

Lidský papilomavirus – role v karcinogenezi cervixu a možnosti jeho detekce

Human Papillomavirus – Role in Cervical Carcinogenesis and Methods of Detection

Bartošík M., Hrstka R., Jiráková L.

RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Perzistentní infekce onkogenním typem lidského papilomaviru (human papillomavirus – HPV), nejčastěji HPV 16 a HPV 18, může vést k rozvoji řady maligních onemocnění, zejména pak ke karcinomu děložního hrdla u žen. Testování na přítomnost HPV DNA se tudíž zavádí jako komplementární metoda ke stávajícímu cytologickému vyšetření, mimo jiné i díky vyšší citlivosti. **Cíl:** Tento přehledový článek pojednává o roli HPV v karcinogenezi děložního hrdla, zejména popisuje vznik cervikálních intraepiteliálních lézí (CIN1-3) a molekulární mechanismus transformace buněk. Představuje existující biomarkery pro diagnostiku prekancerózních lézí, mezi které patří např. mRNA transkripty genů *E6* a *E7*, protein p16 (inhibitor cyklin-dependentní kinázy regulující přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu), změněné metylační vzorce DNA nebo působení specifických miRNA, tj. krátkých nekódujících jednořetězcových RNA o délce 18–22 nukleotidů, které posttranskripčně regulují genovou expresi. Dále rozebírá výhody a nevýhody komerčně dostupných HPV testů, a v neposlední řadě představuje nově vyvíjené metody umožňující levnou a rychlou diagnostiku HPV na bázi optické i elektrochemické detekce. **Závěr:** Nádory děložního hrdla i navzdory velkému pokroku v posledních letech stále patří mezi nejrozšířenější ženské malignity s vysokou mortalitou, zejména v rozvojových zemích. Ke snížení mortality by mohla pomoci implementace HPV testování do rutinního screeningového vyšetření. To však bude třeba finančně zefektivnit tak, aby bylo cenově konkurenceschopné se stávajícími cytologickými vyšetřeními.

Klíčová slova

HPV – karcinom cervixu – HPV testování – hybridizace nukleových kyselin – mRNA – metylace DNA – miRNA

Summary

Background: Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV) strains, especially HPV 16 and HPV 18, is associated with the onset of various malignant diseases, including cervical carcinoma in women. HPV DNA testing is thus being implemented as a complementary method to standard cytological examination, mainly due to its increased sensitivity. **Aim:** This review outlines the role of HPV in cervical carcinogenesis, with a focus on the formation of cervical intraepithelial neoplasias (CIN1–3) and the molecular mechanism underlying cellular transformation. Current biomarkers used to screen premalignant lesions are described, including mRNA transcripts of the *E6* and *E7* genes, protein p16 (a cyclin-dependent kinase inhibitor that regulates cell cycle progression from G1 to S phase), altered DNA methylation patterns, and actions of specific microRNAs (short (18–22 bp), non-coding, single-stranded RNA molecules that regulate gene expression at the post-transcriptional level). This review also describes the advantages and drawbacks of commercial HPV tests, and depicts novel methods for more cost-effective and faster HPV diagnostics based on optical or electrochemical detection. **Conclusion:** Although great progress has been made, the incidence and mortality rates of cervical malignancies remain relatively high, especially in developing countries. Incorporation of HPV testing into routine screening programs could help to decrease mortality rates; however, the cost of such testing must be reduced if it is to compete with current cytology-based examinations.

Key words

HPV – cervical carcinoma – HPV testing – nucleic acid hybridization – mRNA – DNA methylation – microRNA

Práce byla podpořena grantem MŠMT-NPU I-LO1413 a GAČR 17-08971S.

This work was supported by MEYS-NPS I-LO1413 and GAČR 17-08971S.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.

RECAMO

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: martin.bartosik@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 25. 9. 2017

