

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd



Diplomová práce

**ÚLOHA LIDSKÝCH PAPILOMAVIRŮ  
V ETIOPATOGENEZI ZHOUBNÝCH NÁDORŮ  
SINONASÁLNÍ KRAJINY**

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: Doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D.

2015

Bc. KATEŘINA SIEGLOVÁ

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Dne 12. 4. 2015

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat především konzultantovi Doc. MUDr. Janu Lacovi, Ph.D. za odborné vedení ve vypracování diplomové práce a grantové zastřešení, garantovi práce Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. a RNDr. Haně Vošmikové za trpělivou edukaci a vedení v oblasti molekulárně biologických metod. Dále také všem pracovníkům Fingerlandova ústavu patologie LFUK a FN Hradec Králové pod vedením prof. MUDr. Aleše Ryšky, Ph.D. za umožnění uskutečnění činností spojených s vypracováním diplomové práce.

Neméně bych také chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu a trpělivost při zpracovávání diplomové práce.

## Obsah

Prohlášení .....	2
Poděkování .....	3
Obsah .....	3
Abstrakt.....	5
Úvod .....	7
Zadání diplomové práce – cíl práce.....	8
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
1.1.  Anatomicko-histologicko-patologická část .....	9
1.1.1.  Anatomická a histologická stavba sinonasální krajiny .....	9
1.1.2.  Buněčný cyklus a jeho regulace .....	11
1.1.3.  Nádorová transformace.....	14
1.2.  Papilomaviry .....	22
1.2.1.  Taxonomie .....	22
1.2.2.  Struktura virionu .....	23
1.2.3.  Životní cyklus .....	23
1.2.4.  Mechanismus působení jako onkogen .....	27
1.3.  Preanalytické a analytické aspekty detekce HPV .....	30
1.3.1.  Preanalytická část.....	30
1.3.2.  Metody detekce.....	32
1.3.3.  Kontrola kvality.....	41
2. PRAKTICKÁ ČÁST .....	44
2.1.  Tvorba databáze (získání FFPET, struktura informací) .....	44
2.2.  Základní barvení Hematoxylinem-eosinem.....	45
2.3.  Imunohistochemické stanovení p16 .....	46
2.4.  In situ hybridizace .....	47
2.4.1.  Detekce DNA .....	47

2.4.2.	Detekce RNA .....	49
2.5.	Izolace DNA/RNA.....	51
2.6.	EIA.....	53
2.7.	Typizace HPV .....	55
2.8.	Beta globin .....	58
2.9.	mRNA .....	60
2.10.	Statistické zpracování dat.....	62
3.	Výsledková část .....	63
3.1.	p16 IHC.....	63
3.2.	DNA ISH .....	63
3.3.	EIA.....	64
3.4.	DNA typizace .....	65
3.5.	β globin DNA.....	67
3.6.	β globin RNA.....	73
3.7.	RNA E6 protein .....	75
3.8.	RNA ISH .....	75
3.9.	Srovnání metod.....	79
3.10.	Výsledky klinické části studie.....	85
	Diskuze .....	87
	Závěr.....	91
	Zkratky .....	92
	Literatura.....	95
	Přílohy.....	105

## Abstrakt

Cílem této diplomové práce je komparace imunohistochemických a molekulárně biologických metod pro detekci lidských papilomavirů (HPV) v nádorové tkáni s jejich následným využitím při studiu úlohy HPV v etiopatogenezi zhoubných nádorů sinonasální krajiny.

Z množství metod používaných k detekci lidských papilomavirů byla vybrána in situ hybridizace, imunohistochemická detekce exprese proteinu p16<sup>INK4a</sup>, klasická polymerázová řetězová reakce v kombinaci se dvěma detekčními metodami a to enzymoimunoanalýzou a reverzní hybridizací, dále pak polymerázová řetězová reakce v reálném čase a reverzní transkripce.

Při porovnání všech metod užitých k detekci HPV byla zjištěna velice dobrá shoda, kde všechny prováděné metody vykazovali statisticky významnou shodu s hladinou významnosti  $p < 0,0001$  (p16, DNA in situ hybridizace, RNA in situ hybridizace, kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR) mRNA) až na metodu detekce p16 vs. DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), kde hladina významnosti dosáhla  $p = 0,004$  v celém souboru, respektive  $p = 0,002$  v souboru dlaždicobuněčného karcinomu (DK). Korelační koeficient mezi metodou detekce exprese p16 a celkovým HPV statusem činí v celém souboru 0,659 a v souboru DK 0,864; což značí významnou lineární závislost mezi oběma sledovanými vyšetřeními.

Lze tedy k detekci HPV s výhodou využít detekci p16 imunohistochemicky v kombinaci s detekcí mRNA pomocí RT-qPCR, jež poskytne informaci jak o vlivu HPV na buněčný cyklus, tak i o jeho transkripční aktivitě a typu.

Výše zmíněnými metodami bylo dokázáno, že 24,7 % (18/73) karcinomů sinonasální krajiny vykazuje HPV pozitivitu bez ohledu na diagnostickou jednotku. Ve skupině dlaždicobuněčných karcinomů je to 35,7 % (17/49).

Dle klinické části naší studie mají pacienti s p16 pozitivním DK medián přežití 71 měsíců oproti 16 měsíců u pacientů s p16-negativním DK. Medián přežití pacientů s HPV-pozitivním DK byl 30 měsíců oproti 14 měsícům u pacientů s HPV-negativním DK.

## Abstract

The aim of this thesis is the comparison of immunohistochemical and molecular biological methods for the detection of human papillomavirus (HPV) in tumour tissue and their subsequent use in the study of HPV role in the etiopathogenesis of malignant tumors of sinonasal region.

Several methods for the purpose of HPV detection were applied: in situ hybridization, immunohistochemical detection of expression of p16INK4a protein, classic polymerase chain reaction combined with two different enzyme immunoassay detection methods, and reverse hybridization, followed by polymerase chain reaction with real time reverse transcription.

All methods (p16 DNA in situ hybridization, RNA in situ hybridization, quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription - RT-qPCR mRNA) used for the detection of HPV performed very well when compared, showing concordance with statistical significance  $p < 0,0001$ . Detection of p16 vs. DNA polymerase chain reaction (PCR) had correlation coefficient  $p = 0.004$  in the whole group, and  $p = 0.002$  in the subgroup of squamous cell carcinoma (SCC). Correlation coefficient between detection of p16 and overall HPV status was 0,659 for entire set and 0,864 for set of SCC, indicating significant linear dependence.

Immunohistochemical detection of p16 in combination with the detection of mRNA by RT-qPCR can be used with advantage for HPV testing. These methods provide information about HPV type, transcription activity and HPV interaction with cell cycle.

The above-mentioned methods demonstrated that 24.7% (18/73) of carcinomas in sinonasal region showed HPV association regardless of their histological subtype. The group of SCC showed association with HPV infection in 35.7% (17/49).

According to the clinical part of our study, median survival of the subgroup diagnosed with SCC differed depending on HPV status of the carcinomas: when evaluated by p16 expression, the cohort with p16-positive SCC showed median survival 71 months compared to 27 months in the group with p16- negative SCC. Similarly the HPV-positivity evaluation showed prolonged median survival in patient with HPV-positive SCC (30 months) compared to those with HPV-negative SCC (14 months).

## Úvod

Papilomaviry představují významný rizikový faktor vzniku dlaždicobuněčných karcinomů různé lokalizace, přičemž mezi nejzásadnější a vědecky podložené náleží anogenitální trakt (karcinom děložního čípku) a oblast hlavy a krku (karcinom patrové mandle a kořene jazyka).

I přes intenzivní výzkum jsou stále karcinomy hlavy a krku řešeny rozsáhlými invazivními chirurgickými zásahy s následnou aktinoterapií. V poslední době se objevují pokusy o adjuvantní chemoterapii využívající chemoterapeutika či cílenou biologickou léčbu.

Dlaždicobuněčné karcinomy etiopatogeneticky spjaté s vysoce rizikovými lidskými papilomaviry se odlišují svým biologickým chováním a prognózou, na čemž by mohla být postavena a v blízké době snad i vyvinuta účinná kurativní léčba.

Neméně důležitý je i výzkum a celoplošné zavedení spolehlivých metod pro detekci lidských papilomavirů, které budou schopné zachytit i to nejmenší množství viru s možností typizace a určení jeho aktivity.

Tato práce by měla přinést informace o srovnání různých dostupných metod v detekci lidských papilomavirů u karcinomů dutiny nosní jak komerčně dostupných a validovaných, tak i metod používaných pouze výzkumně s vlastní potřebou validace. Mimo jiné by výsledky srovnávaných metod měly sloužit k průkazu etiopatogeneze těchto virů u karcinomů sinonasálního traktu.



## **Zadání diplomové práce – cíl práce**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Kateřina Siegllová

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: Doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D.

Název diplomové práce: Úloha lidských papilomavirů v etiopatogenezi zhoubných nádorů sinonasální krajiny

### **Cíle práce:**

Komparace imunohistochemických a molekulárně biologických metod pro detekci lidských papilomavirů (HPV) v nádorové tkáni.

Potvrzení či vyvrácení významu HPV při vzniku karcinomů sinonasální krajiny.

Zjištění procentuálního zastoupení HPV positivity u dlaždicobuněčných karcinomů sinonasální krajiny.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Anatomicko-histologicko-patologická část

### 1.1.1. Anatomická a histologická stavba sinonasální krajiny

Abychom mohli detailně pochopit problematiku zhoubných nádorů sinonasální krajiny, musíme ozřejmit její fyziologicko-histologický obraz. Řadíme sem jak samotnou dutinu nosní, tak vedlejší dutiny nosní, které jsou první částí respiračního traktu. Jejich hlavní funkcí je upravovat vdechovaný vzduch, zejména zbavovat vzduch nečistot a prohřívát ho.

Oporou zevního nosu jsou kosti nosní (*ossa nasalis*) spolu s hyalinními chrupavkami nosními (*cartilagine nasí*), ke kterým patří *cartilago nasi lateralis*, *cartilago septi nasi*, *cartilago alaris major* a *minores*, *cartilagine nasales accessoriae* a *cartilago vomeronasalis*. Kůže kryjící nosní hrot a křídla je pevněji fixována k perichondriu chrupavek. V kůži a podkožním vazivu se nacházejí četné mazové žlázy, svalová vlákna, cévy a nervy.

Dutina nosní je vymezena kraniálně kostí čichovou, laterálně kostí klínovou a patrovou, kaudálně tvrdým patrem.

#### 1.1.1.1. *Vestibulum nasi*

*Vestibulum nasi* je rozšířená část krytá kůží, která sahá od nozder po okraj *cartilago alaris major*. U vchodu nalézáme chlupy (*vibrissae*), které slouží jako první „filtr“ vzduchu. Vestibulum vystýlá vrstevnatý dlaždicobuněčný epitel rohovějící, který přechází ve vrstevnatý dlaždicobuněčný epitel nerohovějící [1]. Ve sliznici nalézáme četné vlasové folikuly, potní a mazové žlázy. Kraniálně při vstupu do dutiny nosní přechází vrstevnatý dlaždicobuněčný nerohovějící epitel v epitel vícevrstevný cylindrický [2]. Toto místo se nazývá skvamo-kolumnární junkce [3].

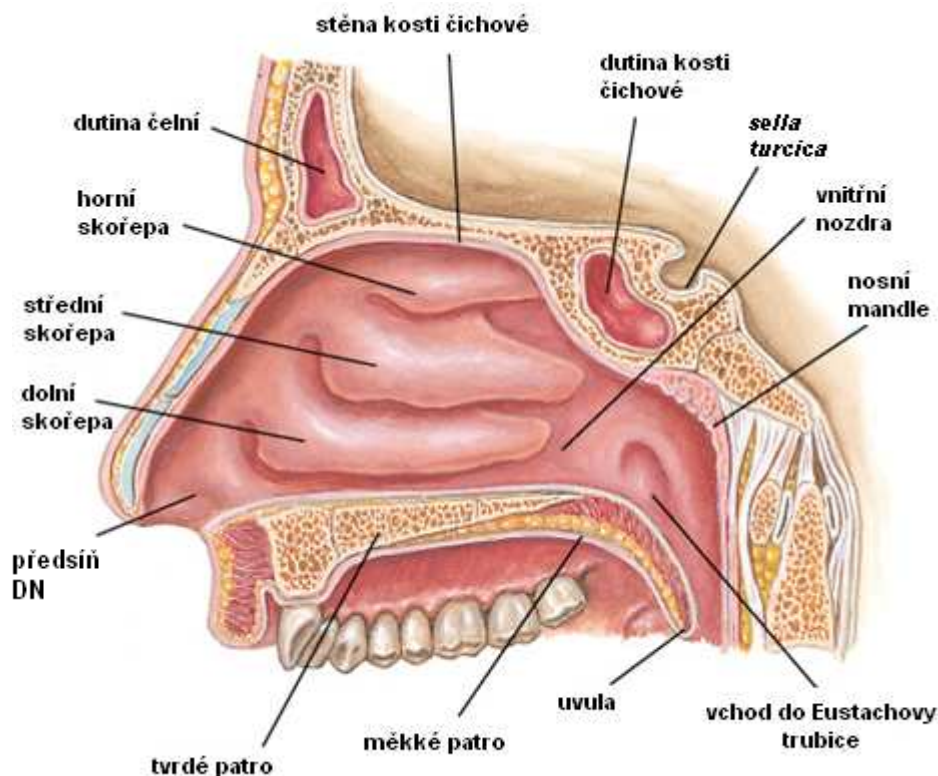
#### 1.1.1.2. *Cavum nasi*

*Cavum nasi* je chrupavčitém a kostěným septem (*septum nasi*) rozdělena na dvě poloviny. *Septum nasi* se skládá ze tří částí: kostěné, chrupavčité a membránové. Z laterálních stěn dutiny nosní odstupují tři páry skořepin nosních (*conchae nasales superiores, mediae a inferiores*).

Většinu plochy sliznice kryje respirační epitel (víceřadý řasinkový) s pohárkovými buňkami, který je v přední etáži nízce kubický a postupně se zvyšuje. Ve slizničním vazivu nacházíme bohaté žilní pleteně a smíšené tuboalveolární žlázy. Žilní pleteně

v oblasti skořepin tvoří plexy náchylné ke zduření. Horní skořepy pokrývá čichový epitel, což je vysoký epitel víceřadý cylindrický s řasinkami, čichovými receptory a podpůrnými a bazálními buňkami. Přechod mezi čichovým a respiračním epitelem tvoří tzv. víceřadý respirační cylindrický epitel. Epitel je od *lamina propria mucosae* oddělen bazální membránou, která je zpočátku tenká a kraniálně se ztlušťuje. [2] Slizniční vazivo je pak připojeno přímo k periostu a k perichondriu.

Na laterální stěně dutiny nosní se nacházejí vchody do vedlejších dutin nosních.

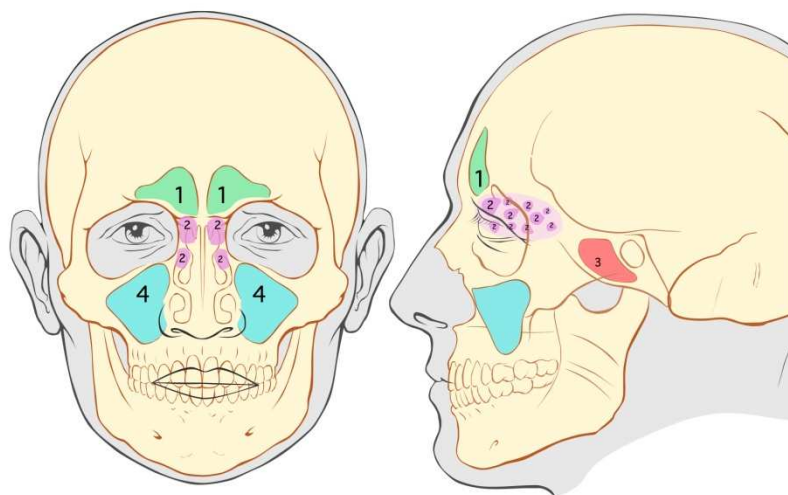


Obr. 1 – anatomická stavba sinonasální krajiny (dostupné z: <http://content.answcdn.com/main/content/img/elsevier/dental/f0098-01.jpg>, 3. 9. 2014)

### 1.1.1.3. Sinus paranasales

Vedlejší dutiny nosní jsou párové útvary vystlané nižším epitelem víceřadým cylindrickým s menším množstvím pohárkových buněk a žlázek, než je tomu v dutině nosní [2]. Žlázy tvoří sekret, který se vyprazdňuje do dutiny nosní.

Funkce vedlejších dutin nosních není zcela zřejmá; podílí se na rezonanci při tvorbě barvy hlasu, uvažuje se též o jejich úloze při tepelné izolaci očnice a při „chlazení“ mozku [4]. K vedlejším dutinám nosním řadíme *sinus maxillaris*, *sinus frontalis*, *sinus sphenoidalis* a *sinus ethmoidales anteriores, medii et posteriores*.



Obr. 2 – Anatomická poloha vedlejších nosních dutin – schematicky: 1 *sinus frontalis*, 2 *sinus ethoidales*, 3 *sinus sphenoidalis*, 4 *sinus maxillaris* (dostupné z: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Senos\\_paranasales.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Senos_paranasales.jpg), 3. 9. 2014)

### 1.1.2. Buněčný cyklus a jeho regulace

Buněčný cyklus je soubor událostí, které vedou ke zdvojení genetické informace buňky spolu s ostatními součástmi buňky a jejich následovnému rozdělení do dvou dceřiných buněk. Somatické buňky, s výjimkou např. neuronů a kardiomyocytů, během svého života prodělávají sérii buněčných cyklů. Buněčný cyklus je řízen několika způsoby, které budou podrobněji rozebrány v následujících odstavcích. Celý cyklus rozdělujeme do základních dvou fází, a to na interfázi a mitózu. [5] [6]

#### 1.1.2.1. Interfáze

Interfáze je obdobím, kdy buňka roste a připravuje se na mitózu. Dále ji dělíme na následující fáze:

Do **G<sub>0</sub>**, neboli do fáze klidové, se buňky dostávají po předešlé mitóze a setrvávají v ní různě dlouhou dobu. V této fázi si buňka plní svojí danou funkci a udržuje všechny své komponenty v počtu a koncentracích nezbytných pro správnou funkci. Pomocí signálních drah a působení mediátorů může dojít k přesunu do G1 fáze. [6]

**G1** fáze je charakterizována intenzivní syntézou všech potřebných složek pro následnou replikaci genetické informace. To znamená, že se syntetizuje velké množství nukleotidů, RNA, ribozomů a enzymů. Na konci této fáze se nachází hlavní kontrolní uzel buněčného cyklu. Pokud se buňka nachází v situaci, kdy obsahuje dostatečné množství všech potřebných součástí k replikaci DNA, může cyklus pokračovat do S fáze. Postup G1 fází spočívá v přítomnosti dostatečného množství komplexu cyklinu D s CDK 4/6 a následného působení cyklinu E s CDK2. Do S fáze buňka může pokračovat za působení cyklinu A s CDK2. [6]

**S fáze** je obdobím syntézy DNA a histonů. Dochází k vytvoření dvouchromatidových chromozomů, přičemž rychlost syntézy DNA je různá mezi jednotlivými chromozomy, ale stejná pro homologní páry chromozomů s výjimkou chromozomu X. [6]

**V G2** fázi se každý chromozom skládá ze dvou sesterských chromatid, teda dvou identických molekul DNA. Nachází se zde také druhý kontrolní bod buněčného cyklu, kdy dochází ke kontrole genetické informace a případným opravám. Ke konci G2 fáze dochází ke kondenzaci chromatinu. V případě přítomnosti dostatečného množství cyklinu A a cyklinu B v komplexu s CDK2, dochází k přesunu do fáze mitózy. [6]

#### **1.1.2.2. Mitóza**

Samotnou mitózu dále dělíme na karyokinezi, kdy dochází k rozdělení jádra, a cytokinezi, kdy dochází k dělení cytoplazmy. Mitóza je plynulý proces, ve kterém však dokážeme rozlišit 4 fáze: profáze, metafáze, anafáze, telofáze. Dochází zde k rozdělení sesterských chromatid k opačným pólům buňky pomocí mitotického aparátu, tvorbě jaderné membrány a v průběhu cytokineze pak k oddělení dceřiných buněk. [6]

#### **1.1.2.3. Regulace**

Jedna z hlavních složek řízení buněčného cyklu přichází z okolí cílové buňky. **Růstové faktory** jsou hydrofilní signální molekuly nezbytné pro přežívání buněk, buněčný růst a proteosyntézu. Růstové faktory jsou aktivní až v komplexu se svým membránovým receptorem s enzymovou aktivitou, které následně aktivují proteinkinázy. Nejčastěji stimulují buňky k proliferaci (platelet derived growth factor, erythropoetin, epidermální růstový faktor, fibroblastový růstový faktor, interleukiny), na rozdíl od nich transformující růstový faktor beta (tumor growth factor beta; TGF- $\beta$ ) disponuje inhibiční vlastností. K buněčné proliferaci většinou nestačí pouze jeden růstový faktor, ale je potřeba účinku několika specifických růstových faktorů na různé receptory. [6]

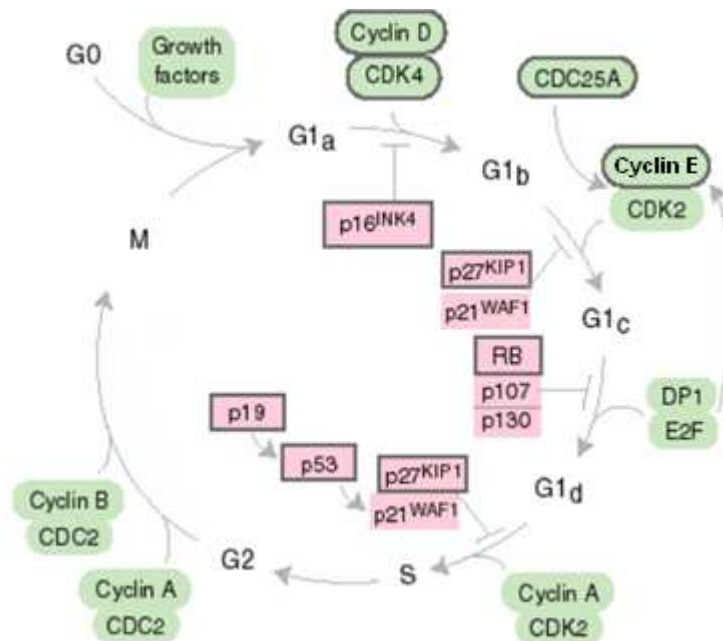
**Cykliny a cyklin dependentní proteinkinázy** (CDK) jsou produkty genů zvaných protoonkogeny a podílí se na řízení buněčného cyklu. CDK jsou proteiny, které jsou po vazbě s cyklinem fosforylovány a v takto aktivní formě dále fosforylují další proteiny v místě serinů a threoninů. Toto působení je potencováno vazbou s proliferačním buněčným nukleárním antigenem (proliferating cell nuclear antigen - PCNA) a inhibováno inhibitory cyklin dependentních proteinkináz (ICDK), jejichž zvýšení zapříčiní zastavení buněčného cyklu. U člověka je známo celkem 8 cyklinů, pojmenovaných velkými tiskacími písmeny (A, B, C, D, E, F, G a H), které tvoří komplexy se sedmi CDK (CDK1-CDK7). K zastavení v průběhu buněčného cyklu dochází též v případě, kdy se v buňce nenachází dostatečná koncentrace cyklinů a CDK. [6]

Další část řídicího mechanismu buněčného cyklu tvoří proteinové **produkty tumor-supresorových genů**. Tyto proteiny způsobují inhibici proliferace a růstu buňky. Podrobněji budou popsány produkty genů Rb1 a TP53 a INK4 (Inhibitor Protein Kinase 4).

Produktem genu Rb1 je Rb protein (pRb), který zastává funkci jaderného transkripčního faktoru, který interaguje s dalšími transkripčními faktory z rodiny E2F (E2F1 - E2F6) a po vzniku jejich komplexu pRb-E2F potlačují transkripci genů důležitých pro přestup z G1 fáze do S fáze, jako jsou např. geny pro cyklin D a E. Protein pRb se v buňce vyskytuje neustále, avšak jeho aktivita je dána jeho mírou fosforylace. Fosforylovaný pRb je neaktivní a je tak umožněno přechodu buňky do S fáze. Fosforylace je indukována vazbou růstových faktorů na jejich receptory, které způsobí interakce mezi cykliny a jejich CDKs a tím jejich aktivaci a spuštění fosforylační funkce zacílené na threoniny pRb. [6]

Gen TP53 je umístěn na krátkých raménkách chromosomu 17 a je nazýván „strážcem genomu“, jelikož na jeho funkci závisí, zda proběhne kontrola genetického materiálu a oprava případných chyb v kontrolním bodě G1/S (velký repair) a S/G2 (malý repair). Produktem tohoto genu je jaderný fosfoprotein p53, který je transkripčním faktorem vázajícím se na promotor několika cílových genů důležitých v regulaci buněčného cyklu. Nejdůležitějšími jsou geny CIP1/WAF1 (Cyklin Dependent Protein Kinase / Wild type p53 dependent growth Arrest Factor), GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage) a BAX (apoptotický člen rodiny Bcl-2). Produkt genu CIP1/WAF1 protein p21 svou vazbou k CDK inhibuje jejich aktivitu v kontrolních bodech G1 i G2. [6] Produkt genu GADD45 podněcuje reparaci DNA interakcí s PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) či indukci apoptózy přes systém p38/JNK. [7]

TGF- $\beta$  reguluje transkripci genu INK4, jehož variační transkripcí vznikají dva různé proteiny p15 a p16. Oba proteiny mají inhibiční funkci na CDKs G1 fáze, přičemž p15 se váže na CDK4 a p16 na CDK2, CDK4 a CDK6. [6]



Obr. 3: Schéma regulace buněčného cyklu. Zeleně – pozitivní regulátory, Růžově – negativní regulátory. Šedivým rámečkem jsou označeny proteiny, jejichž defekt se nachází v buňkách některých zhoubných nádorů. (dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/bm/CellCycle.pdf>, 13. 9. 2014)

### 1.1.3. Nádorová transformace

#### 1.1.3.1. Definice

Tumor, neoplázie či novotvar jsou označení nové geneticky podmíněné abnormální tkáně v mnohobuněčném organismu s klonálním charakterem, která nemá žádnou fyziologickou funkci a roste nekontrolovaným způsobem [8].

Maligní transformací rozumíme vícestupňovou genetickou a epigenetickou změnu buňky vedoucí ke schopnosti autonomního růstu a invazi. Taková buňka se vyznačuje několika základními charakteristikami, kterými jsou zejména: nezávislost na růstových stimulačních faktorech, rezistence vůči inhibitorům růstu, rezistence vůči apoptóze, výrazná proliferační aktivita, schopnost indukovat angiogenezi, invazivita a schopnost metastazování [8] [9].

### **1.1.3.2. Mechanismus vzniku**

Mezi epigenetické změny řadíme chemické změny DNA či chromatinu (např.: metylaci promotorů, změny acetylace histonů, aj.), která vede k rozdílné expresi genů. Nemají tedy žádný vliv na pořadí nukleotidů.

Každý nádor se vyznačuje genetickou změnou ovlivňující pořadí nukleotidů klíčových genů regulující buněčný cyklus. Mezi ně patří protoonkogeny, tumor supresorové geny a geny pro reparační mechanismy. Tyto geny kódují velké množství proteinů nezbytných pro správný buněčný cyklus a reparaci případných defektů (signální molekuly, receptory, intracelulární přenašeče, transkripční faktory, pro-apoptické proteiny, proteiny kontroly buněčného cyklu, proteiny reparace DNA). [8] [9] [10]

Tyto genetické a epigenetické změny jsou vyvolány rozličnými faktory, které se obecně rozdělují mezi chemické, fyzikální a biologické.

### **1.1.3.3. Faktory kancerogeneze**

**Chemické faktory** jsou spolu s fyzikálními nejčastějším spouštěčem nádorové transformace už jen tím, že se vyskytují všude kolem nás. Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) uvádí, že až 80% zhoubných nádorů je přímo či nepřímo spojeno s expozicí chemickým a fyzikálním vlivům vnějšího prostředí. Mezi ty nejnebezpečnější prokázané karcinogeny patří např.: benzo-a-pyren, dimethylbenzanthracen, aromatické aminy, nitrosaminy, alkylující činidla, mykotoxiny jako aflatoxin B<sub>1</sub>, arzen, azbest, chrom, potravní aditiva (cyklamát, sacharin, dusitany a dusičnany) atd. [11] [12] Na nádorové transformaci se také podílejí látky, které se běžně v našem organismu vyskytují. Mezi ně patří produkty oxidačního stresu (peroxidový radikál, superoxidový radikál, hydroxylový radikál) vznikající např. při Fentonově reakci, či při aktivaci neutrofilních granulocytů v rámci zánětu [9] [13].

