrovej, cytomegalovírus, ľudský herpesvírus 6, ľudský herpesvírus 7 a ľudský herpesvírus 8.

Sú to pomerne veľké vírusy (120 - 220 nm) so štvorvrstvou štruktúrou. Jadro obsahuje dvojvláknovú lineárnu DNA o veľkosti až 80 - 150 respektíve 120 – 250 tisíc bázových párov (v závislosti od konkrétneho vírusu), kódujúcu 100 – 200 génov. Je uzavreté v ikosahedrálnej kapside, ktorý pozostáva zo 162 kapsomér a je zabalený v amorfnom proteínovom obale nazývanom tegument. Celá vírusová partikula je nakoniec zapuzdovaná lipidovou dvojvrstvou, derivovanou z bunkovej membrány hostiteľskej bunky (Obrázok č. 9).

Vírusové gény sú replikované v jadre hostiteľskej buky v špecifickom poradí; ako prvé sa replikujú okamžité včasné gény, kódujúce regulačné proteíny, potom včasné gény, kódujúce enzýmy pre replikáciu vírusovej DNA a nakoniec neskoré gény, ktoré kódujú štruktúrne proteíny.

Herpesvírusy patria medzi najrozšírenejšie vírusy a typické je pre ne dlhodobé prežívanie (latencia) v špecifických tkanivách infikovaného organizmu. Latentný vírus môže byť kedykoľvek reaktivovaný a vrátený do bunkového cyklu (Whitley 1996).



Obrázok č. 9: Štruktúra viriónu herpesvírusu (upravené podľa <http://www.twiv.tv/virus-structure/>)

### Herpes simplex vírus 1 a 2

Herpes simplex vírus 1 a 2 (HSV-1, HSV-2) majú genomickú homológiu 50 - 70 % a zdieľajú viacero charakteristík. Hlavným rozdielom medzi nimi sú miesta, kde najčastejšie zahajujú latenciu. HSV-1 prežíva v latentnom stave väčšinou v gangliách trojklaného nervu (zhluk nervových vlákien pri uchu), odkiaľ môže napádať pery alebo tvár. HSV-2 zvykne sídliť v sakrálnych gangliách v spodnej časti chrbtice a napádať oblasti genitálií. Tento rozdiel však nie je stopercentný, oba vírusy sa môžu nachádzať v oboch častiach tela a tak infikovať ústnu, tak ako aj genitálnu oblasť. Prenášajú sa intímny kontaktom pri bozkávaní prostredníctvom slín a sexuálnym kontaktom (<http://www.herpes.com/hsv1-2.html>, <http://virology-online.com/viruses/HSV.htm>).

Spôsobujú primárne a rekurentné infekcie v mukokutánnych prechodoch. K infekcii dochádza prostredníctvom slizničného epitelu alebo mikroinváziou kože a po primárnej infekcii sa vírus reprodukuje v epitelových bunkách a šíri sa v tkanivách. Preniká do axónov

gangliových buniek inervujúcich slizničný epitel a následne je transportovaný do tela bunky, kde perzistuje v podobe latentnej infekcie. Po reaktivácii prechádza do produktívnej fázy rekurentnej infekcie, novovytvorené maturované virióny sú transportované z gangliovej bunky a uvoľňujú sa späť do tkanív (Knipe a Howley, 2001).

Medzi mukokutánne prejavy HSV patria herpetický zápal d'asien a ústnej dutiny, tvárový opar, genitálny herpes, herpetické zápal rohovky a kožné herpetické panarícium (hnisavé ložiská na prstoch). Infekcia sa môže prejaviť na akejkolvek časti kože. Môžu infikovať novorodencov počas pôrodu a tiež spôsobovať herpetickú encefalitídu (Whitley 1996). Infekcia HSV je nebezpečnejšia u osôb s poruchou imunity, má sklon progredovať a vyžaduje dlhší čas na liečbu. Prejavy primárnej alebo rekurentnej infekcie u týchto pacientov bývajú závažnejšie. Patria medzi ne, okrem bežných ochorení u zdravej populácie, napríklad zápal dýchacích ciest, zápal tráviaceho traktu alebo roztrúsené kožné ochorenia (Cukuranovic a kol. 2012).

Úloha HSV v rozvoji neoplázií KM je predmetom rozsiahleho výskumu. HSV infekcia môže spôsobovať chromozómové zlomy, amplifikáciu bunkovej DNA a tiež formáciu „double minute“ chromozómov (malé fragmenty extrachromozómovej DNA) (Chenet-Monte a kol. 1986). Vírus sa šíri najmä sexuálnym kontaktom a primárna infekcia pri genitálnom herpes zahŕňa vulvu, vagínu a krčok maternice. Tak ako HPV, aj HSV-2 môže infikovať dlaždicovobunkový epitel skvamo-kolumnárnej junkcie, z ktorej vzniká invazívny KKM (Smith a kol. 2002). Preto by sa dalo domnievať, že infekcia epitelových buniek KM vírusom HSV (najmä HSV-2) by mohla súvisieť so vznikom, prípadne progresiou karcinómu.

Hypotéza synergie vírusov HSV a HPV je podporovaná niekoľkými faktami. Herpetické lézie uľahčujú prístup HPV k bazálnej membráne. Zápal vyvolaný herpesom môže potlačiť imunitnú odpoveď sprostredkovanú pomocnými T lymfocytmi. HSV indukuje produkciu oxidu dusnatého, čo spolu s priamym pôsobením HSV vedie k poškodeniam bunkovej DNA. Infekcia HSV ďalej urýchľuje replikáciu HPV a zvyšuje možnosť integrácie HPV DNA do bunkovej DNA (Al-Daraji a Smith 2009).

### **Varicella-zoster vírus**

Varicella-zoster vírus (VZV), alebo tiež ľudský herpesvírus 3 (HHV-3), je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich vírusov u ľudí. U cca 90 % dospelých ľudí je sérologicky dokázaná prítomnosť infekcie VZV. Infekcia je zvyčajne prenášaná vzduchom (kvapôčková nákaza) s počiatočnou replikáciou v nosohltane. U náchylných alebo séronegatívnych jedincov



vedie replikácia v nosohltanu k virémii s následným rozvojom vyrážky. V priebehu primárnej infekcie môže VZV zahájiť celoživotný latentný stav v miechových uzlinách.

Ochorením zapríčineným primárnou infekciou VZV sú ovčie kiahne (varicela), objavujúce sa najčastejšie u detí v predškolskom veku. Pri oslabení organizmu môže dôjsť k reaktivácii vírusu a následnému prechodu z latentnej do rekurentnej fázy, čo spôsobuje ochorenie pásový opar. Jedinci s potlačenou imunitou infikovaní VZV sú náchylní na ťažší priebeh ochorenia, ktorý môže vyústiť do ďalších komplikácií (napr. zápal pľúc, zápal pečene atď.). Vo vážnych prípadoch je infekcia letálna (Whitley 1996, Cukuranovic a kol. 2012).

Heggie a kol. (1990) vo svojom experimente dokázali, že infekcia KM vírusom VZV alebo nejaký produkt produkovaný infikovanou bunkou môže u myší pôsobiť onkogénne. U infikovaných myší pozorovali vznik prekanceróz a karcinómov.

### **Vírus Epstein – Barrovej**

Vírus Epstein - Barrovej (EBV), ľudský herpesvírus 4 (HHV-4), predstavuje prvý známy ľudský onkovírus. Infikuje takmer všetkých ľudí pred dosiahnutím dospelosti. Je prenášaný intímny kontaktom a najčastejšou formou prenosu je výmena slín. Pri strese a oslabenej imunite môže dôjsť k reaktivácii vírusu a zvýšeniu orálneho šírenia slinami.

Latentným sídlom vírusu EBV u zdravých nositeľov sú takmer výlučne B lymfocyty a jeho replikácia prebieha v lymfatických tkanivách (prúšná žľaza, atď.). Okrem B lymfocytov je vírus schopný infikovať dlaždicové epitelové bunky, žľazové epitelové bunky, myoepitelové bunky, bunky hladkej svaloviny, T bunky, NK bunky, plazmatické bunky a folikulárne dendritické bunky (Gulley a Tang 2008).

Vírus EBV spôsobuje najčastejší typ infekčnej mononukleózy u ľudí. Je to jeden z najúspešnejších vírusov v bunkovej transformácii. EBV infekcia je preto spájaná so širokým spektrom malignít. Známa je jeho asociácia s post - transplantačnými lymfoproliferatívnymi ochoreniami, Hodgkinovým a non-Hodgkinovým lymfómom, Burkittovým lymfómom a lymfómami u pacientov s narušenou imunitou. Ďalej sa jeho spojitosť preukázala aj u karcinómu nosohltanu, žalúdka a iných vzácnych malígnych ochorení (Gulley a Tang 2008, Al-Daraji a Smith 2009).

Prenos EBV je možný aj pohlavným stykom. Epitel KM obsahuje receptory pre EBV a je tiež zdrojom šírenia vírusu. Pre jeho schopnosť transformovať bunku na nádorovú sa preto dá uvažovať o jeho možnej úlohe aj pri KKM.

## **Ľudský cytomegalovírus**

Infekcia ľudským cytomegalovírusom (CMV), tiež nazývaným ľudským herpesvírus 5 (HHV-5), patrí celosvetovo medzi infekcie s najvyššou prevalenciou. Je prenášaný intímnym kontaktom prostredníctvom slín, moču, materského mlieka, cervikálnych sekrétov, krvi, slíz, semena, atď.. Zdrojom CMV infekcie môžu byť aj transplantované obličky alebo transfúzia krvi.

CMV sa replikuje najmä v žľazových bunkách slín a obličiek. To má za následok veľké množstvo vírusu šíriaceho sa slinami a močom. Replikáciou DNA vírusu vznikajú charakteristické viacjadrové obrie bunky s vnútrobunkovými inklúziami. Perzistentná infekcia môže pretrvávať v bunkách slinných žliaz, prsníkov, obličiek, endocervixu, semenných vačkov a periférnych leukocytov, z ktorých je potom vírus chronicky vylučovaný. V prípade kongenitálnej primárnej infekcie sa môže u približne 10 % novorodencov vyskytnúť vrodené zväčšenie pečene a sleziny, zápal sietnice, kožná vyrážka (purpura), poškodenie centrálného nervového systému alebo zhoršený sluch v neskoršom veku. Asi u 10 % prípadov spôsobuje primárna infekcia u starších detí a dospelých mononukleózu (90 % prípadov je asymptomatických). V prípade CMV infekcie u pacientov s oslabenou imunitou môže dôjsť k život ohrozujúcim ochoreniam po primárnej infekcii a aj po reaktivácii vírusu. Infekcia zahŕňa pľúca, pečeň, rohovku a centrálny nervový systém. Pacienti infikovaní HIV vírusom a po transplantácii kostnej drene majú zvýšené riziko zápalu pľúc (Cukuranovic a kol. 2012, Whitley 1996).

CMV patrí k najfrekvencovanejším vírusom infikujúcim genitálny trakt. Od 60. rokov je preto študovaný pre jeho možnú úlohu vo vývoji KKM.

Žiadna štúdia však zatiaľ jasne necharakterizovala úlohu infekcie CMV pri karcinogéze KM. Stále teda nie je jasné či vystupuje iba ako neškodná oportunistická infekcia v HPV pozitívnych prípadoch alebo sa zúčastňuje na oslabení imunity, čím uľahčuje karcinogézu spôsobenú HPV.

## **Ľudský herpesvírus 6**

Infekcia ľudským herpesvírusom 6 (HHV-6) je bežná a celosvetovo rozšírená. Vírus sa delí na dva typy: HHV-6A a HHV-6B. Predpokladá sa, že rezervoár HHV-6 je v slinných žľazách a prenos je teda sprostredkovaný najmä slinami. Vírus v infikovaných slinných žľazách zaháji latenciu, periodicky sa reaktivuje a šíri infekciu na ďalších hostiteľov. Latentná infekcia bola demonštrovaná aj v krvi, bunkách CNS, obličkách, pľúcach, genitáliách, a bunkách CNS.



HHV-6 infekcia je spájaná so širokým spektrom ochorení. HHV-6B je dokázaný etiologický faktor pri roseole (horúčka a výsev makulárnej vyrážky). Roseolou bývajú postihnuté najmä kojenci, batolátá a deti vo veku do dvoch rokov (Whitley 1996, Braun a kol. 1997).

Boli dokázané aj ochorenia CNS a autoimunitné ochorenia (skleróza multiplex, encefalitída, meningitída atď.), zažívacie problémy, hematologické malignity, lymfoproliferatívne ochorenia a prítomnosť vírusu bola detegovaná aj u niektorých nádorových ochorení - Kaposiho sarkóm, lymfómy, leukémie, karcinóm KM a mozgové nádory. Asociácia bola dokázaná aj pri prípadoch odvrhnutia transplantovaných obličiek (Braun a kol. 1997).

HHV-6 môže hrať nepriamu úlohu v karcinogéze prostredníctvom potlačenia imunity, napríklad priamou infekciou CD4 + T pomocných lymfocytov a indukciou ich apoptózy. Infikované môžu byť aj epitelové bunky týmusu, hematopoetické kmeňové bunky a NK bunky, ktoré sú nevyhnutné pre dozrievanie imunitného systému, pre ochranu proti vzniku nádorov a proti vírusovým infekciám (<http://hhv-6foundation.org/associated-conditions/hhv-6-and-cancer>). Kashanchi a kol. (1997) zistili, že gén *ORF 1* vírusu HHV-6 sa viaže na proteín p53 a tým pôsobí jeho inaktiváciu, čo tiež zvyšuje citlivosť k okogenéze. Infekcia a jej následky sú teda ovplyvnené stavom imunitného systému hostiteľa.

Incidencia HHV-6 bola dokázaná aj v oblasti KM (Broccolo a kol. 2008). To môže indikovať sexuálnu prenosnosť vírusu alebo systémové šírenie makrofágmi a lymfocytmi v tkanive alebo krvi.

### **Ľudský herpesvírus 8**

Infekcia ľudským herpesvírusom 8 (HHV-8) sa vyskytuje iba medzi ľuďmi a je pomerne častá. Prenáša sa najmä slinami pohlavným stykom, pričom najrizikovejšou skupinou sú homosexuálni muži. U infikovaných jedincov sa za normálnych okolností vyskytuje v latentnej forme po celý život bez príznakov.