Přijato/Accepted: 26. 1. 2018

doi: 10.14735/amko201889

Úvod

Infekce lidským papilomavirem (human papillomavirus – HPV) patří mezi nejběžnější pohlavně přenosné choroby. Předpokládá se, že až 80 % populace se během života setká s infekcí HPV. Celkově je známo > 200 genotypově odlišných kmenů lidských papilomavirů [1], ovšem ne všechny jsou pro člověka nebezpečné, většina z nich způsobuje pouze kožní nebo genitální bradavice (jde o tzv. low-risk HPV, LR-HPV). Některé kmeny však vykazují onkogenní charakter (HPV 16, 18, 36, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, souhrnně high-risk HPV, HR-HPV), což znamená, že jejich dlouhodobá neléčená přítomnost může vést k maligní transformaci epitelální tkáně a ke vzniku nádorů cervixu (děložního hrdla), vagíny, anální oblasti, nebo dokonce hlavy a krku. Nejrozšířenějšími onkogenními kmeny jsou HPV 16 a HPV 18, u kterých se uvádí, že způsobují až 70 % všech karcinomů děložního hrdla [2]. Genom HPV je tvořen dvoušroubovicovou kruhovou DNA o délce ~ 8 kb (obr. 1), rozdělenou do tří oblastí:

1. časná oblast (early region) obsahující vždy geny *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* a *E7*, u některých kmenů pak ještě *E3* a *E8*;
2. oblast obsahující kódující sekvence genů pozdní fáze (late region) *L1* a *L2*;
3. kontrolní oblast (long control region – *LCR*)

Proteiny kódované geny časné oblasti mají spíše regulační funkci, podílejí se

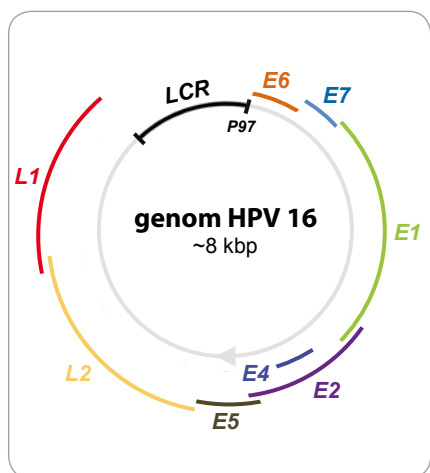
např. na replikaci a transkripci genomu, buněčné signalizaci nebo apoptóze a jsou častěji exprimované v raných fázích infekce (od toho pojmenování early). Proteiny pozdní fáze, *L1* a *L2*, tvoří virový kapsid. Oblast *LCR* zahrnuje zejména místa transkripčních faktorů a promotoru *P97* zodpovědný za transkripci téměř všech genů z časné oblasti. Za normálních okolností je transkripce z promotoru *P97* inhibována vazbou proteinu *E2*, čímž je hladina proteinů *E6* a *E7* udržována nízká. Genová exprese je polycistronní, více genů má společný promotor a výsledné mRNA transkripty tak závisí na zvoleném čtecím rámci [3]. Navíc díky alternativnímu sestřihu může jeden mRNA transkript dát vzniknout více proteinům [4].

Role HPV v karcinogenezi cervixu

Zjednodušeně lze vznik cervikálního karcinomu rozdělit do čtyř fází – HPV infekce, virová perzistence, vznik prekanceróz a invazivní karcinom [2] (obr. 2). Naštěstí dokáže imunitní systém člověka HPV infekci ve většině případů odstranit. V opačném případě se infekce stává perzistentní. Vznikají premaligní léze, u kterých je virová DNA v buňce lokalizována nejdříve epizomálně, tj. není začleněná do chromozomální DNA. Postupně však dochází k molekulárním změnám, chromozomální nestabilitě a integraci virové DNA do genomu hostitele, která vede ke ztrátě regionu *E2*. Sníží se tak

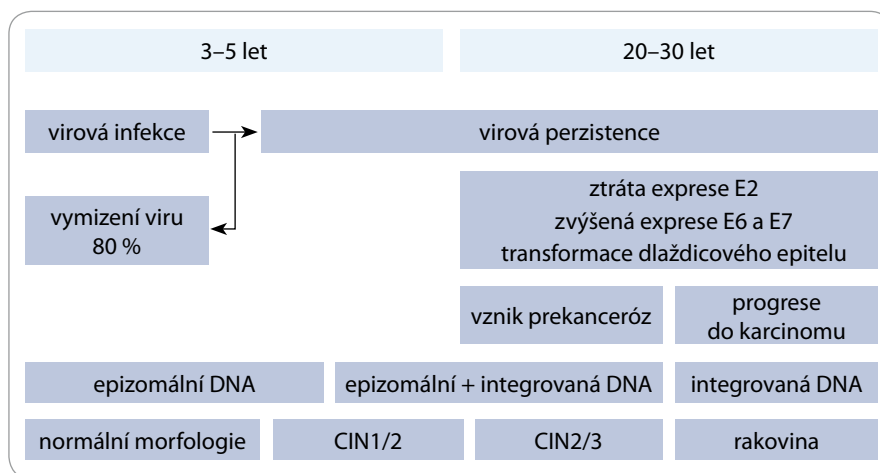
hladina proteinu *E2*, čímž dochází ke zvýšené expresi onkoproteinů *E6* a *E7*, jelikož za normálních okolností protein *E2* negativně reguluje transkripci genů *E6* a *E7* vazbou na tzv. *E2*-vazebné místo v rámci *LCR*. Karcinogenní potenciál proteinů *E6* a *E7* je dán tím, že inhibují expresi důležitého nádorového supresorového proteinu p53, resp. retinoblastomového proteinu pRb, což vede k deregulaci buněčného cyklu buňky, ke snížení exprese proteinů důležitých při opravných mechanismech DNA a k postupné akumulaci buněčných defektů.

