

# LIDSKÉ PAPILOMAVIRY V PATOGENEZI NEOPLÁZIÍ DĚLOŽNÍHO ČÍPKU

Ruth Tachezy a Eva Hamšíková

Do začátku 80. let minulého století byly infekce lidskými papillomaviry spojovány se vznikem genitálních bradavic (*condylomata accuminata*), které byly již od antických dob považovány za sexuálně přenosné onemocnění. Epidemiologické charakteristiky karcinomu děložního čípku (KDC) a lézí, které tomuto závažnému onemocnění předcházejí, již od 60. let minulého století naznačovaly, že jejich vznik je podmíněn přítomností nějakého sexuálně přenosného infekčního agens. Nejprve byla uvažována infekce virem herpes simplex 2, ale toto podezření bylo vyvráceno několika prospektivními studii a v současné době je nade vší pochybnost prokázáno, že hlavním etiologickým faktorem KDC jsou lidské papillomaviry (Bosch et al., 2002).

Papillomaviry jsou nádorové DNA viry, patří do čeledi *Papovaviridae*. Jsou to malé, neobalené viry o velikosti přibližně 55 nm, jejich genom je tvořen dvouřetězcovou, kovalentně uzavřenou molekulou DNA o délce přibližně 8 000 pb. DNA nese informaci pro dva pozdní proteiny (L1 a L2) a až osm časných (E1 až E8) proteinů, z nichž dva (E6 a E7) jsou virově specifické onkoproteiny. Informace pro všechny virově–specifické proteiny je uložena pouze na jednom řetězci virové DNA. Papillomaviry jsou druhově specifické, infikují exkluzivně epiteliální buňky a na základě tkáňové specifity se dělí na kožní a slizniční a podle onkogeního potenciálu na nízko– (low risk, LR) a vysoce– (high risk, HR) rizikové typy. Doposud je známo více než 100 genotypů HPV, z nichž asi 40 infikuje anogenitální trakt. Předpokládá se, že PV infikují buňky bazálních vrstev epitelu přes mikrotraumata nebo přímým kontaktem v místech přechodu epitelu dlaždicobuněčného v cylindrický, například v oblasti děložního čípku. Podobně je možná infekce HPV a vznik lézí na dalších místech přechodného epitelu např. v nosohltanu, na epiglotis, hlasívkách a v oblasti anu. Replikační cyklus PV je závislý na diferenciaci buněk. V jádrech infikovaných nediferencovaných kmenových buněk dochází pouze k omezené expresi virového genomu, při dozrávání buněk a jejich migraci k povrchu se exprimují další virové geny a viriony vznikají až v terminálně diferencovaných keratinocytech. Buňky produkující HPV vykazují typické cytopatické změny vedoucí ke vzniku koilocytů. V tomto stadiu nacházíme HPV DNA výlučně v epizomální formě a kompletní viriony jsou dostatečným zdrojem pro přenos infekce na jiné osoby. U dospělých dochází k šíření infekce genitálními typy HPV především sexuálním stykem, v daleko menší míře pak nepřímou kontaminací. U dětí je možný přenos vertikálně z matky při porodu, není vyloučena ani transplacentární infekce v průběhu těhotenství. Úspěšný přenos HPV infekce je určen jednak citlivostí hostitele, jednak dávkou viru a délkou kontaktu.

Většina HPV infekcí genitálního traktu je latentních, tzn. že je nelze zjistit ani cytologicky, ale pouze metodami detekce HPV DNA. U mladších žen se v téměř 80% jedná o infekci přechodnou, starší ženy jsou infikovány v daleko menší míře, ale infekce je mnohem častěji persistentní. Klinickými projevy HPV infekce genitálního traktu jsou benigní, často spontánně regredující léze, které se zpravidla spontánně vyhojí do 1 roku a pouze výjimečně přecházejí ve zhoubné nádory. Klinickým projevem infekce genitálního traktu LR typy HPV, mezi které řadíme především typ 6 a 11, v menší míře pak 42, 43, 44 jsou *condylomata accuminata*. Subklinické a latentní

formy virové infekce mohou, za přispění dalších faktorů, přejít v intraepiteliální léze, předcházející rozvoji KDC. Intraepiteliální léze nízkého stupně (LG SIL) opět většinou spontánně mizí, část persistuje po různě dlouhé časové období a pouze malá část progreduje do intraepiteliálních lézí vysokého stupně (HG SIL), kam zařazujeme i karcinom *in situ*. HG SIL se spontánně vyhojí pouze výjimečně a bez adekvátní léčby po různě dlouhé době persistence často přecházejí v invazivní karcinom. Progrese onemocnění je velice pomalá, nezbytnou podmínkou je persistentní přítomnost HR HPV (Ho et al., 1995).

