

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Šiklův patologicko anatomický ústav



Molekulárně biologická detekce virových a bakteriálních patogenů a jejich vztah k nádorovým a pseudonádorovým jednotkám

Jana Kašpírková

Doktorská dizertační práce

Plzeň 2012

Obor: patologie

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Hes, PhD.

## **Předmluva**

Doktorandská dizertační práce je shrnutí publikační činnosti autorky v oblasti molekulárně biologické detekce virových a bakteriálních patogenů a jejich vztahu k nádorovým a pseudonádorovým jednotkám, se zaměřením na detekci lidských papilomavirů v raritních lézích. Práce je členěna do tří částí.

První část obsahuje souhrn 5 prací, které se zabývaly detekcí lidských papilomavirů ve vzácných neoplastických jednotkách, jež byly: ekrinní syringofibroadenom asociovaný s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem, spiroadenocylindromu podobný bazaloidní karcinom anu a rekta, hidradenoma papilliferum s komponentou duktálního karcinomu *in situ*, léze anogenitálních mléčnou žlázu napodobujících žlázách a nově popsaná jednotka kribriformní adenokarcinom drobných slinných žláz. Souhrn je doplněn uvedením do problematiky detekce lidských papilomavirů ve vzácných lézích a zakončen diskuzí shrnující výsledky a zabývající se problematikou interpretace a biologické relevance nálezu. V druhé části je přehled ostatní publikační činnosti autorky. Třetí část tvoří plné texty 5 prací, jež jsou podkladem k vlastní dizertační práci.

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, Prof. Ondřeji Hesovi, PhD., za odborné vedení a cenné připomínky při vypracování této práce a celkovou podporu. Velký dík patří též mým spolupracovníkům ze Šiklova patologicko anatomického ústavu za možnost podílet se na výzkumu a řešení zajímavých vědeckých projektů. Bez jejich znalostí a zkušeností by tato práce nemohla vzniknout.

## **Prohlášení autorky:**

Autorka dizertační práce „Molekulárně biologická detekce virových a bakteriálních patogenů a jejich vztah k nádorovým a pseudonádorovým jednotkám“ souhlasí s jejím půjčováním dle zavedených pravidel.

V Plzni dne 1. 3. 2012

Jana Kašpírková

## Obsah

<b>1. Úvod</b>	...4
1.1 Infekční agens v etiologii maligních onemocnění člověka	...4
1.2 Lidské transformující viry	...5
1.3 Lidské papilomaviry	...6
<b>2. Cíle práce</b>	...9
<b>3. Komentáře</b>	...10
3.1 Ekrinní syringofibroadenom asociovaný s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem	...10
3.2 Spiroadenocylindromu podobný bazaloidní karcinom anu a rekta: kazuistika zahrnující HPV průkaz a mutační analýzu genu CYLD	...11
3.3 Hidradenoma papilliferum s komponentou duktálního karcinomu in situ: kazuistika a přehled literatury	...13
3.4 Lidské papilomaviry v lézích anogenitálních mléčnou žlázu napodobujících žlázách	...14
3.5 Kribriformní adenokarcinom drobných slinných žláz postihující zejména jazyk: charakteristika nové jednotky	...15
<b>4. Diskuze</b>	...17
4.1 Prevalence HPV v karcinomech	...17
4.2 Alfa HPV	...17
4.3 Beta HPV	...20
4.4 Detekce HPV ve vzácných lézích	...21
<b>5. Literatura</b>	...25
<b>6. Souhrn dalších publikací autorky</b>	...33

# 1. Úvod

## 1.1 Infekční agens v etiologii maligních onemocnění člověka

Karcinogeneze je multifaktoriální a několikastupňový proces, na kterém se podílejí vlivy vnějšího prostředí a genetická predispozice jedince (95). Tento předpoklad je plně zachován i u konceptu působení infekčního agens při vzniku určitých malignit (119). Infekční agens jsou etiologickým faktorem u přibližně 20% lidských neoplázií (77). Souvislost mezi bakteriálním agens a vznikem či progresí rakoviny byla navržena už na začátku 19. století (87). Teorie virové etiologie rakoviny pak byla podpořena objevem na objev viru způsobujícího sarkom u kuřat (88).

Dle současných poznatků existují tři mechanismy, kterými infekční agens mohou iniciovat a podporovat onkogenní proces u člověka (18). Prvním mechanismem je indukce chronického zánětlivého procesu, jež je výsledkem dlouhodobé imunitní odpovědi na persistentní infekci (114). Tomuto konceptu odpovídá zejména onkogenní působení virů hepatitidy B a C při indukci hepatocelulárního karcinomu, persistence gram negativní bakterie *Helicobacter pylori* u rakoviny žaludku nebo dlouhodobé působení *Schistosoma haematobium* při vzniku karcinomu močového měchýře (87). Druhým mechanismem působení infekčních agens při vzniku lidských neoplázií je virem indukovaná transformace (88). Dalším mechanismem je chronická suprese imunitního systému infekčním agens, jako je imunodeficience způsobená HIV infekcí (51).

Při hledání příčinné souvislosti mezi patogenem a onemocněním se vychází z upravené verze Kochových postulátů, která zohledňuje molekulárně biologické techniky (30). Genom podezřelého patogenu je přítomen ve většině s nemocí asociovaných lézí

1. Pouze nemocná tkáň by měla obsahovat genom podezřelého patogenu.
2. Vyléčení nemoci je doprovázeno snížením počtu kopií genomu patogenu.
3. Mikrobiální genom je možné detekovat před propuknutím onemocnění a měl by korelovat se závažností onemocnění
4. Povaha mikroorganismu asociovaného detekcí jeho nukleových kyselin by měla být ve shodě se známou biologickou charakteristikou skupiny těchto mikroorganismů
5. Genom mikroba je detekovatelný v topografické souvislosti tkáně
6. Molekulární průkaz je reprodučibilní

## 1.2 Lidské transformující viry

Narozdíl od akutně transformujících virů, které se vyskytují u zvířat, lidské nádorové viry způsobují malignitu s poměrně dlouhou dobou latence a za spoluúčasti dalších vnějších i vnitřních vlivů (67). V současné době je podle International Agency for Research on Cancer (IARC) klasifikováno 7 lidských virů jako karcinogenní pro člověka a to virus Epstein-Baarové (EBV, HHV4), určité typy lidských papilomavirů (HPV), virus hepatitidy B (HBV), virus hepatitidy C (HCV), lidský T-lymfotropní virus 1 (HTLV-1), lidský herpesvirus 8 (HHV-8, KSHV) a virus lidské imunodeficiency (HIV). Merkel cell polyomavirus (MCPyV) bude nejspíše do této skupiny v dohledné době přidán (91). Další skupiny virů jsou v podezření a to zejména polyomaviry (lidské i zvířecí) a adenoviry. Velká pozornost je také směřována k endogenním retrovirům, zejména role evolučně poměrně mladého endogenního retroviru HERV v etiologii rakoviny prsu (110).

Základní vlastnost onkogenního viru je schopnost navodit necytolytickou interakci s buňkou. Dále musí zajistit přenos svých genů zodpovědných za onkogenezi na dceřiné buňky během buněčného dělení a to buď integrací do buněčného genomu nebo pomocí epizomální replikace (118, 121). Infekce je pouze jedním z faktorů nutných pro vznik neoplázie a většina infekcí onkogenními viry nemá za následek tvorbu malignity, specifický genetický základ hostitele je důležitým faktorem (51). Vznik nádoru vyžaduje také určitým způsobem deficientní imunitní systém, což může být navozeno např. stresem, věkem, chemickými a fyzikálními karcinogeny, jinou infekcí nebo specifickým genotypem hostitele (88). Akumulace genetických a epigenetických změn vede ke vzniku nádorového fenotypu buňky. Z evolučního hlediska onkogenní transformace buňky nepřináší viru žádné výhody (23).

V tabulce 1 jsou shrnuty nejčastější lidské malignity, u kterých je virus prokázaným etiologickým agens.