Z histologického hlediska dochází k transformaci epitelální tkáně cervixu, vznikají tzv. cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) odstupňované dle progresu onemocnění jako CIN1, CIN2 a CIN3, přičemž u CIN1 a části CIN2 lézí může dojít ke spontánní regresi, aniž by byla potřebná konizace (mluvíme o tzv. produktivních lézích, odpovídajících dle nové nomenklatury low-grade skvamózním intraepiteliálním lézím (LSIL)). CIN3 a zbylá část CIN2 patří do tzv. transformujících lézí (odpovídajících high-grade skvamózním intraepiteliálním lézím (HSIL)), které jsou spojeny se zmíněnou deregulací a nadměrnou expresí *E6* a *E7*, přičemž CIN3 je posledním předstupněm invazivního karcinomu. Bohužel z morfoloického hlediska není možné rozlišit produktivní a transformující CIN2, a je tedy obtížné určit, zda infekce vymizí, nebo povede až ke vzniku karcinomu. Kromě samotného HPV testování se tak uvažuje o dalších



Obr. 1. Genom HPV 16.

Schematické zobrazení polohy jednotlivých genů v rámci kruhového genomu HPV 16.



Obr. 2. Proces karcinogeneze.

Chronologické zobrazení karcinogeneze od HPV infekce až po vznik karcinomu děložního hrdla, včetně lokalizace virové DNA a jednotlivých fází onemocnění.

biomarkerech, které by přesněji určily případy vyžadující léčbu. Mezi tyto markery patří kupříkladu mRNA transkripty genů *E6* a *E7* (produkty aktivní exprese těchto genů), jejichž zvýšená přítomnost poukazuje na přítomnost transformující léze [5]. Nedávná korejská studie např. uvádí až 91% citlivost a 98,6% specifitu pro detekci CIN2+ lézí (pro 337 vzorků) při použití HPV *E6/E7* mRNA testu [6]. Autoři ovšem zdůrazňují, že bude zapotřebí provést rozsáhlejší klinické studie s heterogennějším výběrem populace s ohledem na geografické rozdíly.

Mezi další markery patří protein p16^{INK4a}, jehož hladina se zvyšuje inaktivací pRb. Jedná se o inhibitor cyklin-dependentní kinázy regulující přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. I navzdory velké variabilitě v metodách a interpretacích dat existuje spousta studií popisujících korelaci mezi zvýšenou expresí p16^{INK4a} a přítomností CIN2+ lézí [7]. Americká společnost pro kolposkopii a cervikální patologii dokonce doporučila imunohistochemické stanovení p16 u diagnosticky sporných lézí jakožto vhodnou metodu pro rozlišení prekanceróz za předpokladu výrazné „blokované“ positivity stanovení p16 [8]. Jako možné biomarkery jsou uvažovány i aberantní epigenetické změny (zejména v DNA metylaci) nebo změněné hladiny miRNA (viz níže).

Epigenetické změny DNA u HPV

Nejvíce studovaným epigenetickým mechanismem ve spojitosti s cervikálními lézemi jsou metylace DNA, tj. modifikace 5'-uhlíku cytosinu v dinukleotidu CpG metylovou skupinou (za vzniku metylcytosinu). Například metylace promotoru má za následek „vypnutí“ exprese příslušného genu, a pokud je tímto promotorem kontrolována exprese nádorového supresorového genu, hypermetylace tohoto promotoru způsobí nižší expresi daného nádorového supresoru, což může vést až ke karcinogenezi.