Po infekcii vírus vstupuje do lymfocytov, kde zostáva v latentnom stave. Reaktivácia vírusu pri oslabenej imunite (infekcia vírusom HIV, pacienti po transplantácii) môže spôsobiť vznik nádorového ochorenia - Kaposiho sarkóm. Ďalšími chorobami sú primárny efüzny lymfóm a multicentrická Castelmanova choroba. Infekcia HHV-8 u detí s oslabenou imunitou a u príjemcov orgánov je spájaná so syndrómom primárnej infekcie – horúčka, vyrážky, zápal lymfatických uzlín, zlyhanie kostnej drene, prípadne rapídne postupovanie Kaposiho sarkómu (<http://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/4/adult-and-adolescent-oi-prevention-and-treatment-guidelines/342/hhv-8>)

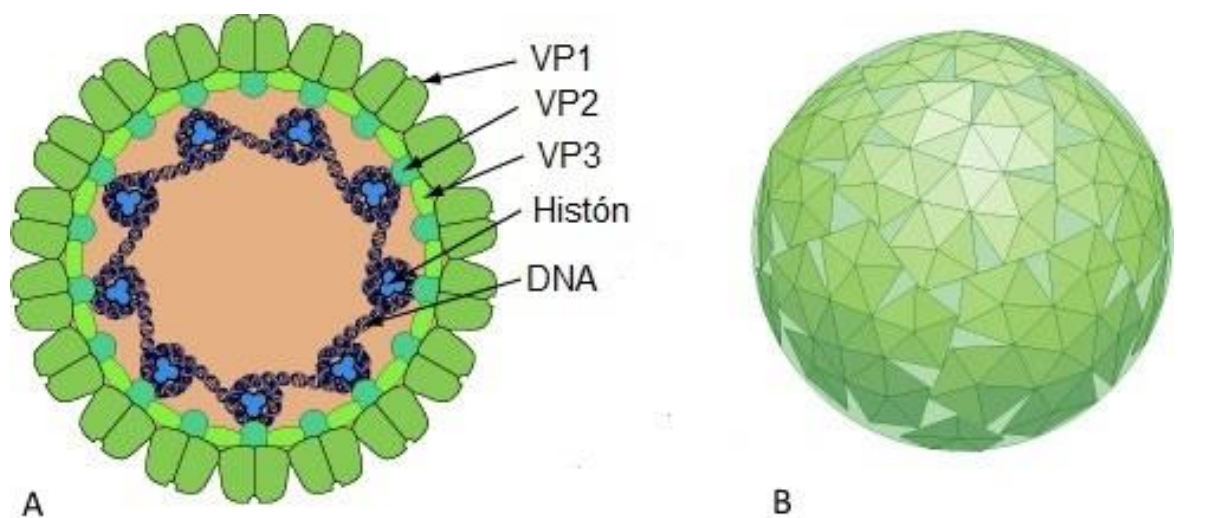
HHV-8 môže immortalizovať primárne endotelové bunky odvodené z kostnej drene - indukuje bunkovú proliferáciu, nezávislosť prichytenia a prežívanie buniek. V léziách Kaposiho sarkómu a u multicentrickej Castelmanovej choroby boli zaznamenané vysoké hladiny cytokínov a rastových faktorov. Vírusovú DNA však obsahuje iba časť transformovaných endotelových buniek. To naznačuje, že neinfikované bunky prežívajú prostredníctvom mechanizmu, ktorý zahŕňa cytokíny sekretované z infikovaných buniek. Predpokladá sa preto, že vírusová transformácia buniek je závislá na parakrinných mechanizmoch tak ako aj na bunkovom mikroprostredí (Al-Daraji a Smith 2009).

Prenos pohlavným stykom a schopnosť HHV-8 transformovať bunky podporujú hypotézu, že by tento vírus mohol byť zapojený aj do vzniku / progresie malignít KM.

#### **4.4.2. Ľudské polyomavírusy**

V súčasnej dobe je známych viac ako 10 typov polyomavírusov, čeľaď *Polyomaviridae*, ktorých infekcia bola preukázaná u ľudí. Medzi tieto ľudské typy patria napríklad vírusy JCV (iniciály pacienta), BKV (iniciály pacienta), MCPyV (polyomavírus Merkelových buniek), KIV (Karolinska Institute) a WUV (Washington University) s 50 – 80 % homológiou (Dalianis a Hirsch 2013).

Sú to malé (40 – 45 nm) neobalené vírusy s dvojitou, kruhovou, s histónmi asociovanou DNA s veľkosťou 5000 - 5300 bp. Ich genetická informácia obsahuje iba niekoľko génov a je rozdelený do troch častí. Nekódujúci kontrolný región (počiatok replikácie a transkripcie, promótor atď.) reguluje expresiu včasných a neskorých vírusových génov v súlade s životným cyklom hostiteľskej bunky (aktivácia, diferenciácia). Včasný génový región kóduje veľký T antigén (TAg) a malý T antigén (tAg), ktoré napomáhajú replikácii vírusového genómu a transformácii buniek. MCPyV obsahuje aj *middle* (stredný) T antigén (mTAg), ktorý tiež prisipieva k bunkovej transformácii. Neskorý génový región kóduje kapsidové proteíny VP1, VP2 a VP3. U vírusov BKV a JCV je v tomto regióne kódovaný aj malý neštruktúrny proteín - agnoproteín, ktorého úloha stále nie je úplne objasnená. Celý genóm je zbalený do chromátin pripomínajúcich štruktúr (minichromozómov) a obalený do ikosahedrálneho kapsidu tvoreného 72 tetramerickými kapsomérmi (proteíny VP1 – 3) (Obrázok č.10 A a B) (Gjoerup a Chang 2010, Dalianis a Hirsch 2013).



Obrázok č. 10: A – Štruktúra viriónu Polyomavírusu (upravené podľa [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/148.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/148.html))

B - Ikosahedrálny kapsidový proteín

Polyomavírusy sú veľmi rozšírené (druhovú a bunkovú špecificitu), pričom infekcia u imunokompetentných jedincov väčšinou pretrváva subklinicky v latentnej forme. Ochorenia sú väčšinou spájané s oslabenou imunitou hostiteľa (HIV pozitivita, pacienti po transplantácii) a to najmä pri nedostatku T buniek.

Genomické sekvencie polyomavírusov boli zaznamenané v asociácii s rôznymi nádorovými ochoreniami a autoimunitnými stavmi. Onkogénna transformácia je u nich navodzovaná prostredníctvom T (tumor) antigénov, ktoré sú v tomto prípade funkčne odpojené od neskorších krokov vírusového životného cyklu – DNA replikácia, expresia neskorých génov, zostavenie viriónu, bunková lýza. Pri transformácii buniek inaktivujú T antigény v infikovaných bunkách signálne dráhy a tumor supresorové proteíny (pRB a p53), čím narúšajú kontrolné mechanizmy bunkového cyklu (Dalianis a Hirsch 2013).

### **BKV**

BKV je všadeprítomný vírus, ktorého primárna infekcia sa najčastejšie vyskytuje u detí – séroprevencia vo veku 5 – 9 rokov dosahuje 65 – 90 %. Predpokladá sa, že prenos je sprostredkovaný z dýchacích ciest hostiteľa, uro / fekálne - orálnou cestou, krvou alebo sexuálnym kontaktom, pričom jedným z jeho najvýznamnejších rezervoárov je znečistená voda (Siguiet a kol. 2012).

Prvá infekcia je zvyčajne úplne bez príznakov. Vo výnimočnom prípade sa môže vyskytnúť slabá infekcia dýchacích ciest alebo krvácajúci zápal močového mechúra u malých detí. Po primárnej infekcii pretrváva vírus v latentnom stave v orgánoch, tkanivách a telových

tekutinách (obličky, mandle, leukocyty, spermie, centrálny nervový systém, atď.), kde ostáva až do doby výrazného oslabenia imunity hostiteľa. Reaktivácia a replikácia BK vírusu (najčastejšie v močových cestách) je zodpovedná za vážne ochorenia u jedincov s oslabenou imunitou, najmä pokiaľ sú postihnuté T bunkové ochranné mechanizmy. Vírusová nálož pritom koreluje so závažnosťou imunosupresie. Rizikovou skupinou sú HIV pozitívny pacienti, recipienti transplantovaných orgánov a pacienti trpiaci na roztrúsený lupus erythematosus. Najviac ohrození sú pacienti po transplantácii obličiek (80 %), u ktorých sa vyskytuje najčastejšia a najzávažnejšia forma infekcie vo forme akútneho intersticiálneho zápalu obličiek. U recipientov kostnej drene sa často vyskytuje krvácajúci zápal močového mechúra. Vírus môže veľmi vzácne spôsobiť zápal mozgových blán, pľúc, sietnice, hrubého čreva a krvných ciev (Ahsan a Shah 2006, Siguier a kol. 2012, Cukuranovic a kol. 2012).

Napriek potenciálu polyomavírusov vyvolať bunkovú transformáciu a dokázanej nádorovej transformácii buniek BK vírusom na bunkových kultúrach a u niektorých hlodavcov a opíc, nie je doposiaľ potvrdená asociácia medzi infekciou BKV a ľudskými nádormi. Možný súvis je predpokladaný pri karcinóme prostaty, kde bola popísaná vyššia vírusová nálož ako u zdravej populácie (Delbue a kol. 2014). Ďalej bola BKV DNA detegovaná napríklad v nádoroch kolorekta, nadobličky, lymfómoch, karcinómoch pankreasu, mozgových nádoroch a sarkómoch. Tieto dôkazy však na potvrdenie spojitosti vírusu s ľudskými nádormi nie sú postačujúce (Abend a kol. 2009).

Pred viac ako desiatimi rokmi bola naznačená možná úloha BK vírusu ako kofaktora pri nástupe / progresii genitálnych karcinómov (Martini a kol. 2004). Je to najmä pre to, že BKV zahajuje latenciu blízko KM v urogenitálnom trakte a je frekventovane detegovaný v moči. Z dôvodu schopnosti vírusov HPV aj BKV ovplyvňovať BC a inhibovať apoptózu, mohli by teoreticky aditívne alebo synergicky podporovať malígnu transformáciu (Fraase a kol. 2012).

## **JCV**

JCV patrí medzi bežne sa vyskytujúce vírusy so séroprevenciou vo vyššom veku okolo 50 - 80 %. Je prenášaný pravdepodobne podobným spôsobom ako BK vírus, uro / fekálne - orálnou cestou, znečistenou vodou, krvou, atď.

Primárna infekcia sa väčšinou vyskytuje na mandliach odkiaľ sa šíri najmä do obličiek. Tam v prípade funkčného imunitného systému pretrváva v latentnej forme počas celého života hostiteľa. Prítomnosť vírusu bola detegovaná napríklad aj v B – lymfocytoch kostnej drene a periférnej krvi alebo centrálnej nervovej sústave. Reaktivácia JCV sa prejavuje u pacientov

s oslabenou imunitou. Je schopný sa dostať do gliových buniek centrálného nervového systému, vrátane astrocytov a myelín produkujúcich buniek. Jeho reaktivácia / primárna infekcia v týchto bunkách môže spôsobiť umocnenie vírusovej replikácie a lytickú infekciu, čo má za následok fatálne ochorenie - progresívna multifokálna leukoencefalopatia (*PML*). Vírus je potom detekovateľný v miechovej tekutine. *PML* bola zaznamenaná u pacientov s oslabenou imunitou spôsobenou vírusom HIV a syndrómom AIDS, ďalej u príjemcov transplantovaných orgánov, pacientov s vrodenými imunitnými chorobami, roztrúsenou sklerózou a Crohnovou chorobou (Gjoerup a Chang 2010, Maginnis a Atwood 2009, Cukuranovic a kol. 2012).

Rovnako ako pri víruse BK, ani pri JCV nie je dokázaný jeho súvis so vznikom / progresiou ľudských nádorových ochorení. Spôsobuje nádory u druhov, ktoré nie sú jeho prirodzeným hostiteľom, ako malé hlodavce a primáty. Niekoľko štúdií poukázalo na JCV infekciu spojenú s viacerými typmi nádorov, medzi ktorými sú napríklad nádory kolorekta, žalúdka, pažeráka, mozgu a pľúc. Ďalšie štúdie však tieto fakty popierajú (Maginnis a Atwood 2009).

Spojitosť vírusu JCV s KKM by mohla spočívať na rovnakých princípoch ako v prípade BKV. Študované sú najmä prípady infekcie u pacientov s oslabenou imunitou (Alosaimi a kol. 2014).

Vysoká prevalencia JCV a BKV u zdravých jedincov a záchyt vírusovej DNA citlivými molekulárnymi mechanizmami komplikuje štúdium súvislosti detegovaného vírusu so vznikom nádorov. Vzhľadom na nepostačujúce dôkazy karcinogenézy u ľudí a postačujúce dôkazy na zvieracích modeloch klasifikovala WHO vírusy BKV a JCV za potenciálne karcinogénne pre človeka (Bouvard a kol. 2012).

### **MCPyV**

MCPyV je veľmi nedávno objavený vírus, ktorý bežne infikuje ľudskú populáciu. Sérové protilátky proti obalovému proteínu VP1 sú detekovateľné až u 80 % dospelých a infekcia je väčšinou asymptomatická. Tak ako u vírusov BK a JC, cesty prenosu pre MCPyV nie sú úplne potvrdené. Pravdepodobný je prenos fekálno – orálnou cestou alebo z dýchacích ciest hostiteľa v detskom veku. Vzhľadom na chronické šírenie MCPyV DNA kožou, jej prítomnosť na rôznych enviromentálnych povrchoch a tiež na hypotézu, že životný cyklus vírusu môže byť spojený s bunkovou diferenciáciou, nie je vylúčený ani prenos prostredníctvom blízkeho kontaktu s kožou infikovaného. Okrem kože, kde je možné detegovať MCPyV DNA aj enkapsidované virióny, bola prítomnosť vírusovej DNA (v menších

množstvách) preukázaná aj v dýchacom trakte, slinách, lymfatických tkanivách, moči alebo gastrointestinálnom trakte (Spurgeon a Lambert 2013).

Pôvodne bol izolovaný zo vzoriek karcinómu z Merkelových buniek (Merkel cell carcinoma – MCC), ktoré sa vyskytujú v bazálnej vrstve pokožky (vlasové folikuly, niektoré sliznice, oblasti kože citlivé na dotyk). Už pri tomto objave bola predložená príčinná súvislosť detegovaného vírusu s až 80 % prípadov tohoto vzácneho, agresívneho karcinómu kože (Feng a kol. 2008). Po zavedení citlivejších metód sa neskôr ukázalo, že MCPyV je pravdepodobne zodpovedný za takmer všetky prípady MCC (Rodig a kol. 2012). V roku 2012 bol MCPyV klasifikovaný WHO ako pravdepodobne karcinogénny pre človeka (Bouvard a kol. 2012).

V prípade potlačeného imunitného systému UV žiarením, ďalej prirodzeným starnutím, AIDS alebo liekmi indukovanou supresiou prirodzenej imunity po orgánových transplantáciách je schopnosť organizmu brániť sa škodlivým vplyvom nedostatočná. Tieto okolnosti môžu následne viesť k reaktivácii vírusu. Podmienkami na to, aby reaktivovaný MCPyV spôsobil karcinogézu (podľa predpokladaného modelu), sú minimálne dva mutačné zásahy. Jedným je integrácia jeho genómu do chromozómu hostiteľskej bunky a ďalším mutácia vírusového genómu tak, aby bolo zabránené vírusovej replikácii (najčastejšie je mutovaný TAg) (Spurgeon a Lambert 2013).

Prítomnosť MCPyV DNA bola študovaná napríklad aj v mezoteliómoch, hematologických nádoroch, melanómoch, nádoroch hrubého čreva, dlaždicovobunkových karcinómoch, Kaposiho sarkómoch a ďalších. Zvýšená vírusová nálož bola nachádzaná u jedincov s potlačenou imunitou (Dalianis a Hirsch 2013, Spurgeon a Lambert 2013).

Prvý dôkaz o možnej koexistencii MCPyV v skupine HPV asociovaných dlaždicovobunkových karcinómoch publikovali Imajoh a kol. (2012). Vychádzali z viacerých predpokladov – množiace sa dôkazy o prítomnosti MCPyV v dlaždicovobunkových karcinómoch, výskyt neuroendokrinných karcinómov na KM, ktoré sú histologicky podobné s MCC a možný spôsob prenosu vírusu pohlavným stykom.