Tabulka 1: Lidské transformující viry a nejčastější malignity, se kterými jsou asociovány

<b>Virus</b>	<b>Malignity</b>
Virus Epstein-Baarové	Burkitův lymfom Hodgkinův lymfom Karcinom nosohltanu Posttransplantační lymfoproliferativní nemoc
Lidský papilomavirus	Karcinomy anogenitální oblasti (děložní čípek, vulva, vagina, anus, penis) Karcinomy hlavy a krku
Lidský herpesvirus 8	Kaposhiho sarkom Lymfom serózních blan Primární efusní lymfom Multicentrická Castlemanova choroba
Virus hepatitidy B	Hepatocelulární karcinom
Virus hepatitidy C	Hepatocelulární karcinom
Lidský T-lymfotropní virus -1	T-buněčná leukemie/lymfom dospělých
Virus lidské imunodeficience	Lymfomy

### 1.3 Lidské papilomaviry

Papilomaviry jsou malé neobalené dvouvláknové DNA viry s dlaždicobuněčným tropismem. Jsou mutačně poměrně stálé a přísně druhově specifické (54). Doposud bylo objeveno více jak 120 typů lidských papilomavirů, ale jako obecně prokázané karcinogeny jsou v současné době klasifikovány pouze vysocerizikové (HR- z ang. high risk) typy ze skupiny alfa (109), jež způsobují především slizniční léze. Onkogenní potenciál HPV byl stanoven na základě epidemiologických dat získaných studiem cervikálního karcinomu. V maligních neopláziích je nejčastěji nalézán HR-HPV typ 16, dále pak 18 a 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (109). Maligní potenciál dalších HPV je intenzivně studován, neboť většina z nich byla popsána právě z kožních nebo slizničních lézí (21). Některé typy primárně kožních HPV jsou zřejmě saprofytické a vyskytují se běžně na pokožce zdravých lidí (107). Další, zejm. ze skupiny beta, jsou ale dávány do souvislosti s malignitami, zejména kožními (1). Aktivní úloha HPV typů 5, 8, 9, 14, 23, 24, 25 a 38 v patogenezi karcinomu kůže byla prokázána u

onemocnění epidermodysplasia verruciformis, mechanismus maligní transformace těchto virů se ale liší od HR-HPV indukované onkogeneze (38, 13).

Za karcinogenní proces vyvolaný persistentní HR-HPV infekcí jsou zodpovědné 2 onkoproteiny kódované virovými geny E6 a E7. Jimi kódované proteiny interagují s celou škálou buněčných proteinů s primárním cílem produkce viru. Mimo jiné inaktivují p53 a pRB, čímž jednak podporují postup buněčného cyklu a syntézu DNA, a dále také blokují apoptózu (120, 45). K maligní transformaci buněk dále přispívá virovými proteiny navozená reaktivace katalytické podjednotky telomerázy hTert (101), zabránění nasedání transkripčních faktorů (11) a indukce poruchy rozchodu chromozomů při mitóze (26).

Persistentní infekce HR-HPV je příčinou vzniku maligních neoplázií známou zejména v oblasti anogenitálního traktu. HR-HPV etiologie byla prokázána u 99,7% dlaždicobuněčných karcinomů děložního hrdla, 81,8 % adenokarcinomů děložního hrdla, 40 % karcinomů vulvy, 64-91% karcinomů pochvy, 88 až 93,8 % análních karcinomů a 40 až 81,8 % karcinomů penisu (71, 109, 54). HR-HPV jsou také asociovány s neoplaziemi v oblasti hlavy a krku a to u zhruba 25 -35% (94).

Při hledání příčinné souvislosti mezi lézí a HPV infekcí je třeba začít širokospektrální detekcí HPV DNA (119) Při volbě detekčního algoritmu je důležité brát v úvahu biologickou podstatu transformující HPV infekce (92) a materiál dostupný pro analýzu (112).

Nejrozšířenější průkaz HPV DNA pomocí molekulárně genetických metod vychází z polymerázové řetězové reakce (PCR) (83, 69). Vysoká sensitivita PCR je výhodou i nevýhodou tohoto systému. Existuje mnoho různých komerčních a také „in-house“ PCR systémů, které amplifikují DNA sekvenci různých částí genomu HPV viru. Zda PCR systém detekuje pouze určitý typ HPV nebo širší typové spektrum, je dáno podmínkami PCR a použitím specifických, degenerovaných nebo konsensus primerů (73). Vizualizace amplifikované DNA je možná více způsoby, které mohou dále upřesnit nálezy. Většina PCR systémů detekující široké spektrum HPV je sekvenčně zacílena do evolučně vysoce konzervované oblasti genu L1 nebo E1 (29, 34, 50, 56, 102). Použití pouze jediného detekčního PCR systému může vést k falešně negativním výsledkům, což vychází zejména ze sekvenční variability vzdálenějších fylogenetických skupin HPV a z biologické podstaty HPV infekce, neboť nejčastější cíle amplifikace při širokospektrální detekci, geny L1 a E1, nemusí být nutně zachovány ve všech nádorech (68). DNA onkogenů E6 a E7 sice zůstává v nádoru i během progresu, sekvenčně se však velmi liší mezi různými HR-HPV typy a proto PCR cílené

do těchto oblastí nedetekují široké spektrum HPV typů, ale jednotlivé specifické typy (37, 52).

Na řezu lze HPV prokázat metodou hybridizace *in situ* (ISH). Nejčastěji se používají komerční systémy obsahující směs sond proti více typům HPV, ale lze použít i typově specifický přístup (81). V čitelně obarveném řezu lze navíc podle druhu signálu rozlišit, zda je HPV integrované do genomu buňky nebo se vyskytuje pouze v epizomální formě (94).

Průkaz HPV viru se neomezuje pouze na genetické metody, ale lze využít i imunohistochemické metody (IHC) přímého či nepřímého průkazu viru. Rutině se využívá imunohistochemické barvení proteinu p16. Signální dráha p16-Rb je obecně častým cílem virových onkoproteinů při imortalizaci buňky a většina těchto virových interakcí má za následek p16 overexpresi díky přímé nebo nepřímé inaktivaci pRB a následném pokusu buňky zastavit buněčnou proliferaci (84). Přestože transformující HPV infekce není jedinou příčinou overexprese proteinu p16, v některých typech nádorů, zejména u rakoviny děložního hrdla a v perianálních lézích, ale i u nádorů hlavy a krku, je imunohistochemické barvení proteinu p16 používáno jako sekundární marker HR-HPV infekce (70). Citlivost detekce HR-HPV ve tkáni pomocí p16 IHC se uvádí až 100% (49), nicméně specifita IHC průkazu overexprese p16 pro identifikaci HPV infekce je nižší, neboť se vyskytuje u více nádorových jednotek, které jsou evidentně bez vztahu s HPV infekcí (108).

Konzultační patologické pracoviště se setkává s neobvyklými benigními a maligními neoplazmiemi, jejichž etiologie by mohla naznačovat možnou asociaci s HPV infekcí. Pokud u vzácných nebo nově popsaných karcinomů lokalizace, histologický obraz nebo nepřímé markery připomínají HPV asociované léze, detekce HPV DNA je prvním krokem v procesu, které by mohl vést k definitivnímu objasnění souvislosti mezi HPV a lézí. Kromě rozřešení etiologické příčiny, HPV statut nádoru může také znamenat informaci o prognóze a predikci odpovědi na léčbu pro pacienty, jako je tomu např. u karcinomů tonsily (3). Velkou pozornost je třeba věnovat interpretaci nálezu HPV DNA. Komplikací při interpretaci je zejména možnost snadné kontaminace materiálu v prelaboratorním procesu i při izolaci DNA, možný komenzální charakter infekce nebo netransformační latentní persistence viru či multiinfekce (92).



## 2. Cíle práce

- Navrhnout systém detekce lidských papilomavirů (HPV) pro vzácné neoplastické jednotky, u kterých je podezření na HPV asociovanou etiopatogenezi
- Provést HPV detekci u vzácných neoplastických jednotek: ekrinní syringofibroadenom asociovaný s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem, spiroadenocylindromu podobný bazaloidní karcinom anu a rekta, hidradenoma papilliferum s komponentou duktálního karcinomu *in situ*, léze anogenitálních mléčnou žlázu napodobujících žlázách a kribriformní adenokarcinom drobných slinných žláz
- Interpretovat výsledek detekce a biologickou relevanci nálezu pro jednotlivé léze

### **3. Komentáře**

#### **3.1**

#### **Ekrinní syringofibroadenom asociovaný s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem**

Kacerovska D, Nemcova J, Michal M, Kazakov DV. Eccrine syringofibroadenoma associated with well-differentiated squamous cell carcinoma. Am J Dermatopathol. 2008 Dec;30(6):572-4.

V práci je popsán vzácný nález ekrinního syringofibroadenomu (ESFA) asociovaného s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem. Pacientem byl 85-letý muž, kterému byl odstraněn 2,5 x 2,5 cm velký, hnědě zbarvený ulcerující nodul se zarudlým krvácejícím povrchem umístěný v metakarpophalangeálním kloubu ukazováku levé ruky. Histopatologicky byly nalezeny oblasti dobře diferencovaného dlaždicobuněčného karcinomu, které se střídaly s oblastmi anastomozujícími pruhy, snopci a sloupce epiteliálních buněk rozšiřujících se z exulcerované epidermis do ztlustělé, edematózní myxoidní na cévy bohaté dermis, typickými pro ESFA.