I když jsou změněné metylační vzorce virové DNA v souvislosti s progresí karcinomu cervixu dobře známé, data získaná z různých studií jsou často nekonzistentní [9], zejména co se týká asociace mezi metylací v *LCR* regionu a CIN2+. Některé práce uvádějí pozitivní korelaci

mezi frekvencí metylace v *LCR* a progresí onemocnění [10,11], jiné naopak ukazují sníženou metylaci (demetylací) určitých promotorů v *LCR* u pacientů s CIN3 a rakovinou děložního hrdla v porovnání se zdravými jedinci [12]. To je pravděpodobně způsobeno různou přípravou klinických vzorků nebo analýzou odlišných CpG ostrůvků [13]. Zřejmě nejkonzistentnější výsledky vykazuje oblast genů *L1* a *L2*, kde dochází ke zvýšené metylaci u karcinomů [14].

Mezi metody studia metylace DNA, které byly nedávno detailněji popsány v časopise Klinická onkologie [15], patří např. restrikční analýza v kombinaci s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (quantitative polymerase chain reaction – qPCR), metylačně specifická PCR (methylation-specific PCR – MSP), MethyLight PCR (kombinace MSP a fluorescenčního měření pomocí TaqMan sondy) anebo MS-HRM (Methylation-Specific High Resolution Melting) přístup využívající rozdílů teplot tání dvouřetězových DNA v závislosti na jejich sekvenci. Zmíněné metody využívají buď metylačně senzitivní restrikční endonukleázy rozeznávající a štěpící konkrétní restrikční místa v DNA v závislosti na přítomnosti metylcytosinu, anebo reakci DNA s hydrogensulfidem sodným (tzv. bisulfidovou konverzi), který konvertuje cytosin v DNA na uracil, přičemž metylcytosin zůstává nezměněn.

Post-transkripční regulace pomocí miRNA

Funkcí miRNA, tj. krátkých nekódujících jednořetězových RNA o délce 18–22 nukleotidů, je post-transkripční regulace genové exprese vedoucí k degradaci cílové mRNA a následnému poklesu hladiny příslušného proteinu. miRNA vykazují funkci supresorovou i onkogenní, a proto jsou v současné době intenzivně studovány. Uvažuje se o jejich potenciálním využití jako diagnostických či prognostických biomarkerů, či dokonce v terapii.

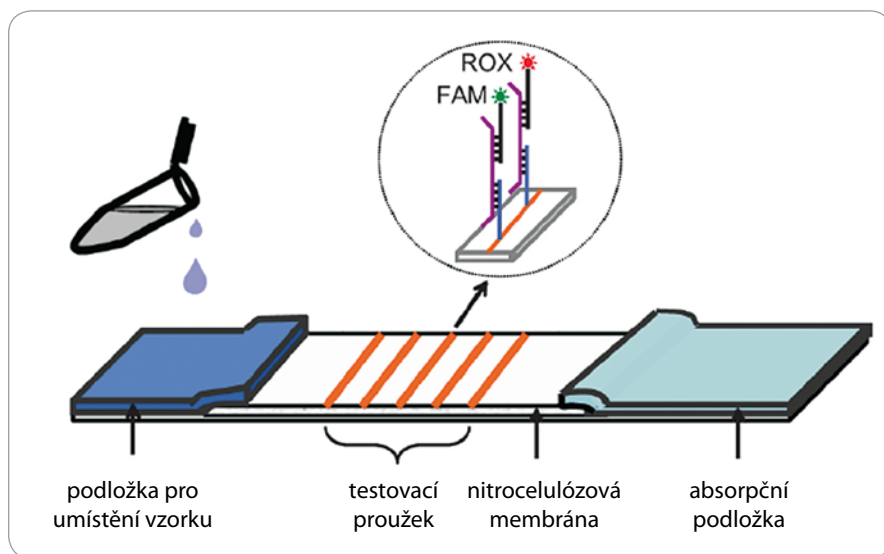
Z těchto důvodů byly provedeny celogenomové studie zaměřené na expresi miRNA v cervikálních lézích, ovšem pouze několik miRNA sekvencí se ukázalo být konzistentně změněno napříč těmito studii [13]. Nejčastěji uváděné

nádorové supresorové miRNA jsou miR-143, miR-145 a miR-214, naopak za onkogenní miRNA jsou považovány např. miR-21 a miR-146a [13,16]. Pro definitivní validaci vybraných miRNA bude ovšem potřeba provést více nezávislých studií a rovněž popsat přesnou roli jednotlivých miRNA v karcinogenezi indukované virem HPV.