#### **4.4.3. *Chlamydia trachomatis***

*Chlamydia trachomatis* (CT) patrí medzi gramnegatívne parazitujúce baktérie infikujúce vnímavé bunky slizníc. Sú to obligátne intracelulárne parazity; ich rast a množenie je energeticky závislé od hostiteľskej bunky. CT je najčastejšie ochorenie prenášané nechráneným vaginálnym, análnym alebo orálnym sexom, ktoré, ak sa nelieči, môže spôsobiť vážne problémy. Infekcia môže byť prenesená aj z matky na dieťa počas vaginálneho pôrodu

(<http://www.cdc.gov/std/chlamydia/chlamydia-factsheet-june-2014.pdf>, Matoušková a Hanuš 2009).

Chlamýdie majú dvojfázový životný cyklus. Odohráva sa mimo bunky, kde má baktéria formu infekčného, neaktívneho elementárneho telieska s pevnou bunkovou stenou s veľkosťou 250 – 400 nm. Po endocytóze vstupuje do vnútra bunky, kde sa zmení na neinfekčné, metabolicky aktívne retikulárne teliesko veľkosti 800 – 1000 nm, ktoré sa delí binárnym delením. Novovzniknuté retikulárne telieska kondenzujú naspäť na elementárne telieska. Životný cyklus končí autolýzou bunky a uvoľnením teliesok do okolia, kde adherujú na ďalšie epitelové bunky. Celý cyklus trvá 48 až 72 hodín. U chlamýdií je popisovaná aj premena na tzv. perzistentné formy, kedy sa pri nedostatku živín alebo pôsobením niektorých antibiotík alebo cytokínov vytvorí vnútrobunková, ďalej sa nedeliaca forma s obmedzenou metabolickou aktivitou. V tejto forme dokážu chlamýdie prežívať niekoľko rokov, až do obnovenia vhodných podmienok na delenie (Matoušková a Hanuš 2009).

Zmena antigénnych a biochemických vlastností modifikuje klinické príznaky infekcie a diagnostické možnosti. To môže byť spolu s prípadnými novými sekvenčnými variantami dôvodom pre falošne negatívne výsledky diagnostických testov. Napríklad v roku 2006 bol vo Švédsku objavený nový kmeň *CT*, ktorý obsahoval deléciu 377 bp (Ripa a Nilsson 2006). Bežne používané testy preto nezachytili asi 8000 pozitívnych pacientov (Herrmann 2007) .

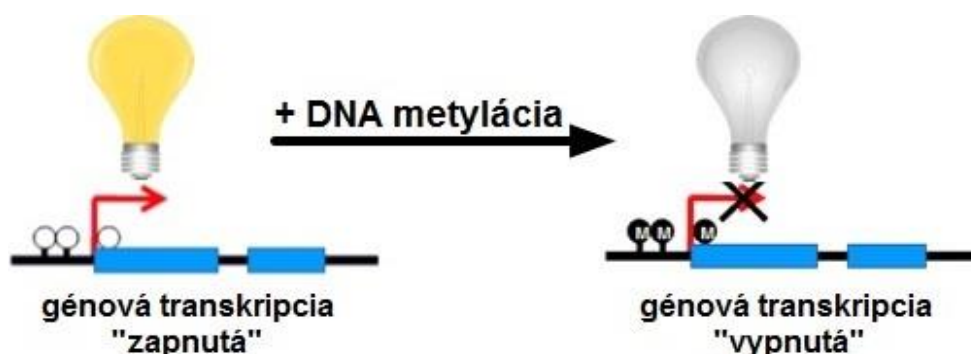
Väčšina infikovaných zostáva bez klinických príznakov, môže sa ale vyskytnúť množstvo ochorení. Sú to napríklad zápal močovej rúry, konečníka, neplodnosť alebo očný trachóm (zápal spojiviek a rohovky), ktorý môže spôsobiť oslepnutie. U mužov sa objavuje zápal prostaty a nadsemenníka, u žien zápal KM, hlboký panvový zápal (Pelvic Inflammatory Disease - PID), mimomaternicové tehotenstvo a akútne alebo chronické bolesti panvy. Novorodenci infikovanej matky sú počas pôrodu náchylní na infekciu oka a pľúc (<http://www.urology.sk/nase-sluzby/andrologicko-sexuologicke-vysetrenie/>).

Súvislosť *CT* s nádorovou transformáciou je najviac študovaná v asociácii s KKM. Ako potenciálny kofaktor s HPV je *CT* často spájaná pre ich súbežný prenos, podobný spôsob infekcie, vo väčšine prípadov asymptomatický priebeh a možnú perzistenciu v organizme. *CT* infekcia môže slúžiť ako vstupná cesta, umožňujúca prístup HPV k bazálnej epitelovej vrstve. Je schopná indukovať chronický zápal, hypertrofiu KM a dlaždicové metaplázie. Tieto procesy zvyšujú riziko transformácie cervikálnych buniek, perzistentne infikovaných HR – HPV. Môžu tiež viesť k zvýšeniu vírusovej nálože, integrácii vírusového genómu, inhibícii apoptózy (modulácia imunitných odpovedí hostiteľa), nadexpresii onkogénov E6 / E7 a bunkovej

transformácii (Silva a kol. 2014). Pre tieto, ale aj mnohé iné fakty je *CT* neustále hojne študovaná ako možný biologický kofaktor pri vzniku / progresii KKM.

#### 4.4.4. Metylácia hostiteľskej DNA

DNA metylácia je jeden z epigenetické mechanizmov, ktoré bunka používa na kontrolu génovej expresie. Tento jav sa v ľudskom genóme vyskytuje na cytozínových bázach (v polohe 5' oproti guanínu), ktoré sú prostredníctvom enzýmov DNA metyltransferáz konvertované na 5 – metylcytozín. Metylované cytozíny sú vždy súčasťou dinukleotidu CpG a vyskytujú sa sporadicky v celom genóme. Správna DNA metylácia je nevyhnutná pre bunkovú diferenciáciu a vývoj embrya. Odlišne metylované oblasti v blízkosti génových promótorov rôznych bunkových typov poukazujú na úlohu metylácie pri riadení génovej expresie – čím viac metylovaný promótor, tým nižšia miera transkripcie génu (Obrázok č. 11). Úroveň metylácie je odlišná v rôznych tkanivových typoch a tiež v normálnych a transformovaných bunkách jedného typu tkaniva (Phillips 2008).



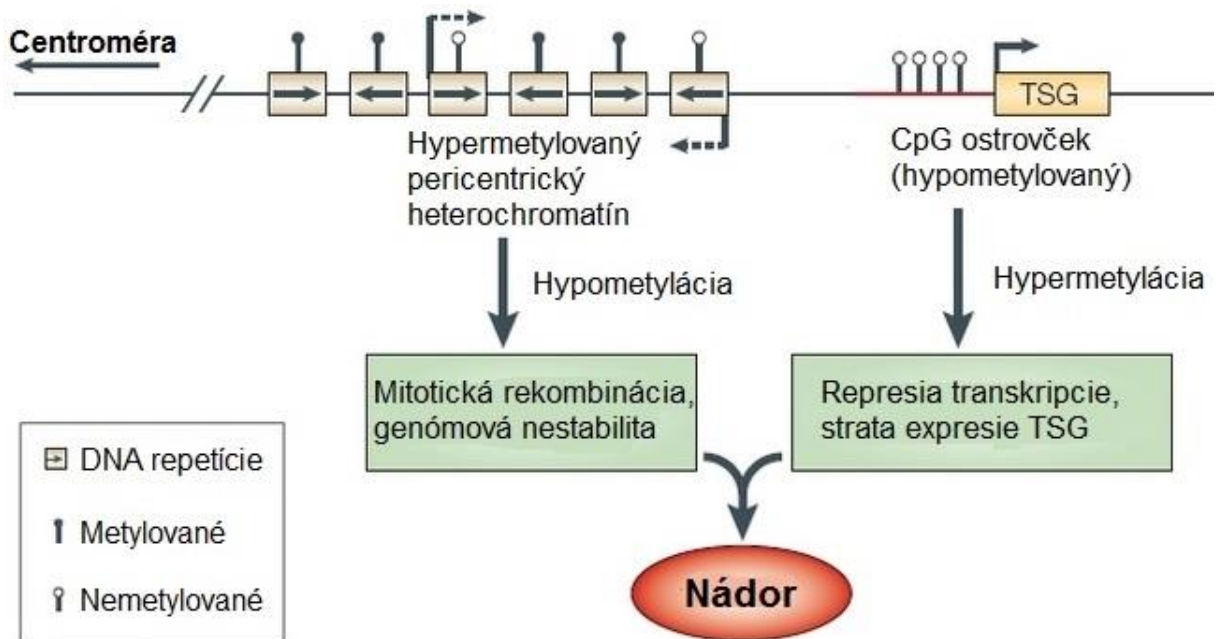
Obrázok č. 11: Transkripčné umlčenie DNA promótorov prostredníctvom metylácie (upravené podľa <https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerk-home/forschungsarbeiten/lebenswissenschaften/2011/zillner-forschungsbericht0/>)

Vzhľadom na kritickú úlohu DNA metylácie pri génovej expresii a bunkovej diferenciácii je veľmi pravdepodobné, že chyby v metylačnom mechanizme môžu mať za následok vážne problémy. Abnormálna metylácia je študovaná najmä pri nádorových ochoreniach, lupuse, svalovej dystrofii a rade vrodených väd, ktoré sú pravdepodobne zapríčinené defektným mechanizmom imprintingu (Robertson 2005).

V porovnaní so zdravými bunkami bývajú nádorové bunky hypometylované. Výnimku tvoria gény, ktorých funkcia zahŕňa reguláciu BC, inváziu nádorových buniek, DNA opravy a iné mechanizmy zabraňujúce metastázovaniu. Hypermetylácia týchto génov (väčšinou patriacich k TSG) prispieva k nekontrolovanému deleniu buniek, genetickým a ďalším procesom, vedúcim k nádorovej transformácii (Obrázok č. 12). Metylačný status môže



v niektorých prípadoch, napríklad pri karcinóme čreva, slúžiť ako biomarker ochorenia (Phillips 2008).



Obrázok č.12 : DNA metylácia a nádory (upravená podľa Phillips 2008)

Abnormálna metylácia je dokázaná aj na promótoroch TSG u KKM. Produkty HPV onkogénov E6 a E7 sú po interakcii so špecifickými bunkovými proteínmi schopné regulovať remodeláciu chromátnu a modulovať bunkovú DNA metylačnú mašineriu, čím môžu ovplyvňovať génovú expresiu. *In vitro* štúdie dokazujú, že proteín E6 HPV typu 16 supresiou p53 indukuje zvýšenú reguláciu DNA metyltransferázy DNMT1, zatiaľ čo proteín E7 sa na ňu viaže a aktivuje ju. Tieto tvrdenia podporuje fakt, že zvýšená regulácia DNMT1 bola detegovaná *in vivo* v léziách CIN III a KKM. DNA metylácia promótorov TSG je preto študovaná ako možný marker karcinogenézy (Steenbergen a kol. 2014).

## 5. Materiál a metódy

### 5.1. Typy materiálu použité na analýzu

Testovaným materiálom boli gynekológom odoberané stery z KM do LBC nádoby ThinPrep® (Hologic / Gen-Probe), zaslané na cytologickú alebo genetickú analýzu do Bioptickej laboratoře s.r.o.. Vyberané boli odbery od pacientok s histologicky potvrdenou stredne ťažkou až ťažkou cervikálnou dyspláziou CIN III+. Všetky vzorky museli mať dostatočnú celularitu a HPV *screeningovou* metódou u nich bola potvrdená prítomnosť HR - HPV (14 typov). Vzorky vhodné na analýzu boli určené patológom a spracúvané v molekulárne – genetickom laboratóriu.

Na analýzu boli použité vzorky od 51 pacientok vo veku 17 – 80 rokov. U všetkých vzoriek bola stanovená histologická diagnóza CIN III, z čoho u dvoch bola potvrdená aj mikroinvázia a u jednej adenokarcinóm *in situ*.

Kontroly pochádzali od 51 žien vo veku 27 - 65 rokov s potvrdenou HPV negativitou.

### 5.2. Izolácia DNA

#### 5.2.1. Izolácia DNA z LBC nádoby ThinPrep® - detekcia vírusov a CT

Na izoláciu DNA z LBC bola použitá súprava QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN), založená na kolónkovej izolácii DNA a RNA z plazmy, séra a iných bezbunkových telových tekutín. Postupovalo sa podľa návodu dodaného výrobcom, ktorý bol upravený na základe potrieb následných analytických metód. Princíp súpravy spočíva v naviazaní nukleových kyselín na silikátovú membránu po pridaní chaotropných solí a etanolu do lyzátu (tzv. kolónková izolácia). Procedúra sa skladá zo štyroch krokov: lýza buniek, naviazanie DNA na membránu, premývanie a filtrovanie purifikovanej DNA do elučného pufru. Pred začiatkom izolácie boli dodané chemikálie pripravené na použitie (Tabuľka č. 4)

Tabuľka č. 4: Príprava chemikálií súpravy pred ich použitím

<b>Proteáza</b>	lyofilizovaná proteáza + 1,4 ml proteázového resuspendujúceho pufru	skladovať v mrazničke
<b>RNA / AVE</b>	lyofilizovaná nosičová RNA + 310 µl pufru AVE	rozdeliť na alikvóty po 30,8 µl a zamraziť
<b>Premývací pufr AW1</b>	pufr AW1 + 20 ml 96 % etanol	-
<b>Premývací pufr AW2</b>	pufr AW2 + 30 ml 96 % etanol	-

Pre predpokladanú nízku koncentráciu vírusovej DNA boli vzorky zakoncentrované. Fixačný roztok v nádobkách bol premiešaný pomocou vortexu a 2 ml z nich boli odobrané do

skúmaviek. Vzorky boli stočené na centrifúge<sup>1</sup> pri 3000 x g, 15 min a pipetou bolo odstránených 1800 µl supernatantu. Zvyšných 200 µl bolo po premiešaní (vortex) a rozpustení peletu použitých na samotnú izoláciu.

Do pripravených 200 µl zakoncentrovaného roztoku bolo pridaných 25 µl proteázy, 10 µl internej kontroly inhibície a 200 µl pripravenej zmesi AL pufru a nosičovej RNA rozpustenej v pufri AVE. Zmes bola pripravená podľa Tabuľky č. 5.

Tabuľka č. 5: Použité objemy AL pufru a roztoku RNA / AVE v závislosti od počtu vzoriek

Počet vzoriek	Objem AL pufru (µl)	Objem RNA / AVE (µl)
1	220	4,5
2	440	9
3	660	13,5
4	880	18
5	1100	22,5
6	1320	27
7	1540	31,5
8	1760	36
9	1980	40,5
10	2200	45

Skúmavky so všetkými pridanými reagensiami boli 15 sekúnd premiešavané (vortex) a inkubované 15 minút pri teplote 56 °C (Dry Bath Incubator, Major Science, Saratoga California). Nasledovalo krátke stočenie centrifúgou, prídanie 250 µl etanolu, 15 sekúnd premiešanie (vortex) a inkubácia 5 minút pri izbovej teplote. Krátka centrifugácia bola zopakovaná a lyzát bol pipetou prenesený do QIAamp Min Elute kolónky. Kolónky boli stočené na centrifúge pri 6000 x g, 1 minútu. Zberné skúmavky s filtrátom boli vyhodnené a kolónky boli umiestnené do novej skúmavky. Bolo pridaných 500 µl premývacieho AW1 pufru a skúmavky boli opäť stočené pri 6000 x g, 1 minútu. Skúmavky boli znovu vymenené a postup sa zopakoval s pufrom AW2 a následne s čistým etanolom. Po vymenení kolónky s etanolom boli skúmavky znovu stočené pri 16 000 x g, 3 minúty. Kolónky boli následne umiestnené do čistej 1,5 ml skúmavky. Na stred membrány bolo pridaných 200 µl AVE elučného pufru, nasledovala inkubácia 1 minútu pri izbovej teplote a po centrifugácii 1 minútu pri 16 000 x g bola eluovaná čistá DNA. Kolónka bola vyhodnená a vzorky uskladnené v chladničke.