Mezi nejvýznamnější **fyzikální faktory** patří ionizující záření (rentgenové záření, ultrafialové a  $\gamma$  záření), mechanické poškození chromozomů azbestem [14] a vysoká teplota. Ionizující záření způsobuje jak přímou ionizaci DNA s následnými zlomy, tak vznik radikálů, které tak nepřímo ionizují DNA. Ionizovaná DNA pak prochází nejrůznějšími modifikacemi a defekty jako jsou např.: příčné vazby s proteiny, jednoduché a dvojité zlomy, inserce, mezivláčkové můstky, hydroxylace bází, rozevření purinového či pyrimidinového jádra apod. [9] [11] [15].



Bakterie a viry, jakožto **biologické faktory**, jsou též významnou skupinou podílející se na vzniku zhoubných nádorů, i když v menší míře, než předchozí faktory a to především v roli kofaktorů [11]. Mezi bakteriální původce karcinomů řadíme bakterii *Helicobacter pylori*, která má vliv na vznik karcinomu žaludku a MALT lymfomu [16].

Studium etiopatogeneze virů lidských nádorů je velice obtížné, jelikož experimentální podmínky lze jen stěží, či není možno vytvořit a navíc převedení výsledů na člověka není validní z důvodu multifaktoriálního působení prostředí a životního stylu spolu s dlouhodobou nákazou virem. Každý člověk disponuje i jinou efektivitou svého imunitního systému a ve většině případů i u nakaženého jedince nedojde ke vzniku nádoru z důvodu dostatečné imunitní odpovědi na přítomnost viru. [3] I přes to je nyní známo šest virů, které jsou etiologicky spjaty se vznikem nádoru. Tyto viry jsou uvedeny v tabulce.

Virus	Druh nádoru
<i>Human papillomavirus</i> (HPV)	karcinom děložního čípku, hrtanu a anogenitálního traktu [17] [18] [19]
<i>Hepatitis B virus</i> (HBV)	hepatocelulární karcinom [20] [19]
<i>Epstein-Barr virus</i> (EBV)	karcinomy horních cest dýchacích [21] [22] [23] [24] [25], Hodgkinův lymfom, Burkittův lymfom [19]
<i>Human herpes virus 8</i> (HHV8)	Kaposiho sarkomu [26]
<i>Human T-lymphotropic virus 1</i> (HTLV1)	Leukémie z T-buněk [3]
<i>Merkel cell virus</i> (MCV)	Karcinom z Merkelových buněk [3]

Tabulka 1: Přehled virů uplatňujících se v etiopatogenezi lidských nádorů

Mechanismem vzniku nádorové transformace způsobené většinou virů, je přenos onkogenů, které jsou součástí jejich genomu, do DNA člověka. Toto však není cílem virů, ale spíše vedlejším efektem při replikaci jejich genomu a šíření se na další hostitele. Většina DNA virů stimuluje hostitelskou buňku k replikaci a proliferaci, čímž dosáhne mnohonásobného počtu kopií viru. HPV a jiné malé DNA viry toho dosáhnou tím, že jejich proteiny odstaví tumor supresorové mechanismy (Rb a p53). [19]

Na vzniku neoplázie se podílejí další faktory, které nelze nijak ovlivnit. Patří mezi ně věk, pohlaví, rasa a zejména pak genetická predispozice, přičemž s přibývajícím se věkem se zvyšuje riziko vzniku zhoubného novotvaru díky kumulaci mutací [27].

#### **1.1.3.4. Prekancerózy**

Prekanceróza je označení pro takovou alteraci tkáně, která vede ke zvýšenému riziku vzniku nádorového bujení. Je charakterizovaná zvýšením buněčné proliferace, která vede ke zvýšenému riziku vzniku replikační chyby, a tím i k mutacím genů zodpovídající za regulaci buněčného cyklu a následnému vzniku nádoru. Za prekancerózy považujeme stavy, mezi které v některých případech patří chronické záněty způsobené bakteriemi (*Helicobacter pylori*) nebo viry (EBV, high-risk HPV, HCV atd.) a hyperplazie některých hormonálně regulovaných orgánů (např. hyperplazie endometria) [28].

Prekancerózy můžeme rozdělit podle charakteru do tří stupňů. **Stacionární**, kde je riziko maligního zvratu malé a nemusí být charakterizován žádnou histologickou odchylkou ani zvýšenou proliferační aktivitou. **Progradientní** stupeň je spjat s vyšším rizikem maligního zvratu, mikroskopicky prokazatelnými buněčnými atypii a zvýšenou buněčnou proliferací. **Preinvazivní** je stupeň nejzávažnější, s nejvyšším rizikem maligního zvratu; tíže buněčných atypii je zde shodná s invazivním nádorem, je však stále zachována intaktní bazální membrána a nedochází k šíření do okolních struktur [28].

Mezi prekancerózy dutiny nosní a vedlejších nosních dutin spojované s následným vznikem karcinomu patří Schneideriánské papilomy, avšak nepřítomnost prekancerózy nevyklučuje vznik karcinomu. [29]

Přítomnost HPV DNA byla prokázána u 20-25 % invertovaných papilomů bez dysplazie, 55,8 % s high-grade dysplazií a u 55,1 % invazivních dlaždicobuněčných karcinomů. [29]

#### **1.1.3.5. Neoplázie dutiny nosní a paranasálních sinusů**

Dle původu buňky, ze které tumor vzniká, rozlišujeme mnoho různých druhů zhoubných nádorů (např.: karcinomy z epitelových buněk, sarkomy z pojivové tkáně, gliomy z nervové tkáně, atd.).

Přestože je dutina nosní s paranasálními sinusy svými rozměry poměrně malou oblastí, je místem vzniku několika histologicky rozličných skupin tumorů zahrnujících nádory ze slizničního epitelu, slizničních žláz, měkkých tkání, kostí, chrupavek, neurální a neuroektodermové tkáně, hematolymfoidních či germinálních buněk [30]. Karcinomy této oblasti však představují pouze 3 % ze všech karcinomů hlavy a krku a také procentuální zastoupení dlaždicobuněčného karcinomu je zde nižší (cca 65 %). [29]

Následující tabulka shrnuje jednotlivé druhy nádorů sinonasální krajiny.

Druh a původ tumoru	Typ	Subtyp
Maligní epiteliální	Dlaždicobuněčný karcinom	Verukózní
		Papilární
		Bazaloidní
		Vřetenobuněčný
		Adenoskvamózní
		Akantolytický
	Lymfoepiteliální karcinom	
	Sinonasální nediferencovaný karcinom	
	Adenokarcinom	Intestinální
		Neintestinální
Karcinom slinných žláz	Adenoidně cystický karcinom	
	Mukoepidermoidní karcinom	
Benigní epiteliální	Schneideriánské papilomy	Invertovaný typ
		Onkocytický typ
		Exofytický typ
	Respirační epiteliální adenomatoidní hamartom	
	Adenomy slinných žláz	Pleomorfní adenom
		Myoepiteliom
Onkocytom		
Neuroendokrinní	Typický karcinoid	
	Atypický karcinoid	
	Malobuněčný karcinom (neuroendokrinní typ)	
Neuroektodermové	Ewingův sarkom	
	Primitivní neuroektodermový tumor	
	Čichový neuroblastom	
	Melanocytární neuroektodermový tumor dětského věku	
	Slizniční maligní melanom	
Z měkkých tkání	Maligní	Fibrosarkom
		Maligní fibrózní histiocytom
		Leiomyosarkom
		Rabdomyosarkom
		Angiosarkom
	Hraniční a s malým maligním potenciálem	Desmoidní fibromatóza
		Zánětlivý myofibroblastický tumor
		Glomangiopericytom
		Extrapleurální solitární fibrózní tumor
	Benigní	Myxom
		Leiomyom
		Hemangiom
		Schwannom
Neurofibrom		
	Meningeom	

Kostí a chrupavek	Maligní	Chondrosarkom
		Mezenchymální chondrosarkom
		Osteosarkom
		Chordom
	Benigní	Obrovskobuněčná léze/tumor
		Chondrom
		Osteom
		Chondroblastom
		Chondromyxoidní fibrom
		Osteochondrom
		Osteoidní osteom
		Osteoblastom
		Ameloblastom
		Hamartom
Hematolymfoidní	Extranodální NK/T lymfom, difuzní B velkobuněčný lymfom, extramedulární plazmocytom, extramedulární myeloidní sarkom, histiocytární sarkom, histiocytóza z Langerhansových buněk	
Z germinálních buněk	Nezralý teratom, teratom s maligní transformací, sinonasální teratokarcinosarkom, nádor ze žlutkového váčku, zralý teratom, dermoidní cysta	
Sekundární tumory		

Tabulka 2: Přehled WHO klasifikace neoplázií v sinonasální oblasti. [30]

Jelikož přítomnost papilomavirů je spojována především s dlaždicobuněčným karcinomem [30], budeme se tímto typem neoplázie více zabírat v následujících odstavcích.

#### 1.1.3.5.1. Dlaždicobuněčný karcinom

Dlaždicobuněčný karcinom (DK) vychází z epitelálních buněk sliznice, vystylající dutinu nosní a paranazální sinusy. Zahrnuje keratinizující a nekeratinizující typ. V literatuře se můžeme setkat s různými, často matoucími označeními pro nekeratinizující typ DK jako jsou např.: Schneideriánský karcinom, karcinom z cylindrických buněk, karcinom z respiračního (I) epitelu. [29] [30]

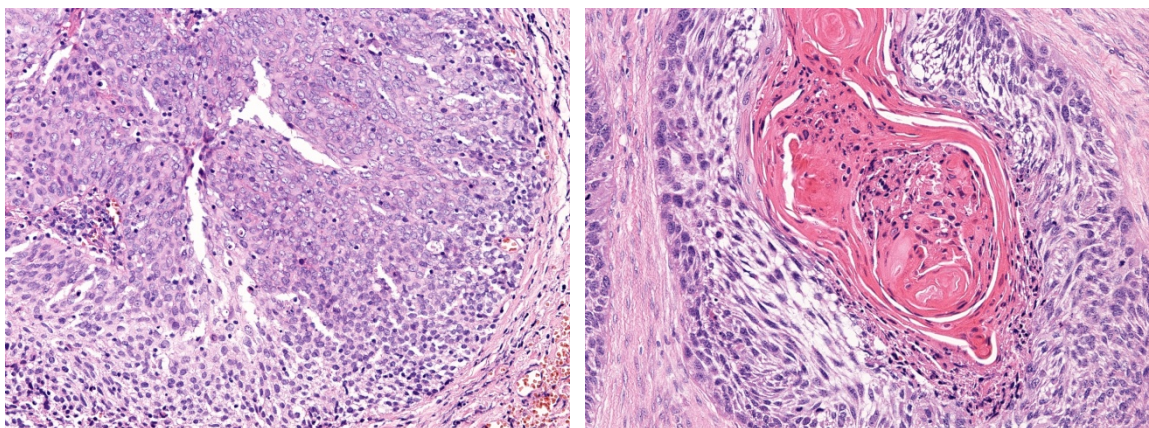
Vzniku DK horních cest dýchacích obvykle předchází rohovějící typ dysplázie dlaždicobuněčného epitelu [31]. V této fázi se však nádorový proces v klinické praxi zastihne zcela výjimečně.

**Nekeratinizující typ** DK, nazývaný též Schneideriánský karcinom, byl dříve často nazýván cylindrocélulární karcinom. Preinvazivní stádium karcinomu se vyznačuje cylindrickými buňkami uspořádanými v papily, které komunikují s povrchovým epitelem a vytvářejí invaginace. Při malém zvětšení mohou mikroskopicky napodobovat invertovaný papilom. Cylindrické buňky mají tendenci palisádovat kolmo k bazální membráně. Jádra těchto buněk jsou atypická s výraznou mitotickou aktivitou, některé buňky nacházíme ve stavu apoptózy. Makroskopicky je místo postižení vkleslé s hladkými okraji s fokální infiltrací stromatu. [29] [30]

Klasický nekeratinizující DK sinonasální krajiny je podobně jako tento typ karcinomu v orofaryngu složen z menších buněk s bazofilní cytoplasmou, někdy bazaloidního vzhledu. Často nacházíme centrální nekrózy s nápadnými mitózami a apoptózou. [29] [30]

**Keratinizující typ** DK v sinozální krajíně se nijak neliší od DK v jiných lokalizacích hlavy a krku. Je charakterizován různě diferencovanými dlaždicovými buňkami s extracelulární či intracelulárním uložením keratinu. Buňky nádoru se vyznačují mozaikovým uspořádáním vytvářejícím hnízda, a malé skupiny nebo rostou disperzně či difúzně. Tumor rozlišujeme jako dobře, středně, nebo nízcce diferencovaný. [30]

Varianty DK jsou v sinozální oblasti vzácné, ale mohou se zde vyskytnout. Patří mezi ně verukózní karcinom, papilární, bazaloidní, vřetenobuněčný, adenoskvamózní a extrémně vzácný akantolytický dlaždicobuněčný karcinom. [30]



Obrázek 4 (vlevo) a 5 (vpravo): vlevo – dlaždicobuněčný karcinom nekeratinizující (nerohovějící), vpravo – dlaždicobuněčný karcinom keratinizující (rohovějící) - barvení hematoxylinem eosinem zvětšení 200x (zdroj: FÚP FNHK)

Mezi významné faktory, které přispívají k rozvoji DK, patří často profesionální expozice např. dřevnému a textilnímu prachu, niklu a chlorofenolům, formaldehydu [32], dále kouření a předchozí výskyt sinonasálního papilomu, zejména invertovaného typu. V několika málo studiích byl HPV nalezen ve variabilním počtu případů DK sinonasální oblasti, ale jeho význam v etiopatogenezi této skupiny nádorů není dosud zcela jasný. [33].

DK sinonasální krajiny je obecně velmi vzácný, protože představuje přibližně 3 % zhoubných nádorů hlavy a krku, ale spolu s adenokarcinomem zahrnuje 80-90 % všech karcinomů této oblasti [34] [35]. Častější výskyt je zaznamenáván u Japonců. DK se vyskytuje především mezi 55. – 65. rokem věku, zatímco u dětí je velice vzácný [33].

V nynější době je obecně akceptováno, že přítomnost lidského papilomaviru (HPV), vedle tabákového a alkoholového abúzu [36], významně zvyšuje incidenci DK v orofaryngu (kořen jazyka, patrové mandle) a v anogenitální oblasti (děložní hrdlo, pochva, vulva, penis, hnus), přičemž typ 16 je spíše spojován s dlaždicobuněčným karcinomem a typ 18 s adenokarcinomem. [37] [38] [39] Co se týče přítomnosti HPV u DK v oblasti dutiny nosní a paranasálních sinusů, je dle studií cca 20 %. [17] [29] Z několika dalších obsáhlejších studií vyplývá, že přítomnost HPV je rozdílná co se týče jednotlivých typů DK u typu nekeratinizujícího 39,7 %, keratinizujícího 3,4 %, bazaloidního 41,7 %, papilárního 75 % a adenoskvamózního 66,6 %. [29] [40] [41] [42] Tato přítomnost je v praxi nejčastěji stanovována pomocí HPV in situ hybridizace (ISH), imunohistochemického stanovení exprese proteinu p16<sup>INK4a</sup>, jako produktu tumor supresorového genu INK4, který velice dobře koreluje se závažností infekce a prognózou pacienta, RT-PCR (reverzní transkriptáza – polymerázová řetězová reakce) k průkazu mRNA a PCR. [17] [29] [43] [44] Zmíněné metody budou dále projednány v následujících odstavcích.

## 1.2. Papilomaviry

Papilomavirus je malý dvouvláknový DNA virus, který způsobuje různé epiteliální proliferativní a/nebo nádorové léze. Výzkum těchto virů započal již ve 30. letech 19. století, kdy se prokázalo, že králičí bradavice jsou přenosné tkáňovými extrakty. Největší rozmach však přišel v 70. letech 19. století s rozvojem molekulárně biologických metod, a to především sekvenace DNA a polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR). [19] Papilomaviry se vyvíjeli spolu se svými hostiteli a jsou vysoce druhově specifické. [17] Největší úsilí se logicky soustředilo na výzkum lidského papilomaviru (human papillomavirus, HPV).

HPV jsou nejznámější pro jejich účast u benigních a neoplastických onemocnění anogenitálního traktu, avšak způsobují také laryngální papilomy či jiná proliferativní epiteliální léze sliznice dýchacích cest. Mimo jiné tento virus napadá i jiné lokalizace hlavy a krku, jako jsou například spojivky, ušní kanál, dutinu nosní, dutina ústní – především pak hltan a patrové mandle. [17] [39]

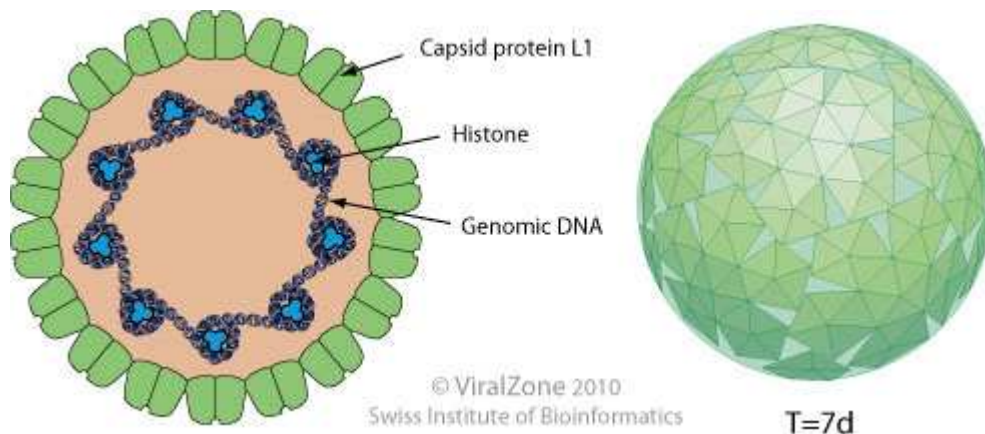
### 1.2.1. Taxonomie

Papilomaviry řadíme spolu s polyomaviry do rodiny *Papovaviridae*. Předpona *Papova-* vznikla spojením prvních dvou písmen rodů a jednoho druhu spadající do této čeledi (*pa* – *Papillomavirus*, *po* – *Polyomavirus*, *va* – *Vacuolating Agent*, což je původní název druhu *Simian Virus 40*). [45] Papilomaviry tvoří vlastní rodinu *Papillomaviridae*, kterou rozdělujeme na několik rodů, které jsou pojmenovány řeckou abecedou (alfa, beta, gama, ...). Rody od sebe vymezuje 40-55% rozdílnost v nukleotidové sekvenci, druhy pak 40-40%, typy 10-25 %, subtypy 2-10% a varianty 2% rozdílnost. [19] [17]

V současnosti je identifikováno více než 115 typů zvířecích a lidských papilomavirů. Tyto typy dělíme do dvou skupin (subsetů) podle rizika vzniku karcinomu a to na low-risk (nízké riziko) a high-risk (vysoké riziko). [39] Toto rozdělení má klinický význam, ne fylogenetický.

### 1.2.2. Struktura virionu

Papilomaviry jsou malé sférické neobalené DNA viry, jejichž velikost se pohybuje kolem 55nm. Mají proteinové pouzdro (kapsidu) složenou ze 72 kapsomer (pentamer) poskládaných do šikmého ikosaedru (viz. obrázek 6). Kapsomera je složena z hlavního kapsidického proteinu L1 a vnitřního vedlejšího kapsidického proteinu L2, jež jsou přidružené k L1 pentamerům, které tvoří vnější obal. Uvnitř kapsidy se nachází jedna molekula dvouvláknové cirkulární DNA sbalená do minichromozomu pomocí nukleozomů a tvořící tak gynofor viru. Délka papilomavirové DNA se pohybuje okolo 8000bp. [45] [19]



Obr. 6: Schématické zobrazení struktury HPV viru. Zeleně hlavní kapsidický protein L1, modře histony s cirkulární dvouvláknovou DNA. (dostupné z: [http://education.expasy.org/images/Papillomaviridae\\_virion.jpg](http://education.expasy.org/images/Papillomaviridae_virion.jpg), 7. 10. 2014)

### 1.2.3. Životní cyklus

Životní cyklus papilomaviru je spjatý s terminální diferenciací hostitelské epitelální buňky. Buněčný receptor, který umožňuje přestup viru do buňky je u HPV16 receptor CD151 [46], u jiných se uvažuje o možné asociaci s proteoglykany heparan sulfátu (Heparan Sulfate Proteoglykans, HSPGs). [19] Po nasednutí viru na receptor se vytváří clathritinový váček, který splývá s endozomem. V endozomu dochází k lýze kapsidy a následně DNA viru penetruje do cytoplazmy. [47] [48] Cílem viru jsou mitoticky aktivní keratinocyty bazální vrstvy dlaždicového epitelu, které se obnaží při drobném mechanickém poranění. [19] [39]



Po adsorpci a pinocytóze virionu do buňky bazální vrstvy, dochází ke ztrátě kapsidy a asociaci virové DNA s cytoplazmatickými proteiny, které zajistí transport DNA do jádra buňky, kde proběhne několik replikací, až počet dosáhne počtu 20 až 50 kopií. Po navázání buněčných transkripčních faktorů do hlavního regulačního regionu URR (Upstream Regulatory Region) začíná transkripce časných virových proteinů (Early protein, E). Spektrum transkripčních faktorů nutných pro zahájení transkripce se liší jak v čase, tak i mezi HPV typy, ale všechny obsahují vazebná místa pro Ap-1, Sp-1 a TFIID. Všechny potřebné transkripční faktory, nutné jak pro zahájení časně i pro následný přechod do pozdní fáze životního cyklu viru, poskytuje keratinocyt během své diferenciaci, a tím se stává vhodným hostitelem. High-risk HPV mají dva hlavní promotory a několik vedlejších. U typu HPV31 a HPV16 je hlavním časným promotorem p97 nebo p99, u typu HPV18 je to p105. Hlavním pozdním promotorem je p742, za kterým se nacházejí čtecí rámce pro pozdní virové proteiny L1 a L2 (Late protein, L) zakončené pozdním polyadenylačním signálem. [17] [19]

Za časným promotorem se nacházejí čtecí rámce pro několik časných proteinů: E6, E7, E1, E2, E4 a E5, za nimiž se nachází časný polyadenylační signál (Early Poly A). E1 a E2 jsou proteiny regulující virovou transkripci a replikaci. Po jejich nasednutí na URR sekvenci dochází k replikaci virové DNA. Protein E1 má ATPázovou a helikázovou aktivitu, která je důležitá pro rozvinutí DNA k efektivní replikaci, ale jako monomer má pouze nízkou afinitu k rozpoznávací sekvenci. Za působení E2 proteinu se spojují jednotky E1 proteinu v hexamerní strukturu s vysokou afinitou k rozpoznávací sekvenci. [17] [19]

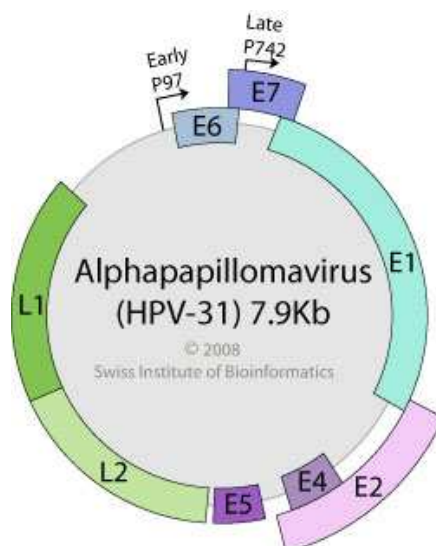
Jak již bylo sděleno výše, nachází se v počáteční fázi infekce přibližně 50 kopií viru na buňku a ani dále se počet kopií viru v nediferencované buňce nemění třeba i několik desetiletí. Tato fáze je řízena koncentrací E2 proteinu, který reguluje E1 a E2 expresi. Pokud je koncentrace těchto proteinů příliš vysoká, brzdí se jejich transkripce a tím se jejich hladina udržuje na nízké úrovni. Pokud však dojde k diferenciaci buňky, transkripce replikačních genů se přepne z E2-regulovaného časného promotoru na více aktivní E2-nezávislý pozdní promotor, což zapříčiní amplifikaci virového genomu v řádech tisíců kopií na buňku. [19]

Proteinem s nejvyšší expresí v průběhu produktivní fáze infekce (pozdní fáze) je fúzní protein E1<sup>E4</sup>. Jelikož čtecí rámec E4 proteinu nemá iniciační kodón (ATG), „zapůjčí“ si ho ze čtecího rámce pro protein E1 a po následném alternativním sestřihu mRNA a translaci dochází ke vzniku tohoto fúzního proteinu. Funkce proteinu E1<sup>E4</sup> je stále předmětem studia, zjistilo se ale, že jeho nadměrná tvorba a navázání se na cytokeratiny v cytoplazmě buňky způsobí rozpad cytokeratinové sítě a možné uvolnění virionů z buňky. Dále se pak tento protein váže na komplex cyklin B/cdk1 a izolací v cytoplazmě způsobí neschopnost buňky přechodu z G2 do M fáze buněčného cyklu a setrvání tak v S fázi. [17] [19]

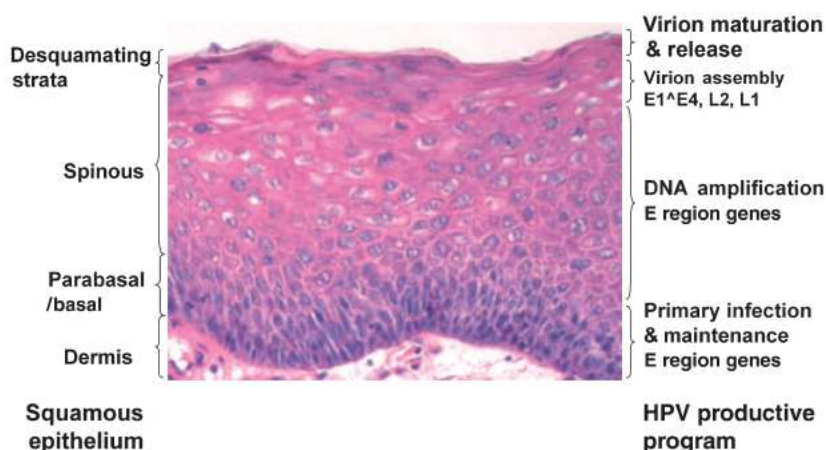
E5 je malý hydrofobní protein situovaný v intracelulárních membránách. Blokadí H<sup>+</sup>-ATPázy dochází ze snížené acidifikační schopnosti endozomu a tím stimuluje recyklaci receptoru pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) a zvyšuje tak jeho koncentraci. [19] Aktivace EGFR zahrnuje aktivaci fosfoinositol-3-kinázy, p38 MAP kinázy a nukleárního transkripčního faktoru kappa B (NFκB) a tím zvyšuje signalizaci zprostředkovanou Rac1. Rac1 je malá GTPáza, která reguluje mnoho signalizačních drah, mezi nimiž je i indukce exprese genu pro enzym cyklooxygenázu 2 (COX2) jehož působením vzniká prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>). COX2 je enzym umožňující inhibici epiteliální diferenciaci a apoptózy. [17]

Pomocí virových proteinů E6 a E7 je zajištěno setrvání buňky v buněčném cyklu i přes pokračující buněčnou diferenciaci (nedochází k degradaci jádra) a jejich kooperace napomáhá epizomu k vytvoření tisíců kopií virů na buňku. [17] [19] [39] Mechanismus působení je popsán níže v kapitole Mechanismus působení jako onkogen.

