

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dijana M. Tasić

Povezanost polimorfizama gena za TNF- α ,
IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne
intraepitelijalne neoplazije kod žena sa
infekcijom humanim papiloma virusom

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Dijana M. Tasić

Cytokine genes polymorphisms of TNF- α ,
IFN- γ and IL-12 as potential predictors in the
onset of cervical disease associated with HR-
HPV infections

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Mentor

Prof. dr Maja Čupić
Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

Komentor

Prof. dr Vera Pravica,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

Članovi komisije

dr Živko Perišić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

dr Ivana Lazarević, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

dr Aleksandra Knežević, vanredni
profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

dr Branka Popović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki
fakultet

dr Dejan Baskić, vanredni profesor
Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet
Medicinskih nauka

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujem:

Prof. dr Maji Ćupić, mom mentoru, koja me je vodila ovim teškim i izazovnim putem nauke, uz nesebičnu podršku i veliko prijateljstvo, koje je za ceo život,

Prof. dr Veri Pravici, komentoru, koja nam je svojim znanjem rasvetlila put ka savladavanju složene imunološke problematike sa kojom smo se uhvatili u koštac,

Doc. dr Vladimiru Peroviću na nezamenljivoj pomoći prilikom izvođenja imunološkog dela ovog istraživanja,

Prof. dr Aleksandri Knežević na velikoj podršci u izvođenju eksperimentalnog dela ovog istraživanja i obogaćivanju teze najnovijim dostignućima u domenu HPV genotipizacije,

Prof. dr Ivani Lazarević na neprocenjivoj pomoći i korisnim savetima kojima je unapredila ovu doktorsku tezu,

Prof. dr Živku Perišiću i dr Aleksandri Pikuli čija su pomoć i stručnost omogućile klinički aspekt ovog istraživanja,

Gabrijeli Pavlović, posebno, na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom delu istraživanja, stalnom podstrecu da istrajem i njenom nezamenljivom prijateljstvu,

Mariji Životić, na velikoj pomoći u eksperimentalnom delu istraživanja, pozitivnoj energiji i prijateljstvu,

Miroslavi Ivančić i Danijeli Darmanovićna tehničkoj pomoći, prikupljanju uzoraka i podataka od pacijentkinja,

Maji Nedeljković na tehničkoj pomoći u sprovođenju imunološkog dela istraživanja,

Snežani Stanojević velikom stručnjaku i prijatelju, koja je dala neprocenjiv doprinos našem radu i veliku pomoć pri tumačenju komplikovanih relacija između kliničkih, imunoloških i virusoloških aspekata ove teze,

Svim pacijentkinjama, koje su svojom saradnjom, poverenjem i dobrom voljom omogućile da se ovo istraživanje sprovede,

Svojim dragim i bliskim prijateljima kao i svim bliskim saradnicima na podršci, pomoći i razumevanju,

Mojoj najbližoj porodici, koja jemojstub oslonca, na koji se oslanjam težinom svih svojih životnih radosti i nedaća,

Prof. dr Lidiji Tasić, mojoj najvoljenijoj majci, kojoj dugujem sve, bez čije nesebične moralne, fizičke i emotivne podrške ne bih mogla da pređem ovaj težak put,

Mojim najdivnijim devojkicama, Tamari i Sari, koje su bile moja inspiracija i u najtežim trenucima, one su moj život i njima posvećujem tezu.

Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom

Sažetak

Uvod: Karcinom grlića materice predstavlja četvrti po učestalosti maligni tumor kod žena. Infekcija visoko onkogenim tipovima HPV igra centralnu ulogu u razvoju cervikalne intraepitelijalne neoplazije i cervikalnog karcinoma. Pored HR-HPV, brojni kofaktori igraju značajnu ulogu u malignoj transformaciji ćelija. Najznačajniji među njima su faktori domaćina (genetski faktori i imunski status), faktori spoljašnje sredine i bihevioralni faktori (multiparitet, upotreba oralnih kontraceptiva, pušenje, infekcija drugim seksualno prenosivim patogenim uzročnicima, ranije stupanje u seksualne odnose, promiskuitet, loši socioekonomski uslovi i nutritivni faktori).

Ciljevi istraživanja: Cilj ove studije bio je da se kod ispitanica, koje su sa prethodno definisanim kolposkopskim i citološkim nalazom bile grupisane u četiri kategorije: PAP II, ASCUS, LSIL, HSIL, utvrdi prisustvo HR-HPV. Takođe je kod svih HR-HPV pozitivnih žena trebalo ispitati distribuciju genotipova i alela proinflamatornih citokina TNF- α , IFN- γ i IL-12 i njihov uticaj na nastanak cervikalne bolesti udružene sa HR-HPV i utvrditi koji genotipovi imaju protektivni, odnosno favorizujući, značaj za nastanak karcinoma grlića materice. Takođe, cilj istraživanja bio je da se kod svih HR-HPV pozitivnih pacijentkinja na osnovu upitnika utvrde kofaktori rizika za nastanak cervikalne bolesti i ispita povezanost između kofaktora i konstitucionalnih genskih polimorfizama proinflamatornih citokina, kao i njihov zajednički uticaj na nastanak cervikalnog karcinoma.

Materijal i metodologija: Istraživanje dizajnirano kao studija preseka sprovedeno je tokom četvorogodišnjeg perioda, od 2014. do 2018. godine i obuhvatilo je 541 pacijentkinju. Svim pacijentkinjama je tokom ginekološkog pregleda utvrđen kolposkopski i citološki status na grliću materice. Na osnovu citološkog nalaza sve pacijentkinje podeljene su u četiri grupe: PAP II, ASCUS, LSIL, HSIL. Radi utvrđivanja prisustva HPV i detekcije SNP za TNF- α , IFN- γ i IL-12 pacijentkinjama je uzet endocervikalni bris i/ili bris sa vidljivih lezija na ektocerviksu tehnikom

cervikalnog citobraša. Dalji postupak obrade podrazumevao je izolaciju ukupne DNK pomoću komercijalnog kita za izdvajanje nukleinskih kiselina. Dokazivanje i genotipizacija HPV izvršeni su sa dve metode, *in house* PCR za L1 i E1 gene za utvrđivanje prisustva virusa u uzorku cervikalnog brisa, a potom genotipizacija metodom sekvenciranja. Takođe, jedan deo uzoraka je tipiziran komercijalnom metodom. Izolovanje DNK iz cervikalnog brisa za ispitivanje polimorfizama citokinskih gena izvršeno je pomoću odgovarajućih kolona. Za dokazivanje i analizu polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 gena korišćena je SNP TaqMan metoda. Statistička analiza izvršena je primenom parametarskih i neparametarskih testova i korelacione i multiple regresione analize.

Rezultati: HR-HPV infekcija dokazana je kod 84 (15,5%), od ukupno 541 ispitanice. Najčešće izolovani HR-HPV genotipovi iz uzoraka sa grlića materice su HPV-16, 45, 31, 52, 18, 53, 33, 58, 66, 35, 59, 62. HR-HPV tip 16 se sa značajno većom učestalošću javlja kod pacijentkinja sa HSIL. U grupi ispitanica sa HSIL, HR-HPV tip 16 je otkriven za najvećom učestalošću jer je čak 16/17 ispitanica (86,5%) bilo HPV pozitivno. Povišena produkcija TNF- α citokina se sa značajno većom učestalošću javlja u lezijama umerenog i teškog stepena. Dominantan genotip TNF- α gena u ovim lezijama je AA genotip. Polimorfizam TNF- α gena je visoko signifikantnim, pozitivnim koeficijentom korelacije povezan sa citološkim nalazom. Polimorfizam gena za IFN- γ i IL-12 nije u značajnoj korelaciji sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije. Postoji umerena, negativna, signifikantna veza između polimorfizma gena za IFN- γ i ranijih infekcija. Između polimorfizma gena za IL-12 i ranica na grliću materice postoji negativna i signifikantna veza. Starosna dob povećava rizik za razvoj HSIL za 3,5 puta. BMI veći od 25 uvećava šansu za nastanak LSIL i HSIL za 2-3 puta. Dužina pušačkog staža utiče na nastanak HSIL, dok broj cigareta po danu nema uticaj na nastanak HSIL. Niži obrazovni status povećava rizik za razvoj HSIL promena tri puta. Iregularni menstrualni ciklusi povećavaju rizik za nastanak HSIL za 1,7 puta. Veći broj porođaja (preko 5) povezuje se sa 5 puta većim rizikom za razvoj cervikalnih lezija teškog stepena. Prethodne i rekurentne infekcije povećavaju rizik za razvoj LSIL dva puta. Najčešće prisutan STD patogen kod ispitanica sa HSIL je *Chlamydia trachomatis* koja je bila prisutna na grliću materice kod čak 81,8% pacijentkinja, dok su *Ureaplasma urealyticum* i *Trichomonas vaginalis* češće korelirali sa LSIL nalazom i to sa

učestalosti od 58,8% i 11,8%. Intervencije na grliću materice povećavaju rizik za nastanak HSIL promena dva puta. Upotreba kondoma predstavlja protektivni faktor koji smanjuje rizik za razvoj HSIL preko 5 puta, LSIL preko 4 puta i nastanak ASCUS oko 2 puta.

Zaključak: Sprovedenom studijom utvrđeno je da se kod pacijentkinja sa HR-HPV infekcijom u lezijama umerenog/teškog stepena javlja visoka produkcija TNF- α citokina, kao i da je dominantan genotip u ovim lezijama AA genotip. Takođe je utvrđeno da su kofaktori koji imaju uticaj na nastanak cervikalnog karcinoma kod žena sa HR-HPV infekcijom starosna dob, BMI, dužina pušačkog staža, multiparitet, prethodne i rekurentne infekcije, niži obrazovni status, iregularni menstrualni ciklusi i intervencije na grliću materice. Upotreba kondoma predstavlja protektivni faktor koji smanjuje rizik za razvoj cervikalne intraepitelijalne neoplazije svih stepena.

Ključne reči: HR-HPV, polimorfizmi, TNF- α , IFN- γ , IL-12, CIN, cervikalni karcinom

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK:

Cytokine genes polymorphisms of TNF- α , IFN- γ and IL-12 as potential predictors in the onset of cervical disease associated with HR-HPV infections

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common malignant tumor found in women worldwide. Infection with high risk onconegic HPV types plays a central role in the development of cervical precursor lesion and cervical cancer. In addition to HR-HPV infection, numerous cofactors are important for malignant cell transformation. The most important among theme are: host factors (genetic and immune factors), environmental and behavioral factors (multiparity, use of oral contraceptives, smoking, sexually transmitted infections, early sexual intercourse, promiscuity, poor socio-economic conditions and nutritional factors).

Aims: The aim of this study was to determinate the presence of HR-HPV infection in women that were previously divided into four groups (PAP II, ASCUS, LSIL, HSIL) based on cytological and colposcopic findings. In all HR-HPV positive women, it was also necessary to investigate the distribution of genotypes and allele of proinflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ and IL-12 and their effect on the development of a cervical illness associated with HR-HPV and also to determine which genotypes possess a protective or favoring significance for the development of cervical cancer. Further aims were to establish risk factors for the occurrence of cervical disease in all HR-HPV positive patients and to examine the association between this cofactors and constitutional gene polymorphisms of proinflammatory cytokines, as well as their common influence on the development of cervical carcinoma.

Material and methodology: This four year cross sectional study was conducted from 2014 to 2018 and included 541 patients. Colposcopic and cytological status was determined for each patients during the gynecological examination. Based on the cytological findings, all patients were classifeid into four groups: PAP II, ASCUS, LSIL, HSIL. To determinate the presence of HPV infection and single nucleotide polymorphism of TNF- α , IFN- γ and IL-12, cervical swab were taken from visible lesions on the ectocervix using cervical cytobras. Further procedure involved the isolation of the total DNA using a commercial DNA extraction kit. Detection and HPV

genotyping were performed using two methods, *in house* PCR for the L1 gene and the E1 for determining the presence of viruses in the samples and then sequencing method for HPV genotyping. Also, a part of the samples was genotyped using HPV high risk typing test. Isolation of DNA from the cervical smear to test polymorphisms of the cytokine gene was carried out using the appropriate columns. Analysis of TNF- α , IFN- γ and IL-12 polymorphism was performed using commercial TaqMan assays. Statistical analysis was performed using parametric and non-parametric tests and correlation and multiple regression analysis.

Results: From total of 541 patients, 84 (15,5%) were found HR-HPV positive. The most commonly isolated HR-HPV genotypes from cervical lesions were HPV-16, 45, 31, 52, 18, 53, 33, 58, 66, 35, 59, 62. The infection rate of HPV-16 was significantly higher in HSIL women. 16 of 17 HSIL patients (86,5%) also had infection with HPV-16. Significantly higher production of TNF- α was observed in severe dysplasia. The dominant genotype in these lesions is the AA genotype. The correlation between TNF- α gene polymorphism and cervical findings is highly significant. There is not a significant relationship between IFN- γ and IL-12 gene polymorphism and the onset of cervical intraepithelial neoplasia. There is a moderate, negative, significant correlation between IFN- γ gene polymorphism and earlier infections. There is a negative significant correlation between the polymorphism of the IL-12 gene and cervical lesion. Age increases the risk of developing HSIL by 3.5 times. BMI greater than 25 increases the opportunity for the development of LSIL and HSIL by 2-3 times. Long term smoking increase the risk for HSIL, while the number of cigarettes per day has no effect on the occurrence of HSIL. Lower educational level increases the risk of developing HSIL by 3 times. Irregular menstrual cycles increase the risk of developing HSIL by 1.7 times. Multiparity is associated with 5 times greater risk of developing severe cervical dysplasia. Previous and recurrent infections increase the risk of developing LSIL by 2 times. *Chlamydia trachomatis* is the most common STD presented pathogen in patient with HSIL with rate of 81,8%. *Ureaplasma urealiticum* and *Trichomonas vaginalis* are also frequently presented but in women with LSIL, with rate of 58,8% and 11,8%, respectively. Interventions on the cervix increase the risk of developing HSIL changes by 2 times. Condom use may reduce the risk for all degrees of cervical intraepithelial neoplasia.

Conclusion: Results of the study shows that HSIL lesions are associated with higher TNF- α production. The most dominant TNF- α genotype in this lesions is AA genotype. It also has been found that, in women with HR-HPV infection, following cofactors are important for development of cervical cancer: age, BMI, smoking, multiparity, previous and recurrent cervical and vaginal infections, lower socioeconomic status, irregular menstrual cycles and surgical procedures on the cervix. Condom use was found to have protective role in development of cervical changes.

Key words: polymorphism, TNF- α , IFN- γ , IL-12, HR-HPV infection, CIN, cervical cancer

Scientific field: Medicine

Specialised scientific field: Molecular medicine

UDK:

Sadržaj

1. Uvod

1.1. Otkriće povezanosti karcinoma grlića materice i HPV	1
1.2. Incidencija karcinoma grlića materice.....	3
1.3. Klasifikacija HPV	6
1.4. Molekularna filogenetika HPV	7
1.5. Morfološke i strukturne odlike HPV	10
1.6. Organizacija HPV genoma i životni ciklus HPV	10
1.7. Tumorski potencijal HPV i mehanizmi cervikalne kancerogeneze.....	14
1.7.1. Tumorski potencijal E6 gena.....	14
1.7.2. Tumorski potencijal E7 gena.....	18
1.7.3. Tumorski potencijal E5 gena.....	21
1.8. Patogeneza genitalne HR-HPV infekcije i povezanost sa nastankom karcinoma grlića materice	22
1.9. Imunski odgovor u toku cervikalne HPV infekcije	25
1.10. Polimorfizmi gena proinflatornih citokina TNF- α ,IFN- γ i IL-12 i njihova uloga u nastanku cervikalne bolesti udružene sa HR- HPV	29
1.11. Kofaktori rizika za nastanak i progresiju cervikalne bolesti udružene sa HR- HPV.....	33
1.12. Prevencija i terapija HPV infekcije	37
1.12.1. <i>Screening</i> programi za rano otkrivanje cervikalne HR-HPV infekcije.....	40
1.12.2. Preventabilne vakcine i vakcinalni programi za sprečavanje nastanka genitalne HPV infekcije	44
1.12.3. Terapijske vakcine	47

2. Ciljevi istraživanja 49

3. Materijal i metodologija..... 51

3.1. Materijal.....	52
3.1.1. Pacijenti	52
3.1.2. Pacijentkinje i njihove karakteristike	52
3.1.3. Klinički uzorci.....	52
3.2. Metodologija	53
3.2.1. Izolovanje virusne DNK za virusološko testiranje HPV.....	53
3.2.2. Dokazivanje HPV DNK PCR metodom	55
3.2.2.1. HPV PCR za L1 gen	55
3.2.2.2. HPV PCR za E1 gen	56

	Uvod
3.3.2.3. Vizualizacija PCR produkata metodom elektroforeze	57
3.2.3. Genotipizacija HPV DNK metodom DNK sekvenciranja L1 i E1 gena.....	58
3.2.3.1. HPV sekvenciranje L1 gena	59
3.2.3.2. HPV sekvenciranje E1 gena	60
3.2.3.3. Analiza HPV DNK L1 i E1 sekvenci.....	61
3.2.4. Genotipizacija HR-HPV komercijanim testom - Sacacce.....	62
3.2.5. Dokazivanje polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12B.....	64
3.2.5.1. Izolacija DNK iz uzoraka krvi za dokazivanje genskog profila	64
3.2.5.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK	65
3.2.5.3. Detekcija i analiza polimorfizama gena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (<i>Real-time PCR</i>)	65
3.2.6. Statistička obrada.....	67
4. Rezultati.....	68
4.1. Demografske karakteristike pacijentkinja.....	70
4.2. Distribucija HR-HPV genotipova i njihova korelacija sa citološkim i kolposkopskim nalazom	71
4.3. Polimorfizmi gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12.....	75
4.3.1. Raspodele i korelacije genotipova-polimorfizama	75
4.4. Utvrđivanje i ispitivanje kofaktora rizika za nastanak cervikalne bolesti.....	78
4.5. Koinfekcije i njihova raspodela prema citološkom statusu	86
4.6. Povezanost kolposkopskog i citološkog nalaza kod pacijentkinja sa HR-HPV infekcijom	87
4.7. Korelacije između kofaktora i genskih polimorfizama proinflamatornih citokina i njihov zajednički uticaj na nastanak cervikalnog karcinoma	89
4.7.1. Modeli (jednačine procene rizika) za visoko rizične polimorfizme	92
4.8. Provera usaglašenosti 2 metode za HPV tipizaciju	94
5. Diskusija	96
6. Zaključci.....	117
7. Literatura	121

1. Uvod

1.1. Otkriće povezanosti karcinoma grlića materice i HPV

Današnje poznavanje humanih papiloma virusa (*Human papillomavirus* - HPV) nastalo je kao rezultat brojnih istraživanja i eksperimenata koji su vršeni u prošlosti. Period od kada su prvi put opisani pa sve do danas može grubo biti podeljen na dva dela. Prvi, koga sačinjavaju istraživanja sprovedena na životinjama koja su trajala sve do prve polovine XX veka i drugi, koji predstavlja period nakon 1970. godine kada raste svest o značaju HPV kao uzročnika tumorskih promena kod čoveka i kada se sprovode brojna istraživanja kojima je precizno definisan maligni potencijal ovih virusa.

Genitalne bradavice prvi put se spominju za vreme Hipokrata. U tom periodu terminom kondilomi opisivane su "kružne otekline u predelu anusa". Do kraja XIX veka ustalio se termin *condyloma accuminatum* (šiljasti kondilomi). Promene su povezivane sa seksualnim kontaktom i bile naročito izražene među homoseksualcima (Oriol, 1989).

Iako su lekarima bile poznate još od davnina, interesovanje za ove promene počinje da raste sredinom XIX veka kada italijanski lekar Rigoni Stern objavljuje izveštaj u kome su analizirani smrtni slučajevi nastali kao posledica karcinoma u periodu od 1760-1839. Stern je primetio da se karcinom uterusa češće javlja kod udatih žena i udovica u odnosu na mlade, nevine devojke i monahinje. Tako su prvi put dovedeni u vezu cervikalni karcinom i seksualni kontakt (Rigoni Stern, 1982).

Njegovo zapažanje nakratko je privuklo pažnju stručnjaka tog doba, ali trebalo je da prođe još pola veka da infektivna priroda kožnih bradavica bude potvrđena od strane Payne i Jadassohn-a i još 10 godina da se potvrdi i infektivna priroda genitalnih bradavica. Virusna etiologija bradavica potvrđena je 1907. godine od strane Ciufa koji je iskoristio nećelijski infiltrat dobijen iz promena na koži kako bi izvršio transmisiju oboljenja (Ciufu, 1907). Nakon toga virusna etiologija pripisana je i genitalnim i laringealnim bradavicama, a 1949. godine pomoću elektronske mikroskopije dokazano je i prisustvo virusnih partikula u tkivu bradavica (Strauss i sar., 1949). Zbog velike strukturne sličnosti između virusa iz kožnih i genitalnih lezija smatrano je da su oba tipa bradavica uzrokovana istim tipom virusa koji je svrstan u familiju Humanih Papova virusa.

Razvoj molekularnih tehnika probudio je ponovno interesovanje za HPV. Tokom 1965. godine prvi put je određena struktura i molekulska težina DNK papiloma virusa iz kutanih lezija, a krajem 60-ih godina utvrđena je i prikazana DNK struktura virusa iz genitalnih bradavica (Dunn i Ogilvie, 1968). Dalji razvoj molekularnih tehnika utvrdio je povezanost HPV i cervikalnog karcinoma.

Nakon 1970. godine usledila su brojna istraživanja koja su pokušala da dovedu u vezu nastanak karcinoma grlića materice sa HPV. Najviše inovacija i zasluga na ovom polju pripalo je nemačkom naučniku Haraldur zur Hausenu koji je pokazao da je HPV etiološki faktor za nastanak cervikalnog karcinoma (Zur Hausen i sar., 1975). Takođe, on je zajedno sa svojim saradnicima utvrdio heterogenost HPV i iz kutanih promena izolovao četiri nova tipa virusa (HPV 1 - 4) (Gissman i sar., 1977). Njegove hipoteze potvrđene su kroz serološka ispitivanja koja su ukazala na postojanje različitih tipova HPV.

Dalji klinički napredak napravljen je otkrivanjem koilocita u epitelnim lezijama za koje se smatralo da su povezane sa cervikalnim prekanceroznim promenama (Purola i Savia, 1977). U ovim ćelijama je nekoliko godina kasnije, pomoću elektronske mikroskopije, dokazano prisustvo virusnih partikula HPV, pa je tako postalo jasno da epitelne lezije predstavljaju manifestaciju infekcije HPV (Della Tore i sar., 1978).

Tokom 70-ih i 80-ih godina XX veka izolovani su novi tipovi HPV što je uslovalo nastanak prve klasifikacije. Southern blot hibridizacijom i uz korišćenje HPV-11 DNK kao specifične probe iz biopata cervikalnog karcinoma izolovani su HPV-16 (Durst i sar., 1983) i HPV-18 (Boshart i sar., 1984). Ovih partikula nije bilo u benignim genitalnim promenama što je jasno ukazalo na povezanost ovih tipova HPV sa razvojem malignih skvamoznih lezija. U godinama koje su usledile rađena su brojna istraživanja koja su pomogla u boljem razumevanju uticaja HPV na razvoj malignih promena.

Tokom 1985. ustanovljeno je da prilikom integracije virusne DNK u hromozomdomaćina dolazi do selektivne transkripcije E6 i E7 gena, kao i specifične delecije. Napredak u razumevanju ćelijske transformacije indukovane virusom napravljen je utvrđivanjem interakcije E6 gena sa p53 genom, koja je dovela do degradacije proteina koji je produkt ovog gena, kao i do reakcija E7 sa pRb

(*Rethinoblastoma protein* - pRb), što je blokiralo funkciju ovog gena. Ovi intraćelijski događaji sledstveno su vodili do imortalizacije i pojave transformisanog fenotipa koji sadrži virusni genom (Zur Hausen, 2009).

Ćelijska transformacija nastala kao posledica dejstva ovih onkogenih pokazana je na ćelijama glodara 1986. a godinu dana kasnije i na humanim keratinocitima. Globalne epidemiološke studije identifikovale su HPV-16 i HPV-18 kao najveće faktore rizika za cervikalni karcinom. Dalja dostignuća odigravala su se na polju razumevanja intracelularnih i ekstracelularnih puteva zaslužnih za malignu transformaciju, ulogu ekspresije virusnih onkoproteina u održavanju malignog fenotipa, imunskog odgovora u toku HPV infekcije i razvoja HPV vakcina (Zur Hausen, 2009).

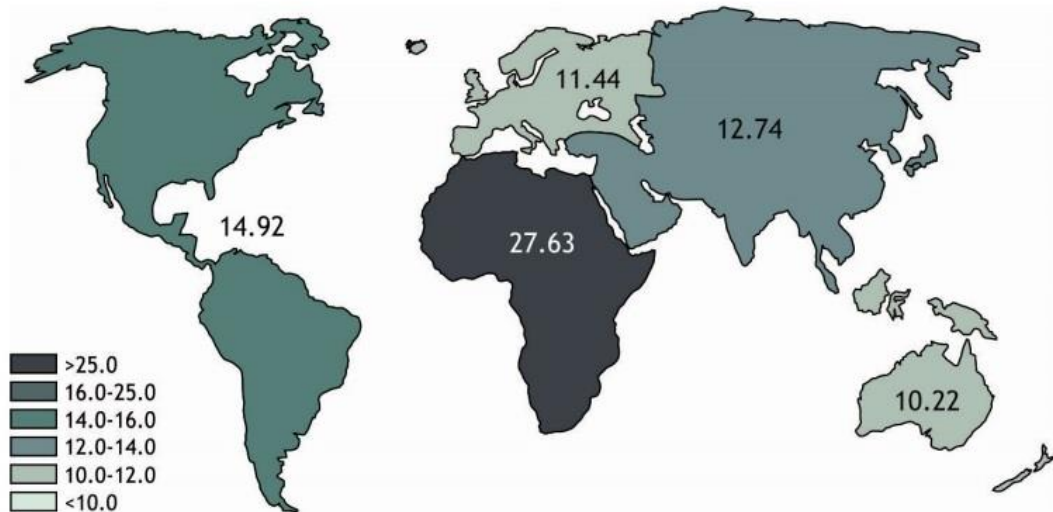
Danas se sa sigurnošću zna da infekcije specifičnim tipovima HPV prouzrokuju cervikalni karcinom. Dugotrajne studije koje prate žene vakcinisane protiv visokorizičnih tipova HPV trebalo bi da pruže bolje i preciznije podatke o razvoju karcinoma. Kako je cervikalni karcinom jedan od najčešćih maligniteta među ženama, specifični tipovi HPV predstavljaju jedan od najvažnijih kancerogena u humanoj medicini.

1.2. Incidencija karcinoma grlića materice

Karcinom grlića materice predstavlja četvrti po učestalosti maligni tumor kod žena. Tokom 2012. godine u svetu je registrovano 530 000 novoobolelih slučajeva, a standardizovana stopa incidencije iznosila je 14/100 000 žena (Ferlay i sar., 2015).

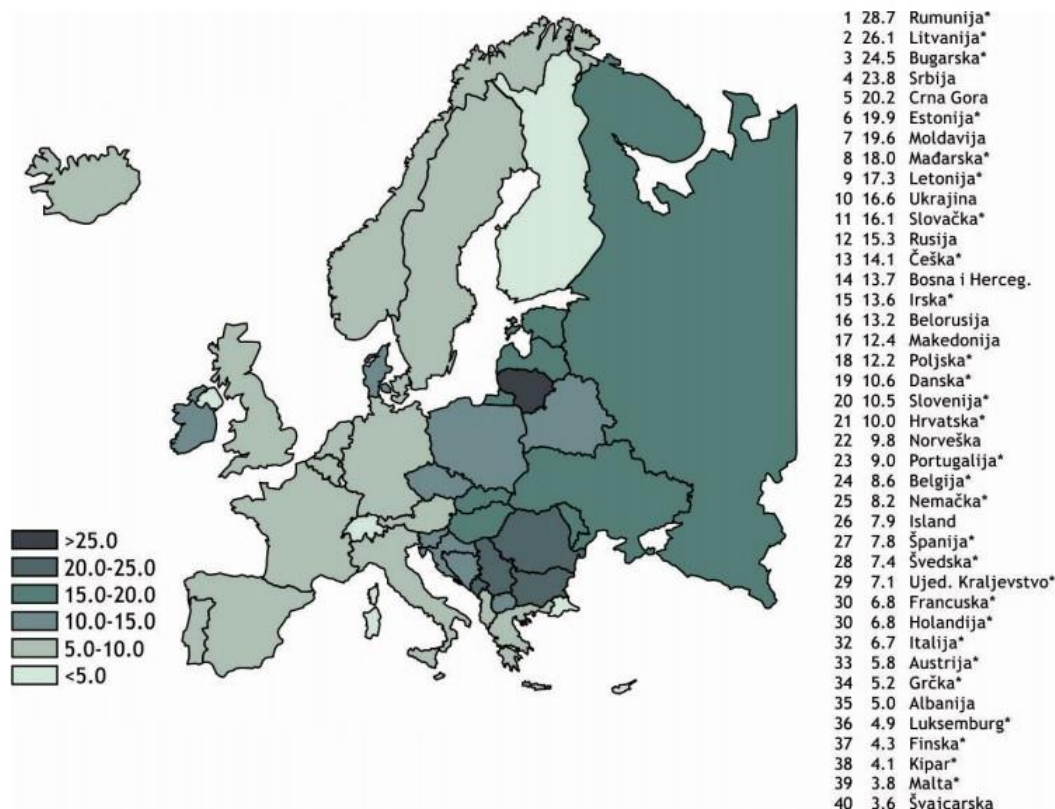
Stope incidencije značajno variraju među zemljama širom sveta (slika 1). Najveći procenat obolelih (> 85%) registrovan je u slabo razvijenim zemljama (Vaccarella i sar., 2017). Najviše stope incidencije od cervikalnog karcinoma registrovane su u Subsaharskim delovima Afrike, Jugoistočnoj Aziji, Latinskoj Americi, Karibima i Centralnoj i Istočnoj Evropi. Tokom 2012. godine najveće stope incidencije od cervikalnog karcinoma zabeležene su u sledećih pet zemalja: Indija (122 844 novoobolelih), Kina (61 619), Indonezija (20 928), Brazil (18 503) i Rusija (15 342) (Momenimovahed i sar., 2017). Visina standardizovanih stopa incidencije varirala je od 8,5/100 000 žena u razvijenim zemljama, do 25,7/100 000 žena, koliko je registrovano u nerazvijenim zemljama sveta. Opadajući trend stopa incidencije od karcinoma grlića

materice zabeležen je u najvećim delovima Evrope, Južne i Severne Amerike i Okeanije, kao i u nekim azijskim zemljama poput Japana, Kine i Indije (Vaccarella i sar., 2013).



Slika 1. Standardizovana stopa incidencije cervikalnog karcinoma u svetu za 2012. godinu (Vukićević i sar., 2015)

U Evropi, najveća učestalost karcinoma zabeležena je u Rumuniji (28,7/100 000 žena) (slika 2). Nakon Rumunije, visoke stope incidencije zabeležene su i u Litvaniji i Bugarskoj, dok je u 2012. Srbija bila četvrta u Evropi sa stopom incidencije koja je iznosila 23,8/100 000 žena (Miljuš i sar., 2017).



Slika 2. Standardizovane stope incidencije cervikalnog karcinoma u Evropi za 2012. godinu (Vukićević i sar., 2015)

Prema novijim podacima iz 2015. godine cervikalni karcinom bio je četvrti po učestalosti malignitet u Republici Srbiji sa nešto nižom standardizovanom stopom incidencije koja je izosila 23,5/100 000 žena. Podaci Registra za rak za centralnu Srbiju pokazuju da su stope incidencije po regionima bile najveće u Zaječarskom (62,3/100 000 žena) i Borskom okrugu (49,6/100 000 žena), dok su najniže zabeležene u Zlatiborskom (17,9/100 000 žena) i Raškom okrugu (19,4/100 000 žena) (Miljuš i sar., 2017).

Tokom 2015. godine u Republici Srbiji registrovano je 777 novoobolelih, a cervikalni karcinom bio je najzastupljeniji između 45. i 65. godine života. Stope incidencije do 35. godine života su niže i iznose 10,2/100 000 žena, kada dolazi do naglog porasta, pa se nakon 35. godine života stope incidencije kreću između 35,7/100 000 i 57,5/100 000 žena. Najveće stope incidencije zabeležene su u starosnoj dobi između 60 i 64 godine (57,5/100 000) (Miljuš i sar., 2017).

Značajne varijacije u stopama incidencije koje postoje širom sveta objašnjavaju se razlikama u sprovođenju skrining programa, mogućnostima za sprovođenje efikasne prevencije i visokom prevalencijom HPV u određenim regionima (Torre i sar., 2016; Vaccarella i sar., 2013). U visoko razvijenim zemljama u kojima se skrining programi sprovode godinama unazad, stopa incidencije karcinoma grlića materice smanjena je za 4% godišnje, odnosno za 70% od početka sprovođenja programa. Stope incidencije održavaju se u zemljama u kojima se skrining uopšte ne sprovodi ili se sprovodi neadekvatno, kao i u onim zemljama u kojima je obuhvat stanovništva mali (Torre i sar., 2016). Vakcinacija protiv HPV se već nekoliko godina koristi u cilju smanjenja stopa incidencije karcinoma grlića materice, pa ipak, ovaj efikasni metod prevencije ostaje nedostupan u nerazvijenim zemljama zbog visokih troškova vakcinacije (Gonçalves i sar., 2014). Varijacije nastaju i kao posledica nedostatka resursa, nedovoljne obučenosti medicinskog osoblja za sprovođenje skrininga i neostupnosti zdravstvene nege (Akinyemiju i sar., 2016). Na stope incidencije karcinoma grlića materice značajno utiču i stope prevalencije HPV, pa se tako najveći broj inficiranih ovim virusom beleži u Africi i Latinskoj Americi, odnosno u onim zemljama u kojima je i učestalost cervikalnog karcinoma velika (Bruni i sar., 2010).

1.3. Klasifikacija HPV

Prva klasifikacija HPV izvršena je krajem 70-ih godina prošlog veka. Sličnosti koje su tada uočene između papiloma i polioma virusa uslovile su njihovo spajanje u jednu familiju - *Papovaviridae*. Odlike ove familije bile su dvolančana DNK, ikozaedarni kapsid građen od 72 kapsomere, virion bez omotača i jedro u kome su se odvijale replikacija virusa i sklapanje viriona. Međutim, kasnija ispitivanja i sekvenciranje genoma pokazali su da među ovim virusima postoje i značajne razlike. One se prvenstveno odnose na homologiju nukleinskih i aminokiselinskih sekvenci, veličinu genoma (genom papiloma virusa sadrži 8000 bp, dok je genom polioma virusa manji i sadrži 5000 bp), razlike u broju otvorenih okvira čitanja (*Open Reading Frames* – ORF) (papiloma virusi poseduju više ORF i kodiraju veći broj proteina) i načinu replikacije (geni papiloma virusa prepisuju se sa jednog lanca, dok se geni polioma virusa prepisuju i sa komplementarnog lanca) (Bernard, 2005). Postojanje ovih razlika uslovalo je reviziju prvobitne klasifikacije 2004. godine i razdvajanje familije

Papovaviridae na dve posebne familije - familiju *Poliomaviridae* i familiju *Papillomaviridae* (de Viliers i sar., 2004).

1.4. Molekularna filogenetika HPV

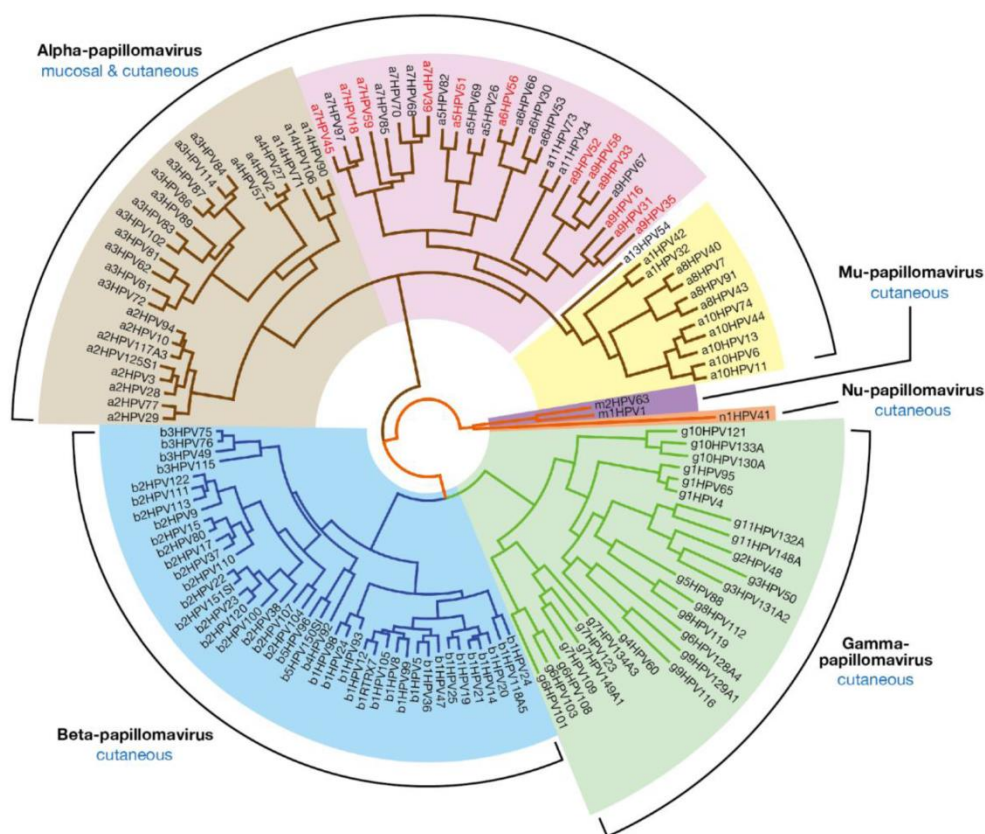
Od trenutka kada su prvi put izolovani, pa sve do danas, prisustvo papiloma virusa dokazano je u ćelijama sisara i ptica, a najbolje proučeni su papiloma virusi izolovani iz humanih ćelija. Do sada je izolovano najmanje 200 tipova HPV, dok je kod životinja izolovano približno 60 tipova papiloma virusa (Doobar i sar., 2012).