<sup>1</sup> všetky centrifugácie boli vykonané pri izbovej teplote na centrifúge Centrifuge 5430, Eppendorf, Hamburg, Nemecko

### **5.2.2. Izolácia DNA z LBC nádoby ThinPrep® - detekcia metylácií**

DNA potrebná pre detekciu metylácií bola izolovaná zo vzoriek LBC pomocou súpravy QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN). Princíp je rovnaký ako u QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (vid'. vyššie).

Fixačný roztok v nádobkách bol premiešaný pomocou vortexu a 1 ml vzorky bol odobratý do skúmaviek s objemom 1,5 ml. Vzorky boli stočené na centrifúge pri 3000 x g, 10 min a pipetou bolo odstránených 900 µl supernatantu. Zvyšných 100 µl bolo po premiešaní (vortex) a rozpustení peletu pridaných 10 µl proteinázy K. Po následnom pridaní 100 µl AL pufru boli vzorky dôkladne zhomogenizované premiešaním na vortexe a inkubované 10 minút pri 56 °C. Po inkubácii boli vzorky rýchlo stočené na centrifúge. Nasledovalo pridanie 50 µl 96 % etanolu, premiešanie 15 sekúnd na vortexe a inkubácia 3 minúty pri izbovej teplote. Po rýchlom stočení na centrifúge bol celý bunkový lyzát prenesený do QIAamp MinElute kolónky. Vzorky boli stočené na centrifúge pri 6000 x g, 1 minútu. Zberné skúmavky s filtrátom boli vyhodnené a kolónky boli umiestnené do novej skúmavky. Bolo pridaných 500 µl AW1 pufru a skúmavky boli opäť stočené pri 6000 x g, 1 minútu. Skúmavky boli znovu vymenené a postup sa zopakoval s pufrom AW2. Pre úplné vysušenie membrány boli vzorky stáčané 3 minúty pri 20000 x g, skúmavky boli vyhodnené a kolónky boli premiestnené do nových 1,5 ml skúmaviek. Na stred membrány bolo napipetovaných 60 µl AE destilovanej vody, vzorky sa nechali inkubovať 1 minútu pri izbovej teplote. Nakoniec boli stáčané 1 minútu pri 20000 x g, čím bola eluovaná čistá DNA. Kolónka bola vyhodnená a vzorky uskladnené v mrazničke pri -20 °C.

### **5.3. Meranie koncentracie a čistoty DNA**

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA vo vzorkách bola meraná pomocou spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware). Meraním absorbancie žiarenia pri 260 nm bola stanovená koncentrácia DNA a pomerom absorbancií 260 nm a 280 nm kontaminácia vzorky bielkovinami. Podľa výsledných hodnôt sa vyberali vzorky pre ďalší postup

Množstvo DNA pre používané reakcie bolo empiricky optimalizované nasledovne (Tabuľka č. 6).

Tabuľka č. 6: Množstvo DNA potrebné na reakciu

Vstupný objem (μl)	Množstvo DNA (ng)
2	30 - 200
5	100 - 500

## 5.4. Konvenčná jednokolová PCR

**pSGB:** *Primery* cielené do konzervatívnej oblasti génu E1 u 33 známych kožných a slizničných typov HPV. Amplifikovaná je oblasť veľkosti 188 bp (Tieben a kol. 1993). V Tabuľke č. 7a je znázornená príprava PCR reakcie a v Tabuľke č. 7b teplotný program zvolený v *cyclery*.

Tabuľka č. 7a: príprava PCR reakcie - pSGB

Reagencie PCE	Objem na jednu reakciu (μl)
HotStarTaq™ MM (QIAGEN)	12.5
<i>Primer S</i> (25 μM)	0,5
<i>Primer G</i> (25 μM)	0.5
<i>Primer B</i> (25 μM)	0.5
DNA	2
H <sub>2</sub> O	9

Tabuľka č. 7b: teplotný program - pSGB

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	95	14:00
Denaturácia	45	94	01:00
Anelácia		53	01:30
Polymerizácia		72	02:00
Finálna polymerizácia	1	72	05:00
-	1	14	∞

Citlivosť reakcie<sup>2</sup>: cca 1000 kópií / ml

**pGP 5 + / 6 +:** *Primery* cielené do konzervatívnej oblasti génu pre obalový proteín L1. Amplifikovaná je oblasť veľkosti 140 - 150 bp (Van den Brule a kol. 2002). V Tabuľke č. 8a je znázornená príprava PCR reakcie a v Tabuľke č. 8b teplotný program zvolený v *cyclery*.

<sup>2</sup> Platí pre všetky PCR detekcie vírusov

Tabuľka č. 8a: príprava PCR reakcie - pGP

Reagencie PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
FastStart MM (Roche)	12.5
<i>Primer F*</i> (25 µM)	1
<i>Primer R*</i> (25 µM)	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5
BSA	1,25
DNA	2
H <sub>2</sub> O	5,75

\*F – forward, R – reverse

Tabuľka č. 8b: teplotný program - pGP

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)	
Preinkubácia	1	94	10:00	
Denaturácia	45	94	00:20	33 % ŠCHT
Anelácia		38	00:30	44 % ŠOT
Polymerizácia		71	00:80	62 % ŠOT
Finálna polymerizácia	1	72	04:00	
-	1	14	∞	

ŠCHT – štandardná chladiaca teplota

ŠOT – štandardná ohrievacia teplota

**pE6 / E7:** *Primery* cielené do oblastí onkogénov E6 a E7 u šiestich, často sa vyskytujúcich, HR - HPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 45). Sekvencie amplifikované multiplexovou, typovo špecifickou PCR: HPV 16 - 119 bp, HPV 18 - 172 bp, HPV 31 - 153 bp, HPV 33 - 211 bp, HPV 35 - 230 bp, HPV 45 - 207 bp (Hagmar a kol. 1992). V Tabuľke č. 9a je znázornená príprava PCR reakcie a v Tabuľke č. 9b teplotný program zvolený v *cyclery*.

Tabuľka č. 9a: príprava PCR reakcie - pE6 / E7

Reagencie PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
FastStart MM (Roche)	12.5
<i>Primer F</i> (každý <i>primer</i> 10 µM)	1
<i>Primer R</i> (každý <i>primer</i> 10 µM)	1
BSA	0,5
DNA	2
H <sub>2</sub> O	8

Tabuľka č. 9b: program PCR - pE6 / E7

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	95	09:00
Denaturácia	40	95	00:30
Anelácia		57	00:30
Polymerizácia		72	01:00
Finálna polymerizácia	1	72	05:00
-	1	14	∞

**HHV-8:** *Primery* zacielené na časť génu kódujúceho glykoproteín M, ktorý sa zúčastňuje vstupu a výstupu vírusu z bunky. Amplifikovaný je úsek z oblasti *ORFK9* s veľkosťou 180 bp (Pan a kol. 2001). Vzorky pre PCR boli pripravované v duplikátoch. V Tabuľke č. 10a je znázornená príprava PCR reakcie a v Tabuľke č. 10b teplotný program zvolený v *cyclery*.

Tabuľka č. 10a: príprava PCR reakcie - HHV 8

Reagencie PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
ImmoMix™ Red MM (Bioline, London, UK)	12,5
<i>Primer F</i> (10 µM)	1
<i>Primer R</i> (10 µM)	1
DNA	2
H <sub>2</sub> O	8,5

Tabuľka č. 10b: teplotný program – HHV 8

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	95	10:00
Denaturácia	40	95	00:30
Anelácia		56	00:30
Polymerizácia		72	00:45
Finálna polymerizácia	1	72	05:00
-	1	14	∞

## 5.5. Gélová elektroforéza

Výsledky PCR reakcií boli vizualizované elektroforézou na 2% agarózovom gély. Gél bol pripravený rozpustením 2,5 g agarózy (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Nemecko) v 150 ml 100 x zriedeného TAE pufru (SIGMA – ALDRICH, Buchs SG, Švajčiarsko) a uvedením zmesi do varu. Pre výslednú vizualizáciu amplikónov pod UV žiarením bolo do zohriatej zmesi pridaných 3,2 µl fluorescenčného interkalačného farbiva etídium bromid (EtBr). Pripravená zmes bola naliata do vaničky s hrebeňom pre vytvorenie jamiek.

Po stuhnutí zmesi boli amplikóny a štandard molekulovej hmotnosti (DNA marker) (Thermo Scientific, Waltham, USA) nanosené na gél spolu s 5 µl modro zafarbenej nanášacej zmesi

(Thermo Scientific). Nanášacia zmes umožnila klesnutie vzoriek na dno a vizuálne sledovanie priebehu elektroforézy. Elektroforéza prebiehala v TAE tlmivom roztoku 17 minút pri napätí 150 V pod prúdom 400 mA.

Dĺžky vizualizovaných prúžkov boli porovnané so štandardom a pozitívnymi kontrolami, použitými pre každý marker.

## 5.6. Sekvenácia

Všetky vzorky, vyhodnotené po gélovej elektroforéze ako pozitívne, boli overené sekvenovaním.

### 5.6.1. Prečistenie PCR reakcie

Amplifikované PCR produkty boli prenesené do 96 - jamkovej PCR doštičky a nechali sa prečistiť na prístroji Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter, Brea, California) s použitím súpravy Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter). Princíp súpravy spočíva v naviazaní DNA na magnetické guľičky, odstránení všetkých kontaminantov (zbytky zložiek z PCR reakcie a gélovej elektroforézy), premytí alkoholom a konečného eluovania prečistenej DNA.

### 5.6.2. Sekvenačná reakcia

Po prečistení PCR produktov nasledovala sekvenačná reakcia. Zloženie reakcie je zobrazené v Tabuľke č. 11a a program zvolený v *termocyclery* v Tabuľke č. 11b.

Tabuľka č. 11a: príprava sekvenačnej reakcie

Reagencie	Objem na jednu reakciu (µl)
BigDye terminator (Applied Biosystems)	1
Sekvenačný pufor (Applied Biosystems)	1,5
Sekvenačný <i>primer</i> * (3,2 µM)	1
H <sub>2</sub> O	0,5
Prečistený PCR produkt	6

\* Na sekvenačnú reakciu bol využitý jeden z *primerov* použitých pri reakcii PCR.

Tabuľka č. 11b: teplotný program – sekvenačná reakcia

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Denaturácia	25	96	00:10
Anelácia		50	00:05
Polymerizácia		60	04:00
-	1	4	∞



### 5.6.3. Prečistenie sekvenačnej reakcie

Výsledné produkty boli od zložiek použitých v reakcii prečistené pomocou súpravy Agencourt CleanSEQ Kit (Beckman Coulter). Prečisťovanie sekvenačnej reakcie prebiehalo automatizovane, na rovnakom princípe ako prečisťovanie PCR reakcie.

### 5.6.4. Kapilárna elektroforéza

Po prečistení vzoriek bola vykonaná sekvenačná analýza na automatickom sekvenátore ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, Carlsbad, California) pri konštantnom napätí 13,2 kV / 20 min.. Dáta boli vyhodnotené pomocou programu Bioedit (Ibis Biosciences, Carlsbad, California) (Šteiner 2011).

### 5.6.5. Analýza sekvencií

Výsledné sekvencie boli analyzované v programe BLAST na stránkach NCBI ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). V prípade pozitívneho výsledku pri detekcii HPV (pSGB a pGP), slúžila sekvenčná analýza zároveň aj na určenie konkrétneho typu prítomného vírusu.

## 5.7. real - time - kvantitatívna PCR (qPCR)

**BKV:** Na detekciu vírusu BKV bola použitá súprava BK Virus R-gene® (bioMérieux, Paríž, Francúzsko), určená na kvantitatívnu PCR (PCR v reálnom čase). Dodávané *primery* zachytávajú génovú sekvenciu malého T antigénu, ktorá je v reakcii amplifikovaná a zároveň aj detegovaná. Príprava qPCR reakcie je znázornená v Tabuľke č. 12a.

Detekcia je zabezpečená technológiou duálne značených sond *TaqMan*. Využíva 5' - 3' exonukleázovú aktivitu enzýmu Taq DNA polymerázy na štiepenie sondy značenej na jej koncoch fluoreskujúcim (*reporter*) a nefluoreskujúcim fluoroforom (*quencher* - zhášač).

Súčasťou súpravy je aj kontrola citlivosti (hodnotenie efektívnosti testu), interná pozitívna kontrola (kontrola izolácie DNA a prítomnosť inhibítorov) negatívna kontrola a štyri kvantifikačné štandardy (presné stanovenie vírusovej nálože), ktoré slúžia na zostavenie kalibračnej krivky.

Tabuľka č. 12a: príprava qPCR reakcie - BKV

Reagencie quantitative PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
PCR MM	15
DNA	10

Pripravené vzorky boli prenesené do *termocycleru* Rotor-Gene Q (QIAGEN). Teplotný program zvolený v *cyclery* je znázornený v Tabuľke č. 12b.

Tabuľka č. 12b: teplotný program qPCR – BKV

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	95	15:00
Denaturácia	45	95	00:10
Anelácia		60	00:40
Polymerizácia		72	00:25
Optimalizácia	1	60	-

Analyzované vzorky boli značené fluorescenčnou farbičkou emitujúcou v zelenom spektre a kontroly farbičkou emitujúcou v žltom spektre. Nastavenie reakcie a konečná analýza výsledkov boli vykonané prostredníctvom Rotor - Gene Q software (QIAGEN).

**MCPyV:** Na detekciu MCPyV bola použitá súprava QuantiFast Pathogen PCR + IC Kit (QIAGEN), určená na detekciu vírusov, baktérií a húb, a dva páry primerov. Obidva páry zachytávali sekvencie druhého exónu veľkého T antigénu s veľkosťami 110 bp (LT2) a 88 bp (SET7) (Rodig a kol. 2012). Príprava qPCR reakcií je znázornená v Tabuľke č. 13a a 13b.

Súčasťou súpravy je interná kontrola amplifikácie / prítomnosti PRC inhibítorov (IC D) a k nej príslušný primer s próbou (IC A). Detekcia aj analýza bola zabezpečená systémom TaqMan sond, rovnako ako v prípade ako v prípade qPCR BKV.

Tabuľka č. 13a: teplotný program – MCPyV LT2

Reagencie quantitative PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
MM QuantiFast 5x	4
Mix F + R + P* LT2	1
IC A	2
IC D	2
H <sub>2</sub> O	6
DNA	5

\*Próba

Tabuľka č. 13b: teplotný program – MCPyV SET7

Reagencie quantitative PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
MM QuantiFast 5x	4
Mix F + R + P* SET7	1
IC A	2
IC D	2
H <sub>2</sub> O	6
DNA	5

Pripravené vzorky boli prenesené do *termocycleru* Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Teplotný program zvolený v *cyclery* je znázornený v Tabuľke č. 13c.

Tabuľka č. 13c: teplotný program qPCR – MCPyV

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	95	05:00
Denaturácia	45	95	00:00
Anelácia		60	01:00

## 5.8. Detekcia RNA

RNA bola detegovaná na prístroji PANTHER system (Hologic / Gen-Probe Incorporated, San Diego, California), ktorý využíva princíp transkripciou sprostredkovej amplifikácie (TMA - transcription - mediated amplification). Jedná sa o izotermickú metódu založenú na transkripcii RNA (RNA polymeráza) a syntéze DNA (reverzná transkriptáza), s cieľom produkcie niekoľkých miliárd amplikónov RNA z templátovej sekvencie nukleovej kyseliny (RNA, DNA). Pri tejto metóde bola analyzovaná RNA priamo z LBC (bez predošlej izolácie).