Současné testování HPV

Aktuálně se v ČR na přítomnost HPV testují pouze 4 % pacientek s abnormální cytologií s nejasným významem. Cytologie z tekutého média (liquid-based cytology – LBC) je odběrová metoda založená na klasickém Pap testu, avšak odebraný vzorek se místo přímé fixace na sklíčku umísťuje do vhodného média (komerčně pod názvem ThinPrep Pap Test) [17]. Tento postup je vhodný i pro diagnostiku DNA HPV bez nutnosti dvou odběrů. Z roztoku se izolovaná DNA/RNA testuje pomocí komerčně dostupných testovacích sad [18]. Většina testovacích sad je schopná detekovat přítomnost několika HPV typů, a to včetně rozlišení HR/LR HPV a konkrétní genotypizace. Standardně se provádí detekce HPV 16 a HPV 18 (Cervista HPV 16/18 Assay, Hologic), ale existují testy, které zvládnou až 37 genotypů současně (LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test, Roche).

Spousta komerčních HPV testů je založena na PCR amplifikaci a následné hybridizaci. Hlavní rozdíly mezi testy pak tkví v používaných primerech a způsobech detekce. Dalším rozdílem je izolace DNA pro amplifikaci, kterou lze provádět pomocí kolonek (HC2 High-Risk HPV DNA Test, Qiagen) nebo magnetických kuliček (RealTime High Risk HPV, Abbott). Nevýhodou mnoha testovacích sad je jejich zaměření na přítomnost *L1* genu (kódujícího hlavní kapsidový protein) [17], který však může být deletován v průběhu integrace virové DNA do lidského genomu. V případě, že *L1* region nebude přítomen, DNA HPV test bude falešně negativní [19]. Na trhu se však objevuje stále více testů, které obsahují primery i pro *E6/E7* kódující oblast, např. AMPLICOR® Human Papillomavirus Test (Roche) se schválením CE-IVD, které jsou klíčové pro maligní transformaci způsobenou HPV.



Obr. 3. Fluorescenční dipstick.

Roztok DNA se po nakápnutí na jeden konec dipsticku laterálním prouděním dostane až k testovacím proužkům obsahujícím vazebné DNA sondy komplementární k 13 typům HPV DNA. Dochází k hybridizaci a po následném přidání fluorescenčně značených DNA sond i k fluorescenci. Absorbující podložka zachytává zbytek roztoku.

Převzato z [21].

ROX – 6-carboxy-X-rhodamine, FAM – 6-carboxyfluorescein

Stále více se také rozšiřuje přístup spočívající v hybridizaci amplifikované DNA na sondy vázané na nitrocelulózu proužky, který současně poskytuje informace o genotypu HPV, nicméně tato metodika je náročnější na přístrojové vybavení (INNO-LiPA HPV Genotyping, Innogenetics). Odlišný přístup bez nutnosti PCR amplifikace je použití hybridizační techniky k detekci virové DNA pomocí RNA sondy. Po navázání vzniká DNA/RNA duplex, který je zachytáván protilátkou specifickou pro hybridní molekuly. Následná detekce probíhá vazbou další protilátky s vhodnou detekční značkou. Příkladem tohoto přístupu může být HC2 High-Risk HPV DNA Test (Qiagen). Dalším možným způsobem detekce cílené na *E6/E7* oblast je test ZytoFast HPV-Typing ISH Kit (ZytoVision). Test dokáže pomocí značených DNA sond detekovat DNA i RNA a rozpoznávat i různé typy HPV. Tento test je určen pro hybridizaci *in situ* (chromogenic *in situ* hybridization), tudíž je vhodnější spíše pro bioptické vzorky.

Další možností detekce *E6/E7* oblasti HPV může být zaměření se na mRNA, např. pomocí testu Aptima HPV Assay (Hologic), také se schválením CE-IVD.