Tipovi papiloma virusa označavaju se brojevima, po redosledu njihovog otkrivanja (HPV-1, HPV-2). Oni genotipovi čiji su genomi identifikovani samo na osnovu PCR metode (*Polymerase chain reaction* - PCR) označavaju se prefiksom "cand" - kandidat (candHPV-90) (de Viliers i sar., 2004).

Tradicionalna klasifikacija izvršila je podelu papiloma virusa na tipove oslanjajući se na njihovu specifičnost za pojedine vrste. Zahvaljujući komparativnoj homologiji L1 gena izvršena je i filogenetska organizacija, jer papiloma virusi, bez obzira na sličnu organizaciju genoma, mogu pokazivati razliku od preko 40% među divergentnim sekvencama L1.

Aktuelna klasifikacija, predložena od strane Međunarodnog Komiteta za Taksonomiju virusa deli papiloma viruse na pet kategorija: rod (*genus*), vrstu (*species*), tip, podtip i varijantu (Bernard, 2005).

Rod predstavlja najširu kategoriju klasifikacije. Na osnovu homologije nukleotidne sekvence genoma, papiloma virusi klasifikovani su u 53 roda koja se označavaju slovima grčke abecede. HPV svrstani su u pet rodova (*Alpha - papillomavirus*, *Beta - papillomavirus*, *Gama - papillomavirus*, *Mu - papillomavirus*, *Nu - papillomavirus*), a za humanu medicinu najznačajniji su *Alpha - papillomavirus* i *Beta - papillomavirus*. Do danas je identifikovano više od 200 HPV tipova koji imaju od 71% do 90% sličnosti u nukleotidnoj sekvenci genoma (ICTV, 2018).



Slika 3. Rodovi HPV (Doobar i sar., 2012)

Unutar jedne vrste sličnost sekvence iznosi između 60% i 70%, dok je unutar jednog tipa sličnost 71% do 89%. Za određeni tip definisani su i podtipovi koji imaju između 90% i 98% sličnosti (Howley i sar., 2013). Na osnovu ovih kriterijuma utvrđeno je da HPV-64 predstavlja podtip HPV-34, a HPV-46 podtip HPV-20 (de Viliers i sar., 2004).

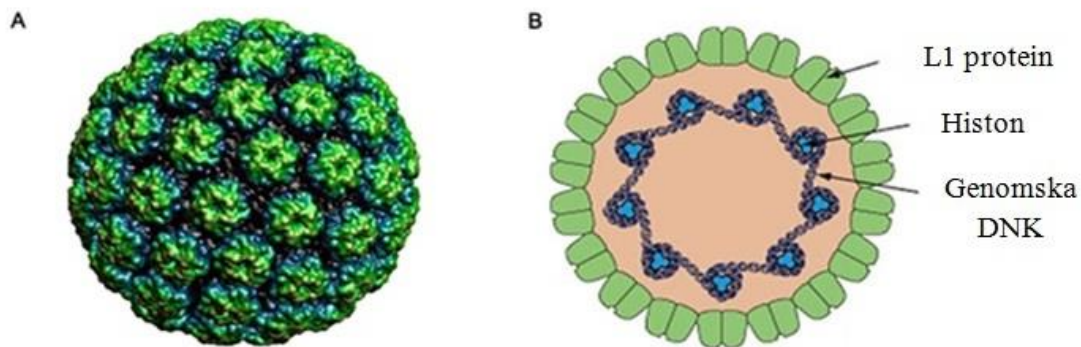
Varijante HPV pokazuju sličnost sekvenci L1 gena od preko 98%. Dalja klasifikacija varijanti izvršena je na linije (*lineage*), ukoliko razlike u sekvenci L1 gena iznose 1% i podlinije (*sublineage*), ukoliko su razlike između 0,5% i 1% (Kukimoto i Muramatsu, 2015). Određivanje varijanti omogućeno je poređenjem segmenata HPV genoma izolata sa referentnim genomom. Ukoliko između ova dva genoma postoji razlika od najmanje jednog nukleotida izolat se proglašava varijantom (Bernard, 2010).

Tabela 1. Klasifikacija HPV

Rod	Vrsta	Tipovi
<i>Alpha-papillomavirus</i>	1	HPV-32, HPV-42
	2	HPV-10, HPV-3, HPV-28, HPV-29, HPV-78, HPV-94
	3	HPV-61, HPV-72, HPV-81, HPV-83, HPV-84, candHPV-62, candHPV-86, candHPV-87 candHPV-89
	4	HPV-2, HPV-27, HPV-57
	5	HPV-26, HPV-51, HPV-69, HPV-82
	6	HPV-53, HPV-30, HPV-56, HPV-66
	7	HPV-18, HPV-39, HPV-45, HPV-59, HPV-68, HPV-70
	8	HPV-7, HPV-40, HPV-43, candHPV-91
	9	HPV-16, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-59, HPV-67
	10	HPV-6, HPV-11, HPV-13, HPV-44, HPV-74
	11	HPV-34, HPV-73
	12	RhPV1
	13	HPV-54
	14	candHPV-90
	15	HPV-71
<i>Beta-papillomavirus</i>	1	HPV-5, HPV-36, HPV-47, HPV-93
	2	HPV-9, HPV-15, HPV-17, HPV-22, HPV-23, HPV-37, HPV-38, HPV-80
	3	HPV-49, HPV-75, HPV-76
	4	candHPV-92
	5	candHPV-96
<i>Gama-papillomavirus</i>	1	HPV-4, HPV-65, HPV-95
	2	HPV-48
	3	HPV-50
	4	HPV-60
	5	HPV-88
<i>Mu-papillomavirus</i>	1	HPV-1
	2	HPV-63
<i>Nu-papillomavirus</i>	1	HPV-41

1.5. Morfološke i strukturne odlike HPV

Papiloma virusi su mali, sferični virusi čiji dijametar iznosi 52 - 55 nm. Virusne čestice imaju ikozaedarnu simetriju i ne poseduju omotač. Nasledni materijal ovih virusa predstavlja jedan molekul cirkularne, dvolančane DNK koji se sastoji od približno 8000 baznih parova (bp) i koji je vezan za ćelijske histone. DNK je sadržana u proteinskom kapsidu građenom od 72 pentamerne kapsomere. Kapsid sadrži dva strukturna proteina: kasni (*late* - L) L1 protein koji čini 80% mase celokupnog strukturnog proteina i čija težina iznosi 55kDa i L2 protein molekulske težine 72 kDa. Oba proteina kodirana su od strane virusne DNK. Svaka kapsomera sastoji se iz pet molekula L1 proteina i jednog molekula L2 proteina. Kao produkt ekspresije L1 proteina, samog ili u kombinaciji sa L2 proteinom, nastaju virusu slične partikule (*virus like particles* - VLPs). Intaktni virion ima denzitet od 1,34 g/ml u cezijum hloridu i sedimentacioni koeficijent 300 (Knipe i Howley, 2013).



Slika 4. Struktura HPV. A) 3D prikaz; B) Shematski prikaz HPV čestice (Santos Lopez i sar., 2015)

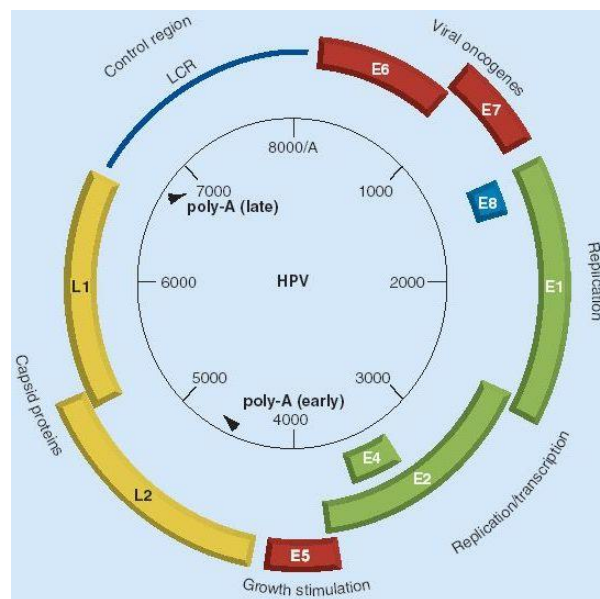
1.6. Organizacija HPV genoma i životni ciklus HPV

Različiti tipovi HPV odlikuju se genomima koji međusobno pokazuju visok stepen sličnosti. Jedna od zajedničkih karakteristika genoma papiloma virusa je da se svi ORF nalaze na jednom lancu virusne DNK. Kodirajući lanac sa koga se prepisuju geni može sadržati do deset ORF.

Genom HPV u funkcionalnom smislu podeljen je na tri dela:

1. rani region (*early* - E) koji kodira proteine E1 - E7
2. kasni region (*late* - L) koji kodira strukturne proteine L1 i L2
3. dugi kontrolni region (*long control region* - LCR) ili uzvodni regulatorni region

Za razliku od prva dva regiona, LCR region ne sadrži ORF, ali poseduje *cis* elemente neophodne za virusnu replikaciju i transkripciju.



Slika 5. Struktura HPV genoma (Kroupis i Vourlidis, 2011)

Rani okviri čitanja prepisuju se u onim ćelijama koje su inficirane, ali koje još uvek ne proizvode viruse. Kod većine HPV razlikuje se šest ranih gena označenih kao E1, E2, E4, E5, E6, E7, dok samo HPV 6b sadrži i rani gen E8 koji je ujedno i odlika goveđih papiloma virusa. Proteini koji se kodiraju od strane ovih gena učestvuju u virusnoj replikaciji i transformaciji ćelije. E1 i E2 proteini vezuju se za LCR region i imaju ulogu u započinjanju sinteze virusne DNK. Osim toga, E2 protein funkcioniše i kao glavni regulatorni protein transkripcije virusne DNK. E4 protein uključen je u kasnu fazu životnog ciklusa virusa i omogućava izlazak virusnih čestica iz ćelije. Smatra se da E5 protein svoju ulogu ostvaruje i tokom rane i tokom kasne faze životnog ciklusa virusa. Iako njegova uloga nije precizno definisana, istraživanja pokazuju da ovaj protein vrši stimulaciju sinteze ćelijske DNK, kao i da dovodi do povećanja ekspresije receptora za faktore stimulacije rasta. E6 i E7 proteini omogućavaju malignu

transformaciju inficiranih ćelija i njihovu imortalizaciju. Produkt E6 gena vezuje se za Rb protein uzrokujući njegovu proteolizu, dok E7 protein dovodi do degradacije p53 proteina (Leto i sar., 2011; Howley i sar., 2013).

Kasni region kodira strukturne proteine L1 i L2 koji su neophodni za stabilnost viriona. Ekspresija ovih proteina odvija se samo u onim ćelijama koje proizvode viruse.

Papiloma virusi su visoko epiteliotropni virusi koji inficiraju ćelije kože, anogenitalne regije i sluzokožu usne duplje. Životni ciklus virusa uslovljen je diferencijacijom inficiranih epitelnih ćelija i njihovom migracijom od bazalnog ka površnom sloju epitela. HPV genomi ne kodiraju polimeraze i enzime neophodne za virusnu replikaciju već su zavisni od replikatornih proteina ćelija domaćina koji posreduju u sintezi virusne DNK (Moody i Laimins, 2010).

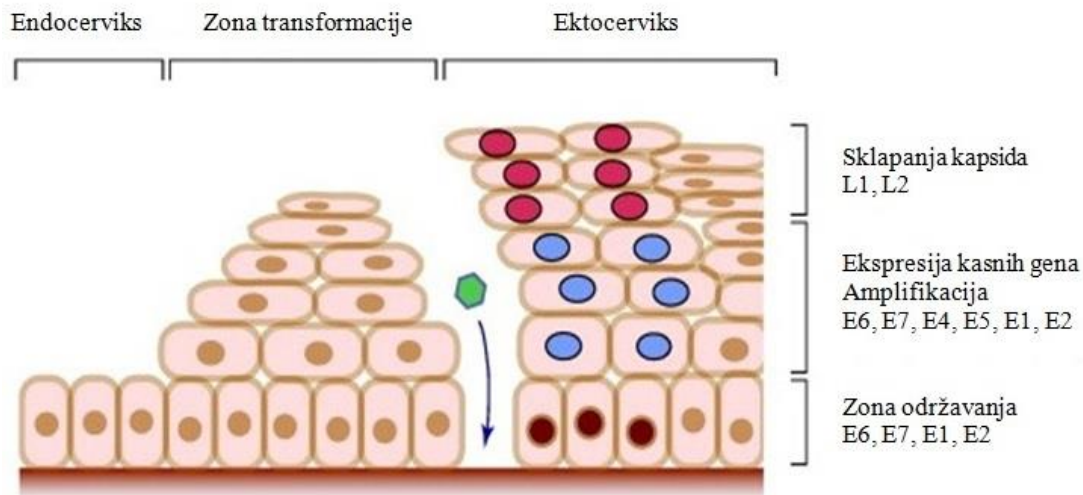
HPV dospeva u bazalne ćelije kroz mikrotraume na površini epitela i tu započinje svoj životni ciklus. Smatra se da je ulazak virusa u ćelije omogućen vezivanjem za receptore koji se nalaze na površini ćelije, međutim, specifični receptor za HPV još uvek nije identifikovan. Istraživanja pokazuju da $\alpha 6$ integrin može imati ulogu u adsorpciji HPV virusa i da ovaj integrinski kompleks pokazuje najveći stepen vezivanja HPV (Yoon i sar., 2001). Druge studije, pak, pokazuju da prisustvo $\alpha 6$ integrina nije neophodno za ulazak virusa u ćelije, kao i da se HPV može vezati za heparin i glikozaminoglikane na površini ćelije (Doorbar i Quint, 2012).

U inficiranim bazalnim ćelijama virusni genom smešten je izvan ćelijske DNK i održava se u vidu epizoma. Zahvaljujući replikatornim mehanizmima ćelije domaćina genom se umnožava na 50 do 100 kopija replikujući se samo jednom u toku ćelijske deobe. U ovom periodu ekspresija ranih gena je na niskom nivou i prvenstveno se proizvode E1, E2, E6 i E7 proteini. Uloga E1 i E2 proteina ogleda se u održavanju epizomalne DNK i regulaciji njene replikacije (Doorbar i Quint, 2012), dok produkcija E6 i E7 proteina ima za cilj modifikaciju ćelije domaćina, diferencijaciju inficiranih ćelija u keratinocite i stvaranje okoline koja će biti pogodna za dalju replikaciju virusa. E6 i E7 proteini takođe sprečavaju apoptozu ćelije koja bi nastala kao posledica razmnožavanja virusnog genoma (Yugawa i Kiyonto, 2009). U bazalnom sloju se odvija i stimulacija ćelijske deobe i povećanje koncentracije mitogenih faktora pod uticajem

E5 proteina. Deobom bazalnih ćelija nastaju dve ćerke ćelije, od kojih jedna postaje nova bazalna ćelija, dok druga migrira u više slojeve epitela gde započinje dalju diferencijaciju.

Aktivnost ćelijskih faktora u toku diferencijacije ćelija podstiče pojačanu replikaciju virusnog genoma i ekspresiju ranih gena, pa se u središnjim slojevima epitela vrši intenzivno umnožavanje virusnog genoma i sinteza svih ranih proteina. U diferentovanim ćelijama epitela dolazi do transformacije epizoma u vegetativnu DNK. Mehanizam ove transformacije za sada je nepoznat, ali se smatra da dominantna ekspresija E1 i E2 gena ima ulogu u započinjanju replikacije virusne DNK. Vezivanje E2 proteina za LCR dovodi do usmeravanja E1 proteina ka početnom mestu replikacije. Na taj način se na inicijalnom mestu stvara E1:E2 kompleks, a dalja replikacija virusa odvija se nezavisno od deobe ćelije. Odvajanju E2 proteina iz ovog kompleksa dovodi do distorzije DNK i olakšanog pristupa ćelijskih faktora koji nastavljaju replikaciju (Doorbar i Quint, 2012).

U površnim slojevima epitela dominira ekspresija kasnih gena i pojačano se sintetišu L1 i L2 proteini. Mehanizam sklapanja viriona još uvek nije u potpunosti poznat. Brojna istraživanja pokazuju da se sklapanje viriona odvija spontano, pri čemu prvo dolazi do spajanja L1 proteina i obrazovanja pentamernih kapsomera, a potom se pomoću L2 proteina obrazuje ikozaedarni kapsid od 72 kapsomere. U površnom sloju dolazi i do pojačane ekspresije E4 gena. Produkt ovog gena vezuje se za citokselet, uzrokuje njegov kolaps i tako omogućava raspadanje ćelije i izlazak virusa (Pindis i sar., 2015).



Slika 6. Životni ciklus HPV u cervikalnom epitelu (Bodily i Lemins, 2011)

1.7. Tumorski potencijal HPV i mehanizmi cervikalne kancerogeneze

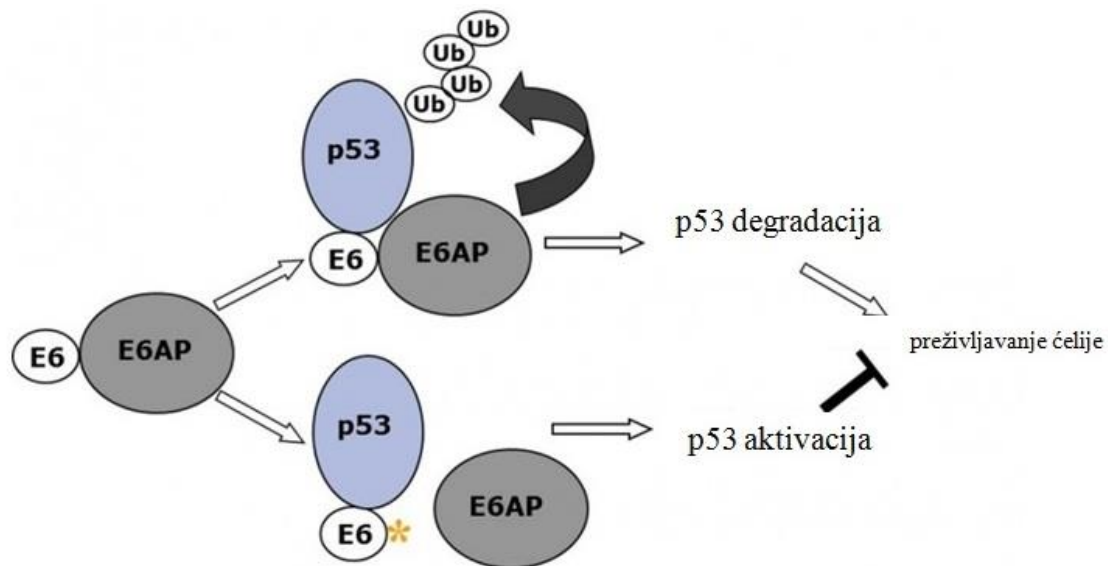
HPV u ćelijama cervikalnog epitela indukuje ćelijsku deobu podstičući ujedno na taj način i replikaciju virusa a tokom infekcije određenim HPV tipovima dolazi do gubitka kontrole proliferacije i diferencijacije što uzrokuje ćelijsku transformaciju i malignu alteraciju ćelije. Pokazano je da tumorski potencijal imaju E6 i E7 HPV geni, kao i da imortalizaciju cervikalnih ćelija mogu da izazivaju samo visokoonkogeni tipovi HPV (*high risk HPV* - HR-HPV). Osim ova dva gena, onkogeni potencijal i uloga u malignoj transformaciji ćelije pripisuje se i E5 genu (Howley i sar., 2013).

1.7.1. Tumorski potencijal E6 gena

Protein E6 građen je od oko 150 aminokiselina, a na njegovim krajevima nalaze se *cys* domeni koji vezuju cink i koji se označavaju kao "cink prsti". Terminalni C kraj E6 proteina sadrži S/TXV regiju kojom se ovaj protein vezuje za PDZ domen brojnih ćelijskih proteina. Svoje dejstvo E6 protein prvenstveno ostvaruje vezivanjem za tumor supresorski protein p53.

p53 je ćelijski protein koji se u zdravim ćelijama nalazi u niskim koncentracijama i koji se u određenim uslovima razlaže posredstvom mdm-2 ubikvitin ligaze. Tokom virusnih infekcija ili oštećenja DNK razgradnja p53 proteina je inhibirana, a njegova koncentracija i posttranslacijska aktivacija se povećavaju. Aktiviran p53 protein učestvuje u reparaciji DNK i zaustavljanju ćelijskog ciklusa, a u slučajevima

ireverzibilnih oštećenja ćelije pokreće njenu apoptozu. Vezivanjem E6 proteina za p53 indukuje se njegova degradacija. Razgradnja je omogućena vezivanjem E6 proteina za E6-AP proteinski kompleks (*E6 associated protein* - E6-AP), a potom za p53, nakon čega dolazi do ubikvitinacije p53 proteina i njegove razgradnje posredstvom 26S ćelijskih proteozoma (Howley i sar., 2013).



Slika 7. Degradacija p53 proteina (Ruttkay-Nedecky i sar., 2013)

Pored toga što indukuje degradaciju p53 proteina, E6 protein svoje dejstvo ostvaruje i kroz nekoliko dodatnih mehanizama (Fernandes i sar, 2012) :

- inhibicijom vezivanja p53 proteina za specifičnu sekvencu DNK,
- inhibicijom acetilacije p53 proteina,
- inhibicijom aktivacije p53 proteina blokiranjem p14/ARF puta.

E6 protein svoj onkogeni potencijal ispoljava vezivanjem i za brojne druge ćelijske proteine. Među njima su najznačajniji p300, *myc* protein, interferon regulatorni faktor 3 (*interferon regulatory* - IRF3), autokrini faktor motiliteta (*autocrine motility factor 1* - AMF-1/gPS2), proteinski faktori koji posreduju u adheziji i elementima citoskeleta (paksilin), hTERT (*human telomerase reverse transcriptase* - hTERT), produkti proapoptotskih gena Bcl2 i Bak, faktori replikacije i faktori koji učestvuju u reparaciji DNK, kao i brojni drugi (Fernandes i sar, 2012).

Proteini p300 i hADA3 (histonska acetilaza) predstavljaju ćelijske proteine koji učestvuju u acilaciji p53 proteina. Acetilisani p53 protein podstiče transkripciju p53 gena tako što ispoljava veći afinitet za vezivanje za DNK sekvence na kojima je lociran promotor za p53 gen. Vezivanjem E6 proteina za p300 inhibira se acilacija p53 proteina i smanjuje ekspresija p53 gena (Zimmermann i sar., 2000), dok se vezivanjem za hADA3 indukuje razgradnja ovog proteina i tako sprečava acilacija p53 (Kumar i sar., 2002).

Transformacija zdravih u maligne ćelije dovodi do povećanja koncentracije p53 proteina i njegove aktivacije posredstvom p14/ARF signalnog puta. Vezivanjem E6 proteina za ARF protein blokira se njegova aktivacija kao i aktivacija p53 proteina što omogućava opstanak malignih ćelija (Shamanin i sar., 2008).

Kao posledica blokade ili degradacije p53 proteina javlja se inhibicija apoptoze inficiranih ćelija. E6 protein omogućava inhibiciju i spoljašnjeg i unutrašnjeg apoptotskog puta. Inhibicija spoljašnjeg puta apoptoze ostvaruje se vezivanjem E6 proteina za TNFR-1 (*Tumor necrosis factor receptor 1* - TNFR-1), FADD (*Fas-associated protein with death domain* - FADD) i kaspazu 8 (Garnett i sar., 2006), dok se inhibicija unutrašnjeg puta ostvaruje vezivanjem za Bak protein i njegovom degradacijom od strane proteozoma (Underbrink i sar., 2008).

Još jedan važan efekat E6 proteina u nastanku cervikalnog karcinoma je aktivacija hTERT (Howie i sar., 2009). Ovaj protein učestvuje u replikaciji krajeva hromozoma i u normalnim uslovima prisutan je samo u matičnim i embrionalnim ćelijama, dok u ostalim ćelijama aktivacija telomerazne aktivnosti indukuje njihovu imortalizaciju. Promotor za hTERT sadrži dva regiona, E kutiju "*E box*" i GC kutiju "*GC box*". Za ova mesta vezuju se faktori transkripcije koji uključuju i ćelijski *myc* protein. Vezivanjem *myc* proteina kao i E6 proteina udruženog sa E6-AP kompleksom pokreće se acilacija histona na promotoru za hTERT i aktivira njegova transkripcija (Xu i sar., 2008). Aktivacija dodatno može biti podstaknuta vezivanjem NFX-123 proteina kojim se pojačava ekspresija hTERT (Katzenellenbogen i sar., 2007).

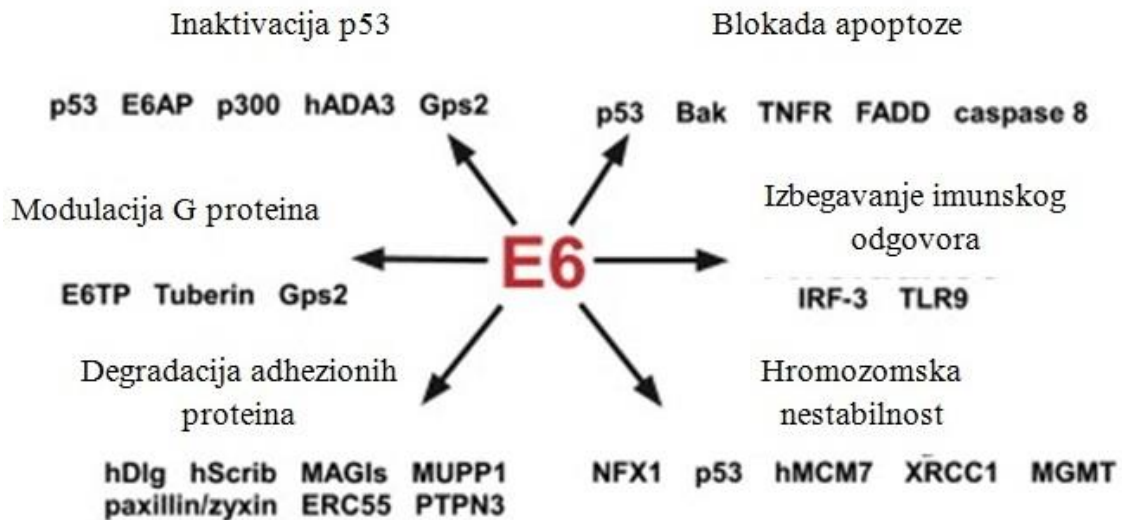
Pored povećane ekspresije hTERT, E6 protein utiče i na druge proteine koji učestvuju u održavanju hromozomske stabilnosti kao što je hMCM7 (*Human*

minichromosome maintenance 7 protein - hMCM7). Ovaj protein omogućava da se DNK replikuje samo jednom u toku ćelijskog ciklusa, pa interakcija E6 proteina sa hMCM7 ili njegova degradacija dovode do hromozomskih abnormalnosti. E6 se vezuje i za dva proteina koja učestvuju u reparaciji jednolančanih DNK prekida. Vezivanjem za XRCC1 (*X-ray repair cross complementing 1* - XRCC1) onemogućava se reparacija DNK oštećenja uzrokovanih alkilirajućim agensima, dok se vezivanjem za O-6-metil guanin metil transferazu indukuje njena degradacija preko E6-AP (Iftner i sar., 2002; Howie i sar., 2009).

Ekspresija E6 proteina u ćelijama dovodi i do narušavanja ćelijske strukture. E6 se vezuje za paksilin i ziksin, adhezione molekule koji povezuju ćelijski citoskelet sa ekstracelularnim matriksom i preko aktinskih vlakana učestvuju u prenošenju signala između ekstracelularnog matriksa i jedra. Ova interakcija dovodi do gubitka aktinskih vlakana i nemogućnosti održavanja ćelijske strukture (Howie i sar., 2009). E6 se vezuje i za hScrib, protein koji gradi međućelijske spojeve i vezuje bazalne ćelije za ekstracelularni matriks, dovodeći do njegove degradacije (Nakagawa i Huibregtse, 2000).

Istraživanja pokazuju da E6 protein HR-HPV reaguje sa dva proteina koja su značajna za urođeni imunski odgovor IRF3 i Toll-like receptor 9 (*Toll like receptor 9* - TLR9). Tokom virusne infekcije, aktivacija IRF3 vodi ka transkripciji interferona β (*Interferon beta* - IFN- β), dok aktivacija TLR9 vodi ka povećanoj produkciji citokina. Ekspresija E6 proteina u ćeliji dovodi do smanjene transkripcije TLR9 i gubitka njegove funkcije, a takođe je sprečena i transkripcija IFN- β (Hasan i sar., 2007).

Gubitak p53 proteina nastao usled dejstva E6 proteina rezultuje gubitkom kontrolne tačke u G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Prolongirana proliferacija u odsustvu p53 proteina vodi i ka gubitku kontrolne tačke u G₂ fazi ćelijskog ciklusa i sledstveno nastanku aneuploidije. Sve ove interakcije zajedno uzrokuju genomsku nestabilnost i ubrzavaju procese kancerogeneze.

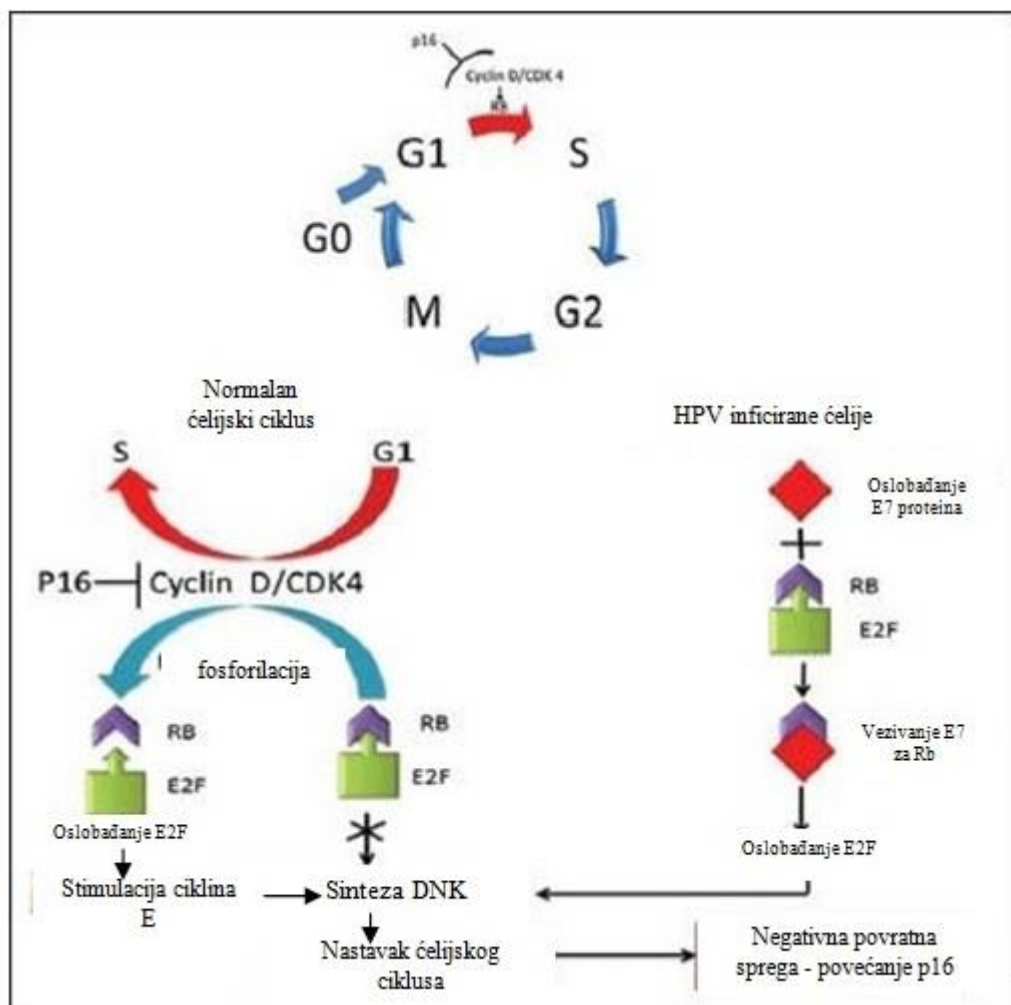


Slika 8. Funkcija E6 proteina (Howie i dr., 2009)

1.7.2. Tumorski potencijal E7 gena

Onkogeni potencijal HR-HPV ispoljava se i preko E7 gena i njegovog produkta E7 proteina. Ovaj protein svoj efekat ostvaruje vezivanjem za pRb.

pRb protein učestvuje u kontroli ćelijskog ciklusa. Tokom G₀ i G₁ faze ovaj protein nalazi se u svom aktivnom, hipofosforilisanom obliku, dok se u M i S fazi ćelijskog ciklusa nalazi kao neaktivan, fosforilisan oblik. E7 protein poseduje sposobnost vezivanja za aktivan oblik pRb, čime se od pRb proteina odvaja transkripcioni faktor E2F i započinje proteoliza pRb molekula pomoću kompleksa kulin 2 ubikvitin ligaze. Indukcija proteolize pRb i aktivacija E2F posredovane transkripcije predstavlja mehanizam pomoću koga ovi virusi uvode ćeliju u S fazu ćelijskog ciklusa (Howley i sar., 2013).



Slika 9. Mehanizam delovanja E7 proteina (Patil i sar., 2014)

Pored toga što ulazi u interakciju sa pRb, E7 protein deluje i na nekoliko pRb-u srodnih proteina. Proteinski faktor retinoblastoma p600 učestvuje u regulaciji anoikize, oblika apoptoze koji se aktivira neposredno po ulasku ćelije u deobu bez istovremene podele matriksa. E7 se sa p600 povezuje preko CR1 domena i utiče na disregulaciju anoikize, štiteći pojedine ćelije od apoptoze i omogućavajući na taj način replikaciju virusa i transformaciju ćelije (DeMasi i sar., 2007). Kontrola ćelijskog ciklusa odigrava se i vezivanjem za još dva dodatna proteina p107 i p130.

Efekat E7 proteina ostvaruje se i kroz nekoliko dodatnih mehanizama koji utiču na poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa. Jedan od ovih mehanizama obuhvata supresiju inhibitora ciklin zavisnih kinaza (*cyclin-dependent kinase inhibitors* - CKIs) p21^{CIP1} i p27^{KIP1}. Aktivnost CKIs ogleda se u inhibiciji rasta ćelije i zaustavljanju

ćelijskog ciklusa u G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Inaktivacija CKIs pomoću E7 proteina dovodi do gubitka kontrolne tačke u G₁ fazi, pa nakon završetka deobe ćelija opet ulazi u S fazu i započinje novi deobni proces (Nguyen i Munger, 2008).

Dejstvo E7 proteina na pRb/E2F kompleks dovodi do povećanja nivoa ciklina A i ciklina E u ćeliji. Udruženi sa inhibicijom CKIs, povećani nivoi ciklina u ćeliji omogućavaju stalno održavanje keratinocita u fazi deobe i sinteze DNK. E7 protein može se povezati sa ciklin A/CDK2 kompleksom što dovodi do povećanja CDK2 aktivnosti i podstiče prelazak iz S u G₂ fazu ćelijskog ciklusa (Nguyen i Munger, 2008). Gubitak kontrolnih tačaka u G₁, S i G₂ fazi ćelijskog ciklusa uzrokuje multipolarne mitoze, greške u razdvajanju centrozoma, defekte dvolančane DNK i aneuploidiju (Howley i sar., 2013).

U ćelijama u kojima se ekspirira E7 uočeno je i prisustvo DNK fokusa reparacije, što ukazuje na to da E7 protein dovodi do fragmentisanja DNK molekula, a takođe i do sprečavanja njegove popravke. Smatra se da se na taj način olakšava integracija genoma HPV u genom domaćina. E7 utiče na odvajanje DNK fragmenata iz cirkularnog genoma virusa i omogućava njihovu integraciju u hromozom domaćina preko endogenih mehanizama za popravku dvolančanih prekida (*DNA double-strand break* - DSB). Ukoliko se uzvodni regulatorni region HPV integriše u hromozom domaćina, sa ovog mesta nastavlja se replikacija virusa i ona traje sve dok se u ćeliji ekspiriraju E1 i E2 geni (Kadaja i sar., 2007).