Imunohistochemicky byla prokázána exprese proteinu p16 v nádoru, zatímco benigní části s ESFA p16 expresi nevykazovaly. Expresí proteinu p16 v nádoru je velmi často vyvolána HPV infekcí, proto byla ve vzorku provedena širokospektrální detekce HPV.

Z nádoru fixovaného formalínem a zalitého do parafínu byla izolovaná celková DNA při speciálních bezpečnostních opatřeních snižujících riziko kontaminace jinými vzorky na minimum. 4 řezy o velikosti 5 µm byly deparafinizovány xylenem a etanolem. Izolace byla provedena manuálně za použití komerčního kitu podle firemního protokolu. Kvalita izolované DNA a absence PCR inhibitorů byla ověřena amplifikací kontrolních genů pomocí multiplex PCR produkující fragmenty o velikosti 100, 200, 300, 400 a 600 bp, podle integrity DNA ve vzorku. Byla provedena širokospektrální HPV detekce za použití několika systémů PCR. Pro amplifikaci byly použity širokospektrální primery cílené do oblastí HPV genomu L1 a E1. Ve vzorku byl detekován (pomocí primerů CP-SGB) beta papilomavirus HPV typ 107, recentně popsán Vasiljevic et al (2008). Otázka etiologického významu nebo biologické relevance nálezů není prozatím rozřešena, neboť HPV typ 107 byl nalezen zatím vzácně a v malém počtu kopií viru.

## 3.2

### **Spiroadenocylindromu podobný bazaloidní karcinom anu a rekta: kazuistika zahrnující HPV průkaz a mutační analýzu genu CYLD**

Kacerovska D, Szepe P, Vanecek T, Nemcova J, Michal M, Mukensnabl P, Kazakov DV. Spiradenocylindroma-like basaloid carcinoma of the anus and rectum: case report, including HPV studies and analysis of the CYLD gene mutations. *Am J Dermatopathol.* 2008 Oct;30(5):472-6.

V práci je popsán případ bazaloidního karcinomu postihující anus a rektum u 57-leté pacientky. Mikroskopicky tumor vykazoval nezvyklé morfologické znaky silně připomínající spiroadenomacylindrom, neboť se většinou skládal z nodulů bazaloidních buněk pilovitě uspořádaných, obsahujících nebo obklopených eosinofilním materiálem bazálních membrán a dále s přítomností intratumorálních lymfocytů. Přerůstající dlaždicový epitel vykazoval dysplastické změny kompatibilní s diagnózou dlaždicového karcinomu *in situ*, který se stupňoval do invazivního a obsahoval ostrůvky bazaloidních buněk. Dále se v dlaždicovém epitelu vyskytovaly koilocyty.

Z nádoru fixovaného formalínem a zalitého do parafínu byla izolovaná celková DNA při speciálních bezpečnostních opatřeních snižujících riziko kontaminace jinými vzorky na minimum. 4 řezy o síle 5 $\mu$ m byly deparafinizovány xylenem a etanolem. Izolace byla provedena manuálně za použití komerčního kitu podle firemního protokolu. Kvalita izolované DNA a absence PCR inhibitorů byla ověřena amplifikací kontrolních genů pomocí multiplex PCR produkující fragmenty o velikosti 100, 200, 300, 400 a 600 bp, podle integrity DNA ve vzorku.

Genetická analýza zahrnovala detekci HPV zaměřenou na vysocerizikové a nízké rizikové typy a DNA mutační analýzu genu CYLD. Detekce HPV s onkogenním potenciálem ze skupiny alfa byla provedena pomocí několika širokospektrálních PCR cílených do oblasti HPV genomu E1 a L1. Pozitivní nález byl potvrzen sekvenací PCR produktu a jeho porovnáním s databází BLAST. Mutační analýza genu CYLD zahrnovala PCR amplifikaci a sekvenování kódující oblasti genu CYLD, včetně exon-intronových spojů.

Pomocí HPV detekce byl identifikován HPV typ 16, což je nejčastější HPV zodpovědný za malignity v anogenitální oblasti. V nádoru nebyly pomocí sekvenace kódující oblasti objeveny žádné alterace genu CYLD.

### 3.3

#### **Hidradenoma papilliferum s komponentou duktálního karcinomu *in situ*: kazuistika a přehled literatury**

Vazmitel M, Spagnolo DV, Nemcova J, Michal M, Kazakov DV. Hidradenoma papilliferum with a ductal carcinoma in situ component: case report and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 2008 Aug;30(4):392-4.

Hidradenoma papilliferum (HP) je benigní kožní adnexální neoplázie, která se vyskytuje zejména v anogenitální oblasti dospělých žen a má znaky analogické intraduktálnímu papilomu prsu. Maligní změny v HP jsou extrémně vzácné. V literatuře byl doposud popsán jediný případ duktálního karcinomu *in situ*, který vzniknul v HP.

V této studii byl popsán další případ HP, který kromě typické morfologie HP prezentoval okrsek s duktálním karcinomem *in situ*, který se jevil jako zvětšené pleomorfní epitelové buňky blastického vzhledu s atypickými mitózami a obklopené myoepiteliálními buňkami.

Z nádoru fixovaného formalínem a zalitého do parafínu byla izolovaná celková DNA při speciálních bezpečnostních opatřeních snižujících riziko kontaminace jinými vzorky na minimum. 4 řezy o velikosti 5 µm byly deparafinizovány xylenem a etanolem. Izolace byla provedena manuálně za použití komerčního kitu podle firemního protokolu. Kvalita izolované DNA a absence PCR inhibitorů byla ověřena amplifikací kontrolních genů pomocí multiplex PCR produkující fragmenty o velikosti 100, 200, 300, 400 a 600 bp, podle integrity DNA ve vzorku.

Byla provedena širokospektrální HPV detekce za použití několika systémů PCR, detekující kožní i slizniční typy. Pro amplifikaci byly použity primery cílené do oblastí HPV genomu L1 a E1. Genotypizace pozitivního nálezu byla provedena sekvenací produktu a srovnáním s databází BLAST.

Ve vzorku byl detekován vysocerizikový typ HPV 16. Lokalizace neoplázie by mohla svědčit pro možnou HPV etiologii. Nelze však vyloučit kontaminaci z okolní tkáně při odběru bioptického materiálu.

## 3.4

### **Lidské papilomaviry v lézích anogenitálních mléčnou žlázu napodobujících žlázách**

Kazakov DV, Nemcova J, Mikyskova I, Belousova IE, Vazmitel M, Michal M. Human papillomavirus in lesions of anogenital mammary-like glands. *Int J Gynecol Pathol.* 2007 Oct;26(4):475-80.

Anogenitální mléčnou žlázu napodobující žlázy (MLG ,z ang. mamary-like glands) byly dlouhou dobu považovány za ektopickou prsní tkáň. V současné době jsou hodnoceny jako typické struktury lokalizované v anogenitálním traktu. V práci byla provedená genetická detekce HPV v 16 neopláziích vznikajících na podkladě anogenitálních MLG. Jednalo se o 3 fibroadenomy, 2 ložiska adenózy, 1 invazivní duktální karcinom, 1 tubulo-lobulární karcinom, 2 hidradenoma papilliferum s výraznými cystickými změnami připomínající cystadenom a oxifilní metaplázii a 7 případů extramamární Pagetovy choroby.

Z nádoru fixovaného formalínem a zalitého do parafínu byla izolovaná celková DNA při speciálních bezpečnostních opatřeních snižujících riziko kontaminace jinými vzorky na minimum. 4 řezy o velikosti 5 µm byly deparafinizovány xylenem a etanolem. Izolace byla provedena manuálně za použití komerčního kitu podle firemního protokolu. Kvalita izolované DNA byla ověřena amplifikací kontrolních genů pomocí multiplex PCR produkující fragmenty o velikosti 100, 200, 300, 400 a 600 bp, podle integrity DNA ve vzorku.

Byla provedena širokospektrální HPV detekce za použití několika systémů PCR. Pro amplifikaci byly použity primery cílené do oblastí HPV genomu L1 a E1. Pozitivní nálezy byly ověřeny sekvenací a srovnáním s databází BLAST nebo reverzní hybridizací se systémem LiPA.

V invazivním duktálním karcinomu byl detekován vysocerizikový HPV typ 31. V jednom případě extramamární Pagetovy choroby byl nalezen nízkorizikový HPV typ 6. Dále byl ve stejné jednotce ale jiném případě detekován dosud nepopsaný typ HPV, který byl sekvenčně nejbližší podobný HPV typu 21 a 24 ze skupiny beta papilomavirů. Nález HPV v skupině MLG lézí je ojedinělý. Nelze se vyjádřit, zda se jedná spíše o náhodnou koincidenci a nebo zda invazivní duktální karcinom MLG je etiologicky vyčleněn ze skupiny MLG. Dle našich nálezů a podle literárních zdrojů HPV nehraje obecně kauzální roli v anogenitálních MLG lézích.