### 5.8.1. Detekcia mRNA

Prítomnosť vírusovej mRNA bola detegovaná u 14 HR - HPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Na analýzu bola použitá súprava APTIMA® HPV Assay (Hologic / Gen-Probe Incorporated, San Diego, California), ktorá je založená na kvalitatívnej detekcii vírusovej mRNA exprimovanej z HPV onkogénov E6 a E7. Touto metódou sú teda detegované iba vírusy, ktoré sú transkripčne aktívne. Tie, ktoré sú v bunkách prítomné iba latentne zachytené nie sú.

### 5.8.2. Detekcia rRNA

Prítomnosť bakteriálnej ribozomálnej RNA bola detegovaná u *CT* pomocou súpravy APTIMA® Combo 2 Assay (Hologic / Gen-Probe Incorporated, San Diego, California). Analýza je založená na rozpoznaní a kvalitatívnej detekcii cieľových sekvencií molekúl rRNA *CT*, ktoré sú vo všetkých infikovaných bunkách prítomné vo vysokom počte kópií.

## 5.9. Detekcia metylácií

**Metylácie promótorov TSG:** Na detegovanie metylácií bol využitý princíp bisulfidickej konverzie. Pri tejto metóde je pomocou bisulfidu v nemetylovanej DNA cytozín konvertovaný na uracyl, zatiaľ čo metylovaný cytozín (5mC) zostáva nezmenený.

### 5.9.1. Bisulfidická konverzia

Pri bisulfidickej konverzii bolo postupované podľa návodu súpravy EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH). Pred použitím súpravy boli podľa Tabuľky č. 14 pripravené potrebné chemikálie. Podľa odmeranej koncentrácie izolovanej DNA boli vzorky v 0,2 ml skúmavkách nariadené tak, aby v objeme 45 µl bolo výsledné množstvo DNA 200 – 500 ng.

Tabuľka č. 14: príprava chemikálií pre bisulfidickú konverziu

<b>CT konverzný pufor</b>	CT konverzný reagent (lyofilizát) + 750 µl destilovaná voda + 210 µl M - riediaci pufor	ikubácia 10 minút na trepačke pri izbovej teplote, skladovať v -20 °C max. 1 mesiac
<b>M-premývací pufor</b>	6 ml M – premývací pufor + 24 ml 96 % etanolu	skladovať pri izbovej teplote

K nariadeným vzorkám bolo pridaných 5 µl M – riediaceho puforu, zmes bola premiešaná pipetou a nechala sa inkubovať 15 minút pri 37 °C. Po inkubácii bolo ku vzorkám pridaných 100 µl CT konverzného puforu a nechali sa znovu inkubovať 12 – 16 hodín pri 50 °C. Následne boli vzorky krátko stočené na centrifúge. Prázdne kolónky Zymo – Spin IC Column umiestnené v zbernej skúmavke boli stočené pri 17000 x g, 30 sekúnd, následne do nich bolo napipetovaných 400 µl M – väzobného puforu a celý objem vzorky. Kolónky v skúmavke boli niekoľkokrát premiešané otáčaním, stáčané 30 sekúnd na centrifúge pri 14000 x g, supernatant bol vyliaty a znovu umiestnený do zbernej skúmavky. Ku vzorkám naviazaným na membránu bolo pridaných 100 µl M – premývacieho puforu a boli stáčané 30 sekúnd pri 14000 x g. Supernatant bol opäť vyliaty, do kolónky bolo pridaných 200 µl M – desulfonačného puforu,

vzorky sa nechali stáť 15 – 20 minút pri izbovej teplote a následne boli stáčané 3 minúty pri 14000 x g. Po vylíatí supernatantu bolo pridaných 200 µl M – premývacieho pufru a vzorky boli stočené pri 14000 x g, 30 sekúnd (krok bol zopakovaný). Vzorky boli nakoniec umiestené do 1,5 ml skúmavky, na stred membrány bolo pridaných 12,5 µl M – elučného pufru, inkubovali sa 3 minúty pri izbovej teplote a boli stočené pri 14000 x g 30 sekúnd. Kolónka bola vyhodená a vzorky uskladnené pri -70 °C.

### 5.9.2. Multiplexová metylačne špecifická qPCR

Detekcia metylovanej DNA bola vykonaná pomocou súpravy PreCursor – M kit (Self-Screen, Amsterdam, Holandsko). Princíp súpravy spočíva v kvalitatívnej detekcii metylácií na promótoroch tumor supresorových génov *CADMI* (cell adhesion molecule 1), *MAL* (myelin and lymphocyte) a *miR124-2* (micro-RNA). Analýza je založená na *TaqMan* technológii (viď. podkapitola 5.7 *real - time* - kvantitatívna PCR (qPCR)) kombinovanej s  $\Delta\Delta Cq$  analýzou.  $\Delta\Delta Cq$  analýza určuje relatívny stupeň metylácie pozorovaných génov v porovnaní s bežným stupňom metylácie, ktorý nie je spájaný s kancerogénou.

Ako kontrola je použitá metylačne nešpecifická PCR pre referenčný gén  $\beta$  – aktín, slúžiaca na určenie celkového množstva DNA v reakcii.

Pre kalibráciu reakcie je použitý nízko kópiový plazmid DNA so známym počtom kópií pre štyri cieľové gény (*MAL*, *CADMI*, *miR124-2* a  $\beta$  – aktín).

Do príslušných jamiek 96 - jamkovej platničky Hard-Shell® Low-Profile Thin-Wall 96-Well Skirted PCR Plates #HSP-9655 (Bio - Rad) bolo napipetovaných 10 µl dôkladne roztopeného a zvortexovaného PreCursor – M MM. Následne bolo k MM pridaných 2,5 µl pripravenej konvertovanej templátovej DNA (50 ng), 2,5 µl vody do netemplátovej kontroly v pozícii B1 a 2,5 µl dôkladne roztopeného a zvortexovaného PreCursor – M kalibrátoru do pozície A1. Platnička bola následne utesnená lepiacim optickým filmom, stočená na centrifúge a vložená do termocycleru CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio - Rad, Hercules, California). Teplotný program nastavený v *cyclery* je zobrazený v Tabuľke č 15.

Tabuľka č. 15: teplotný program- metylačne špecifická qPCR

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	95	05:00
Denaturácia	45	95	00:15
Anelácia		63	00:50

Ako pozitívna kontrola reakcie slúži kalibrátor v pozícii A1 a ako negatívna kontrola netemplátová vzorka s vodou v pozícii B1. Na značenie jednotlivých génov boli použité fluorescenčné farbičky emitujúce v zelenom (*miR124-2*), žltom ( $\beta$  – *aktín*), oranžovom (*MAL*) a červenom (*CADMI*) spektre. Nastavenie reakcie a hodnotiacich kritérií bolo vykonané prostredníctvom Bio – Rad CFX Manager 2.1 software a konečná analýza výsledkov prostredníctvom výrobcom vytvoreného excel súboru, kde boli porovnané získané hodnoty vzoriek s hodnotami štandardov.

## 5.10. Hybridizačné metódy

**HPV SPF10-LiPA25:** Kvalitatívna identifikácia DNA 25 genotypov HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, a 74) pomocou súpravy RHA Kit HPV SPF10-LiPA25, version 1 (Labo Bio-medical Products, Rijswijk, Holandsko). Princíp metódy spočíva v hybridizácii denaturovaných a biotinylovaných amplikónov na špecifické oligonukleotidové próby, ktoré sú paralelne v líniách imobilizované na papierovom prúžku. Po hybridizácii a premytí je pridaná alkalická fosfatáza konjugovaná so streptavidínom, ktorý sa naviaže na vytvorené biotinylované hybridy. Inkubácia s BCIP / NBT chromogénom (substrát) umožňuje vizuálnu interpretáciu výsledkov (fialové sfarbenie prúžkov).

Amplifikácia: PCR reakciou je pomocou *primerov* SPF10 amplifikovaný región génu pre obalový proteín L1 s dĺžkou 65 bp. V Tabuľke č. 16a je znázornená príprava PCR reakcie a v Tabuľke č. 16b teplotný program zvolený v *cyclery*.

Tabuľka č. 16a: príprava PCR reakcie - SPF10-LiPA25

Reagencie PCR	Objem na jednu reakciu (µl)
PCR MM	20
DNA	5

Tabuľka č. 16b: teplotný program - SPF10-LiPA25

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	94	09:00
Denaturácia	40	94	00:30
Anelácia		52	00:45
Polymerizácia		72	00:45
Finálna polymerizácia	1	72	05:00
-	1	14	∞

Hybridizácia: Do prikrytého vodného kúpeľa nastaveného na 50 °C (+/- 0,5 °C) bol ponorený hybridizačný roztok a premývací roztok (PR), ktoré sa nechali zohrievať na teplotu

37 - 50 °C. Do vrchnej časti každého označeného žliabku vo vaničke bolo napipetovaných 10 µl denaturačného roztoku a následne 10 µl biotinylovaných amplikónov. Zmes bola niekoľkokrát premiešaná pipetou a pripravený denaturačný mix sa nechal inkubovať 5 minút pri izbovej teplote. Do denaturovaných vzoriek boli pridané 2 ml predhriateho, pretrepaného hybridizačného roztoku a nakláňaním vaničky bola zmes premiešaná. Do jednotlivých žliabkov s roztokom boli ponorené prúžky s imobilizovanými próbami, vanička bola vložená do pripraveného zakrytého vodného kúpeľa s trepačkou (SW22 Shaking Water Bath, Julabo, Seelbach, Nemecko) a vzorky sa nechali inkubovať 1 hodinu. Rýchlosť trepania bola nastavená na cca 55 RPM

**Premývanie:** Po inkubácii bola vanička vybraná z vodného kúpeľa a roztok bol odstránený vákuovou odsávačkou. Do žliabkov boli následne napipetované 2 ml predhriateho PR, vanička bola 10 – 20 sekúnd premiešavaná nakláňaním a PR bol odstránený vákuovou odsávačkou (krok bol zopakovaný). Po ďalšom pridaní 2 ml predhriateho PR bola vanička inkubovaná v pripravenom zakrytom vodnom kúpeli s trepačkou 30 minút.

**Vizualizácia:** Po inkubácii a odsatí PR boli pridané 2 ml oplachovacieho roztoku (OR), (vopred pripraveného podľa Tabuľky č. 17). Prúžky boli ručne premývané nakláňaním vaničky 1 minútu a OR bol odsatý (krok bol zopakovaný). Do žliabkov boli následne pridané 2 ml konjugačného roztoku (vopred pripraveného podľa Tabuľky č. 18) a vanička sa nechala inkubovať 30 minút na trepačke mimo vodného kúpeľa (PSU-10, Orbital Shaker, Biosan, Riga, Litva) pri rýchlosti 80 RPM. Po inkubácii a odsatí konjugačného roztoku boli prúžky 1 minútu nakláňaním oplachované v 2 ml OR a po odsatí bol krok zopakovaný. Nasledovalo opláchnutie v 2 ml substrátového pufru a inkubácia 30 minút v tme na trepačke mimo vodného kúpeľa v 2 ml substrátového roztoku (vopred pripraveného podľa Tabuľky č. 18). Po inkubácii boli prúžky 2-krát ručne premyté destilovanou vodou, pinzetou vybrané zo žliabkov vaničky a nalepené na interpretačný list. Hodnotené boli pozitívne reagujúce sondy.

Tabuľka č. 17: Príprava oplachovacieho roztoku

	<b>Oplachovací Roztok</b>		
<b>Počet prúžkov</b>	<b>Rinse [5x] Ml</b>	<b>Voda ml</b>	<b>Celkový objem ml</b>
<b>1,2,3</b>	5	25	30
<b>3,4,5</b>	10	40	50
<b>6,7,8</b>	12,5	62,5	75

Tabuľka č. 18: Príprava konjugačného a substrátového roztoku

Počet prúžkov	Konjugačný Roztok		Substrátový roztok		Celkový objem ml
	Diluent Konjugátu μl	Konjugát [100x] μl	Substrátový Pufor μl	Substrát [100x] μl	
1	30	2970	30	2970	3
2	50	4950	50	4950	5
3	70	6930	70	6930	7
4	90	8910	90	8910	9
5	110	10890	110	10890	11
6	130	12870	130	12870	13
7	150	14850	150	14850	15
8	170	16830	170	16830	17

**CNS:** Simultánna kvalitatívna identifikácia genómov 8 vírusov (enterovírus, HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, CMV, EBV, JCV) a parazita *Toxoplasma gondii* pomocou súpravy RHA Kit CNS (Labo Bio-medical Products). Princíp metódy je rovnaký ako pri HPV SPF10-LiPA25 (viď. vyššie).

**Amplifikácia:** Namnoženie cielených sekvencií DNA je zabezpečené pomocou multiplexovej PCR v 2 reakciách so špecifickou sadou primerov. Primery v MM 1 zachytávajú genómy HSV-1, HSV-2, VZV a HHV-6 a v MM 2 genómy CMV, EBV a JCV. Amplikóny oboch reakcií majú dĺžky do 200 bp (presné dĺžky výrobcom neuvedené).

V Tabuľke č. 19a je znázornená príprava PCR reakcie a v Tabuľke č. 19b teplotný program zvolený v *cyclery*.

Tabuľka č. 19a: príprava PCR reakcie – CNS

Reagencie PCR	Objem na jednu reakciu (μl)
PCR MM	45
DNA	5

Tabuľka č. 19b: teplotný program - Linear Array

Program	Počet cyklov	Teplota (°C)	Čas (min.)
Preinkubácia	1	94	09:00
Denaturácia	35	94	00:30
Anelácia		52	00:45
Polymerizácia		72	00:45
Finálna polymerizácia	1	72	05:00
-	1	14	∞



Hybridizácia: Do prikrytého vodného kúpeľa nastaveného na 50 °C (+/- 0,5 °C) bol ponorený hybridizačný roztok a premývací roztok, ktoré sa nechali zohrievať na teplotu 37 - 50 °C. Do vrchnej časti každého označeného žliabku vo vaničke bolo napipetovaných 20 µl denaturačného roztoku a následne 20 µl biotinylovaných amplikónov z každej reakcie. Zmes bola niekoľkokrát premiešaná pipetou a pripravený denaturačný mix sa nechal inkubovať 5 minút pri izbovej teplote. Do denaturovaných vzoriek boli pridané 2 ml predhriateho, pretrepaného hybridizačného roztoku a nakláňaním vaničky bola zmes premiešaná. Do jednotlivých žliabkov s roztokom boli ponorené prúžky s imobilizovanými próbami, vanička bola vložená do pripraveného zakrytého vodného kúpeľa s trepačkou a vzorky sa nechali inkubovať 1 hodinu. Rýchlosť trepania bola nastavená na cca 55 RPM.

Premývanie aj Vizualizácia boli vykonané podľa rovnakého postupu ako pri HPV SPF10-LiPA25 (viď. vyššie).

## **5.11. Štatistické spracovanie výsledkov**

Na určenie štatistickej významnosti zistených hodnôt, bol použitý Fisherov test. Tento test je vhodný pre menšie vzorky dát, pretože na rozdiel od iných metód (chi – kvadrát) dáva presnú hodnotu významnosti odchýlky od nulovej hypotézy. Výsledok testu popisuje závislosť medzi testovanými veličinami – t.j. či je odchýlka od nulovej hypotézy dostatočne významná.