Efekat E7 proteina ogleda se i u blokadi onih faktora koji suprimiraju rast ćelije. Na taj način podstiču se ćelijski rast i deoba i omogućava nekontrolisana proliferacija ćelija. Transformišuću faktor rasta β (*Transforming growth factor β* - TGF- β) je potentan inhibitor rasta ćelija, a sticanje rezistencije na TGF- β je jedan od glavnih karakteristika karcinoma. E7 protein ima sposobnost blokade funkcije TGF- β što dovodi po nekontrolisanog rasta ćelija. CKIs, p21^{CIP1} i p27^{KIP1} posreduju u inhibiciji ćelijskog rasta zajedno sa TGF- β , a inaktivacija ovih CKIs od strane E7 proteina je još jedan od mehanizama kojim se utiče na kontrolu ćelijskog rasta. Faktori supresije ćelijskog rasta, P15Inkb i p15INKB, koji za pravilno funkcionisanje zahtevaju funkcionalan pRb, takođe bivaju suprimirani pod dejstvom E7 proteina čime se dodatno podstiče ćelijski rast i deoba (MaLac i Munger, 2009).

E7 protein ima efekat i na interferonske signalne puteve. Efekat E7 proteina obuhvata inhibiciju translokacije p48 za koji se vezuje interferon stimulišući transkripcioni faktor 3 (*Interferon-stimulated gene factor 3* - ISGF3) što sprečava transkripciju ćelijskih gena koji učestvuju u apoptozi i kontroli ćelijskog ciklusa. Osim toga, E7 protein može ometati funkciju interferon regulatornih faktora (*interferon regulatory factors* - IRFs) povezanih sa IRF1 i narušiti njihovu transkripcionu aktivnost (Park i sar., 2000). Pokazano je da IFN- γ inhibira ekspresiju E7, a IFN- γ indukovana supresija citokinskog signalnog puta SOCS-1/JAB (*cytokine signaling-1* - SOCS-1/JAB) povezuje se sa ubikvitin zavisnom degradacijom E7 proteina (Kamio i sar., 2004).

E7 protein vezuje se i za enzime koji modifikuju histone. E7 ulazi u interakciju sa klasom 1 histon deacetilaze. Ovaj spoj dovodi do povećanja E2F posredovane transkripcije u diferenciranim ćelijama i ima uticaj na S fazu ćelijskog ciklusa (Longworth i sar., 2005). E7 protein takođe se vezuje i za histon acetil transferaze, p300, pCAF i SRC1 i inhibira njihovu aktivnost (Baldwin i sar., 2006).

1.7.3. Tumorski potencijal E5 gena

Pored E6 i E7 proteina, nešto slabiji, ali svakako značajan onkogeni potencijal ispoljava i E5 protein. Povećana produkcija E5 proteina u inficiranim ćelijama dovodi do povećane ekspresije receptora epidermalnog faktora rasta (*epidermal growth factor receptor* - EGFR) i inhibicije ekspresije glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I (*major histocompatibility complex class I* - MHC I) na plazma membrani (Moody i Laimins, 2010).

E5 protein funkcioniše i kao fuzioni protein, a nedavno je utvrđeno da je ovaj protein neophodan i jedini dovoljan za spajanje ćelija, pri čemu dolazi do formiranja tetraploidnih ćelija (Hu i sar., 2009). Ove ćelije su hromozomski nestabilne, naročito ukoliko se fuzija odigrava uporedno sa ekspresijom virusnih onkoproteina koji utiču na poremećaj funkcije p53 i ćelijsku apoptozu.

U prekancerskim lezijama često se uočava prisustvo aneuploidije/tetraploidije. Pokazano je da se poremećaj broja hromozoma može biti izazvan samo delovanjem E6 i E7 proteina koji dovode do deregulacije citokineze i tako uzrokuju nastanak

tetraploidije (Heilman i sar., 2009). Međutim, smatra se da formiranje tetraploidnih ćelija prvenstveno nastaje kao posledica dejstva E5 proteina. Ovakve ćelije u kojima dolazi do ekspresije virusnih onkoproteina i inhibicije apoptoze značajno utiču na stabilnost hromozoma (Duelli i sar., 2007).

In vivo i klinička ispitivanja pokazuju da hromozomska nestabilnost i tetraploidija/aneuploidija olakšavaju integraciju virusnog genoma u hromozom domaćina i potenciraju ekspresiju E6 i E7 proteina što značajno utiče na transformaciju ćelije. Sve ovo sugerše da fuzija ćelija posredovana E5 proteinom igra kritičnu ulogu u ranom stadijumu razvoja karcinoma grlića materice (Gao i Zheng, 2010). U kasnijim stadijumima razvoja tumora dolazi do delecija ORF koji kodiraju E5 protein što ukazuje na to da ovaj protein nije značajan za perzistenciju tumora, ali je njegova uloga u inicijalnim stadijumima ključna.

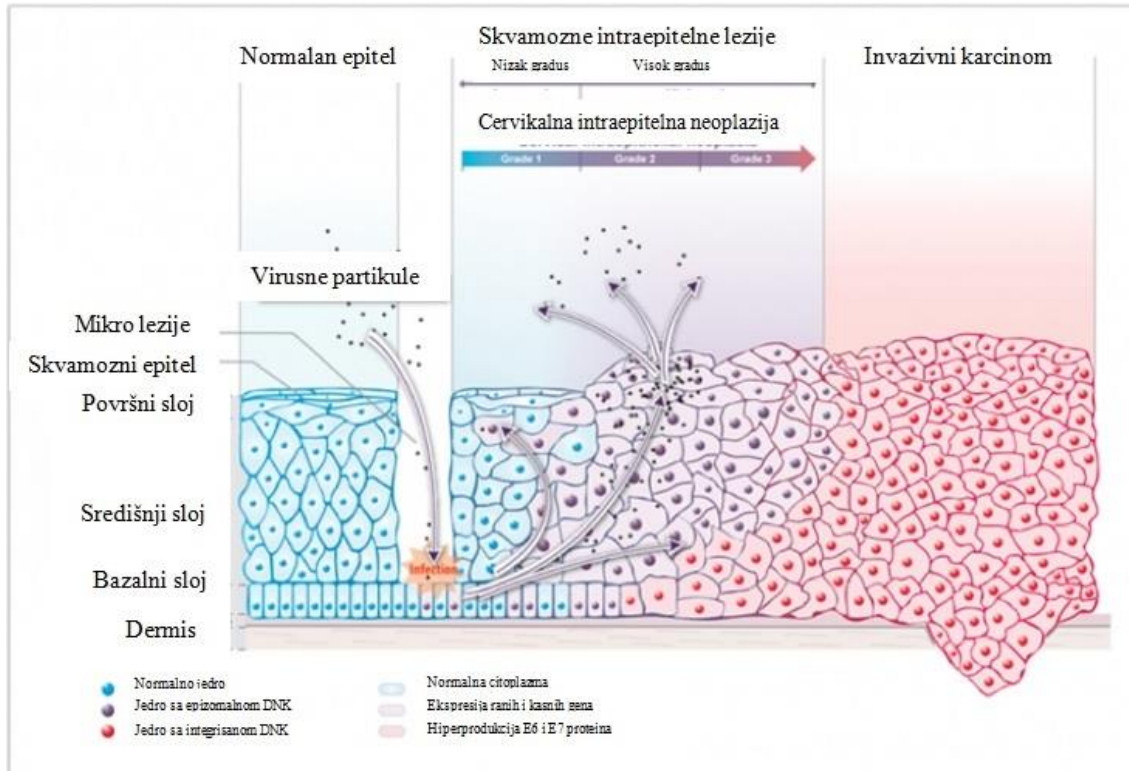
1.8. Patogeneza genitalne HR-HPV infekcije i povezanost sa nastankom karcinoma grlića materice

HPV u epitel grlića materice najčešće dospevaju tokom seksualnog kontakta preko mikroabrazija na površini epitela. Infekcija uobičajeno traje od 12 do 18 meseci, a nakon ovog perioda virus se zahvaljujući imunskom sistemu eliminiše iz organizma. Kod 10% žena virus se ipak zadržava u ćelijama te se uspostavlja perzistentna infekcija (Fernandes i sar., 2012). Posledica razvoja perzistentne infekcije su lezije na epitelu grlića materice koje mogu progredirati do maligniteta, pa su infekcije HR-HPV važan faktor rizika za razvoj cervikalnog karcinoma (Moody i Laimins, 2010).

HR-HPV u ćelije epitela dospeva vezivanjem L2 proteina sa $\alpha 6$ integrinom, heparinom ili proteoglikanima keratinocita koji se nalaze u zoni transformacije epitela (zona u kojoj cilindrični epitel endocerviksa prelazi u pločasto slojevit epitel egzocerviksa). To je područje nezrelih ćelija koje su posebno osetljive na dejstvo hormona kod žena u reproduktivnom periodu i stoga podložne infekcijama i mutacijama. Ćelije bazalnog sloja imaju visok proliferativni potencijal i poseduju brojne faktore transkripcije. Neposredno po infekciji, HR-HPV koristi ove ćelijske faktore kako bi započeo ekspresiju E onkogeni i replikaciju epizoma koja se održava na niskom nivou (50-100 kopija po ćeliji). Po završetku ćelijske deobe, ćerke ćelije migriraju u

suprabazalni sloj. U idealnim uslovima, infekcija ostaje asimptomatska zbog efektivne kontrole inficiranih ćelija od strane ćelija imunskog odgovora (Langerhansove ćelije, T limfociti). U manjem broju slučajeva suprabazalne ćelije započinju svoju diferencijaciju, ali pod dejstvom E onkoproteina dolazi do brzog prelaska G₁ faze u S fazu ćelijskog ciklusa što za posledicu ima ćelijsku hiperplaziju, pojačanu replikaciju virusa i povećanje broja epizoma u ćelijama (1000 kopija po ćeliji). Kod genetski predisponiranih osoba, infekcija HR-HPV zajedno sa određenim faktorima okoline dovodi do maligne transformacije ćelija. Kružna, epizomalna DNK postaje linearna, najčešće usled prekida između E2 i E4 regiona i ugrađuje se u hromozom domaćina. Integracija se najčešće dešava na fragilnim mestima genoma domaćina i može se odvijati na jednom ili više lokusa. U ovoj fazi još ne dolazi do razvoja produktivne infekcije, ali maligni keratinociti inficirani HR-HPV nalaze se u svim slojevima epitela gde vremenom probijaju bazalnu membranu i invadiraju okolno tkivo (Howley i sar., 2013). Integracija virusnog genoma uslovljena je prvenstveno HPV genotipom i kod HPV-18 i HPV-45 može se sresti kod gotovo svih karcinoma, dok se kod HPV-16 sreće u polovini slučajeva (Vinokurova i sar., 2008).

Infekcija HPV dovodi do displastičnih promena i pojave atipičnih skvamoznih ćelija koje su neodređenog značaja (*atypical squamous cells of undetermined significance* - ASCUS). Kod većine osoba dolazi do regresije ovih promena, međutim, ukoliko su kod inficirane osobe prisutni i određeni kofaktori (starija životna dob, genetski faktori, poremećaj imunološkog statusa, multiparitet, upotreba oralnih kontraceptiva, pušenje, veći broj seksualnih partnera, prisustvo HIV infekcije i dr.) dolazi do progresije epitelne lezija i razvoja displastičnih promena različitog stepena.



Slika 10. Patogeneza HR-HPV infekcije i progresija displastičnih promena
(Kohen i sar., 2019)

Danas su u upotrebi dva sistema pomoću kojih se opisuju displastične promene nastale kao posledica perzistentne infekcije (CIN klasifikacioni sistem i Betesda klasifikacija). CIN klasifikacioni sistem razlikuje sledeće stepene displazije (Solomon, 2015):

- CIN I (blaga displazija) - karakteriše se lezijama niskog stepena koje su lokalizovane u donjoj trećini epitela,
 - CIN II (umerena displazija) - lezije višeg stepena koje se razvijaju u bazalnim i površnim slojevima i koje zahvataju dve trećine epitela,
 - CIN III (teška displazija, *carcinoma in situ*) - lezije visokog stepena koje zahvataju ceo epitel,
 - Invazivni karcinom cerviksa - zahvaćen je čitav epitel, a maligne ćelije prodiru u tkivo ispod epitela i mogu se putem krvnih i limfnih sudova širiti u udaljene
- Betesda klasifikacija obuhvata podelu promena cervikalnog epitela na:

- skvamozne intraepitelijalne lezije niskog stepena (*Low-grade squamous intraepithelial lesion* – LSIL) - odgovara blagoj displaziji (CIN I)
- skvamozne intraepitelijalne lezije visokog stepena (*High-grade squamous intraepithelial lesion* – HSIL) - odgovara umerenoj do teškoj displaziji (CIN II i III).

Progresija displastičnih promena odigrava se uporedno sa integracijom virusnog genoma u genom domaćina. U ćelijama cervikalnog karcinoma usled funkcionalne inaktivacije pRb pod dejstvom E7 proteina dolazi do pojačane ekspresije tumorsupresorskog proteina p16^{INK4A} koji je produkt CDKN2A gena (Mai i sar., 2015). Ovaj protein deluje kao inhibitor ciklin zavisne kinaze i aktivira S fazu ćelijske deobe. Ekspresija p16^{INK4A} korelira sa stepenom cervikalne neoplazije. Zato se ovaj protein može iskoristiti kao prediktivni marker pomoću koga se mogu identifikovati žene sa cervikalom displazijom koje su pod povećanim rizikom za progresiju u lezije višeg stepena.

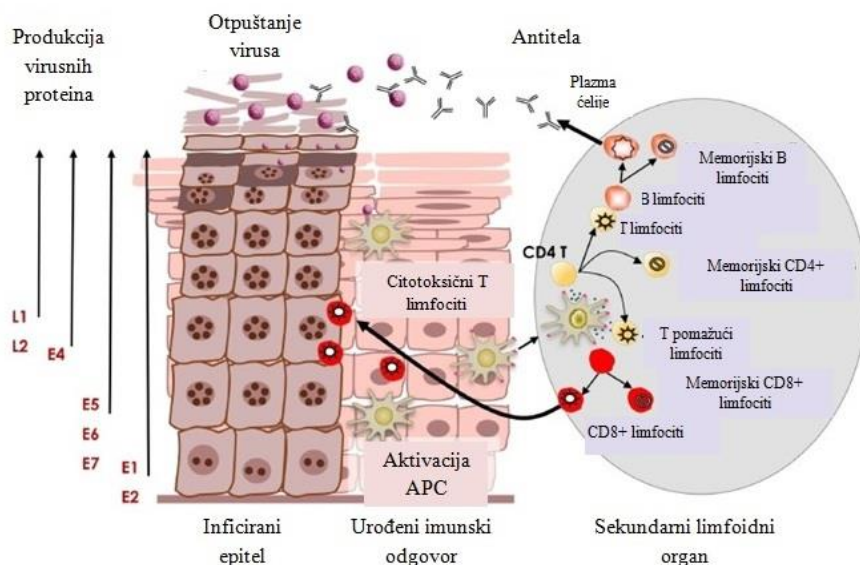
Perzistentna infekcija, integracija genoma HPV u genom domaćina i povećana produkcija E6 i E7 proteina povećavaju rizik za progresiju LSIL u HSIL i invazivni karcinom. E6 i E7 proteini dovode do razvoja hromozomskih nestabilnosti usled dupliranja centrozoma, uklanjanja kontrolnih tačaka u ćelijskom ciklusu i degradaciji p53 i pRb proteina (Münger i sar., 2004). Svi ovi procesi uzrokuju genetske promene koje se tokom vremena akumuliraju i dovode do razvoja karcinoma.

1.9. Imunski odgovor u toku cervikalne HPV infekcije

HPV infekcija predstavlja lokalnu, latentnu infekciju u kojoj virus u ćelijama domaćina može ostati mesecima, pa čak i godinama. Imunski odgovor često nije dovoljan za kompletno uklanjanje virusa iz organizma zbog čega se uspostavlja perzistentna infekcija (Stanley, 2009).

Nakon ulaska HPV u ćeliju, antigen prezentujuće ćelije (*antigen presenting cell* - APC) Langerhansove (*Langerhans cell* - LC) i dendritične ćelije (*dendritic cell* - DC) vrše obradu i prezentaciju virusnih antigena nezrelim T limfocitima koji se aktiviraju i potom diferenciraju u efektorske CD4⁺ i CD8⁺ T limfocite. CD4⁺T limfociti se klasifikuju u dve različite subpopulacije limfocita - Th1 i Th2 limfocite koji se razlikuju

prema produkciji različitih citokina kao i efektorskoj ulozi u imunskom odgovoru. Th1 sekretuju proinflamatorne ili tumor-supresivne citokine: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 i IL-12, a Th2 antiinflamatorne ili tumor-promovišuće citokine: IL-4, IL-5, IL-10 i TGF- β . Takođe, Th1 limfociti stimulišu ulogu CD8+ T ćelija čija je uloga da virus efikasno eliminišu, dok je uloga Th2 da aktiviraju B limfocite na produkciju specifičnih antitela kao odgovor na HPV infekciju (Stern, 2005). U infekciji HR-HPV bez displazije prisutna su oba tipa inflamatornih citokina. Međutim, progresijom HPV promena počinje da predominira Th2 tip inflamacije. Inhibiran Th1 i stimulisan Th2 citokinski odgovor tokom infekcije HR-HPV korelira sa progresijom u cervikalnu bolest odnosno rizikom od nastanka karcinoma grlića materice.



Slika 11. Imunski odgovor na HPV infekciju (Stern i sar., 2012)

U najvećem broju slučajeva virus se unutar dve godine od infekcije eliminiše iz organizma. Međutim, HPV su razvili brojne tehnike koje im omogućavaju da opstanu u ćelijama domaćina. Pokazano je da HPV odmah na početku infekcije ostvaruje svoj uticaj na funkciju LC i DC kroz nekoliko mehanizama. HPV infekcija dovodi do promena u citokinskom miljeu koje uzrokuju inhibiciju LC i DC (Stanley, 2008). L2 protein HPV ima sposobnost inhibicije maturacije, migracije i sekrecije citokina od strane LC. E6 protein utiče na smanjenje koncentracije E kadherina, proteina koji omogućavaju intracelularnu adheziju, dovodeći tako do poremećaja interakcije između LC i keratinocita (Ghittoni i sar., 2010).

Osim početne inhibicije funkcije LC i DC, HPV su uspeli da razviju brojne mehanizme kojima izbegavaju imunski odgovor kojim obezbeđuju vremenski dugu perzistenciju u ćelijama domaćina. Njihov životni ciklus u potpunosti zavisi od diferencijacije keratinocita i organizovan je tako da se produkcija virusnih antigena u nediferenciranim ćelijama održava na niskom nivou, dok se pojačana ekspresija ostvaruje u visoko diferenciranim ćelijama. Kasni geni HPV sadrže kodone koji se u humanim ćelijama retko prepisuju, pa je produkcija kasnih produkata - proteina ograničena i inhibirana usled nedostatka odgovarajuće tRNK. Rani virusni proteini takođe se proizvode u nedovoljnim količinama pa zbog toga ostaju neprepoznati od strane imunskog sistema (Tindle, 2002). Replikacija virusa, kao i sklapanja viriona odigravaju se u terminalno diferenciranim ćelijama koje bi svakako odumrle prirodnim procesom, pa u njima virusi ostaju neprepoznati od strane imunskog sistema. Pored toga, virusi u inficiranim ćelijama ne dovode do razvoja citolize i nekroze, te se s toga ne razvija zapaljenski odgovor. U inficiranom epitelu dolazi do slabog oslobađanja proinflamatornih citokina koji su važni za aktivaciju i migraciju APC. Tako virus izbegava pokretanje imunskog odgovora u skvamoznom epitelu i praktično postaje nevidljiv, što mu omogućava dugo preživljavanje unutar ćelija domaćina (Stanley, 2006).

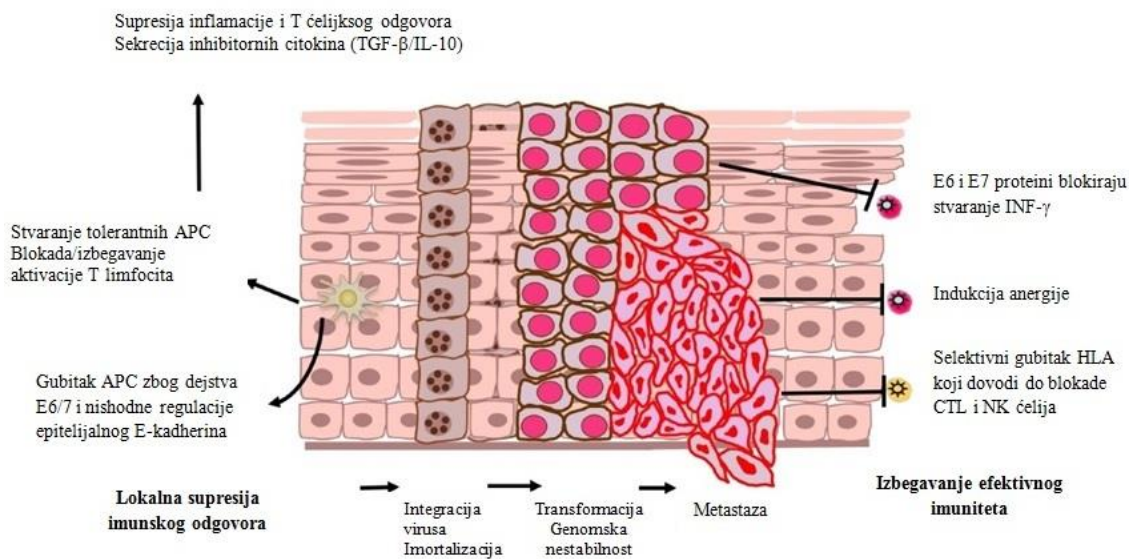
Tokom infekcije HPV, čak i u odsustvu citolize i nekroze, epitelne ćelije bi trebalo da započnu produkciju IFN-1, proteina koji predstavljaju komponentu urođenog imunskog sistema i koji ima snažan antivirusni efekat. U inficiranim ćelijama prvenstveno dolazi do stvaranja dva podtipa IFN-1, IFN- α i IFN- β . Oba interferona poseduju antivirusna, antiproliferativna, antiangiogena i imunomodulatorna svojstva i deluju kao most između urođenog i stečenog imunskog odgovora (Le Bon i Tough, 2002). HR-HPV imaju sposobnost inhibicije produkcije interferona i u kombinaciji sa nishodnom regulacijom TLR receptora i održavanjem produkcije virusnih proteina na niskom nivou uspevaju da izbegnu aktivaciju urođenog imunskog odgovora, a samim tim i aktivaciju stečenog imunskog odgovora. Blokada produkcije interferona ostvaruje se pomoću virusnih proteina E6 i E7 (Kanodia i sar., 2007). Ovi proteini sprečavaju transkripciju mnogih interferon-regulatornih gena uključujući Stat-1 gen koji je transkripcioni faktor za interferon inducibilne gene. E6 protein blokira funkciju IRF-3, aktivaciju protein kinaze R i aktivaciju kinaze Tyk2, dok E7 protein blokira funkciju

IRF-1 (Stanley, 2009). I jedan i drugi protein imaju sposobnost blokade TLR-9 (Hasan i sar., 2007).

Tokom infekcije HR-HPV dolazi do promene citokinskog profila uslovljenog šiftom Th1 u Th2 imunski odgovor. Ekspresija brojnih citokina koji se u niskim koncentracijama sintetišu u zdravim ćelijama biva izmenjena usled infekcije HPV. U ćelijama se smanjuje sinteza proinflamatornih citokina, IL-1, IL-6, TNF- α i TNF- β , dok se produkcija antiinflamatornog citokina, kao npr. IL-10 povećava (Ghittoni i sar., 2010). Promena u citokinskom miljeu omogućava smanjenje sposobnosti imunskih ćelija da infiltrišu inficirano tkivo. U keratinocitima se produkcija IFN- α , IFN- β i IFN- κ održava na niskom nivou. Smanjena ekspresija IFN- κ takođe doprinosi inhibiciji ekspresije IFN-inducibilnih gena (Rincon-Orozco i sar., 2009).

Razvoj specifičnog T-ćelijskog odgovora je takođe suprimiran ili odložen, a ovaj efekat naročito je izražen tokom infekcije HR-HPV (van der Burg i Palefsky, 2009). Jedan od razloga zašto izostaje efikasan T ćelijski odgovor u toku HR-HPV infekcije je i nishodna regulacija MHC I usled delovanja E5, E6 i E7 proteina. Takođe, poznato je da E7 protein ometa prezentaciju antigena preko MHC molekula. Na aktivaciju imunskog odgovora utiče i blokada IFN- γ indukovane prezentacije antigena citotoksičnim T ćelijama (Ghittoni i sar., 2010).

Pored navedenih mehanizama, HPV izbegava imunski odgovor mehanizmom baziranim na analogiji u građi E7 proteina i proteina ćelija domaćina, što ograničava njegovu imunogenost; nishodnom regulacijom ekspresije IL-18 od strane E6 proteina; E5 posredovanom acidifikacijom endozoma koja utiče na obradu antigena i njihovo prezentovanje od strane APC; E5 posredovanom nishodnom regulacijom CD1d molekula - MHC I sličnih molekula koji deluju kao antigeni za NK ćelije, kao i smanjenom aktivacijom NK ćelija (Fernandes, 2012).



Slika 12. Izbegavanje imunskog odgovora (Stern i sar., 2012)

1.10. Polimorfizmi gena proinflamatornih citokina TNF- α , IFN- γ i IL-12 i njihova uloga u nastanku cervikalne bolesti udružene sa HR- HPV

Citokini predstavljaju glikoproteine male molekulske mase (6-70 kDa) koji deluju kao posrednici između ćelija imunskog sistema i neophodni su za odvijanje svih faza imunskog odgovora. Citokini se stvaraju od strane različitih ćelija kao što su limfociti, monociti, makrofagi, fibroblasti, ali i drugih ćelija izvan imunskog sistema. U citokine se ubraja grupa IL, IFN i transformišućih faktora rasta (*transforming growth factor* - TGF), a njihovo dejstvo uglavnom je lokalno autokrino i parakrino, ređe endokrino.

U nastanku cervikalnog karcinoma posebna uloga pripisuje se TNF- α , IFN- γ i IL-12, a poremećaj koncentracije i produkcije ovih citokina u toku infekcije povezuje se sa perzistentnom HR-HPV infekcijom i progresijom displastičnih promena (Kobayashi i sar., 2008).

TNF- α je citokin građen od 233 aminokiseline, a njegova molekulska težina iznosi 25,6 kDa. Prvenstveno ga luče makrofagi kao odgovor na akutnu inflamaciju, ali se može produkovati i od strane inficiranih keratinocita. Indukuje apoptozu i nekrozu malignih ćelija. U ćelijama cervikalnog karcinoma ovaj citokin se nalazi u povećanim koncentracijama.

IFN- γ svoje dejstvo ostvaruje preko JAK-STAT i CBL-Crk signalnog puta. Nedovoljne koncentracije IFN- γ u cervikalnom karcinomu povezuju se sa redukcijom apoptoze i ćelijskom proliferacijom, dok se više koncentracije IFN- γ povezuju sa smanjenom ekspresijom E6 i E7 gena.

IL-12 je heterodimerni glikoprotein, molekulske težine 74kDa. Izlučuju ga B limfociti, dendritične ćelije i fagociti. U patogenezi cervikalnog karcinoma pokazuje imunoprotektivno dejstvo. Smanjena produkcija IL-12 u cervikalnom karcinomu povezuje se sa smanjenim imunskim odgovorom i sa lošijom prognozom oboljenja (Paradkar i sar., 2014).

Poslednjih nekoliko godina genetskoj predispoziciji pridaje se sve veća uloga u nastanku karcinoma grlića materice kod žena sa HR-HPV infekcijom. Dosadašnja istraživanja su pokazala da nastanak cervikalnog karcinoma predstavlja višestruku interakciju gena i faktora spoljašnje sredine.

Projektom "Genom čoveka" (*Human Genome Project*), koji se bazirao na sekvencioniranju molekula DNK, pokazano je da u svim genima postoji polimorfizam nukleotida (*single nucleotide polymorphism* - SNP). Genski polimorfizmi su rezultat evolutivnih procesa i predstavljaju mutacije koje su opstale u populaciji sa frekvencijom višom od 1%. Za razliku od polimorfizama, mutacije dovode do izmenjenog redosleda nukleotida koji je vrlo redak u populaciji i najčešće se manifestuje bolešću odnosno, određenim patološkim fenotipom. Polimorfizam je zamena nukleotida u molekulu DNK, uobičajena u populaciji, pri čemu se ni jedan alel ne smatra "standardnim". Umesto toga, postoje dva ili nekoliko podjednako zastupljenih redosleda DNK. Najčešće ispitivani polimorfizmi su SNP koji predstavljaju supstituciju, inserciju ili deleciju samo jedne baze (Kubistova i sar., 2009).

Funkcionalna uloga svakog pojedinačnog SNP zavisi od njegove pozicije u genu, a najznačajniji su oni u regulatornom regionu. Polimorfizam lociran u 5'promotoru/enhanceru reguliše nivo transkripcije i ekspresije gena; egzonski polimorfizmi menjaju kodirajuće sekvence DNK što utiče na promenu redosleda aminokiselina u proteinu i njihovu funkciju, intronski dovode do promene u obradi

iRNK (*splicing*), dok polimorfizmi u 3' regionu mogu uticati na stabilnost iRNK (Ćupić i sar., 2014).

Polimorfizmi gena mogu se otkriti različitim metodama (Kim i Misra, 2007):

- metodom reakcije lančane polimerizacije (PCR);
- cepanjem delova DNK određenim restrikcijским endonukleazama (određivanje dužine restrikcionih fragmenata (*restriction fragment length polymorphism - RFLP*));
- metodom “*Lightcycler*” koja se temelji na lančanoj reakciji polimerizacije uz vrlo brze izmene temperaturnih ciklusa;
- metodom koja se temelji na bioluminiscenciji pirofosfata nastalih u specifičnim “proba-produženim” reakcijama (*Bioluminometric Assay Coupled With Modified Probe Extension Reactions - BAMPER*);
- bioinformatičkim programima kojima je moguće izračunati mesto SNP u genomu (*Immunoblot/Genoblot Scanning System –Whole-Genome Shotgun Assembly - WGS*A).

Dokazan polimorfizam ima adekvatnu nomenklaturu definisanu brojem referentne sekvence – rs. Mutacije pojedinačnih nukleotida (A, T, G, C) definišu sklonost prema određenim bolestima, određuju rezistenciju ili toleranciju na lekove i samim tim definišu nove ciljeve terapije omogućavajući individualni terapijski pristup mnogim oboljenjima.

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u genima koji kodiraju relevantne proinflamatorne citokine kao što su TNF- α , IFN- γ i IL-12 postaju veoma značajni genetski markeri u proceni rizika za nastanak cervikalnog karcinoma udruženog sa HR-HPV. Sve veći značaj dobija uloga specifičnih polimorfizama citokinskih gena u progresiji virusnih infekcija, kao i riziku od nastanka tumora virusnog porekla.

Podaci o genskim polimorfizmima koji imaju uticaja na napredovanje HPV infekcije ka karcinomu cerviksa, od strane različitih istraživačkih timova, razlikuju se kod različitih etničkih populacija sa različitih geografskih područja (Hoffmann i sar., 2002).

Do danas je opisano nekoliko polimorfizama u promotoru TNF- α gena: -238 G/A; -308 G/A; -857 C/T; -863 C/A. Najviše i najbolje proučen među njima je SNP na poziciji -308 G/A (Rotar i dr., 2014). Pokazalo se da je da je SNP na poziciji -308 u promotoru TNF- α gena (rs1800629) G/A, visoko povezan sa CIN I udruženim sa HR-HPV. Smatra se da bi prisutan A alel na poziciji -308 TNF- α gena, koji predstavlja visoko sekretorni TNF- α fenotip, mogao da ima snažan uticaj na nastanak HR-HPV cervikalnog karcinoma (Pan i dr., 2012; Zhang i Zhang, 2013). Pomenuti TNF- α -308 G/A polimorfizam, koji može za posledicu da imavisoku produkciju TNF- α , favorizuje aktivnost ciklin zavisne kinaze, čime je pojačana ekspresija iRNK E6/E7 u HPV imortalizovanim keratinocitima (Kirkpatrick i sar., 2004). Takođe, pokazano je da TNF- α stimuliše transkripciju receptora za epidermalni faktor rasta (*epidermal growth factor* - EGF) čime se stimuliše ćelijska proliferacija i tumorogeneza (Gaiotti i sar., 2000). Istraživanja pokazuju da se polimorfizam TNF- α gena povezuje sa povećanim rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma. Meta-analičke studije su potvrdile da prisustvo A alela (Wang i dr., 2015), a posebno AA genotipa, nosi veći rizik za nastanak tumora na grliću materice kod HR-HPV pozitivnih žena (Liu i sar., 2012).

IFN- γ je jedan od najvažnijih Th1 imunomodulatora sa antiproliferativnom, antitumorskom i antivirusnom ulogom. SNP na poziciji +874 (rs62559044) T/A, lociran u prvom intronu IFN- γ gena, povezan je sa povišenom produkcijom IFN- γ i efikasnijom odbranom od HPV infekcije, dok je njegov nizak nivo prisutan u cervikalnom karcinomu povezan sa lošijom prognozom. DNK sekvenca koja sadrži +874 T alel je specifično vezno mesto za NF- κ B transkripcioni faktor (Pravica i sar., 2000). Veliki broj radova pokazuje da dominacija T alela korelira sa pojačanom ekspresijom IFN- γ i smanjenim rizikom za nastanak karcinoma cerviksa (Zhang i sar., 2018), dok je niskosekretorni +874 AA IFN- γ genotip povezan sa rizikom za nastanak HR-HPV cervikalnog tumora (Gey i sar., 2003).

Mnogobrojne studije pokazuju da IL-12 dovodi do efikasne destrukcije ćelija karcinoma. IL-12 se sastoji iz dve subjedinice p35 (IL-12A) i p40 (IL-12B) (Chen H i sar., 2009). Nasleđivanje varijanti IL-12A i IL-12B gena, naročito funkcionalnih SNP, drastično menja njegovu ekspresiju, kao i drugih citokina čija je funkcija pod njegovim uticajem. IL-12 kaskadom molekulskih signala stimuliše produkciju IFN- γ , istovremeno

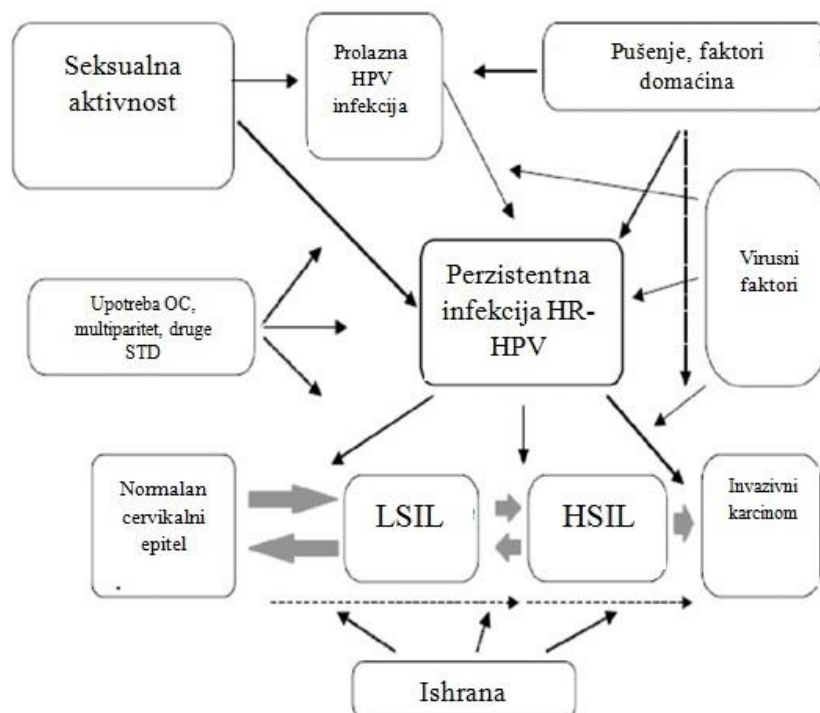
inhibira IL-4 koji suprimira sintezu IFN- γ i podstiče protektivni Th1 imunski odgovor. Najbolje proučeni polimorfizmi gena za IL-12 predstavljaju SNP na poziciji +1188 A/C u 3'UTR regionu IL-12B gena (rs3212227) i SNP na poziciji +277 G/A u 5'UTR regionu IL-12A gena (rs568408). SNP na poziciji +1188 A/C u 3'UTR regionu IL-12B gena povezan je sa predispozicijom za nastanak karcinoma grlića materice kod žena sa HR-HPV (de Carvalho i sar., 2012). Istraživanja pokazuju da je AA genotip povezan sa progresijom HR-HPV lezija u cervikalni karcinom (Yuzhalin i sar., 2012). Meta-analička studija sprovedena od strane Shi-ja i saradnika iz 2017. godine pokazala je da SNP u regionu IL-12B gena (rs3212227) nosi povećan rizik za razvoj cervikalnog karcinoma. Istraživanja o uticaju SNP u regionu IL-12A gena još uvek su u ranoj fazi, a dosadašnji rezultati pokazuju da polimorfizam ovog gena nema uticaj na produkciju IL-12 (Tao i sar., 2012; Wang i sar., 2013).

Svakako da pored određivanja genotipa virusa danas važan prediktivni činilac u nastanku karcinoma grlića materice imaju polimorfizmi relevantnih citokinskih gena, čije bi određivanje upotpunilo praćenje toka perzistentne HR-HPV infekcije i prognoziralo rizik od nastanka cervikalne bolesti. Takođe bi doprinelo pravovremenom terapijskom pristupu i praćenju perzistentne HR-HPV infekcije što bi svakako uticalo i na smanjenje rizika od nastanka karcinoma grlića materice.