## 3.5

### **Kribriformní adenokarcinom drobných slinných žláz postihující zejména jazyk: charakteristika nové jednotky**

Skalova A, Sima R, Kaspirkova-Nemcova J, Simpson RH, Elmberger G, Leivo I, Di Palma S, Jirasek T, Gnepp DR, Weinreb I, Perez-Ordoñez B, Mukensnabl P, Rychly B, Hrabal P, Michal M. Cribriform adenocarcinoma of minor salivary gland origin principally affecting the tongue: characterization of new entity. *Am J Surg Pathol.* 2011 Aug;35(8):1168-76.

V práci bylo popsáno 22 případů typických, doposud málo popsaných adenokarcinomů nízkého stupně. Tyto adenokarcinomy byly nejčastěji nalezeny v lokalitě jazyka a některými histologickými znaky připomínaly papilární karcinom štítné žlázy. Nádory byly neopouzdržené a lobulárně uspořádané, typ růstu byl především kribriformní a solidní. Proto byly tyto neoplastické jednotky nazvány „kribriformními adenokarcinomy drobných slinných žláz“ (CAMSG, z ang. Cribriform adenocarcinoma of minor salivary gland origin) Všechny nádory se vyskytly na dospělých pacientech s průměrným věkem stanovení diagnóza 55,8 roků.

Molekulárně genetická studie CAMSG zahrnovala detekci aktivačních mutací genů KRAS, BRAF, c-kit, PDGRFa a detekci slizničních typů HPV. Pro tyto účely byla komerční soupravou po deparafinizaci xylenem a etanolem izolována celková DNA z 18 vzorků CAMSG, 5 vzorků polymorfních low-grade adenokarcinomů slinných žláz (PLGA) a 5 adenoidně cystických karcinomů. Kvalita izolované DNA a absence PCR inhibitorů byla ověřena amplifikací kontrolních lidských genů, generující produkty 100, 200, 300, 400 a 600 bp. Detekční systém pro HPV se skládal z několika PCR reakcí, které byly navrženy tak, aby pokrývaly spektrum vysocerizikových a nízkorizikových HPV, jež hrají úlohu v patogenezi částí neoplázií z oblasti hlavy a krku. Širokospektrální detekce HPV byla zaměřena do oblastí L1 HPV genu a do oblasti E1 HPV genu. Konkrétně byly použity PCR s primery GP5+/6+ a CPSGB, jejichž produkty byly ověřovány a genotypizovány sekvenační reakcí a srovnáním s databází BLAST. Dále byl použit komerční systém INNO-LiPA Genotyping kit Extra s detekčním a genotypizačním systémem na principu reverzní hybridizace biotinem značeným krátkých PCR produktů (primery SPF). Riziko falešně negativní detekce HPV díky delecii genů L1 a E v nádoru bylo sníženo na minimum doplněním typově specifické PCR zacílené do oblasti HPV onkogenů E6 a E7 u 5 nejčastějších HPV typů, vyskytujících se v malignitách lokalizace hlavy a krku a to 16, 18, 31, 33, 35.

HPV DNA byla detekována pouze v 1 ze vzorků a to směs HPV typů 33 a 18. Vzhledem k ojedinělému nálezu se nepředpokládá kauzální role HPV v patogenezi CAMSG .



## 4. Diskuze

### 4.1 Prevalence HPV v karcinomech

Oblast výzkumu etiologické úlohy HPV v iniciaci malignit se ubírá více méně dvěma obsáhlými směry a to podle příslušnosti HPV do skupiny alfa nebo beta, neboť mechanismus onkogeneze těchto dvou skupin je zásadně odlišný.

### 4.2 Alfa HPV

Detekce biologicky relevantní infekce vysocerizikovými HPV (HR-HPV, z ang. high risk) ze skupiny alfa v neopláziích je v současné době tématem diskuzí ve vědeckých kuloárech, neboť nález HR-HPV DNA byl dokumentován téměř ve všech studovaných lokalizacích s diskutabilním etiologickým dopadem (92).

Vycházíme-li z Kochových postulátů adaptovaných na použití molekulárně biologických technologií při hledání příčinné souvislosti mezi infekcí patogenem a určitým onemocněním (viz kapitola 1.1), nejcitlivější metoda průkazu podezřelého patogenu je v procesu určení kauzality na prvním místě. Touto nejcitlivější metodou je nejčastěji detekce specifického úseku DNA z genomu patogenu. Většina z běžně používaných polymerázových řetězových reakcí (PCR) je schopná detekovat i pouhých několik jednotek kopií HPV v reakci (56, 78). Citlivost *in situ* hybridizačních technik je v tomto případě nedostatečná, uvádí se pouhých 70 % ve srovnání s PCR HPV detekcí. (81, 74, 35). Kombinací dvou i více PCR reakcí lze detekovat široké spektrum onkogenních papilomavirů a zároveň snížit riziko falešné negativity způsobené ztrátou některých genů v primárním nebo sekundárním nádoru (52, 68). Při výběru konkrétních PCR je třeba dále zohlednit kvalitu DNA v materiálu, neboť formalínová fixace má za následek fragmentaci DNA a proto amplikony jednotlivých PCR reakcí pro FFPE archivní materiál by neměly obecně přesahovat 300 bp (73). Často publikovaná je PCR detekce HR-HPV s využitím GP5+/6+ (34) nebo SPF (56) primerů vzhledem k nízkým nárokům na kvalitu DNA (2). Tento přístup ale generuje určité množství falešně pozitivních výsledků, protože metoda je extrémně citlivá a detekovaný virus může představovat transientní infekci nebo dokonce kontaminaci při zpracování bloku. Proto je důležité dodržovat správné laboratorní postupy .

Interpretace nálezu HPV DNA je zvláště v raritních lézích nesnadná, neboť s rostoucím počtem studií se ukazuje, že samotná přítomnost HPV DNA neznamena vždy účast viru v karcinogenním procesu, ale může odrážet pouze transientní infekci, která neneso riziko

neoplastické transformace (93), nebo představuje využití pro virus vhodné niky v preexistující patologii se změněným imunitním dohledem a s bohatou produkcí cytokinů a růstových faktorů (30). Proto v posledních několika letech stoupá na významu použití dalších markerů, které by podpořily aktivní onkogenní roli viru v nádoru (92).

V tomto ohledu se již literatura rozchází v tom, co je nejspecifičtější marker onkogenního působení HR-HPV v tkáni obecně, ale i pro konkrétní typ nádoru. Používají se metody genetické i imunohistochemické a hodnotí se virové faktory i faktory vztažené k hostiteli.

Z genetických metod je tomto kroku možné použít *in situ* hybridizaci (ISH) pro topografickou detekci HR-HPV DNA. Výhoda detekce HPV v topografické souvislosti tkáně pomocí ISH je však zastřena poměrně častým nespecifickým barvením a vysokým pozadím na řezu (74).

Real-time PCR systémy pracují na stejném principu amplifikace cílového genu jako klasická PCR, ale postupný nárůst namnoženého úseku HR-HPV DNA je možné monitorovat během procesu. Tento systém umožňuje kvantifikovat typově specifickou virovou nálož, což podle některých studií může predikovat závažnost nálezu, zejména u HPV typu 16 (42). Např. podle studie Weinberga a kol. je možné zahrnout virovou nálož do klasifikačních kritérií pro HNSCC, s tím že vyšší virová nálož představuje příznivý predikční faktor pro pacienta (111). Obecně je význam real-time PCR kvantifikace viru zatím nejasný. Touto technikou je možné také ohodnotit míru integrace HR-HPV do buněčného genomu. Integrace je dalším rizikovým faktorem, neboť vede k deregulaci exprese virových onkogenů (120). Informační hodnota tohoto testu má svá omezení, integrace viru není totiž nutným předpokladem onkogeneze (22). Hodnocení virového metylomu se zdá být slibnou metodou, podle které stupeň metylace virového genomu odráží závažnost léze, od nemetylovaných po vysoce metylované genomy s progresí nemoci (28).

Detekce exprese virových onkogenů pomocí reverzní transkripce (RT) a následné PCR by podle posledních prací měla poskytovat klinicky vysoce relevantní důkaz transformační aktivity HR-HPV v lézi. Úskalím metody je ale kvalita RNA v FFPE materiálu. Navíc je reakce typově specifická a poměrně náročná na provedení (92). Velmi slibně se jeví v tomto ohledu nová metodika RNAscope, což je *in situ* hybridizační technika s chromogenní vizualizací, jež detekuje v topografické souvislosti mRNA 7 nejčastějších HR-HPV. Bohužel je zatím publikováno velmi málo výsledků s použitím této metody (105).