Se zvyšující se závažností lézí se zužuje spektrum přítomných typů HPV. S KDC je spojeno více než 20 typů, především vysoce rizikové typy 16 a 18, vzácněji pak další typy jako 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, které jsou častěji přítomné v prekancerózních lézích. Podobné léze nacházíme na vulvě (VIN), v pochvě (VAIN), v perianální oblasti (PAIN) nebo na penisu (PIN). Nejčastěji se vyskytujícím typem u nemocných i zdravých osob je typ 16.

Mezi rizikové faktory progrese onemocnění řadíme jednak faktory hostitelské, kam patří genotyp HLA a polymorfismus buněčných genů (p53) a dále virové, mezi které patří persistence viru, která zvyšuje pravděpodobnost integrace virové DNA do genomu hostitelské buňky, což má za následek inaktivaci genu E2, fungujícího také jako represor transkripce onkoproteinů E6 a E7. Dále sem patří variabilita v sekvenci virové DNA a v neposlední řadě virová nálož.

HPV infekci je možné detekovat několika způsoby.

1. Morfologické metody (cytologie, histologie) umožňují zjistit subklinickou formu infekce. Nejrozšířenější skrínigová metoda – cytologické vyšetření stěrů z exo- a endocervixu, barvených dle Papanicolauea, má řadu omezení (citlivost, specificita). Nově zaváděná metoda tzv. liquid-based cytology dosahuje lepších výsledků. Histologie klasifikuje změny v bioptickém materiálu a je definitivním potvrzením diagnózy.

2. Elektronově-mikroskopické metody detekují přímo virové partikule, ale jejich provádění je příliš náročné pro rutinní praxi.

3. Imunochemické metody, které pomocí specifických protilátek detekují přítomnost virově-specifických proteinů jsou málo citlivé a také jejich specificita je relativně nízká.

4. Nejvíce používané jsou metody detekce HPV DNA, které umožňují zjistit i latentní infekci. Tyto metody můžeme rozdělit na techniky hybridizační (komerčně dostupný test firmy DIGENE, založený na přímé hybridizaci (Hybrid Capture – HC), Southern blot (SB), dot blot (DB), in situ hybridizace na filtru (FISH), in situ hybridizace na sklíčkách (ISH)) a dále na techniky amplifikační, kdy je úsek HPV DNA před detekcí nejprve namnožen pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). V následném kroku je k zvýšení specifity a citlivosti, eventuelně k určení typu HPV, využíváno opět hybridizace a sekvenace produktů PCR.

Detekce HPV pro účely epidemiologických studií se provádí pomocí PCR. Všechny nejčastěji používané systémy primerů jsou cílené do oblasti vysoce konzervovaného genu L1. Prvním systémem je směs primerů odvozených z degenerovaných primerů MY09/11 a označovaných jako PGMY09/11 (Gravitt et al., 2000), který amplifikuje 450 pb dlouhý úsek. Druhý systém využívá obecné primery – GP5+/6+ (Jacobs et al., 1997), které namnoží úsek dlouhý 150 pb. Třetí systém využívá primery označované

jako SPF10, které amplifikují 65 pb dlouhý fragment (Kleter et al., 1999). Všechny uvedené PCR systémy jsou schopné v jednom kroku detekovat všechny genitální typy HPV.

5. Sérologické metody nám umožňují zjistit, jestli se organismus s HPV infekcí již setkal. Protilátky proti virově specifickým proteinům jsou detekovány nejčastěji enzymoimunoanalýzou (ELISA), v daleko menší míře Western–blottingovou analýzou nebo radioimunoprecipitací. Jako antigeny se v poslední době nejčastěji používají tzv. pseudoviriony (virus–like particles – VLP) (Kirnbauer, 1996), které spontánně vznikají při dostatečně vysoké expresi hlavního kapsidového proteinu L1 v rekombinantních expresních systémech. Na svém povrchu nesou konformační epitopy, které jsou při přirozené infekci pravděpodobně zodpovědné za vznik neutralizačních protilátek. Detekovatelné hladiny protilátek se v periferní krvi objevují 1–12 měsíců po infekci, jejich množství záleží kromě jiného na intenzitě a délce infekce, i když některé osoby detekovatelné množství protilátek nevytvoří nikdy.