1.11. Kofaktori rizika za nastanak i progresiju cervikalne bolesti udružene sa HR- HPV

Infekcija visoko onkogenim tipovima HPV igra centralnu ulogu u razvoju cervikalnog karcinoma i nastanku njegovih prekursorskih lezija. Maligna transformacija ćelija epitela grlića materice i tumorogeneza su multifaktorijalni i rezultat su udruženog dejstva HPV genotipa i njegovog tumorskog potencijala, kao i faktora domaćina (genetski faktori i imunski status), faktora spoljašnje sredine i bihevioralnih faktora (multiparitet, upotreba oralnih kontraceptiva (*oral contraceptive* - OC), pušenje, infekcija drugim seksualno prenosivim patogenim uzročnicima (*sexual transmitted disease* - STD), ranije stupanje u seksualne odnose, promiskuitet, loši socioekonomski uslovi i nutritivni faktori (Castellsague i sar., 2008). Istraživanja iz ove oblasti su utvrdila postojanje jasne povezanosti nekoliko faktora kao što su: multiparitet, dugogodišnji pušački staž kao i upotreba OC sa povećanim rizikom za nastanak CIN III

i cervikalnog karcinoma kod žena sa perzistentnom HR-HPV infekcijom (Appleby i sar., 2007; Plummer i sar., 2003).



Slika 13. Kofaktori cervikalne kancerogeneze (Al-Ouqaili i sar., 2017)

Multiparitet (šest ili više porođaja) se povezuje sa povećanim rizikom za razvoj HSIL i karcinoma grlića materice (Castellsague i sar., 2008; Bosch i sar., 2002). Smatra se da oštećenje cervikalnog epitela koje nastaje kao posledica cervikalne traume, porođaja ili STD predstavlja visokorizično okruženje koje pomaže HR-HPV da infiltriraju bazalni sloj i uspostave perzistentnu infekciju. Ovo potvrđuje i kohortna studija Jensena i saradnika u kojoj je utvrđeno da žene sa perzistentnom HR-HPV infekcijom i većim brojem porođaja imaju povećan rizik za razvoj CIN III (Jensen i sar., 2013). Velika IARC studija (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) pokazala je da su žene koje su imale sedam ili više terminskih porođaja imale i 3,8 puta veći rizik za razvoj skvamocelularnog karcinoma cerviksa u odnosu na žene koje nisu rađale, kao i 2,3 puta veći rizik u poređenju sa ženama koje su imale jedan ili dva porođaja (Munoz i sar., 2002).

Pušenje se već dugi niz godina dovodi u vezu sa povećanim rizikom za karcinom grlića materice, ali još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno da li kancerogeni iz duvanskog

dima olakšavaju nastanak HPV infekcije, omogućavaju perzistenciju infekcije ili deluju kao kofaktor u progresiji displastičnih promena (Appleby i sar., 2006). Pokazano je da hemijski kancerogeni iz duvanskog dima i cigareta ostvaruju direktan mitogeni efekat dovodeći do oštećenja DNK, kao i da pušenje može da dovede do smanjenja broja LC (Castellsague i sar., 2008). Rezultati SUCCEED studije (*The Study to Understand Cervical Cancer Early Endpoints and Determinants - SUCCEED*) ukazuju da žene koje su HR-HPV pozitivne i pušači imaju 2,5 puta veći rizik za razvoj CIN III u poređenju sa nepušačima (Wang i sar., 2009). Skorašnja studija Fanga i saradnika pokazala je da su među HR-HPV pozitivnim ženama dugogodišnji pušači (8 i više godina) i teški pušači (više od 18 cigareta dnevno) imali veći rizik za progresiju displastičnih promena u CIN III i invazivni karcinom (Fang i sar., 2019).

Oralni kontraceptivi - Rezultati dosadašnjih istraživanja koja su ispitivala povezanost OC i cervikalnog karcinoma su različita. Neke studije pokazuju pozitivnu korelaciju između OC i cervikalnog karcinoma, druge, pak, kažu da ta veza ne postoji. Smatra se da se rizik za cervikalni karcinom povećava sa produženom upotrebom OC. Meta-analitička studija Gierisch-a i saradnika iz 2013. godine ukazuje da se kod HR-HPV pozitivnih žene rizik za cervikalni karcinom povećava sa višegodišnjom upotrebom OC. Slične rezultate pokazuje i studija Tao-a i saradnika iz 2014. godine u kojoj je rizik za karcinom *in situ* postojao i kod HR-HPV pozitivnih žena koje su manje od 5 godina koristile OC, dok je kod HR-HPV pozitivnih žena koje su OC upotrebljavale duže od 5 godina postojao povećan rizik za razvoj invazivnog karcinoma. Jansen i saradnici u svojoj studiji, pak, nisu utvrdili povezanost između OC i cervikalnog karcinoma (Jansen i sar., 2013).

Pored prethodno navedenih kofaktora, uloga u razvoju HR-HPV infekcije pripisuje se i rizičnom seksualnom ponašanju i prekomernoj telesnoj težini.

Rizično seksualno ponašanje podrazumeva rano stupanje u seksualne odnose i veći broj partnera što predstavlja promovišuće faktore za nastanak STD. Infektivni kofaktori svoje dejstvo ostvaruju ili direktnom genotoksičnošću ili indukcijom cervikalne inflamacije koja dovodi do genotoksičnih oštećenja oslobađanjem oksidativnih metabolita (Verteramo i sar., 2009). STD kofaktori u nastanku HPV infekcije i CIN mogu biti bakterijske etiologije (*Chlamydia trachomatis* - CT, genitalne

mikoplazme, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*), virusne etiologije (*Herpes simplex virus* - HSV, *Cytomegalovirus* - CMV, *Human immunodeficiency virus* - HIV), gljivične etiologije (*Candida albicans* i *non albicans* vrste), protozoalne etiologije (*Trichomonas vaginalis*).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da infekcija CTolakšava infekciju i perzistenciju HR-HPV (Paba i sar., 2008), kao i da se iz HSIL promena HR-HPV pozitivnih žena u najvećem procentu izoluje CT (Tasić i sar., 2018). Inflamacija koja nastaje tokom koinfekcije CT/HR-HPV dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji oštećuju ćelijsku DNK, inhibiraju apoptozu i dovode do genetske destabilizacije ćelija. Na površini epitela razvijaju se mikroulceracije, a pojačava se i ekspresija E6 i E7 onkogena. Istraživanja pokazuju da je koinfekcija CT/HR-HPV praćena i povećanom produkcijom p16^{INK4A} u 56,3% slučajeva i pojačanom ekspresijom Ki67 antigena (Calil i sar., 2011).

Genitalne mikoplazme (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma penetrans*, *Ureaplasma urealyticum*) dovode do razvoja inflamatornih promena cerviksa čime se olakšava perzistencija HPV infekcije. Ove bakterije pojačavaju ekspresiju *myc* onkogena, podstiču virusnu perzistenciju i transformaciju ćelija mehanizmom translokacije/delecije hromozoma. Rezultati istraživanja Verterama i saradnika pokazali su značajnu povezanost između infekcije HPV i *Ureaplasma urealyticum* (Verteramo i sar., 2009).

Smatra se da nastanak infekcije kao i progresiju cervikalnih promena HR-HPV pozitivnih žena indukuje i HSV-2 (Li i Wen, 2017). HSV-2 dovodi do stvaranja ulceracija epitela grlića materice čime se olakšava prodor HPV prema ćelijama bazalnih slojeva. Produkt neposredno ranih gena HSV-2 (ICP4, ICP0, ICP27) pojačavaju ekspresiju protoonkogena kao i E6/E7 onkogena stimulišući na taj način replikaciju HPV.

Pored HSV-2, u nastanku cervikalnog karcinoma značajnu ulogu igra i infekcija CMV. Smatra se da CMV učestvuje u integraciji HPV genoma u genom domaćina što je preduslov za malignu transformaciju ćelije. Istraživanja pokazuju da se CMV dokazuje u promenama na grliću materice udruženim sa HR-HPV sa različitom učestalošću.

Tako je pozitivan nalaz CMV prisutan kod 28% LSIL, dok je u značajno većem procentu ~44% , CMV se dokazuje kao pridruženi STD patogen kod težih cervikalnih promena - HSIL, udruženih sa HR-HPV (Marinho Dias i Sousa, 2013).

HIV infekcija favorizuje nastanak i perzistenciju HPV infekcije, kao i progresiju cervikalnih HPVlezija (Buonaguro, 2010). HIV-om uzrokovana imunosupresija i smanjen broj i repertoar imunskih ćelija, doprinosi HPV da ne bude prepoznat od strane APC, kao i nepokretanju i neusmeravanju imunskog odgovora na eliminaciju virusa. Sve ovo HPV obezbeđuje uspostavljanje prezistencije i posledično reaktivaciju kao i mogućnost maligne transformacije ćelije. Hronična inflamacija koja nastaje tokom koinfekcije HIV/HR-HPV aktivira ciklooksigenazu 2 (*Cyclooxygenase 2* - COX-2) u cervikalnom epitelu i pojačava sintezu prostaglandina 2 (*prostaglandin E2* - PGE-2). Velike koncentracije PGE-2 povezuju se sa nastankom cervikalnog karcinoma u pacijentkinja sa HIV-om (Fitzgerald i sar., 2012).

Prekomerna telesna težina i gojaznost predstavljaju faktore rizika za mnoge hronične bolesti uključujući i karcinome. Mnoge studije pokazuju da je indeks telesne mase (*Body mass index* - BMI) kod žena povezan sa incidencijom karcinoma različitih lokalizacija. Istraživanja pokazuju pozitivnu korelaciju između BMI i patološkog nalaza Papanikolau testa (*Papanicolaou test* - Pap test) ukazujući da što je BMI veći to je i rizik za nastanak patoloških promena na grliću materice veći (Maruthur i sar., 2009; Lee i sar., 2013).

Nastanak karcinoma grlića materice predstavlja multifaktorijelan proces koji nastaje tokom više godina. Infekcija HR-HPV predstavlja inicijalni proces u nastanku cervikalnog karcinoma, a istraživanja koja će se vršiti u budućnosti treba da utvrde u kom stepenu i koji kofaktori imaju pospešujuću ulogu u ovom procesu.

1.12. Prevencija i terapija HPV infekcije

Visoka učestalost genitalne HPV infekcije usloвила je potrebu za uvođenjem brojnih algoritama kojima se ova infekcija može uspešno prevenirati i lečiti.

Prevencija HPV infekcije vrši se na primarnom, sekundarnom i tercijarnom nivou. Primarna prevencija ima za cilj smanjenje rizika za nastanak HPV infekcije. Mere

primarne prevencije uključuju edukaciju o bezbednom seksualnom ponašanju, faktorima rizika za razvoj HPV infekcije i preventivnoj vakcinaciji. Bezbedno seksualno ponašanje podrazumeva upražnjavanje sigurnog seksualnog kontakta (stalnog partnera ili ograničiti broj seksualnih partnera, smanjenje promiskuitetnog nebezbednog ponašanja) uz obavezno korišćenje zaštite od STD. Upotreba kondoma pruža delimičnu zaštitu od HPV infekcije jer se virus i dalje može preneti preko nepokrivenog dela kože (Vaccarella i sar., 2006). Ipak, manji broj partnera i korišćenje kondoma značajno smanjuju učestalost HPV infekcije.

Sekundarna prevencija usmerena je na otkrivanje HPV infekcije u što ranijoj fazi uvođenjem skrining metoda koje podrazumevaju redovne ginekološke preglede žena, kolposkopske metode, citološke pretrage, pre svega Pap test i virusološke preglede HPV testiranjem. Osim toga, mere sekundarne prevencije odnose se i na unapređenje metoda koje se primenjuju u skriningu i povećanje dostupnosti skrininga što većem broju žena. Sekundarna prevencija uključuje i unapređenje antivirusnih terapijskih procedura kao i razvoj terapijskih vakcina (Botha, 2009).

Tercijarna prevencija usmerena je na sprečavanje progresije već postojećih HPV lezija i nastanka komplikacija.

Terapijske procedure koje se primenjuju u lečenju HPV infekcije treba da budu prilagođene svakom pacijentu, njegovim simptomima i potrebama, ali i raspoloživim resursima. Specifičan antivirusni lek za sada ne postoji već se terapija primenjuje samo u tretmanu vidljivih lezija. Dostupni terapijski tretmani uključuju (Yanofsky i sar., 2012):

- **hirurške metode:**
 - **kriohirurgija** svoj efekat ostvaruje zamrzavanjem intracelularne tečnosti što dovodi do destrukcije ćelija. Može se primenjivati u lečenju genitalnih bradavica i CIN I. U lečenju žena sa CIN I promenama krioterapija dovodi do povlačenja lezija u 88% slučajeva (Luciani i sar., 2008).
 - **elektrohirurgija (elektrodesikacija** - primenjuje se u lečenju spoljašnjih genitalnih bradavica; **elektroekscizija** (*Loop Electrosurgical Excision Procedure* - LEEP) za tretman skvamoznih intepitelnih lezija).

- **hirurške zahvate** (kiretaža, ekscizija) - najstarija metoda u lečenju genitalnih bradavica sa efikasnošću od oko 72%. Danas se najčešće primenjuje u lečenju ekstenzivnih lezija koje ne reaguju na druge vidove terapije.
- **lasersku hirurgiju (CO₂ vaporizacija)** - primenjuje se u lečenju refraktornih ili ekstenzivnih lezija, prvenstveno periuretralnih i vaginalnih bradavica kao i skvamoznih lezija. Ova metoda je efiksna u 80% -91% slučajeva (Aynaud i sar., 2008).
- **Farmakološka terapija:**
 - **Imunomodulatorni lekovi:**
 - **Interferon** - može se primenjivati lokalno, sistemski i intralezijski. Meta-analitička studija Yang i sar. iz 2009. godine pokazala je dobar odgovor na terapiju interferonom koji je kod 45% primalaca IFN terapije odgovorilo potpunom eliminacijom virusa i rezolucijom HPV infekcije, dok se recidiv javlja kod 21% pacijenata. Rizik za recidiv je nešto veći ukoliko se ova terapija kombinuje sa hirurškom ekscizijom.
 - **5% imikvimod** - utiče na pojačanu produkciju IFN- γ , IL-6, TNF- α . Nekoliko randomizovanih studija pokazalo je da lokalna primena 5% imikvimod krema dovodi do regresije kondilomatoznih promena kod 50% pacijenata, dok je stopa recidiva 13% -19% (Diamantis i sar., 2009).
 - **Citotoksična sredstva:**
 - **Podofilotoksin** (0,05% rastvor i 0,15% krem) - vezuje se za ćelijske mikrotubule i indukuje ćelijsku nekrozu. Može se primenjivati i u kućnim uslovima. Studije pokazuju efikasnost od 45% do 77%, dok stopa recidiva iznosi 38% (Lacey i sar., 2003).
 - **Podofilin** u koncentraciji od 20% -25% - prvi topikalni lek u tretmanu genitalnih bradavica. Njegova upotreba se ne preporučuje zbog male efikasnosti i velike toksičnosti.
 - **5-fluorouracil** - primenjuje se u lečenju genitalnih bradavica, vulvarnih i vaginalnih intraepitelijalnih neoplazija. Kao i podofilin, ima nisku efikasnost i veliku toksičnost zbog čega njegova upotreba nije odobrena. Ipak, ovaj lek ispoljava značajnu efikasnost u tretmanu CIN II kod mladih žena (Rahangdale i sar., 2014).

- **Keratolitički agensi:**
 - **Trihloroacetna kiselina** u koncentraciji od 80% -90% predstavlja jeftinu, metodu koja nema sistemsku neželjena dejstva, a može se primenjivati i u trudnoći. Svoj efekat ostvaruje denaturacijom proteina i indukcijom ćelijske smrti. Primjenjuje se u lečenju CIN i vaginalnih intraepitelnih neoplazija.

1.12.1. Screening programi za rano otkrivanje cervikalne HR-HPV infekcije

Skrining predstavlja neinvazivan, jednostavan i brz način dijagnostikovanja patoloških ćelija cerviksa, prekanceroznih cervikalnih lezija i cervikalnog karcinoma u ranoj fazi. Sve ove lezije dijagnostikovane pravovremeno mogu se adekvatno i uspešno tretirati što poboljšava ishod lečenja, smanjuje nastanak komplikacija i značajno doprinosi kvalitetu života pacijenta. Procenjuje se da se uspešno sprovedenim skriningom incidencija cervikalnog karcinoma smanjuje za 90% (Sasieni i sar., 2009). Istraživanja iz Engleske pokazuju da je primena skrininga u periodu od 2008. do 2013. godine dovela do smanjenja 1A stadijuma cervikalnog karcinoma za 67%, a stadijuma III za 95%. Primenom skrininga uspešno je prevenirano 70% smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomom grlića materice (Landy i sar., 2016).

Skrining cervikalnog karcinoma se širom sveta sprovodi kao organizovani ili oportunistički. Oportunistički skrining podrazumeva postupak kada se pacijent javi lekaru iz nekog drugog razloga, ali se ta prilika iskoristi da mu se savetuje neki od testova za rano otkrivanje cervikalnih promena. O ovom tipu skrininga govorimo i kada sam pacijent zatraži od lekara da se podvrgne nekom od testova. Ako se skrining izvodi na maloj, definisanoj grupi ljudi za koju se smatra da ima povećan rizik za oboljevanje to predstavlja selektivni skrining. Masovni (populacioni) skrining podrazumeva organizovano pozivanje velikog broja ljudi za koje se procenjuje da su u povećanom riziku od određene bolesti. Ovakav pristup, iako organizaciono zahtevan, smatra se dugoročno najefikasnijim, te se zato on nalazi u osnovi svih nacionalnih programa za rano otkrivanje pojedinih malignih bolesti.

Prednost se uvek daje organizovanom skriningu jer je kvalitet programa bolji, obuhvat stanovništva veći, a pregledi se vrše u tačno predviđenim vremenskim

intervalima. Skrining programi razlikuju se od zemlje do zemlje u odnosu na ciljnu populaciju, interval skrininga i metode sprovođenja skrininga.

U zemljama Evropske unije u kojima se sprovodi organizovani skrining obuhvaćene su žene starosti od 20/30 godina do 60/65 godina (Anttila i dr., 2009). Preporuke Američkog udruženja za ginekologiju i akušerstvo savetuju započinjanje skrininga 3 godine nakon stupanja u seksualne odnose, a najkasnije do 21. godine života. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) za žene starosti preko 30 godina preporučuje se i kombinovano testiranje (Pap test i HPV test) (Berg i Atkins, 2003).

Interval za sprovođenje skrininga iznosi od 1 do 15 godina. Kraći intervali imaju veći zaštitni efekat, pa zbog toga skrining koji se sprovodi na svakih godinu dana, kao i onaj koji se sprovodi na 1-3 godine imaju najveći protektivni efekat. U zemljama Evropske unije, kao i u Velikoj Britaniji, Holandiji, Norveškoj, Švedskoj i Danskoj sprovođenje skrininga vrši se na 3-5 godina (Liao i sar., 2012). Ovo je ujedno i najčešći interval u kom se skrining sprovodi među zemljama širom sveta, ali koji pruža značajnu zaštitu samo od nastanka invazivnog karcinoma.

Metode kojima se sprovodi skrining zavise od tehnološke razvijenosti neke zemlje i edukovanosti lekara. Skrining za cervikalni karcinom može se sprovoditi pomoću:

- vizuelnog pregleda grlića materice golim okom uz primenu sirćetne kiseline (*Visual inspection with acetic acid - VIA*)
- vizuelnog pregleda grlića materice golim okom uz primenu Lugolovog rastvora (*Visual inspection with Lugol's iodine - VILI*)
- Pap testa
- kolposkopije
- HPV tipizacije
- citologije na tečnoj podlozi (*Liquid based cytology - LBC*)

VIA predstavlja vizuelni pregled grlića materice pomoću sirćetne kiseline. Tokom pregleda grlić materice se premazuje 3%-5% rastvorom sirćetne kiseline nakon čega dolazi do kratkotrajnog prebojavanja patološkog tkiva što se inspekcijom uočava kao jasno ograničena, gusta, neprozirna, beličasta lezija (*Aceto-white epitel*). VILI

predstavlja vizuelni pregled grlića materice pomoću Lugolovog rastvora (Šilerova proba). Pri prebojavanju Lugolovim rastvorom normalno tkivo grlića dobija mrkobraon ili kestenjastu boju dok se patološke lezije uočavaju kao žučkasto prebojene. Ovi testovi imaju specifičnost od 82% i senzitivnost od 84% (Sankaranarayanan, 2009). VILI ima nešto višu senzitivnost u odnosu na VIA u otkrivanju HSIL zbog čega se smatra preciznijim testom (Sankaranarayanan, 2004). U nerazvijenim zemljama sveta ovo su najčešće primenjivane metode skrininga cervikalnog karcinoma (Blumenthal i dr., 2005).



Slika 14. Pozitivne promene na grliću materice dobijene tokom bojenja sirćetnom kiselinom (levo) i Lugolovim rastvorom (desno) (Rani i sar., 2016)

Pored vizuelnih metoda, skining karcinoma grlića materice može se sprovoditi i putem Pap testa. Test se izvodi tako što se sa grlića pomoću štapića i četkice skidaju ćelije površinskog epitela, razmazuju na mikroskopskoj pločici i potom posmatraju pod mikroskopom. Rezultati Pap testa svrstavaju se u jednu od 5 grupa: I i II normalan nalaz; III - abnormalne ćelije; IV - maligne ćelije u malom broju; V- brojne maligne ćelije. Atipičan nalaz ovog testa zahteva izvođenje biopsije i histopatološku potvrdu. Nalazi Pap testa i histopatološki nalaz poklapaju se u oko 50% slučajeva. Senzitivnost ove metode iznosi 57%, dok je specifičnost 76% (Barut i sar., 2015). Pap test je najčešće korišćena metoda skrininga u zemljama širom sveta. Zahvaljujući ovoj metodi značajno je smanjena incidencija cervikalnog karcinoma.

Kolposkopija predstavlja vizuelnu metodu u kojoj se uz pomoć pokretnog mikroskopa (kolposkopa) grlić materice posmatra pod uveličanjem od 6-40 puta. Na

osnovu karakterističnih znakova (izgled ivica kolposkopskih promena, boje, vaskularne atipije i bojenja Lugolovim rastvorom) promene su klasifikovane kao: normalan nalaz; skvamozna metaplazija; leukoplakija; kondilomi; CIN I; CIN II i III; invazivni karcinom. Kolposkopija pokazuje visoku senzitivnost, ali nisku specifičnost zbog čega se ne može primenjivati samostalno u skriningu cervikalnog karcinoma (Pimple i sar., 2010).

HPV tipizacija može se vršiti kroz nekoliko testova: PCR, test hibridizacije HPV DNK i test *in situ* hibridizacije. Izvođenje HPV tipizacije u oportunom skriningu se ne preporučuje zbog niske specifičnosti ove metode. U kombinaciji sa konvencionalnom citologijom HPV tipizacija ispoljava visoku senzitivnost i specifičnost (Alonso i sar., 2006).

LBC se u odnosu na tradicionalni razmaz razlikuje po načinu uzimanja uzorka. Nakon uzimanja brisa, cervikalne ćelije se stavljaju u posudu sa tečnošću za konzerviranje umesto razmazivanja po mikroskopskom staklu. Ova metoda znatno je pouzdanija od tradicionalnog brisa jer olakšava pripremu preparata i uklanja krv i mukus koji mogu otežavati pregled pločice.

Prateći preporuke Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) kao i rezultate skrining programa iz drugih zemalja u Srbiji je tokom 2009. godine od strane Ministarstva zdravlja kreiran i usvojen program organizovanog skrininga za cervikalni karcinom pod nazivom "Uredba o nacionalnom programu za rano otkrivanje karcinoma grlića materice". Ovaj program je nekoliko godina kasnije revidiran i unapređen, a od kraja 2012. godine počeo je da se postepeno uvodi u praksu i sprovodi kao decentralizovani organizovani skrining. Sprovođenje skrininga vrši se od strane lekara koji rade u Primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Prema ovom programu sve žene starosti od 25 do 64 godine jednom godišnje podležu skrining pregledu, a nakon 3 uzastopna uredna nalaza skrining se može sprovoditi na svake 3 godine. Metoda izbora za sprovođenje skrininga je Pap test. U slučaju pozitivnih rezultata dalji koraci koji se preduzimaju zavise od stepena detektovanih promena. LSIL promene se prate, a Pap test ponavlja jednom godišnje, dok HSIL promene podležu daljoj dijagnostici i terapiji u ustanovama sekundarnog nivoa.

1.12.2. Preventabilne vakcine i vakcinalni programi za sprečavanje nastanka genitalne HPV infekcije

Primarna prevencije je, pored edukacije o načinima sprečavanja nastanka HPV infekcije, usmerena i na razvoj efikasnih preventabilnih vakcina.

Vakcinalni programi predviđaju obuhvat prvenstveno ženske populacije starosti od 9 do 26 godina. Pre 15. godine vakcinacija se sprovodi u dve doze, a nakon 15. godine u tri doze. Kvadrivalentne i nanovalentne vakcine odobrene su i za primenu kod muškaraca starosne dobi od 9 do 26 godina.

Preporuke su da se sa vakcinacijom započne između 11-12 godine života (kvadrivalentna vakcina se može primenjivati od 9 godine), odnosno pre stupanja u seksualne odnose. Na taj način indukuje se bolji humoralni imunski odgovor (sinteza većeg titra antitela) (Reagan-Steiner i sar., 2015; Meites i sar., 2016), koji je uvek slabiji u odnosu na celularni imunski odgovor, koji se indukuje prirodnom infekcijom. O efikasnijoj primeni vakcine u mlađem životnom dobu svedoči i studija iz Švedske u kojoj je efikasnost vakcine primenjene u dobi između 10 i 13 godina iznosila 93%, dok je nakon primene u dobi između 20 i 22 godine iznosila 48%, a u dobi između 23 i 26 godina 21% (Leval i sar., 2013).

U svetu su licencirane tri preventabilne vakcina protiv HPV (tabela 2):

- dvovalenta (HPV16/18) - *Cervarix* - u upotrebi od 2009. godine,
- kvadrivalentna (HPV6/11/16/18) - *Gardasil* - prva vakcina protiv HPV registrovana 2006. godine,
- nanovalentna (HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58) - *Gardasil 9*.

Vakcinalni antigen je protein virusnog kapsida - L1. Sintetski stvoreni L1 sposobni su da formiraju VLPkoje se imunskom sistemu prikazuju kao virusne čestice i prezentuju pomenute antigenske determinante koje su visoko imunogene. Na taj način sezibiliše se humoralna imunost i stvara dovoljno efektivan nivo serumskih antitela da bi zaštitio i lokalno sluznicu na mestu ulaska virusa. Antitela transudacijom iz krvi prodiru u epitel genitalne sluzokože. Na taj način stvorena specifična antitela štite lokalno i sprečavaju uspostavljanje HPV infekcije (Wang i sar., 2013).

Sva tri tipa vakcina preveniraju infekcije onkogenim tipovima HPV (HPV-16/18) koji su ujedno i uzročnici 70% cervikalnih karcinoma širom sveta. Nanovalentna vakcina obuhvata još pet tipova HR-HPV (HPV-31/33/45/52/58) čime se pokriva gotovo 90% uzročnika karcinoma grlića materice (Capra i sar., 2017). Kvadrivalentne i nanovalentne vakcine usmerene su i protiv niskorizičnih tipova HPV (HPV-6/11) koji uzrokuju anogenitalne bradavice. Nijedna od pomenutih vakcina nema terapeutsko dejstvo već se primenjuju isključivo u prevenciji HPV oboljenja.

Tabela 2. Uporedni prikaz preventabilnih HPV vakcina

	<i>Cervarix</i>	<i>Gardasil</i>	<i>Gardasil 9</i>
HPV tipovi	16, 18	6, 11, 16, 18	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58
Antigen (doza)	20 μ g HPV-16 L1 20 μ g HPV-18 L1	20 μ g HPV-6 L1 20 μ g HPV-11 L1 40 μ g HPV-16 L1 20 μ g HPV-18 L1	30 μ g HPV-6 L1 40 μ g HPV-11 L1 60 μ g HPV-16 L1 40 μ g HPV-18 L1 20 μ g HPV-31 L1 20 μ g HPV-33 L1 20 μ g HPV-45 L1 20 μ g HPV-52 L1 20 μ g HPV-58 L1
Izvor antigena	Baculovirus	Kvasci	Kvasci
Adjuvansi	ASO ₄	AlH ₄ O ₉ PS ⁻³	AlH ₄ O ₉ PS ⁻³
Doziranje i način primene	I.M. (0,5 ml u 0, 1, 6 mesecu)	I.M. (0,5 ml u 0, 2, 6 mesecu)	9-14 godina: I.M. (0,5 ml u 0 i 6 mesecu) 45 godina: I.M. (0,5 ml u 15-0, 2, 6 mesecu)
Odobrena u starosnoj dobi	10-25 godina	9-26 godina	Muškarci: 9-26 godina Žene: < 45 godina

Brojne studije potvrdile su efikasnost HPV vakcina. Primena dvovalentnih vakcina dovela je do smanjenja CIN II, kao i promena višeg stepena za 70,2%. Utvrđeno je i da ove vakcine indukuju dobar imunski odgovor i stvaranje visokog titra antitela koji se održava i 6,4 godine nakon prve doze vakcine (Schwarz, 2008). Studije koje su pratile imunski odgovor na kvadrivalentnu vakcinu pokazale su da se titar antitela održava na visokom nivou 9 godina nakon prve doze vakcine (Nygard i sar., 2015).

Praćenjem efikasnosti preventivnih HPV vakcina uočeno je i postojanje unakrsnih reakcija, odnosno smanjenja učestalosti cervikalnih HPV infekcija, virusne perzistencije i CIN koji su uzrokovani HPV tipovima koji nisu sadržani u vakcinama. Studija iz Škotske koja je pratila efikasnost bivalentne HPV vakcine osam godina nakon sprovođenja prve doze pokazala je da efikasnost protiv HPV tipova 16 i 18 iznosi 89%. Uočeno je i postojanje unakrsne zaštite protiv tri značajna onkogeni HPV tipa (HPV-

31/33/45). Efikasnost protiv HPV-31 iznosila je 93,8%, protiv HPV-45 82,6%, dok je protiv HPV-33 bila 79,1 % (Kavanagh i sar., 2017).

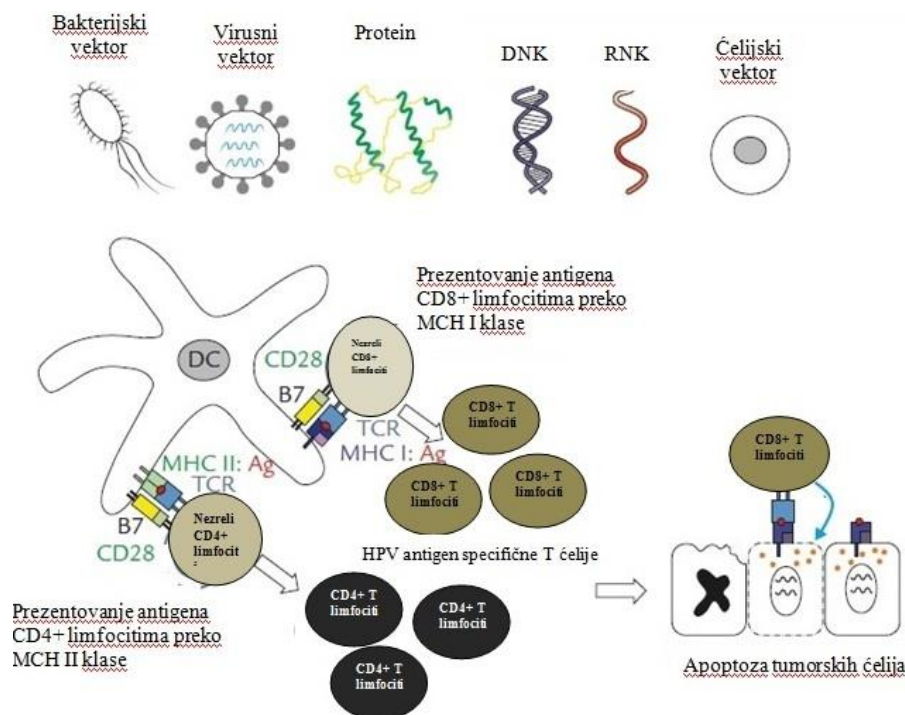
Tokom 2016. godine objavljena je studija koja je pratila desetogodišnju efikasnost primene kvadrivalentne vakcine, a koja je pokazala da su se učestalost infekcija izazvanih HPV-6/11/16/18, kao i učestalost genitalnih bradavica smanjili za 90%, dok je učestalost cervikalnih lezija visokog stepena smanjena za 85% (Garland i sar., 2016). Smanjenje učestalosti infekcija i cervikalnih promena visokog stepena, uključujući i cervikalni karcinom, za 96,7% registrovano je primenom nanovalentne vakcine (Joura i sar., 2015).

Najčešći neželjeni efekti koji se javljaju po primeni HPV vakcina uključuju blage lokalne reakcije (eritem, bol, oticanje) i sistemske reakcije (bol u mišićima, groznica, glavobolja, mučnina) i obično samostalno prolaze kroz nekoliko dana. Primena vakcina retko može biti praćena i razvojem životno ugrožavajućih reakcija i stanja (anafilaksa, autoimunske i neurodegenerativne bolesti). Primena profilaktičkih vakcina je kontraindikovana kod trudnica, osoba koje su alergične na kvasce ili na bilo koju komponentu vakcine.

1.12.3. Terapijske vakcine

Primena profilaktičkih HPV vakcina napravila je veliki napredak u prevenciji infekcija i oboljenja koja su povezana sa HPV, pa ipak, u svetu se i dalje registruje visok procenat obolelih. Usled toga razvila se potreba za obrazovanjem terapijskih tretmana koji bi pomogli u kontroli i eradikaciji ovih oboljenja. Pored preventabilnih razvijene su i terapijske vakcine koje se danas sa različitim stepenom efikasnosti primenjuju u lečenju infekcija i oboljenja udruženih sa HPV.

Do danas je dizajnirano nekoliko tipova terapijskih vakcina. Ove vakcine kao antigene sadrže žive vektore, proteine, aminokiseline, kao i cele ćelije (Yang i sar., 2016). Cilj primene terapijskih vakcina je aktivacija specifičnog CD4+ i CD8+ T ćelijskog odgovora kako bi se virusi eliminisali iz ćelije. Većina vakcina usmerena je protiv E6 i E7 onkoproteina i kreirana tako da prvenstveno pokrene imunski odgovor na E7 jer ovaj protein ima znatno bolju imunogenost u odnosu na E6 protein (Kumar i sar., 2015).



Slika 15. Mehanizam delovanja terapijskih vakcina (Lin i sar., 2010)

Studije koje su ispitivale efikasnost terapijskih vakcina pokazuju različite rezultate. Neka istrživanja pokazuju da terapijske vakcine nisu postigle očekivani uspeh što je objašnjeno nemogućnošću da se indukuje dovoljno jak specifičan T ćelijski odgovor (Melief, van der Burg, 2008). Dve skorašnje studije, pak, pokazuju da je primena terapijskih HPV vakcina postigla uspeh u lečenju 50% lezija visokog stepena vulve iz kojih je izolovan HPV-16. Radilo se o primeni adjuvantne vakcine koja je sadržala sintetičke sekvence E6 i E7 proteina koje se preklapaju kao i rekombinovani fuzioni protein E6/E7/L2 poreklom od HPV-16. Efikasnost vakcine povezana je sa indukcijom jakog CD4+ i CD8+ T ćelijskog odgovora. Kod onih ispitanika čije su lezije bile nereaktivne registrovan je slab imunski odgovor na vakcinu kao i povećanje broja lezija (Daayana i sar., 2010; Welters i sar., 2010). Primena vakcine koja je sadržala sintetisane E6 i E7 preklapajuće proteine pokazala je dobar efekat u lečenju cervikalnog karcinoma (Welters i sar., 2008).

2. Ciljevi istraživanja

Planom istraživanja definisani su sledeći ciljevi:

1. Kod svih pacijentkinja ispitati prisustvo HR-HPV u cervikalnom brisu.
2. Kod svih HR-HPV pozitivnih pacijentkinja ispitati distribuciju genotipova i alela proinflammatoryh citokina TNF- α , IFN- γ i IL-12, kao i njihov uticaj na nastanak cervikalne bolesti udružene sa HR-HPV. Takođe, utvrditi koji genotipovi imaju protektivni odnosno favorizujući značaj za nastanak karcinoma grlića materice udružen sa HR-HPV.
3. Kod svih HR-HPV pozitivnih pacijentkinja na osnovu upitnika utvrditi kofaktore rizika za nastanak cervikalne bolesti i ispitati povezanost između kofaktora i konstitucionalnih genskih polimorfizama proinflammatoryh citokina, kao i njihov zajednički uticaj na nastanak cervikalnog karcinoma.

3. Materijal i metodologija

3.1. Materijal

3.1.1. Pacijenti

Istraživanje dizajnirano kao studija preseka sprovedeno je tokom četvorogodišnjeg perioda, od 2014. do 2018. godine na Institutu za Mikrobiologiju i Imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Klinici za ginekologiju i akušerstvo „Narodni front“ u Beogradu. Istraživanjem je bila obuhvaćena 541 pacijentkinja.