Bola testovaná hypotéza, že prítomnosť sledovaného markeru u HPV pozitívnych žien má vplyv na progresiu lézií KM. Nulová hypotéza indikovala nezávislosť prítomnosti sledovaných markerov na progresii ochorenia.

Ako hladinu štatistickej významnosti Fisherovho testu bola použitá obvyklá hodnota 0,05, ktorá povoľuje prijatie testovanej hypotézy s 95 % pravdepodobnosťou.

Výpočet vlastných hodnôt Fisherovho testu pre konkrétne markery bol vykonaný pomocou štatistických nástrojov programu MS Excel.

## 6. Výsledky

### 6.1. HPV testovanie

Všetky vzorky vybrané na testovanie boli *screeningovým* mRNA APTIMA testom určené ako HR - HPV pozitívne (14 HR typov). Prvým krokom analýz bolo potvrdenie prítomnosti infekcie a určenie konkrétnych typov vírusu. Po izolácii DNA na to boli využité PCR detekcie pSGP, pGP 5+ / 6+ a pE6 / E7. V prípadoch, kedy bola pomocou sekvenovania zistená infekcia viacerými typmi HPV, bola vykonaná identifikácia HPV DNA založená na PCR a hybridizácii nukleových kyselín HPV SPF10-LiPA25. Výsledky HPV testovania sú zobrazené v Tabuľke č. 20.

### 6.2. Detekcia vybraných biologických markerov – analyzované vzorky

Markery HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, CMV, EBV a JCV boli pre vysokú citlivosť testované pomocou hybridizácie na prúžky pomocou súpravy RHA CNS. Pre zvyšné markery, u ktorých hybridizačné testovanie nebolo možné, boli využité príslušné zaužívané metódy: konvenčná PCR - HHV-8, qPCR - BKV, MCPyV detekcia rRNA – CT a bisulfidická konverzia - metylácie promótorov TSG. Výsledky testovania biologických markerov sú zobrazené v Tabuľke č. 20.

Tabuľka č. 20: Výsledky testovania HPV a vybraných biologických markerov

Pacientka	vek	histológia	typ HPV	EBV	CMV	HHV8	HHV6	HSV-1	HSV-2	VZV	BKV	JCV	MCPyV	CT	metylácie
1	28	CIN III	31, 56	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	36	CIN III	33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NA
3	36	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	24	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg
5	32	CIN III	16, 51, 52	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	36	CIN III	39, 68, 74	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	27	CIN III	31, (54)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
8	27	CIN III	16, (18)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
9	24	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	poz	neg

Pacientka	vek	histológia	typ HPV	EBV	CMV	HHV8	HHV6	HSV-1	HSV-2	VZV	BKV	JCV	MCPyV	CT	metylácie
10	17	CIN III	6, 11, 16, 18, 52	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	poz
11	33	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12	26	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13	20	CIN III	16, (31), 39, 56, 70, 74	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg
14	28	CIN III	33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15	51	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
16	25	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
17	36	CIN III	31,52, (54)	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg	neg	poz	neg	neg	poz
18	37	CIN III, mikroinvázia	59	neg	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz
19	35	CIN III,	18	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
20	32	CIN III	16	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
21	30	CIN III	18	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
22	37	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg	poz
23	40	CIN III	45	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
24	38	CIN III	16, 33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
25	26	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	poz
26	21	CIN III	16, 66	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	poz	neg	neg
27	29	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
28	29	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
29	37	adenokarcinóm <i>in situ</i>	45	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
30	24	CIN III	16	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
31	34	CIN III	35	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg	poz
32	41	CIN III	52	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
33	27	CIN III	16, 53, 54	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
34	32	CIN III	68	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
35	26	CIN III	16	neg	neg	neg	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
36	26	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	NA
37	36	CIN III	56	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NA
38	80	CIN III	33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NA
39	24	CIN III	52	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
40	34	CIN III	31	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz

Pacientka	vek	histológia	typ HPV	EBV	CMV	HHV8	HHV6	HSV-1	HSV-2	VZV	BKV	JCV	MCPyV	CT	metylácie
41	27	CIN III	58	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	NA
42	32	CIN III	16, 31, (54)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
43	21	CIN III	6,33,7 4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
44	62	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
45	27	CIN III	31, (54)	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NA
46	23	CIN III	16, 33, 52	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
47	24	CIN III	33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
48	26	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
49	23	CIN III	16, 52	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
50	21	CIN III	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
51	38	CIN III, mikroinvázia	16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz

(-) – slabšie detegovaná pozitivita

NA - nebolo možné analyzovať

### 6.3. Detekcia vybraných biologických markerov – kontrolná skupina

Pre markery, ktoré boli v analyzovaných vzorkách detegované, bola vykonaná analýza na kontrolnej skupine. Všetky vzorky kontrolnej skupiny boli *screeningovým* testom APTIMA určené ako HPV negatívne. Výsledky testovania kontrolnej skupiny sú zobrazené v Tabuľke č. 21.

Tabuľka č. 21: Výsledky testovania biologických markerov u kontrolnej skupiny.

pacientka	vek	EBV	CMV	HHV6	HSV-1	JCV	MCPyV	CT
1	33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	30	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	62	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	44	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	30	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	38	neg	poz	neg	neg	neg	neg	poz

pacientka	vek	EBV	CMV	HHV6	HSV-1	JCV	MCPyV	CT
7	40	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8	50	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9	53	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	26	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11	42	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12	37	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13	39	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
14	35	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15	35	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
16	51	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
17	49	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
18	55	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg
19	35	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg
20	41	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
21	36	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg
22	36	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
23	43	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
24	38	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
25	32	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
26	27	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
27	43	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg
28	42	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
29	42	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
30	26	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
31	49	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg
32	43	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
33	23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
34	49	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
35	51	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
36	49	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
37	53	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
38	29	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
39	44	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
40	45	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
41	37	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
42	55	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg
43	42	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

pacientka	vek	EBV	CMV	HHV6	HSV-1	JCV	MCPyV	CT
44	30	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
45	33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz
46	45	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
47	23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
48	37	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
49	31	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
50	30	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
51	37	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

#### 6.4. Štatistická analýza

Sledovaný súbor 51 žien bol štatisticky spracovaný pomocou Fisherovho testu s nulovou hypotézou vid'. kapitola Materiál a metódy podkapitola Štatistické spracovanie výsledkov.

Tento súbor bol porovnaný s kontrolnou skupinou 51 HPV negatívnych žien.

Fisherov test bol vykonaný pre všetky detegované markery okrem metylácií. Vzhľadom na fakt, že detegovanie metylácií je v niektorých krajinách zavedené do praxe ako schválený, vedecky overený test, používaný pre ohodnotenie pretrvávajúceho transformačného pôsobenia HPV a bunku, nebolo nutné vykonávať ďalšie kontrolné analýzy.

V Tabuľke č. 22 sú zobrazené výsledné hodnoty početnosti jednotlivých markerov v analyzovaných vzorkách a v kontrolách a k nim príslušné hodnoty Fisherovho testu.

Tabuľka č. 22: Výsledky štatistickej analýzy pomocou Fisherovho testu

marker	EBV	CMV	HSV-1	HSV-2	HHV-6	HHV-8	VZV	BKV	JCV	MCPyV	CT	metylácie
analyzované vzorky (N = 51)	4	1	1	0	1	0	0	0	4	6	4	26
kontrolná skupina (N = 51)	4	1	0	-	0	-	-	-	1	3	3	-
významnosť odchýlky od nulovej hypotézy (p = 0,05)	1	1	1	-	1	-	-	-	0,36	0,49	1	-

## 7. Diskusia

Vývoj progresie ťažkých lézií krčka maternice (CIN II / III) je veľmi nepredvídateľný. Aktuálne vyšetrenia využívané v gynekologickom *screeningu* nie sú schopné odlíšiť lézie, ktoré vplyvom imunitného systému ustúpia od tých, ktoré budú ďalej progredovať až ku karcinómu. Väčšina týchto lézií je preto dnes liečená chirurgickým zásahom, čo vo väčšine prípadov znamená prehnanú liečbu a zbytočné komplikácie. Definovanie prognostických biomarkerov by mohlo pomôcť v odlišení žien s prechodnou infekciou od žien v riziku pre vývin karcinómu.

Cytologické *screeningové* vyšetrenie, ktoré aktuálne prevláda, zachytí ťažké lézie s vysokou špecifitou. Pre nízku citlivosť však veľa ohrozených žien táto metóda nezachytí. V porovnaní s cytologickým *screeningom*, HPV testovanie zachytí takmer všetky rizikové ženy. Nevýhodou tohto typu vyšetrenia je ale jeho nízka špecifita, ktorá by sa dala zvýšiť práve pomocou vhodných biologických markerov. Tekutá (LBC) cytológia, ktorá pomohla vylepšiť kvalitu cytologického vyšetrenia, poskytuje zároveň ideálny materiál na testovanie prítomnosti vírusu HPV.

Je známe, že pretrvávajúca infekcia vírusom HPV je nevyhnutným ale nie postačujúcim faktorom pre rozvoj KKM. Úloha v progresii tohto ochorenia bola popísaná u mnohých faktorov - fajčenie, časté striedanie sexuálnych partnerov, nízky vek pri prvom pohlavnom styku atď.. V posledných rokoch sú intenzívne študované rôzne biologické markery, ktoré by mohli podporovať karcinogézu KM. Partia medzi ne napríklad sexuálne prenosné vírusy a baktérie alebo epigenetické zmeny DNA. Práve tieto markery by mohli slúžiť pre lepšie rozpoznanie rizika vývinu karcinómu u HPV pozitívnych žien.

### 7.1. Kvalita a kvantita DNA

Vzhľadom na veľkosti úsekov DNA potrebných na analýzy vírusov bolo po izolácii potrebné dosiahnuť DNA v kvalite minimálne 300 bp. Tekutá cytológia, z ktorej bola izolovaná testovaná DNA, predstavuje natívny materiál. Takýmto spôsobom konzervácie, na rozdiel od FFPE vzoriek, nie je DNA nijakým spôsobom degradovaná. Kvalita DNA býva preto po izolácii vysoká a nie je nutné vykonávať dodatočné testy.

Pri analýze mikroorganizmov z bezbunkových materiálov sú výnosy izolovanej DNA väčšinou nízky a sú preto spekrofotometricky ťažko stanovované. Meranie koncentrácie skresľovala aj nosičová RNA, ktorá sa používa pre zvýšenie celkového výťažku DNA (alebo RNA). Výsledné koncentrácie izolovanej DNA vírusov boli preto merané iba orientačne. Pri

izolácii DNA na následnú analýzu metylácií boli namerané koncentrácie kľúčové pre riedenie DNA na požadované množstvo potrebné pre reakciu.

## 7.2. Rozbor výsledkov

Ako možné biologické markery boli vybraté najmä mikroorganizmy, u ktorých sa v mnohých štúdiách diskutovala ich možná spoluúčasť na vzniku alebo progresii ťažkých lézií KM. Medzi najviac študované patria niektoré druhy rodiny herpesvírusov alebo baktéria *Chlamydia trachomatis*.

Pre častú infekciu genitálneho traktu je jedným z najviac analyzovaných biomarkerov v súvislosti s KKM herpesvírus CMV. Marinho-Dias a Sousa (2013) zosumarizovali dostupné štúdie, od roku 1980 do 2011, zaoberajúce sa úlohou CMV pri vývoji KKM. Prišli k záveru, že infekcia CMV sa často objavuje v rôznych štádiách karcinogenézy, pričom frekvencia výskytu je u karcinómu *in situ* a u invazívneho karcinómu vyššia ako v normálnych nálezoch. Výskyt infekcie ale neukazoval stúpajúcu tendenciu pri progredujúcich léziách. Vzrastajúca frekvencia preto mohla korelovať s reaktiváciou vírusu. Doteraz teda nebolo objasnené, či je CMV iba oportunistickým patogénom u HPV pozitívnych žien alebo prispieva k HPV asociovanej karcinogenéze. V našej štúdii bol detegovaný iba jeden CMV pozitívny prípad, u pacientky s léziou CIN III spojenou s mikroinváziou, ale taktiež v jednom prípade kontrol.

Jedenkrát bola u pacientok s CIN III potvrdená aj prítomnosť vírusu HHV-6. Chen a kol. (1994) po prvýkrát *in vivo* detegovali prítomnosť tohto vírusu spolu s HPV16 v bunkách CIN a KKM. Broccolo a kol. (2008) neskôr demonštrovali prítomnosť HHV-6 infekcie signifikantne častejšie v ťažkých léziách KM a tým aj možnú spoluprácu na vývoji KKM, avšak najnovšie publikácie tieto tvrdenia zatiaľ nepotvrdili (Amirian a kol. 2013). V kontrolnej skupine prítomnosť HHV-6 potvrdená nebola.

Vzťah herpesvírusu HSV-1 v súvislosti s infekciou buniek KM nebol potvrdený (Lanham a kol. 2001, Zhao a kol. 2012) a je študovaný veľmi málo. V našej štúdii bol potvrdený u jednej pacientky s CIN III a u jednej kontroly. Na rozdiel od HSV-1, je pre častejšiu infekciu genitálnej oblasti venovaná omnoho väčšia pozornosť vírusu HSV-2. Spolu s CMV a baktériou *Chlamydia trachomatis* patrí HSV-2 medzi najštudovanejšie potenciálne kofaktory pri progresii karcinogenézy KM. Asociácia vírusu HSV-2 s KKM bola prvýkrát popisovaná v sedemdesiatych rokoch (Rawls a kol. 1968), ešte pred navrhnutou hypotézou, že tento karcinóm je v kauzálnom vzťahu práve s vírusom HPV. U pacientov s KKM bola v epiteloch preukázaná častejšia prítomnosť HSV-2 DNA a vyšší level protilátok proti tomuto vírusu ako



u kontrolných osôb (Smith a kol. 2002). Tvrdenia štúdií však stále nie sú konzistentné (Lehtinen a kol. 2002, Muñoz a kol. 2006, Zhao a kol. 2012). Cao a kol. (2014) preto urobili metaanalýzu 20 štúdií, ktoré popisujú 3337 žien s KKM. Výsledok ich štúdie nepotvrdil nepriaznivý účinok vírusu HSV-2 na vývoj karcinómu. V našej štúdií prítomnosť HSV-2 nebola potvrdená ani v jednej vzorke. Detegované neboli ani herpesvírusy VZV a HHV-8. V prípade vírusu HHV-8 nebola preukázaná jeho asociácia s KKM (Lanham a kol. 2001, Brasil Cda a kol. 2013) aj napriek skutočnosti, že je tento vírus prenosný pohlavným stykom a je schopný vyvolať nádorové ochorenie. Infekcia VZV študovaná zatiaľ v bunkách KM *in vivo* nebola.

Z herpesvírusov bol najčastejšie detegovaný vírus EBV. Jeho prítomnosť bola potvrdená u 4 pacientok s léziami CIN III. Niekoľko štúdií preukázalo asociáciu EBV pri vývoji KKM. Dokázali prítomnosť značného množstva EBV v HPV pozitívnych CIN léziách. Predpokladali, že EBV nie je iba komenzálnym patogénom prítomným popri infekcii HPV, ale že jeho kooperácia s HPV môže prispievať k indukcii a vývoju karcinogenézy (Santos a kol. 2009, Khenchouche a kol. 2013). Konkrétna úloha EBV v asociácii s KKM však zatiaľ vysvetlená nebola. Pozitívne výsledky pri detegovaní prítomnosti vírusu by teoreticky mohli znamenať iba infekciu prítomnú v stromálnych lymfocytoch (Shoji a kol. 1997). Túto hypotézu potvrdzujú aj nálezy v kontrolnej skupine, kde bol vírus EBV taktiež detegovaný 4-krát.