V průběhu diferenciaci keratinocyty dochází k přestupu viru do pozdní fáze životního cyklu a počátku syntézy pozdních virových proteinů L1 a L2, jakožto hlavních a vedlejších kapsidických proteinů. Před rozpadem buňky se proteiny L1 a L2 shromažďují do ikosaedrické kapsidy obsahující jednu kopii kruhové virové DNA asociované s buněčnými histony. [19]



Obr. 7: Struktura genomu lidského „high-risk“ papilomaviru 31. Šipkami jsou naznačeny časný (Early) promotor p97 a pozdní (Late) promotor p742, barevnými boxy pak jednotlivé čtecí rámce virových časných (Early, E) a pozdních (Late, L) proteinů. (dostupné z: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/187.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/187.html), 15. 10. 2014)



Obr. 8: Životní cyklus HPV v závislosti na diferenciaci dlaždicobuněčného epitelu. Preparát laryngálního papilomu barveného barvením Hematoxylin-eosin. Nalevo popis vrstev epitelu: od spodu – dermis; bazální a parabazální vrstva; *stratum spinosum* a vrstva odlupujících se buněk. Popis životního cyklu HPV napravo: od spodu – místo primární infekce a počátek transkripce E genů; amplifikace E genů; shromažďování virových proteinů E1^E4, L2 a L1; virové zrání a uvolňování. [17]

#### 1.2.4. Mechanismus působení jako onkogen

Jak již bylo řečeno výše, dělíme HPV na tzv. high-risk a low-risk skupiny. Většina low-risk HPV typů způsobují bradavice nejrůznější lokalizace. Na rozdíl od nich skupina high-risk je spjata s vysokým rizikem vzniku nádorové transformace. Mezi tyto vysoce rizikové typy řadíme HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, a 58. [49]

Jak uvádějí studie, přítomnost HPV je u karcinomu děložního čípku zcela zásadním faktorem. Celých 99,7% karcinomů děložního čípku vykazuje HPV pozitivitu [50], z toho 90% případů je HPV16 a 18 pozitivních. [51] V případě dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku je popisován častější výskyt typu HPV 16. [52]

Mechanismus působení E1 a E2 byl popsán již v předchozích odstavcích a je taktéž důležitý v onkogenezi těchto virů. Největší „hrozbou“ pro buňku jsou však časné virové proteiny E6 a E7, které svou vazbou k několika buněčným proteinům způsobí jejich inaktivaci a pozastavují tak buněčný cyklus a vytváří příhodné prostředí k replikaci virové DNA.

E6 protein tvoří komplex s proteinem p53, který je dále ubikvitinován a degradován v proteazomu a tím zabraňuje aktivaci proteolýzy a následné apoptóze infikované buňky. [17] [9] [36] [51] [53] Dále protein E6 u high risk HPV zvyšuje degradaci tumor supresorového proteinu - tuberulous sclerosis factor 2 (TSC2), čímž zapříčiní hromadění malé GTPázy Reb1. Tento enzym aktivuje komplex mTORC1, který fosforyluje p70-S6 kinázu, která následně fosforyluje ribozomální protein S6 a vede k hromadění jeho aktivní formy. Následně dochází ke stimulaci komplexu mTORC2, který fosforyluje mnoho proteinů, mezi kterými je i protein Akt a aktivuje ho na Akt<sup>S473</sup>, který fosforylací inaktivuje TSC2 a spojuje tím pomyslný bludný kruh. Proteinkinázové komplexy (m-TORC1 a m-TORC2) se účastní mimo jiné i regulace buněčného cyklu tím, že fosforylují proteiny (pAkt<sup>S473</sup>, p16<sup>INK4a</sup> a pS6), které následně po této aktivaci potencují buněčné dělení. [44] [53] Dále se pak protein E6 váže i s jinými buněčnými proteiny zapojenými do buněčné signalizace zprostředkované kalciovými ionty, přes protein-protein interakce zapříčiňuje degradaci PDZ proteinů (PSD-95/disc large/ZO-1) zajišťujících mezibuněčnou komunikaci, regulaci buněčného růstu, buněčnou polaritu a adhezi. [19]

Protein E7 vytváří komplexy s hypofosforylovanou formou pRb vedoucí ke snížené buněčné koncentraci pRb, což zapříčiní zmírnění represe genů pro proteiny (transkripční faktor E2F) stimulující buňku pro přechod do S fáze buněčného cyklu. [19] [36] [51] Pokles pRb a E7 zprostředkovaná zvýšená exprese histonových demethyláz způsobí zablokování represe transkripce genu pro p16<sup>INK4a</sup>, což zapříčiní zvýšenou expresi p16<sup>INK4a</sup>. Dále protein E7 váže do komplexu histonové deacetylázy, jež mají organizaci heterochromatinu předcházet transkripci. [17] [44]

Onkoproteiny E6 a E7 inaktivací proteinu p53 a retinoblastového tumor supresorového genu tak potencují ztrátu kontroly buňky nad buněčným cyklem. [36] [38] [51]

Nyní se v praxi pro nepřímý průkaz a hodnocení HPV infekce používá imunohistochemické stanovení exprese proteinu p16<sup>INK4a</sup>, jakožto produktu tumor supresorového genu INK4. Tento protein za normálních okolností hyperfosforylací inaktivuje CDK 4 a 6 komplex D, čímž předchází inaktivaci retinoblastového tumor supresorového proteinu (pRb) a tím kontroluje buněčnou proliferaci v G1 fázi. Při aktivní replikaci vysoce rizikových typů HPV je pozorována difúzní silná jaderná a/nebo cytoplazmatická exprese tohoto proteinu v prekancerózní a/nebo nádorové lézi. [44]

Kategorie	Cíl	Princip metody	Metoda
Metody amplifikující cíl	DNA	PCR	Linear array HPV test (Roche)
			SPF10-LiPa (DDL)
			GP5+/6+ PCR EIA
			MGP PCR – Luminex
			BSGP5+/6+ PCR-MPG
			Digene HPV genotyping HR test (Qiagen)
			Digene HPV genotyping LQ test (Qiagen)
			Amplicor (Roche)
			PapilloCheck (Greiner-Bio-One)
			CLART HPV2 (Genomica)
	Real-time PCR	Abbott RealTime High Risk HPV test	
		Cobas 4800 HPV test (Roche)	
	mRNA	RT-PCR	HPV 16 E6*I RT-PCR-EIA
NASBA		PreTect HPV Proofer assai (Norchip)	
		NucliSENS EasyQ HPV (Biomerieux)	
TMA	Aptima HPV assai (Gen-Probe)		
Metody amplifikující signál	DNA	Tekutá fáze	Hybrid Capture 2 (Qiagen)
			Cervista HR HPV (Hologic)
		ISH	Ventana Inform HPV (Ventana)
			Dako GenPoint (Dako)
	mRNA	ISH	RNAscope HPV (Advanced Cell Diagnostics)

Tabulka 3: Přehled metod užívaných k detekci HPV. Ve sloupci metoda jsou uvedeny komerční názvy kitů s jejich výrobcem uvedeným v závorce. [3] [54] [55]

### **1.3. Preanalytické a analytické aspekty detekce HPV**

Než je vůbec možné přistoupit k samotným metodám detekce HPV, je třeba si uvědomit, jaký materiál je zpracováván a specifikovat jeho vlastnosti. Až na výjimky je veškerý bioptický materiál ihned po zákroku fixován 10% neutralizovaným pufovaným formaldehydem po dobu optimálně 24h (záleží však na velikosti tkáně) a následně převeden do formy parafínových bloků (Formalin Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Výhodou metod přizpůsobených FFPE vzorků je snadná dostupnost dostatečného množství vzorků i od vzácnějších diagnóz z archivů. [56]

#### **1.3.1. Preanalytická část**

##### **1.3.1.1. Odběr tkáně**

Po dobu od vynětí tkáně a vložení do fixačního média či zpracování probíhá autolýza nevyživovaných buněk tkáně a tak i její znehodnocování. Jak uvádí Bass et.al., molekulárně biologické metody nejsou nijak ovlivněny touto „chladnou ischemií“ trvající po dobu 24h pro DNA a 12h pro RNA analýzu. [56] Jiné práce se přiklánějí k názoru, že tato doba je jedním z faktorů, které ovlivňují fragmentaci DNA a tím znemožňují aplikovat metody založené na detekci delších úseků DNA. [57] [58]

Dalším důležitým faktorem je sama velikost odebraného vzorku, kde při množství menším než 2 mm<sup>3</sup> může dojít k nemožnosti zpracování z důvodu nedostatku DNA/RNA. [56]

### **1.3.1.2. Fixace formaldehydem**

Fixační médium je nepostradatelnou součástí zpracování FFPE tkáňových vzorků. Ideální fixativum rychle proniká do tkáně, kde zabráňuje autolýze a zároveň nealteruje buněčnou ultrastrukturu, čehož prozatím nebylo dosaženo žádným ze známých fixativ. Pro molekulárně biologickou analýzu je neoptimálnější zpracování zmražené tkáně. [58] Nyní je nejpoužívanějším fixačním prostředkem 10% neutralizovaný pufovaný formalín, což je 40% vodný roztok formaldehydu. [59]

Upřednostňuje se doba fixace kratší než 72h jak pro integritu DNA, polymerázovou řetězovou reakci, in situ hybridizaci, tak pro jiné metody včetně detekce jedno-nukleotidových polymorfizmů. [56]

Formaldehyd reaguje s aminoskupinami bazických aminokyselin obsažených v proteinech za vzniku methylolových adduktů, jež dále vzájemně kondenzují za vzniku methylenových můstků. Tyto můstky způsobují inter- a intra-molekulární přemostění v proteinech i nukleových kyselinách stabilizující morfologii tkáně po dobu mnoha let. Tímto způsobem jsou inhibovány proteinkinázové a nukleázové enzymy a tím blokována autolýza. [59] [58]

### **1.3.1.3. Prosycení parafínem a skladování**

Zvýšená teplota užívaná při procesu prosycování tkáně parafínem a vystavení tkáně působení vzdušného kyslíku způsobuje oxidaci a další fragmentaci DNA. [58] Z toho důvodu musí být doba mezi krájením FFPE tkáňových bloků a izolací DNA co nejkratší.

### **1.3.1.4. Izolace DNA**

Etanolvá precipitace a fenol-chloroformová extrakce DNA se v dnešní době stále využívá, ale z důvodů standardizace metod a vyšší časové i manuální náročnosti je v rutinní praxi využíváno komerčních izolačních kitů využívajících mikrokolonky.

Přesný princip izolace na mikrokolonkách je přísně střežen výrobcem, proto zde není možné popisovat molekulové interakce mezi molekulami DNA a skleněnými vlákny, ze kterých se skládá filtr. FFPE tkáň je po deparafinaci xylenem a zavodnění alkoholem lyzována pomocí proteinázy K v prostředí stabilizačního pufru za zvýšené teploty. Centrifugací dochází k oddělení DNA od matrice obsahující proteiny, soli a jiné buněčné součásti. Vázaná DNA na skelných vláknech je v konečné fázi eluována vodným roztokem. [60]



### 1.3.2. Metody detekce

V posledních dekádách se detekce a kvantifikace HPV stala důležitým prognostickým makrem v klinické praxi, a to především díky průkazu etiopatogeneze HPV u karcinomů děložního čípku, nyní už i u karcinomů dutiny ústní a hrtanu. Protože HPV není možné kultivovat v umělých buněčných kulturách, nebylo jednoduché vyvinout metody k jejich detekci, avšak závažnost a četnost stavů jimi způsobených vedla k usilovné práci vědeckých pracovišť na vývoji těchto metod.

V dnešní době jsou již používány tři třídy detekčních markerů přímo odvozených od HPV virů: molekulární metody založené na detekci virových nukleotidových sekvencí (DNA/RNA), serologické markery založené na produkci protilátek a buněčné markery založené na expresi proteinů během infekce a nádorového procesu (p16). [52]

Díky znalosti sekvence nukleových kyselin v DNA HPV, bylo možné vyvinout několik molekulárně biologických metod, které nám umožňují nejenom detekovat přítomnost HPV ve vzorku, ale i určit konkrétní typ viru. Dělíme je dle uspořádání na metody hybridizace s nukleovými kyselinami, metody amplifikující signál a metody amplifikující nukleové kyseliny viru (neboli cíl). [61]

Největším problémem je však definice tzv. zlatého standardu pro detekci HPV infekce. Jedním z důvodů je široké spektrum HPV typů, přičemž nejčastěji je s DK hlavy a krku spojován HPV typ 16 [62], avšak není možné se zaměřit pouze na tento typ. Nejčastěji jsou používány metody detekce p16<sup>INK4a</sup> imunohistochemicky [63] [64], které však nejsou specifické. Další často užívanou detekční metodou je in situ hybridizace (ISH) cílená na HPV DNA, která je vysoce specifická, ale ne příliš senzitivní. Na druhou stranu používané PCR metody jsou velice senzitivní, avšak ne nezbytně specifické, jelikož nedokáží určit transkripční aktivitu viru. Toho lze docílit zjištěním exprese virové E6/E7 mRNA pomocí real-time PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR), čímž se nejvíce blíží k dosažení „zlatý standard“. [65] Metoda detekce mRNA HPV pomocí ISH vzbuzuje rozporuplné mínění, jelikož někteří autoři ji označují jako dobře korelující s výsledky detekce p16 a HPV E6/E7 mRNA RT-qPCR [65], jiní jako metodu nevhodnou pro spolehlivé rozlišení mezi HPV DNA a E6/E7 mRNA transkripty [66].

### **1.3.2.1. Hybridizační metody**

Hybridizací v molekulárně biologické terminologii rozumíme vytvoření nekovalentních vazeb (vodíkových můstků) mezi dvěma vlákny nukleových kyselin různého původu podle Watson-Crickova pravidla komplementarity bází (adenin-thymin/uracil; cytosin-guanin; A-T/U a C-G). Toto pravidlo platí jak pro dideoxyribonukleové (DNA), tak pro ribonukleové kyseliny (RNA) s malou obměnou. Různým původem rozumíme například, jako v našem případě, párování mezi virovou DNA a uměle syntetizovanou hybridizační sondou. [5]

DNA sonda je krátký jednořetězcový DNA oligonukleotid o délce 10 až 150 nukleotidů, který se používá k nalezení hledané komplementární nukleotidové sekvence. Tyto sondy jsou syntetizovány chemicky přesně podle nároků zadavatele. [5]

K tomu, abychom mohli hybridizovat, je třeba jednovláknové DNA, které dosáhneme jejím zahřátím na přibližně 90°C, nebo vystavením DNA extrémním hodnotám pH. Toto přerušení vodíkových vazeb mezi dvěma vlákny DNA se označuje jako denaturace. Tento stav je reversibilní a to odstraněním příčin denaturace a dochází pak ke znovuoobnovení vodíkových můstků buď mezi původními vlákny DNA (renaturace), nebo mezi vlákny různého původu (hybridizace). [5]

Hybridizační metody patří mezi metody přímé a řadíme sem Southern blotting, in situ hybridizaci (ISH) a dot-blot hybridizaci. Poskytují velice kvalitní informace (především lokalizace u ISH), ale jejich značnou nevýhodou je velice malá citlivost ve srovnání s jinými molekulárními technikami [61], přičemž analytická citlivost přímých metod leží okolo 1pg HPV DNA, což odpovídá asi 5000 kopií HPV genomu. [52] Častěji je však hybridizace využívána jako součást detekce po některé z amplifikačních metod.

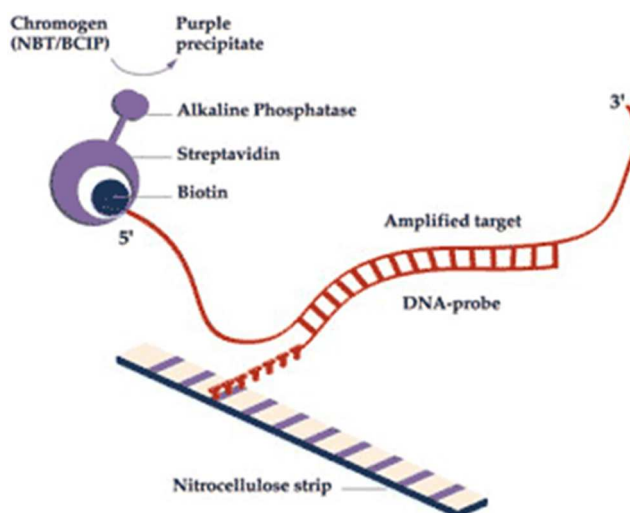
#### **1.3.2.1.1. In situ hybridizace (ISH)**

Tato metoda je využívána především k detekci sekvencí DNA na chromosomech nebo DNA a RNA sekvencí v buňkách. Sondy se váží na komplementární úseky DNA či RNA přímo v buňce a dávají tak přesnou informaci o lokalizaci hledané molekuly. Vizualizace je zajištěna fluorescenční, enzymovou či dnes již nepoužívanou radioizotopovou značkou. [5]

### 1.3.2.1.2. Dot-blot hybridizace

Principem této metody, je reakce mezi DNA (Southern blot), RNA (Northern blot) nebo proteinem (Western blot) vzorku ukotveným na nitrocelulóзовé membráně s detekčním systémem. Tento detekční systém je u DNA a RNA představován hybridizační sondou značenou fluorescenčně nebo kovalentně připojeným systémem streptavidin-biotin-enzym. Nejčastěji je jako enzym alkalická fosfatáza zprostředkovávající barevnou reakci se substrátem nitrotetrazoliové modři (Nitro Blue Tetrazolium, NBT) nebo bromo-chloro-indol fosfátem (BCIP). K detekci proteinů je využívána imunochemická reakce antigenu (proteinu) s protilátkou značenou stejným způsobem, jako u hybridizačních sond. [55] [67]

Některé komerční kity dnes využívají tzv. reverzní hybridizace na nitrocelulóзовém nosiči. Tato metoda využívá stejný princip jako výše uvedené blotovací techniky s tím rozdílem, že na nitrocelulóзовé membráně jsou imobilizované hybridizační sondy ve formě proužků a umožňují tak detekci několika různých nukleotidových sekvencí současně. Navázaný biotinylovaný produkt je následně prokazován vazbou komplexu streptavidinu s enzymem, který dále mění substrát na zbarvený produkt. [55] [67]



Obr. 9: Schématické zobrazení principu reverzní hybridizace na nitrocelulóзовém proužku. Šedé linie: místa ukotvení imobilizovaných sond, červeně: imobilizovaná sonda a biotinylovaný produkt, tmavě modře: biotin, fialově: komplex streptavidinu a enzymu. V horní části: naznačení reakce chromogenu (NBT či BCIP) na barevný produkt. (dostupné z: <http://www.papillomavirus.cz/images/inno1.gif>, 26. 10. 2014)

### **1.3.2.2. Metody amplifikující cíl**

Již výše jsme uvedli, že ačkoli hybridizační metody nám mohou poskytnout velice přesné informace ohledně lokalizace cíle, potýkají se s celkem malou citlivostí. Proto byly vyvinuty metody, které ji několikanásobně zvýší. Toto zvýšení citlivosti může být docíleno dvěma způsoby, a to „namnožením“ neboli amplifikací detekovaného cíle a zvýšení tak jeho koncentrace, nebo zesílení reakce detekující cíl.

#### **1.3.2.2.1. Polymerázová řetězová reakce**

Metoda polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) byla popsána již v roce 1971 a prakticky aplikována v roce 1983. Poskytuje možnost rychle amplifikovat vybrané nukleotidové sekvence DNA. [5]

PCR je založena na využití DNA-polymerázy (enzym katalyzující tvorbu fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy) pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza DNA je řízena templátovými oligonukleotidy (primery), které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězové molekuly DNA. Podle toho, na kterém konci požadované sekvence nasedají, je označujeme jako kódující/forward/upstream primer na 5' konci a nekódující/reverse/downstream primer. [5]

PCR reakce se skládá z několika kroků, na jejichž konci vzniká dvojnásobný počet molekul DNA. Automatizace tohoto procesu je zajištěna pomocí přístroje – termocykleru.

#### **Denaturace**

Aby bylo možné zahájení amplifikace, musí dojít k přerušení vodíkových můstků spojujících dvě vlákna nukleotidů a následnému nasednutí primerů. Tento proces denaturace je zprostředkován zahřátím PCR směsi na teplotu kolem 90°C po dobu několika desítek vteřin až minut. Úvodní denaturační krok je vždy delší, než v následujících cyklech. [5]

## Annealing

Na jednovláknový řetězec DNA mohou nasednout primery pouze v případě, že dojde ke snížení teploty a tím možnosti vzniku vodíkových můstků mezi templátovým řetězcem DNA a primerem. Tato teplota se pohybuje od 45 do 60 °C a závisí na tzv. teplotě tání primerů. Teplota tání primerů se vypočítává podle jejich nukleotidového složení z tabelovaných hodnot. Zvolení správné teploty, je rozhodující, jelikož při volbě příliš vysoké teploty dochází k neochotnému nasedání primerů a tím ke snížené účinnosti (malému výtěžku) amplifikace. Na druhou stranu příliš nízká teplota způsobí příliš rychlou hybridizaci zahrnující velké chyby v komplementaritě párování bází a tím dochází k tvorbě nespecifických amplikonů. Tohoto jevu lze využít u tzv. „touchdown“ PCR, kde teplota annealingu v počátečních cyklech je vyšší, než teplota tání primerů, která se však s dalšími cykly snižuje. Tím je docíleno počáteční tvorby selektivních amplikonů, které následně se za nižší teploty dále efektivně amplifikují. Neméně důležitá je i koncentrace primerů v PCR směsi, která se pohybuje okolo 0,1 až 1 μmol/l. [68] [69]

Na správném designování primerů neboli výběru nukleotidové sekvence, závisí celý výsledek metody. Musí se tedy dbát na dodržení několika zásad, mezi které patří nutnost blízkosti teplot tání obou/všech primerů, které by se neměly lišit o více jak 5°C, nesmějí tvořit dimery a vlásenky a poměr mezi jednotlivými bázemi (G+C/A+T) by měl odpovídat 1:1. Při výběru nukleotidové sekvence primerů je důležitá i délka výsledného produktu, a to především u materiálu získaného z tkání fixovaných formaldehydem, který způsobuje mnohé crosslink vazby mezi oběma vlákny DNA (znemožnění denaturace) stejně jako její značnou fragmentaci. [69] [70]

## Extenze

Extenze neboli prodlužování nukleotidového řetězce ve směru 3' - 5' pomocí termostabilní DNA polymerázy (Taq polymeráza, polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*), která odolává teplotám do 98°C a není jí tedy nutné po každém kroku denaturace znovu přidávat. Výhodou jsou i nyní dobře dostupné tzv. hot start techniky, které obsahují v reakční směsi protilátku proti Taq polymeráze, která způsobí její zablokování až do doby, kdy dochází k první denaturaci během PCR procesu a tím i k inaktivaci protilátky. Nevznikají tedy žádné nespecifické amplikony v době od napipetování master mixu ke vzorku DNA do spuštění PCR cyklu. Pokud není k dispozici hot start technika, omezuje se nespecifická amplifikace uchováváním a transportem vzorků na ledu. [69]

K tomu, aby mohla extenze probíhat, musí PCR směs obsahovat tyto složky: deoxynukleotid trifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) v koncentraci kolem 50 μmol/l, Taq DNA polymeráza v koncentraci 1 až 2,5 U/100ml, manganaté ionty (MgCl<sub>2</sub>) v koncentraci 1,5 až 6 mmol/l. Taq polymeráza prodlužuje rostoucí řetězec rychlostí cca 60 bazí/s, čemuž musíme přizpůsobit čas extenze. [69]

Výsledkem extenzní části PCR jsou DNA produkty o délce primerů a počtu bazí mezi nimi.

### **Detekce**

Nedílnou součástí každé PCR je i detekce amplifikované DNA, která může být provedena několika způsoby, mezi níž patří např.: gelová elektroforéza (agar/polyarylamid/čip), enzymo-imuno analýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) či hybridizační metody.

ELISA je široce používanou laboratorní metodou napříč biologickými obory. Využívá se zde specifické vazby mezi antigenem a protilátkou signalizovanou detekčním systémem. Existuje několik možných modifikací této metody, ať už se jedná o průkaz antigenu či protilátky. Po PCR ji lze využít jako detekčního kroku a to především pro kvalitativní informaci. Amplifikovaná DNA je zde považována za antigen, proti kterému je namířená protilátka imobilizovaná např. na povrchu jamky mikrotitrační destičky. Vazba antigenu na protilátku je vizualizovaná pomocí detekčního systému sekundární protilátky značené fluorescenční látkou (Fluorescence Immuno Assay, FIA) či enzymem pomocí vazby biotin-streptavidin-fluorescein/enzym. Po přidání substrátu se pomocí enzymu vytváří barevný komplex, který je dokazován fotometricky. Pro hodnocení je důležité stanovení tzv. tresh hold hodnoty, která stanoví, od kdy je možné vzorek považovat za pozitivní (obsahuje DNA, proti které je namířena protilátka). Pro stanovení této limitní hodnoty je třeba dodržování pravidel hodnocení kvality: pozitivní kontrola, negativní amplifikační a negativní konjugační kontrola. [71]

Existují další modifikace této klasické PCR, mezi které patří např. PCR s využitím reverzní transkripce (Reverse Transtriction PCR, RT-PCR), PCR v reálném čase (Real Time PCR/Quantitative PCR, qPCR) užívaná pro i kvantifikaci amplifikované DNA, multiplex PCR, amplifikace dlouhých řetězců (Long Distance PCR, LD-PCR), reamplifikace (Nested PCR), PCR s více produkty (Multiplex PCR) či asymetrická PCR.

#### 1.3.2.2.2. RT-PCR

Klasická PCR je designována pouze pro amplifikaci DNA, která podává informaci pouze o přítomnosti či nepřítomnosti hledaného úseku/úseků, popřípadě o jejich délce, ale postrádá bližší informaci o aktivitě přepisu určitého genu v buňce. Pro tyto potřeby proteomiky byla vyvinuta metoda využívající schopnost reverzní transkriptázy, proteinu, jež je používán RNA viry (např.: retroviry) k přepisu své RNA do DNA schopné inkorporace do genomu hostitelské buňky. Tento protein tedy přepisuje mRNA (Messenger RNA) do tzv. cDNA (Complementary DNA) a její množství odpovídá síle aktivity přepisu genu pro daný protein. Ke stanovení DNA je však zapotřebí použití qPCR, jejíž princip je popsán níže. [72] [73] [74]

Reverzní transkripce může probíhat v jenom nebo dvou krocích. Při jednokrokové analýze probíhá reverzní transkripce i replikace v jedné zkumavce, která obsahuje RNA, reverzní transkriptázu, primery, Taq DNA polymerázu, směs deoxyribonukleotidů, hořčičnaté ionty popřípadě další stabilizační příměsi. Výhodou jednokrokové metody je nižší riziko kontaminace vzorku při manipulaci. U dvoukrokové analýzy probíhá nejprve reverzní transkripce se stejným složením jako u jednokrokové metody s tím rozdílem, že obsahuje nespecifické primery. Ve druhém kroku pak přidáme specifické primery a provedeme PCR. Tento postup vykazuje větší přesnost, avšak hrozí zde i větší riziko zkřížené kontaminace vzorků během manipulace. [75]

Reverzní transkripce je využívána k detekci mRNA HPV proteinů E6 a E7 s tou výhodou, že nám poskytuje informace o aktuální transkripční aktivitě viru. Detekce mRNA HPV navíc mnohem více koreluje s pozitivitou imunohistochemického vyšetření p16<sup>INK4a</sup> než detekce HPV DNA a tím se stává citlivějším markerem HPV infekce. [76]

### 1.3.2.2.3. Real Time PCR

Real time PCR je laboratorní molekulárně biologická technika založená na principu PCR, která v průběhu amplifikace detekuje či kvantifikuje cílovou DNA. Tato detekce probíhá, jak sám název napovídá, v reálném čase, takže nám dovoluje přímo sledovat nárůst počtu DNA molekul. [75]

Celý průběh metody lze rozdělit do několika fází. Úvodní lineární fáze je charakterizována pozvolným nárůstem signálu (fluorescence), není rozpoznatelná od pozadí a během těchto počátečních deseti až patnácti cyklů je vypočítávána tzv. baseline. Během časně exponenciální fáze dochází k exponenciálnímu nárůstu molekul DNA a fluorescence. V této fázi signál protíná tzv. threshold, kdy PCR směs obsahuje detekovatelné a kvantifikovatelné množství ampliconů jasně odlišitelné od signálu pozadí. Tato mez je vypočítávána nejčastěji jako desetinásobek směrodatné odchylky baseline. Cyklus, ve kterém křivka protne threshold, je označován dle výrobce různě jako  $c_t$  či CP (crossing point). Z této hodnoty lze experimentálně dosáhnout počátečního počtu templátových molekul DNA ve vzorku. Následuje exponenciální fáze, kdy signál lineárně roste a fáze plateau, kdy dochází k vyčerpání reakčních komponent. [75]

Měřeným signálem se v real time PCR rozumí míra fluorescence, která je přímo úměrná počtu molekul DNA. Mechanismus, kterým je fluorescence zprostředkována, se liší dle druhu použité fluorescenční značky. Obecně jsou rozděleny na značky nespecifické, kam patří hojně používané barvivo SYBR Green či Eva Green, a specifické sondy. [77]

SYBR Green je asymetrické cyaninové barvivo systematickým názvem dle IUPAC N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropan-1,3-diamine. Toto barvivo absorbuje záření modré barvy s absorpčním maximem 497nm a emituje záření zelené barvy s emisním maximem 520nm. [78] Preferuje nespecifickou vazbu na dvouvláknovou DNA, ale také se slabě váže k jednovláknové DNA, čímž se stává snadno použitelným a levným nástrojem pro detekci v real time PCR. [79] [80]

Snad nejdůležitější částí kvantitativní PCR v reálném čase je sama kvantifikace. Můžeme se rozhodnout pro dva typy, a to absolutní nebo relativní kvantifikaci.