Sve ispitanice su tokom pregleda bile informisane o istraživanju koje se sprovodi i svojim potpisom su dale saglasnost za učešće u studiji. Urađena je i anonimna pismena anketa popunjavanjem upitnika koji je sadržao osnovne podatke o pacijentu, socio-demografske podatke, podatke o seksualnim i životnim navikama, kao i podatke o drugim kofaktorima od značaja za nastanak perzistentne HPV infekcije/ili cervikalne bolesti udružene sa HPV. Svi podaci dobijeni na osnovu upitnika/ankete, kao i uzorci koji su dobijeni od pacijentkinja su bili odobreni odlukama Etičkih Komiteta GAK "Narodni Front" (24/2-2; 22.10.2013.), odnosno Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (29/XI-2; 20.11.2013.).

3.1.2. Pacijentkinje i njihove karakteristike

Najmlađa ispitanica imala je 20 godina, a najstarija 73 godine, srednje uzrasne dobi 46,5 godina. Najveći broj ispitanica poticao je iz gradske sredine, pre svega iz Beograda i bio je srednjeg nivoa obrazovanja, najveći broj ih je bio zaposlen i većinu su činile udate žene.

3.1.3. Klinički uzorci

Tokom četvorogodišnjeg perioda, pri posetama dnevnoj bolnici GAK "Narodni Front" ispitanicama je urađen ginekološki pregled i utvrđen kolposkopski i citološki status na grliću materice. Citoloski gradus utvrđen na osnovu Pap testa bio je dalje kriterijum za virusološko ispitivanje prisustva HPV na grliću materice i utvrđivanje genskih polimorfizama relevantnih citokinskih gena koji se smatraju važnim prognostičkim biomarkerima za tok i evoluciji HPV infekcije ka LSIL i HSIL.

Prikupljeni uzorci su potom analizirani u laboratorijama za virusologiju i imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu Pap citološkog nalaza na grliću materice, a prema Betezda klasifikaciji, ispitanice su potom podeljene u 4 grupe:

1. žene sa normalnim nalazom na cerviksu - kontrolna grupa PAP II;
2. žene čiji je citološki nalaz definisan kao ASCUS;
3. ispitanice sa LSIL ili CIN I koje odgovaraju blagim promenama cervikalnog epitela sa koilocitozom (ćelije sa perinuklearnim rasvetljenjima indikativne za HPV infekciju);
4. ispitanice sa HSIL (CIN II/III) koje odgovaraju umerenoj i/ili teškoj cervikalnoj displaziji.

Kako bi se utvrdilo prisustvo HPV infekcije svim ispitanicama uzet je endocervikalni bris i/ili bris sa vidljivih lezija na ektoceriksu tehnikom cervikalnog citobraša. Nakon uzorkovanja brisevi su potapani u epruvete sa 1ml transportnog medijuma (Sacace, Biotechnologies, S.r.l. Italy) radi održavanja vlažnosti uzorka i čuvani do 24h na temperaturi od +4°C ili zamrzavani na temperaturi od ili -80°C radi čuvanja u laboratoriji do postupka obrade uzorka i izdvajanja DNK.

Za određivanje genskih polimorfizama, ispitanicama je uzimano 5 ml periferne krvi u odgovarajuće epruvete (Becton Dickinson, Nju Džersi, SAD) sa antikoagulansom – EDTA, i unutar 4 h transportovano do Laboratorije za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu gde je krv dalje obrađivana.

3.2. Metodologija

3.2.1. Izolovanje virusne DNK za virusološko testiranje HPV

U daljem postupku obrade cervikalni brisevi su vorteksovani u trajanju od 2 minuta kako bi se izdvojio kompletan sadržaj briseva. Dobijeni sadržaj potom je centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti (rpm/min). Nakon centrifugiranja supernatant je odlivan, a dobijeni sediment predstavljao je uzorak iz koga je

Materijal i metodologija komercijalnim setom za izdvajanje nukleinskih kiselina (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) izolovana ukupna DNK. Ekstrakcija je urađena po protokolu proizvođača uz određene modifikacije. Svi reagensi koji su bili korišćeni u procesu izolovanja DNK pripremljeni su prema uputstvu proizvođača i pre primene stabilizovani na sobnoj temperaturi 1-2h. Kako bi se sprečila kontaminacija, procedura ekstrakcije DNK rađena je u laminarnoj komori uz korišćenje filter nastavaka različitih zapremina i sterilnih plastičnih tubica od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Procedura ekstrakcije DNK izvršena je kroz korake:

- 1) U plastičnu tubicu zapremine 1,5 ml sipano je 20 μ l Protein kinaze K, dodato 200 μ l sedimenta briseva i pažljivo promešano.
- 2) U uzorak je potom dodato 200 μ L AL pufera, a homogenizacija je izvršena na vorteks mešalici 3 puta u trajanju od 5 sekundi dok uzorak nije postao homogen.
- 3) Inkubirano je 30 minuta na temperaturi od 56°C.
- 4) Nakon inkubacije dodato je 200 μ L etanola (96-100%), vorteksovano i potom kratkotrajno centrifugirano.
- 5) Dobijena smeša prebačena je u QIAamp Mini kolonu sa tubicom za prikupljanje filtrata i centrifugirana na 8000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.
- 6) Nakon završenog centrifugiranja smeša je prebačena u novu QIAamp Mini kolonu.
- 7) U novu QIAamp Mini kolonu dodato je 500 μ l AW1 pufera i centrifugirano na 8000 rpm u trajanju od 1 minuta na sobnoj temperaturi.
- 8) Posle centrifugiranja QIAamp Mini kolona je izvađena i prebačena u novu tubicu za prikupljanje filtrata.
- 9) U novu tubicu potom je dodato i 500 μ L AW1 pufera i centrifugirano na 14 000 rpm tokom 3 minuta na sobnoj temperaturi.
- 10) Po završenom centrifugiranju QIAamp Mini kolona je izvađena i premeštena u novu plastičnu tubicu čija je zapremina iznosila 1,5 ml.
- 11) Dodato je 30 μ L AE pufera direktno na membranu kolone i inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirano 1 minut na 8000 rpm.

Ekstrahovana DNK korišćena je za PCR reakciju ili je zamrzavana na -20°C do izvođenja PCR.

3.2.2. Dokazivanje HPV DNK PCR metodom

Dokazivanje prisustva HPV u uzorku *in house* PCR metodom korišćeni su konsenzus prajmeri za dokazivanje regiona 450 bp L1 i E1 gena.

3.2.2.1. HPV PCR za L1 gen

Za dokazivanje HPV L1 gena korišćeni su prajmeri (Remmerbach i sar., 2004):

- MY09 oligonukleotidne sekvence 5`CGTCCMARRGGAWACTGATC 3`
i
- MY11 prajmer 5` GCMCAGGGWCTATAAYAATGG 3`.

Svi reagensi koji su bili neophodni za PCR reakciju, kao i uzorci ekstrahovane DNK otapani su na ledu i pre upotrebe vorteksovani. Kako bi se sprečila kontaminacija, procedura pripreme PCR reakcije smeše rađena je u laminarnoj komori uz korišćenje filter nastavaka različitih zapremina i sterilnih plastičnih tubica od 0,2 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany).

PCR reakciona smeša imala je zapreminu od 25 μ l i sadržala je:

- 12,5 μ l Taq PCR Master Mix -250 U (QIAGEN Inc., USA),
- 1 μ l prajmera MY09,
- 1 μ l prajmera MY11,
- 5 μ l ekstrahovane DNK,
- 5 μ l H₂O.

Uz uzorke su u cilju kontrolereakcije pripremane pozitivna kontrola (HPV DNK) i negativna kontrola (bez DNK). Amplifikacija se odvijala u PCR termosajkleru (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany).

PCR protokol za amplifikaciju sastojao se od (Gravitt i sar., 2000):

1. početne denaturacije u trajanju od 5 minuta na 95°C,
2. replikacionih ciklusa koji su se ponavljali 40 puta i koji su se odvijali u tri koraka:
 - denaturacija DNK u trajanju od 30 s na 94°C,
 - vezivanje prajmera u trajanju od 30 s na 58°C,

- ekstenzija lanca u trajanju od 1 minut na 72°C
- 3. dodatne ekstenzije lanca u trajanju od 20 minuta na 72°C.
- 4. završetak reakcije na 4°C.

Dobijeni PCR produkti su nakon završetka reakcije odmah analizirani ili čuvani na +4°C kraći vremenski period do analize ili na -20°C tokom dužeg vremenskog perioda.

3.2.2.2. HPV PCR za E1 gen

Dokazivanje HPV E1 gena takođe je izvršeno pomoću dva seta prajmera:

- GP1 oligonukleotidne sekvence 5' TGGTACAATGGGCATATGAT 3' i
- GP2 oligonukleotidne sekvence 5' ATAATGGCTTTTGGAAATTACA 3'.

Svi reagensi koji su bili neophodni za PCR reakciju, kao i uzorci ekstrahovane DNK, otapani su na ledu i pre upotrebe vorteksovani. Kako bi se sprečila kontaminacija, procedura pripreme PCR reakcione smeše rađena je u laminarnoj komori uz korišćenje filter nastavaka različitih zapremina i sterilnih plastičnih tubica od 0,2 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Zapremina reakcione smeše iznosila je 25 μ l i sadržala je:

- 12,5 μ l PCR Master Mix -250 U (QIAGEN Inc., USA),
- 1 μ l prajmera GP1,
- 1 μ l prajmera GP2,
- 5 μ l ekstrahovane DNK,
- 5 μ mol H₂O.

Uz uzorke je u cilju kontrole procedure pripremana i negativna kontrola (bez DNK) kao i pozitivna kontrola (HPV DNK). PCR procedura je rađena u PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany).

PCR protokol za amplifikaciju rađen je po sledećem protokolu (Azzimonti i sar., 1999):

1. početna denaturacija na 85° C u trajanju od 10 minuta,

2. replikacioni ciklusi koji su se ponavljali 40 puta i koji su se odvijali u tri koraka:
 - denaturacija DNK u trajanju od 1 min na 94°C,
 - vezivanje prajmera u trajanju od 1 min na 50°C,
 - ekstenzija lanca u trajanju od 90 s na 72°C.
3. dodatna ekstenzija lanca u trajanju od 10 minuta na 72°C,
4. završetak reakcije na 4°C.

Dobijeni PCR produkti su nakon završetka reakcije odmah analizirani ili na čuvani +4°C kraći vremenski period do analize ili na -20°C tokom dužeg vremenskog perioda ukoliko je to bilo potrebno (Knežević, 2008).

3.3.2.3. Vizualizacija PCR produkata metodom elektroforeze

Vizualizacija PCR produkata izvršena je elektroforezom u 3% agaroznom gelu sa dodatkom etidijum bromida. Izvođenje elektroforeze izvršeno je pomoću sledećih reagenasa:

- Agaroz (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).
- 1x Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).
- Etidijum-bromid, vodeni rastvor - 10mg/ml (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).
- DNK Standard 100bp (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).
- 5x Pufer za punjenje - *Loading buffer* (2,5 g saharoze, 1 ml 2,5% rastvora Bromophenol Blue, u 10ml destilovane H₂O).

Vizuelizacija PCR produkata amplifikacije regiona L1 i E1 gena dužine približno 450 bp, izvršena je elektroforezom u 3% rastvor agaroze u TAE puferu sa dodatkom etidijum-bromida (1 μ l/100ml TAE pufera) pod UV svetlom. Postupak gel elektroforeze je podrazumevao da se 8 μ l svakog amplikona - uzorka pomeša sa po 2 μ l 5x pufera za punjenje (*loading buffer*). Uporedno sa ovim uzorcima pripreman je standard DNK (*ladder* - komercijani regens koji predstavlja mešavinu DNK poznatih veličina čiji seprodukti izdvajaju na po 100 bp) (Jovanović i sar., 2005), tako što je 5 μ l standarda pomešano sa 2 μ l 5x pufera za punjenje. U prethodno pripremljeni gel koji je postavljen

Materijal i metodologija u sud za elektroforezu potom su sipani produkti ili amlikoni i DNK standard. Elektroforeza je izvođena pri naponu od 75V - 100V u trajanju od 45-60 minuta.

Nakon završetka elektroforeze agarozni gel osvetljen je UV svetlom u tamnoj komori i analiziran na prisustvo/odsustvo amplifikovanih segmenata L1 i E1 gena. Veličina amplifikata za L1 i E1 gen iznosila je približno 450 bp. Svaki amplifikat ove dužine koji je detektovan u agaroznom gelu smatran je pozitivnim rezultatom.

Pozitivni produkti amplifikacije odmah su korišćeni za HPV genotipizaciju metodom DNK sekvencioniranja ili su zamrzavani na -20°C do dalje obrade.

3.2.3. Genotipizacija HPV DNK metodom DNK sekvenciranja L1 i E1 gena

Uzorci kod kojih je dobijen pozitivan rezultat dalje su korišćeni za određivanje HPV genotipa. HPV genotipizacija izvedena je sekvenciranjem DNK metodom završetka lanca, primenom didezoksiribonukleotida obeleženih fluorescentnim bojama (Remmerbach i sar., 2004).

Celokupna procedura sastojala se iz prečišćavanja pozitivnih PCR produkata DNK i naknadnog cikličnog sekvenciranja. Proces prečišćavanja izvršen je pomoću Qiagen MinElute PCR Purification seta za prečišćavanje (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) prema protokolu proizvođača uz određene modifikacije. Reagensi koji su bili neophodni za prečišćavanje pripremljeni su prema uputstvu proizvođača.

Procedura prečišćavanja produkata sastojala se iz sledećih koraka:

- U tubicu u kojoj su se nalazili PCR produkti dodavano je 75 μ l PBI pufera i potom pažljivo promešano.
- Smeša je zatim prenošena u MinElute kolonu sa tubicom za prikupljanje filtrata i centrifugirana na 14000 rpm u trajanju od 1 minuta na sobnoj temperaturi.
- Po završetku centrifugiranja filtrat je odbacivan, a u MinElute kolonu dodavano je 750 μ l PE pufera i potom ponovo centrifugirano na 14000 rpm u trajanju od 1 minuta na sobnoj temperaturi.
- Nakon ponovnog centrifugiranja filtrat je odbacivan, a MinElute kolonu je dodatno centrifugirana na 24000 rpm u trajanju od 1 minuta na sobnoj temperaturi.

- Po završetku ovog procesa MinElute kolona je izvađena i prebačena u čistu tubicu zapremine 1,5 ml.
- U novu tubicu dodavano je 10 μ l EB pufera direktno na membranu i potom inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi, a onda jedan 1 centrifugirano na 14000 rpm.

Dobijeni prečišćeni produkti su nakon završetka reakcije odmah korišćeni za DNK sekvenciranje ili su zamrzavani na -20°C tokom dužeg vremenskog perioda.

3.2.3.1. HPV sekvenciranje L1 gena

Prečišćeni PCR produkti naknadno su sekvencirani pomoću Big Die Terminator 3.1. Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) upotrebom istih setova prajmera koji su korišćeni i za PCR (Remmerbch i sar., 2004). Sekvencioniranje je urađeno prema protokolu proizvođača, uz određene modifikacije i vršeno je za svaki lanac posebno, odnosno, pripremane su dve smeše koje su sadržale po jedan prajmer.

U reakciji sekvenciranja L1 gena upotrebljeni su sledeći reagensi:

- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- MY09 ili MY11 prajmeri (Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany)
- Molecular Biology Grade H₂O (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Za svaki od prajmera pripremljena je po jedna reakciona smeša. Zapremina smeše po uzorku iznosila je 15 μ l i sastojala se iz:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| • Big Dye Terminator Mix | 4 μ L |
| • Big Dye Terminator pufer | 1 μ L |
| • MY09 ili MY11 | 1,25 μ L (konc. 1mmol) |
| • H ₂ O | 6,75 μ L |
| • Prečišćen L1 gen HPV DNK | 2 μ L |

U PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) izvršena je reakcija cikličnog umnožavanja koja se sastojala iz:

- a) početne denaturacija na 96°C u trajanju od 1 minut;
- b) replikacionih ciklusa koji su se ponavljali 30 puta, a koji su se odvijali u tri koraka: denaturacije DNK u trajanju od 10 sekundi na 96°C, vezivanja prajmera u trajanju od 5 sekundi na 55°C i ekstenzije DNK lanca u trajanju od 4 minuta na 60°C;
- c) završetak reakcije na 4°C.

Po završenoj reakciji, dobijeni produkti cikličnog umnožavanja su odmah prečišćeni ili zamrzavani na -20°C ne duže od 3 dana.

3.2.3.2. HPV sekvenciranje E1 gena

Za HPV DNK sekvenciranje E1 gena korišćen je Big Die Terminator 3.1. Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA USA) upotrebom istih setova prajmera koji su korišćeni i za PCR. Sekvencioniranje je urađeno prema protokolu proizvođača, uz određene modifikacije i vršeno je za svaki lanac posebno, odnosno, pripremane su dve smeše koje su sadržale po jedan prajmer.

U reakciji sekvenciranja E1 gena upotrebljeni su sledeći reagensi:

- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- P1 ili P2 prajmeri (Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany)
- Molecular Biology Grade H₂O (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Za svaki od prajmera priprema se po jedna reakciona smeša. Zapremina smeše po uzorku iznosila je 15 μ l, a smeša se sastojala iz:

- Big Dye Terminator Mix 4 μ L
- Big Dye Terminator pufer 1 μ L
- P1 ili P2 1,25 μ L (konc. 1mmol)
- H₂O 5,5 μ L
- Prečišćen L1 gen HPV DNK 2 μ L

U PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) izvršena je reakcija cikličnog umnožavanja koja se sastojala iz:

- a) početne denaturacija na 96°C u trajanju od 1 minut;
- b) replikacionih ciklusa koji su se ponavljali 30 puta, a koji su se odvijali u tri koraka: denaturacije DNK u trajanju od 10 sekundi na 96°C, vezivanja prajmera u trajanju od 5 sekundi na 50°C i ekstenzije DNK lanca u trajanju od 4 minuta na 60°C;
- c) završetka reakcije na 4°C.

Po završenoj reakciji, dobijeni produkti cikličnog umnožavanja su odmah prečišćeni ili zamrzavani na -20°C ne duže od 3 dana.

3.2.3.3. Analiza HPV DNK L1 i E1 sekvenci

Analiza produkata cikličnog umnožavanja HPV DNK L1 i E1 gena izvršena je u sekvenatoru ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sekvenciranje je urađeno prema protokolu proizvođača uz određene modifikacije. Produkti cikličnog umnožavanja prethodno su prečišćeni primenom izopropanola.

Procedura prečišćavanja obuhvatala je:

1. U tubicu u kojoj su se nalazili produkti cikličnog umnožavanja dodato je 80 μ l 75% izopropanola i potom pažljivo promešano.
2. Inkubiranje je vršeno na sobnoj temperaturi u mraku u trajanju od 15 minuta.
3. Po završenoj inkubaciji tubice su centrifugirane na 2000 rpm na sobnoj temperaturi u trajanju od 45 minuta.
4. Nakon centrifugiranja filtrat je odbačen, a tubice su okrenute naopako i centrifugirane na 700 rpm na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minuta.
5. Nakon centrifugiranja tubice su osušene na vazduhu u mraku.

Dobijeni PCR produkti su odmah korišćeni za analizu sekvenci ili su zamrzavani na -20°C (prethodno uvijane u providnu i aluminijumsku foliju) do 7 dana.

Po završetku prečišćavanja u svaki uzorak dodato je 10 μ l Hi-Di TM formamida (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a nakon toga izvršena je denaturacija po sledećem protokolu: 2 minuta na 95°C i 2 minuta na 4°C. Nakon završene denaturacije uzorci su stavljeni u sekvenator.

Dobijeni produkti analizirani su i obrađeni pomoću softverskog programa Sequence Analysis 5.1. softwer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) u kome su nukleotidne sekvence bile predstavljene pomoću elektroferograma.

Dobijene nukleotidne sekvence za L1 i E1 gen HPV DNK u vidu elektroferograma analizirane su u cilju procene kvaliteta sekvenciranja. Prisustvo pojedinačnih pikova ukazivalo je na postojanje infekcije jednim HPV tipom, dok su dvoznačni pikovi i pikovi koji su se preklapali tumačeni kao mešovita infekcija sa više tipova HPV (Remmerbach i sar., 2004; Molijin i sar., 2005).

Uzorci su prvo međusobno upoređivani s obzirom na to da je za svaki od uzoraka rađena sekvenca u oba pravca. Potom su upoređivani sa poznatim HPV referentnim sojevima i dokumentovanim virusnim sekvencama koje su dostupne u GeneBank bazi podataka (NCBI, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) pomoću BLAST programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Nukleotidna sekvenca je dodeljena određenom HPV tipu ukoliko se poklapala više od 95% sa referentnim sojem HPV i imala dužinu od 291 bp. Kod mešovite infekcije dominantni HPV tip određivan je na isti način. Ukoliko je sličnost sa poznatim HPV genotipom iznosila manje od 95%, rezultat je tumačen kao prisustvo mešovite infekcije bez dominantnog genotipa (Remmerbach i sar., 2004; Molijin i sar., 2005).

3.2.4. Genotipizacija HR-HPV komercijanim testom - Sacacce

Postupak HPV genotipizacije urađen je i komercijalnim testom Sacacce (Sacacce Biotechnologies, HPV High Risk Screen). Uzorci za ovaj postupak su predstavljali HPV pozitivni produkti koji su dobijeni nakon amplifikacije HPV DNK PCR *in house* metodom skrininga za L1 i E1 gen.

U reakciji genotipizacije HR-HPV upotrebljeni su:

- PCR-mix-1 “16-35” - (sadrži prajmere za sledeće HPV tipove - 16/31/33/35 i interna kontrola) 0,275 mL
- PCR-mix-1 “18-59” - (sadrži prajmere za sledeće HPV tipove - 18/39/45/59 i interna kontrola) 0,275 mL

- PCR-mix-1 “52-66” - (sadrži prajmere za sledeće HPV tipove -52/56/58/66i interna kontrola) 0,275 mL

Za svaki od uzoraka pripremana je posebna reakciona smeša koja je bila sastavljena od:

- PCR-mix-1(2,3) 5 μ l
- 2,5 x pufer 10 μ l
- TaqF polimeraza 0,5 μ l

U svaku tubicu sipano je 15 μ l reakcione smeše i potom dodata po jedna kap mineralnog ulja (25 μ l) i 10 μ l ekstrahovane DNK. Uporedno sa ovim pripremane su i:

- negativna kontrola koja je sadržala 10 μ l DNK buffer-a,
- unutrašnja kontrola koja je sadržala 10 μ l β -globinskog gena,
- tri različite pozitivne kontrole:
 - 10 μ l PCR-mix-1 “16-35” - HPV 16/31/33/35 DNA (C+),
 - 10 μ l PCR-mix-1 “18-59” - HPV 18/39/45/59 DNA (C+),
 - 10 μ l PCR-mix-1 “52-66” - HPV 52/56/58/66 DNA (C+).

Amplifikacija uzoraka urađena je u PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany), po protokolu proizvođača:

- a) inicijalna denaturacija na temperaturi od 95°C tokom 15 minuta;
- b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 42 puta, a obuhvata tri koraka:
 - denaturacija na temperaturi od 95°C tokom 30 sekundi;
 - vezivanje prajmera na temperaturi od 63°C tokom 40 sekundi;
 - ekstenzija DNK lanca na temperaturi od 72°C tokom 50 sekundi;
- c) finalna ekstenzija DNK lanca na temperaturi od 72°C tokom 1 minuta i
- d) završetak reakcije na 10°C.

Analiza specifičnih produkata amplifikacije bila je zasnovana na prisustvu/odsustvu specifičnih traka amplifikovane DNK u 3% agaroznom gelu. Pozitivnim rezultatom smatrani su oni amplifikati čija je dužina prikazana u tabeli 3.

Tabela 3. Dužina specifičnih DNK amplifikata

PCR-mix-1 "16-35"			PCR-mix-1 "18-59"			PCR-mix-1 "52-66"		
Tip	Dužina	IC	Tip	Dužina	IC	Tip	Dužina	IC
HPV-16	325 bp	723 bp	HPV-18	425 bp	723 bp	HPV-52	360 bp	723 bp
HPV-31	520 bp		HPV-39	340 bp		HPV-56	325 bp	
HPV-33	227 bp		HPV-45	475 bp		HPV-58	240 bp	
HPV-35	280 bp		HPV-59	395 bp		HPV-66	304 bp	

3.2.5. Dokazivanje polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12B

3.2.5.1. Izolacija DNK iz uzoraka krvi za dokazivanje genskog profila

Za izolaciju DNK iz krvi ispitanika korišćen je GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača. Pre početka izolacije puferima za ispiranje (engl. *Wash buffer* - WB) WB I i WB II dodata je propisana količina 100% etanola. Krv u „vakutainer“ epruvetama je promešana okretanjem epruvete gore-dole osam puta nakon čega je iz svake uzimano po 200 μ l krvi i prenošeno u obeležene ependorf epruvete zapremine 1,5 ml (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Zatim je svakom uzorku dodavano po 400 μ l rastvora za liziranje i 20 μ l proteinaze K. Nakon toga, svi uzorci su kratko i energično izmešani na vorteks mešalici i inkubirani 10 minuta u vodenom kupatilu na 56°C uz povremeno mešanje (2-3 puta) okretanjem epruveta gore-dole. U svaki uzorak je potom dodavano po 200 μ l 96% etanola, a zatim je smeša energično mešana. Nakon toga, sav sadržaj je prebacivan u prethodno obeležene kolonice koje su bile ubačene u ependorf epruvete od 2 ml sa odsečenim poklopcem (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Sadržaj kolonica je potom centrifugiran 1 minut na 6000 rpm nakon čega su kolonice sa vezanom DNK prebacivane u kivete za otpad koje su sastavni deo GeneJet Genomic DNA Purification kompleta. DNK vezane za matriks kolona su ispirane dodavanjem po 500 μ l WB I i centrifugiranjem kolona u trajanju od 1 minut na 8000 rpm. Sadržaj kiveti za otpad je zatim odlivan, a u kolone je dodavano po 500 μ l WB II. Nakon toga, kolone su centrifugirane 3 minuta na 14 000 rpm, a ukoliko bi u njima ostalo još tečnosti, centrifugiranje je ponavljano još 1 minut na istoj brzini nakon pražnjenja kiveti za

Materijal i metodologija otpad. Kolone sa vezanom DNK su prebacivane u nove obeležene Eppendorf „Safe Lock“ epruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka) i pristupalo se izdvajanju DNK vezane za matriks kolone na sledeći način: u svaku kolonu je dodavano 200 μ l pufera za rastvaranje DNK, zatim su kolone inkubirane 2 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 1 minut na 8000 rpm. Izolovanim DNK je zatim spektrofotometrijski određivana koncentracija i čistoća.

3.2.5.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

Uzorak od 8 μ l izolovane DNK nanošen je u mikrokivetu Gene Quant Pro Calculatora (LKB Pharmacia, Uppsala, Švedska), a zatim su očitavane vrednosti apsorpcije na 230, 260, 280 i 320 nm. Čistoća DNK je procenjivana na osnovu vrednosti količnika apsorpcija na 260 nm i 280 nm (260/280) i apsorpcija na 260 nm i 230 nm (260/230). Prihvatljivi opsezi/vrednosti su bili između 1,65 i 1,85 (260/280) odnosno $> 1,2$ (260/230). U suprotnom, ponavljana je izolacija DNK iz uzorka krvi. Vrednosti koncentracije izolovane DNK su bile od oko 20 ng/ μ l. Iz izolovane DNK uzimani su uzorci od 500 ng i dopunjavani vodom do zapremine od 125 μ l čime su dobijana razblaženja od 4 ng/ μ l koja su korišćena za određivanje polimorfizama. Ostatak DNK je čuvan na -20°C .

3.2.5.3. Detekcija i analiza polimorfizama gena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (*Real-time PCR*)

Jedna od metoda za detekciju SNP-ova jeste i PCR u realnom vremenu sa primenom TaqMan eseja. PCR u realnom vremenu (kvantitativni PCR) predstavlja modifikaciju konvencionalnog PCR-a gde se dinamika amplifikacije meri u realnom vremenu nakon svakog PCR ciklusa. U PCR reakciji koriste se, pored prajmera, i alel specifične oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obeležene različitim fluorescentnim bojama (reporter boje npr. VIC, FAM) dok se na njihovom 3' kraju nalazi prigušivač (*quencher*) koji blokira emisiju fluorescencije. Tokom PCR reakcije u fazi vezivanja prajmera po principu komplementarnosti se za ciljnu sekvencu DNK vezuje i jedna od proba. Nakon toga, u fazi kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide dolazi do uklanjanja probe 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću enzima. Kako se najpre odvaja 5' nukleotid sa reporterom, usled njegovog udaljavanja od prigušivača boja

Materijal i metodologija počinje da fluorescira, što se registruje pomoću odgovarajućeg detektora u aparatu. Iz ciklusa u ciklus raste intenzitet fluorescencije, što omogućava da se u realnom vremenu prati dinamika PCR reakcije. Na kraju PCR reakcije detektovano značajno povećanje fluorescencije samo jedne od boja ukazuje na homozigotno stanje za dati alel, dok povećanje fluorescencije obe boje ukazuje na heterozigotno stanje.

Za detekciju i analizu polimorfizama gena TNF- α i IL-12 u genomu ispitanica primenjena je TaqMan metoda korišćenjem komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida i to za TNF- α rs1800629 (#C__514879_10) i IL-12 rs3212227 (#C__2084293_10) (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) prema preporukama proizvođača reagensa. Amplifikacija je vršena u optičkim pločama za PCR, formata 8 x 12 bunarčića (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), u koje su sipane reakcione smeše od 5 μ l 2 x Real Master Mix Probe (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 0,25 μ l komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju navedenih polimorfizama i 4,75 μ l ispitivanog DNK uzorka (4 ng/ μ l). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), kratko centrifugirane na 1500g i smeštane u termoblok Realplex2 PCR mašine (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec \rightarrow 60°C 1 minut sa 40 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 60°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

Za polimorfizam IFN- γ (-874 T/A; rs2430561), s obzirom da nisu postojali komercijalno dostupni oligonukleotidi, korišćena je smeša oligonukleotida koja je posebno dizajnirana uz optimizovanje uslova za amplifikaciju i razlikovanje alela po protokolu koji je prethodno opisan u Popadić D. i autori (600 nM F / 600 nM R / 250 nM A TaqMan proba / 400 nM T TaqMan proba, finalne koncentracije). Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec \rightarrow 55°C 1 minut \rightarrow 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°. Po završetku

Materijal i metodologija amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

3.2.6. Statistička obrada

Prikupljeni podaci su sistematizovani i obrađeni na personalnom računaru uz primenu standardnih statističkih procedura (SPSS ver 19.0 IBM Corp). U analizi su razmatrani relevantni parametri i obeležja definisani ciljevima istraživanja i pretpostavljenim hipotezama.

Primenjene su sledeće metode statističke obrade:

- prikupljanje i statističko sređivanje podataka,
- tabelarno-grafičko predstavljanje rezultata.

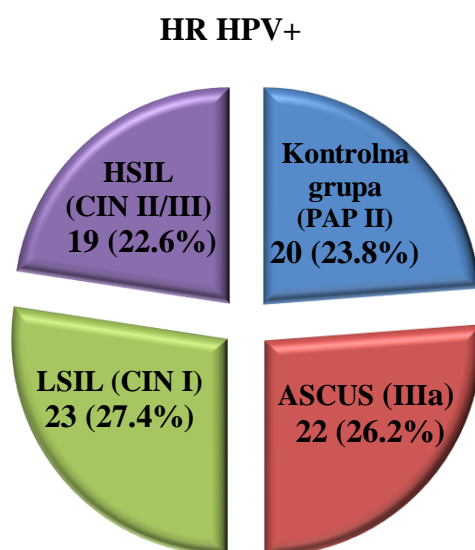
Analiza signifikantnosti razlika obeležja izvršena je primenom parametarskih i neparametarskih testova:

- χ^2 (Che Square) test,
- Fisher-ov exact test
- Student-ov t-test,
- ANOVA-jednofaktorskaanaliza,
- Mann-Whitney U-test,
- Kruskal Wallis test.

Primenjene su i korelaciona analiza (Pearson-ov/Spearman-ov koeficijent korelacije) i multipla regresiona analiza. Testiranje značajnosti razlika izvršeno je na nivou verovatnoće $p < 0.05$.

4. Rezultati

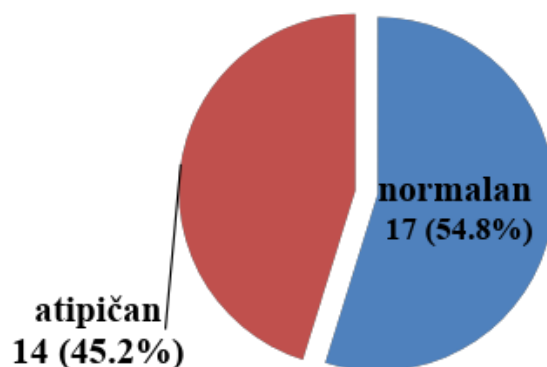
Sprovedeno istraživanje obuhvatilo je 541 ženu, među kojima je kod 84 ispitanice (15,5%) registrovana infekcija visoko onkogenim HPV (HR- HPV). Dalja istraživanja definisana ciljevima su se odnosila na HR HPV pozitivne pacijentkinje. Grupa ispitanica sa HR-HPV potom je podeljena u četiri podgrupe prema rezultatu citološkog nalaza na cerviksu. Raspodela žena po ovim podgrupama prikazana je na Grafikonu 1. Kontrolnu grupu činile su žene sa normalnim nalazom na cerviksu (PAP II); drugu podrgrupu činile su žene kod kojih je citološki nalaz atipičnih ćelija nepoznatog porekla definisan kao ASCUS; treću grupu činile su pacijentkinje sa LSIL nalazom (CIN I), a četvrtu grupu pacijentkinje sa HSIL nalazom (CIN II/III).



Grafikon 1. Raspodela u ispitivanim grupama prema citološkom nalazu

Pored prvobitne raspodele, podela ispitanica sa HR-HPV izvršena je i prema rezultatu kolposkopskog nalaza. Prvu grupu činile su ispitanice kod kojih je nalaz bio normalan (54,8%), dok su drugu grupu činile one ispitanice koje su imale atipičan nalaz (45,2%). Ovi rezultati prikazani su na Grafikonu 2.

KOLPOSKOPSKI NALAZ



Grafikon 2. Raspodela u ispitivanim grupama prema kolposkopskom nalazu

4.1. Demografske karakteristike pacijentkinja

Najmlađa žena u studiji imala je 20 godina, a najstarija 73 godine. Žene sa normalnim citološkim nalazom su bile najmlađe među svim pacijentkinjama prosečne starosne dobi od $34,5 \pm 8,2$ godina, dok su žene koje su imale ASCUS bile prosečne starosti $37,1 \pm 9,0$, što nije značajno različito u odnosu na grupu žena sa blagim stepenom CIN koje su u proseku imale $37,4 \pm 9,5$ godina. Žene sa najtežim oblicima CIN bile su signifikantno starije u odnosu na druge grupe, a njihova prosečna starosna dob iznosila je $46,7 \pm 12,2$ (Tabela 4).

Signifikantan broj žena potiče iz gradske sredine, pre svega iz Beograda i po pitanju ove demografske karakteristike sve upoređivane grupe su slične. Distribucija ispitanica prema stepenu školske spremne pokazuje da su žene sa HSIL najčešće srednjeg nivoa obrazovanja, a u značajno malom broju slučajeva sa visokom stručnom spremom.

Sličnost ispitivanih podgrupa uočena je i u raspodelama ispitanica po bračnom i socijalnom statusu. Nešto veća učestalost nezaposlenosti registrovana je kod žena sa HSIL nalazom, međutim ova razlika nije bila statistički značajna (Tabela 4).

Tabela 4. Demografske karakteristike u ispitivanim grupama

	<i>grupa HR-HPV+ citološki nalaz</i>				<i>p</i>
	<i>PAP II (Control)</i>	<i>ASCUS</i>	<i>LSIL</i>	<i>HSIL</i>	
<i>starosna dob</i>	34.5 \pm 8.2	37.1 \pm 9.0	37.4 \pm 9.5	46.7\pm12.2	0.007*
<i>mesto stanovanja</i>					
<i>Beograd</i>	15 (75.0)	19 (86.4)	16 (69.6)	13 (68.4)	0.507
<i>drugi grad</i>	3 (15.0)	2 (9.1)	5 (21.7)	3 (15.8)	
<i>Selo</i>	2 (10.0)	1 (4.5)	2 (8.7)	3 (15.8)	
<i>školska sprema</i>					
<i>Niža</i>	2 (10.0)	1 (4.5)	2 (8.7)	4 (21.1)	0.045*
<i>Srednja</i>	7 (35.0)	10 (45.5)	13 (56.5)	12 (63.2)	
<i>Visoka</i>	11 (55.0)	11 (50.0)	8 (34.8)	3 (15.8)	
<i>bračni status</i>					
<i>Udata</i>	9 (45.0)	11 (50.0)	13 (56.5)	11 (57.9)	0.183
<i>neudata</i>	11 (55.0)	10 (45.5)	10 (43.5)	3 (15.8)	
<i>razvedena</i>	0 (0)	1 (4.5)	0 (0)	5 (26.3)	
<i>socijalni status</i>					
<i>zaposlena</i>	12 (60.0)	18 (81.8)	19 (82.6)	11 (57.9)	0.139
<i>nezaposlena</i>	8 (40.0)	4 (18.2)	4 (17.4)	8 (42.1)	

*. significantno $p < 0.05$, Chi-Square-Fisher's Exact Test, One-Way ANOVA, Student's t-test $sr \pm sd$, $n(\%)$.