Ako o možných kofaktoroch pri vývoji KKM sa hovorí aj v súvislosti s polyomavírusmi, ktoré boli nájdené v širokom spektre bunkových typov. Asociáciu BK vírusu s KKM popisuje Comar a kol. (2011). Prítomnosť polyomavírusovej DNA detegovali v 44 % neoplázií vysokého stupňa, z čoho 83 % bolo pozitívnych na vírus BK. Sekvencie vírusu boli pritom najfrekvencovanejšie v léziách vysokého stupňa spolu s prítomnosťou HPV typu 16. Tieto výsledky poukazujú na možnú spoluprácu vírusu BKV s HPV 16 pri bunkovej transformácii. Mohlo by to ale znamenať aj fakt, že podmienky na replikáciu vírusu BK sú lepšie v HPV 16 pozitívnych predrakovinových léziách ako v HPV 16 negatívnych bunkách. Hypotézu možnej koexistencie BKV a HPV, ale nie ich spolupráce, podporuje aj Fraase a kol. (2012). V našej štúdií prítomnosť BKV vo vzorkách detegovaná nebola.

Vírus JC bol detegovaný 4-krát. Jeho spojitosť s KKM nie je intenzívne študovaná a pozornosť sa venuje pacientom s oslabenou imunitou. Pri porovnávaní cervikálnych sterov a vzoriek z KKM bol u HIV pozitívnych žien v karcinómoch zaznamenaný trojnásobne vyšší výskyt vírusu JC ako v steroch. Vo vzorkách HIV negatívnych žien sa významný rozdiel medzi sterami a karcinómami nepotvrdil. Možno teda usudzovať, že JC vírus v kombinácii s HR - HPV infekciou môže ovplyvňovať progresiu karcinogenézy smerom ku KKM iba

u pacientov s oslabenou imunitou (Alosaimi a kol. 2014). V kontrolnej skupine bol vírus JCV detegovaný v jednom prípade.

Najčastejšie, až 5-krát vo vzorkách s CIN III a raz vo vzorke pacientky s mikroinváziou bol detegovaný polyomavírus MCPyV. Prítomnosť tohto vírusu v bunkách KKM bola detegovaná viacerými štúdiami. Žiadna však zatiaľ nestanovila jeho priamu súvislosť s karcinogénou (Imajoh a kol. 2012, Salehi-Vaziri a kol. 2015). V kontrolnej skupine boli MCPyV pozitívne 3 vzorky.

Najintenzívnejšie študovaný marker predstavuje baktéria *Chlamydia trachomatis*. Priama úloha tejto baktérie v karcinogéze KM je popisovaná množstvom štúdií (Koskela a kol. 2000, Arnheim a kol. 2011). Avšak napriek tomu, že epidemiologické štúdie uvádzajú pozitívnu asociáciu CT s HPV asociovanými ťažkými léziami a KKM a *in vitro* štúdie poukazujú na schopnosť CT indukovať genetické poškodenia a neoplastické zmeny, molekulárny mechanizmus potvrdzujúci špecifickú úlohu CT v patogéze doposiaľ nie je známy. Častú prítomnosť CT v bunkách KM je možné vysvetliť celosvetovo vysokou prevalenciou infekcie. V našej štúdii bola infekcia CT u analyzovaných vzoriek potvrdená 4-krát a u kontrolnej skupiny 3-krát.

Jediný marker, u ktorého je potvrdená spojitosť s KKM je epigenetické umlčanie promótorov TSG metyláciou. Hypermetylácia génových promótorov je považovaná za zásadný krok v ranej karcinogéze KKM. Viaceré štúdie sledovali úroveň metylácie génov CADM1, MAL a miR124-2, ktoré bránia nádorovému bujneniu buniek. Výsledky štúdií ukazujú, že stupeň metylácie týchto génov v HR - HPV pozitívnych cervikálnych steroch koreluje so stupňom a dĺžkou trvania infekcie. Metylačnou analýzou je tak detegovaných až 100 % KKM a väčšina prekanceróz závažnosti CIN III (Bierkens a kol. 2013, De Strooper a kol. 2014). V našej štúdii bol pozitívny metylačný status zaznamenaný v 23 prípadoch CIN III, obidvoch prípadoch mikroinvázie a aj pri adenokarcinóme. Epigenetické umlčanie TSG DNA metyláciou v cervikálnych prekancerózach je preto čoraz viac považované za vhodný biomarker pri určovaní závažnosti a progresii ochorenia u HR - HPV pozitívnych pacientok. Práve pre potvrdený vplyv metylácií na progresiu KKM neboli v našej štúdii vykonávané doplňujúce testy na kontrolnej skupine.

Po štatistickom porovnaní výsledkov získaných z analýz oboch testovaných skupín, nebola asociácia s progresiou KKM potvrdená u žiadneho z mikrobiologických markerov.

Vzhľadom na veľmi vysokú prevalenciu väčšiny sledovaných markerov v populácii, je ťažké stanoviť ich kauzálne spojenie so vznikom alebo progresiou karcinómov. Je veľmi pravdepodobné, že sa v testovaných tkanivách nachádzajú iba ako oportunistické patogény a na

chorobu nemajú nijaký vplyv. Prípadne môžu negatívne pôsobiť iba pri imunitnom oslabení organizmu u pacientov s AIDS alebo po transplantáciách orgánov.

Hoci sa v prípade MCPyV nepotvrdil samostatný vplyv na karcinogézu, nie je vylúčené jeho pôsobenie v kombinácii s iným markerom. Boli zaznamenané iba dva prípady koinfekcie dvoch sledovaných markerov (bez prítomnosti pozitívnej metylácie), pričom v oboch bol jedným z markerov MCPyV (MCPyV + CT, MCPyV + JCV).

Podľa očakávania bol vplyv na progresiu karcinogézy potvrdený u metylácií promótorov. Tento marker je už v niektorých krajinách využívaný na vyselektovanie žien v ohrození a je vďaka nemu možné obmedziť množstvo žien, odoslaných na ďalšie vyšetrenia. Podľa zisteného metylačného statusu by bolo z našich vzoriek vyradených 48 % pacientiek. Viac ako polovica z nich by však bola označená za rizikové, pričom je takmer vylúčené, aby sa u všetkých týchto žien v budúcnosti vyvinul karcinóm. Dokázaná prítomnosť metylácií TSG génov *CADMI*, *MAL* a *miR124-2* teda dokáže signifikantne znížiť množstvo žien v možnom riziku, ale iba do istej miery. Aberantná DNA metylácia bola nedávno dokázaná aj pri génoch *DLX4* a *SIMI* v asociácii s nálezom lézií nižšieho stupňa (Sakane a kol. 2015). Je teda pravdepodobné, že pri rôznych stupňoch závažnosti lézie sú viac metylované rozličné gény. Možnosťou dôkladnejšej selekcie žien v ohrození by teda mohlo byť objavenie ďalších génov, ktorých metylácia by bola pre ťažké lézie charakteristickejšia. Medzi najnovšie študované perspektívne gény s citlivosťou pre ťažké lézie patrí gén *FAM19A4* (De Strooper a kol. 2014).

V minimálne 9 prípadoch bol okrem metylácie prítomný aj iný sledovaný marker. Nie je teda vylúčené, že špecificita metylácií by sa dala, podľa získaných výsledkov, zvýšiť kombináciou s analýzou sledovaných mikroorganizmov. V dvoch prípadoch lézií CIN III a v jednom prípade mikroinvázie bola s metyláciou zároveň potvrdená aj prítomnosť dvoch ďalších markerov (MCPyV + CMV, JCV + HSV-1 a CT + EBV). V 6 vzorkách bol popri metylácii detegovaný jeden marker (EBV, 2 x JCV, 2 x MCPyV a HHV-6) a v troch ďalších bol detegovaný marker (EBV, CT a MCPyV), pričom metylačný status nebolo možné dokázať.

Rozdiely medzi našimi výsledkami v porovnaní s inými štúdiami, ktoré potvrdzujú asociáciu jednotlivých faktorov so vznikom a / alebo progresiou KKM, môžu byť spôsobené predovšetkým v odlišnom študovanom materiáli. Vo väčšine štúdií boli na analýzu využívané biopsiou odobraté tkanivá KM s léziami alebo priamo s karcinómom. Naše vzorky pochádzali z povrchového steru KM, preto nebolo možné zachytiť prípadnú infekciu v hlbších častiach epitelu. Nie je preto vylúčené, že sledované markery negatívne ovplyvňujú bunky KM bližšie k bazálnej membráne a nie je ich vždy možné detegovať cytologickými stermi.

Keďže cieľom našej práce bolo nájsť marker, ktorý by mohol zvýšiť špecificitu HPV testovania vykonávaného práve z cytologických sterov, je nevyhnutné, aby sa vybraný marker nachádzal v povrchovej vrstve epitelu. Výskyt markeru v bunkách nezískateľných sterom je preto pre účely pravidelného preventívneho *screeningu* bezpredmetný.

## 8. Súhrn

- Pomocou rôznych molekulárno-biologických metód boli v cytologických vzorkách krčka maternice od 51 pacientok s predrakovinovými léziami stupňa CIN III+ detegované: 1-krát vírusy CMV, HSV-1 a HHV-6, 4-krát vírusy EBV, JCV a baktéria *Chlamydia trachomatis*, 6-krát vírus MCPyV a 26-krát metylované promótoory tumorsupresorových génov *CADMI*, *MAL* a *miR124-2*. Ani v jednom prípade neboli detegované vírusy HSV-2, HHV-8, VZV a BKV.
- Pre markery, ktorých prítomnosť bola vo vzorkách potvrdená, boli vykonané testy na kontrolnej HPV negatívnej skupine 51 žien. Bola detegovaná prítomnosť: 1-krát CMV a JCV, 3-krát *Chlamydia trachomatis* a 4-krát vírus EBV. Vírusy HSV-1 a HHV-6 u kontrolnej skupiny detegované neboli.
- Po porovnaní analyzovanej skupiny s kontrolnou skupinou pomocou Fisherovho testu nebola preukázaná asociácia týchto markerov s progresiou predrakovinových zmien krčka maternice. Kontrolné testovanie nebolo vykonané v prípade metylácií, keďže tento marker je mnohými štúdiami overený a v praxi používaný ako komerčný test, používaný pre účel ohodnotenia pretrvávajúceho transformačného pôsobenia vírusu HPV na bunku.
- Detekcia metylácie analyzovaných TSG dokáže vyselektovať pacietky v riziku iba do určitej miery. Stále to nie je postačujúci marker, ktorý by dokázal zvýšiť špecificitu HPV testovania na potrebnú úroveň.
- Sledované mikroorganizmy podľa získaných výsledkov nie sú samostatne vhodné ako markery, ktoré by zvýšili špecificitu HPV testovania. Nie je ale vylúčené ich využitie v kombinovanej detekcii infekcie alebo v kombinácii s analýzou metylačného statusu.

## 9. Literatura

1. Abend, J.R., Jiang, M., Imperiale, M.J. (2009): BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol* **19**: 252-60.
2. Ahsan, N., Shah, K.V. (2006): Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol* **577**: 1-18
3. Al-Daraji, W.I., Smith, J.H. (2009): Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *Int J Clin Exp Pathol* **2**: 48-64.
4. Alosaimi, B., Hampson, L., He, X., Maranga, I.O., Oliver, A.W., Hampson, I.N. (2014): Increased prevalence of JC polyomavirus in cervical carcinomas from women infected with HIV. *J Med Virol* **86**: 672-7.
5. Amirian, E.S., Adler-Storthz, K., Scheurer, M.E. (2013): Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Lett* **336**: 18-23.
6. Apgar, B.S., Zoschnick, L., Wright, T.C. Jr. (2003): The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician* **68**: 1992-8.
7. Appleby, P., Beral, V., Berrington de González, A., Colin, D., Franceschi, S., Goodill, A., Green, J., Peto, J., Plummer, M., Sweetland, S. (2006): Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* **118**: 1481-95.
8. Arena, S., Marconi, M., Ubertosi, M., Frega, A., Arena, G., Villani, C. (2002): HPV and pregnancy: diagnostic methods, transmission and evolution. *Minerva Ginecol* **54**: 225-37.
9. Arnheim Dahlström, L., Andersson, K., Luostarinen, T., Thoresen, S., Ögmundsdóttir, H., Tryggvadóttir, L., Wiklund, F., Skare, G.B., Eklund, C., Sjölin, K., Jellum, E., Koskela, P., Wadell, G., Lehtinen, M., Dillner, J. (2011): Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus and other risk factors in cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**: 2541-50.
10. Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowsert, L.M., Olson, C., Brown, J.C. (1991): Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* **60**: 1445-56.
11. Bekkers, R.L., Massuger, L.F., Bulten, J., Melchers, W.J. (2004): Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* **14**: 95-105.
12. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):35-56.
13. Bierkens, M., Hesselink, A.T., Meijer, C.J., Heideman, D.A., Wisman, G.B., van der Zee, A.G., Snijders, P.J., Steenbergen, R.D. (2013): CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int J Cancer* **133**: 1293-9.
14. Bouvard, V., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Straif, K. (2012): WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, 2012. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol* **13**: 339-340.
15. Brasil Cda, M., Ribeiro, C.M., Leão, J.C. (2013): Oral and genital human herpesvirus 8 and human papillomavirus in heterosexual partners. *J Oral Pathol Med* **42**: 61-5.

16. Braun, D.K., Dominguez, G., Pellett, P.E. (1997): Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* **10**: 521-67.
17. Brink, A.A., Snijders, P.J., Meijer, C.J. (2007): HPV detection methods. *Dis Markers* **23**: 273-81.
18. Brinton, L.A., Hamman, R.F., Huggins, G.R., Lehman, H.F., Levine, R.S., Mallin, K., Fraumeni, J.F. Jr. (1987): Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **7**: 23-30.
19. Broccolo, F., Cassina, G., Chiari, S., Garcia-Parra, R., Villa, A., Leone, B.E., Brenna, A., Locatelli, G., Mangioni, C., Cocuzza, C.E. (2008): Frequency and clinical significance of human beta-herpesviruses in cervical samples from Italian women. *J Med Virol* **80**: 147-53.
20. Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J., Clifford, G. (2013): A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* **445**: 224-31
21. Cao, S., Gan, Y., Dong, X., Lu, Z. (2014): Herpes simplex virus type 2 and the risk of cervical cancer: a meta-analysis of observational studies. *Arch Gynecol Obstet* **290**: 1059-66.
22. Comar, M., Bonifacio, D., Zanconati, F., Di Napoli, M., Isidoro, E., Martini, F., Torelli, L., Tognon, M. (2011): High prevalence of BK polyomavirus sequences in human papillomavirus-16-positive precancerous cervical lesions. *J Med Virol* **83**: 1770-6.
23. Cubie, H.A. (2013): Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* **445**:21-34.
24. Cukuranovic, J., Ugrenovic, S., Jovanovic, I., Visnjic, M., Stefanovic, V. (2012): Viral infection in renal transplant recipients. *ScientificWorldJournal*: 820621.
25. Cuzick, J., Clavel, C., Petry, K.U., Meijer, C.J., Hoyer, H., Ratnam, S., Szarewski, A., Birembaut, P., Kulasingam, S., Sasieni, P., Iftner, T. (2006): Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* **119**: 1095-101.
26. Dalianis, T., Hirsch, H.H. (2013): Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* **437**: 63-72.
27. De Strooper, L.M., Meijer, C.J., Berkhof, J., Hesselink, A.T., Snijders, P.J., Steenbergen, R.D., Heideman, D.A. (2014): Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev Res (Phila)* **7**: 1251-7.
28. De Strooper, L.M., van Zummeren, M., Steenbergen, R.D., Bleeker, M.C., Hesselink, A.T., Wisman, G.B., Snijders, P.J., Heideman, D.A., Meijer, C.J. (2014): CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J Clin Pathol* **67**: 1067-71
29. De Villiers, E.M. (2013): Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* **445**: 2-10.
30. Delbue, S., Ferrante, P., Provenzano, M. (2014): Polyomavirus BK and prostate cancer: an unworthy scientific effort? *Oncoscience* **1**: 296-303.
31. Deng, W., Jin, G., Lin, B.Y., Van Tine, B.A., Broker, T.R., Chow, L.T. (2003): mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol* **77**: 10213-26.