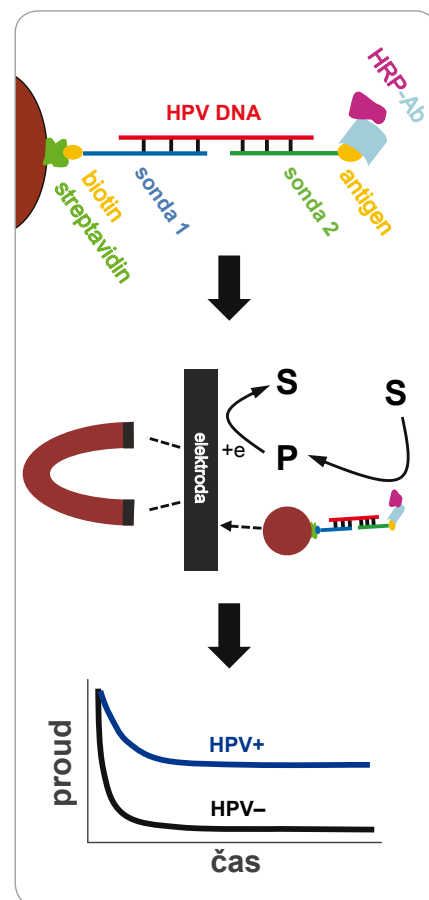
Cílená detekce *E6/E7* mRNA může specifikovat stadium onemocnění, neboť její hladina s progresí onemocnění stoupá.

Plošné testování HPV, zavedené např. ve Spojených státech, prodloužilo interval mezi preventivními cytologickými vyšetřeními v podobě Pap testů na dobu 3 let (naopak v ČR jsou cytologická vyšetření prováděna 1× ročně) a zmíněné HPV testování je prováděno každých 5 let (zavedeno pro pacientky nad 30 let) [20].

Nové přístupy detekce HPV

Kromě komerčně dostupných kitů pro detekci HPV DNA, popsanych v předešlé kapitole, jsou vyvíjeny nové metody, jejichž ambicí je učinit existující HPV testování cenově dostupnější a instrumentálně méně náročné. I tyto přístupy většinou využívají hybridizace DNA mezi hledanou sekvencí HPV DNA a vhodnou DNA sondou, a to přímo v roztoku nebo na vhodném pevném povrchu, např. magnetických kuličkách, obvykle s využitím fluorescenčních nebo elektrochemických metod detekce.

Jedním z příkladů uživatelsky příjemné alternativy ke stávajícím přístupům by mohl být tzv. dipstick test, který



Obr. 4. Elektrochemický test pro detekci virové DNA.

Test je založen na hybridizaci virové DNA se dvěma sondami – vazebnou sondou (sonda 1) připevněnou na magnetické kuličky, a detekční sondou (sonda 2) značenou antigenem (nahore). Po hybridizaci jsou magnetické kuličky přitáhnuty k povrchu elektrody pomocí magnetu (uprostřed) a je elektrochemicky měřen signál z enzymatické reakce křenové peroxidázy (HRP), která je konjugována s protilátkou (Ab) specifickou vůči antigenu (dole).

HRP – křenová peroxidáza,
S – substrát, P – produkt.

Převzato z [27].

je do značné míry podobný jednorázovým těhotenským testům. Nedávno byl vyvinut dipstick test na bázi laterálního proudění (lateral flow dipstick), obsahující nitrocelulózu membránu pokrytou DNA vazebnými sondami pro detekci 13 onkogenních typů HPV [21] (obr. 3). Vzorek obsahující HPV DNA byl nejdříve amplifikován pomocí asymetrické PCR, jednořetězcové amplikony byly následně hybridizovány s vazebnými son-

dami na různých místech membrány a detekce byla provedena pomocí DNA sond fluorescenčně značených molekulami ROX a FAM. Zvýšená fluorescence jedné z fluorescenčních barev, vždy na jiném místě membrány, pak znamenala přítomnost daného HPV typu. Dipstick byl úspěšně validován na klinickém materiálu s > 98% konkordancí s komerčně dostupným kitem GenoArray (HybridBio). Další dipstick test s fluorescenční detekcí využil namísto PCR tzv. izotermální amplifikaci [22]. Na rozdíl od PCR reakce, která vyžaduje termocykler (z důvodu cyklování teplot) a delší čas, dokáže speciální polymeráza, při izotermální amplifikaci amplifikovat DNA při konstantní teplotě (obvykle kolem 60 °C) během kratší doby (za < 1 hod). Autoři prezentovali úspěšné rozlišení kmenů HPV 16 a HPV 18 u klinických vzorků a předpokládají, že by test mohl být aplikován v menších nemocnicích a klinikách. Výhodou fluorescenčního měření je vysoká citlivost a možnost paralelního stanovení velkého množství vzorků současně (několik desítek až stovek). Často ovšem vyžaduje náročnější instrumentaci a relativně drahé fluorescenční barvy.