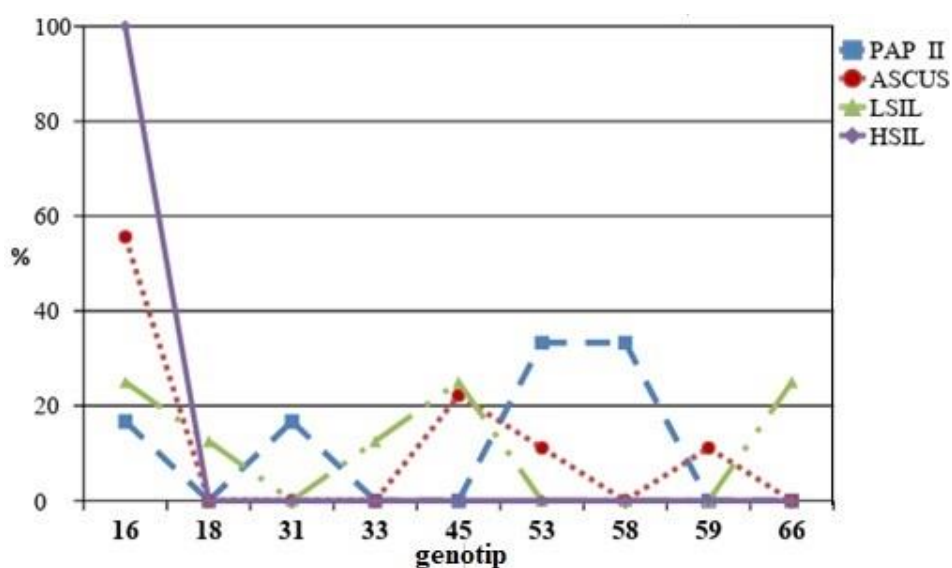
4.2. Distribucija HR-HPV genotipova i njihova korelacija sa citološkim i kolposkopskim nalazom

Na grafikonu 3 i tabeli 5 prikazana je distribucija rezultata genotipizacije 12 detektovanih HPV tipova prema definisanim podgrupama citološkog nalaza u ispitivanom uzorku pacijentkinja sa HPV infekcijom.

Najzastupljeniji genotip HPV bio je HR-HPV tip 16 koji je u ukupnom uzorku detektovan kod 42,9% slučajeva, a što je bilo bez značajne razlike u odnosu na pojavu ostalih HPV tipova zajedno. Drugi po učestalosti bio je HR-HPV tip 45 zastupljen u 15,5% slučajeva i tip 31 koji je detektovan kod 10,7% ispitanica. Svi ostali tipovi bili su zastupljeni sa znatno manjom učestalošću od 1,2% do 6%.

Testiranjem značajnosti razlika u raspodelama genotipova između podgrupa citološkog nalaza (PAP II, ASCUS, LSIL, HSIL) dokazuje se da ona postoji na signifikantnom nivou (Kruskal Wallis Test, $p < 0.001$).

HR-HPV tip 16 u podgrupi ispitanika sa HSIL nalazom bio je zastupljen u 89,5% slučajeva, dok je u ostalim podgrupama citološkog nalaza registrovan u oko 10% -50% slučajeva, što je statistički značajna učestalost. Međutim, razlika u raspodelama HPV genotipova između ostalih podgrupa citološkog nalaza (PAP II, ASCUS, LSIL) nije bila statistički značajna (Kruskal Wallis Test, $p = 0.136$).



Grafikon 3. Distribucija HPV genotipova prema citološkom nalazu

Tabela 5. Distribucija HR-HPV pozitivnih žena prema HPV genotipu

HPV Genotipovi	grupa HR-HPV+ citološki status					Ukupno
	PAP II (Kontrolna)	ASCUS	LSIL	HSIL		
16	2 (10.0)	11 (50.0)	6 (26.1)	17 (89.5)	36 (42.9)	
18	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (8.7)	2 (10.5)	4 (4.8)	
31	6 (30.0)	0 (0.0)	3 (13.0)	0 (0.0)	9 (10.7)	
33	2 (10.0)	1 (4.5)	1 (4.3)	0 (0.0)	4 (4.8)	
35	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.3)	0 (0.0)	1 (1.2)	
45	1 (5.0)	5 (22.7)	7 (30.4)	0 (0.0)	13 (15.5)	
52	2 (10.0)	3 (13.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.0)	
53	3 (15.0)	1 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (4.8)	
58	3 (15.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.6)	
59	0 (0.0)	1 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)	
62	1 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)	
66	0 (0.0)	0 (0.0)	3 13.0	0 (0.0)	3 (3.6)	

n(%)

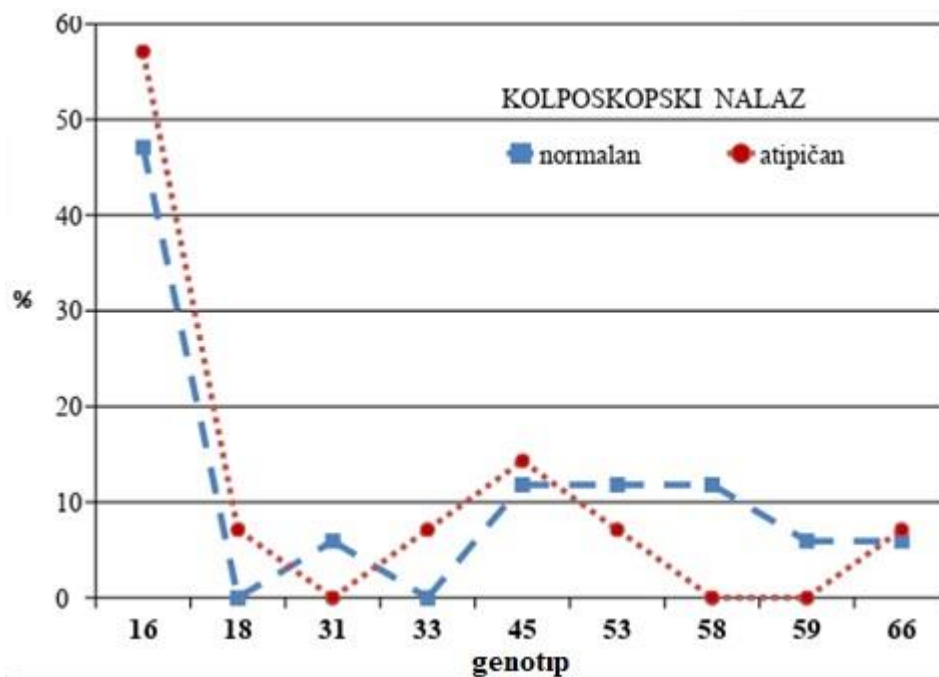
Distribucija rezultata genotipizacije detektovanih 12 HPV tipova prema kolposkopskom nalazu prikazana je na tabeli 6 i grafikonu 4.

HPV-16 dominantno je bio zastupljen u obe grupe kolposkopskog nalaza. Nešto veća učestalost pojave ovog genotipa pri atipičnom kolposkopskom rezultatu nije bila i statistički značajna. Upoređivanjem raspodela ovog i ostalih genotipova sa tabele 6 utvrđuje se da se one signifikantno ne razlikuju u odnosu na rezultat kolposkopskog nalaza: normalan ili atipičan, kod HR-HPV pozitivnih žena (Mann-Whitney U-test, $p=0.357$)

Tabela 6. Distribucija HPV genotipova prema kolposkopskom nalazu

HPV genotip	grupa HR-HPV+ kolposkopski nalaz	
	normalan	atipičan
16	8 47.1	8 57.1
18	0 0.0	1 7.1
31	1 5.9	0 0.0
33	0 0.0	1 7.1
45	2 11.8	2 14.3
53	2 11.8	1 7.1
58	2 11.8	0 0.0
59	1 5.9	0 0.0
66	1 5.9	1 7.1

n(%)



Grafikon 4. Distribucija HPV genotipova prema kolposkopskom nalazu

4.3. Polimorfizmi gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12

4.3.1. Raspodele i korelacije genotipova-polimorfizama

Distribucija genotipova i alela proinflamatornih citokina prema citološkom nalazu prikazana je na tabeli 7. Statističkim testiranjem značajnosti razlika između grupa pokazalo se da je u grupama različitog citološkog nalaza, jedino u slučajevima umerene i/ili teške cervikalne displazije, značajno veća učestalost visoke produkcije TNF- α gena (A alela, 75% , $p=0.010$).

Istovremeno, između ostalih grupa (PAP II, ASCUS, LSIL), raspodele alela proinflamatornih citokina TNF- α gena, ne razlikuju se značajno. Dominacija GG genotipa u oko 72% - 86% slučajeva i izuzetno retka pojava AA genotipa tipična je raspodela za ove citološke podgrupe.

U analiziranom uzorku nije dokazana značajna razlika u distribuciji gena IFN- γ i IL-12 koji kodiraju relevantne proinflamatorne citokine, prema kontrolnoj (PAP II) i ostalim grupama citološkog nalaza ($p=0.572$ i $p=0.513$).

Niska produkcija IFN- γ homozigotnog AA alela, koja bi prema postavljenoj hipotezi predstavljala povišen rizik za nastanak cervikalnog karcinoma, nešto je učestalija u ASCUS i LSIL cervikalnom nalazu (57,1% i 50% slučajeva). Heterozigotni AT alel preovlađuje u kontrolnoj, ali i grupi sa HSIL nalazom (71,4% i 100% slučajeva).

Slična je situacija i u raspodeli alela IL-12, koji u slučajevima PAP II (kontrolna grupa) ima najveću učestalost niske produkcije homozigotnog AA alela (71,4%), dok je i kod ASCUS ista učestalost AC alela ovog gena (71,4%). U citološkim nalazima LSIL i HSIL u 50% zastupljena je rizična, niska produkcija ovog IL-12.

Tabela 7. Distribucija genotipova i alela proinflamatornih citokina prema citološkom nalazu

Genotip (alel)	citološki nalaz								p
	PAP II		ASCUS		LSIL		HSIL		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
TNF- α GG GA AA [•]	6	85.7	5	71.4	5	83.3	0	0.0	0.010*
	1	14.3	2	28.6	0	0.0	1	25.0	
	0	0.0	0	0.0	1	16.7	3	75.0	
IFN- γ AA [°] AT TT	1	14.3	4	57.1	3	50.0	0	0.0	0.572
	5	71.4	2	28.6	1	16.7	4	100.0	
	1	14.3	1	14.3	2	33.3	0	0.0	
IL-12 AA [°] AC CC	5	71.4	2	28.6	3	50.0	2	50.0	0.513
	2	28.6	5	71.4	2	33.3	2	50.0	
	0	.0	0	.0	1	16.7	0	.0	

●.- visoka produkcija ○ - niska produkcija
p<0.05

*. signifikantno

U cilju postizanja bolje preglednosti raspodele i uticaja alela proinflamatornih citokina sa povišenim rizikom za nastanak promena na cerviksu, oni su grupisani u odnosu na njihove heterozigotne kombinacije i upoređeni u kontrolnoj naspram ostalih grupa citološkog nalaza (Tabela 8).

Očigledno je da se svi slučajevi visoke produkcije TNF- α gena javljaju van kontrolne grupe (100%) i to pri umerenoj i teškoj cervikalnoj displaziji, premda je visokosekretorni AA alela u kontrolnoj grupi zastupljen sa 65% slučajeva u odnosu na ostale grupe, tako da statistička značajnost ipak nije dokazana (p=0.160).

Niska produkcija AA alela proinflamatornih citokina IFN- γ gena koja bi mogla po hipotezi da ima veći rizik za prognozu cervikalnog karcinoma, u većem broju slučajeva zastupljena je pri svim citološkim nalazima (87,5%) u odnosu na normalan nalaz. Ni u ovom slučaju to nije statistički značajno veća učestalost u odnosu na nisku produkciju alela ovog gena (65% slučajeva) u kontrolnoj grupi (p=0.204).

Niska produkcija AA alela proinflammatoryh citokina IL-12 gena, u većem broju slučajeva zastupljena je u kontrolnoj grupi (83,3%) u odnosu na sve ostale cervikalne nalaze (58,3% - ASCUS, LSIL, HSIL). Razlika u učestalosti niske produkcije AA alela IL-12 gena između kontrolne i ostalih citoloških nalaza zajedno, ni u ovom slučaju, nije značajna ($p=0.178$).

Zaključuje se da je prezentovan uzorak ispitivanih polimorfizama citokinskih gena pružio pokazatelje o nekim od pretpostavljenih trendova produkcije koje bi mogle da imaju protektivni, odnosno favorizujući značaj, za nastanak karcinoma grlića materice udružen sa HR-HPV. Pri ovoj veličini uzorka distribucije genotipova i alela proinflammatoryh citokina nije bilo statistički signifikantnog pokazatelja o njihovoj protektivnoj ili favorizujućoj ulozi.

Tabela 8. Distribucija genotipova i alela proinflammatoryh citokina visoke i niske produkcije prema kontrolnoj grupi i ostalim citološkim nalazima

Genotip (alel)	kontrolna grupa i ostali nalazi			
	PAP II		ASCUS,LSIL,HSIL	
	N	%	N	%
TNF- α GG+GA	7	35.0	0	.0
AA [•]	13	65.0	4	100.0
IFN- γ AA [○]	10	62.5	7	87.5
AT+TT	6	37.5	1	12.5
IL-12 AA [○]	10	83.3	7	58.3
AC+CC	2	16.7	5	41.7

●.- visoka produkcija ○ - niska produkcija *. signifikantno $p<0.05$

U nastavku analize upoređivane su distribucije genotipova i alela proinflammatoryh citokina prema kolposkopskom nalazu. Utvrđeno je da se ni jedna od raspodela ne razlikuje značajno u odnosu na normalan ili atipičan kolposkopski nalaz (Tabela 9).

Tabela 9. Distribucija genotipova i alela proinflamatornih citokina prema kolposkopskom nalazu

Genotip (alel)	kolposkopski nalaz				p
	normalan		atipičan		
	N	%	N	%	
TNF- α GG	9	75.0	7	58.3	0.443
GA	2	16.7	2	16.7	
AA [•]	1	8.3	3	25.0	
IFN- γ AA [°]	5	41.7	3	25.0	0.391
AT	6	50.0	6	50.0	
TT	1	8.3	3	25.0	
IL-12 AA [°]	7	58.3	5	41.7	0.410
AC	5	41.7	6	50.0	
CC	0	.0	1	8.3	

●.- visoka produkcija ○ - niska produkcija *. signifikantno p<0.05

Kao što je prethodna analiza pokazala, na ispitivanom uzorku genskih polimorfizama proinflamatornih citokina nije utvrđena značajnija genska predispozicija koja bi mogla da nalaz određenog citokinskog profila poveže sa nastankom cervikalne bolesti udružene sa HR-HPV, osim prisustva TNF- α AA alela koji pokazuje značajniju povezanost sa progresijom promena u HSIL, pri HR-HPV infekciji.

4.4. Utvrđivanje i ispitivanje kofaktora rizika za nastanak cervikalne bolesti

Na osnovu anonimne pismene ankete, popunjavanjem upitnika koji je sadržao pored osnovnih podataka o pacijentu i socio-demografskih podataka, podatke o seksualnim i životnim navikama, kao i drugim kofaktorima od značaja za nastanak cervikalne bolesti udružene sa HR-HPV, izvršena je analiza faktora rizika za nastanak umerene/teške displazije po ispitivanim grupama (Tabela10).

Zastupljenost pušača bila je slična u svim podgrupama i iznosila je od 42% - 59%. Prosečan pušački period varirao je od 12 do 20 godina, s tim što je značajno najduži period registrovan u grupi ispitanica sa HSIL. Prosečan broj cigareta po danu kretao se od 14 do 18, što nije pokazano kao značajna razlika među grupama.

Prosečna uhranjenost ispitanica izraženakao BMI bila je najniža u kontrolnoj grupi kao i u grupi ispitanica sa ASCUS nalazom. Kod ispitanica sa LSIL i HSIL vrednosti BMI bile su signifikantno više i nalazile su se u kategoriji gojaznih.

Najveća učestalost neredovnih menstrualnih ciklusa registrovana je kod ispitanica sa HSIL cervikalnim nalazom i bila je značajno viša u odnosu na sve ostale upoređivane grupe, ali ova karakteristika može se objasniti i starosnom dobi kojoj većinom pripadaju žene iz ove grupe, s obzirom na to da je kod mlađih žena neredovan ciklus zabeležen u samo nekoliko slučajeva.

U kontrolnoj grupi ispitanica sa PAP II nalazom, upotreba kondoma kao metode kontracepcije bila je zastupljena u 70% slučajeva što je značajno više u odnosu na sve ostale grupe. Značajna karakteristika grupe ispitanica sa HSIL nalazom bila je odsustvo upotrebe bilo kakve vrste kontracepcije u odnosu na ostale grupe, a kada je kontracepcija bila primenjivana onda je to u vrlo malom broju slučajeva bila upotreba kondoma.

Ispitanice sa HR-HPV, bez obzira na citološki nalaz, imale su menarhu sa oko 13 godina, dok su prvi seksualni odnosi bili u starosnoj dobi između 18 - 19. godine života.

Učestalost većeg broja seksualnih partnera bila je svojstvena skoro svim ispitivanim grupama sa verovatnoćom od 50% do 55% slučajeva, jedino je u grupi pacijentkinja sa HSIL nalazom bila nešto ispod 40%. Ni u ovom slučaju se razlike između ispitivanih grupa nisu pokazale kao statistički značajne.

Prema broju porođaja, broju dece, broju abortusa i spontanih pobačaja, skoro sve ispitivane grupe bile su vrlo slične. Ispitanice sa HSIL nalazom u proseku su imale najveći broj porođaja i dece (median=2), što je primetno više u odnosu na ostale grupe, ali se na priloženom uzorku ispitanica nije pokazalo kao statistički značajna razlika. Veći broj porođaja i dece u ovoj grupi je na granici statističke značajnosti ($p=0.06$), imože se smatrati značajnim za prag pouzdanosti $p<0.10$ (Tabela 10).

Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom

Rezultati

Tabela 10. Analiza faktora rizika za nastanak umerene/teške displazije u ispitivanim grupama

	grupa HR-HPV+ citološki nalaz				p
	PAP II (Control)	ASCUS	LSIL	HSIL	
<i>Pušenje</i>					
Pušač	11 (55.0)	13 (59.1)	10 (43.5)	8 (42.1)	0.621
nepušač	9 (45.0)	9 (40.9)	13 (56.5)	11 (57.9)	
<i>dužina pušačkog staža</i>					
Godine	12.1 \pm 7.4	15.2 \pm 7.6	15.2 \pm 7.2	20.5\pm10.0	0.015*
<i>broj cigareta</i>					
Broj	13.9 \pm 4.5	13.9 \pm 4.4	15.2 \pm 6.4	18.4 \pm 5.9	0.175
<i>BMI</i>					
Index	21.5 \pm 2.2	24.7 \pm 2.9	26.5\pm3.4	26.0\pm3.9	0.001*
<i>Menarha</i>					
Godine	13.0 \pm 0.9	13.1 \pm 1.6	13.0 \pm 1.4	13.5 \pm 1.2	0.662
<i>redovnost ciklusa</i>					
Da	16 (80.0)	21 (95.5)	19 (82.6)	9 (47.4)	0.030*
Ne	4 (20.0)	1 (4.5)	4 (17.4)	10 (52.6)	
<i>prvi seksualni odnos</i>					
Godine	17.8 \pm 2.6	19.1 \pm 2.7	18.4 \pm 1.9	18.4 \pm 2.3	0.355
<i>zaštita od trudnoće</i>					
prekinuti snošaj	2 (10.0)	5 (22.7)	8 (34.8)	3 (15.8)	0.023*
kondom	14 (70.0)	7 (31.8)	4 (17.4)	2 (10.5)	
Spirala	0 (0)	2 (9.1)	2 (8.7)	1 (5.3)	
kontraceptivne pilule	1 (5.0)	1 (4.5)	2 (8.7)	2 (10.5)	
NE	3 (15.0)	7 (31.8)	7 (30.4)	11 (57.9)	
<i>broj seksualnih partnera</i>					
1	1 (5.0)	2 (9.1)	2 (8.7)	5 (26.3)	0.412
2	8 (40.0)	9 (40.9)	10 (43.5)	7 (36.8)	
3 i više	11 (55.0)	11 (50.0)	11 (47.8)	7 (36.8)	
<i>broj porođaja</i>	0 (02)	1 (03)	0 (01)	2 (03)	0.060
<i>broj dece</i>	0 (0 2)	1 (03)	0 (01)	2 (04)	0.060
<i>broj abortusa</i>	0 (0 2)	0 (01)	1 (02)	2 (0 3)	0.100
<i>broj spontanih pobačaja</i>	0 (00)	0 (02)	0 (01)	1 (01)	0.231

*. significantno p<0.05 , Kruskal Wallis Test, Chi-Square Test, One-Way ANOVA sr \pm sd, n(%), median (min max)

Ostali faktori rizika za nastanak cervikalne displazije prikazani na tabeli 11. Ovi faktori rizika odnose se na podatke o intervencijama na cerviksu, ranijim infekcijama i njihovom lečenju, drugim bolestima ispitanica i podacima o ginekološkim bolestima u porodici.

Lečenje od STD je u najmanjem broju slučajeva bilo zastupljeno u kontrolnoj grupi (10%). U ostalim grupama bilo je 16% - 22% ovih slučajeva, tako da se upoređivane grupe nisu značajno razlikovale.

Utvrđeno je da su ranije vaginalne infekcije kao i infekcije na grliću materice u signifikantno velikom broju slučajeva bile zastupljene kod žena koje su imale LSIL (73,9%), dok su kod ispitanica sa HSIL bile zastupljene u 57,9% slučajeva. Kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL učestalost je bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu.

Najveća učestalost rekurentnih genitalnih infekcija bila je zastupljena kod ispitanica sa LSIL nalazom i to signifikantno više u odnosu na sve ostale grupe.

Najveći broj ranije lečenih infekcija je utvrđen kod ispitanica sa LSIL i HSIL nalazom, što odgovara najvećem broju ranijih cervikalnih ili vaginalnih infekcija u ovim grupama. Ipak, primećuje se da je lečenje infekcija u odnosu na njihov razvoj izostalo u najvećem broju slučajeva u grupi žena sa LSIL nalazom u odnosu na druge grupe.

Ni za jednu od ispitivanih grupa nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na nalaz promena na grliću materice. Kod 59% - 78% žena koje su imale HR-HPV, bez obzira na citološki nalaz, zabeležena je barem jedna promena na cerviksu.

Intervencije na grliću materice su se sa signifikantno većom učestalošću javljale kod ispitanica sa HSIL, što je bila razlika u odnosu na ostale grupe.

Pojava ginekoloških bolesti u porodici najčešće je bila zabeležena kod ispitanica iz kontrolne grupe, a zatim kod ispitanica sa HSIL promenama, ali utvrđeno je da ta razlika nije bila statistički značajna.

Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom

Rezultati

U grupi ispitanica sa PAP II citološkim nalazom prisustvo drugih bolesti bilo je zastupljeno u 5% slučajeva, dok je u drugim grupama bilo zastupljeno u 22% - 37% slučajeva, tako da su se ove grupe signifikantno razlikovale u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 11. Analiza faktora rizika za nastanak umerene/teške displazije u ispitivanim grupama

	grupa HR-HPV+ citološki nalaz				p
	PAP II (Control)	ASCUS	LSIL	HSIL	
<i>ranije lečene od seksualno prenosivih bolesti</i>					
Da	2 (10.0)	4 (18.2)	5 (21.7)	3 (15.8)	0.712
Ne	18 (90.0)	18 (81.8)	18 (78.3)	16 (84.2)	
<i>ranije cervikalne ili vaginalne infekcije</i>					
Da	5 (25.0)	8 (36.4)	17 (73.9)	11 (57.9)	0.007*
Ne	15 (75.0)	14 (63.6)	6 (26.1)	8 (42.1)	
<i>učestale/ponovljene infekcije</i>					
Da	4 (20.0)	5 (22.7)	14 (60.9)	2 (10.5)	0.002*
Ne	16 (80.0)	17 (77.3)	9 (39.1)	17 (89.5)	
<i>ranije lečene infekcije</i>					
Da	5 (25.0)	8 (36.4)	11 (47.8)	10 (52.6)	0.154
Ne	15 (75.0)	14 (63.6)	12 (52.2)	9 (47.4)	
<i>promene na grliću materice</i>					
Da	13 (65.0)	13 (59.1)	18 (78.3)	12 (63.2)	0.559
Ne	7 (35.0)	9 (40.9)	5 (21.7)	7 (36.8)	
<i>intervencije na grliću materice</i>					
Da	4 (20.0)	6 (27.3)	4 (17.4)	12 (63.2)	0.006*
Ne	16 (80.0)	16 (72.7)	19 (82.6)	7 (36.8)	
<i>ginekološke bolesti u porodici</i>					
Da	9 (45.0)	4 (18.2)	4 (17.4)	7 (36.8)	0.123
Ne	11 (55.0)	18 (81.8)	19 (82.6)	12 (63.2)	
<i>druge bolesti</i>					
Da	1 (5.0)	7 (31.8)	5 (21.7)	7 (36.8)	0.039*
Ne	19 (95.0)	15 (68.2)	18 (78.3)	10 (63.2)	

*. significantno $p < 0.05$, Chi-Square Test
n(%)

4.4.1. Kofaktori koji utiču na nastanak nepovoljnog citološkog statusa

Daljom obradom podataka sve prethodno analizirane varijable su u svojstvu kofaktora razmatrane u vidu parametara koji predstavljaju meru njihove povezanosti sa različitim citološkim statusom (ASCUS, LSIL, HSIL) u poređenju sa kontrolnom grupom (PAP II).

Na grafikonu 5 prikazane su procenjene šanse (*odds ratios* - OR) i odgovarajući 95% intervali poverenja kao mere povezanosti varijabli različitih citoloških statusa prema kontrolnoj grupi. Prikazane su samo one varijable koje su značajne kao rizični faktori u narušavanju normalnog citološkog statusa u uslovima HR-HPV infekcije, odnosno, čije su OR i 95% CI vrednosti signifikantne ($p < 0.05$).

Upotreba kondoma razmatrana je u svojstvu protektivnog kofaktora u HR-HPV infekciji. Primetno je sa Grafikona 5 da je faktor od najvećeg uticaja pri bilo kojem neregularnom citološkom nalazu izostanak kondoma kao kontraceptivnog metoda, odnosno, ovaj vid zaštite bio je primenjivan u signifikantno manjem broju slučajeva, dok je izuzetno učestala primena ovog metoda kontracepcije u kontrolnoj grupi, sa normalnim citološkim nalazom (95%). Zbog izostanka primene kondoma povećava se šansa za nastanak cervikalne displazije HSIL preko 5 puta (OR=5.65, 95% CI 1.738-20.447), za nastanak LSIL-a šansa je povećana 4 puta (OR=4.02, 95% CI 1.579-10.260) i za nastanak ASCUSA-a oko 2 puta (OR=2.02, 95% CI 1.119-4.324) pri infekciji HR-HPV.

Gojaznost definisana sa BMI>25 je faktor koji uvećava šansu za LSIL i HSIL promene za 2-3 puta kod pacijentkinja sa HR-HPV. Osim toga, starosna dob je kod HSIL nalaza faktor koji, uz gojaznost, na sličan način povećava rizik

U odnosu na normalan cervikalni status, pri HR-HPV infekciji, kod LSIL promena dominiraju ranije vaginalne infekcije i infekcije grlića materice za koje je izostalo lečenje i koje su se ponavljale, što povećava šansu za LSIL promenama za 2-3 puta.

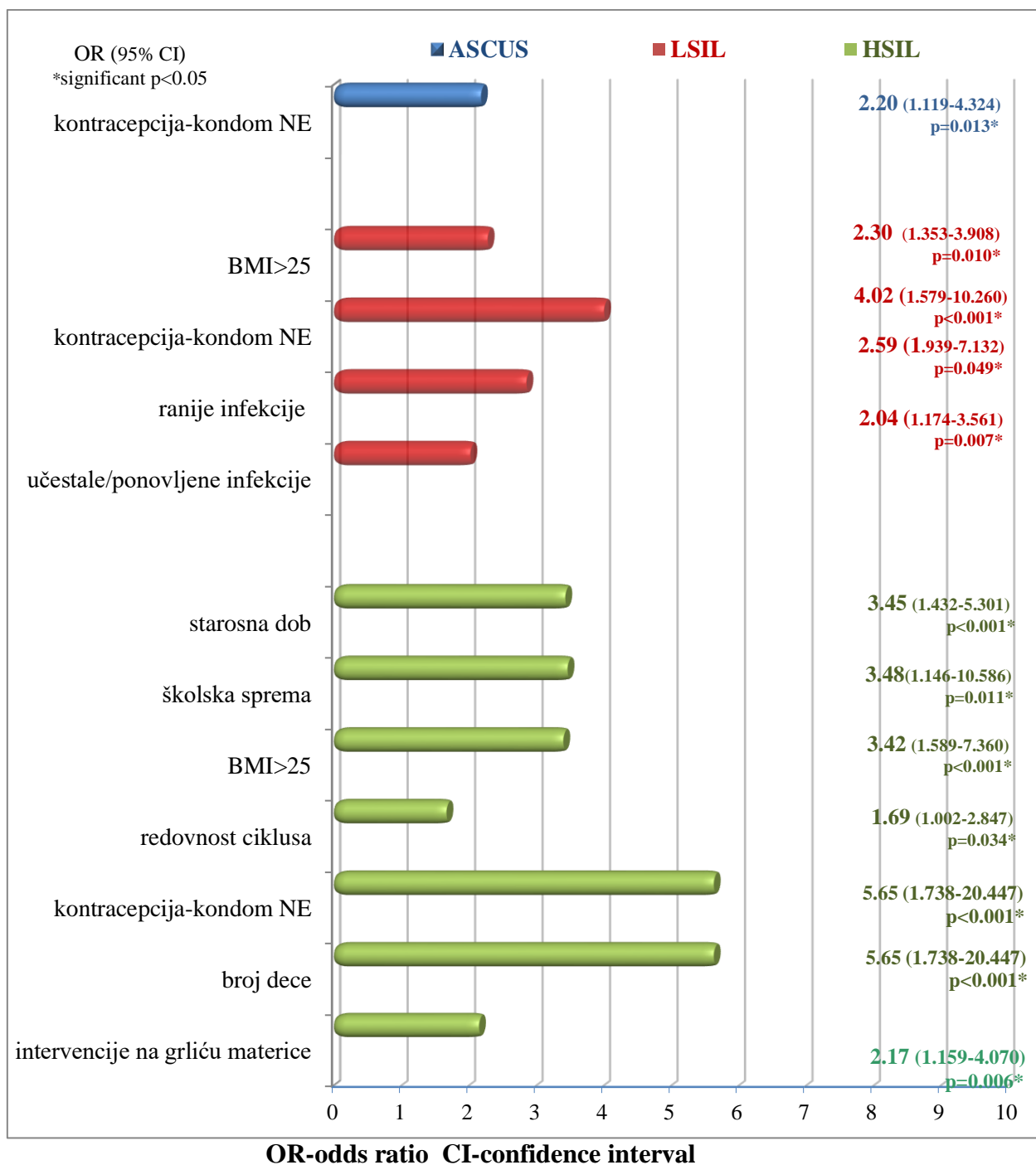
Veći broj porođaja, izražen preko broja rođene dece u slučajevima sa HSIL promenama uvećava šansu za ovaj nalaz preko 5 puta, a intervencije na grliću materice za oko 2 puta.

HR-HPV pozitivne žene sa HSIL nalazom su po demografskim pokazateljima najčešće srednjeg obrazovanja, što se pokazuje kao potencijalno rizičan faktor ili obeležje svojstveno HSIL statusu sa učestalošću preko tri puta većom u odnosu na normalan nalaz.

Takođe je pokazano da kod žena sa HSIL nalazom izvestan hormonski disbalans, prezentovan kao neregularnost ciklusa, može biti relativno rizičan faktor (OR=1,69), što takođe može biti vezano i za veću starosnu dob pacijentkinja i ulazak u menopauzu (Grafikon 5).

Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom

Rezultati

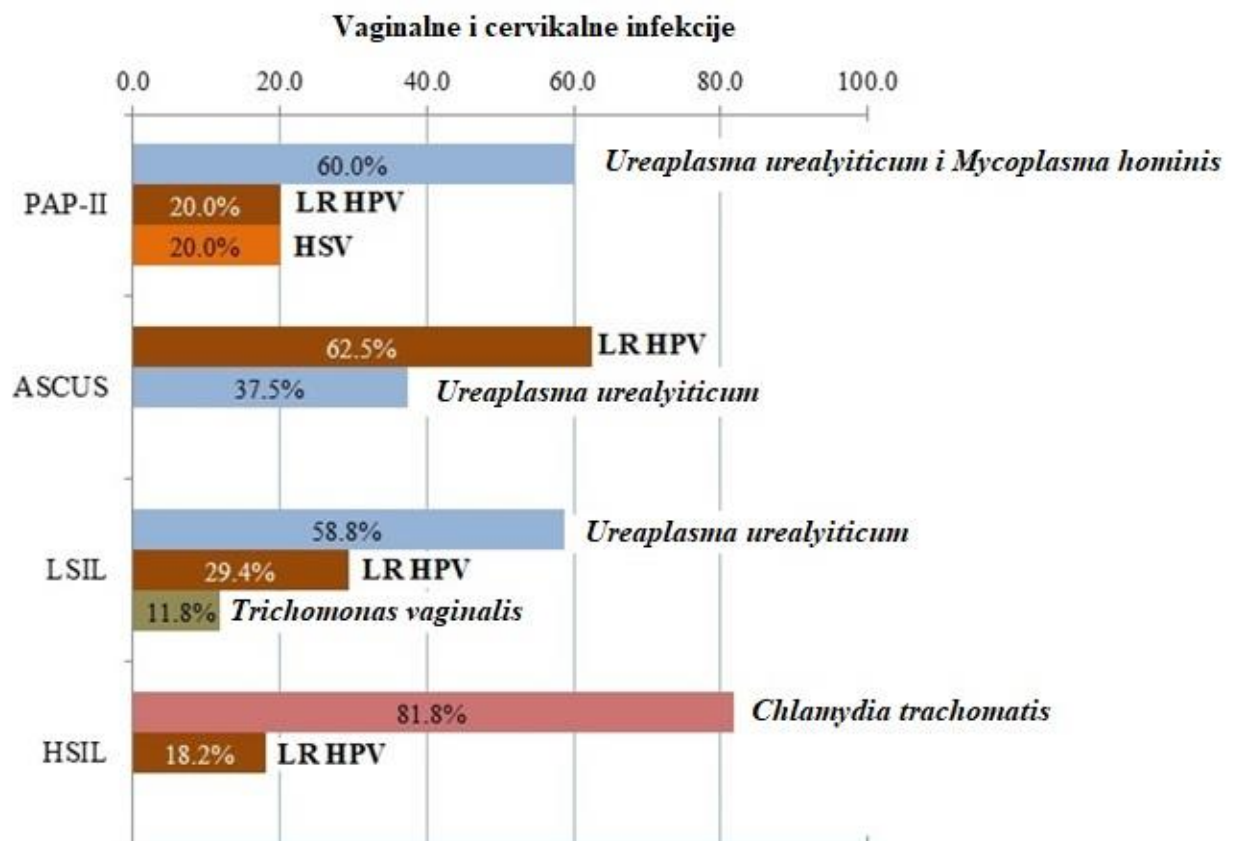


Grafikon 5. Faktori rizika u različitim citološkim nalazima u odnosu na kontrolnu grupu kod HR-HPV infekcije

4.5. Koinfekcije i njihova raspodela prema citološkom statusu

Na grafikonu 6 prikazane su cervikalne i vaginalne koinfekcije prema preovlađujućim uzročnicima i u odnosu na citološki status u ispitivanim podgrupama.

U signifikantnom broju slučajeva u citološkom nalazu teške cervikalne displazije (HSIL) preovlađivala je *Chlamydia trachomatis* kao uzročnik (81,8% slučajeva, $p < 0.05$). U ostalim grupama citološkog nalaza postojala je kombinacija uzročnika bez statistički značajne razlike u zastupljenosti.



Grafikon 6. Vaginalne i cervikalne infekcije prema citološkom statusu

4.6. Povezanost kolposkopskog i citološkog nalaza kod pacijentkinja sa HR-HPV infekcijom

Od interesa za ovo istraživanje bilo je i da se utvrdi povezanost kolposkopskog i citološkog nalaza kod pacijentkinja sa HR-HPV infekcijom (Tabela 12).