32. Dimmock, N.J., Easton, A.J., Leppard, K.N. (2007): Introduction to modern virology, 6th edition. Blackwell Publishing LTD, UK
33. Dochez, C., Bogers, J.J., Verhelst, R., Rees, H. (2014): HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine* **32**: 1595-601.
34. Doorbar, J. (2013): The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* **445**: 80-98.
35. Dugué, P.A., Rebolj, M., Garred, P., Lynge, E. (2013): Immunosuppression and risk of cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **13**: 29-42.
36. Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S. (2008): Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**: 1096-100.
37. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2012) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *online*. Dostupné na <http://globocan.iarc.fr>
38. Forman, D., de Martel, C., Lacey, C.J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Plummer, M., Franceschi, S. (2012): Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* **20**: 12-23.
39. Fraase, K., Hart, J., Wu, H., Pang, X., Ma, L., Grant, F., Li, A., Lennon, A., Hu, P.C., Dong, J. (2012): BK virus as a potential co-factor for HPV in the development of cervical neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* **42**: 130-4.
40. Fredericks, D.N., Relman, D.A. (1996): Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* **9**: 18-33.
41. Gjoerup, O., Chang, Y. (2010): Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv Cancer Res* **106**: 1-51.
42. Gulley, M.L., Tang, W. (2008): Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn.* 2008 Jul;**10**: 279-92
43. Hagmar, B., Johansson, B., Kalantari, M., Petersson, Z., Skyldberg, B., Walaas, L. (1992): The incidence of HPV in a Swedish series of invasive cervical carcinoma. *Med Oncol Tumor Pharmacother* **9**: 113-7.
44. Heggie, A.D., Wentz, W.B., Sorensen, K., Anthony, D.D. (1990): Induction of cervical neoplasia in the mouse by an extract of cells infected by varicella-zoster virus. *J Gen Virol* **71**: 2175-8.
45. Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M.R., McLaughlin-Drubin, M.E., Münger, K., Feldman, S., McKeon, F.D., Xian, W., Crum, C.P. (2012): A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 10516-21.
46. Herrmann B. (2007) A new genetic variant of Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* **83**: 253-4.
47. Chen, M., Wang, H., Woodworth, C.D., Lusso, P., Berneman, Z., Kingma, D., Delgado, G., DiPaolo, J.A. (1994): Detection of human herpesvirus 6 and human papillomavirus 16 in cervical carcinoma. *Am J Pathol* **145**: 1509-16.



48. Chenet-Monte, C., Mohammad, F., Celluzzi, C.M., Schaffer, P.A., Farber, F.E. (1986): Herpes simplex virus gene products involved in the induction of chromosomal aberrations. *Virus Res* **6**: 245-60.
49. Chow, L.T., Broker, T.R. (2006). Citované podľa Laco, J. (2012): Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Galén, Praha.
50. Chow, L.T., Broker, T.R., Steinberg, B.M. (2010). Citované podľa Laco, J. (2012): Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Galén, Praha.
51. Imajoh, M., Hashida, Y., Nemoto, Y., Oguri, H., Maeda, N., Furihata, M., Fukaya, T., Daibata, M. (2012): Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients. *Virol J* **9**: 154.
52. International Agency for Research on Cancer 2012. A review of human carcinogens. Biological agents. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 100 B. International Agency for Research on Cancer, Geneva, Switzerland.
53. Javier, R.T, Butel, J.S. (2008): The history of tumor virology. *Cancer Res* **68**: 7693-706.
54. Kashanchi, F., Araujo, J., Doniger, J., Muralidhar, S., Hoch, R., Khleif, S., Mendelson, E., Thompson, J., Azumi, N., Brady, J.N., Luppi, M., Torelli, G., Rosenthal, L.J. (1997): Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* **14**: 359-67.
55. Khenchouche, A., Sadouki, N., Boudriche, A., Houali, K., Graba, A., Ooka, T., Bouguermouh, A. (2013): Human papillomavirus and Epstein-Barr virus co-infection in cervical carcinoma in Algerian women. *Virol J* **19**: 340.
56. Kinkorová Luňáčková, I. (2013): Nové možnosti ve screeningu karcinomu děložního hrdla (ThinPrep Pap test). *Prakt Gyn* **17**: 157 - 160
57. Klein, G., DiMaio, D. (2006). Citované podľa Laco, J. (2012): Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Galén, Praha.
58. Knipe, D.M., Howley, P. (2001): Fields. Virology (fourth edition). Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia.
59. Koskela, P., Anttila, T., Bjørge, T., Brunsvig, A., Dillner, J., Hakama, M., Hakulinen, T., Jellum, E., Lehtinen, M., Lenner, P., Luostarinen, T., Pukkala, E., Saikku, P., Thoresen, S., Youngman, L., Paavonen, J. (2000): Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* **85**: 35-9.
60. La Vecchia, C., Boccia, S. (2014): Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cancer. *Eur J Cancer Prev* **23**: 110-2.
61. Laco, J. (2012): Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Galén, Praha.
62. Lanham, S., Herbert, A., Basarab, A., Watt, P. (2001): Detection of cervical infections in colposcopy clinic patients. *J Clin Microbiol* **39**: 2946-50.
63. Lehtinen, M., Koskela, P., Jellum, E., Bloigu, A., Anttila, T., Hallmans, G., Luukkaala, T., Thoresen, S., Youngman, L., Dillner, J., Hakama, M. (2002): Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am J Epidemiol* **156**: 687-92.

64. Lie, A.K, Kristensen, G. (2008): Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* **8**: 405-15.
65. Louie, K.S., de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Herrero, R., Meijer, C.J., Shah, K., Franceschi, S., Muñoz, N., Bosch, F.X. (2009): International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer* **100**: 1191-7.
66. Maginnis, M.S., Atwood, W.J. (2009): JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Semin Cancer Biol* **19**: 261-9.
67. Magnusson, P.K., Lichtenstein, P., Gyllensten, U.B. (2000): Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer* **88**: 698-701.
68. Májek, O., Dvořák, V., Dušek, L., Mužík, J., Šnajdrová, L., Gregor, J. Cervix.cz . (2015): Program cervikálního screeningu v České republice. *online*. Dostupné na <http://www.cervix.cz>
69. Marinho-Dias, J., Sousa, H. (2013): Cytomegalovirus infection and cervical cancer: from past doubts to present questions. *Acta Med Port* **26**: 154-60
70. Martini, F., Iaccheri, L., Martinelli, M., Martinello, R., Grandi, E., Mollica, G., Tognon, M. (2004): Papilloma and polyoma DNA tumor virus sequences in female genital tumors. *Cancer Invest* **22**: 697-705.
71. Matoušková, M., Hanuš, M.. (2009): Chlamydia trachomatis – postrach urologické ambulance ? *Urol. praxi* **10**: 60–64.
72. Mayrand, M.H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., Walter, S.D., Hanley, J., Ferenczy, A., Ratnam, S., Coutlée, F., Franco, E.L. (2007): Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study Group. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. **357**: 1579-88.
73. McCann, M.F., Irwin, D.E., Walton, L.A., Hulka, B.S., Morton, J.L., Axelrad, C.M. (1992): Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1**: 125-9.
74. Moodley, J.R., Hoffman, M., Carrara, H., Allan, B.R., Cooper, D.D., Rosenberg, L., Denny, L.E., Shapiro, S., Williamson, A.L. (2006): HIV and pre-neoplastic and neoplastic lesions of the cervix in South Africa: a case-control study. *BMC Cancer* **6**: 135.
75. Moody, C.A., Laimins, L.A. (2010): Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**: 550-60.
76. Muñoz, N., Bosch, F.X., Castellsagué, X., Díaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K.V., Meijer, C.J. (2004): Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* **111**: 278-85.
77. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A.B., Gissmann, L. (2006): Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **3**: 3/1-10.
78. Muñoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J.S., Shah, K.V., Meijer, C.J., Bosch, F.X. (2002): International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**: 1093-101.

79. Pan, L., Milligan, L., Michaeli, J., Cesarman, E., Knowles, D.M. (2001): Polymerase chain reaction detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-optimized protocols and their application to myeloma. *J Mol Diagn* **3**: 32-8.
80. Pedroza-Saavedra, A., Plett-Torres, T., Chihu-Amparán, L., Maldonado-Gama, M. González-Jaimes, A.M., Esquivel-Guadarrama, F., Gutiérrez-Xicotencatl, L. (2011): Molecular Bases of Human Papillomavirus Pathogenesis in the Development of Cervical Cancer. *In*: Vanden Broeck, D. (ed.) (2011): Human Papillomavirus and Related Diseases – From Bench to Bedside – Research Aspects. InTech, Rijeka: 249-90
81. Phillips, D.H., Ni Shé, M. (1993): Smoking-related DNA adducts in human cervical biopsies. *IARC Sci Publ.* **1**: 327-30.
82. Phillips, T. (2008): The role of methylation in gene expression. *Nature Education* **1**: 116
83. Pim, D., Banks, L. (2010) Citované podľa Laco, J. (2012): Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu. Galén, Praha.
84. Rawls, W.E., Tompkins, W.A., Figueroa, M.E., Melnick, J.L. (1968): Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science* **161**: 1255-6.
85. Richart, R.M. (1967). Citované podľa Freitag, P. (1998): *Papillomaviry: papillomavirové infekce v gynekologii*. Triton, Praha.
86. Richart, R.M. (1990): A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* **75**: 131-3.
87. Ripa, T., Nilsson, P. (2006). Citované podľa Herrmann B. (2007) A new genetic variant of Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* **83**: 253-4.
88. Robertson, K.D. (2005): DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* **6**: 597-610.
89. Rodig, S.J., Cheng, J., Wardzala, J., DoRosario, A., Scanlon, J.J., Laga, A.C., Martinez-Fernandez, A., Barletta, J.A., Bellizzi, A.M., Sadasivam, S., Holloway, D.T., Cooper, D.J., Kupper, T.S., Wang, L.C., DeCaprio, J.A. (2012): Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* **122**: 4645-53.
90. Sakane, J., Taniyama, K., Miyamoto, K., Saito, A., Kuraoka, K., Nishimura, T., Sentani, K., Oue, N., Yasui, W. (2015): Aberrant DNA methylation of DLX4 and SIM1 is a predictive marker for disease progression of uterine cervical low-grade squamous intraepitheliallesion. *Diagn Cytopathol*
91. Salehi-Vaziri, M., Sadeghi, F., Alamsi-Hashiani, A., Haeri, H., Monavari, S.H., Keyvani, H. (2015): Merkel cell polyomavirus and human papillomavirus infections in cervical disease in Iranian women. *Arch Virol* **160**: 1181-7.
92. Santos, N.B., Villanova, F.E., Andrade, P.M., Ribalta, J., Focchi, J., Otsuka, A.Y., Dale Silva, I. (2009): Epstein-Barr virus detection in invasive and pre-invasive lesions of the uterine cervix. *Oncol Rep* **21**: 403-5.
93. Shoji, Y., Saegusa, M., Takano, Y., Hashimura, M., Okayasu, I. (1997): Detection of the Epstein-Barr virus genome in cervical neoplasia is closely related to the degree of infiltrating lymphoid cells: a polymerase chain reaction and in situ hybridization approach. *Pathol Int* **47**: 507-11.
94. Schneider, V., Kay, S., Lee, H.M. (1983): Immunosuppression as a high-risk factor in the development of condyloma acuminatum and squamous neoplasia of the cervix. *Acta Cytol* **27**: 220-4.

95. Siguier, M., Sellier, P., Bergmann, J.F. (2012): BK-virus infections: a literature review. *Med Mal Infect* **42**: 181-7.
96. Silva, J., Cerqueira, F., Medeiros, R. (2014): Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* **289**: 715-23.
97. Smith, J.S., Herrero, R., Bosetti, C., Muñoz, N., Bosch, F.X., Eluf-Neto, J., Castellsagué, X., Meijer, C.J., Van den Brule, A.J., Franceschi, S., Ashley, R. (2002): Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1604-13.
98. Spurgeon, M.E., Lambert, P.F. (2013): Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology* **435**: 118-30.
99. Steenbergen, R.D., Snijders, P.J., Heideman, D.A., Meijer, C.J. (2014): Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer* **14**: 395-405.
100. Steger, G., Corbach, S. (1997): Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* **71**: 50- 8
101. Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I.M., Matlashewski, G., Banks, L. (1998): Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**: 229-34.
102. Strauss, S., Sastry, P., Sonnex, C., Edwards, S., Gray, J. (2002): Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm Infect* **78**:135-8
103. Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T., Laimins, L.A. (2000): The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* **74**: 1178-86.
104. Syrjänen, S. (2010): Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* **118**: 494-509.
105. Szarewski, A., Ambroisine, L., Cadman, L., Austin, J., Ho, L., Terry, G., Liddle, S., Dina, R., McCarthy, J., Buckley, H., Bergeron, C., Soutter, P., Lyons, D., Cuzick, J. (2008): Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**: 3033-42.
106. Šteiner, P. (2011): Molekulárně genetická charakterizace vzácných nádorů urogenitálního traktu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha
107. Tachezy, R., Smahelova, J., Kaspirkova, J., Salakova, M. (2013): Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One* **8**: e79156.
108. Tieben, L.M., ter Schegget, J., Minnaar, R.P., Bouwes Bavinck, J.N., Berkhout, R.J., Vermeer, B.J., Jebbink, M.F., Smits, H.L. (1993): Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods* **42**: 265-79.
109. Traut, H.F., Papanicolaou, G.N. (1943): Cancer of the uterus: The vaginal smear in its diagnosis. *Cal West Med* **59**: 121–122.
110. Trottier, H., Franco, E.L. (2006): The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* **30**: 1-15.
111. Van den Brule, A.J., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L.M., Meijer, C.J., Snijders, P.J. (2002): GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**: 779-87.

112. Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kissel'jov, F., Dürst, M., Schneider, A., von Knebel Doeberitz, M. (2008): Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* **68**: 307-13.
113. Vojtaššák, J., Sadvský, O. (2010): Etiopatogenéza rakoviny krčka maternice. *Onkológia* **5**: 278–281
114. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Muñoz, N. (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**: 12-9.
115. Whitley, R.J. (1996): Herpesviruses. In: Baron, S. (ed.): Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
116. Woodman, C.B., Collins, S.I., Young, L.S. (2007): The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* **7**: 11-22.
117. Zhai, Y., Hotary, K.B., Nan, B., Bosch, F.X., Muñoz, N., Weiss, S.J., Cho, K.R. (2005): Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer Res* **65**: 6543-50
118. Zhao, Y., Cao, X., Zheng, Y., Tang, J., Cai, W., Wang, H., Gao, Y., Wang, Y. (2012): Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. *J Med Virol* **84**: 1920-7.
119. Zur Hausen, H., de Villiers, EM. (1994): Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* **48**: 427-47.