Elektrochemická analýza představuje zajímavou, i když zatím méně používanou alternativu ve srovnání se stávajícími metodami založenými zejména na optické detekci [23]. Nabízí relativně levnou, rychlou a přístrojově nenáročnou možnost detekce na miniaturizovaných čípech. V posledních několika letech pozorujeme výrazný nárůst počtu prací na téma elektrochemické detekce DNA, zejména co se týká aplikace v onkologickém výzkumu [24]. Objevilo se i několik strategií pro stanovení přítomnosti DNA pocházející z HPV 16 [25,26], ovšem ne všechny práce demonstrovaly použitelnost metody na klinických vzorcích. Nedávno byl vyvinut rychlý elektrochemický test pro detekci HPV 16 aplikovatelný i na klinickém materiálu [27]. Pomocí magnetických kuliček byla ze vzorků DNA (izolovaných z kartáčkových stěrů) separována virová DNA z HPV 16 a po PCR amplifikaci byla sledována elektrochemická odezva na elektrodových čípech, které umožňují paralelní detekci více vzorků (obr. 4). Test dokázal úspěšně rozlišit HPV 16 od HPV 18 a vý-

sledky z kartáčkových stěrů dobře korelovaly se standardními metodami. Pro širší použití elektrochemických metod je nicméně zapotřebí jejich rozsáhlejší validace na klinických vzorcích.

Další zajímavou a relativně jednoduchou možností je amplifikace virové DNA spojená s kolorimetrickou [28,29] nebo turbidimetrickou detekcí [30], a to bez nutnosti hybridizace s DNA sondou. Jinými slovy, pokud neznámý vzorek obsahuje virovou DNA, dojde k její amplifikaci a díky exponenciálnímu nárůstu množství DNA ve vzorku dochází i ke změně vlastností roztoku, případně dochází k četnějším interakcím amplikonů s vhodně zvolenou látkou. Pokud se kupříkladu do reakce přidá komplex kalceinu a iontů manganu, je možné detekovat vznik amplikonů kolorimetricky. Během amplifikace se uvolňuje pyrofosfát, který ionty manganu váže na sebe, tím je kalcein uvolněn do roztoku a dochází ke změně barvy z oranžové na žlutozelenou [28]. Turbidimetrické měření využívá skutečnosti, že během amplifikace nastává vysrážení uvolněného pyrofosfátu v přítomnosti hořčičnatých iontů, což vede k zakalení roztoku (zvýšení turbidity) [30]. Výhodou obou metod je možnost stanovení přítomnosti virové DNA pouhým okem (díky změně barvy, resp. zákalu), ovšem za cenu poněkud nižší citlivosti.

Závěr a výhled do budoucnosti

I když diagnostika i prevence cervikálních lézí za poslední léta doznala velkého pokroku, a to zejména díky zavedení LBC či HPV testování, resp. díky vývoji vakcín proti onkogenním genotypům HPV a jejich zavedení do praxe, nádory děložního hrdla stále patří mezi nejrozšířenější ženské malignity s vysokou mortalitou zejména v rozvojových zemích, kde spolehlivé screeningové programy chybí.

V ČR je stav lepší, i když i zde je mortalita v porovnání se zeměmi západní Evropy relativně vysoká. Zřejmě i díky ad-resnému zvaní na preventivní prohlídky (zavedenému v roce 2014) však roste počet žen, které podstupují screeningové vyšetření (čímž roste i incidence), zároveň však dochází k mírnému poklesu mortality. V současnosti je vyšetření při-

tomnosti nukleové kyseliny vysoce rizikových kmenů HPV v cervikálním stěru hrazeno pouze ženám se sporným cytologickým nálezem nebo jako kontrola konizačního či ablačního výkonu (konkrétně se jedná o výkon č. 95201). Předpokládá se, že implementace HPV testování do rutinního screeningového vyšetření by mohla ještě výrazněji napomoci ke snížení mortality. Avšak aby k tomu skutečně došlo, bude zřejmě zapotřebí zlevnit HPV testování tak, aby bylo cenově konkurenceschopné se stávajícími cytologickými vyšetřeními.