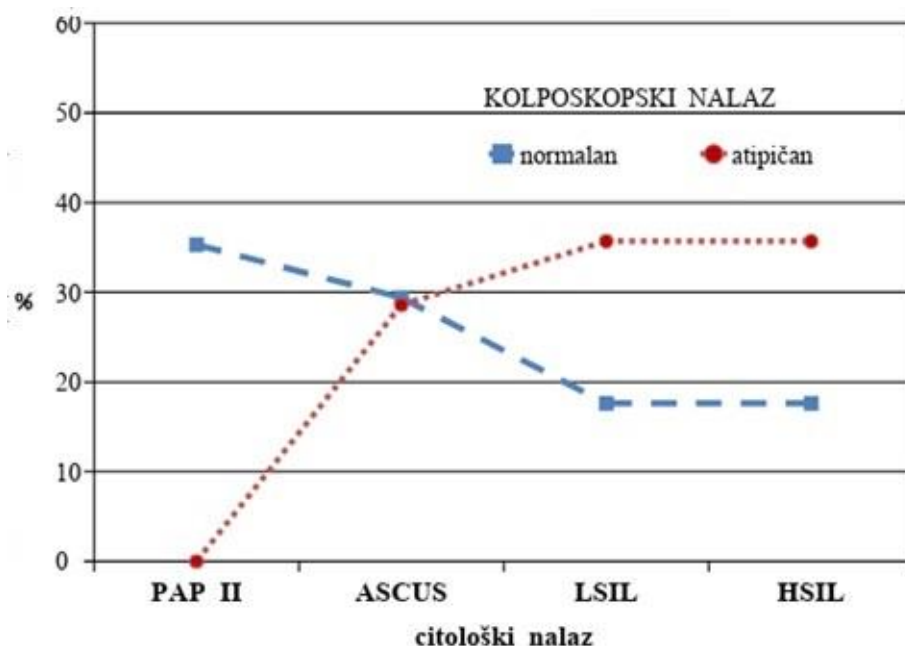
Raspodela kolposkopskog prema svim podgrupama citološkog nalaza pokazuje da se kod normalnog kolposkopskog nalaza učestalost normalnog citološkog nalaza na cerviksu javlja u kontrolnoj grupi (PAP II) u oko 35% slučajeva. Učestalost ostalih nalaza na cerviksu, pri normalnom kolposkopskom nalazu, se smanjuje (oko 29% ASCUS i oko 18% LSIL i HSIL) (Tabela 12).

Nasuprot tome, kada se učestalost citološkog nalaza posmatra u grupi atipičnog kolposkopskog nalaza, trend promene odvija se u suprotnom smeru. U ovoj grupi nije zastupljen ni jedan slučaj normalnog citološkog nalaza, a najveću učestalost imaju umeren i težak stepen CIN (36%).

Primetna različitost u raspodelama citološkog nalaza, dokazuje se statističkim upoređivanjem između grupa prema rezultatu kolposkopskog nalaza. Ove dve grupe se signifikantno razlikuju na način koji je prethodno opisan (Mann-Whitney U-test, $p=0.049 < 0.05$, Tabela 12, Grafikon 7).

Tabela 12. Kolposkopski i citološki nalaz u ispitivanom uzorku

	kolposkopski nalaz	
	normalan	atipičan
citološki nalaz		
PAP II	6 (35.3)	0 (0.0)
ASCUS	5 (29.4)	4 (28.6)
LSIL	3 (17.6)	5 (35.7)
HSIL	3 (17.6)	5 (35.7)
n(%)		



Grafikon 7. Kolposkopski i citološki nalaz u ispitivanom uzorku

Uopšteniju predstavu o udelu različitih citoloških promena kod normalnog i atipičnog nalaza predstavlja prikaz u kome su kontrolna grupa i ASCUS prikazane sumirano, u odnosu na sve pojave umerene i teške intraepitelijalne lezije cerviksa zajedno.

Na tabeli 13 se vidi da se u oko 74% slučajeva umereni i najteži oblici displazije cerviksa javljaju pri atipičnom kolposkopskom nalazu. Istovremeno, ovi citološki nalazi (LSIL/HSIL) utvrđeni su u oko 35% slučajeva i pri normalnom kolposkopskom nalazu kod žena sa HR-HPV infekcijom.

Tabela 13. Kolposkopski nalaz u odnosu na grupisani citološki nalaz

citološki nalaz	kolposkopski nalaz	
	normalan	atipičan
PAP II/ ASCUS	11 (64.7)	4 (28.6)
LSIL/ HSIL	6 (35.3)	10 (71.4)
n(%)		

Postojanje korelacije između kolposkopskog i citološkog nalaza iz prethodne analize dalje je proverena određivanjem značajnosti i stepena ove povezanosti. Pearsonov koeficijent korelacije od 0.456 svedoči da između kolposkopskog i citološkog nalaza postoji dobra, pozitivna, linearna povezanost, koja je statistički značajna ($p < 0.02$, Tabela 14).

To znači da su povoljni kolposkopski nalazi sa većom verovatnoćom povezani sa boljim citološkim nalazom i obrnuto - uz atipičan kolposkopski nalaz češće se javljaju nepovoljniji citološki nalazi višeg stepena.

Tabela 14. Korelacija kolposkopskog i citološkog nalaza

kolposkopski nalaz		citološki nalaz
	Pearson Correlation	0.456
	Sig. (2-tailed)	0.02*
	N	31

*. signifikantno $p < 0.05$

4.7. Korelacije između kofaktora i genskih polimorfizama proinflamatornih citokina i njihov zajednički uticaj na nastanak cervikalnog karcinoma

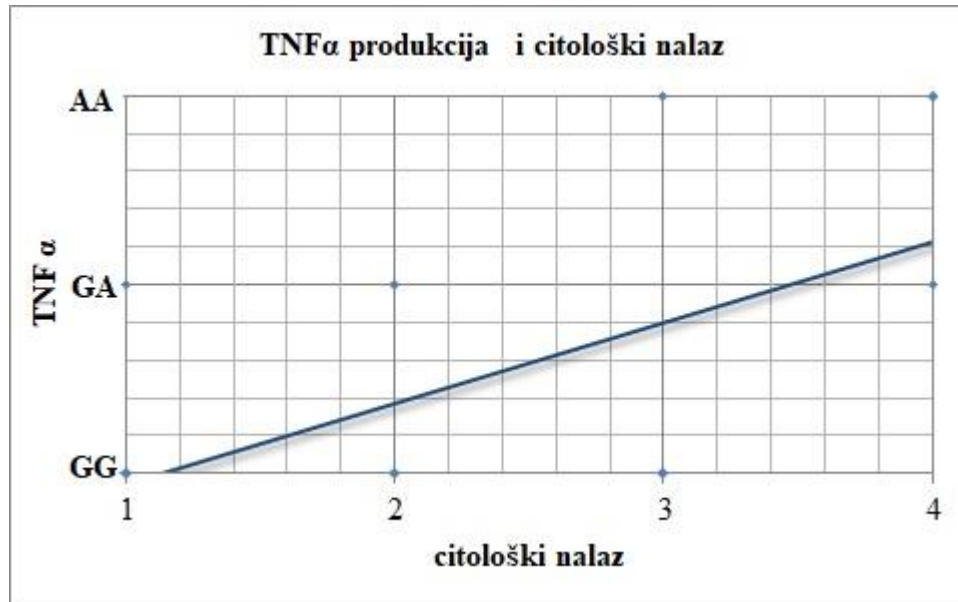
U nastavku statističke obrade primenjene su korelaciona i multipla regresiona analiza, čiji je zadatak bio da pokažu koji od ispitivanih polimorfizama, ali i prethodno analiziranih kofaktora, imaju dominantan uticaj na progresiju perzistentne HR-HPV infekcije u cervikalnu bolest. Na tabeli 15 prikazane su samo značajne korelacije polimorfizama koje postoje u ispitivanoj grupi u odnosu na ostale kofaktore.

Tabela 15. Korelacije polimorfizama sa ostalim parametrima

TNF-α		citološki nalaz
	Spearman Correlation	0.592
	Sig. (2-tailed)	0.002*
IFN-γ		ranije infekcije
	Spearman Correlation	-0.472
	Sig. (2-tailed)	0.020*
IL-12		ranice na grliću
	Spearman Correlation	-0.444
	Sig. (2-tailed)	0.030*

*. signifikantno $p < 0.05$

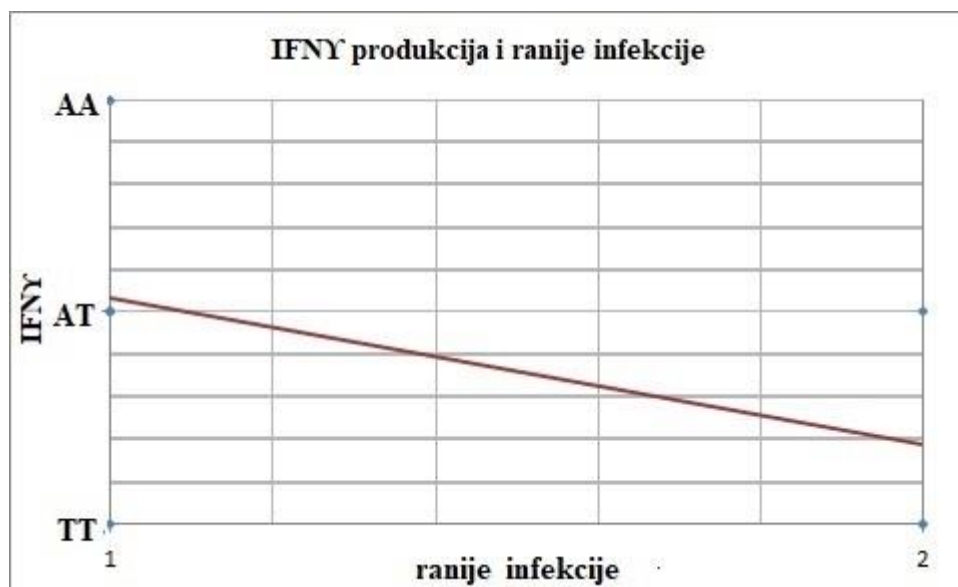
TNF- α je visoko signifikantnim, pozitivnim koeficijentom korelacije povezan sa citološkim nalazom. To znači da se više produkcije ovoga gena javljaju pri nepovoljnijem citološkom nalazu, kao što je to raspodelama polimorfizama i nagovešteno (Grafikon 8).



Grafikon 8. Korelacija TNF- α produkcije i citološkog nalaza

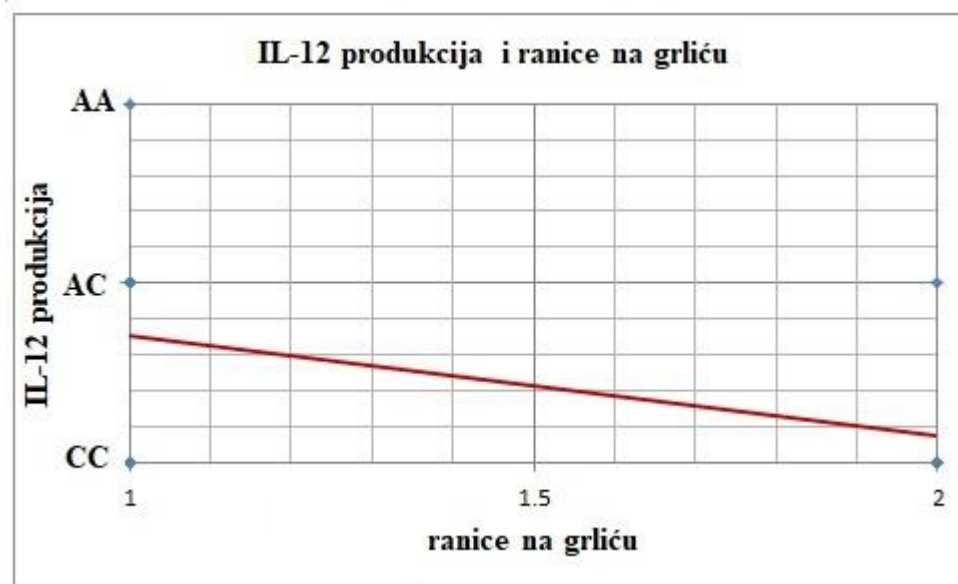
Polimorfizam gena za IFN- γ i IL-12 proinflamatornih citokina u signifikantnoj je korelaciji sa pojedinim kofaktorima koji su identifikovani kao rizični za nastanak karcinoma grlića materice udružen sa HR-HPV.

Na tabeli 15 se vidi da postoji umerena, negativna veza, koja je signifikantna, između polimorfizma gena IFN- γ i ranijih infekcija. Negativan predznak korelacije pokazuje da su niske produkcije ovog gena u vezi sa većim brojem prethodnih infekcija i obrnuto (Grafikon 9).



Grafikon 9. Korelacija IFN- γ produkcije i učestalost ranih infekcija

Produkcija IL-12 povezana je sa dobrim, negativnim i signifikantnim koeficijentom (-0.444) sa pojavama ranica na grliću materice. To znači da polimorfizam IL-12 gena koji predstavlja rizičan, niskosekretorni genotip, visoko korelira sa prisustvom ranica na grliću materice (Grafikon 10).



Grafikon 10. Korelacija IL-12 produkcije i učestalosti ranica na grliću materice

4.7.1. Modeli (jednačine procene rizika) za visoko rizične polimorfizme

Multipla linearna regresiona analiza primenjena je na svim relevantnim kofaktorima i polimorfizmima gena koji su bili predmet našeg istraživanja. Konačan cilj je bio da se dobiju "modeli" ili jednačine procene rizika koji bi identifikovali najveći i zajednički uticaj relevantnih faktora rizika.

Primenjen je metod odabira faktora ("korak po korak"- *stepwise*) prema stepenu njihovog uticaja na određenu pojavu. U prvom koraku, zavisna promenljiva bila je pojava visokih produkcija **TNF- α** gena koji označavaju povišen rizik za nastanak težih cervikalnih promena. Konačna selekcija kofaktora-varijabli koje su obuhvaćene analizom uvrstila je četiri faktora rizika, koji udruženo predstavljaju najveću šansu za povećanu produkciju visoko rizičnog **TNF- α** polimorfizma. Ovo su ujedno i članovi jednačine modela koji signifikantno opredeljuju ovu pojavu (Tabela 16).

Tabela 16. Model predikcije visoko rizične produkcije **TNF- α** polimorfizma

Model visoko rizični TNF-α polimorfizam	B	Std. Error	t	sig.	95% Confidence Interval for B	
					Lower Bound	Upper Bound
(Constant)	.180	.207	.866	0.397	-.254	.614
citološki nalaz	.420	.067	6.262	<0.001*	.280	.561
kolposkopski nalaz	-.432	.139	-3.115	0.006*	-.723	-.142
lečene infekcije	-.494	.135	-3.665	0.002*	-.776	-.212
ranice na grliću	.304	.144	2.108	0.049*	.002	.606

B-koeficijent regresije Std.Error- stand.greška, 95% CI- interval poverenja (gornja i donja granica)

*. signifikantno $p < 0.05$

Daljom selekcijom izdvojena su dva kofaktora, koja se povezuju sa niskom produkcijom **IFN- γ** , odnosno AA polimorfizmom ovog gena, koji predstavlja visok rizik za cervikalnu bolest.

Na taj način dobijena je i jednačina modela za prognozu pojave visoko rizičnog **IFN- γ** polimorfizma (Tabela 17).

Tabela 17. Model predikcije visoko rizične produkcije IFN- γ polimorfizma

Model visoko rizični IFN- γ polimorfizam	B	Std. Error	t	sig.	95% Confidence Interval for B	
					Lower Bound	Upper Bound
(Constant)	-.083	.260	-.318	0.754	-.623	.458
ranije infekcije	.414	.176	2.344	0.029*	.047	.781
broj dece	-.191	.085	-2.248	0.035*	-.368	-.014

B-koeficijent regresije Std.Error- stand.greška, 95% CI- interval poverenja (gornja i donja granica)

*. signifikantno $p < 0.05$

Pojava visoko rizičnog IL-12 polimorfizma sledeća je zavisna promenljiva u predikcionom modelu. Konačnom selekcijom kofaktora izdvojena su dva najčešće povezana sa niskom produkcijom IL-12 koja predstavlja visoko rizični polimorfizam AA ovog gena.

Na tabeli 18 predstavljena je jednačina modela za prognozu pojave visoko rizičnog IL-12 polimorfizma.

Tabela 18. Model predikcije visoko rizične produkcije IL-12 polimorfizma

Model visoko rizični IL-12 polimorfizam	B	Std. Error	t	sig.	95% Confidence Interval for B	
					Lower Bound	Upper Bound
(Constant)	-.316	.273	-1.159	0.259	-.884	.251
ranice na grliću	.587	.195	3.003	0.007*	.180	.993
abortusi	.281	.126	2.231	0.037*	.019	.542

B-koeficijent regresije Std.Error-stand.greška, 95% CI- interval poverenja (gornja i donja granica)

*. signifikantno $p < 0.05$

Finalni model u primeni multiple regresione analize treba da pokaže da li neki od ispitivanih polimorfizama mogu da predstavljaju biomarker osetljivosti za nastanak karcinoma grlića materice u žena sa perzistentnom HR-HPV infekcijom. U tom smislu je pojava HSIL, kao predstavnika težeg oblika cervikalne displazije, predstavljala zavisnu promenljivu u odnosu na sve analizirane varijable (Tabela 19).

Postupkom selekcije korak po korak, po značaju redukcije varijanse, izdvojen je samo jedan značajan prediktor, a to je visoko rizična produkcija **TNF- α** polimorfizma. Ovaj polimorfizam gena TNF- α signifikantan je u predviđanju nastanka HSIL kod žena sa HR-HPV infekcijom.

Tabela 19. Model za predikciju HSIL na osnovu polimorfizama proinflammatoryh citokina

Model za predikciju HSIL	B	Std. Error	t	sig.
(Constant)	.229	.172	1.333	0.198
TNF-α polimorfizam	.738	.257	2.873	0.009*
IFN-γ polimorfizam	.007	.201	.034	0.973
IL-12 polimorfizam	.124	.194	.640	0.529

B-koeficijent regresije Std.Error- stand.greška,

*.signifikantno $p < 0.05$

4.8. Provera usaglašenosti 2 metode za HPV tipizaciju

Komparacija rezultata genotipizacije HR-HPV dobijenih metodom sekvenciranja i komercijanom Sacacce metodom pokazala je slaganje u 85,2% (Tabela 20). Statističkom metodom upoređena raspodela HPV genotipova (sa prethodnim rangiranjem), utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u HPV genotipizaciji koja je urađena metodom sekvenciranja u odnosu na nalaz dobijen komercijalnim kitom za genotipizaciju Sacacce (Mann-Whitney U-test, $p=0.208$).

Tabela 20. Provera usaglašenosti nalaza HPV genotipizacije dobijenih metodom sekvenciranja i komercijalnim testom Sacacce za HPV genotipizaciju tipizaciju

Redni br. protokol	Sekvencioniranje	Sacacce	Sekvencioniranje sif.	Sacaccesif.
2,878	59	31,59	15	15
2,889	52,6	39,56	10	0*
2,903	35	33,45,56,58	6	0*
2,947	33	33,59	4	4
2,961	16	16	1	1
2,962	16,53	16,45,56	1	1
2	58	18,58	14	14
13	56	56	12	12
127	16	16,35	1	1
161	43,53	33,18,56,58	11	0*
171	6	56,58	0	0*
204	52	33,52	10	10
287	16	16,31,52	1	1
288	16	16,31,52	1	1
289	16	16,31,52	1	1
290	52	16,31,52	10	10
292	16	16,31,52,58	1	1
293	16,18	16,18,31,52,58	1	1
249	16	16,31,52,58	1	1
295	16	16,31,52	1	1
435	16	16,18,58	1	1
2,597	16	16,52	1	1
2,600	16	16,39,52	1	1
2,601	16	16	1	1
2,605	16	16	1	1
2,606	16	16,39,56	1	1
2,607	16	16,39,56	1	1

* neslaganje sekvenciranja i komercijalne metode Sacacce za HPV tipizaciju 4/27=14.8% (**85.2%** slaganja 2 metode za HPV tipizaciju)

Prednost sekvenciranja je mogućnost detektovanja svih do sada utvrđenih HR-HPV genotipova, dok je komercijalan test limitiran na 14 genotipova određenih specifičnim setovima prajmera. Prednost komercijalnog Sacacce testa za genotipizaciju bila bi mogućnost detektovanja više različitih HR-HPV genotipova prilikom mešovutih infekcija.

5. Diskusija

Infekcija HPV poznata je još od vremena Hipokrata. Iako u početku interesovanje naučnika za ovo oboljenje nije bilo veliko, eksperimenti i istraživanja koja su sprovedena još od XIX veka pokušavala su da daju precizniji uvid u tok bolesti, kao i strukturu i osobine HPV. Vremenom, bolesti povezane sa HPV okupirale su pažnju sve većeg broja naučnika i sve više dobijale na značaju, te tako danas predstavljaju jedan od velikih i vodećih javno zdravstvenih problema.

Cervikalni karcinom predstavlja četvrti po učestalosti maligni tumor u svetu (Ferlay i sar., 2015) i drugi po redu uzrok smrti kod žena starosne dobi od 15 do 44 godine (Bruni i sar., 2015). Incidencija karcinoma grlića materice varira u zemljama širom sveta, a najviše stope registruju se u Subsaharskim delovima Afrike, Jugoistočnoj Aziji, Latinskoj Americi, Karibima i Centralnoj i Istočnoj Evropi (Momenimovahed i sar., 2017). Incidencija cervikalnog karcinoma u Srbiji jedna je od najviših u Evropi sa standardizovanom stopom koja iznosi 23,8/100 000. Podaci nacionalnog centra za rak Centralne Srbije pokazuju da se standardizovane stope kreću od 17,9/100 000 do 62,3/100 000. Više stope incidencije se u Evropi jedino registruju u Rumuniji, Bugarskoj i Litvaniji (Miljuš i sar., 2017).

Postoje jasni dokazi da HPV imaju kauzalnu ulogu u razvoju skvamocelularnog karcinoma anogenitalne regije (vulva, vagina, cerviks, anus i penis), kao i karcinoma u regionu glave i vrata (farinks, larinks i usna duplja) (Syrjanen i sar., 2012). Perzistentna infekcija uzrokovana sa jednim ili više tipova visoko onkogenih HPV neophodna je kako bi se razvile patološke promene na cerviksu. Mehanizam kojim HPV ostvaruju kancerogeni efekat podrazumeva integraciju virusne DNK u genom domaćina, produkciju virusnih onkoproteina i aktiviranje brojnih mehanizama kojima se izbegava imunski odgovor domaćina.

HR-HPV u epitel cerviksa najčešće dospevaju tokom seksualnog kontakta kroz mikroabrazije koje postoje na koži. Virusni ulaze u bazalne ćelije epitela koje poseduju brojne transkripcione faktore i koje im omogućavaju da započnu replikaciju epizoma. Rani virusni proteini utiču na ćelijski ciklus omogućavajući bržu ćelijsku deobu i pojačanu replikaciju virusnih proteina. Uporedno sa diferencijacijom epitela i migracijom ćelija ka površinskim slojevima dolazi i do pojačane sinteze kasnih virusnih

proteina, stvaranja velikog broja kopija virusa i sklapanja virona u najpovršnijim slojevima epitela koji potom probijaju bazalnu membranu i infiltrišu okolno tkivo.

U malignoj transformaciji ćelije značaju ulogu igraju kasni virusni proteini E6 i E7. Uloga E6 proteina prvenstveno se ogleda u inhibiciji i degradaciji p53 proteina, ali i brojnih drugih enzima. Na taj način sprečava se reparacija oštećenih delova DNK domaćina, inhibira se apoptoza i omogućava nekontrolisan rast i deoba ćelije. E7 protein svoju funkciju ostvaruje vezivanjem za ćelijski pRb protein dovodeći do njegove proteolize i utičući na taj način na poremećaj ćelijskog ciklusa.

Ipak, infekcija HR-HPV nije i jedina dovoljna za razvoj displastičnih promena, pa tako brojni kofaktori imaju značajnu ulogu u razvoju cervikalnog karcinoma (Kim i sar., 2012). Gotovo 80% HPV infekcija završice se spontanom regresijom i eliminacijom virusa iz organizma dve godine od inicijalnog kontakta sa virusom. U manjem broju slučajeva, uspostavlja se perzistentna infekcija, a 25% žena koje imaju infekciju HR-HPV tipovima razvije CIN prvog stepena koja može progredirati u CIN II i CIN III. Cervikalni karcinom razvija se u 10% slučajeva, odnosno kod 1% pacijentkinja sa dugogodišnjom HR-HPV infekcijom. Maligna transformacija nastaje kao posledica onkogenog potencijala HR-HPV, faktora domaćina (genetska predispozicija, imunološki status), faktora okoline, kao i bihevioralnih faktora (multiparitet, pušenje, upotreba OC, promiskuitet, STD, rano stupanje u seksualne odnose, BMI, loš socioekonomski status).

U ovoj studiji obuhvaćena je 541 žena, od kojih je kod 15,5% dokazana HR-HPV infekcija. Među HR-HPV pozitivnim ženama, najviše ispitanica bilo je u grupi sa LSIL nalazom (27,4%), dok je ispitanica sa HSIL nalazom bilo neznatno manje (22,6%). Normalan citološki nalaz pri HR-HPV infekciji imalo je 23,8% ispitanica, a ASCUS je registrovan kod 26,2% žena.

Slični podaci objavljeni su i u drugim istraživanjima. U studiji Diksona i saradnika iz 2014. godine HPV infekcija registrovana je kod 23,7% ispitanica. Nešto veći procenat registrovan je u velikom ARTISTIC istraživanju koje je obuhvatilo 24.510 žena među kojima je infekcija HR-HPV tipovima detektovana kod 27,3% ispitanica mlađih od 30 godina i svega 6,1% žena starijih od 30 godina (Sargent i sar.,

2008). Rezultati ispitivanja sprovedenog na Kosta Riki pokazali su da je 50% ispitanica imalo HPV infekciju, a kod 33,8% izolovani su HR-HPV tipovi (Chaturvedi i sar., 2011).

Roschit i saradnici pokazali su da prevalencija HPV, HR-HPV infekcije i citoloških abnormalnosti opada sa povećanjem starosne dobi. U njihovoj studiji, 50% mlađih žena imalo je HR-HPV infekciju, dok je nasuprot njima, u grupi žena starosti od 50 do 54 godine HR-HPV infekcija kod 20% ispitanica (Rositch i sar., 2013).

Među našim ispitanicama najčešće izolovan genotip kod HR-HPV pozitivnih žena bio je HPV-16 (42,9%), zatim HPV-45 (15,5%) i HPV-31 (10,7%), dok su ostali HPV genotipovi izolovani u manjem procentu slučajeva.

Testiranjem značajnosti razlika u raspodeli genotipova prema podgrupama citološkog nalaza utvrđeno je postojanje razlike na značajnom nivou. HR-HPV tip 16 je kod ispitanica sa HSIL bio zastupljen u 89,5% slučajeva, dok je u ostalim grupama njegova učestalost bila značajno niža. Razlika u raspodeli genotipova u ostalim grupama nije bila statistički značajna. Poređenjem grupa kolposkopskog nalaza (normalan i atipičan) utvrđeno je da je HR-HPV tip 16 bio nešto češći u grupi ispitanica sa atipičnim nalazom, ali ova razlika ipak nije bila statistički značajna.

Literaturni podaci pokazuju da su HPV-16 i HPV-18 najčešće izolovani tipovi HPV i da se detektuju u 70% cervikalnih karcinoma (Castle i Maza, 2016). Studije objavljene u Severnoj i Južnoj Americi, Evropi, Aziji i Africi potvrđuju ove navode. U Turskoj, HPV-16 izoluje se kod 20,7% žena koje su podvrgnute skriningu. Pored HPV-16 čest nalaz predstavljaju i HPV-51 (10,8%), 31 (8,7%), 52 (7,1%) i 18 (5,1%) (Gultekin i sar., 2017). Albawardi i saradnici (2018) objavili su da se kod žena sa cervikalnim lezijama visokog stepena iz promena na grliću najčešće izoluju HPV-16 (49%), HPV-31 (20%) i HPV-18 (6,6%).

Studija objavljena u Bahreju pokazala je da su HR-HPV tip 16 i tip 52 najčešće izolovani genotipovi iz promena na grliću materice. Pored ova dva genotipa, detektovani su i HPV-18, 31, 33, 51, 44, 45, 56, 59 (Maqsood i sar., 2011). Slične podatke objavili su i Haija i saradnici koji su u najvećem broju slučajeva detektovali HR-HPV tip 16, zatim tip 18, 45, 62 i 53 (Haija i sar., 2006). Studija u Iranu pokazala je

da su najčešći genotipovi kod ispitanica sa abnormalnim citološkim nalazom HPV-16, 18, 31, 33, 51, 56 i 66 (Eghbali i sar., 2012).

Rezultate naše studije potvrđuje i ATHENA studija sprovedena u SAD koja je takođe pokazala da je HR-HPV tip 16 najčešće izolovani HPV genotip u cervikalnim promenama visokog stepena. Ovim istraživanjem je utvrđeno i da se iz *insitu* karcinoma i adenokarcinoma cerviksa često izoluje i HPV tip 18 (Monsonogo i sar., 2015). Još jedna, novija studija iz SAD objavljena tokom 2016. godine pokazala je da je kod pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom u 94% slučajeva izolovana HR-HPV infekcija, kao i da su najčešće izolovani genotipovi bili HPV-16 i HPV-18 (Mbatani i sar., 2016). Podaci iz Indije slični su onima iz Amerike, među pacijentkinjama sa cervikalnim karcinomom u 94% slučajeva izoluje se HR-HPV infekcija, a dominantni genotipovi su HPV-16, 18,31,33,35 (Bskaran i sar., 2015).

Studije iz Severne Amerike pokazuju da se iz cervikalnih lezija najčešće izoluje HPV-16 (5,8%), zatim HPV-18 (2,1%) i HPV-52 (2%). U Evropi najčešće izolovani genotipovi su HPV-16 (4,8%), HPV-31 (2,3%) i HPV-18 (0,9%). Na Afričkom kontinentu se takođe najčešće izoluju HPV tip 16 (3,5%), ali i HPV tip 52 (2,4%) (Bruni i sar., 2012).

Kako su u istraživanju korišćene dve metode za izvođenje genotipizacije HR-HPV, izvršeno je i poređenje ove dve metode. Upoređivanjem rezultata dobijenih metodom sekvenciranja i rezultata dobijenih komercijanom Sacacce metodom, uočeno je slaganje u 85,2% slučajeva, tj. među rezultatima dobijenim uz pomoć ove dve metode nije uočena statistički značajna razlika. Svaka od metoda pokazala je određene prednosti ali i nedostatke. Prednost sekvenciranja ogleda se u mogućnosti detektovanja svih do sada utvrđenih HR-HPV genotipova, dok je komercijalan test limitiran na 14 genotipova određenih specifičnim setovima prajmera. Međutim prednost komercijalnog Sacacce testa za genotipizaciju predstavlja mogućnost detektovanja više različitih HR-HPV genotipova prilikom mešovutih infekcija koji mogu biti jasno razgraničeni ovim testom.

Cervikalni karcinom nastaje usled interakcije multiplih gena i faktora sredine. Poslednjih godinaveliki broj istraživača usmeren je ka proučavanju genetskih promena koje imaju ulogu u razvoju karcinoma cerviksa. Zahvaljujući modernim tehnološkim

procedurama koje se primenjuju u ispitivanju genskih polimorfizama, otkriveni su pojedinačni aleli koji su povezani sa predispozicijom za razvoj karcinoma grlića materice.

Poznato je da polimorfizmi određenih citokinskih gena koji kodiraju proteine uključene u Th1 i Th2 ćelijski odgovor mogu biti povezani sa boljom ili lošijom prognozom cervikalne bolesti kod žena sa perzistentnom HR-HPV infekcijom. Stoga se polimorfizmi pojedinačnih nukleotida gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 mogu smatrati biomarkerima koji mogu da imaju prediktivnu ulogu u nastanku HR-HPV karcinoma grlića materice. SNP se odnose na DNK polimorfizme na genomskom nivou koje nastaju usled transverzije jednog nukleotida. Poređenjem učestalosti SNP određenih lokusa i alela između zdravih pojedinaca (kontrola) i pacijenata sa cervikalnim karcinomom može se uočiti povezanost između polimorfizma alela i rizika za razvoj bolesti (Mitjans i sar., 2012).

Ovim istraživanjem je pokazano da je među različitim grupama citološkog nalaza TNF- α bio jedini citokin čija se povišena produkcija sa značajno većom učestalošću javljala u lezijama umerenog do teškog stepena. Između ostalih grupa nije postojala značajna razlika, kako u eksprimiranju TNF- α gena, tako ni u eksprimiranju gena za IFN- γ i IL-12. U lezijama umerenog do teškog stepena dominirao je AA genotip, dok je u ostalim grupama (PAP II, ASCUS, LSIL) u 72% - 86% registrovan GG genotip. Korelacionom i multiplom regresionom analizom pokazano je da je TNF- α visoko signifikantnim, pozitivnim koeficijentom korelacije bio povezan sa citološkim nalazom. To znači da su se veće produkcije ovoga citokina javljale pri nepovoljnijem citološkom nalazu.

Analizom distribucije genotipova i alela proinflamatornih citokina prema kolposkopskom nalazu utvrđeno je da se prisustvo TNF- α AA alela, pri HR-HPV infekciji, značajno povezuje sa progresijom promena na grliću materice u HSIL.

TNF- α je multifunkcionalni citokin koji se proizvodi od strane monocita i makrofaga i koji igra značajnu ulogu u promociji inflamatornog odgovora, ćelijskoj proliferaciji i indukciji apoptoze. Ovaj citokin je ujedno i najvažniji proinflamatorni

citokin koji deluje inhibitorno na tumorske ćelijesprečavajući njihov rast i progresiju tumorskih promena (Waters i sar., 2015).

Proučavanjem SNP na promotoru za TNF- α gen uočeno je da se sledeći polimorfizimi povezuju sa genetskom predispozicijom za razvoj cervikalnog karcinoma: rs361525 (-238), rs1800629 (-308), rs1800750 (-376), rs1799964 (-1031) i rs673 (-244) (Rotar i dr., 2014). Tokom 2015. godine objavljena je studija sprovedena u Kini u kojoj je pokazano da je i SNP TNF- α gena na poziciji rs1799724 (-857) takođe u značajnoj korelaciji sa cervikalnim karcinomom (Yin i sar., 2015).

Do danas su najbolje proučeni SNP na poziciji: rs361525 (-238) i rs1800629 (-308). SNP na poziciji -308 dovodi do zamene G alela u A alel i direktno je i pozitivno povezan sa specifičnom regulacijom sinteze TNF- α na transkripcionom nivou. Ispitivanjima je utvrđeno da G alel ima dvostruko niži uticaj na transkripciju TNF- α gena. Iako je veliki broj studija koje su se bavile ispitivanjem SNP u promotoru gena za TNF- α imalo za cilj da utvrdi njegovu vezu sa povećanom predispozicijom za razvoj cervikalnog karcinoma, rezultati studija su različiti, a utvrđeno je i postojanje značajnih rasnih razlika.

SNP na poziciji-238 lociran je na represorskom genu koji se sastoji od 25 bp, a SNP na ovoj poziciji povezuje se sa protektivnom ulogom u karcinomu (Jang i sar., 2001). Ovaj efekat pokazan je i u studiji Liu-a i saradnika u kojoj je prisustvo GA/AA alela na poziciji -238 povezano sa smanjenjem rizika za razvoj cervikalnog karcinoma (Liu i sar., 2012). Kaluza i saradnici takođe su pokazali da prisustvo AA alela na poziciji -238 smanjuje transkripciju TNF- α gena u T i B limfocitima (Kaluza i sar., 2000).

Velika studija sprovedena u Kini koja se bavila ispitivanjem povezanosti između SNP na pozicijama -238, -308, -376, -1031 i -244 utvrdila je da je polimorfizam TNF- α gena na poziciji -308 povezan sa cervikalnim karcinomom. Učestalost G alela u ovom polimorfizmu bila je manja u grupi ispitanika sa cervikalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu grupu, dok je, nasuprot G alelu, učestalost A alela bila značajno viša kod ispitanica sa cervikalnim karcinomom u odnosu na kontrolnu grupu (OR¼ 2.58, 95% CI¼ 1.87-3.56). SNP polimorfizam na poziciji -1031 takođe je bio povezan sa

povećanim rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma. Kao i kod polimorfizma na poziciji -308, polimorfizam -1031 bio je praćen smanjenom učestalošću G alela i povećanom učestalošću A alela u grupi ispitanika sa cervikalnim karcinomom. Polimorfizam na poziciji -238 i prisustvo TT ili TC alela povezani su sa povećanim rizikom za karcinom grlića materice, dok je na poziciji -1031 to bilo prisustvo AG ili AA alela. Razlog zbog koga se cervikalni karcinom češće javljao pri SNP na pozicijama -238, -308 i -1031 objašnjen je mogućnošću da SNP u ovom regionu dovodi do povećane osetljivost na cervikalni karcinom tako što utiče na poremećaj nivoa TNF- α . Na taj način se stvaraju uslovi za nastanak perzistentne HPV infekcije koja je glavni faktor rizika za razvoj cervikalnog karcinoma (Li i sar., 2018).

Veza između SNP na poziciji -308 i cervikalnog karcinoma prijavljena je u mnogim studijama koje su sprovedene među pripadnicima različitih rasa, a prisustvo A alela povezano je sa povećanim rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma (Nieves Ramirez i sar., 2011; Kohaar i sar., 2007). Wang i saradnici sprovedli su meta-analitičku studiju kojom je pokazano da se prisustvo A alela na poziciji -308 povezuje sa povećanim rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma, kao i da su pripadnici bele rase u većem riziku od pripadnika drugih rasa (Wang i sar., 2015).

Slične rezultate pokazala je i studija u kojoj je utvrđeno da nosioci SNP na poziciji -308G/A imaju veći rizik za oboljevanjem od cervikalnog karcinoma u odnosu na osobe koje imaju oba G alela (Babapour i sar., 2019). Studija Liu-a i saradnika iz 2012. godina pokazala je da je postojanje AA alela na poziciji -308 povezano sa povećanim rizikom za nastanak cervikalnog karcinoma, kao i da je efekat ovog polimorfizma znatno izraženiji među Azijatima (Liu i sar., 2012).