Z imunohistochemických metod je nejvíce používané stanovení exprese p16 proteinu, které je dostatečně senzitivní ale ne vždy specifické pro detekci HR-HPV. Recentní práce při detekci transformující HPV infekce u malignit hlavy a krku upřednostňují přístup, který začíná imunohistochemickým barvením p16 a pokračuje genetickou detekcí HR-HPV, nejčastěji pomocí PCR. Výsledkem je rozdělení nádorů do 4 kategorií, p16 – /HPV – (1.kategorie), p16 – /HPV + (2.kategorie), p16 + /HPV + (3.kategorie) a p16 + /HPV – (4.kategorie), přičemž pouze u 3.kategorie se předpokládá, že skutečně odpovídá HPV indukovanému nádoru (111). Smeets a kol. se domnívá, že tento přístup by mohl být zlatým standardem pro určení HPV etiologie i u jiných entit, než u karcinomů hlavy a krku (92).

Při hodnocení p16 imunohistochemického barvení je nutné posoudit distribuci exprese, přičemž s aktivní replikací HR-HPV je spojována difúzní exprese p16, nikoliv ložisková.

V literatuře se popisuje více příčin nadměrné exprese p16 v nádoru bez vztahu k virové infekci, které vycházejí zejména z antiproliferativní funkce p16 a to např. u karcinomů orgánů trávicího traktu (6), karcinomů močového měchýře (72), karcinomů endometria (61) a měkkotkáňových nádorů (86). Pozitivní zpětná vazba při deregulaci Rb dráhy je zřejmě častou příčinou nadměrné exprese p16. Vysoká exprese p16 byla např. popsána u karcinomů prsu, kde byla zároveň detekována ztráta Rb a podobný závěr měla i práce Bastide a kol. u nádorů plic (41, 8). Termín „onkogenně indukovaná senescence“ se používá pro popis jevu, který se vyskytuje např. v nevocelulárním névu nebo benigním schwannomu. V těchto benigních lézích je často detekována mutace v Ras signální dráze a zároveň overexprese p16. Maligní protějšky těchto tumorů, tedy melanom a maligním schwannom jsou však bez exprese p16 a naopak ztráta p16 je podstatným krokem při vzniku těchto nádorů. Předpokládá se tedy, že overexprese p16 v těchto benigních nádorech je důsledkem kontroly proliferace v odpovědi na onkogenní stimuly a chrání tak buňku před maligním zvratem (43).

Přímý průkaz L1 proteinu HR-HPV je možné použít pro určení stupně léze, neboť se závažností léze exprese obalového proteinu L1 ubývá (31). Další imunohistochemické markery mohou pomoci při interpretaci nálezu HPV DNA a to zejména Ki-67 (14, 52), Bcl-2 (62) a p53 (33).

Tabulka 2 shrnuje nejčastěji reportované malignity, kde byla nalezena HR-HPV DNA a je zde podezření na HPV asociovanou etiologii onemocnění, zatím však většinou bez dostatku průkazných studií (92). Otázka přenosu HR-HPV do neexponovaných lokalizací je také

nedořešená, neboť HPV jen výjimečně vytvářejí virémii a proto šíření krví není jednoznačně přijato ve vědeckých kruzích (10, 46).

Tabulka 2: Malignity, u kterých byla publikovaná přítomnost HR-HPV DNA.

<b>Malignita</b>	<b>Autor</b>
Karcinom hrtanu	Manjarrez, 2006 (66); Torrente, 2005 (103)
Sinonasální karcinom	Hoffmann, 2006 (44); Katori 2005 (53); Syrjänen 2003(98)
Karcinom jícnu	Awerkiew, 2003 (5); Lu, 2008 (64)
Karcinomy přídatných orgánů oka	Scott, 2002 (89); Tulvatana, 2003 (104)
Karcinom plic	Yu, 2009 (117); Castillo, 2006 (16); Chen , 2004 (47); Fei, 2006 (27)
Karcinom vaječníku	Konidaris, 2007 (57); Wu,2003 (113); Yang,2005 (115)
Adenoskvamózní karcinom děložní sliznice	Gingelmaier, 2007 (32); O'Leary, 1998 (75)
Adenokarcinom tlustého střeva	Damin, 2007 (20); Cheng, 1995 (48), Buyru, 2003 (12)
Karcinom močového měchýře	Barghi, 2005 (7) ;Gutierrez, 2006 (36) ; Helal Tel, 2006 (40)
Karcinom prsu „basal-like“ fenotypu	Damin, 2004 (19); Subhawong, 2009 (97); Yasmeen, 2007 (116)

### 4.3 Beta HPV

Biologická validita infekce HPV ze skupiny beta je v tomto směru ještě diskutabilnější (29, 119), neboť většina těchto virů je nedostatečně popsána a je zapotřebí objasnění jejich molekulárních charakteristik a znalost epidemiologie, aby bylo možné lépe porozumět jejich roli v karcinogenezi.

Většina HPV typů ze skupiny beta vytváří benigní proliferace, které spontánně regredují do 5 let (60). Maligní transformace těchto lézí je spolehlivě prokázána jen u pacientů trpících vzácnou genetickou chorobou Epidermodysplasia verruciformis (EV) (65). Ve vztahu s EV jsou beta HPV typy 5 a 8 klasifikovány jako vysocerizikové (76). Nicméně beta HPV byly detekovány ve velké části nemelanomových kožních malignit a to zejména u

imunokomprimovaných pacientů, ale také u imunokompetentních pacientů (38). Proto případná role beta HPV v karcinogenezi představuje velmi diskutované téma a předmět výzkumu (60).

Přestože znalosti o beta HPV jsou ve srovnání s alfa HPV výrazně chudší, některé skutečnosti, o které se lze při interpretaci nálezu opírat, již popsány jsou. Zejména charakteristiky týkající se rozdílu v onkogenním mechanismu těchto virů Beta HPV se neintegrují do genomu, jejich genom se do klonů rakovinných buněk dědí epizomálně (76). Virový E6 protein beta HPV nezpůsobuje v buňce degradaci proteinu p53 (106), ale jeho působení vede k utlumení exprese buněčného tumorsupresoru Bak, jež hraje roli v apoptotické dráze indukované při poškození UV zářením. Transformační aktivita ve spojení s UV zářením byla také prokázána u E2 proteinu HPV typu 8 u transgenních myší (79).

Použití molekulárně biologických technik, jež zohledňují a vizualizují výše uvedené procesy, bude zřejmě v následujícím výzkumu etiologické role HPV v karcinogenezi užitečné, doposud však bylo publikováno pouze malé množství studií zabývajících se tímto tématem. (60, 96, 9).

#### **4.4 Detekce HPV ve vzácných lézích**

Rozsáhlé možnosti přímé a nepřímé detekce HPV vnáší poměrně širokou variabilitu do publikovaných prevalencí HPV v různých karcinomech. V reakci na to se v posledních době rozšiřují možnosti ověření transformačního potenciálu HPV infekce. Zejména v některých lokalizacích, jako u nádorů hlavy a krku, je intenzivně studován průkaz transformující HPV infekce (94). V této skupině neoplázií se preferuje širokospektrální PCR detekce vysocerizikových a nízkorizikových HPV kombinovaná s imunohistochemickým průkazem difúzní exprese proteinu p16 nebo detekcí mRNA transkriptu onkogenů HPV (90). Tento přístup se zdá být vhodný i pro jiné neoplázie, u kterých je podezření na účast HPV ze skupiny alfa v patogenezi onemocnění (92).

Kombinace genetického průkazu HPV a imunohistochemického průkazu exprese p16 proteinu byla provedena také ve většině námi publikovaných studií, v některých případech byly použity i jiné doplňkové biomarkery.

U případu ekrinního syringofibroadenomů nalezeného společně s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem byla zachycena exprese p16 proteinu. Následná širokospektrální HPV detekce zachytila v lézi přítomnost beta HPV typu 107. Tento typ HPV

byl sice popsán v kožních lézích, konkrétně v aktinické keratóze, ale jaký má transformační potenciál a zda jeho přítomnost v tkáni může za určitých podmínek vyvolat vznik nádoru spojený s blokováním p16-Rb kontrolního buněčného mechanismu, je zatím nejasné (107). HPV indukovaná overexprese proteinu p16 v kožních lézích souvisejících s beta HPV infekcí nebyla doposud hlouběji studována. Nicméně v několika dostupných pracích (58, 59) nebyl nalezen signifikantní vztah mezi přítomností HPV a overexpresí proteinu p16 v kožních lézích, proto ani my nepředpokládáme účast detekovaného HPV typu 107 v patogenezi ekrinního syringofibroadenomu asociovaného s dobře diferencovaným dlaždicobuněčným karcinomem. Overexprese proteinu p16 zde byla zřejmě výsledkem antiproliferativní funkce p16. Nelze také vyloučit přítomnost jiného, dosud nepopsaného HPV typu, který není možné zachytit použitými genetickými technikami. Role jiného onkoviru také nemůže být vyloučena.