Nejvíce používanou metodou detekce HPV infekce v rutinním provozu je v současné době metoda přímé hybridizace, na níž je založena komerčně dostupná souprava firmy Digene Hybrid Capture II. V tomto testu hybridizuje HPV DNA v testovaném vzorku se směsí typově specifických HPV RNA prób, hybridní DNA/RNA molekuly se vychytávají na specifické anti–DNA/RNA protilátky zakotvené na pevné fázi a detekují se dále značenými protilátkami, které se váží na více míst každé hybridní molekuly, čímž se výsledný signál zesiluje. Souprava používá směs 5 LR a 13 HR HPV prób, její citlivost je 1 pg, což reprezentuje asi 5000 kopií HPV DNA. Určitou nevýhodou je zkřížená reaktivita s typy, které nejsou v próbě obsažené.

Další komerční produkty, jako je INNO LiPa firmy Innogenetics (SPF10 primery, 25 HPV typů), MULTIGENE firmy Symbiosis (22 HPV typů) či nová souprava firmy ROCHE, která má být uvedena na trh v roce 2004 (PGMY09/11 primery, 27 HPV typů) jsou založené na detekci PCR produktů pomocí obrácené hybridizace k pevně ukotvené próbě. Princip detekce je takový, že k imobilizovaným typově specifickým próbám je přidán značený PCR produkt (např. biotinem), který je následně detekován reakcí s barevným substrátem.

Citlivost PCR reakce závisí kromě jiného na typu materiálu, který do reakce vstupuje. Při použití hrubých lyzátů je citlivost nižší než při použití purifikované DNA. Dalším faktorem je typ HPV, typ použité Taq polymerázy, citlivost substrátu, délka amplifikovaného fragmentu DNA.

V poslední době se věnuje pozornost vztahu mezi virovou náloží a klinickým nálezem. Zdá se, že hranice mezi normálním a abnormálním cytologickým nálezem je přibližně  $10^4$  kopií HPV DNA na stěr. Léze s méně než  $10^5$  kopií HPV DNA na stěr mají tendenci k regresi, zatímco vyšší dávka viru může být známkou eventuelní progresse léze k závažnějšímu nálezu (Snijders et al., 2003).

V posledních 20 letech se značně rozšířily znalosti o epidemiologii, molekulární biologii a imunologii HPV. Byly získány přesvědčivé důkazy o etiologickém vztahu mezi infekcí HR typy HPV a vznikem lidských nádorů, především KDCČ. V současnosti se tedy výzkum v oblasti HPV zaměřil především na přípravu vakcín. Pracuje se zároveň na vývoji profylaktické a terapeutické vakcíny. Vakcína profylaktická by měla zabránit infekci HPV a vakcína terapeutická by měla zničit

nádorové buňky, které obsahují virově specifické onkoproteiny E6 a E7. Další možností by mohla být vakcína kombinovaná, kterou by byly vakcinovány infikované ženy bez patologického nálezu.

Je zcela zřejmé, že imunitní systém organismu hraje v kontrole HPV infekce důležitou úlohu. Opakovaně se podařilo prokázat, že regrese lézí, vyvolaných PV, je dílem buněčné imunity a že přítomnost neutralizačních protilátek je schopná zabránit virové infekci. Také častější přítomnost těžkých cervikálních lézí u žen s poruchou imunity svědčí o tom, že správně fungující imunitní systém je předpokladem účinné obrany proti důsledkům infekce HPV.

Vývoj vakcín proti HPV je spojen se značnými obtížemi, které souvisí především s biologií viru. HPV se nemnoží na běžných typech tkáňových kultur a proto není možné použít žádný z klasických postupů přípravy vakcín. Vývoj očkovacích látek proti HPV je tedy založen na technologii genového inženýrství. Protože je doposud známo více než 100 genotypů HPV, z nichž přibližně 20 bylo nalezeno v lézích KDCČ, a zdá se, že imunitní reakce infikovaného organismu jsou typově specifické, byla by příprava vakcíny proti všem dvaceti typům HPV velice složitá. Avšak, více než 50% případů KDCČ je spojeno s HPV 16 a tak je zřejmé, že první vakcíny budou zaměřené právě proti tomuto typu. Inkubační doba je, stejně jako u jiných nádorových virů, dlouhá a může trvat až několik desítek let. Také individuální sexuální život trvá několik desítek let a je tedy otázkou, zda imunita vyvolaná vakcínou bude trvat dostatečně dlouho. Infekce HPV je spojena s nejvyšším rizikem, pokud k ní dojde u adolescentů. Profylaktické HPV vakcíny, jejichž úkolem je indukovat tvorbu neutralizačních protilátek, které by zabránily následné infekci, by tedy měly být aplikovány těsně před tímto obdobím, s možnou revakcinací v následujícím desetiletí života.