### **Absolutní kvantifikace**

Metoda absolutní kvantifikace používá několik ředění standardu, jež může být ve formě jednovláknové DNA (single strand DNA, ssDNA), dvouvláknové DNA (double strand DNA, dsDNA) či RNA, které se používají k vytvoření tzv. standardní křivky. Standardní křivka je tvořena lineární závislostí mezi koncentrací a hodnotou  $C_t$ . [75]

### **Relativní kvantifikace**

Metody využívající relativní kvantifikaci nám poskytují výsledky ve formě poměru hodnoty vnějšího standardu/kalibrátoru a hodnoty měřeného vzorku. [75]

### **High-resolution melting analýza**

High-resolution melting (HRM) analýza slouží především ke kontrole specifity real-time PCR reakce, ale i k průkazu bodových mutací. HRM je založena na sledování tzv. bodu tání ampliconů pomocí fluorescenčního barviva. Při pomalém zahřívání dvouvláknových PCR produktů dochází k rozvolňování vláken, přičemž v blízkosti bodu tání se skokově sníží míra fluorescence. Bod tání je vysoce specifický a závisí na nukleotidové sekvenci a délce řetězce. Při nespecifické PCR reakci se vytváří několik různých produktů s různým bodem tání, který se projeví několika skoky v míře fluorescence. V takovém případě při derivaci hodnot dostáváme graf s několika píky. [81]

#### **1.3.2.3. Průkaz buněčných markerů**

Mezi buněčné markery signalizující HPV infekci je řazen již dříve zmíněný protein p16<sup>INK4a</sup>. Tento protein je prokazován v řezech FFPE tkáně imunohistochemickými metodami, využívající vazby myší monoklonální protilátky na protein p16<sup>INK4a</sup>. Tato vazba je vizualizovaná pomocí sekundární protilátky s avidin-biotin-peroxidázovým komplexem. [63] [64] [82]

### **1.3.3. Kontrola kvality**

Kontrola kvality je součástí správné laboratorní praxe a jedním z nejdůležitějších kroků analýzy. Poskytuje nám informaci o tom, že výsledek je bez jakýchkoli pochybností správný. To zajišťuje systém interního a externího hodnocení kvality. Kdyby tento systém chyběl či selhal, mohlo by dojít vlivem chybného výsledku k poškození zdraví pacienta.

Kontrolu kvality na mezinárodní úrovni představuje společnost ISQua spolu s World Health Organization (WHO). Na základě jejich předpisů a doporučení zajišťuje kontrolu kvality ministerstvo zdravotnictví a její hodnocení je ukotveno v zákoně č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování. [83]

#### **1.3.3.1. Interní hodnocení kvality**

Podle znění ustanovení § 47 odst. 3 písm. b) zákona č. 372/2011 Sb. je poskytovatel zdravotních služeb v rámci zajištění kvality a bezpečí poskytovaných zdravotních služeb povinen zavést interní systém hodnocení kvality a bezpečí. [83]

Součástí interního hodnocení kvality (IHK) je laboratorní příručka a standardní operační postup (SOP).

Validace (verifikace) metody by měla být prováděna při zavádění každé nové metody, při modifikaci postupu, obměně přístrojové techniky nebo kdykoli při přetrvávajících problémech. [84]

##### **1.3.3.1.1. Vnitřní kontrola kvality**

Všechny PCR metody, standardní nebo nested PCR, ale i real-time PCR, by měly být vždy kontrolovány pomocí pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontrola zajišťuje správnost průběhu amplifikace, negativní umožňuje zjistit případné kontaminace chemikálií pro přípravu reakčních směsí nebo tzv. cross kontaminaci produkty předešlých PCR reakcí. V dnešní době je také nepostradatelnou součástí inhibiční kontrola, pomocí které se zjišťuje případná přítomnost inhibitorů Taq DNA polymerázy, jako např. heparin, etanol a další, v každém analyzovaném vzorku. Tímto způsobem je možné zamezit vydávání falešně negativních výsledků. Všechny tři kontroly jsou tedy minimem, ale i maximem vnitřní kontroly kvality u PCR metod. [85] [67]

## **Kvalitativní metody**

U kvalitativních metod je doporučeno postupovat dle pokynů výrobce bez modifikací, v souladu se zamýšleným použitím, účastnit se externího hodnocení kvality a vyšetřovat se vzorky vždy jeden pozitivní kontrolní vzorek, jeden negativní kontrolní vzorek, kontrolu izolace a amplifikace. [84]

## **Kvantitativní metody**

### **Přesnost**

Přesnost metody zobrazuje míru shody mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za stanovených podmínek. [86] Výrazem přesnosti jsou hodnoty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

Stanovení opakovatelnosti zahrnuje vyšetření minimálně deseti vzorků na třech koncentračních hladinách, přičemž jeden vzorek by měl mít koncentraci v oblasti meze stanovitelnosti metody, další v oblasti odpovídající střední koncentraci rozsahu kalibrační závislosti a další v oblasti nejvyššího bodu kalibrace. Následně je hodnocena směrodatná odchylka, průměr a variační koeficient. [84]

Měření reprodukovatelnosti metody spočívá v provedení stejné analýzy v deseti po sobě následujících pracovních dnech, lze akceptovat i deseti po sobě následujících stanovení provedených v různých dnech. Stejně jako u opakovatelnosti je hodnotícím faktorem průměrná hodnota, směrodatná odchylka a variační koeficient. [84]

### **Správnost**

Správnost metody je definována jako blízkost mezi výsledkem analýzy a skutečným výsledkem (hodnotou). [86]

### **Senzitivita**

Citlivostí metody se rozumí její schopností detekovat hledaný analyt v pozitivním vzorku (mutaci/patogenní DNA aj.). Jinak řečeno podíl biologických vzorků se správně pozitivním výsledkem testu a součtu vzorků správně pozitivních a falešně negativních [86]. S ní souvisejí i následující pojmy.

Mez detekce je minimální množství, nejčastěji koncentrace DNA/RNA/proteinu, které je ve vzorku s určitostí detekovatelné. Důležité především u kvalitativní analýzy. [86]

Mez stanovitelnosti je minimální množství, nejčastěji koncentrace DNA/RNA/proteinu, která je ve vzorku s určitostí kvantifikovatelná. S touto mezí je spjatá především real-time PCR. [86]

## **Specifita**

Schopnost metody určit právě pouze hledaný analyt se nazývá specifita. Interferující látky, které mohou nějakým způsobem ovlivnit analýzu, jsou většinou uvedeny výrobcem, nebo v odborné literatuře. Nejčastějším problémem bývá falešně zvýšený signál real-time PCR při tvorbě dimerů primerů u nespecifické detekce Siber greenem, či tvorba nespecifických produktů při nevhodně zvolené sekvenci primerů a teplotě annealingu. [86]

### **1.3.3.2. Externí hodnocení kvality**

Externí hodnocení kvality (EHK) není pro poskytovatele zdravotních služeb povinné. Jedná se tedy o dobrovolný proces, který bude proveden pouze na základě žádosti o jeho provedení. [83]

Oprávnění pro kontrolu kvality má Český institut pro akreditaci, který propůjčením certifikátu akreditace garantuje úroveň klinického zařízení a splnění nároků na poskytování kvalitní péče. Tento institut je členem European co-operation for Accreditation a International Laboratory Accreditation Cooperation. Systém akreditace klinických laboratoří probíhá dle norem ČSN EN ISO 15189:2007. [87] V oblasti molekulárně biologických laboratoří je akreditace nezbytností k vydávání validních výsledků.

Akreditovaným orgánem zajišťujícím EHK je společnost SEKK s.r.o., která poskytuje klinickým laboratořím komplexní služby v systému externího hodnocení kvality, zajištění správné laboratorní práce a vzdělávání v laboratorní medicíně. [88] V případě molekulárně biologických laboratoří je EHK nadnárodně zajišťována společností Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) a INSTAD e.V. [85]

EHK je uskutečňována vyšetřením vzorku materiálu zasílaného akreditovaným orgánem. Výsledky této analýzy jsou laboratořemi zasílány zpět a po hodnocení je vydáno stanovisko s případným certifikátem o úspěšném absolvování. [85]

## 2. PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1. Tvorba databáze (získání FFPET, struktura informací)

K získání dostatečně velkého (statisticky významného) souboru vzorků FFPET (Formaline Fixed Paraffin Embedded Tissue, parafinové bločky fixované ve formaldehydu) karcinomů sinonasální krajiny byla oslovena další dvě pracoviště patologie, která souhlasila se zasláním svých archivních bločků, a to Hlavův ústav patologie Všeobecné fakulní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (14 případů) a Ústav klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc (14 případů). Spolu se vzorky z archivu Fingerlandova ústavu patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové (46 případů) tvoří skupinu o celkové velikosti 74 vzorků FFPET karcinomů sinonasální krajiny.

V rámci hodnocení klinické studie „Úloha vysoce rizikových lidských papilomavirů (HPV) v etiopatogenezi zhoubných nádorů sinonasální oblasti“ (jejíž součástí byla i tato práce) bylo třeba získat i další informace o pacientech, jako je pohlaví, rodné číslo, jméno a příjmení, vztah k užívání cigaret, povolání, lokalizaci nádoru, datum diagnózy, TNM klasifikace, rozměr nádoru, počet nalezených uzlin, typing, subtyping, grading, stav resekcího okraje, druh terapie, nález recidivy, případné úmrtí pacienta a nález jiné malignity. Některé údaje se u některých případů i přes veškerou vynaloženou snahu nepodařilo získat. Z důvodu přehlednosti jsou v příloze dostupné pouze informace týkající se této práce přímo související s jejím cílem. Ochrana osobních údajů je zajištěna použitím pouze pořadového čísla, rok narození a pohlaví.

Etická komise FNHK a přednosta Fingerlandova ústavu patologie vydali souhlasné stanovisko s nakládáním osobních informací pacientů a provedením studie. Patříčné dokumenty jsou dostupné v příloze.

K testovaným vzorkům byla zařazena kontrolní skupina 20 FFPET od 10 mužů a 10 žen zahrnující slizniční vzorky chronické rinitidy a sinusitidy.

Celá databáze s výsledky jednotlivých vyšetření se nachází v příloze této práce.

## 2.2. Základní barvení Hematoxylinem-eosinem

Pomůcky a přístroje: sáňkový mikrotom Leica SM2010R (Leica Biosystems, Wetzlar, Německo), barvicí automat Tissue-Tek Prisma E2D (Sakura, Flemingweg, Holandsko), montovací automat Tissue-Tek Film E2 (Sakura, Flemingweg, Holandsko), podložní skla, krycí fólie, etanol, xylen, aceton (Lach:ner, Neratovice, Česká Republika)

Ke zhotovení preparátů bylo použito řezů o tloušťce 5 $\mu$ m krájené na sáňkovém mikrotomu na podložní skla se zábrusnou plochou, natahované na roztok želatiny (8 g želatiny v 250 ml destilované vody přivedené k varu a ochlazené na laboratorní teplotu) na vyhřívané ploténce. K manipulaci s parafínovými řezy bylo použito preparačních jehel.

Po důkladném odstranění přebytečné želatiny a osušení preparátů byly vloženy do barvicího automatu a barveny dle programu Mayer He. Program se skládá z 10min sušení ve vyhřívané komůrce, tří deparafínovacích lázní recyklovaného xylenu (2x4 a 1x3 min), dvou zavodňovacích lázní 96% etanolu s metanolem (2x3 min), jedné lázně 70% alkoholu (2 min), jedné lázně destilované vody (20 s), lázně Mayerova hematoxylinu (4 min), promývání tekoucí vodou (5 min), lázně 1% roztoku eosinu (40 s), promývání tekoucí vodou (10 s), lázně 70 % alkoholu (30 s), dvě lázně 95 % alkoholu s metanolem (2x1 min), lázně acetonu (2 min), dvě lázně recyklovaného xylenu (3 a 2 min). Montování in-line montovacím automatem pomocí krycí fólie.

### 2.3. Imunohistochemické stanovení p16

Pomůcky a přístroje: sáňkový mikrotom Leica SM2010R (Leica Biosystems, Wetzlar, Německo), barvicí automat BenchMark ULTRA (Ventana Medical System Inc., Tucson, Arizona, USA), montovací automat Tissue-Tek Film E2 (Sakura, Flemingweg, Holandsko), horkovzdušný termostat UN260 (Mettler, Schwabach, Německo), podložní skla Starfrost Green (Light Labs, Dallas, USA), 200 ml nádoby na lázně acetonu, etanolu a xylenu (Lach:ner, Neratovice, Česká Republika).

Ke zpracování FFPE imunohistochemickou metodou na průkaz proteinu p16<sup>INK4a</sup> byly krájeny řezy o tloušťce 5 µm pomocí sáňkového mikrotomu, na podložní skla se zelenou matovanou plochou, natahované na kapku destilované vody na vyhřívané ploténce. Následovalo důkladné odstranění přebytečné vody pomocí svého filtračního papíru a sušení v termostatu (60 min) při teplotě 60 °C.

Další postup probíhal pomocí automatického přístroje podle předem definovaného programu A – p16 ve výrobce dodávaném softwaru BenchMark ULTRA. Prvním krokem programu bylo předehřátí skel na 65°C po dobu 4 min s následným zahřátím na 72°C, během kterého došlo k odparafinování řezů. Následovalo kondicionování buněk kondicionérem buněk 1. s dobou působení 8 min při 95°C. Po oplachu následovalo ochlazení skel na 36°C aplikace 1 kapky protilátky p16 (E6H4) Histo a inkubace 4 min. Po omytí následoval krok jádrového barvení, kdy byla na řez nanášena jedna kapka hematoxylinu II a ponechána po dobu 4 min. Posledním krokem bylo nanášení jedné kapky Bluing Reagent a inkubace 4 min při laboratorní teplotě.

Takto obarvené preparáty byly odvodněny dehydratační procedurou obsahující oplach roztokem mírného saponátu na nádobí, oplach destilovanou vodou, 1 min v lázni se 70% etanolem, 1min ve 2 lázních se 100% etanolem, oplach ve 100% acetonu a 2 x 30 s v lázni s xylemem. Následně je možné takto odvodněná skla montovat v automatu.

V každém běhu byl použit systém interní kontroly kvality zastoupený jedním sklem s řezem tkáně se známou pozitivitou p16<sup>INK4a</sup>, jež byl zkontrolován před odečtením výsledků testu odpovědným lékařem a výsledky zaznamenány do databáze.

## 2.4. In situ hybridizace

### 2.4.1. Detekce DNA

Pomůcky a přístroje: sáňkový mikrotom Leica SM2010R (Leica Biosystems, Wetzlar, Německo), barvicí automat BenchMark ULTRA (Ventana Medical System Inc., Tucson, Arisona, USA), montovací automat Tissue-Tek Film E2 (Sakura, Flemingweg, Holandsko), horkovzdušný termostat UN260 (Mettler, Schwabach, Německo), podložní skla Starfrost Green (Light Labs, Dallas, USA), kontrolní systém HPV 3 in 1 Systém Control Slides (Ventana - Roche, Basilej, Švýcarsko), detergent DNA-OFF 500 ml (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japonsko), 200 ml nádoby na lázně acetonu, etanolu a xylenu (Lach:ner, Neratovice, Česká Republika).

Pro detekci HPV DNA v FFPET byla vybrána imunohistochemická metoda ISH INFORM HPV III Family 16 Probe ve spojení se soupravou ISH View Blue Plus Detection Kit (Ventana - Roche, Basilej, Švýcarsko), která obsahuje detekční směs značených lidských HPV genomických sond. Tyto sondy detekují HPV typů 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 66.

Z bloků FFPET byly krájeny řezy o tloušťce 5  $\mu\text{m}$  pomocí sáňkového mikrotomu na podložní skla se zelenou matovanou plochou, natahované na kapku destilované vody na vyhřívané ploténce. Následovalo důkladné odstranění přebytečné vody pomocí savého filtračního papíru a sušení v termostatu (60 min) při teplotě 60  $^{\circ}\text{C}$ . Pro dekontaminaci řezné plochy žiletky byl použit detergent.

Jako systém interní kontroly kvality byl použit kontrolní systém, kde každé kontrolní podložní sklo obsahuje tři umělé FFPET nádorů vytvořené použitím charakterizovaných lidských buněčných linií. První řez je původem z buněčné linie CaSki, která obsahuje zhruba 200-400 kopií HPV typu 16 na buňku a zastupuje silně pozitivní kontrolu. Druhou slabě pozitivní kontrolou je řez buněčné linie HeLa obsahující 10-50 kopií HPV typu 18 na buňku. Negativní kontrolu zastupuje řez buněčné linie C33A HPV negativního lidského cervikálního karcinomu. V každém běhu je součástí analýzy jedno kontrolní sklo.

Proces detekce HPV DNA výše zmíněnou metodou byl uskutečněn automatickým barvicím přístrojem podle programu 223 HPV 16 ISH. Nejprve byla skla opatřena čárovým kódem odpovídajícím protokolu sondy a poté vložena do barvicího automatu. Barvicí cyklus obsahuje několik jednotlivých kroků, mezi které patří: sušení, odparafinování, předběžné zpracování, předfixování, kondicionování buněk, natrávení enzymem s demaskováním antigenu, denaturace, hybridizace a jádrové barvení.



Proces sušení zahrnovalo přehřátí na 62°C a inkubaci po dobu 4 min, kde se tkáňové řezy zbavily vzdušné vlhkosti. Odparafinování proběhlo zahřátím na 72°C a oplachem saponátem Ventana EZ Prep. Následoval krok kondicionace buněk roztokem Cell Conditioning 2 v módu standard nastaveného na 86°C po dobu 8 min a natrávení enzymem Ventana ISH Protease 3, jehož doba působení byla zvolena na 4 min. Po oplachu byla aplikována jedna kapka Inform HPV Family 16 sondy s následným krokem denaturace po dobu 12 min a hybridizace po dobu 2 h. Po hybridizaci byl nanesen detekční systém Ventana Plus Detection Kit obsahující králičí anti-DNP protilátku, myší anti-králičí protilátku, kozí anti-myší protilátku, pufr, streptavidin, MgCl<sub>2</sub>, nitrotetrazolinovou modř a 5-bromo-4-chromo-3-indoyl fosfát. Na konci programu bylo dobarveno pozadí pomocí Ventana Red Counterstain II.

Po skončení programu bylo nutné pokračovat dehydratační procedurou obsahující oplach roztokem mírného saponátu na nádobí, oplach destilovanou vodou, 1 min v lázni se 70% etanolem, 1min ve 2 lázních se 100 % etanolem, oplach ve 100% acetonu a 2 x 30 s v lázni s xylenem. Následně je možné takto odvodněná skla montovat v automatu.

Odečtení výsledků bylo provedeno odpovědným lékařem pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 10x až 40x podle doporučení výrobce příručkou Interpretation Guide – Inform HPV ISH Probes (Ventana – Roche, Basilej, Švýcarsko). Výsledky byly zaznamenány do databáze.

### 2.4.2. Detekce RNA

Pomůcky a přístroje: sáňkový mikrotom Leica SM2010R (Leica Biosystems, Wetzlar, Německo), horkovzdušný termostat UN260 (Mettler, Schwabach, Německo), podložní skla SuperFrost Plus Slides (Light Labs, Dallas, USA), Pretreat Kit, Detection Kit a Control system buněčné linie HeLa (Advanced Cell Diagnostics Inc., Hayward, California, USA), teploměr, varná kádinka, pinzeta, stojánek na podložní skla, aloba, odpadní nádoba, 200 ml nádoby na lázně acetonu, etanolu a xylenu (Lach:ner, Neratovice, Česká Republika), fix pro hydrofobní bariéru Immerge Hydrophobic Barrier Pen (Advanced Cell Diagnostics Inc., Hayward, California, USA), montovací médium Pertex (Bamed, České Budějovice, Česká Republika), destilovaná voda, roztok hydroxidu amonného.

Pro detekci HPV RNA v FFPE tkáni byla vybrána imunohistochemická metoda ISH RNA Scope (Advanced Cell Diagnostics Inc., Hayward, California, USA), která pracuje na principu hybridizace sond s hledanou RNA HPV proteinů E6/E7 a následné několikanásobné amplifikace signálu.

Z bloků FFPE byly krájeny řezy o tloušťce 5  $\mu\text{m}$  pomocí sáňkového mikrotomu na předem označená podložní skla natahované na kapku destilované vody na vyhřívání ploténce. Následovalo důkladné odstranění přebytečné vody pomocí svého filtračního papíru a sušení v termostatu (60 min) při teplotě 60  $^{\circ}\text{C}$ . Během procesu validace metody nebyla zjištěna potřeba dekontaminace rezné plochy žiletky mezi jednotlivými vzorky.

V každém běhu barvení byla použita interní kontrola kvality představovaná kontrolním sklem s řezem tkáně z buněčné linie HeLa, jež bylo součástí kitu. Na tomto skle byla použita sonda pro house-keepingový gen Probe – Hs – PPIB nebo Probe – Hs – UBC.

Prvním krokem metody byla příprava tkáně k vlastní detekci, jež zahrnovala odparafínování tkáňových řezů a odhalení buněčných struktur. Odparafínování bylo provedeno dvěma lázněmi xylenu po 5 min, dvěma lázněmi 100% etanolu po 1 min. Po důkladném osušení řezu bylo aplikováno 5 až 8 kapek Pretreat 1 a inkubováno 10 min při laboratorní teplotě. Po důkladném opláchnutí dvěma lázněmi destilované vody byla skla ve stojanu ponořena do vroucího Pretreat 2 (1x) a inkubována po dobu 15 min při teplotě 100 – 104  $^{\circ}\text{C}$ . Následovalo okamžité opláchnutí destilovanou vodou a 100 % etanolem a následným důkladným osušením řezů. Kolem každého řezu byla vytvořena hydrofobní bariéra pomocí dodávaného fixu o minimální velikosti 2 x 2 cm. Po zaschnutí bariéry bylo aplikováno asi 5 kapek Pretreat 3 a inkubováno 15 min při 40  $^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí doby inkubace byla skla dvakrát opláchnuta destilovanou vodou.

Osušením byla odstraněna přebytečná tekutina a nanášeno asi 5 kapek příslušného roztoku sondy (RNAScope Probe HPV 16, RNAScope Positive Control Probe PPIB) a inkubováno 120 min při 40°C ve vlhké komůrce. Po slití sondy do odpadové nádoby byla skla dvakrát oplachována roztokem 1x Wash Buffer po dobu 2 min a přebytečná tekutina odstraněna. Následoval několika krokový postup zahrnující postupné nanášení asi 4 kapek na každý řez roztoků Amp 1, 2, 3, 4, 5 a 6, přičemž každé nanášení roztoku bylo následováno inkubací ve vlhké komůrce po dobu 30, 15, 30, 15, 30 a 15 min při 40 °C (Amp 1-4) nebo při laboratorní teplotě (Amp 5 a 6) ve vlhké komůrce a dvakrát oplach v lázni obsahující roztok 1x Wash Buffer po dobu 2 min. Dalším krokem bylo nanášení 120 µl roztoku DAB na každý řez a inkubací 10 min při laboratorní teplotě. Roztok DAB bylo nutné připravit smísením ekvivalentního množství roztoků DAB Brown A a DAB Brown B. Po inkubaci bylo nutné zlikvidovat roztok DAB do speciální nádoby označené jako nebezpečný odpad kvůli jeho toxicitě a adekvátně jej zlikvidovat dle směrnice zařízení. Po dvojitým opláchnutím destilovanou vodou byla skla po dobu 2 min ponořena do roztoku Gillova hematoxylinu, opláchnuta destilovanou vodou, opláchnuta 0,02% roztokem hydroxidu amonného, opět opláchnuta destilovanou vodou a po 2 minutách přenášena z lázni 70% etanolu, dvakrát 100 % etanolu a xylenu. Ihned byla skla s obarvenými tkáňovými řezy montována médiem a překryta krycími skly.

Odečtení výsledků barvení bylo provedeno odpovědným lékařem pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 100x až 400x a výsledky zaznamenány.

## 2.5. Izolace DNA/RNA

Pomůcky a přístroje: sáňkový mikrotom Leica SM2000R, vortex FVL-2400N Combi Spin (BioSan, Riga, Lotyšsko), centrifuga 5424 R (Eppendorf Hamburg, Německo), termoblok Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko), mikropipety 0,1-2,5  $\mu$ l, 0,5-10  $\mu$ l, 2,5-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l a 100-1000  $\mu$ l (Eppendorf Hamburg, Německo), pipetovací špičky Ep Dualfilter T.I.P.S.<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo), zkumavky 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock (Eppendorf, Hamburg, Německo), detergent DNA-OFF 500 ml (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japonsko), xylén (Lach:ner, Neratovice, Česká Republika), etanol a izopropanol (Penta, Praha, Česká Republika)

Pro potřeby izolace DNA/RNA bylo použito několik parafinových řezů o tloušťce 5  $\mu$ m z bločků FFPET stočených do ruliček krájených pomocí sáňkového mikrotomu. Počet ruliček byl odhadnut tak, aby celková plocha izolovaného materiálu dosahovala plochy cca 1  $\text{cm}^2$ . Mezi krájením jednotlivých bločků byl použit detergent k očištění plochy žiletky, preparačních jehel a nitrilových rukavic, aby nedocházelo ke kontaminaci DNA mezi jednotlivými případy a zároveň tak bylo dosaženo úspory v množství použitých žiletek. Ruličky byly uchovávány po dobu maximálně 48 h pro DNA a 24 h pro RNA v plastových 1,5 ml zkumavkách označených identifikačním číslem vzorku a pořadovým číslem.

Izolace DNA byla provedena pomocí izolačního kitu Cobas - DNA Sample preparation kit (Roche, Basilej, Švýcarsko) podle standardního operačního postupu, který je v souladu s protokolem výrobce kitu. Deparafinace vzorku byla provedena napipetováním 0,5 ml čistého xylenu s následnou homogenizací pomocí vortexu a inkubací po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Převedení do vodné fáze proběhlo pomocí 0,5 ml absolutního etanolu, vortexováním a inkubací 5min při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace 2 min při centrifugační síle 20 000 x g. Supernatant byl odstraněn bez porušení pelety pomocí pipety s pipetovací špičkou opatřenou filtrem. Peleta rozvířena vortexováním s 1 ml absolutního etanolu (Penta, Praha, Česká Republika) a opětovnou centrifugací za stejných podmínek (2 min 20 000 x g). Supernatant byl odpipetován a peleta sušena ve vyhřívaném bloku 10 min při 56 °C. Po pečlivém vysušení bylo přidáno 180  $\mu$ l DNA tkáňového lýtického pufru (DNA TLB) a 70  $\mu$ l rekonstituované proteinkinázy K a inkubováno 60 min ve vyhřívaném bloku při 56 °C. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky vířeny pomocí vortexu po dobu 10 s a inkubovány ve vyhřívaném bloku po dobu 60 min při 96 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu následovala centrifugace při síle 8 000 x g po dobu 30 s a přidavek 200  $\mu$ l DNA PBB s inkubací 10 min, po které bylo přidáno 100  $\mu$ l izopropanolu

a promícháno. Tento lyzát byl přemístěn do označené zkumavky s vloženým filtrem a centrifugován 1 min při síle 8 000 x g. Přefiltrovaná kapalina i se zkumavkou byla zlikvidována do biologického odpadu a filtr nasazen na novou sběrnou zkumavku. Následně bylo přidáno 500 µl pracovního roztoku WB I, centrifugováno při síle 8 000 x g po dobu 1 min, opětovně nasazen filtr na novou sběrnou zkumavku a bylo přidáno 500 µl pracovního roztoku WB II. Dalším krokem byla centrifugace 1 min při síle 8 000 x g, po které byl filtr nasazen na novou sběrnou zkumavku a znovu centrifugován 1 min při síle 20 000 x g. Nasazením na označenou 1,5 ml zkumavku, přidáním 70 µl roztoku DNA EB s inkubací 5 min a centrifugací 1 min při síle 8 000 x g bylo získáno 70 µl vzorku. Takto izolovanou DNA/RNA je možné skladovat při teplotě -20 °C až 60 dní.