V případě bazaloidního karcinomu postihujícího anus a rektum byl detekován HPV typ 16, což je nejčastější HPV typ spojený s malignitami v této anatomické lokaci (17). Dysplastický epitel vzorku vykazoval imunohistochemicky silnou a difuzní pozitivitu reakce s p16 proteinem. Histologicky byl dále genetický nález HPV typu 16 podpořen nálezem koilocytů v epitelu. Všechny tyto nálezy velmi silně svědčí pro HPV indukovanou patogenezi nádoru.

HPV typ 16 byl také detekován v případě hidradenoma papilliferum s komponentou duktálního karcinomu *in situ*. U tohoto nádoru však nebyla imunohistochemicky prokázána overexprese proteinu p16, což nepodporuje HPV asociovanou patogenezi nádoru. Nicméně ji nelze ani vyloučit a další metodiky, jako topografická lokalizace HPV pomocí *in situ* hybridizace nebo průkaz transkriptu HPV onkogenů E6 a E7, jež nebyly v době provádění studie v laboratoři dostupné, by mohly tuto otázku pomoci rozřešit. Nelze vyloučit netransformující HPV infekci jako anatomický místně specifický efekt, neboť HPV byl vzácněji detekován na zdravé kůži v anogenitální oblasti, zejména u pacientů s jinou HPV indukovanou lézí v anogenitálu, ale také u asymptomatických dětí (82, 99).

U souboru 16 lézí v anogenitálních, mléčnou žlázu napodobujících, žlázách jsme prokázali HPV pouze u dvou lézí extramamární Pagetovy choroby, a to nízkorizikový alfa HPV typ 6, který nejčastěji způsobuje anogenitální bradavice typu condyloma accuminatum, a dále beta HPV typ příbuzný typu 21 a 24. Předpokládá se, že onkogenní potenciál HPV typu 6 v této anatomické lokalizaci je velmi omezený. Zřejmě může být však příčinou malé části HPV indukovaných karcinomů penisu (4). Detekce HPV typu ze skupiny beta, který je fylogeneticky nejvíce příbuzný typům 21 a 24, také nepodporuje HPV asociovaný vznik léze,

neboť se jedná o typy vyskytující se pouze v kožních lézích (21). Tento nález může být spíše náhodný nebo způsobený kontaminací materiálu při zpracování. V epitelu lézí nebyly objeveny žádné cytopatické změny, které by připomínaly HPV infekci. V jednom případě extramamární Pagetovy choroby byla navíc prokázána komponenta *in situ* duktálního karcinomu a zde byl potvrzen vysocerizikový alfa HPV typ 31, což je jeden z nejčastějších vysocerizikových HPV, fylogeneticky nejbližší typu HPV 16. Nález HPV v skupině MLG lézí je ojedinělý. Dle našich nálezů a podle literárních zdrojů HPV nehraje obecně kauzální roli v anogenitálních MLG lézích.

Ve skupině 22 případů nově popsanych neoplastických jednotek z oblasti hlavy a krku, autory pojmenovanými jako kribriformními adenokarcinomy drobných slinných žláz (CAMSG, z ang. Cribriform adenocarcinoma of minor salivary gland origin), byla při pátrání po patogenezi onemocnění provedena rozsáhlejší genetická a imunohistochemická analýza. Součástí analýzy byla také detekce HPV typů se zaměřením na vysocerizikové a nízkorizikové typy, které jsou etiologickým agens u částí malignit hlavy a krku, zejména v oblasti orofaryngu, ústní dutiny a laryngu. PCR systém pro detekci HPV v CAMSG byl navržen tak, abychom se vyvarovali falešně negativních výsledků, a u každého vzorku byla provedena PCR amplifikace v oblasti L1, E1 a E6 genu. Pouze u jediného vzorku byla tímto systémem detekována HPV DNA, a to směs HPV vysocerizikových alfa typů 33 a 18. Imunohistochemický průkaz proteinu p16 ve většině případů nesvědčil pro HPV etiologii lézí, neboť vykazoval pouze nepravidelnou pozitivitu v barvení jádra i cytoplazmy. Silné difuzní barvení, jež se vyskytuje u HPV indukovaných lézí, bylo popsáno pouze u jednoho případu CAMSG, kde byla zároveň detekována přítomnost HPV DNA typů 33 a 18. Tento případ se zřejmě vymyká ze skupiny ostatních CAMSG, kde HPV etiologii vzhledem k laboratorním nálezům nepředpokládáme.

Metodické možnosti molekulárně biologické detekce HPV s onkogenním potenciálem se zejména v několika posledních letech velmi rozšířily a kromě zachycení většího spektra typů HPV a multitypové infekce se klade důraz na průkaz transformující infekce. V případě vysocerizikových alfa typů HPV existuje více vhodných doplňkových biomarkerů, které potvrdí transformační aktivitu HPV v lézi a některé, jako imunohistochemické barvení proteinu p16, průkaz HPV transkriptu nebo topografická detekce NA HPV, začínají být dostupné i pro použití v rutinním patologickém provozu.

Onkogenní působení dalších HPV typů, zejména ze skupiny beta, při vzniku kožních malignit je stále otázkou výzkumu. Aktivní etiopatogenická úloha beta HPV typů byla spolehlivě zatím prokázána jen u geneticky podmíněného onemocnění epidermodysplazia verruciformis (EV). Nicméně na příkladu EV a jiných geneticky podmíněných onemocnění, jako fokální epiteliální hyperplazie, WHIM syndromu nebo Falconiho anemie, se zřetelně rýsuje genetický základ hostitele jako nejdůležitější faktor ovlivňující vznik a progresy HPV indukované choroby. Výzkum se tedy začíná přiklánět ke komplexnímu pohledu na patogenezi onemocnění a objevují se první studie, které používají celogenomové sekvenování a stanovení celkového mikrobiomu a metagenomu léze (80). Nový přístup metodicky využívá sekvenátory druhé generace nebo hmotnostní spektrometry a extrémní důraz je kladen na bioinformatickou analýzu. Tento přístup je ale v počátcích a je třeba intenzivního výzkumu a evaluaci nových výstupů ověřenými molekulárně biologickými technikami a klinickou korelací.



## 5. Literatura

1. Akgül B, Cooke JC, Storey A: HPV-associated skin disease. *J Pathol.*, 2006, 208(2), 165-75.
2. Alos L, Moyano S, Nadal A. et al.: Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer.* 2009, 15;115(12):2701-9.
3. Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R. et al.: Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.*, 2010, s. 24–35.
4. Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. *Prev Med.*, 2011, 1,53 Suppl 1:S36-41.
5. Awerkiew S, Bollschweiler E, Metzger R et al.: Esophageal cancer in Germany is associated with Epstein-Barr-virus but not with papillomaviruses. *Med Microbiol Immunol.*, 2003, 192(3), 137-40
6. Ayhan S, Isisag A, Saruc M et al.: The role of pRB, p16 and cyclin D1 in colonic carcinogenesis. *Hepatogastroenterology.* 2010, 57(98),251-6
7. Barghi MR, Hajimohammadmehdiarbab A, Moghaddam SM et al.: Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma.*BMC Infect Dis.*, 2005, 8,5:102.
8. Bastide K, Guilly MN, Bernaudin JF et al.: Molecular analysis of the Ink4a/Rb1-Arf/Tp53 pathways in radon-induced rat lung tumors. *Lung Cancer.* 2009, 63, 348-53.
9. Bedard KM, Underbrink MP, Howie HL et al.: The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol.*, 2008, 82(8), 3894-902.
10. Bodaghi S, Wood LV, Roby G et al.: Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol.*, 2005,43(11),5428-34.
11. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA et al.: The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.*, 1999, 4, 18(9),2449-58.
12. Buyru N, Budak M, Yazici H et al.: p53 gene mutations are rare in human papillomavirus-associated colon cancer. *Oncol Rep.*, 2003,10(6),2089-92.
13. Caldeira S, Zehbe I, Accardi R et al.: The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol.*, 2003,77(3),2195-206.
14. Cameron RI, Maxwell P, Jenkins D et al.: Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. *Histopathology.* 2002,41(4),313-21.
15. Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.*, 2011,20(3),161-73.
16. Castillo A, Aguayo F, Koriyama C et al.: Human papillomavirus in lung carcinomas among three Latin American countries. *Oncol Rep.*, 2006,15(4),883-8.