Velikost dávky, tolerance, bezpečnost a potřeba použití adjuvans byly prověřeny v klinických studiích I. stupně za použití pseudovirionů typu 16 (NCI, MERCK, USA) (Harro et al., 2001) a typu 11 (MEDIMUNE, USA) (Evans et al., 2001). Imunogennost a účinnost profylaktické vakcíny, založené na pseudovirionech typu 16 (klinická studie II. stupně), byla prověřena rozsáhlou studií na 2392 mladých ženách ve věku 16–23 let (Koutsky et al., 2002). Studie byla dvojitě slepá, žádná žena ze skupiny nikdy neměla abnormální cytologický nálezu a celkový počet sexuálních partnerů nepřesáhl pět. Ženám byla vakcína aplikována ve třech dávkách, polovina žen byla očkována VLP16, polovina placebo. Před vakcinací, měsíc po poslední dávce (7 měsíců po první) a dále v 6ti měsíčních intervalech byly ženy vyšetřeny a byly jim odebrány vzorky na detekci přítomnosti HPV DNA a specifických anti-VLP16 protilátek. Titry specifických protilátek byly u sérokonvertovaných významně vyšší, než titry dosahované při přirozené infekci. Účinnost vakcíny byla sledována na skupině žen, které byly při vstupu do studie negativní na přítomnost HPV16 DNA i specifických protilátek a 7 měsíců po první dávce byly bez HPV16 DNA nálezu. Čtyřicet jedna žen z kontrolní skupiny bylo v průběhu sledování infikováno HPV16, z nich 9 vyvinulo v průběhu sledování CIN. U vakcinovaných nebyla nalezena HPV16 infekce ani ženy nevyvinuly léze. Studie prokázala, že taková vakcína redukuje jak incidentní infekci, tak rozvoj HPV16–asociovaných lézí a mohla by pravděpodobně redukovat incidenci KDCČ. Nyní probíhá další studie, ve které byla aplikována polyvalentní vakcína, obsahující pseudoviriony typu 6, 11, 16 a 18 ve dvojitě slepém

uspořádání 1155 ženám. Schéma vakcinace i výběr žen byly stejné jako v prvním případě, dosažené titry protilátek byly rovněž vysoké. Další parametry jsou dosud vyhodnocovány. Před spuštěním je klinická studie III. fáze ve Finsku, do které bude zavazato celkem 10 000 osob – asi 2500 osob bude aplikována vakcína, placebo dostane 7500 osob; první výsledky se očekávají v roce 2015. Další uvažovanou studií je vakcinace pseudoviriony typu 16 a 18 pod dohledem NCI v Kostarice, kdy by do programu mělo být zahrnuto rovněž 10 000 osob. Preventivní vakcíny by měly největší význam v rozvojových zemích, kde je incidence KDC obrovská. Použití výše uvedených vakcín je však pro výrobní náklady a náklady spojené s distribucí prakticky vyloučené, a proto se vakcíny druhé generace zaměřují na přípravu v bakteriálních systémech nebo v rostlinách s jednodušším způsobem aplikace (aerosol, jedlé vakcíny). Takové vakcíny by měly být zaměřené proti více typům HPV – toho by mohlo být dosaženo zařazením minoritního kapsidového proteinu L2, který nese více typově společných antigenních determinant. Licence na výrobu preventivní vakcíny se očekává v horizontu přibližně 3 let. V tomto období by měly proběhnout klinické studie v dalších zemích a měla by se vytvořit infrastruktura pro zavedení očkování.