Literatura

1. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1–17.
2. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370(9590): 890–907. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0.
3. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286–2302.
4. Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol* 2010; 5(10): 1493–1506. doi: 10.2217/fmb.10.107.
5. Origeni M, Cristoforoni P, Carminati G et al. E6/E7 mRNA testing for human papilloma virus-induced high-grade cervical intraepithelial disease (CIN2/CIN3): a promising perspective. *Ecantermedicallscience* 2015; 9: 533. doi: 10.3332/ecancer.2015.533.
6. Munkhdelger J, Kim G, Wang HY et al. Performance of HPV E6/E7 mRNA RT-qPCR for screening and diagnosis of cervical cancer with ThinPrep® Pap test samples. *Exp Mol Pathol* 2014; 97(2): 279–284. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.08.004.
7. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(10): 2536–2545. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0306.
8. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT et al. The Lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of american pathologists and the american society for colposcopy and cervical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(10): 1266–1297. doi: 10.5858/arpa.LGT200570.
9. Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L et al. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(12): 2125–2137. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0905.
10. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006; 354(2): 280–285. doi: 10.1016/j.virol.2006.06.018.
11. Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *Plos One* 2011; 6(9): e24451. doi: 10.1371/journal.pone.0024451.
12. Hublarová P, Hrstka R, Rotterová P et al. Prediction of human papillomavirus 16 E6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(3): 321–325. doi: 10.1111/IGC.0b013e31819d8a5c.

13. Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(6): 395–405. doi: 10.1038/nrc3728.
14. Kalantari M, Chase DM, Tewari KS et al. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: A pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. *J Med Virol* 2010; 82(2): 311–320. doi: 10.1002/jmv.21676.
15. Bartošík M, Ondroušková E. Nové metody studia metylace DNA – MS-HRM analýza a elektrochemie. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 64–71. doi: 10.14735/amko20164564.
16. Sharma G, Dua P, Agarwal SM. A comprehensive review of dysregulated miRNAs involved in cervical cancer. *Curr Genomics* 2014; 15(4): 310–323. doi: 10.2174/1389202915666140528003249.
17. Ondryášová H, Koudeláková V, Hajdúch M. Karcinom cervixu – možnosti detekce lidského papilomaviru. *Čes Gynek* 2013; 78(3): 289–294.
18. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(11): 765–774. doi: 10.1093/jnci/djj209.
19. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(11): 1171–1177. doi: 10.1515/CCLM.2005.203
20. The American cancer society medical and editorial content team. HPV and HPV Testing. [online]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/infectious-agents/hpv/hpv-and-hpv-testing.html>.
21. Xu Y, Liu Y, Wu Y et al. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection. *Anal Chem* 2014; 86(12): 5611–5614. doi: 10.1021/ac5010458.
22. Kumvongpin R, Jearanaikoon P, Wilailuckana C et al. Detection assay for HPV16 and HPV18 by loop-mediated isothermal amplification with lateral flow dipstick tests. *Mol Med Rep* 2017; 15(5): 3203–3209. doi: 10.3892/mmr.2017.6370.
23. Bartošík M, Paleček E, Vojtěšek B. Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicině. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): 53–60. doi: 10.14735/amko20141553.
24. Paleček E, Bartošík M. Electrochemistry of nucleic acids. *Chem Rev* 2012; 112(6): 3427–3481. doi: 10.1021/cr200303p.
25. Huang H, Bai W, Dong C et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. *Biosens Bioelectron* 2015; 68: 442–446. doi: 10.1016/j.bios.2015.01.039.
26. Karimizefreh A, Mahyari FA, VaezJalali M et al. Impedimetric biosensor for the DNA of the human papilloma virus based on the use of gold nanosheets. *Microchim Acta* 2017; 184(14): 1729–1737. doi: 10.1007/s00604-017-2173-8.
27. Bartošík M, Ďuríková H, Vojtěšek B et al. Electrochemical chip-based genomagnetic assay for detection of high-risk human papillomavirus DNA. *Biosens Bioelectron* 2016; 83: 300–305. doi: 10.1016/j.bios.2016.04.035.
28. Lin J, Ma B, Fang J et al. Colorimetric detection of 23 human papillomavirus genotypes by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Lab* 2017; 63(3): 495–505. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.160906.
29. Persano S, Valentini P, Kim JH et al. Colorimetric detection of human papilloma virus by double isothermal amplification. *Chem Commun* 2013; 49(90): 10605–10607. doi: 10.1039/c3cc45459b.
30. Saetiew C, Limpaboon T, Jearanaikoon P et al. Rapid detection of the most common high-risk human papillomaviruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 2011; 178(1–2): 22–30. doi: 10.1016/j.jviro.2011.08.007.