Izolace RNA byla provedena pomocí izolačního kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle standardního operačního programu v souladu s protokolem výrobce kitu. Odparafínování bylo provedeno přidáním 1 ml xylenu ke vzorku s následným vortexováním a centrifugací 2 min při 20 000 x g. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a k peletě přidán 1 ml absolutního etanolu, vzorek zvortexován a centrifugován 2 min při 20 000 x g. Poté byl supernatant opět důkladně odsát a vialky nechány otevřené při laboratorní teplotě. Po důkladném vysušení pelety bylo přidáno 150 µl PKD pufru a promícháno vortexem s následným přidavkem 10 µl proteinázy K a opatrným promícháním obsahu vialky. Během 15 min inkubace při 56 °C proběhla proteolýza, která byla ukončena 15 min inkubací při 80 °C a šokovým ochlazením po dobu 3 min na ledu. V následujícím kroku byly vzorky centrifugovány 15 min při 20 000 x g, přičemž byl výsledný supernatant napipetován do 1,5 ml vialky s 10 µl DNase I a 16 µl DNase Booster puftrem. Všechny vzorky byly zvortexovány, centrifugovány 1 min při 8 000 x g, inkubovány 15 min při laboratorní teplotě a následně k nim bylo přidáno 320 µl RBC pufru a 720 µl absolutního etanolu. Po důkladném promíchání bylo napipetováno 700 µl vzorku RNeasy MinElute kolony nasazené na sběrné zkumavce a tento systém centrifugován 30 s při 8 000 x g. Tento postup byl opakován do spotřebování veškerého vzorku. Poté byla sběrná zkumavka zlikvidována a do kolony bylo napipetováno 500 µl RPE pufru a po nasazení nové sběrné zkumavky celý systém opět centrifugován 30 s při 8 000 x g. Tento krok byl zopakován, přičemž po něm následovala opětovná likvidace sběrné zkumavky, nasazení nové a centrifugace 5 min při 20 000 x g s nezavíčkovanými kolonkami. Po důkladném vyschnutí membrány bylo přidáno 20 µl RNase free vody a po nasazení nové sběrné 1,5 ml zkumavky centrifugováno 1 min při 20 000 x g. Takto bylo získáno 18 µl RNA.

## 2.6. EIA

Pomůcky a přístroje: vortex FVL-2400N Combi Spin (BioSan, Riga, Lotyšsko), centrifuga 5424 R (Eppendorf Hamburg, Německo), termoblok Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko), sterilní PCR box DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Riga, Lotyšsko), laminární box Safeflow 1.2 (Bioair, Milano, Itálie), cykler T-100 Thermal Cycler (Bio-Rat, Herkules, Kalifornie, USA), horkovzdušný termostat UN260 (Memmert, Schwabach, Německo), automatický fluorimetr ELx800 (BioTek, Winooski, Vermont, USA), mikropipety 0,1-2,5  $\mu$ l, 0,5-10  $\mu$ l, 2,5-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l a 100-1200  $\mu$ l (Eppendorf Hamburg, Německo), multikanálová pipeta Explorer 1200 (Eppendorf, Hamburg, Německo), pipetovací špičky Ep Dualfilter T.I.P.S.<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo), sterilní mikrozkušavky (AHN Biotechnologie, Northausen, Německo), zkumavky 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock (Eppendorf, Hamburg, Německo),

Detekce HPV pomocí screeningového EIA kit HPV GP HR (Diassay, Rijswijk, Holandsko) byla provedena podle manuálu výrobce. Tento kit využívá primery GP5+/6+ zaměřené na L1 konzervativní sekvenci HPV viru a je koncipován k průkazu HPV typů 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68. Výsledná délka amplifikovaného úseku činí 140 bp [89]

K amplifikaci byl použit HPV GP PCR master mix 39,8  $\mu$ l k němuž bylo přidáno 0,2  $\mu$ l Taq DNA polymerázy na jeden vzorek. Po důkladné homogenizaci master mixu byl rozpipetován do 0,2 ml PCR sterilních mikrozkušavek po 40  $\mu$ l. za použití sterilních rukavic a sterilní zástěry. Příprava a rozpipetování master mixu byla provedena na ledu ve sterilním PCR boxu. K master mixu bylo v laminárním boxu přidáno 10  $\mu$ l izolované DNA vzorků, negativní izolační kontroly a pozitivní a negativní PCR kontroly. Ihned po přidání DNA byly vzorky umístěny do cykleru a spuštěn program HPV\_EIA. Amplifikace probíhala dle návodu výrobce, kde prvním krokem byla denaturace při 94°C na 4 min. Následovalo čtyřicet cyklů o třech krocích, kde denaturace probíhala 20 s při 94 °C, annealing 30 s při 38 °C a extenze 80 s při 71 °C. Finální krok extenze trval 4 min při 71°C, který následovalo ochlazení na 4°C. Produkty byly skladovány při -20 °C.

K detekci byla použita mikrotitrační destička s 96 jamkami, která je součástí kitu. Do každé jamky bylo přidáno 50  $\mu$ l dilučního pufru pomocí multikanálové pipety. Do jamky A1 bylo napipetováno 5  $\mu$ l negativní EIA detekční kontroly, do jamky B1 5  $\mu$ l HPV GP HR pozitivní EIA detekční kontroly, do jamky C1 5  $\mu$ l negativní izolační kontroly, do jamky D1 5  $\mu$ l negativní PCR kontroly. Do následujících jamek bylo napipetováno 5  $\mu$ l amplifikovaných vzorků a do poslední jamky 5  $\mu$ l HPV GP pozitivní PCR kontroly. Destička byla zakryta krycí fólií a vložena do horkovzdušného termostatu, kde byla

inkubována 60 min při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly jamky třikrát promyty 300 µl mycího pufru a jeho zbytek odstraněn přiložením destičky na savý papír. Následuje přidání 100 µl denaturačního činidla do každé jamky, překrytí destičky novou fólií a inkubace 15 min při laboratorní teplotě. Po této inkubaci a odsání denaturačního činidla byl proveden oplach třemi dávkami 300 µl mycího pufru, jehož zbytky byly opět odstraněny přiložením na savý papír. Po tomto kroku bylo přidáno 50 µl roztoku sond, destička přikryta fólií a inkubována 60 min při 55 °C. Po inkubaci následoval opět oplach 3 x 300 µl mycím pufrům a jeho přebytek odsán přiložením na savý papír. Dále bylo do každé jamky napipetováno 50 µl roztoku substrátu, destička překryta fólií a inkubováno 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Tato reakce byla po uplynutí doby inkubace zastavena přidáním 50 µl stop činidla do každé jamky. Konečným krokem bylo měření absorbance při vlnové délce 450 nm pomocí automatického fotometru s analýzou dat pomocí programu Gen5.

Analýza dat byla provedena podle doporučení výrobce a byly splněny tyto podmínky: absorbance HPV GP HR pozitivní EIA detekční kontroly je rovna nebo vyšší než 0,500; absorbance HPV GP HR negativní EIA detekční kontrola, negativní PCR kontrola a negativní izolační kontrola je nižší nebo rovna 0,200. Stanovení cut-off hodnoty bylo provedeno pomocí výpočtu: průměrná hodnota negativní izolační a negativní amplifikační kontroly vynásobená 3.

## 2.7. Typizace HPV

Pomůcky a přístroje: vortex FVL-2400N Combi Spin (BioSan, Riga, Lotyšsko), centrifuga 5424 R (Eppendorf Hamburg, Německo), sterilní PCR box DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Riga, Lotyšsko), laminární box Safeflow 1.2 (Bioair, Milano, Itálie), cykler T-100 Termal Cyclor (Bio-Rat, Herkules, Kalifornie, USA), hybridizační automat B20 (Bee Robotics, Severní Wales, Velká Británie), mikropipety 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2,5-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl a 100-1200 µl (Eppendorf, Hamburg, Německo), pipetovací špičky Ep Dualfilter T.I.P.S.<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo), sterilní mikrozkušavky (AHN Biotechnologie, Northausen, Německo), zkumavky 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock (Eppendorf, Hamburg, Německo).

K typizaci HPV byly vybrány vzorky pozitivní z předchozího screeningového EIA testu a vzorky dlaždicobuněčných karcinomů s nadměrnou expresí p16<sup>INK4a</sup> popřípadě výraznými morfologickými rysy.

Typizace byla provedena typizačním kitem RHA kit HPV SPF10-LiPA25, který umožňuje identifikaci HPV typů 6, 11, 16, 18, 31, 33 - 35, 39, 40, 42 – 45, 51 – 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 74. Tato identifikace probíhá pomocí reverzní hybridizace biotinylovaných produktů amplifikace o délce 65 bp prováděné pomocí PCR s primery SPF10, které jsou cílené na vysoce konzervativní sekvenci genu pro L1 protein HPV.

Nejprve bylo nutné rozaliquotovat PCR master mix do 0,2 ml PCR sterilních mikrozkušavek po 40 µl ve sterilním PCR boxu za použití sterilních rukavic a sterilní zástěry. K master mixu bylo v laminárním boxu na ledu přidáno do každé mikrozkušavky 10 µl izolované DNA vzorků a do mikrozkušavky označené jako KO+ (pozitivní kontrola) 10 µl HPV SPF10 Positive Control. Vzorky i kontrola byly před otevřením 15 s centrifugované na 8 000 x g. Ihned po přidání DNA byly vzorky umístěny do cyklu a spuštěn program HPV\_SPF10. Amplifikace probíhala dle návodu výrobce, kde byla prvním krokem denaturace při 94 °C na 9 min, kterou následovalo čtyřicet cyklů tříkrokové PCR. Prvním krokem byla denaturace, která probíhala 30 s při 94°C, annealing 45 s při 52 °C a extenze 45 s při 72 °C. Finální krok extenze trval 5 min při 72 °C, který následovalo ochlazení na 4 °C. Produkty byly skladovány při -20 °C.

Detekční část metody probíhala v detekční místnosti na hybridizačním přístroji. V prvním kroku bylo 10 µl produktu amplifikace homogenizováno s 10 µl Denaturation solution a inkubováno 5 min při laboratorní teplotě. Každý strip byl označen tužkou na horní okraj identifikačním číslem a vložen do žlábků detekčního panelu. Jednotlivé



denaturované obsahy byly přepipetovány do žlábků s identickým identifikačním číslem stripu s důrazem na zabránění kontaminace mezi jednotlivými žlábků (na každý vzorek nová špička, použití sterilních rukavic). Následoval program HPV\_SPF10 probíhající dle následující tabulky:

Krok	Kanál	čas	Teplota	Pipetovaný objem	Rychlost míchání	
Inkubace		5min			3	
Disperze	Hybridization		49°C	2ml		
Inkubace	solution	60min			3	
Promývání	Stringent wash solution			2ml		
Inkubace		3min			3	
Promývání				2ml		
Inkubace		3min				
Promývání				2ml		
Inkubace		30min			3	
Promývání		Rinse solution			2ml	
Chlazení						
Promývání			2ml			
Promývání	Conjugate solution		2ml			
Inkubace		30min		3		
Promývání	Rinse solution		2ml			
Inkubace		3min		3		
Promývání			2ml			
Inkubace		3min		3		
Promývání	Substrate buffer		2ml			
Inkubace		3min		3		
Promývání	Substrate solution		2ml			
Inkubace		30min		3		
Promývání	Rinse solution		2ml			
Inkubace		3min		3		
Promývání			2ml			
Inkubace		10min		3		
Vysátí						

Tabulka 4: Program HPV\_SPF10 na přístroji B20 (Bee Robotics, Severní Wales, Velká Británie).

Po skončení programu byly stripy pinzetou přeneseny na filtrační papír a ponechány ve tmě při laboratorní teplotě do úplného vyschnutí. Interpretace výsledků byla provedena dle datasheetu dodaného výrobcem.

## 2.8. Beta globin

Pomůcky a přístroje: real-time termocykler Cobas LightCycler 480 (Roche, Basilej, Švýcarsko), vortex FVL-2400N Combi Spin (BioSan, Riga, Lotyšsko), centrifuga 5430 (Eppendorf Hamburg, Německo), sterilní PCR box DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Riga, Lotyšsko), laminární box Safeflow 1.2 (Bioair, Milano, Itálie), fotometr NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), mikropipety 0,1-2,5  $\mu$ l, 0,5-10  $\mu$ l, 2,5-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l a 100-1200  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Německo), pipetovací špičky Ep Dualfilter T.I.P.S.<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo), sterilní mikrozkušavky (AHN Biotechnologie, Northausen, Německo), zkumavky 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock (Eppendorf, Hamburg, Německo), žebříček pro elektroforézu Ladder 100 bp (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA).

Jelikož nebyla součástí kitů EIA kit HPV GP HR i typizačního RHA kit HPV SPF10-LiPA25 amplifikační kontrola PCR, bylo nutné posoudit kvalitu získané DNA/RNA a provést kontrolní amplifikaci house-keepingového genu (v našem případě  $\beta$  globin) či jeho mRNA.

Pro potřeby relativního srovnání vzorků u real-time PCR byla měřena koncentrace izolované DNA na fotometru a upravena ředěním DNase-RNase Free vodou na koncentraci 10 nmol/ $\mu$ l.

Pro kontrolu stavu DNA byla použita izolovaná DNA vzorků, jež byla používána k metodám detekce DNA HPV. K amplifikaci  $\beta$  globinu byly použity primery PC03 (5'-ACACA ACTGTGTTCACTAGC-3'), PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') a GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') připravené firmou GeneriBiotech (Hradec Králové, Česká Republika) jejichž amplifikací vznikly produkty o délkách 100 bp (PC03/PC04) a 268 bp (PC04/GH20). [90] Master mix byl složen z 0,3  $\mu$ l forward a 0,3  $\mu$ l reverse primerů o koncentraci 10  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ l KAPA SYBR Fast qPCR Kit Master Mix (2x) Universal (Kapa Biosystems, Boston, USA), 5  $\mu$ l DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l a 6,9  $\mu$ l vody pro PCR.

Při validaci metody a určování hodnoty threshold byla použita PCR reakce s programem odpovídajícím podmínkám u real-time PCR a k detekci gelová elektroforéza na 2 % agarózovém gelu. Pro přípravu 2 % agarózového gelu bylo použito 70 ml TBE pufru (1x); 1,4 g agarózy a 7  $\mu$ l SYBR Safe, přičemž byla tato směs vařena v mikrovlnné troubě cca 2 min při výkonu 800 W. Pro naplnění elektroforetické vany bylo připraveno dalších 430 ml TBE pufru (1x). Pro hodnocení elektroforetického dělení byl použit žebříček po 100 bp.

Real-time PCR reakce probíhala v cykleru Cobas podle programu: počáteční denaturace 95°C po dobu 3 min; 40 cyklů denaturace 3 s na 95°C s teplotní změnou 4,4 °C/s, annealing 30 s při 55 °C s teplotní změnou 2,2 °C/s, extenze 30 s při 72 °C s teplotní změnou 4,4 °C/s. Následovala kontrolní HRM analýza: 3 s při 95 °C, 30 s při 55 °C, 20 s při 40 °C s postupným zvyšováním teploty o 0,14 °C každé 2 s.

## 2.9. mRNA

Pomůcky a přístroje: real-time termocykler Cobas LightCycler 480 (Roche, Basilej, Švýcarsko), cykler T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Herkules, Kalifornie, USA), vortex FVL-2400N Combi Spin (BioSan, Riga, Lotyšsko), centrifuga 5430 (Eppendorf Hamburg, Německo), sterilní PCR box DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Riga, Lotyšsko), laminární box Safeflow 1.2 (Bioair, Milano, Itálie), mikropipety 0,1-2,5  $\mu$ l, 0,5-10  $\mu$ l, 2,5-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l a 100-1200  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg, Německo), pipetovací špičky Ep Dualfilter T.I.P.S.<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo), sterilní mikrozkušavky (AHN Biotechnologie, Northausen, Německo), zkumavky 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock (Eppendorf, Hamburg, Německo).

Průkaz přítomnosti mRNA E6 HPV v nádorových buňkách byl prováděn pomocí reverzní transkripce vyizolované mRNA a následné real-time PCR amplifikace cDNA fragmentů E6 HPV.

Reverzní transkripce byla provedena pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems - Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA). Do sterilních mikrozkušavek o objemu 0,2 ml byl ve sterilním PCR boxu na ledu za použití sterilních rukavic a sterilní zástěry připraven master mix obsahující 2  $\mu$ l 10x RT Buffer, 0,8  $\mu$ l 25x DTP Mix o koncentraci 100 mM, 2  $\mu$ l 10x RT Random Primers, 1  $\mu$ l MultiScribe Reverse Transcriptase a 4,2  $\mu$ l Nuklease-free H<sub>2</sub>O na jednu reakci. K master mixu bylo v laminárním boxu na ledu přidáno do každé 0,2 ml mikrozkušavky 10  $\mu$ l izolované RNA vzorků. Ihned po přidání RNA vzorků byly mikrozkušavky přeneseny do detekční místnosti a umístěny do cyklu a spuštěn program REVTR\_AB. Čtyřkrokový program byl zahájen teplotou 25 °C na 10 min a dále pak následovaly kroky při 37 °C na 120 min, 85 °C na 5 min a závěrečný krok ochlazení na 4 °C. Takto připravená cDNA byla ihned zpracována metodou real-time PCR a zbytek uchován při -20 °C.

Kvalita cDNA byla zhodnocena pomocí amplifikace fragmentu cDNA pro lidský  $\beta$  globin párem primerů PC03/PC04 podle protokolu shodného pro amplifikaci u DNA.

Real-time PCR směs byla složena ze 7,5  $\mu$ l Power SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems - Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA), 0,3  $\mu$ l forward a 0,3  $\mu$ l reverse primerů o koncentraci 500 nM [91], 6,9  $\mu$ l PCR vody a 5  $\mu$ l cDNA vzorku. Program PCR cDNA\_HPv byl navržen: 40 cyklů s počáteční denaturací 10 min při 95  $^{\circ}$ C, každá další denaturace 15 s při 95  $^{\circ}$ C, annealing 58  $^{\circ}$ C po dobu 15 s, extenze 15 s při 60  $^{\circ}$ C a konečné zchlazení na 4  $^{\circ}$ C.

Navržení primerů proběhlo dle Gao et.al. (2012) [91] jejíž sekvence uvádí tabulka 5.

Typ HPV	Protein	Vlákno	Sekvence (5' $\rightarrow$ 3')	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}$ C)
16	E6-1	FW	ACAAACCGTTGTGTGATTTGTT	55,72
		REV	CAGTGGCTTTTGACAGTTAATACA	55,7
	E6-2	FW	GCAAAGACATCTGGACAAAAAG	55,57
		REV	ACCGACCCCTTATATTATGGAATC	56,62
18	E6	FW	GATCTGTGCACGGAAGTGAACA	60,9
		REV	GGTTATTTCTATGTCTTGCAGTG	54,44
35	E6	FW	AGAATTACAGCGGAGTGAGGTA	58
		REV	CACAAATCATAGCATGCAAAGTC	55,6

Tabulka 5: Sekvence jednotlivých primerů pro amplifikaci cDNA E6/E7 virových proteinů HPV 16, 18 a 35 [91]

## **2.10. Statistické zpracování dat**

Pro analýzu závislosti jednotlivých použitých metod byl použit chi-kvadrát test, Fisherův exaktní test a logická regresní analýza. Pro statisticky signifikantní vztah bylo zvoleno  $p < 0,05$ .

Pro analýzu klinických dat byly použity základní parametry deskriptivní statistiky, jako jsou medián, průměr a 95 % interval spolehlivosti pro spojitá data a absolutní a relativní četnost pro data diskretní.

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí NCSS 8 statistického softwarového programu (NCSS, Kaysville, Utah, USA).

### **3. Výsledková část**

Jako screeningové metody byly použity vyšetření na přítomnost proteinu p16<sup>INK4a</sup>, DNA ISH a HPV EIA. Těmito metodami byli vyšetřeni všichni pacienti souboru. Dalšími metodami (DNA typizace, RNA ISH a RNA proteinu E6) byla vyšetřena pouze skupina pacientů s diagnózou dlaždícobuněčného karcinomu a s přítomností alespoň některého ukazatele pro přítomnost HPV (anamnéza, morfologie, pozitivita některé ze screeningových metod).

Pozitivita vzorku na HPV byla stanovena jako alespoň jeden pozitivní výsledek z vyšetřovaných metod pro detekci HPV (DNA EIA/DNA reverzní hybridizace/DNA ISH/RNA ISH/RT-qPCR mRNA).

Výsledky metod p16, DNA ISH a RNA ISH byly hodnoceny atestovaným patologem z důvodu nutnosti posuzování výsledků přímo v nádorové tkáni. Ostatní metody byly hodnoceny řešitelem práce pod dohledem kvalifikované analytičky.

#### **3.1. p16 IHC**

Průkaz nadměrné exprese proteinu p16 pomocí IHC, se stanovenou hodnotou cut-off 70 % nádorových buněk vykazujících pozitivní signál, vyseletoval celkem 22 pozitivních vzorků s pořadovými čísly 12, 13, 18, 25, 26, 28, 33, 43, 44, 45, 46, 47, 56, 57, 58, 60, 62, 63, 66, 67, 70, 93 a 95.

Všechny testované vzorky negativní skupiny byly p16-negativní.

#### **3.2. DNA ISH**

Detekce HPV DNA metodou ISH prokázala 20 pozitivních vzorků s pořadovými čísly 12, 13, 18, 25, 26, 28, 31, 32, 35, 37, 42, 43, 46, 49, 56, 60, 63, 66, 71, 93 a 95.



### 3.3. EIA

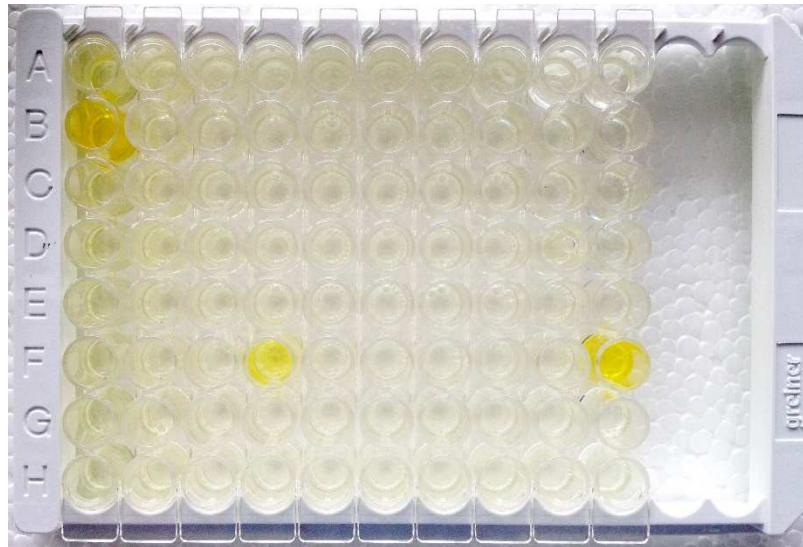
Metodou pro průkaz HPV DNA pomocí amplifikace PCR s následnou detekcí EIA byly potvrzeny dva pozitivní vzorky s pořadovým číslem 18 s absorbancí 0,355 při hodnotě cut-off 0,318 a vzorek s číslem 46 s absorbancí 0,457 při hodnotě cut-off 0,366. Ostatní výsledky zobrazují následující tabulky 6 a 7 s ilustračním obrázkem 10.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,076	0,064	0,103	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B	1,752	0,062	0,085	0,078	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
C	0,095	0,087	0,096	2,559	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
D	0,117	0,079	0,092	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
E	0,120	0,079	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
F	0,093	0,061	<b>0,355</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G	0,078	0,067	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	0,104	0,067	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabulka 6: Absorbance při 450nm (A1 – negativní EIA detekční kontrola, B1 – HPV GP HR pozitivní EIA detekční kontrola, C1 – negativní DNA purifikační kontrola, D1 – PCR negativní kontrola, E1 až B4 – vzorky 1 až 20, 94 a 95, C4 – HPV GP pozitivní PCR kontrola), cut-off 0,318.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,144	0,124	0,092	0,086	0,089	0,080	0,082	0,084	0,076	0,076
B	1,516	0,105	0,088	0,082	0,133	0,085	0,085	0,083	0,094	0,076
C	0,121	0,107	0,087	0,089	0,082	0,083	0,084	0,085	0,076	0,079
D	0,123	0,120	0,097	0,084	0,086	0,080	0,080	0,085	0,114	0,078
E	0,108	0,094	0,086	0,078	0,077	0,078	0,078	0,106	0,079	0,076
F	0,114	0,104	0,088	<b>0,457</b>	0,081	0,076	0,076	0,077	0,075	1,217
G	0,118	0,104	0,084	0,080	0,081	0,081	0,085	0,077	0,076	0,078
H	0,104	0,103	0,078	0,077	0,083	0,083	0,078	0,083	0,077	0,076

Tabulka 7: Absorbance při 450nm (A1 – negativní EIA detekční kontrola, B1 – HPV GP HR pozitivní EIA detekční kontrola, C1 – negativní DNA purifikační kontrola, D1 – PCR negativní kontrola, E1 až E10 – vzorky 21 až 91, F10 – HPV GP pozitivní PCR kontrola, G10 a H10 vzorky 92 a 93), cut-off 0,366.

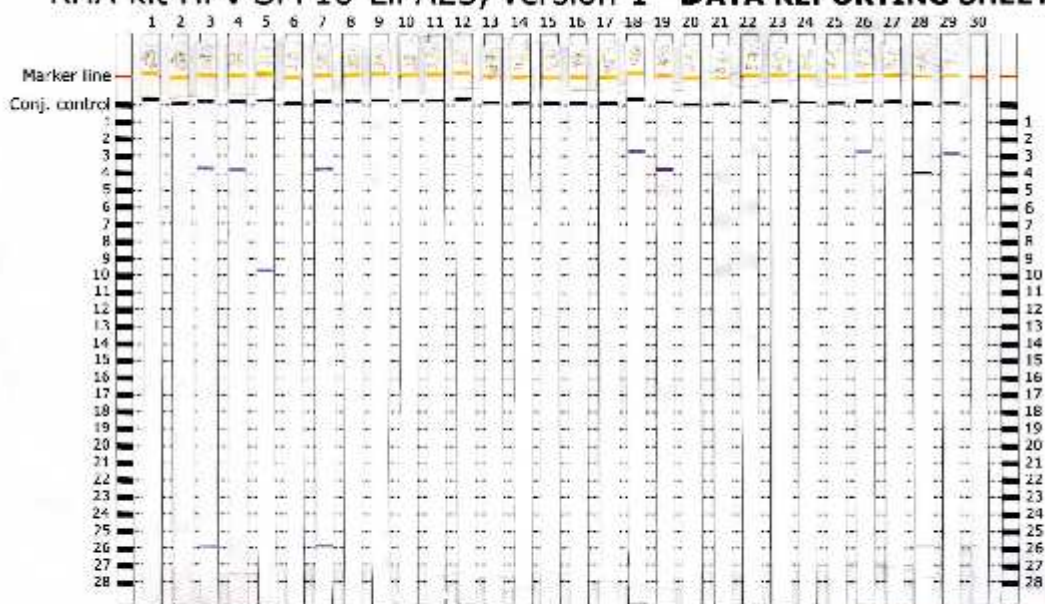


Obrázek 10: Mikrotitrační destička HPV EIA (hodnoty viz. tabulka 7)

### 3.4. DNA typizace

Typizace HPV dle specifické reverzní hybridizace biotinylovaných produktů PCR umožnila určit celkem 8 vzorků. Vzorky s pořadovými čísly 93 a 95 obsahovaly HPV 16, vzorky 18, 25, 28 a 35 HPV 18 a vzorek číslo 26 HPV 35. Výsledky vyšetření zachycuje obrázek 11.