Koncepce vývoje terapeutických vakcín je založena na přítomnosti virově specifických antigenů v nádorových buňkách. V buňkách zhoubných nádorů vyvolaných HPV jsou exprimovány geny E6 a E7, které kódují virově specifické onkoproteiny. Tyto proteiny se pak přímo podílejí na imortalizaci a malignizaci infikované buňky interakcí s buněčnými antionkoproteiny p53 a pRB, které jsou zodpovědné za regulaci buněčného cyklu a důsledkem jejich inaktivace je kontinuální proliferace buněk při níž dochází k fixaci mutací. Hromadící se mutace mohou vést ke vzniku geneticky těžce pozměněných, růstově aktivních buněk, z nichž se vyselektuje maligní klon. Produkty genů E6 a E7 proto představují přirozené cíle pro protinádorové imunitní reakce. Terapeutická vakcína by měla vyvolat tvorbu cytotoxických lymfocytů T (CTL), které rozruší buňky, nesoucí takové antigeny. Vzhledem k tomu, že CTL vznikají, pokud se v antigen–prezentujících buňkách tvoří cílové proteiny intracelulárně a antigen je prezentován ve formě krátkých peptidů v kontextu s HLA I, nabízejí se jako experimentální vakcíny virové vektory, jako jsou rekombinantní viry vakcínie či nereplikující se rekombinantní adenoviry. Další možností je použití DNA vakcín, zvláště zkoumané jsou geny E6 a E7 modifikované tak, aby jejich produkty ztratily vlastnosti onkoproteinů při zachování imunogennosti. Zvažována je též možnost použít modifikované dendritické buňky, různé rekombinantní proteiny nebo imunologicky aktivní peptidy.

Poslední možností jsou vakcíny kombinované, které by jednak stimulovaly protilátkovou odpověď proti neutralizačním epitopům lokalizovaným na obalových proteinech L1, event. L2 a zároveň tvorbu cytotoxických lymfocytů proti produktům časných virových genů především E6 a E7. Takovou podmínku by mohly splňovat tzv. chimerické VLP, které jsou tvořeny modifikovaným proteinem L1, v němž bylo 34 aminokyselinových zbytků na C–konci nahrazeno 50ti aminokyselinovou N–koncovou částí proteinu E7 (Müller, Zhou et al., 1997), pseudoviriony, které by uvnitř nesly genetickou informaci pro virově specifický nestrukturální protein, event. rekombinantní bakterie, které by nesly genetickou informaci jak pro kapsidový, tak nestrukturální protein.

- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. L. M., and Shah, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J.Clin.Pathol.* 55(4), 244-265. 2002.
- Evans, T. G., Bonnez, W., Rose, R. C., Koenig, S., Demeter, L., Suzich, J. A., O'Brien, D., Campbell, M., White, W. I., Balsley, J., and Reichman, R. C. A phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infec.Dis.* 183(10), 1485-1493. 2001.
- Gravitt, P. E., Peyton, C. L., Alessi, T. Q., Wheeler, C. M., Coutlee, F., Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Scott, D. R., and Apple, R. J. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J.Clin.Microbiol.* 38(1), 357-361. 2000.
- Harro, C. D., Pang, Y. Y. S., Roden, R. B. S., Hildesheim, A., Wang, Z. H., Reynolds, M. J., Mast, T. C., Robinson, R., Murphy, B. R., Karron, R. A., Dillner, J., Schiller, J. T., and Lowy, D. R. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J.Nat.Cancer Inst.* 93(4), 284-292. 2001.
- Ho, G. Y., Burk, R. D., Klein, S., Kadish, A. S., Chang, C. J., Palan, P., Basu, J., Tachezy, R., Lewis, R., and Romney, S. (1995). Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute* **87**, 1365-1371.
- Jacobs, M. V., Snijders, P. J. F., Vandenbrule, A. J. C., Helmerhorst, T. J. M., Meijer, C. J. L. M., and Walboomers, J. M. M. (1997). 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.* **35**, 791-795.
- Kirnbauer, R. (1996). Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirol.* **39**, 54-61.
- Kleter, B., Vandoorn, L. J., Schrauwen, L., Molijn, A., Sastrowijoto, S., Tershegget, J., Lindeman, J., Terharmse, B., Burger, M., and Quint, W. (1999). 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.* **37**, 2508-2517.
- Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M., and Jansen, K. U. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N.Engl.J.Med.* 347(21), 1645-1651. 2002.
- Müller, M., Zhou, J. A., Reed, T. D., Rittmüller, C., Burger, A., Gabelsberger, J., Braspenning, J., and Gissmann, L. (1997). Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* **234**, 93-111.
- Snijders, P. J., van den Brule, A. J., and Meijer, C. J. (2003). The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J.Pathol.* **201**, 1-6.