17. Daling JR, Weiss NS, Hislop TG et al.: Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med.*, 1987, 15,317(16),973-7
18. Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol.*, 2009,8(7),67.
19. Damin AP, Karam R, Zettler CG et al.: Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.*, 2004,84(2),131-7.
20. Damin DC, Caetano MB, Rosito MA et al.: Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.*, 2007,33(5),569-74.
21. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR et al.: Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004, 20,324(1),17-27.
22. Darwich L, Cañadas M P, Sirera G et al.: Human papillomavirus genotype distribution and human papillomavirus 16 and human papillomavirus 18 genomic integration in invasive and in situ cervical carcinoma in human immunodeficiency virus-infected women. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21,1486-90.
23. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN, Introduction to modern virology, 6th edition, *Carcinogenesis and tumor viruses*, 2007,341-362.
24. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006,110(5),525-41.
25. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al.: Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.*, 2007,10,356(19),1944-56.
26. Duensing A, Spardy N, Chatterjee P et al.: Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environ Mol Mutagen.*, 2009, 50(8),741-7.
27. Fei Y, Yang J, Hsieh WC et al.: Different human papillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in Wuhan, China. *Jpn J Clin Oncol.*, 2006,36(5),274-9.
28. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res.*, 2009,19(3),438-51.
29. Forslund O, Antonsson A, Nordin P et al.: A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol.*, 1999,80,2437-43.
30. Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol.*, 1996,9(1),18-33.
31. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA et al.: Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol.*, 2010,34(8),1077-87.
32. Gingelmaier A, Gutsche S, Mylonas I et al.: Expression of HPV, steroid receptors (ERalpha, ERbeta, PR-A and PR-B) and inhibin/activin subunits (alpha, betaA and betaB) in adenosquamous endometrial carcinoma. *Anticancer.* 2007,27,2011-7.

33. Grace VM, Shalini JV, lekha TT et al.: Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.*, 2003,91,51-8.
34. Gravitt P E, Peyton C L, Alessi T Q et al.: Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.*, 2000, 38,357-61.
35. Guo M, Gong Y, Deavers M et al.: Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detecting human papillomavirus DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J Clin Microbiol.*, 2008,46,274-80.
36. Gutiérrez J, Jiménez A, de Dios Luna J et al.: Meta-analysis of studies analyzing the relationship between bladder cancer and infection by human papillomavirus. *J Urol.*, 2006,176,2474-81.
37. Hagmar B, Johansson B, Kalantari M et al.: The incidence of HPV in a Swedish series of invasive cervical carcinoma. *Med Oncol Tumor Pharmacother.*, 1992,9,113-7.
38. Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P et al.: Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol.*, 2004,150,949-57.
39. Hazard K, Karlsson A, Andersson K et al.: Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol.*, 2007,127,116-9.
40. Helal Tel A, Fadel MT, El-Sayed NK: Human papilloma virus and p53 expression in bladder cancer in Egypt: relationship to schistosomiasis and clinicopathologic factors. *Pathol Oncol Res.*, 2006,12,173-8.
41. Herschkowitz JI, He X, Fan C et al.: The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer*, 2008,10, R75.
42. Hesselink AT, van den Brule AJ, Groothuismink ZM et al.: Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol.*, 2005,43, 4868-71.
43. Hilliard NJ, Krahl D, Sellheyer K: p16 expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol.*, 2009,36,753-9.
44. Hoffmann M, Klose N, Gottschlich S et al.: Detection of human papillomavirus DNA in benign and malignant sinonasal neoplasms. *Cancer Lett.*, 2006, 28,239,64-70.
45. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 2009,20,384,324-34.
46. Chen AC, Keleher A, Kedda MA et al.: Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol.*, 2009,8,11792-6.
47. Chen YC, Chen JH, Richard K et al.: Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection. *Cancer*. 2004,15101,1428-36.
48. Cheng JY, Sheu LF, Lin JC et al.: Detection of human papillomavirus DNA in colorectal adenomas. *Arch Surg.*, 1995,130,73-6.

49. Chernock RD, El-Moft SK, Thorstad WL et al.: HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol.*, 2009,3,898–903.
50. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ et al.: A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.*, 1997,35,791-5.
51. Jarrett RF: Viruses and lymphoma/leukaemia. *J Pathol.*, 2006,208,176-86.
52. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A et al.: Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol.*, 1996,34,95-100.
53. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M: Markers of malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Eur J Surg Oncol.*, 2005,31,905-11.
54. Katzenellenbogen RA, Galloway DA: Human papillomavirus-associated cancers. In: *Viral Oncology-Basic Science and Clinical Applications*, 2009,1,1-23.
55. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al.: Crum CP. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.*, 2001,25,884-91.
56. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L et al.: Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.*, 1999,37, 2508-17.
57. Konidaris S, Kouskouni EE, Panoskaltsis T et al.: Human papillomavirus infection in malignant and benign gynaecological conditions: a study in Greek women. *Health Care Women Int.*, 2007,28,182-91.
58. Küsters-Vandeveldde HV, de Koning MN, Melchers WJ et al.: Expression of p14ARF, p16INK4a and p53 in relation to HPV in (pre-)malignant squamous skin tumours. *J Cell Mol Med.*, 2009,13,2148-57.
59. Küsters-Vandeveldde HV, Van Leeuwen A, Verdijk MA et al.: CDKN2A but not TP53 mutations nor HPV presence predict poor outcome in metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Int J Cancer.* 2010,1,126,2123-32.
60. Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C et al.: The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol.*, 2009,73,348-70.
61. Liao CL, Hsu JD, Lee MY et al.: Distinguishing between primary endocervical and endometrial adenocarcinomas: is a 2-marker (Vim/CEA) panel enough? *Virchows Arch.*, 2010,456,377-86.
62. Liang XH, Mungal S, Ayscue A et al.: Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. *J Cell Biochem.*, 1995,57,509-21.
63. Lopez-Lizarraga E, Sanchez-Corona J, Montoya-Fuentes H et al.: Human papillomavirus in tonsillar and nasopharyngeal carcinoma: isolation of HPV subtype 31. *Ear Nose Throat J.*, 2000,79,942-4.

64. Lu XM, Monnier-Benoit S, Mo LZ et al.: Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma of the high-risk Kazakh ethnic group in Xinjiang, China. *Eur J Surg Oncol.*, 2008,34,765-70.
65. Majewski S, Jablonska S: Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol.*, 1997,36,659-85.
66. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L et al.: Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Res.*, 2006,1,12,6946-51.
67. Martin D, Gutkind JS: Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene.* 2008,27, 2,S31-42.
68. Morris BJ: Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med.*, 2005,43,1171-7.
69. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymański M et al.: Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 2008, 265,89-96.
70. Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM: Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology*, 2008,40,335-44.
71. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB et al.: Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006,31,24, Suppl 3:S3/1-10.
72. Nakazawa K, Murata S, Yuminamochi T et al.: p16(INK4a) expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol.*, 2009,132,776-84.
73. Nonogaki S, Wakamatsu A, Filho AL et al.: Molecular strategies for identifying human papillomavirus infection in routinely processed samples: focus on paraffin sections. *J Low Genit Tract Dis.*, 2005,9,219-24.
74. Nuovo GJ: In situ detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods Mol Biol.*, 2011,688,35-46.
75. O'Leary JJ, Landers RJ, Crowley M et al.: Human papillomavirus and mixed epithelial tumors of the endometrium. *Hum Pathol.*, 1998,29,383-9.
76. Orth G: Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol.*, 2006,18,362-74.
77. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al.: Global cancer statistics, 2002. *Cancer J Clin.*,2005, 55,74-108.
78. Petersen I, Schewe C, Schlüns K et al.: Inter-laboratory validation of PCR-based HPV detection in pathology specimens. *Virchows Arch.*, 2007, 451,701-16.
79. Pfefferle R, Marcuzzi GP, Akgül B et al.: The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol.*, 2008,128,2310-5.
80. Plottel CS, Blaser MJ: Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe*, 2011,20,10,324-35.
81. Poljak M, Kocjan BJ: Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 2010, 8, 1139-62.