## RHA kit HPV SPF10-LiPA25, version 1 DATA REPORTING SHEET



Strip	Sample id.	Reactive probes	Genotyping Result	Remark
1	22 436/06 II 4	-	HPV NEG	
2	27 042/06 II 2	-	HPV NEG	
3	29 310 3	4, 26	HPV 18	
4	25 309/12 1	4	HPV 18	
5	28 100/12 I 4	10	HPV 35	
6	8 966/04 II 1	-	HPV NEG	
7	18 540/13 2	4, 26	HPV 18	
8	24 64/14	-	HPV NEG	
9	24 65/14	-	HPV NEG	
10	24 66/14	-	HPV NEG	
11	24 67/14	-	HPV NEG	
12	24 70/14	4	HPV 18	
13	26 44/14	-	HPV NEG	
14	26 51/14	-	HPV NEG	
15	26 52/14	-	HPV NEG	
16	26 53/14	-	HPV NEG	
17	26 55/14	-	HPV NEG	
18	26 56/14	-	HPV NEG	
19	K+	4, 26	HPV 18	
20	26 56/14	-	HPV NEG	
21	17 542/12 II 2	-	HPV NEG	
22	9 320/11 II 11	-	HPV NEG	
23	9 366/13 3	-	HPV NEG	
24	2 169/14	-	HPV NEG	
25	26 58/14	-	HPV NEG	
26	26 322/02	3	HPV 16	
27	18 849/14	-	HPV NEG	
28	K+	4, 26	HPV 18	
29	23 778/14	3	HPV 16	
30				

Test date: 5.1.2015

Performed by: Kateřina Siegllová



K0018 v2.0

Obrázek 11: Výsledkový protokol HPV DNA typizace

### **3.5. $\beta$ globin DNA**

Vyšetření vnější kontroly kvality pomocí kontrolní amplifikace úseku DNA kódující housekeepingový gen pro  $\beta$  globin vyřadil vzorky (CP>35) s pořadovými čísly 1, 7, 9, 16, 36, 37, 42, 44, 49, 59 a 68, které tedy nemohou být hodnoceny molekulárně biologickými metodami využívajícími izolaci získanou DNA pro svou nedostačující kvalitu.

Jednotlivé hodnoty cyklů, ve kterých hodnota absorbance přesáhla hodnotu threshold s jejich amplifikačními křivkami, zachycují obrázky 12 až 16.



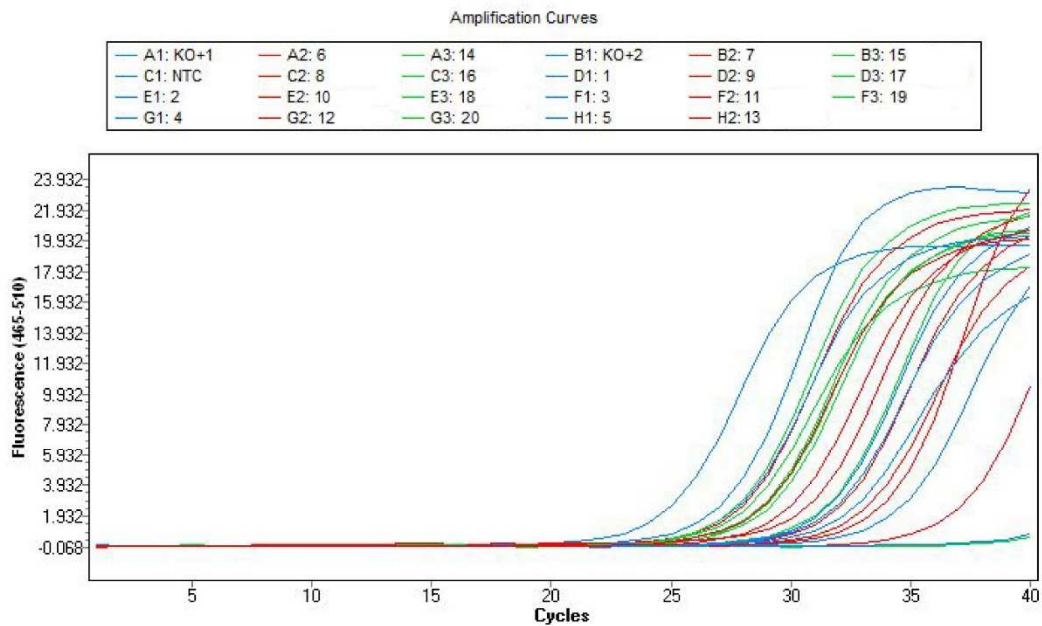
## Abs Quant/2nd Derivative Max for used wells (Abs Quant/2nd Derivative Max)

## Results

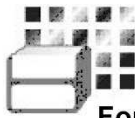
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	KO+1		24.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	6		32.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	14		27.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	KO+2		26.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	7		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	15		35.00			?, >
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	NTC		35.00			?, >
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	8		31.61			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	16		28.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	1		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	9		34.18			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	17		31.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	2		31.42			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	10		27.67			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	18		28.54			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	3		31.89			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	11		30.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	19		28.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	4		27.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	12		28.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	20		27.55			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	5		31.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	13		29.61			

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty, ? - Detector Call uncertain

Obrázek 12: Výsledkový protokol Cobas LightCycler 480 kontrolní amplifikace sekvenční pro  $\beta$  globin z DNA u vzorků 1-20. CP – hodnota cyklu, ve kterém míra fluorescence přesáhla stanovenou hraniční hodnotu. Maximální CP bylo stanoveno na 35 cyklů. Vzorky s neuvedeným CP, nebo 35,00 jsou automaticky vyhodnoceny jako negativní (nedošlo k amplifikaci).



Obrázek 13: Amplifikační křivky Cobas Ligh Cykler 480 vzorků 1-20 u kontrolní amplifikace sekvence pro  $\beta$  globin. V horní části je přiřazení barev k jednotlivým vzorkům.



**Abs Quant/2nd Derivative Max for used (Abs Quant/2nd Derivative Max)**

**Results**

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	ko+		24.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	28		26.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	36		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	44		31.89			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	52		28.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	60		25.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	68					
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	21		33.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	29		31.89			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	37		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	45		28.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	53		31.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	61		24.68			
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	69		27.60			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	22		29.17			
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	30		33.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	38		30.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	46		27.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	54		29.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	62		31.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	70		27.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	23		27.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	31		31.70			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	39		29.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	47		25.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	55		27.84			
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	63		28.05			
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	71		30.75			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	24		27.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	32		33.36			

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

Obrázek 14: Výsledkový protokol Cobas Ligh Cykler 480 kontrolní amplifikace sekvence pro  $\beta$  globin z DNA u vzorků 21-75. CP – hodnota cyklu, ve kterém míra fluorescence přesáhla stanovenou hraniční hodnotu. Maximální CP bylo stanoveno na 35 cyklů. Vzorky s neuvedeným CP, nebo 35,00 jsou automaticky vyhodnoceny jako negativní (nedošlo k amplifikaci).

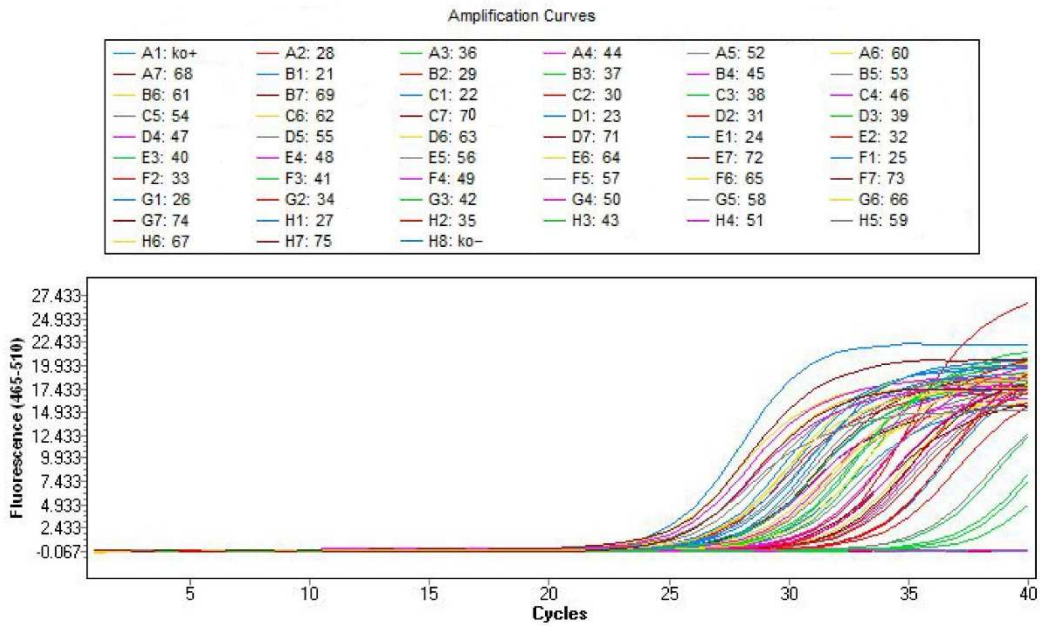
**Results**

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	40		29.46			
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	48					
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	56		25.93			
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	64		28.89			
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	72		31.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	25		26.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	33		30.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	41		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	49		31.13			
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	57		27.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	65		26.87			
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	73		31.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	26		27.42			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	34		32.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	42		27.92			
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	50		25.35			
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	58		25.03			
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	66		29.71			
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	74		25.00			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	27		27.01			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	35		33.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	43		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	51		30.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	59		35.00			>
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	67		26.52			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	75		25.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	ko-					

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

Obrázek 15: pokračování obrázku 13





Obrázek 16: Amplifikační křivky Cobas Ligh Cykler 480 vzorků 21-75 u kontrolní amplifikace sekvence pro  $\beta$  globin z DNA. V horní části je přiřazení barev k jednotlivým vzorkům.

### **3.6. $\beta$ globin RNA**

Vyšetření vnější kontroly kvality pomocí kontrolní amplifikace úseku cDNA přepsané z mRNA, kódující housekeepingový protein  $\beta$  globin, vyřadil vzorky (CP>35) s pořadovými čísly 28, 33 a 42, které tedy nemohou být hodnoceny molekulárně biologickými metodami využívajícími izolaci získanou mRNA pro svou nedostačující kvalitu.

Jednotlivé hodnoty cyklů, ve kterých hodnota absorbance přesáhla hodnotu threshold, zachycuje obrázek 17.



Abs Quant/2nd Derivative Max for used (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	KO+		19,69			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	28					>
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	43		30,63			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	71		26,38			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	KO-					>
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	30		30,32			
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	44		30,96			
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	93		26,51			
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12		32,31			
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	31		26,09			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	45		24,13			
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	94		19,37			
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	13		23,32			
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	32		29,61			
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	46		27,03			
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	95		23,58			
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	18		25,73			
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	33					>
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	56		21,94			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	22		24,56			
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	35		30,07			
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	57		25,46			
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	25		26,12			
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	37		32,78			
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	60		20,84			
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	26		25,93			
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	42		36,12			
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	66		25,28			

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

Obrázek 17: Výsledkový protokol Cobas Ligh Cykler 480 kontrolní amplifikace sekvence pro  $\beta$  globin z RNA u všech vzorků zúžené skupiny. CP – hodnota cyklu, ve kterém míra fluorescence přesáhla stanovenou hraniční hodnotu. Maximální CP bylo stanoveno na 35 cyklů. Vzorky s neuvedeným CP, nebo >35,00 jsou automaticky vyhodnoceny jako negativní (nedošlo k amplifikaci).

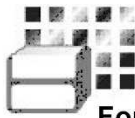
### **3.7. RNA E6 protein**

Vyjádření aktivity viru pomocí detekce přepisované mRNA virového časného proteinu E6 metodou RT-qPCR přineslo pozitivní výsledky u 9 vzorků, jejichž pořadová čísla jsou 12, 18, 25, 26, 43, 46, 57, 93 a 95.

Hodnoty CP s amplifikačními křivkami jednotlivých pozitivních vzorků a kontrol uvádí obrázky číslo 18 až 20.

### **3.8. RNA ISH**

Detekce virových proteinů časné fáze E6/E7 pomocí detekčního systému ISH určila celkem 13 E6/E7 mRNA-pozitivních vzorků s pořadovými čísly 12, 13, 18, 25, 26, 28, 30, 33, 46, 56, 92,93 a 94.



## Abs Quant/2nd Derivative Max for Used wells (Abs Quant/2nd Derivative Max)

## Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	KO+	Unknown	25.58			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	KO+	Unknown	26.24			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	KO+	Unknown	20.93			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	33	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	33	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	33	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	57	Unknown	21.05			?
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	57	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	57	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	KO-	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	KO-	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	KO-	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	37	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	37	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	37	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	60	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	60	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	60	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	12	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	12	Unknown	23.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	12	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	35	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	66	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	66	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	66	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	13	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	13	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	13	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	42	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	42	Unknown				

? - Detector Call uncertain

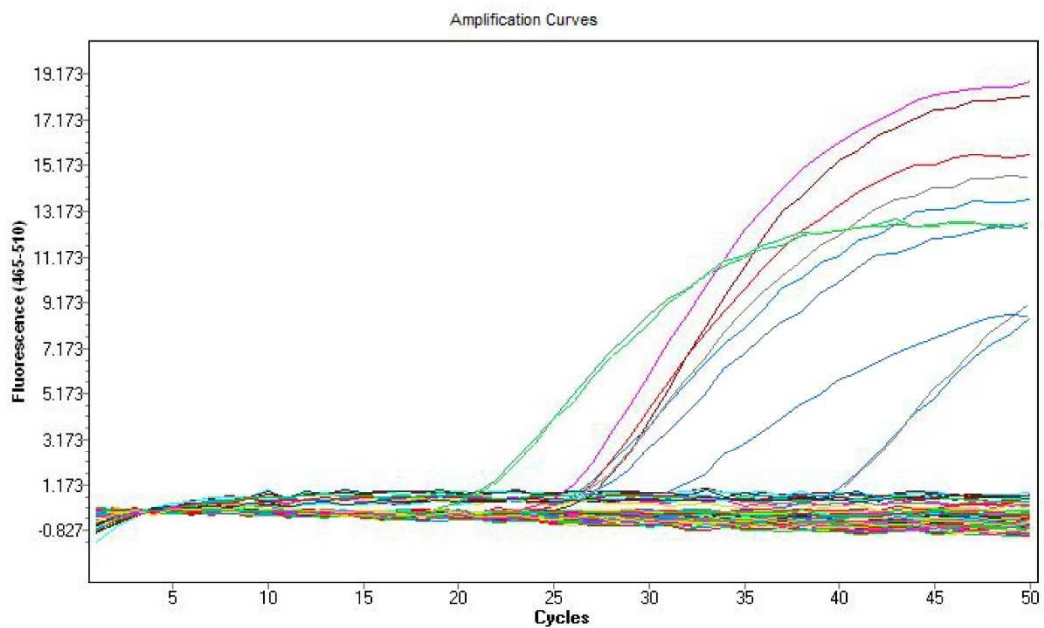
Obrázek 18: Výsledkový protokol Cobas Ligh Cykler 480 amplifikace sekvenční protein E6 z RNA u 26 vzorků. CP – hodnota cyklu, ve kterém míra fluorescence přesáhla stanovenou hraniční hodnotu. Maximální CP bylo stanoveno na 40 cyklů. Vzorky s neuvedeným CP, nebo 40,00 jsou automaticky vyhodnoceny jako negativní (nedošlo k amplifikaci).

**Results**

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	42	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	71	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	71	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	71	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	22	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	22	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	22	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	43	Unknown	25.63			
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	43	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	43	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	93	Unknown	27.21			
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	30	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	30	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	30	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	44	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	44	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	44	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	94	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	94	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	94	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	31	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	31	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	31	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	45	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	45	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	45	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G7	32	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G8	32	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G9	32	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	56	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	56	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	56	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	18	Unknown	26.93			
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	28	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	25	Unknown	39.26			
<input checked="" type="checkbox"/>	H7	26	Unknown	20.94			
<input checked="" type="checkbox"/>	H8	95	Unknown	26.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	H9	46	Unknown	30.54			

? - Detector Call uncertain

Obrázek 19: Pokračování obrázku 18. Vzorky negativní na typizaci HPV DNA byly stanovovány v tripletu – s master mixy pro HPV E6 typu 16, 18 a 35. U vzorků se známým typem HPV byla amplifikována pouze cDNA s odpovídajícím typem master mixu.



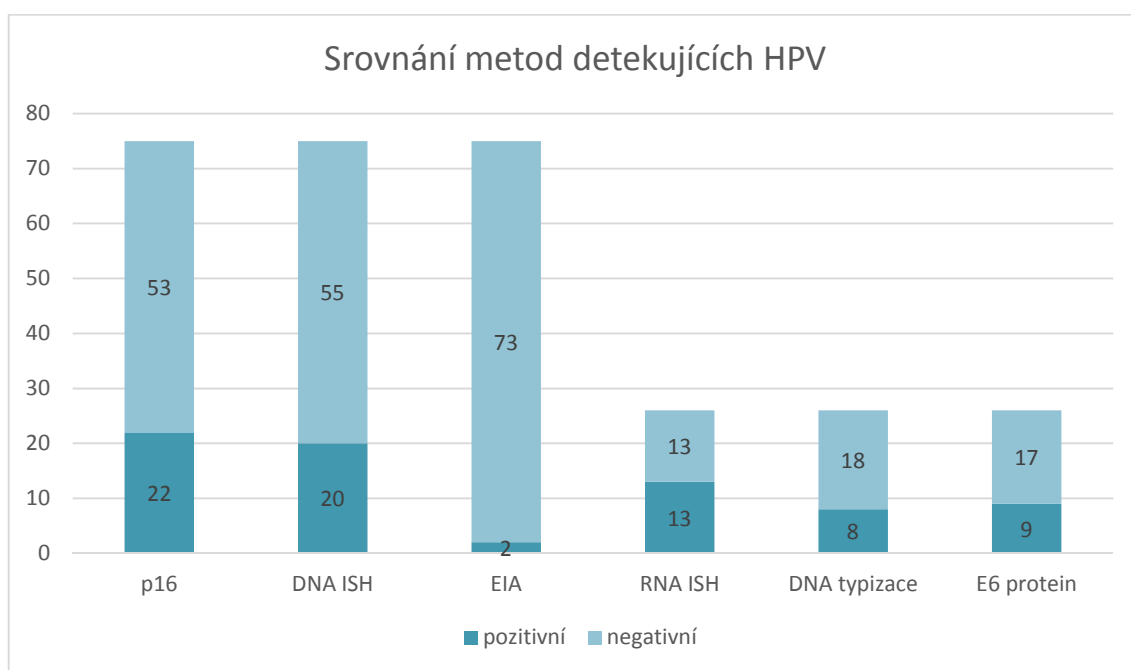
Obrázek 20: Amplifikační křivky Cobas Ligh Cykler 480 u amplifikace sekvencí cDNA virového proteinu E6 u 26 vzorků. 19 tripletů a 7 jednotlivých vzorků.

### 3.9. Srovnání metod

Výsledky 75 pacientů všemi metodami byly vzájemně porovnány a podrobeny statistické analýze. Mezi celkový počet pacientů nebyla zahrnuta kontrolní negativní skupina 20 pacientů, jejichž výsledky byly jak u detekce p16, tak u HPV negativní.

Metoda	Počet pozitivních	Počet testovaných
p16 <sup>INK4a</sup>	22	75
DNA ISH	20	75
DNA EIA	2	75
RNA ISH	13	26
DNA typizace	8	26
RNA E6 protein	9	26

Tabulka 8: Shrnutí výsledků jednotlivých metod detekujících HPV



Graf 1: Grafické znázornění poměr pozitivních a negativních případů v rámci jednotlivých metod (detekce proteinu p16<sup>INK4a</sup> imunohistochemicky - IHC, DNA pomocí ISH, DNA pomocí EIA, DNA reverzní hybridizací, RNA pomocí ISH a virového proteinu E6 real-time RT-PCR).



	p16 IHC	DNA ISH	DNA PCR	RNA ISH	RNA E6
p16 IHC		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DNA ISH	< 0,0001		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DNA PCR	0,004	< 0,0001		< 0,0001	< 0,0001
RNA ISH	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		< 0,0001
RNA E6	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

Tabulka 9: Hodnoty statistické závislosti p mezi jednotlivými metodami v souboru všech vzorků.

	p16 IHC	DNA ISH	DNA PCR	RNA ISH	RNA E6
p16 IHC		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DNA ISH	< 0,0001		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
DNA PCR	0,002	< 0,0001		< 0,001	< 0,0001
RNA ISH	< 0,0001	< 0,0001	< 0,001		< 0,0001
RNA E6	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

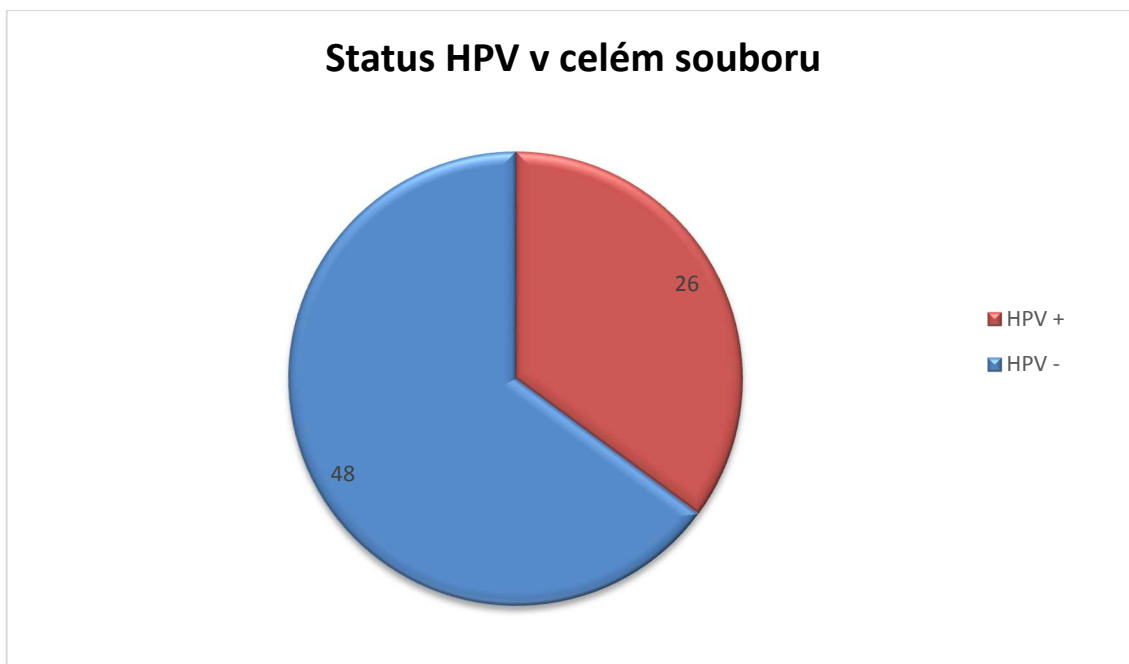
Tabulka 10: Hodnoty statistické závislosti p mezi jednotlivými metodami v souboru vzorků od pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu.

Statistický jev	Celý soubor	DK
Senzitivita	0,89	0,88
Specifita	0,88	0,97
Pozitivní prediktivní hodnota	0,64	0,94
Negativní prediktivní hodnota	0,97	0,94
Korelační koeficient	0,659	0,864
Hladina významnosti p	< 0,0001	< 0,0001

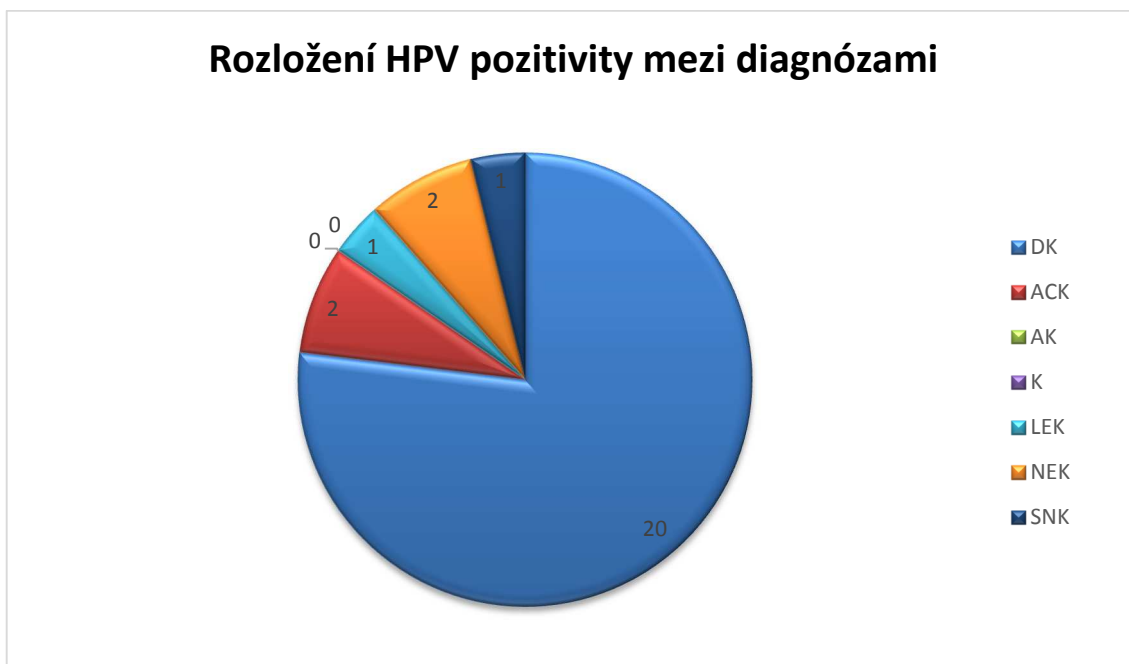
Tabulka 11: Hodnoty sledovaných statistických parametrů exprese p16 oproti HPV statusu u všech pacientů a u skupiny pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu.

Č.vzorku	p16 IHC	DNA ISH	DNA EIA	DNA PCR	RNA ISH	RNA E6	HPV TYP
12	+	+	-	-	+	+	18
13	+	+	-	-	+	-	-
18	+	+	+	+	+	+	18
22	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	-	+	+	+	18
26	+	+	-	+	+	+	35
28	+	+	-	+	+	0	18
30	-	-	-	-	+	-	-
31	-	+	-	-	-	-	-
32	-	+	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-	0	-
35	-	+	-	+	-	-	18
37	-	+	-	0	-	-	-
42	-	+	-	-	-	0	-
43	+	+	-	-	-	+	16
44	+	-	-	-	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-
46	+	+	+	+	+	+	16
56	+	+	-	-	+	-	-
57	+	-	-	-	-	+	16
60	+	+	-	-	-	-	-
66	+	+	-	-	-	-	-
71	-	+	-	-	-	-	-
93	+	+	-	+	+	+	16
94	-	-	-	-	+	-	-
95	+	+	+	+	+	+	16

Tabulka 12: Výsledky jednotlivých vyšetření ve skupině pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu se suspekci na HPV infekci. + pozitivní výsledek, - negativní výsledek, 0 nehodnotitelný výsledek (z důvodu nedostatečné kvality DNA/RNA dokázané nedostatečnou amplifikací vnitřní kontroly – sekvence pro  $\beta$  globin). Typ HPV stanovený pomocí DNA PCR nebo RNA E6 proteinu.

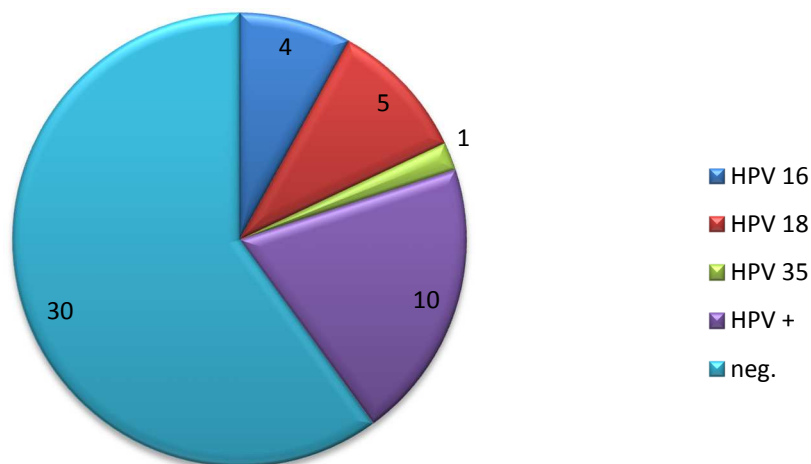


Graf 2: Grafické znázornění počtu HPV pozitivních a HPV negativních vzorků v souboru 75 pacientů bez ohledu na diagnózu. HPV pozitivita byla stanovena jako alespoň jeden pozitivní výsledek některé z vyšetřovaných metod.



Graf 3: Grafické znázornění rozložení HPV positivity mezi jednotlivými diagnostickými jednotkami lokalizovanými v sinonasální krajině. DK – dlaždicobuněčný karcinom, ACK – adenoidně-cystický karcinom, AK – adenokarcinom (intestinální/neintestinální), K – typický karcinoid, LEK – lymfoepiteliální karcinom, NEK – neuroendokrinní karcinom (malobuněčný), SNK – sinonasální nediferencovaný karcinom.

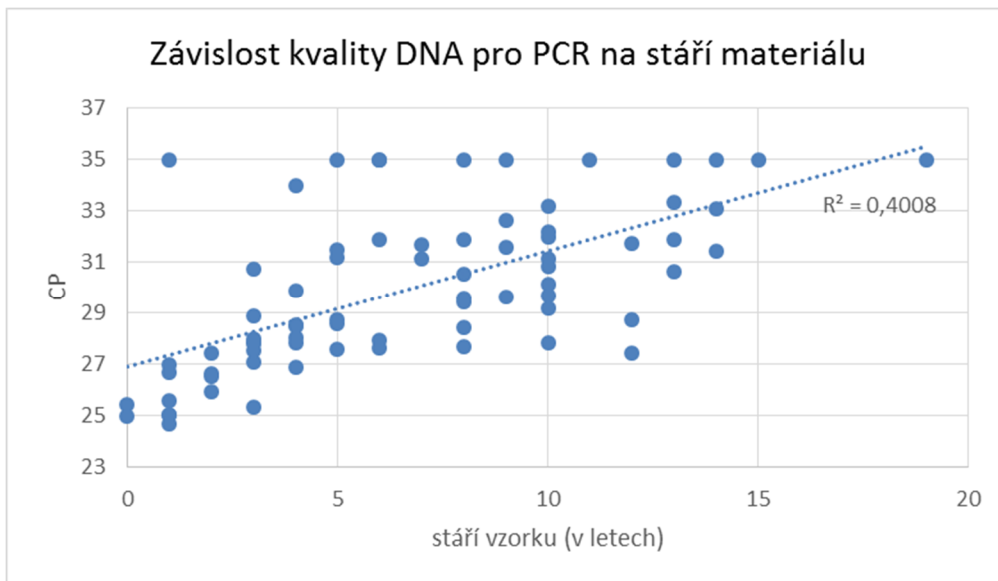
### Rozložení typů HPV u pacientů s diagnózou DK



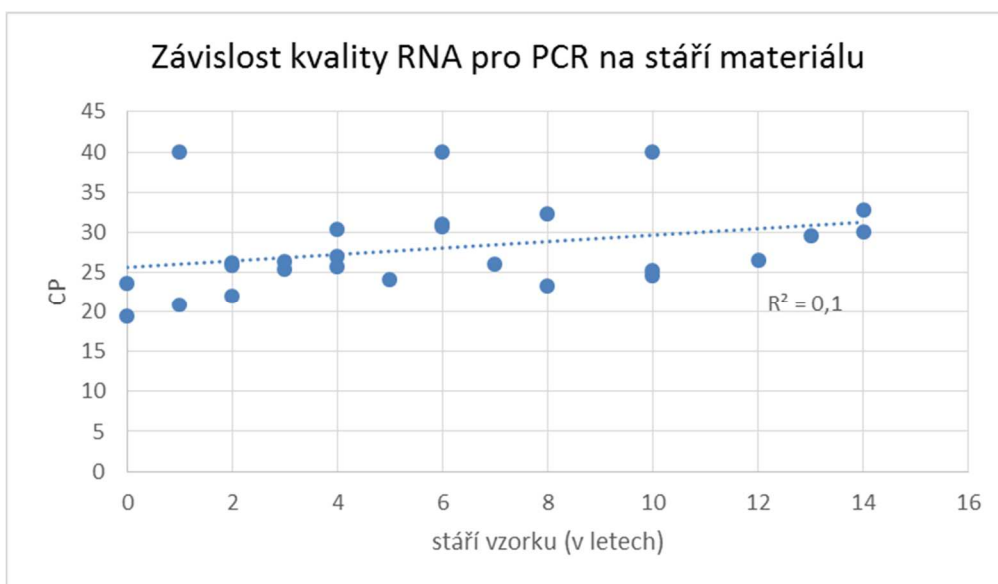
Graf 4: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých typů HPV (16, 18 a 35) ve skupině pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu (DK). HPV + označení skupiny pacientů, jejichž výsledky svědčí pro HPV pozitivitu (pozitivní výsledek alespoň jednoho z prováděných analýz), ale nejsou schopné určit typ HPV.

Metoda	Cena za vyšetření (Kč)	Doba zpracování (h)
CINtec p16	284,00	6
HPV DNA ISH	772,00	14
EIA kit HPV GP HR	1258,50	18
RHA kit HPV SPF10-LiPA25	3415,00	14
RNAscope	1263,30	10
HPV E6 mRNA RT-qPCR	792,90	11

Tabulka 13: Porovnání ceny a doby zpracování jednoho vzorku jednotlivými metodami. V ceně jsou započítány všechny podpůrné reagenty a izolační kity, ne však spotřební materiál.



Graf 5: Vliv stáří materiálu na kvalitě izolované DNA podle stanovení hodnoty CP při amplifikaci kontrolního genu pro  $\beta$  globin.

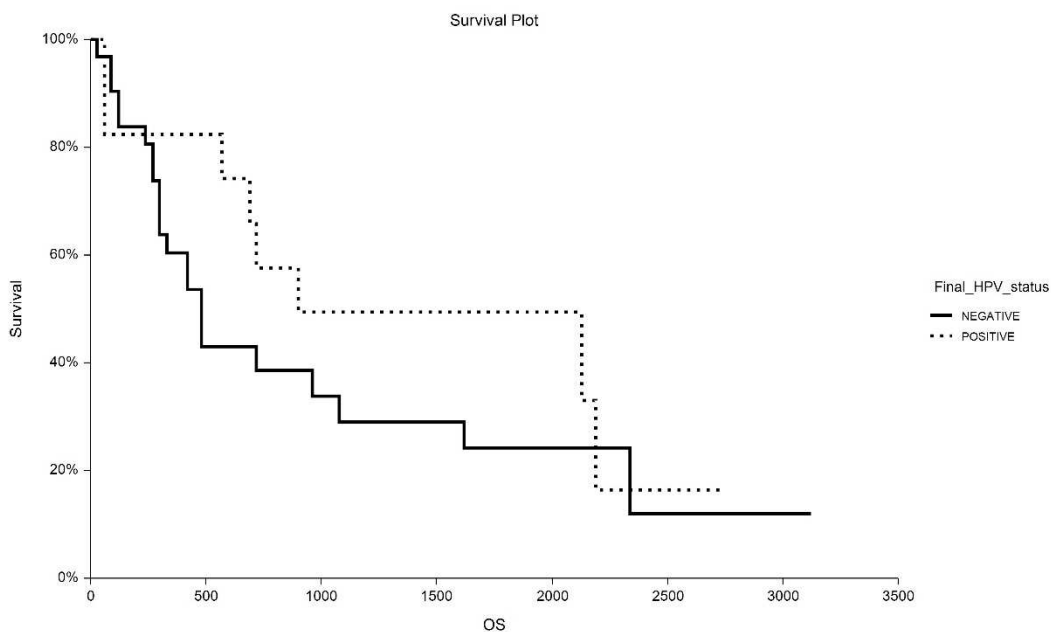


Graf 6: Vliv stáří materiálu na kvalitě izolované RNA podle stanovení hodnoty CP při amplifikaci kontrolní sekvence cDNA pro  $\beta$  globin.

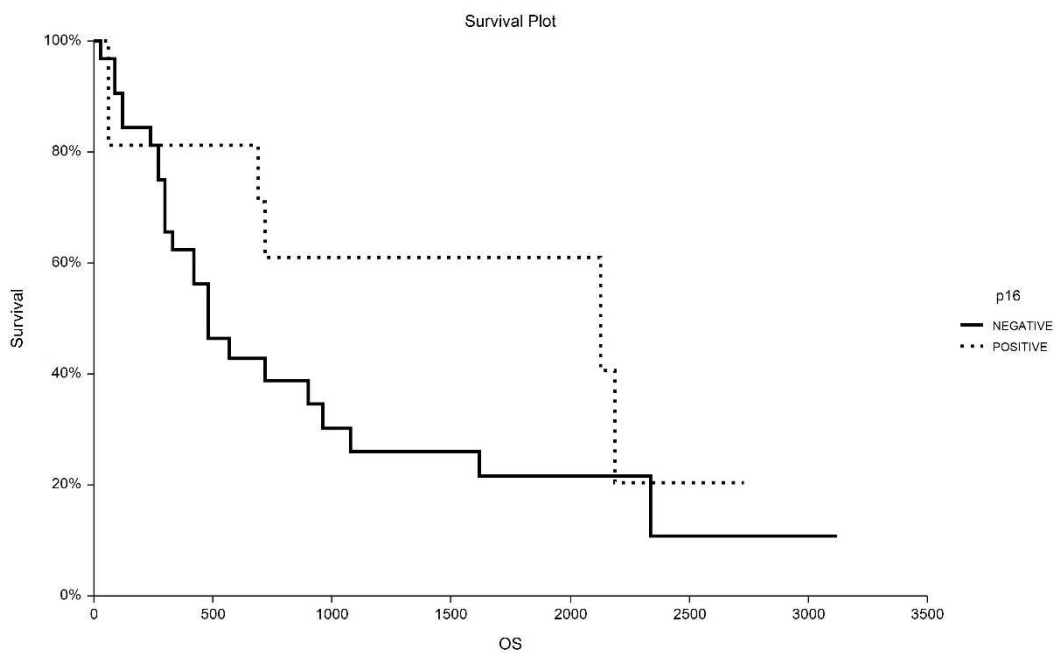
### 3.10. Výsledky klinické části studie

	Celý soubor	DK
Follow-up celkem (měsíce)	1 – 241 medián 19	1 – 104 medián 16
Medián přežití v měsících (95 % interval spolehlivosti)	32 (19 - 73)	24 (14 - 36)
Procento pacientů bez znalosti průběhu onemocnění	19 %	16 %
Follow-up HPV + (měsíce)	2 – 91 medián 21	2 – 91 medián 21
Follow-up HPV – (měsíce)	1 – 241 medián 17	1 – 104 medián 17
Medián přežití HPV+ v měsících (Log-rank test)	30	30
Medián přežití HPV- v měsících (Log-rank test)	33	14
Follow-up p16 + (měsíce)	2 – 241 medián 23	2 – 91 medián 19
Follow-up p16 – (měsíce)	1 – 164 medián 18	1 – 104 medián 16
Medián přežití p16 + v měsících (Log-rank test)	73	71
Medián přežití p16 – v měsících (Log-rank test)	27	16

Tabulka 12: Shrnutí výsledků statistické analýzy klinických dat vůči HPV a p16 statusu.



Graf 5: Celkové přežití (OS) (dny) v závislosti na HPV statusu. HPV negativní pacienti plnou čarou, HPV pozitivní čarou přerušovanou.



Graf 6: Celkové přežití (OS) (dny) v závislosti na p16 statusu. p16 negativní pacienti plnou čarou, p16 pozitivní čarou přerušovanou.

## Diskuze

V posledních letech je stále jasnější, že HPV asociované dlaždicobuněčné karcinomy (DK) se významně liší od HPV negativních případů jak v etiologii, epidemiologii, tak v prognóze. Proto se HPV testování v nádorové tkáni stává klinicky relevantním.

Mnozí autoři považují imunohistochemickou (IHC) detekci nadprodukce proteinu p16 za užitečný nepřímý marker poukazující na transformaci asociovanou s HPV infekcí [41] [54] [61] [82], proto byly všechny případy vyšetřeny pomocí kitu Ventana CINtec® p16. Případy byly považovány za p16 pozitivní v případě, že 70 % nádorových buněk vykazovalo cytoplasmatickou a/nebo nukleární pozitivitu. Pomocí tohoto thresholdu bylo stanoveno 22 pozitivních (29,7 %) z celkového počtu 74 případů, jež je relativně srovnatelný s podobnými výzkumy [66], které však byly zaměřeny na celou oblast hlavy a krku.

Další metodou, která byla vyšetřena u všech případů, byla screenovací metoda PCR HPV DNA s detekcí pomocí EIA a metoda detekce HPV DNA pomocí ISH.

Až na 7 případů (9,3 %) byly obě metody negativní (nebo i další metody, pokud byly provedeny) v případě positivity p16, tudíž můžeme říci, že stanovení exprese p16 IHC je screeningovým testem s vyhovující pozitivní (0,64) a negativní (0,97) prediktivní hodnotou, podle které je možné rozhodnout o dalším vyšetření. Ke stejnému závěru dospěla i studie Dreyer et al., 2013 [66]. Vzorky p16+/HPV- náležely v naší studii do kategorie diagnózy DK (2x) a adenoidně-cystického karcinomu (5x).

Metoda stanovení DNA pomocí PCR s následnou detekcí EIA byla shledána jako nevhodná, kvůli své nízké citlivosti a vysoké časové náročnosti. Tato metoda zachytila pouze 2 pozitivní případy (7,7 %) z celkově hodnocených 26 HPV pozitivních vzorků. Tato metoda je výrobcem určena pro screening materiálu z děložního čípku se stanovenou LOD (limit of detection) u typu HPV 16 a 18 na 10 až 100 kopií HPV na PCR reakci a u typu HPV 35 na 100 kopií HPV na PCR reakci, což je v porovnání s typizačním kitem vyšší LOD. LOD typizačního kitu HPV SPF-10 je u HPV typů 16 a 35 stanovena na 2 kopie na PCR reakci a pro typ 18 dokonce 1 kopie na PCR reakci.

Detekce HPV DNA pomocí ISH byla hodnocena jako dostatečně citlivá, s tím, že zachytila celkem 20 (76,9 %) pozitivních vzorků z celkového počtu 26 HPV pozitivních.



Skupina p16 pozitivních a HPV DNA ISH pozitivních byla vyšetřena dále na přítomnost HPV DNA pomocí PCR s následnou reverzní hybridizací, HPV E6/E7 mRNA metodami ISH a RT-qPCR jimiž bylo prokázáno 7, 12 a 8 pozitivních z 26 testovaných případů. Celkem tedy bylo prokázáno všemi metodami detekujícími HPV 26 pozitivních vzorků (25 %) z celého souboru pacientů. Výsledky jednotlivých vyšetření by mohly poukazovat na dobrou korelaci, avšak výrazně se lišily celkem u 6 případů. Odlišnosti vykazovaly 4 vzorky s výsledkem p16+/RNA ISH+/RT-qPCR- z toho 2 zřejmě z příčiny špatné kvality cDNA pro PCR. U dalších dvou lze vysvětlit výsledek nedostatečnou citlivostí metody RT-qPCR. Dále došlo k rozporu u dvou vzorků s výsledkem p16-/RNA ISH+/RT-qPCR-, což může svědčit buď pro nízkou specificitu detekce HPV mRNA ISH pomocí RNAscope, nebo nedostatečnou citlivost RT-qPCR. Metoda RT-qPCR má nevýhodu v potřebě vysoké kvality izolované mRNA s následným přepisem do cDNA, ale na druhou stranu dokáže rozlišit typ HPV na rozdíl od metody RNAscope.

Ve čtyřech případech p16+/HPV DNA PCR-/E6-E7 RNA+ z celé skupiny vyšetřovaných vzorků mohlo dojít k situaci, kdy použité primery SPF10 PCR pro detekci HPV DNA nepokrývaly sekvence přítomného typu HPV. Byla sice použita screenovací metoda detekce HPV DNA s EIA využívající primery GP5+/6+, ta však nebyla shledána jako dostatečně citlivá, jelikož dokázala zachytit pouze 2 (7,7 %) HPV pozitivní případy z celkového počtu 26 HPV pozitivních. Nicméně, jeden ze vzorků zachycených metodou EIA nebyl detekován primery SPF10. U tohoto vzorku mohlo dojít k infekci subtypem HPV 16 s mutací v proteinu L1 v místě nasedání primerů SPF10.

V pěti případech p16+/HPVDNA PCR/E6-E7 RNA- z celé skupiny vzorků zřejmě došlo k nadměrné expresi p16 z jiné příčiny, například genovou mutací či epigenetickou změnou.

Přes výše zmíněné neshody byla prokázána dobrá shoda výsledů mezi jednotlivými metodami v souboru DK s hladinou významnosti  $p < 0,0001$  (p16/DNA ISH/RNA ISH/mRNA RT-qPCR),  $p < 0,001$  (DNA PCR/RNA ISH) a  $0,002$  (p16/DNA PCR). Korelace mezi detekcí p16 a HPV statusem  $R = 0,864$  s hladinou významnosti  $p < 0,0001$ .

Mezi další důležité faktory stanovení HPV molekulárně biologickými metodami patří vliv stáří testovaného materiálu, jehož význam se mezi jednotlivými studii liší. Podle studie Kokkat et al. [92] nemá stáří zpracovávaného materiálu vliv na kvalitu DNA či RNA. Na druhé straně studie Aggerholm-Pedersen et al. [93] prokázala degradaci mRNA ve vzorcích FFPET vyjádřenou jako  $\Delta Cq = 0,37/\text{rok}$ . Naše studie prokázala středně významnou závislost stáří FFPET na kvalitě izolované DNA při  $R = 0,633$  s  $\Delta CP = 0,46/\text{rok}$ . U RNA byla tato významnost nižší  $R = 0,316$  s  $\Delta CP = 0,40/\text{rok}$ , čímž potvrdila studii Aggerholm-Pedersen et al. [93]. Z těchto údajů je zřejmé, že spolu s dobou skladování působí na kvalitu DNA a RNA i další vlivy, především pak kvalita a délka fixace, tedy klíčové parametry preanalytické fáze.

Přítomnost HPV u DK v oblasti dutiny nosní a paranasálních sinusů je dle studií popisována cca ve 20 % případů. [17] [29] Meta-analýza publikovaná Syrjänen et al. [94] s 27 % HPV pozitivních případů z celkového počtu 492 sinonasálních karcinomů byla našimi výsledky potvrzena se zastoupením 25 % HPV-pozitivních DK.

Mezi detekované typy HPV v celém souboru karcinomů sinonasální krajiny patří typ 16, 18 a 35, přičemž typy 16 a 18 byly zastoupeny po 5 případech a u typu 35 v jednom případě, což naznačuje, že testování pouze přítomnosti typu HPV 16 není přínosem a může tak dojít k vysokému procentu falešně negativních vzorků. U ostatních HPV pozitivních případů nebylo možné jednotlivé typy určit. Toto rozložení jednotlivých typů nekoresponduje s dosavadními publikacemi, kde HPV 16 má u DK (jiné lokalizace než laryngeální, orofaryngeální a orální) výraznější většinové zastoupení cca 65,7 % [62] [66].

Z několika dalších studií vyplývá, že přítomnost HPV je rozdílná s ohledem na typ DK, u typu nerohovějícího se uvádí 39,7 %, u rohovějícího 3,4 %, u bazaloidního 41,7 %, u papilárního 75 % a u adenoskvamózního 66,6 % [29] [40] [41] [42] [95]. Pokud jde o naši studii, z celkového počtu 49 DK bylo 27 (55%) nerohovějících a 16 (33 %) rohovějících. Ve skupině rohovějících DK byly pouze 2 případy (13 %) HPV DNA ISH/PCR+ (HPV 18 a 35), z toho pouze 1 (HPV 35) transkripčně aktivní. Naopak u skupiny nerohovějících DK vykazovalo 11 (41 %) transkripčně aktivní HPV 16 nebo 18 a 10 z nich vykazovalo p16 pozitivitu.

Z tohoto metodicky obsáhlého výzkumu zahrnujícího ISH a PCR metody detekující HPV DNA a HPV E6/E7 mRNA transkripty jsme získali informaci o tom, že high-risk HPV typy se aktivně podílí na vzniku významného podílu sinonasálních DK, zejména nerohovějících, přičemž výsledky detekce HPV se mezi jednotlivými metodami příliš neliší. Co se týče detekce HPV E6/E7 mRNA transkriptů u karcinomů sinonasální krajiny, byla v této studii poprvé použita metoda ISH, která vykazovala silnou korelaci s ostatními metodami HPV detekce a s expresí p16. Stejně jako u orofaryngeálních DK, může být stanovení exprese p16 použito jako spolehlivý nepřímý marker HPV statusu také u sinonasálních karcinomů.

## Závěr

V porovnání všech metod užitých k detekci HPV byla zjištěna velice dobrá shoda, kde všechny prováděné metody vykazovali vzájemnou shodu při míře významnosti  $p < 0,0001$  (p16, DNA ISH, RNA ISH, RT-qPCR mRNA) až na metodu detekce p16 vs. DNA PCR, jejichž míra významnosti dosáhla  $p = 0,004$  v celém souboru, resp.  $p = 0,002$  v souboru DK. Korelace mezi výsledky metod detekce HPV a exprese proteinu p16 dosáhly statistické významnosti s korelačním koeficientem  $R = 0,659$  u souboru všech sinonasálních karcinomů a  $R = 0,864$  u souboru DK sinonasální krajiny.

Veškeré použité metody jsou vhodné pro stanovení HPV statusu, s výjimkou EIA kit HPV GP HR, jež byla shledána nedostatečně citlivá a příliš časově náročná.

Vliv stáří materiálu na kvalitu izolované DNA se potvrdil se statistickou hladinou významnosti  $R = 0,633$ . Na rozdíl od toho je kvalita izolované mRNA závislá na stáří vzorku podstatně méně  $R = 0,316$ . Bylo dokázáno, že za každý rok skladování FFPE bloku tkáně způsobí zvýšení hodnoty CP o 0,457 u DNA a 0,397 u RNA.

HPV se aktivně podílí na vzniku významného podílu karcinomů sinonasální krajiny, přičemž přítomnost HPV byla zjištěna u 25 % všech testovaných případů maligních nádorů.

V rámci dlaždicobuněčného karcinomu sinonasální krajiny bylo zjištěno 35 % HPV pozitivních případů.

## Zkratky

A/C/G/T	Nukleotidy adenin/cytosin/guanin/thymin
Ap-1	Transkripční faktor
BAX	Člen rodiny Bcl-2 (apoptotický signální protein)
Bcl-2	B-cell lymphoma gene (gen součástí apoptotické kaskády)
CDK	Cyklin dependentní kináza
CD	Cluster of differentiation (povrchové znaky buněk)
cDNA	Complementary DNA
CIP1	CDK-interacting protein 1
COX2	Cyklooxygenáza 2
$C_t$	Crossing point (prahová hodnota real-time PCR)
dATP	Deoxyadenosin trifosfát
dCTP	Deoxycytidin trifosfát
dGTP	Deoxyguanosin trifosfát
DK	Dlaždicobuněčný karcinom
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dTTP	Deoxythymidin trifosfát
dsDNA	Double strand DNA (dvouvláknová DNA)
E1 – E7	Early protein 1 - 7 (časný virový protein 1 až 7)
EBV	Epstein-Barr virus
EGFR	Epidermal growth factor receptor (receptor pro epidermální růstový faktor)
EHK	Externí hodnocení kvality
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FFPET	Formalin-fixed paraffin-embedded tissue (formalinem fixovaná, parafínem zalitá tkáň)
FIA	Fluoresceine immuno assai
FÚP FNHK	Fingerlandův ústav patologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové

GADD45	Growth arrest and DNA damage factor
HBV	Hepatitis B virus
HE-EO	Přehledné barvení roztokem hematoxylinu a eozinu
HHV8	Human herpes virus 8
HPV	Human papilloma virus (lidský papilomavirus)
HRM	High resolution melting analyse (analýza teploty tání produktů PCR)
HTLV1	Human T-lymphotropic virus 1
ICDK	Inhibitor cyklin dependentní kinázy
IHC	Imunohistochemie
IHK	Interní hodnocení kvality
INK4	Inhibitor proteinkinase 4
ISH	In situ hybridizace
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L1/L2	Later proteine 1/2
LD-PCR	Long distance polymerase chain reaction
MALT	Mucosa-associate lymphoma tissue
MCV	Molluscum contagiosum virus
mRNA	Messenger RNA
mTOR C1/2	Mammalian target of rapamycin complex 1/2
NFKB	Nuclear factor kappa B (jaderný faktor kapa B)
p53	Protein 53
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDZ	Doména signálních proteinů
PGE2	Prostaglandin E2
pRb	Retinoblastome protein
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction

TFIID	Transkripční faktor II D
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TP53	Tumor protein 53 (gen pro protein 53)
TSC2	Tuberous sclerosis factor 2
Rb1	Retinoblastome 1
Reb1	enzym guanosin trifosfatáza
SOP	Standardní operační program
Sp-1	Transkripční faktor (specificity factor-1)
ssDNA	Single strand DNA (jednovláknová DNA)
URR	Upstream regulatory region (vedoucí regulační oblast)
WAF1	Wild type p53 dependent growth arrest factor
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

## Literatura

- [1] V. Konrádová, J. Uhlík a L. Vajner, Funkční histologie, 2. vydání editor, Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o., 2000.
- [2] B. Markalous, F. Charvát, J. Nejedlý a E. Zýková, Rinitidy, sinusitidy a nosní polypy, Praha: Triton, 2009.
- [3] J. Laco, Lidské papilomaviry a jejich úloha v etiopatogenezi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní a orofaryngu, Praha: Galén, 2012.
- [4] A. Rejthar a B. Vojtěšek, Obecná patologie nádorového růstu, Praha: Grada, 2002.
- [5] B. Alberts a et.al, Základy buněčné biologie, 2. vydání editor, Espero Publishing, 2005.
- [6] B. Otová a R. Mihalová, Základy biologie a genetiky člověka, Praha: Karolinum, 2012.
- [7] R. Tamura, J. Vasconcellos, D. Sarkar, T. Libermann, P. Fisher a L. Zerbini, „GADD45 proteins: central players in tumorigenesis,“ *Curr Mol Med*, č. 12(5), pp. 634-651, June 2012.
- [8] T. Šimůnek, „Molekulární biologie - Patobiochemie nádorů,“ Farmaceutická fakulta Karlovy univerzity, Hradec Králové, 2013.
- [9] S. Jackson a J. Bartek, „The DNA-damage response in human biology and disease,“ *Nature*, pp. 1071-1078, 20 Jan 2010.
- [10] E. Pleasance, R. Cheedman, P. Stephens a et.al., „A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome,“ *Nature*, pp. 191-196, 14 Jan 2010.
- [11] M. Zakaryan, H. Movsesyan a K. Manukyan, „Enviromental stress factors and molelcular mechanisms of cancerogenesis,“ *Bulletin of the International Academy of Science "Ecology and Safety of Vital Functions"*, pp. 136-140, 2001.



- [12] I. A. f. R. o. Cancer, „IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans,“ 25 July 2014. [Online]. Available: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. [Přístup získán 22 September 2014].
- [13] G. Wogan, „Environmental and chemical carcinogenesis,“ *Semin Cancer Biol.*, pp. 473-486, Dec 2004.
- [14] D. Kufe, R. Pollock, R. Weichselbaum, R. Bast, T. Gansler, J. Holland a E. Frei, „Known Physical Carcinogens,“ v *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6. edice editor, BC Decker, 2003.
- [15] L. Daya-Grosjean a A. Sarasin, „The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors,“ *Mutat Res.*, pp. 43-56, 25 Jan 2005.
- [16] P. Konturek, S. Konturek, P. Pierzchalski, W. Bielański, A. Duda, K. Marlicz, T. Starzyńska a E. Hahn, „Cancerogenesis in Helicobacter pylori infected stomach--role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases,“ *Med Sci Monit*, 2001.
- [17] T. Chow, T. Broker a B. Steinberg, „The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia,“ *Journal Compilation AMPIS*, pp. 422-449, 2010.
- [18] M. Narisawa-Saito a T. Kiyono, „Mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced cervical carcinogenesis,“ *Nihon Rinsho*, pp. 53-61, Jan 2009.
- [19] R. L. Garcea and D. DiMaio, *The Papillomaviruses*, New York: Springer Science, 2007.
- [20] M. Buendie, „Hepatitis B viruses and cancerogenesis,“ *Elsevier - Biomedicine & Pharmacotherapy*, pp. 34-43, 1998.
- [21] A. Coghill a et.al., „Epstein-Barr Virus Serology as a Potential Screening Marker for Nasopharyngeal Carcinoma among High-Risk Individuals from Multiplex Families in Taiwan,“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 27 Apr 2014.