82. Powell J, Strauss S, Gray J et al.: Genital carriage of human papilloma virus (HPV) DNA in prepubertal girls with and without vulval disease. *Pediatr Dermatol.*, 2003,20,191-4.
83. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A et al.: PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol.*, 2004, 30,302-8.
84. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L et al.: Ramon y Cajal S. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011,5,30,2087-97.
85. Rubenstein LM, Smith EM, Pawlita M et al.: Human papillomavirus serologic follow-up response and relationship to survival in head and neck cancer: a case-comparison study. *Infect Agent Cancer.* 2011, 8,6,9.
86. Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E: Aberrant expression of the Rb pathway proteins in soft tissue sarcomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006,14,397-403.
87. Samaras V, Rafailidis PI, Mourtzoukou EG et al.: Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. *J Infect Dev Ctries.*, 2010,3,4,267-81.
88. Sarid R, Gao SJ: Viruses and human cancer: from detection to causality. *Cancer Lett.*, 2011,28,305,218-27.
89. Scott IU, Karp CL, Nuovo GJ: Human papillomavirus 16 and 18 expression in conjunctival intraepithelial neoplasia. *Ophthalmology.* 2002,109,542-7.
90. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ et al.: A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol.*, 2011,24,1295-305.
91. Sihto H, Kukko H, Koljonen V et al.: Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 2011, 15,17,4806-13.
92. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ et al.: A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer.*, 2007, 121,2465-72.
93. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ: The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol.*, 2003,201,1-6.
94. Snow AN, Laudadio J: Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol.*, 2010, 17,394-403.
95. Southam CM : The complex etiology of cancer. *Cancer Res.*, 1963,23,1105-15.
96. Struijk L, van der Meijden E, Kazem S et al.: Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes. *J Gen Virol.*, 2008,89,2303-14.
97. Subhawong AP, Subhawong T, Nassar H et al.: Most basal-like breast carcinomas demonstrate the same Rb-/p16+ immunophenotype as the HPV-related poorly differentiated squamous cell carcinomas which they resemble morphologically. *Am J Surg Pathol.*, 2009,33,163-75.

98. Syrjänen KJ: HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *J Clin Pathol.*, 2003,56,174-81.
99. Syrjänen S, Puranen M: Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 2000,11,259-74.
100. Tachezy R, Smahelova J, Salakova M et al. : Human Papillomavirus Genotype Distribution in Czech Women and Men with Diseases Etiologically Linked to HPV. *PLoS One*, 2011,6, e21913.
101. Thomas MC, Chiang CM: E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell.*, 2005,21,17,251-64.
102. Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP et al.: Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods.*, 1993, 42, 265-79.
103. Torrente MC, Ampuero S, Abud M et al.: Molecular detection and typing of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. *Acta Otolaryngol.*, 2005,125,888-93.
104. Tulvatana W, Bhattarakosol P, Sansopha L et al.: Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. *Br J Ophthalmol.* 2003,87,396-8.
105. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ et al.: High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngealsquamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.*, 2011,35,1343-50.
106. Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM et al.: E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol.*, 2008,82,10408-17.
107. Vasiljevic N, Hazard K, Dillner J et al.: Four novel human betapapillomaviruses of species 2 preferentially found in actinic keratosis. *J Gen Virol.*, 2008,89,2467-74.
108. Wadsworth B, Bumpous JM, Martin AW et al.: Expression of p16 in Sinonasal Undifferentiated Carcinoma (SNUC) Without Associated Human Papillomavirus (HPV). *Head Neck Pathol.*, 2011,30.
109. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al.: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.*, 1999, 189,12-9.
110. Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL et al.: Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 2001,7,1553-60.
111. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG et al.: A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol.*, 2006, 24,736-47.
112. Wiegand P, Domhöver J, Brinkmann B. [DNA degradation in formalin fixed tissues]. *Pathologe.* 1996,17,451-4.
113. Wu QJ, Guo M, Lu ZM et al.: Detection of human papillomavirus-16 in ovarian malignancy. *Br J Cancer.*, 2003,18,89,672-5.

114. Yang H, Yang K, Khafagi A et al.: Sensitive detection of human papillomavirus in cervical, head/neck, and schistosomiasis-associated bladder malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005,24,102,7683-8.
115. Yang L, Pei Z: Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2006,14,12,6741-6.
116. Yasmeen A, Bismar TA, Kandouz M et al.: E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2007,15,6,2038-42.
117. Yu Y, Yang A, Hu S et al.: Correlation of HPV-16/18 infection of human papillomavirus with lung squamous cell carcinomas in Western China. *Oncol Rep.*, 2009,21,1627-32.
118. Zhi-Ming Zheng: Viral Oncogenes, noncoding RNAs, and RNA Splicing in Human Tumor Viruses, *Int J Biol Sci*. 2010, 6, 730–755.
119. zur Hausen H: The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*. 2009,15,392,1-10.
120. zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2002,2,342-50.
121. Žemla J, Čiampor F, Leššo J, Všeobecná virológia, *Slovak academic press*, 1995, *Nádory vo vzťahu k vírusovej infekcii*, 139-152.



## 6. Souhrn dalších publikací autorky

1: Kazakov DV, Vanecek T, Zelger B, Carlson JA, Spagnolo DV, Schaller J, Nemcova J, Kacerovska D, Vazmitel M, Sangüeza M, Emberger M, Belousova I, Fernandez-Figueras MT, Kempf W, Meyer DR, Rütten A, Baltaci M, Michal M. Multiple (familial) trichoepitheliomas: a clinicopathological and molecular biological study, including CYLD and PTCH gene analysis, of a series of 16 patients. *Am J Dermatopathol.*, 2011,33(3), 251-65

2: Reischig T, Nemcová J, Vanecek T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Treska V. Intra-graft cytomegalovirus infection: a randomized trial of valganciclovir prophylaxis versus pre-emptive therapy in renal transplant recipients. *Antivir Ther.*, 2010,15(1), 23-30.

3: Daum O, Ferdova E, Kural T, Grossmann P, Nemcova J, Mukensnabl P, Michal M. Pancreatic undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells masquerading as (extra)gastrointestinal stromal tumor: potential diagnostic pitfall. *Pathol Int.*, 2010, 60(1), 59-61.

4: Kazakov DV, Vanecek T, Nemcova J, Kacerovska D, Spagnolo DV, Mukensnabl P, Michal M. Spectrum of tumors with follicular differentiation in a patient with the clinical phenotype of multiple familial trichoepitheliomas: a clinicopathological and molecular biological study, including analysis of the CYLD and PTCH genes. *Am J Dermatopathol.*, 2009, 31(8), 819-27.

5: Treska V, Hes O, Nemcova J. Liver tuberculoma. *Bratisl Lek Listy.* 2009, 110(6), 363-5.

6: Skálová A, Sima R, Vanecek T, Muller S, Korabecna M, Nemcova J, Elmerberger G, Leivo I, Passador-Santos F, Walter J, Rousarova M, Jedlickova K, Curik R, Geierova M, Michal M. Acinic cell carcinoma with high-grade transformation: a report of 9 cases with immunohistochemical study and analysis of TP53 and HER-2/neu genes. *Am J Surg Pathol.*, 2009, 33(8), 1137-45.

7: Kacerovska D, Michal M, Nemcova J, Vanecek T, Kreuzberg B, Mrazkova P, Koudela K Jr, Kazakov DV. Crystal-deficient alveolar soft-part sarcoma with cutaneous involvement: a case report. *Am J Dermatopathol.*, 2009, 31(3), 272-7.

8: de León DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, Cetina L, Coronel A, Hes O. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer*, 2009,9, 22-26.

9: Kacerovska D, Nemcova J, Petrik R, Michal M, Kazakov DV. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the Bartholin gland. *Am J Dermatopathol.*, 2008, 30(6), 586-9.

- 10: Kacerovska D, Nemcova J, Michal M, Kazakov DV. Eccrine syringofibroadenoma associated with well-differentiated squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.*, 2008, 30(6), 572-4.
- 11: Michal M, Hes O, Nemcova J, Sima R, Kuroda N, Bulimbasic S, Franco M, Sakaida N, Danis D, Kazakov DV, Ohe C, Hora M. Renal angiomyoadenomatous tumor: morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of a distinct entity. *Virchows Arch.*, 2009, 454(1), 89-99.
- 12: Kuroda N, Hes O, Michal M, Nemcova J, Gal V, Yamaguchi T, Kawada T, Imamura Y, Hayashi Y, Lee GH. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma with Fuhrman nuclear grade 3: a histological, immunohistochemical, ultrastructural and FISH study. *Histol Histopathol.*, 2008, 23(12):1517-23.
- 13: Kacerovska D, Nemcova J, Pomahacova R, Michal M, Kazakov DV. Cutaneous and superficial soft tissue lesions associated with Albright hereditary osteodystrophy: clinicopathological and molecular genetic study of 4 cases, including a novel mutation of the GNAS gene. *Am J Dermatopathol.* 2008, 30(5), 417-24.
- 14: Hes O, Síma R, Nemcová J, Hora M, Bulimbasic S, Kazakov DV, Urge T, Reischig T, Dvorák M, Michal M. End-stage kidney disease: gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. *Virchows Arch.*, 2008, 453(4), 313-9.
- 15: Belousova IE, Nemcova J, Kacerovska D, Michal M, Kazakov DV. Atypical histopathological features in cutaneous lymphoid hyperplasia of the scrotum. *Am J Dermatopathol.*, 2008, 30(4), 407-8.
- 16: Kazakov DV, Nemcova J, Mikyskova I, Michal M. Absence of Epstein-Barr virus, human papillomavirus, and simian virus 40 in patients of central european origin with lymphoepithelioma-like carcinoma of the skin. *Am J Dermatopathol.*, 2007, 29(4), 365-9.