- [22] R. Raghupathy, E. Hui a A. Chan, „Epstein-barr virus as a paradigm in nasopharyngeal cancer: from lab to clinic,“ *Am Soc Clin Oncol Educ Book.*, pp. 149-153, 2014.
- [23] M. Robinson, Y. Suh, V. Paleri, D. Devlin, B. Ayaz, L. Pertl a S. Thavaraj, „Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population,“ *Infectious agents and cancer*, č. 8(30), 12 August 2013.
- [24] N. Cheng a et.al., „Is gastric lymphoepithelioma-like carcinoma a special subtype of EBV-associated gastric carcinoma? New insight based on clinicopathological features and EBV genome polymorphisms,“ *Gastric Cancer*, 27 Apr 2014.
- [25] J. Chen a et.al., „Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity,“ *J. Clin Gastroenterol.*, pp. 262-271, Apr 2012.
- [26] N. Dupin a J. Deleuze, „Kaposi sarcoma and HHV-8: a model of cutaneous cancer in immunosuppressed patients,“ *Rev Prat.*, pp. 311-316, May 2014.
- [27] C. Thomas, „The significance of environmental factors for the cancerogenesis in old age by the model of iatrogenic carcinogenesis,“ *Aktuelle Geront*, pp. 43-46, Mar 1981.
- [28] J. Stříteský, *Patologie*, Epava, 2001.
- [29] S. J. Lewis a et.al., „The Sinonasal Tract: Another Potential "Hot Spot" for Carcinomas with Transcriptionally-Active Human Papillomavirus,“ *Head and Neck Pathol*, 14 December 2013.
- [30] L. Barnes, Eveson, Reichart a Sidransky, *World Health Organization of Tumours - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, Lion: IARC Press, 2005.
- [31] J. Crissman a R. Zarbo, „Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract,“ *The American Journal of Surgical Pathology*, pp. 5-16, 1989.
- [32] N. Gaudin, „IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans,“ 15 June 2004. [Online]. Available: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2004/pr153.html>. [Přístup získán 22 October 2014].

- [33] J. Crissman a W. Sakr, „Squamous neoplasia of the upper aerodigestive tract. Intraepiteial and invasive squamous cell carcinoma,“ v *Head and Neck Surgical Pathology*, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 34-52.
- [34] J. Batsakis, D. Rice a A. Solomon, „The pathology of head and neck tumors: squamous and mucous - gland carcinomas of the nasal cavity, paranasal sinuses, and larynx,“ *Head Neck Surg*, pp. 497-508, 1980.
- [35] J. Llorente, F. López, C. Suárez a M. Hermsen, „Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances,“ *Nat Rev Clin Oncol.*, 17 Jun 2014.
- [36] M. Gillison, W. Koch, R. Capone, M. Stafford, W. Westra, L. Wu, M. Zahurak, R. Daniel, M. Viglione, D. Symer, K. Shah a D. Sidransky, „Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers,“ *JNCI*, č. 92/9, pp. 709-720, 3 May 2000.
- [37] P. C. Delury a et.al, „The Role of Protein Kinase A Regulation of the E6 PDZ-Binding Domain during the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 18,“ *Journal of Virology*, 26 June 2013.
- [38] L. M. Gillison a et.al., „Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers,“ *Journal of the National Cancer Institute*, pp. 709-720, 3 May 2000.
- [39] P. Delury, E. Marsch, C. James, S. Boon, L. Banks, G. Knight a S. Roberts, „The Role of Protein Kinase A Regulation of the E6 PDZ-Binding Domain during the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 18,“ *Journal of Virology*, č. 87/17, p. 9463–9472, September 2013.
- [40] L. Alos a et.al., „Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favourable outcome,“ *Cancer*, pp. 2701-2709, 115(12) 2009.
- [41] J. Bishop a et.al., „Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract,“ *Am J Surg Pathol*, pp. 185-192, 37(2) 2013.
- [42] Y. Takahashi a et.al., „Comprehensive assessment of prognostic markers for sinonasal squamous cell carcinoma,“ *Head Neck*, (e-pub ahead of print) 2013.

- [43] D. Pfister, K. Ang, D. Brizel, B. Burtness, A. Cmelak, A. Colevas, F. Dunphy, D. Eisele, J. Gilbert, M. Gillison, R. Haddad, B. Haughey, W. Hicks, Y. Hitchcock, M. Kies, W. Lydiatt, E. Maghami a R. Martins, „Head and Neck Cancers,“ *The Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, pp. 596-650, Sep 2011.
- [44] A. A. Molinolo, C. March, M. Dinali, N. Gangane, K. Jennison, S. Hewitt, V. Patel, T. Seiwert a J. Gutkind, „mTOR as a Molecular Target in HPV-Associated Oral and Cervical Squamous Carcinomas,“ *Clinical cancer Research*, pp. 2558-2568, 12 March 2012.
- [45] T. Baker and I. Rayment, "Papovaviridae," in *Nermut/Steven (eds) Animal Virus Structure*, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1987.
- [46] K. Scheffer, A. Gawlitza, G. Spoden, X. Zhang, C. Lambert, F. Berditchevski a L. Florin, „Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis,“ *J. Virol*, č. 87(6), pp. 3435-3446, March 2013.
- [47] D. Mudhakar a H. Harashima, „Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus,“ *AAPS J.*, č. 11(1), pp. 65-77, March 2009.
- [48] J. Mercer, M. Schelhaas a A. Helenius, „Virus entry by endocytosis,“ *Annu Rev Biochem*, č. 79, pp. 803-833, 2010.
- [49] N. Muñoz, X. Bosch, S. de Sanjosé, R. Herrero, X. Castellsagué, K. Shah, P. Snijders a C. Meijer, „Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer,“ *N Engl J Med*, č. 348, pp. 518-527, 6 February 2003.
- [50] N. Muñoz, „Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence,“ *J. Clin Virol*, pp. 1-5, October 2000.
- [51] M. Narisawa-Saito a T. Kiyono, „Mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced cervical carcinogenesis,“ *Nihon Rinsho*, č. 67(1), pp. 53-61, January 2009.
- [52] S. Pagliusi a G. S.M., „International standard reagents for HPV detection,“ *IOS Press*, č. 23, pp. 283-296, 2007.

- [53] E. Kho, H. Wang, N. Banerjee, T. Broker a L. Chow, „HPV-18 E6 mutants reveal p53 modulation of viral DNA amplification in organotypic cultures,“ *PNAS*, č. 110/19, pp. 7542-7549, 7 May 2013.
- [54] P. J. Snijders, H. D. A. a C. J. Meier, „Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens,“ *APMIS*, č. 118, pp. 520-528, 2010.
- [55] A. A. a K. M. Bennett, „Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus,“ *LabMed*, pp. 524-530, 2010.
- [56] B. P. Bass, K. B. Engel, S. R. Grehtag a H. M. Moore, „A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue,“ *Arch Patol Lab Med*, č. 138 (11), pp. 1520-1530, November 2014.
- [57] M. Werner, A. Chott, A. Fabiano a H. Battifora, „Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry,“ *American Journal of Surgical Pathology*, č. 24 (7), pp. 1016-1019, July 2000.
- [58] G. Turashvili, W. Yanga, S. McKinneyb, S. Kallogerc, N. Galea, Y. Nga, K. Chowa, L. Bella, J. Lorettea, M. Carriera, M. Lukc, S. Aparicioa, D. Huntsmana a S. Yipa, „Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: Defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques,“ *Experimental and Molecular Pathology*, č. 92 (1), pp. 33-43, February 2012.
- [59] S. M. Thompson, R. A. Craven, N. J. Nirmalan, P. Harnden, P. J. Selby a R. E. Banks, „Impact of pre-analytical factors on the proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue,“ *Proteomics Clin. Appl.*, č. 7, p. 241–251, 6 March 2013.
- [60] R. M. S. Inc., „Cobas DNA Sample Preparation Kit: Molecular Roche,“ Roche Molecular Systems Inc., 24 November 2014. [Online]. Available: <http://molecular.roche.com/assays/Pages/cobasDNASamplePreparationKit.aspx>. [Přístup získán 24 November 2014].
- [61] A. Abreu, R. Souza, F. Gimenes a M. Consolaro, „A review of methods for detect human Papillomavirus infection,“ *Virology Journal*, č. 9, 6 November 2012.

- [62] A. R. Kreimer, M. W. Clifford, P. Boyle a S. Franceschi, „Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review,“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, č. 14(2), pp. 467-475, 2005.
- [63] J. Geradts, R. A. Kratzke, G. A. Niehans a e. al., „Immunohistochemical Detection of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2/Multiple Tumor Suppressor Gene 1 (CDKN2/MTS1) Product p16 INK4A in Archival Human Solid Tumors: Correlation with Retinoblastoma Protein Expression,“ *Cancer Research*, č. 55 (24), pp. 6006-6011, 15 December 1995.
- [64] H. Haltas, R. Bayrak, S. Yenidunya a U. Yildirim, „The immunohistochemical detection of P16 and HPV L1 capsid protein on cell block sections from residual PapSpin liquid-based gynecology cytology specimens as a diagnostic and prognostic tool,“ *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, č. 16 (11), pp. 1588-1595, October 2012.
- [65] S. K. El-Mofty, „Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: An update with special reference to HPV-related carcinomas,“ *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, č. 19(4), 2014.
- [66] J. H. Dreyer, F. Hauck, M. Oliveira-Silva, M. H. M. Barros a G. Niedobitek, „Detection of HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma: a practical proposal,“ *Virchows Arch*, č. 462, pp. 381-389, 2013.
- [67] P. Chan, M. A. Picconi, T. H. Cheung, L. Giovanelli a J. S. Park, „Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing,“ *Crit Rev Clin Lab Sci.*, č. 49 (4), pp. 117-136, July 2012.
- [68] W. Rychlik, W. J. Spencer a R. E. Rhoads, „Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.,“ *Nucleic Acids Res.*, č. 18 (21), pp. 6409-6412, 11 November 1990.
- [69] M. F. Kramer a D. M. Coen, „Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization,“ *Curr Protoc Cytom.*, p. Appendix 3, August 2006.
- [70] K. Nybo, „DNA and general PCR methods: PCR primer design,“ *Biotechniques*, č. 46 (7), pp. 505-507, June 2009.

- [71] J. Inman-Bamber, C. Wan, T. Gardam, R. Vohra, A. Van Daal a P. Timms, „Novel PCR-EIA method for the detection of *Chlamydia pneumoniae* in respiratory specimens,“ *Mol Cell Probes*, č. 16 (1), pp. 57-61, February 2002.
- [72] A. Radonić, S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert a A. Nitsche, „Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR,“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, č. 313 (4), pp. 856-862, January 2004.
- [73] K. J. Livak a T. D. Schmittgen, „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method,“ *Methods*, č. 25 (4), p. 402–408, December 2001.
- [74] J. O'Connell, „RT-PCR Protokols,“ *Methods in Molecular Biology*, č. 193, pp. 19-25, 2002.
- [75] M. L. Wong a J. F. Medrano, „Real-time PCR for mRNA quantitation,“ *Biotechniques*, č. 39 (1), pp. 75-85, July 2005.
- [76] O. Ukpo, J. J. Flanagan, X. J. Ma, Y. Luo, W. Thorstad a J. S. Lewis, „High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma,“ *Am J Surg Pathol*, č. 35 (9), pp. 1343-1350, 2011.
- [77] M. J. Holden a L. Wang, „Quantitative Real-Time PCR: Fluorescent Probe Options and Issues. Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II,“ *Springer Series on Fluorescence*, č. 6, p. 489, 2008.
- [78] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen a F. Vitzthum, „Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications,“ *Nucleic Acids Research*, č. 32 (12), p. e103, 12 July 2004.
- [79] M. S. Rajeevan, S. D. Vernon, N. Taysavang a E. R. Unger, „Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR,“ *J Mol Diagn*, č. 3 (1), pp. 26-31, February 2001.
- [80] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. Castaño a J. Solera, „Real-time PCR detection chemistry,“ *Clin Chim Acta.*, pp. 231-250, 15 January 2015.

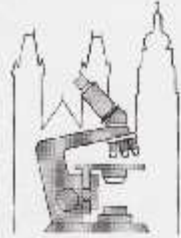
- [81] E. Rouleau, C. Lefol, V. Bourdon, F. Coulet, T. Noguchi, F. Soubrier, I. Bièche, S. Olschwang, H. Sobol a R. Lidereau, „Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome,“ *Hum Mutat.*, č. 30 (6), pp. 867-875, June 2009.
- [82] J. S. Lewis, „p16 Immunohistochemistry As a Standalone Test for Risk Stratification in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma,“ *Head Neck Pathol.*, č. 6 (1), p. 75–82, 3 July 2012.
- [83] MZČR, „Kvalita a bezpečí: Hodnocení kvality a bezpeční zdravotních služeb,“ Ministerstvo Zdravotnictví České republiky, 2010. [Online]. Available: <http://www.mzcr.cz>. [Přístup získán 29 listopad 2014].
- [84] B. Friedecký, D. Novotný, E. Pavlík, L. Plíšková, P. Riedlová, I. Subhanová, T. Zima a D. Žůrek, „Česká společnost klinické biochemie: Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýzeextrahumánního genomu,“ 16 listopad 2004. [Online]. Available: <http://www.cskb.cz/res/file/dokumenty/validace-a-verifikace-molekularne-biologickych-metod-extrahumanni-genom.pdf>. [Přístup získán 29 listopad 2014].
- [85] R. Bolehovská, R. Plíšková, B. Friedecký a V. Palička, „Postanalytické aspekty EHK v molekulární biologii extrahumánního genomu,“ *Klin. Biochem. Metab.*, č. 18 (39), pp. 12-17, 2010.
- [86] B. Chen, M. Gagnon, S. Shahangian, N. L. Anderson, D. A. Howerton a J. D. Boone, „Good laboratory practices for molecular genetic testing for heritable diseases and conditions,“ *MMWR Recomm Rep.*, č. 58, pp. 1-37, 12 June 2009.
- [87] ČIA, „O nás: Český institut pro akreditaci,“ [Online]. Available: <http://www.cia.cz>. [Přístup získán 29 listopad 2014].
- [88] S. s.r.o., „Příručka kvality: Profil společnosti a politika nestrannosti,“ 12 srpen 2013. [Online]. Available: <http://www.sekk.cz/>. [Přístup získán 29 listopad 2014].



- [89] A. Piana, G. Sotgiu, P. Castiglia, S. Pischedda, M. Dettori, C. Cocuzza, E. Muresu a A. Maida, „Molecular methods for detection of human papillomavirus infection: new insights into their role in diagnostics and epidemiological surveillance,“ *Italian Journal of Public Health*, č. 6, pp. 164-171, 2009.
- [90] Y. Sato., R. Sugie, B. Tsuchiya, T. Kameya, M. Natori a K. Mukai, „Comparison of the DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues,“ *Diagnostic Molecular Pathology*, č. 10 (4), pp. 265-271, 2001.
- [91] G. Gao, R. D. Chernock, H. A. Gay, W. L. Thorstad, T. R. Zhang, H. Wang, X. Ma, Y. Luo, J. S. Lewis a X. Wang, „A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis,“ *Int J Cancer*, č. 132 (4), pp. 882-890, 15 February 2013.
- [92] T. J. Kokkat, M. S. Patel, D. McGarvey, V. A. LiVolsi a Z. W. Baloch, „Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein,“ *Biopreserv Biobank*, č. 11(2), p. 101–106, 2013.
- [93] N. Aggerholm-Pedersen, A. Safwat, S. Bærentzen, M. Nordmark, O. S. Nielsen, J. Alsner a B. S. Sørensen, „The Importance of Reference Gene Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples from Sarcoma Patients — An Often Underestimated Problem,“ *Transl Oncol.*, č. 7(6), p. 687–693, 2014.
- [94] K. Syrjänen a S. Syrjänen, „Detection of human papillomavirus in sinonasal carcinoma: systematic review and meta-analysis,“ *Hum Pathol.*, č. 44(6), pp. 983-991, 2013.
- [95] S. K. El-Mofty a D. W. Lu, „Prevalence of high-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity,“ *Am J Surg Pathol.*, č. 29(10), pp. 1367-1372, 2005.
- [96] A. A. Molinolo a e. al., „mTOR as a Molecular Target in HPV-Associated Oral and Cervical Squamous Carcinomas,“ *Clinical cancer Research*, pp. 2558-2568, 12 March 2012.

## Přílohy

Vyjádření etické komise:



Fingerlandův ústav patologie  
Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice  
500 05 HRADEC KRÁLOVÉ

tel.: 49 583 3748  
fax: 49 583 2004  
E-mail: ryska@fhnk.cuni.cz

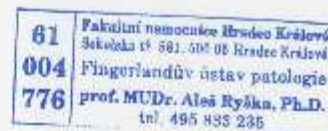
### Věc: Stanovisko přednosty Fingerlandova ústavu patologie ke studii

Souhlasím s provedením studie „Úloha vysoce rizikových lidských papilomavirů (HPV) v etiopatogenezi zhoubných nádorů sinonazální oblasti“ autorským kolektivem pod vedením doc. MUDr. Jana Laca, Ph.D., na Fingerlandově ústavu patologie LF UK a FN Hradec Králové.

V Hradci Králové, 11. 3. 2014

Prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.

Přednostu FÚP



Etická komise, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
Ethics Committee, University Hospital Hradec Kralove, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

STANOVISKO ETICKÉ KOMISE  
*Opinion of the Ethics Committee*

Vážený pan  
Doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D.  
Fingerlandův ústav patologie  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Číslo jednací/Reference number: 201403 S16P  
Řešitel/Principal Investigator: Doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D., Fingerlandův ústav patologie, LF a FN  
Název KH/Full Title of Clinical Trial: Úloha vysoce rizikových lidských papilomavirů (HPV) v etiopatogenezi zhoubných nádorů sinonazální oblasti/The role of high risk human papillomaviruses (HPV) in the etiopathogenesis of malignant tumors of the sinonasal area  
Datum doručení žádosti/Date of submission of the Application Form: 03Mar2014  
Datum jednání EK + čas/Date and time of Ethics Committee's session: 13Mar2014 (14.00-18.00)  
Seznam hodnocených dokumentů/List of all submitted documents: Žádost ze dne 3.3.2014

Vyjádření EK/ Ethics Committee's opinion:  
EK vydává / EC issues

Souhlasné stanovisko/Favourable opinion  
Nesouhlasné stanovisko/Unfavourable opinion

University Hospital Hradec Králové  
Ethics Committee  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
Czech Republic

Datum/Date: 25Mar2014

MUDr. Jiří Vortel, předseda EK  
Signature of Chairperson of the EC

vyřizuje: Ing. Petra Doležalová, tel.: 49 583 3795; E-mail: etikom@fnhk.cz

Seznam členů etické komise/List of the Ethics Committee Members:

Jméno a příjmení First name and surname	Muž/ Žena Male/ Female	Odbornost Specialization	Zaměstnanec zřizovatele EK*		Funkce v EK Role in EC	Přítomen Attendance		Hlasoval Voted	
			Ano Yes	Ne No		Ano Yes	Ne No	Ano Yes	Ne No
Petra Doležalová, Ing.	F	University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eduard Havel, M.D., PhD.	M	Physician of the Surgery Dept., University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Josef Herink, Assoc.Prof., M.D., PhD.	M	Physician , Dept. of Toxicology	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marta Horáková, Ing.	F	Retired	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaromír Hrubecský, M.D.	M	Retired	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Petr Hůlek, Prof., M.D., PhD.	M	Physician ,The 2nd Dept. of Internal Medicine, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Štěpán Klásek	M	Diocesan bishop of Hradec Kralove	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bohuslav Král, Prof., M.D., PhD.	M	Physician, The 2nd Dept. of Internal Medicine, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eva Pařízková, Assoc. Prof. , M.D.PhD.	F	Physician, Department of Pediatric Medicine, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaroslava Pečenková	F	Retired	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Rosvita Ševčílková, M.A.	F	Lawyer	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ivana Dvořáčková, M.A.	F	Vice-Head Nurse, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jiří Vortel, M.D.	M	Cardiologist – private physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	chairman	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jiřina Zatloukalová, M.A.	F	Lawyer, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Petr Žďánský, M.A.	M	Gerontological and Metabolic Department, University Hospital	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Vice- Chairperson	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(pozn: \*Zaměstnanec zřizovatele EK/ Employee of EC appointing authority)

Ethics Committee composition meets the requirements of ICH GCP standards and is working according to its written procedure which is in compliance with the above-mentioned standards (ICH E6)

University Hospital Hradec Králové  
Ethics Committee  
Sukovská 501  
500 05 Hradec Králové  
Czech Republic

Datum/Date: 13Mar2014

Jiří Vortel, M.D.  
Chairperson of the EC

Databáze výsledků:

	rok narození	pohlaví	stáří mat.	typing	subtyping	follow-up (měsíce)	p16 (>70 %)	DNA ISH	DNA EIA	A (450 nm)	DNA typing	DNA β glob	RNA ISH	RNA RT-qPCR	RNA β glob	HPV status
1	1929	Ž	15	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	23	-	-	-	0,12		invalide				-
2	1926	Ž	14	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	11	-	-	-	0,093		31,42				-
3	1923	M	13	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	36	-	-	-	0,078		31,89				-
4	1953	M	12	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	24	-	-	-	0,104		27,44				-
5	1940	M	10	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	16	-	-	-	0,064		31,13				-
6	1974	M	9	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	16	-	-	-	0,062		32,62				-
7	1954	M	9	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	14	-	-	-	0,087		invalide				-
8	1952	M	9	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	104	-	-	-	0,079		31,61				-
9	1932	M	8	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	3	-	-	-	0,079		invalide				-
10	1930	M	8	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	10	-	-	-	0,061		27,67				-
11	1930	Ž	8	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	10	-	-	-	0,067		30,52				-
12	1952	Ž	8	dlaždicobuněčný karcinom	bazaloidní	91	+	+	-	0,067	-	28,46	+	18+	32,31	+
13	1930	M	8	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	71	+	+	-	0,103	-	29,61	+	-	23,32	+
14	1948	M	6	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	9	-	-	-	0,085		27,63				-
15	1951	M	5	dlaždicobuněčný karcinom	papilární	58	-	-	-	0,096		invalide				-
16	1951	Ž	5	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	54	-	-	-	0,092		28,75				-
17	1933	Ž	5	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	9	-	-	-	0,083		31,17				-
18	1944	M	4	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	50	+	+	+	0,355	18	28,54	+	18+	25,73	+
19	1947	Ž	4	dlaždicobuněčný karcinom	adenoskvamózní	4	-	-	-	0,063		28,51				-
20	1929	Ž	3	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	4	-	-	-	0,067		27,55				-
21						1	-	-	-	0,108		33,17				-
22	1923	Ž	10	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	1	-	-	-	0,114	-	29,17	-	-	24,56	-
23	1929	M	3	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	10	-	-	-	0,118		27,84				-
24	1939	Ž	3	dlaždicobuněčný karcinom	verukózní	29	-	-	-	0,104		27,85				-
25	1941	M	2	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	15	+	+	-	0,124	18	26,63	+	18+	26,12	+
26	1956	M	2	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	15	+	+	-	0,105	35	27,42	+	35+	25,93	+
27	1942	Ž	1	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	16	-	-	-	0,107		27,01				+
28	1957	Ž	1	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	4	+	+	-	0,12	18	26,68	+	-	invalide	+
29	1936	Ž	8	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	78	-	-	-	0,094		31,89				-
30	1953	M	4	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	2	-	-	-	0,104	-	33,97	+	-	30,32	+
31	1942	M	7	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	55	-	+	-	0,104	-	31,7	-	-	26,09	+
32	1937	M	13	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	19	-	+	-	0,103	-	33,36	-	-	29,61	+
33	1939	M	10	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	23	+	-	-	0,092	-	30,85	+	-	invalide	+
34	1942	M	10	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	32	-	-	-	0,088		32,21				-

	rok narození	pohlaví	stáří mat.	typing	subtyping	follow-up (měsíce)	p16 (>70 %)	DNA ISH	DNA EIA	A (450 nm)	DNA typing	DNA β glob	RNA ISH	RNA RT- qPCR	RNA β glob	HPV status
35	1925	M	14	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	30	-	+	-	0,087	18	33,09	-	-	30,07	+
36	1928	M	19	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	3	-	-	-	0,097		invalide				-
37	1934	M	14	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící		-	+	-	0,086	-	invalide	-	-	32,78	+
38	1958	M	10	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	14	-	-	-	0,088		30,16				-
39	1950	M	9	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	18	-	-	-	0,084		29,63				-
40	1935	M	8	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	14	-	-	-	0,078		29,46				-
41	1927	Ž	6	dlaždicobuněčný karcinom	rohovějící	54	-	-	-	0,086		invalide				-
42	1962	M	6	dlaždicobuněčný karcinom	bazaloidní	8	-	+	-	0,082	-	27,92	-	-	invalide	+
43	1948	M	6	dlaždicobuněčný karcinom	bazaloidní	66	+	+	-	0,089	-	invalide	-	16+	30,63	+
44	1935	M	6	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	5	+	-	-	0,084	-	31,89	-	-	30,96	-
45	1940	M	5	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	5	+	-	-	0,078	-	28,6	-	-	24,13	-
46	1961	M	4	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	39	+	+	+	0,457	-	27,82	+	16+	27,03	+
47	1971	M	1	adenoidně cystický karcinom	kribriformní	241	+	-	-	0,08		25,03				-
48	1940	Ž	13	adenoidně cystický karcinom	kolonický	35	-	-	-	0,077		invalide				-
49	1931	M	7	adenoidně cystický karcinom	kolonický	152	-	+	-	0,089		31,13				+
50	1943	M	3	karcinoid typický		164	-	-	-	0,133		25,35				-
51	1944	M	13	adenokarcinom neitestinální		150	-	-	-	0,082		30,66				-
52	1919	M	12	adenokarcinom intestinální	kolonický	33	-	-	-	0,086		28,75				-
53	1966	Ž	10	adenoidně cystický karcinom	kribriformní	27	-	-	-	0,077		31,99				-
54	1971	Ž	4	adenokarcinom neitestinální		129	-	-	-	0,081		29,91				-
55	1941	M	10	adenokarcinom intestinální	mucinózní	100	-	-	-	0,081		27,84				-
56	1980	M	2	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	73	+	+	-	0,083	-	25,93	+	-	21,94	+
57	1956	M	3	malobuněčný neuroendokrinní karcinom		15	+	-	-	0,08	-	27,09	-	16+	25,46	+
58	1953	Ž	1	adenoidně cystický karcinom	kribriformní	13	+	-	-	0,085		25,03				-
59	1973	Ž	1	adenokarcinom neitestinální		8	-	-	-	0,083		invalide				-
60	1975	Ž	1	malobuněčný neuroendokrinní karcinom		8	+	+	-	0,08	-	25,57	-	-	20,84	+
61	1952	M	1	adenokarcinom intestinální	kolonický	4	-	-	-	0,078		24,68				-
62	1978	M	5	adenoidně cystický karcinom	kribriformní		+	-	-	0,076		31,48				-
63	1955	M	4	adenoidně cystický karcinom	solidní	35	+	+	-	0,081		28,05				+
64	1960	M	3	sinonasální nediferencovaný karcinom		28	-	-	-	0,083		28,89				-
65	1966	Ž	4	adenokarcinom neitestinální		1	-	-	-	0,082		26,87				-
66	1938	Ž	10	sinonasální nediferencovaný karcinom			+	+	-	0,085	-	29,71	-	-	25,28	+
67	1951	Ž	2	adenoidně cystický karcinom	kribriformní	150	+	-	-	0,084		26,52				-
68	1976	Ž	11	adenokarcinom neitestinální		56	-	-	-	0,08		invalide				-

	rok narození	pohlaví	stáří mat.	typing	subtyping	follow-up (měsíce)	p16 (>70 %)	DNA ISH	DNA EIA	A (450 nm)	DNA typing	DNA β glob	RNA ISH	RNA RT-qPCR	RNA β glob	HPV status
69	1940	M	5	sinonasální nediferencovaný karcinom		1	-	-	-	0,078		27,6				-
70	1961	Ž	3	adenoidně cystický karcinom	kribriformní	36	+	-	-	0,076		27,99				-
71	1949	M	3	lymfoepiteliální karcinom		7	-	+	-	0,085	-	30,75	-	-	26,38	+
72	1990	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,078						-
73	1960	M		negativní kontrola			-	-	-	0,084						-
74	1941	M		negativní kontrola			-	-	-	0,083						-
75	1967	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,085						-
76	1952	M		negativní kontrola			-	-	-	0,085						-
77	1968	M		negativní kontrola			-	-	-	0,106						-
78	1950	M		negativní kontrola			-	-	-	0,077						-
79	1954	M		negativní kontrola			-	-	-	0,077						-
80	1964	M		negativní kontrola			-	-	-	0,083						-
81	1980	M		negativní kontrola			-	-	-	0,076						-
82	1953	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,094						-
83	1953	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,076						-
84	1962	M		negativní kontrola			-	-	-	0,114						-
85	1983	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,079						-
86	1939	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,075						-
87	1988	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,076						-
88	1985	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,077						-
89	1965	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,076						-
90	1941	Ž		negativní kontrola			-	-	-	0,076						-
91	1950	M		negativní kontrola			-	-	-	0,079						-
92	1933	M	12	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	24	+	+	-	0,076	16	31,73	+	16+	26,51	+
93	1954	Ž	0	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	2	-	-	-	0,077	-	25	+	-	19,37	+
94	1941	M	0	dlaždicobuněčný karcinom	nerohovějící	2	+	+	-	0,078	16	25,44	+	16+	23,58	+