Nasuprot ovim rezultatima, studija sprovedena u Africi pokazala je da polimorfizam TNF- α gena na poziciji -308 nema uticaj na razvoj cervikalnog karcinoma (Govan i sar., 2006). Jasna veza između SNP na poziciji -308 nije pronađena ni u studijama sprovedenim u Švedskoj (Ivansson i sar., 2011), Koreji (Jang i sar., 2001) i Kini (Wang i sar., 2012). Studija sprovedena na Tajlandu pokazala je da SNP na pozicijama -308 i -238 ne dovodi do povećanog rizika za razvoj cervikalnog karcinoma (Chincai i sar., 2016). Ostala istraživanja pokazuju da se polimorfizam -308, osim sa cervikalnim karcinomom, povezuje i sa povećanim rizikom za razvoj drugih karcinoma

kao što su karcinom dojke, želuca i jetre (Lu i sar., 2010; Shen i sar., 2011; Yang i sar., 2011).

U određenim etničkim grupama, SNP na poziciji -308 dokazano je povezan sa povećanim rizikom za karcinom grlića materice (Nieves Ramirez i sar., 2011; Kohaar i sar., 2007), ali u određenom broju studija ovi rezultati nisu potvrđeni (Govan i sar., 2006). Studija sprovedena u Meksiku pokazala je da polimorfizam rs1800750 ima protektivni efekat u CIN, kao i da polimorfizmi -1031 i -244 nemaju uticaj na nastanak cervikalnog karcinoma (Nieves Ramirez i sar., 2011).

Rezultati istraživanja SNP gena u ovoj studiji su pokazali da među grupama pacijentkinja sa različitim citološkim i kolposkopskim nalazom nije postojala značajna razlika u distribuciji alela i produkciji IFN- γ . Niska produkcija IFN- γ , homozigotnog AA alela, bila je učestalija u ASCUS i LSIL cervikalnom nalazu dok je heterozigotni AT alel preovladavao u kontrolnoj, ali i grupi pacijentkinja sa HSIL nalazom.

U našem istraživanju utvrđeno je i postojanje negativne, signifikantne veze između polimorfizma gena za IFN- γ i ranijih infekcija. Negativan predznak korelacije ukazivao je da su niske produkcije ovog gena bile u vezi sa većim brojem prethodnih infekcija i obrnuto.

IFN- γ je citokin koji se sekretuje od strane Th1 limfocita, citotoksičnih T limfocita i NK ćelija u odgovoru na antigensku stimulaciju i aktivaciju makrofaga i endotelijalnih ćelija. Ovaj citokin ostvaruje direktan antiproliferativni i antimetabolički efekat na tumorske ćelije, a utiče i na inhibiciju angiogeneze u tumoru. SNP na poziciji +847 T/A lociran na prvom intronu IFN- γ gena ima uticaj na sekreciju ovog citokina. Visoka produkcija IFN- γ povezuje se sa efikasnijim odgovorom domaćina na virusnu infekciju, dok se smanjena produkcija IFN- γ povezuje sa lošijom prognozom kod pacijenata sa cervikalnim karcinomom.

Pokazano je da su genski polimorfizmi koji se javljaju u okviru IFN- γ gena povezani sa poremećajem produkcije i sekrecije IFN- γ , te stoga mogu imati veoma važnu ulogu u razvoju cervikalnog karcinoma. Nivo IFN- γ je značajno manji samo kod pacijenata sa uznapredovalim formama cervikalnog karcinoma kod kojih je došlo do

citokinskog "shifta" i prelaska sa produkcije citokina tip 1 (IFN- γ , IL-2) na citokine tip 2 (IL-4,5,10).

Polimorfizam IFN- γ na poziciji +874 povezuje se sa povećanom predispozicijom i progresijom brojnih oboljenja, uključujući i cervikalni karcinom. AA genotip (homozigotni mutant) odgovoran je za nisku citokinsku ekspresiju, s obzirom na to da DNK sekvenca sadrži T alel koji je specifično mesto za vezivanje NF-kB transkripcionog faktora koji je zadužen za transkripciju gena i produkciju IFN- γ . *In vitro* studija ukazala je da se polimorfizam AA povezuje sa niskim, AT sa umerenim, a TT sa visokom produkcijom IFN- γ (Pravica i sar., 2000).

Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa rezultatima drugih studija. Tamandani i saradnici pokazali su da se u normalnom tkivu i ćelijama cervikalnog karcinoma iRNK za IFN- γ eksprimira u podjednakim koncentracijama (Kordi Tamandani i sar., 2008). Studija de Carvalho-a i saradnika pokazala je da polimorfizam IFN- γ gena ne predstavlja predisponirajući faktor za razvoj displastičnih promena cerviksa, kao ni cervikalnog karcinoma (de Carvalho i sar., 2012). Slične rezultate objavili su i Govan i saradnici u kojima je pokazano da razlike u etničkoj pripadnosti i polimorfizmu gena za IFN- γ ne utiču na razvoj cervikalnog karcinoma, ali da mogu biti važan marker u drugim oboljenjima (Govan i sar., 2006).

Određene studije, pak, pokazuju i pozitivnu vezu između polimorfizma gena za IFN- γ i nastanka cervikalnog karcinoma. Pokazano je da je AA genotip češći kod pacijentkinja kod kojih su registrovane CIN II promene u odnosu na kontrolnu grupu, što je ukazalo na to da SNP mogu imati uticaj na progresiju oboljenja (von Linsingen i sar., 2009). Ove navode potvrdila je i studija Gangwar-a i saradnika u kojim je AA genotip i A alel bio značajno učestaliji kod pacijentkinja sa CIN promenama u odnosu na zdrave osobe (Gangwar i sar., 2009). Lai i saradnici ukazali su na to da je polimorfizam IFN- γ gena povezan sa individualnom ostljivošću na nastanak karcinoma grlića materice (Lai i sar., 2005). Velika meta-analička studija koje je obuhvatila 8 do tada objavljenih istraživanja i preko 2.375 pacijenta sa cervikalnim karcinomom pokazala je da je polimorfizam gena za IFN- γ na poziciji +874 povezan sa povećanim rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma (Liu i sar., 2015). Istraživanje Zhang-a i

saradnika iz 2015. godine kojim je bila obuhvaćeno 520 žena iz ruralnih delova Kine pokazalo je da je polimorfizam IFN- γ gena na poziciji +874T/A povezan sa povećanim rizikom za razvoj HPV infekcije.

IL-12 je proinflamatorni citokin koga luče APC i koji potom deluje na T helper ćelije i NK ćelije stimulišući ih da stvaraju IFN- γ koji je snažan antitumorski faktor (Croxford i sar., 2014). Niske koncentracije IL-12 uočene su kod pacijenata sa različitim tipovima karcinoma (Tao et al., 2012), što ukazuje na činjenicu da ovaj citokin deluje kao snažan antitumorski faktor.

Rezultati ovog istraživanja su, kao i u slučaju polimorfizma gena za IFN- γ , pokazali da ne postoje značajne razlike u distribuciji i produkciji gena za IL-12 među grupama citološkog i kolposkopskog nalaza. Niske produkcije homozigotnog AA alela imale su najveću učestalost u kontrolnoj grupi, dok je kod ASCUS najučestaliji bio AC alel. U citološkim nalazima LSIL i HSIL u 50% bila je zastupljena rizična, niska produkcija ovog gena.

Ovim istraživanjem je pokazano da je produkcija IL-12 povezana sa dobrim, negativnim i signifikantnim koeficijentom sa pojavama ranica na grliću materice. To znači da polimorfizam IL-12 gena, koji predstavlja rizičan, niskosekretorni genotip, visoko korelira sa prisustvom ranica na grliću materice.

Dosadašnja istraživanja bila su usmerena na ispitivanje veze između polimorfizama IL-12A i IL-12B gena i rizika za razvoj karcinoma. Do danas su najbolje proučeni SNP polimorfizam na poziciji 1188A/C u 3' regionu (rs3212227) IL-12B gena i SNP na poziciji 277G/A u 3' regionu (rs568408), kao i SNP na poziciji 564T/G u 5' regionu IL-12A gena (rs2243115).

Proučavanjem polimorfizama gena za IL-12 utvrđeno je da TA genotip nije povezan sa nastankom cervikalnih promena, dok je AA genotip znatno češći kod pacijentkinja sa cervikalnom displazijom težeg stepena i cervikalnim karcinomom. AC genotip znatno se češće javlja kod zdravih osoba, što ukazuje da C alel ima protektivnu ulogu u razvoju cervikalnih lezija i njihovoj progresiji (de Carvalho i sar., 2012).

Polimorfizam IL-12B povezuje se sa razvojem oboljenja koja nastaju kao posledica promene u sintezi i sekreciji IL-12. Pa ipak, još uvek nije precizirano da li se pod promenom nivoa misli na povećanje ili smanjenje koncentracije IL-12. Mali broj studija bavio se ispitivanjem polimorfizma gena za IL-12B i nastanak cervikalnog karcinoma. Studije sprovedene u Koreji pokazala je da polimorfizam gena za IL-12B u regionu rs3212227 AC/CC povećava rizik za nastanak cervikalnog karcinoma, ali da razlika nije statistički značajna u odnosu na žene kod kojih ovaj polimorfizam nije registrovan (Han i sar., 2008). Slični rezultati objavljeni su i u studiji sprovedenoj u Kini. Polimorfizam IL-12B gena u regionu rs3212227 nije bio u značajnoj korelaciji sa povećanim rizikom za razvoj patoloških promena na cerviksu. Studija sprovedena u Kini ukazala je i na to da polimorfizam IL-12B gena u ovom regionu može kod određenih osoba doprineti povećanom riziku za razvoj cervikalnih lezija visokog stepena, naročito ukoliko je povezan sa velikim brojem porođaja (Chen i sar., 2009).

Iako je dokazano da HR-HPV predstavlja etiološki faktor koji dovodi do razvoja cervikalnog karcinoma, u stručnoj i naučnoj javnosti postoji sumnja da li je prisustvo HR-HPV na grliću materice dovoljan uslov za nastanak cervikalne bolesti ili je neophodno prisustvo i drugih pomažućih činilaca. Nastanak infekcije i progresija cervikalnih promena mogu biti potpomognuti dejstvom brojnih kofaktora koji olakšavaju ulazak virusa u ćelije domaćina, omogućavaju njegovu perzistenciju i stvaraju mikrookolinu koja pogoduje progresiji patoloških promena. U ovom radu ispitivali smo koji faktori sredine i bihevioralni faktori kod HR-HPV pozitivnih žena utiču na razvoj i progresiju cervikalnih promena.

Ova studija je pokazala da starija životna dob povećava rizik za razvoj HSIL promena tri puta. Žene sa HSIL nalazom bile su značajno starije od žena drugih starosnih grupa. Prosečna starosna dob u HSIL podrupi iznosila je $46,7 \pm 12,2$, dok su žene sa blagim stepenom CIN bile prosečne starosti $37,4 \pm 9,5$. Najniži prosek godina zabeležen je u grupi ispitanica sa HR-HPV infekcijom i normalnim citološkim nalazom ($34,5 \pm 8,2$ godina).

Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom koja ukazuje na to da je HR-HPV tipovima neophodno više vremena kako bi promene na grliću materice progredirale u teže oblike cervikalne bolesti koje koreliraju sa lošijim citološkim gradusima. Drugi autori takođe

navode da su žene starosne dobi između 46 i 55 godina u najvećem riziku za razvoj HSIL promena (Tao i sar., 2014).

Infekcije HR-HPV tipovima najčešće nastaju u mlađem životnom dobu (Sargent i sar., 2008), ali je neophodno da prođe niz godina za progresiju infekcije ka višim stepenima cervikalnih promena. Studija objavljena 2010. godine od strane Chan-a i saradnika pokazala je da se najviša učestalost HR-HPV infekcije registruje kod žena starosne dobi između 26 i 30 godina, a da je nakon uspostavljene infekcije neophodno da protekne 5 do 15 godina kako bi se ispoljile promene na grliću materice u vidu CIN II/III lezija. Prvi pik učestalosti invazivnog cervikalnog karcinoma zabeležen je kod žena starosne dobi 41-45 godina, što je 15 godina nakon prve infekcije i najmanje 10 godina nakon nastanka CIN II/III promena.

Istraživanja pokazuju da nekoliko drugih kofaktora igra značajnu ulogu u razvoju cervikalnih promena. Ovi faktori uključuju socioekonomske faktore, BMI, pušenje, broj porođaja, perzistentnu HPV infekciju, kao i perzistenciju drugih genitalnih infekcija. Pokazano je da postojanje izvesnog hormonskog disbalansa koji se klinički ispoljava u vidu neredovih menstrualnih ciklusa, takođe može predstavljati potencijalni faktor rizika. Hormonski poremećaji mogu se povezati i sa starosnom dobi pacijentkinja i ulaskom u menopauzu, s obzirom na to da se kod mlađih žena iregularnost menstrualnih ciklusa beleži u znatno manjem broju slučajeva.

Mnogi autori pokazali su da se nivo obrazovanja može povezati sa cervikalnim oboljenjima. U ovoj studiji, školska sprema predstavljala je faktor rizika za razvoj HSIL promena. Ispitanice kod kojih su registrovane promene koje odgovaraju HSIL najčešće su bile srednjeg obrazovnog statusa, dok su ispitanice sa HSIL i visokim nivoom obrazovanja registrovane u značajno malom broju slučajeva. Razlozi zbog kojih se promene višeg stepena češće registruju kod žena nižeg obrazovnog statusa objašnjavaju se prisustvom više različitih markera koji su pokazatelji progresije cervikalnih promena kod ovih žena (neadekvatan skrining, rano stupanje u seksualne odnose, ranije trudnoće, multiparitet, rizično seksualno ponašanje i češće koinfekcije koji mogu pospešiti razvoj i progresiju cervikalne HPV infekcije) (Louie i sar., 2009).

Studija Khan-a i saradnika iz 2005. godine koja je ispitala uticaj socioekonomskih faktora na razvoj CIN III promena kod žena sa HR-HPV infekcijom pokazala je da rizik za CIN III raste sa smanjenjem nivoa obrazovanja. Slične rezultate pokazala je i studija objavljena godinu dana ranije u kojoj je niži nivo obrazovanja i veći stepen siromaštva povezan sa povećanim stopama incidencije penilnog karcinoma, kao i karcinoma cerviksa i vulve (Bernard i sar., 2008).

Prekomerna telesna težina koja se karakteriše kao BMI>25 predstavlja kofaktor koji kod žena sa HR-HPV infekcijom povećava šansu za razvoj LSIL i HSIL promena 2-3 puta (Marathur i sar., 2009; Lee i sar., 2013). Slični rezultati dobijeni su i u ovoj studiji. Kod pacijentkinja kod kojih je su registrovane LSIL ili HSIL promene, nutritivni status, izražen preko BMI, bio je značajno viši u odnosu na žene sa drugim cervikalnim nalazom i svrstan je u kategoriju gojaznih.

Studije sprovedene u SAD su pokazale da gojazne žene imaju veće stope mortaliteta od cervikalnog karcinoma u odnosu na žene sa normalnim BMI (Calle i sar., 2003). Jedno od objašnjenja zbog kojih prekomerna telesna težina dovodi do razvoja cervikalnih promena višeg stepena jeste podatak da se žene sa većim BMI neredovnije podvrgavaju skrining programima. Na taj način povećava se rizik za progresiju cervikalnih promena i šansa za nastanak cervikalnog karcinoma čime se i rizik za smrtni ishod povećava (Maruthur i sar., 2009). Drugi razlog je povećanje serumskih nivoa polnih hormona kod gojaznih osoba, što se povezuju sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma u ženskom reproduktivnom traktu (Prompakay i sar., 2013). Utvrđeno je da gojaznost ima značajno veći uticaj na nastanak adenokarcinoma u odnosu na nastanak karcinoma skvamoznih ćelija. Ovi rezultati ujedno ukazuju i na to da bi gojaznost mogla imati uticaj na razvoj glandularnog karcinoma grlića materice (Lacey i sar., 2003).

Nasuprot ovim rezultatima, studija Wilson-a i saradnika iz 2013. godina pokazala je negativnu korelaciju između prekomerne telesne težine i cervikalnog karcinoma. Velika meta-analitička studija koja je ispitala uticaj prekomerne težine i gojaznosti na nastanak cervikalnog karcinoma takođe je iznela slične rezultate. Ova studija obuhvatila je 9 istraživanja koja su objavljena do 2015. godine i pokazala da prekomerna telesna težina nije povezana sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma grlića materice, dok gojaznost ima slab uticaj na razvoj cervikalnog karcinoma (Poorlajal i Jenabi, 2016).

Upotreba kondoma je, u ovom istraživanju, prvenstveno posmatrana kao protektivni kofaktor u razvoju cervikalne displazije kod HR-HPV pozitivnih žena. Ukoliko se kondomi koriste ispravno i konstantno, smanjuje se rizik za razvoj STD koje mogu biti uzrokovane HIV, HSV ili bakterijama CT, *Neisseria gonorrhoeae* i protozom *Trichomonas vaginalis* (Shew i sar., 2006).

Ovo istraživanje je pokazalo da je faktor koji povećava učestalost lezija bilo kog stepena (ASCUS, LSIL, HSIL) povezan sa odsustvom upotrebe kondoma. Ovaj vid zaštite korišćen je u veoma malom broju slučajeva u svim starosnim grupama izuzev u kontrolnoj grupi gde je učestalost upotrebe kondoma iznosila 70%. Zbog smanjene upotrebe kondoma, šanse za razvoj cervikalnih promena bile su veće u svim ispitivanim grupama. Mogućnost za razvoj HSIL promena bila je 5 puta veća kod ispitanica koje nisu koristile kondom (OR=5.65, 95% CI 1.738-20.447), dok je šansa za razvoj LSIL promena bila 4 puta veća (OR=4.02, 95% CI 1.579-10.260). Ispitanice sa HR-HPV infekcijom koje nisu koristile kondom imale su 2 puta veću šansu za nastanak ASCUS-a (OR=2.02, 95% CI 1.119-4.324).

Protektivna uloga kondoma pokazana je i u drugim studijama. Konstantna upotreba kondoma utiče na prevenciju HPV infekcije, povećava šansu za eliminacijom već postojeće HPV infekcije i dovodi do regresije CIN promena bez primene hirurških intervencija (Lam i sar., 2014). Upotreba kondoma tokom tri meseca podstiče regresiju promena i eliminaciju HPV infekcije tako što omogućava efikasnu eliminaciju virusa od strane imunskog sistema (Cornelis i sar., 2003). Izlaganje semenoj tečnosti kod HR-HPV pozitivnih žena povećava rizik za razvoj prekanceroznih lezija, pa upotreba kondoma značajno sprečava njihov nastanak (Kim i sar., 2012).

Veći broj seksualnih partnera registrovan je u gotovo svim ispitivanim grupama osim u grupi ispitanica sa HSIL nalazom gde je iznosio nešto ispod 40%. Ovakav rezultat može se objasniti bračnim statusom ispitanica iz ove grupe koje su u najvećem procentu slučajeva bile u braku duži vremenski period. Iako se u ovom istraživanju razlike među ispitivanim grupama nisu pokazale kao statistički značajne, smatra se da je veći broj seksualnih partnera značajan za sticanje HPV infekcije, ali ne i za progresiju već postojećih promena.

Prethodno sprovedene studije pokazuju da je broj seksualnih partnera u pozitivnoj korelaciji sa rizikom za nastanak HPV infekcije (Sanchez Aleman i sar., 2011). Vaccarella i saradnici u studiji objavljenoj 2006. godine pokazali su da veći broj seksualnih partnera povećava šansu za razvojem HPV infekcije. Žene koje su imale multiple infekcije i bile HR-HPV pozitivne imale su i veći broj seksualnih partnera u odnosu na žene kod kojih je izolovan samo jedan uzročnik i niskorizični tip HPV, ali ova razlika nije pokazana kao statistički značajna.

Koinfekcije predstavljaju značajan kofaktor u patogenezi cervikalne HR-HPV infekcije i progresiji cervikalnih promena. Najčešće izolovani infektivni agensi su CT, genitalne mikoplazme, CMV, HIV, HSV1 i 2, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*. Mehanizam kojim ovi agensi ostvaruju svoj efekat podrazumeva direktnu genotoksičnost, indukciju cervikalne inflamacije koja uzrokuje genotoksična oštećenja tako što dovodi do poremećaja oksidativnog metabolizma ili indukciju HPV perzistencije (Castle i Giuliano, 2003). Prethodne infekcije koje nisu lečene ili su neadekvatno lečene, kao i infekcije koje su se ponavljale značajno utiču na razvoj displastičnih promena na cerviksu.

Ovim istraživanjem utvrđeno je da su ranije cervikalne i vaginalne infekcije u signifikantno velikom broju slučajeva bile zastupljene kod žena koje su imale LSIL (73,9%), dok su kod ispitanica sa HSIL bile zastupljene u manjem procentu slučajeva (57,9%). Kod pacijentkinja sa LSIL i HSIL učestalost je bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu. Najveća učestalost rekurentnih genitalnih infekcija bila je zastupljena kod ispitanica sa LSIL nalazom i to signifikantno više u odnosu na sve ostale grupe, dok su ranije lečene infekcije najčešće registrovane kod ispitanica sa LSIL i HSIL nalazom. Ranije cervikalne i vaginalne infekcije, kao i rekurentne infekcije povećavale su rizik za nastanak LSIL promena 2-3 puta.

Literaturni podaci pokazuju da su žene sa HSIL promenama najčešće imale prethodne infekcije sa CT (Quinónez-Calvache i sar., 2016). Ovim istraživanjem pokazana je nedvosmislena povezanost između razvoja cervikalnih promena i koinfekcija sa drugim infektivim agensima koji olakšavaju HPV kolonizaciju i perzistenciju u epitelu cerviksa. U značajnom broju slučajeva, kod pacijentkinja sa HSIL nalazom iz promena je izolovana CT. U ostalim podgrupama citološkog nalaza

izolovana je kombinacija uzročnika (niskorizični HPV, *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*), ali razlika u zastupljenosti nije bila statistički značajna.

Epidemiološki podaci pokazuju da CT igra značajnu ulogu kao kofaktor u cervikalnoj kancerogenezi (Silins i sar., 2005), iako još uvek nije sa sigurnošću razjašnjeno na koji sve način CT stupa u interakciju sa HR-HPV i dovodi do transformacije epitelnih ćelija cerviksa (Tavares i sar., 2014). CT povećava osetljivost na HPV infekciju tako što odovodi do razvoja mikroabrazija i alteracije epitelnih ćelija čime se olakšava ulazak virusa u epitelne ćelije cerviksa. Svoju ulogu CT ostvaruje i učestvovanjem u ćelijskoj proliferaciji, modulaciji imunskog odgovora, inhibiciji apoptoze i indukciji hroničnih inflamatorih promena (Silins i sar., 2005).

Prevalencija koinfekcije HPV i CT varira u rezultatima različitih studija. Seraceni i saradnici su utvrdili da je prevalencija koinfekcije sa CT iznosila 58%, kao i da je najčešće registrovana kod žena mlađih od 25 godina. Kod pacijentkinja koje su imale i CT infekciju najčešće su izolovani multipli HPV tipovi (Seraceni i sar., 2016). Nasuprot ovim rezultatima, studija iz Italije je pokazala da je prevalencija udružene HPV i CT infekcije kod mladih žena znatno manja (2,7%) (Panatto i sar., 2015).

Studija Wohlmeistera i saradnika iz 2016. godine pokazuje da se infekcija HR-HPV najčešće javlja udružena sa CT infekcijom. Prisustvo CT najčešće je bilo povezano sa infekcijom HR-HPV tip 33 i multiplim infekcijama sa HR-HPV tip 16 i 18. Ove nalaze potvrđuju i brojne druge studije u kojima je koinfekcija CT/HR-HPV bila povezana sa razvojem cervikalnih lezija visokog stepena (CIN 2/3) (Mancini i sar., 2018).

Infekcija bakterijom *Ureaplasma urealyticum* predstavljala je najčešću prethodnu infekciju koja je registrovana u tri od četiri ispitivane grupe. Rezultati ove studije koji su se odnosili na ulogu prethodnih STD infekcija kod pacijentkinja sa perzistentnom cervikalnom HR-HPV infekcijom upućuju na to da je infekcija *Ureaplasma urealyticum* bila registrovana kao najčešća STD kod pacijentkinja gotovo svih grupa (PAP-II, ASCUS, LSIL). U grupi ispitanica sa normalnim citološkim nalazom bila je udružena sa infekcijom *Mycoplasma hominis*. Iako upoređivanjem grupa nije uočena statistički značajna razlika, *Ureaplasma urealyticum* smatra se važnim kofaktorom u razvoju HPV

indukovanih lezija. Svoje ulogu ova bakterija ostvaruje iniciranjem razvoja ćelijskih abnormalnosti i omogućavanju HPV perzistencije. *In vitro* studije pokazale su da infekcija sa *Mycoplasma hominis* može dovesti do hromozomskih promena i ćelijske transformacije (Verteramo i sar., 2009).

Studije pokazuju da multiparitet kod HR-HPV pozitivnih žena može biti povezan sa rizikom za razvoj HSIL promena na grliću materice (Castellsague i sar., 2003). Žene koje su imale sedam ili više porođaja imaju četiri puta veći rizik za razvoj skvamocelularnog karcinoma u poređenju sa ženama koje nisu rađale. Rizik se značajno povećava sa povećanjem broja porođaja. Hormonske, traumatske i imunološke hipoteze predstavljaju neka od objašnjenja kojima se pokušava utvrditi veza između većeg broja porođaja i displastičnih promena grlića materice. Multiparitet se povezuje sa održavanjem zone transformacije ektocerviksa tokom dužeg niza godina, čime se olakšava kolonizacija epitela HPV, kao i drugim agensima koji uzrokuju STD. Hormonske promene u toku trudnoće modulišu imunski odgovor na HPV infekciju i indukuju perzistenciju virusa. Hormonski mehanizmi utiču i na progresiju premalignih u maligne lezije tako što promovišu integraciju virusne DNK u genom domaćina i dovode do pojačane ekspresije E6 i E7 onkogena (Gargano i sar., 2012; Kim i sar., 2012).

Ovo istraživanje je pokazalo da su u odnosu na broj porođaja, dece i abortusa skoro sve upoređivane grupe bile jednake, ali ispitanice koje su imale teži oblik displazije imale su u proseku i najveći broj porođaja. Šansa za nastanak HSIL promena bila je 5 puta veća kod onih ispitanica koje su imale veći broj porođaja. Ovo je bilo značajno više u odnosu na ostale upoređivane grupe, ali na obuhvaćenom uzorku ispitanica nije predstavljalo statistički značajnu razliku.

Dostupni literaturni podaci ukazuju na različite rezultate kada je u pitanju uticaj koji trudnoća i porođaji imaju na razvoj HPV infekcije i cervikalnih promena. Studija koju su sproveli Gargano i saradnici pokazala je da kod HR-HPV pozitivnih žena multiparitet predstavlja faktor rizika za razvoj CIN III promena i cervikalnog karcinoma. Žene koje su bile HR-HPV pozitivne i koje su imale pet ili više porođaja bile su u 1,6 puta većem riziku za razvoj displastičnih promena cerviksa visokog stepena (Gargano i sar., 2012). Slične rezultate objavili su i Almonte i saradnici. Njihova studija obuhvatila je 5435 žena i pokazala da su one žene koje su imale HR-

HPV infekciju i tri ili više porođaja bile u većem riziku za razvoj CIN II promena (Almonte i sar., 2011). Jensen i saradnici takođe su pokazali da porođaji predstavljaju faktori rizika za nastanak CIN III promena kod HR-HPV pozitivnih žena (Jensen i sar., 2012).

Različite intervencije na cerviksu podjednako doprinose nastanku i progresiji promena i povezane su sa već postojećim promenama na cerviksu. Intervencije na grliću materice sa značajno većom frekvencijom bile su zastupljene kod pacijentkinja sa HSIL nalazom i povećavale su rizik za razvoj ovih promena dva puta.

Iako je u svim analiziranim grupama bio gotovo podjednak broj pušača, a prosečan pušački period iznosio je između 12 i 20 godina, najduži pušački staž imale su ispitanice koje su bile u HSIL grupi. Prosečan broj cigareta konzumiranih u toku dana iznosio je između 14 i 18, što nije pokazano kao značajna razlika.

Kancerogeni efekat cigareta i duvanskog dima dokazano dovodi do poremećaja deobe ćelija uzrokujući oštećenje DNK. Osim toga, toksične materije uzrokuju imunološku alteraciju utičući na smanjenje broja Langerhansovih ćelija u cerviksu i redukujući NK ćelijsku aktivnost (Simen Kapeu i sar., 2008). Brojne studije pokazuju da se kod žena koje su pušači znatno češće registruje HR-HPV infekcija (Chatzistamatiou i sar., 2013), kao i da se prevalencija HR-HPV infekcije povećava sa povećanjem broja cigareta (Vaccarella i sar., 2008). Wang i saradnici su u studiji koja je obuhvatila 7.129 žena uočili da je kod onih ispitanica koje su bile HR-HPV pozitivne rizik za razvojem CIN III promena i cervikalnog karcinoma bio značajno veći ukoliko su žene bile dugogodišnji ili pušači koji konzumiraju veliki broj cigareta dnevno (Wang i sar., 2019). Ovi rezultati samo su potvrdili ranije sprovedene studije koje su takođe pokazale da su višegodišnji i pušači koji konzumiraju veliki broj cigareta dnevno u povećanom riziku za nastanak displastičnih promena na cerviksu.

Nasuprot ovim rezultatima, studija Plummer-a i saradnika nije pronašla nikakvu doznu zavisnost između pušenja i cervikalnih promena. Na nastanak cervikalnih lezija uticaj nisu imali ni vreme početka pušenja, kao ni dužina pušačkog staža (Plummer i sar., 2003).

Pokazalo se da toksični efekat cigareta perzistira i nakon prestanka pušenja. Bivši pušači (<10 godina) imaju gotovo podjednak rizik za razvoj HR-HPV infekcije kao i aktivni pušači, dok one osobe koje su prestale da puše pre 20 godina imaju dva puta manji rizik za razvojem HR-HPV infekcije (Roura i sar., 2014). Velika IARC studija pokazala je da aktivni pušači, kao i bivši pušači (<4 godine) imaju povećan rizik za razvoj CIN III promena i cervikalnog karcinoma u poređenju sa nepušačima (Appleby i sar., 2006). Slične rezultate pokazala je i studija iz Velike Britanije u kojoj su pušači bili u većem riziku za razvoj cervikalnih promena višeg stepena (Collins i sar., 2010).

Prethodne studije koje su ispitivale povezanost između OC i cervikalne kancerogeneze dale su oprečne rezultate. Ovim istraživanjem pokazano je da upotreba OC nije u korelaciji sa displastičnim promenama koje se razvijaju na grliću materice. Ograničenje ove studije, u pogledu upotrebe OC, je što je studija obuhvatila veliki broj žena koje nikada nisu koristile OC, kao i nekoliko ispitanica koje su kontraceptive koristile kraći vremenski period i nekoliko ispitanica koje su u prošlosti koristile kontraceptive, ali je od poslednje upotrebe protekao duži vremenski period.

Pozitivna korelacija između upotrebe OC koje sadrže kombinovane hormonske preparate i nastanka cervikalnih HPV lezija uočena je u studiji Marksa i saradnika iz 2011. godine. Rezultati ove studije pokazali su da upotreba OC u trajanju od preko šest godina povećava rizik za razvojem HPV infekcije. Slične podatke objavili su Mitchel i saradnici, kao i Jensen i saradnici. Ovim istraživanjima je utvrđeno da su žene koje su upotrebljavale OC bile u većem riziku za razvoj perzistentne HPV infekcije u poređenju sa ženama koje nikada nisu koristile OC (Mitcheli i sar., 2014; Jensen i sar., 2013).

Nasuprot ovim rezultatima, istraživanje Westreich-a i saradnika iz 2014. godine pokazalo je da ne postoji povezanost između upotrebe depoa medroksiprogesterona, preparata noretisterona i kombinovanih OC i povećane incidencije i progresije cervikalnih lezija. Slični rezultati dobijeni su i u unakrsnoj studiji Binesh-a i saradnika u kojima nije potvrđena korelacija između upotrebe kombiovanih OC i razvoja cervikalnih displastičnih promena (Binesh i sar., 2013). Sammarco i saradnici su pokazali da upotreba OC ne utiče na perzistenciju virusa i sposobnost organizma da eliminiše virusnu infekciju (Sammarco i sar., 2011).

Posmatrajući dužinu upotrebe OC, rezultati studija takođe su oprečni. Statistički značajna razlika u dužini upotrebe OC nije uočena u studiji Lia i saradnika iz 2013. godine. Slične rezultate objavili su i Westreich i saradnici, kao i Green i saradnici (Westreich i sar., 2014; Green i sar., 2003). Određene studije ukazale su čak da upotreba hormonskih kontraceptiva, bilo da se primenjuju oralno ili intramuskularno ima protektivnu ulogu kada je reč o nastanku HPV indukovnih lezija ukoliko se upotrebljavaju manje od 4 godine (Watson Jones i sar., 2013).

Sa druge strane, kohortna studija sprovedena od strane Roure i saradnika ukazala je da postoji jaka, pozitivna korelacija između dužine upotrebe kombinovanih OC i rizika za razvoj HSIL promena i cervikalnog karcinoma. Ispitanice obuhvaćene njihovom studijom koje su upotrebljavale OC duže od 15 godina imale su i 1,6 puta veću šansu za nastanak HSIL promena, kao i 1,8 puta veći rizik za razvoj karcinoma grlića materice (Roura i sar., 2016). Druge studije su pokazale da upotreba OC duže od šest godina predstavlja faktor rizika za razvoj HPV infekcije (Marks i sar., 2011).

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u toku ovog istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. HPV infekcija visoko onkogenim tipovim dokazana je kod 84 (15,5%), od ukupno 541, ispitanice koje su bile obuhvaćene istraživanjem.
2. Kod HR-HPV pozitivnih žena iz cervikalnih promena izolovani su sledeći HPV tipovi: HPV-16,45,31,52,18,53,33,58, 66,35,59,62.
3. HR-HPV tip 16 se sa značajno većom učestalošću javlja kod pacijentkinja sa HSIL nalazom. 16 od 17 ispitanica (86,5%) koje su imale HSIL imale su i HPV-16 infekciju.
4. Povišena produkcija TNF- α citokina se sa značajno većom učestalošću javlja u lezijama umerenog do teškog stepena. Dominantan genotip u ovim lezijama je AA genotip.
5. Polimorfizam TNF- α gena je visoko signifikantnim, pozitivnim koeficijentom korelacije povezan sa citološkim nalazom. Više produkcije ovog citokina javljaju se pri nepovoljnijem citološkom statusu.
6. Polimorfizam gena za IFN- γ nije u značajnoj korelaciji sa nastankom CIN. Postoji umerena, negativna, signifikantna veza između polimorfizma gena IFN- γ i ranijih infekcija. Niske produkcije ovog citokina u vezi su sa većim brojem prethodnih infekcija.
7. Polimorfizam gena za IL-12 takođe nije u značajnoj korelaciji sa nastankom CIN. Između polimorfizma gena za IL-12 i ranica na grliću materice postoji dobra, negativna i signifikantna veza. Niskosekretorni genotip za IL-12 u korelaciji je sa prisustvom ranica na grliću materice.
8. Starosna dob se izdvaja kao jedan od kofaktora sa visokim uticajem na nastanak HSIL kod žena sa perzistentnom HR-HPV infekcijom. Žene sa najtežim oblicima cervikalne bolesti bile su signifikantno starije u odnosu na druge grupe, a njihova prosečna starosna dob iznosila je 46,7 godina. Rizik za razvoj HSIL je kod žena starije životne dobi 3,45 puta veći u odnosu na druge ispitivane podgrupe.

9. BMI veći od 25 je faktor koji uvećava šansu za nastanak LSIL i HSIL za 2-3 puta kod pacijentkinja sa HR-HPV. Vrednosti BMI su signifikantno više kod žena sa cervikalnim lezijama umerenog ili teškog stepena i nalazile se u kategoriji gojaznih.
10. Na nastanak HSIL uticaj ima i dužina pušačkog staža. Značajno najduži pušački staž registrovan je kod ispitanica sa HSIL nalazom (12 - 20 godina). Broj cigareta po danu nema uticaj na nastanak cervikalnih promena težeg stepena i ne razlikuje se među ispitivanim grupama.
11. Ispitanice sa HSIL nalazom najčešće imaju srednji nivo obrazovanja. Niži obrazovni status povećava rizik za razvoj HSIL promena tri puta.
12. Kod ispitanica sa HSIL nalazom češće se registruju neredovni menstrualni ciklusi u poređenju sa ostalim ispitivanim grupama. Iregularni menstrualni ciklusi povećavaju rizik za nastanak HSIL za 1,7 puta.
13. Veći broj porođaja (preko 5) povezuje se sa 5 puta većim rizikom za razvoj cervikalnih lezija teškog stepena.
14. Kod ispitanica sa LSIL češće se registruju ranije i ponavljane vaginalne i cervikalne infekcije. Prethodne i rekurentne infekcije povećavaju rizik za razvoj LSIL dva puta.
15. Najčešći prisutan STD patogen kod ispitanica sa HSIL nalazom je *Chlamydia trachomatis* (81,8%). U ostalim ispitivanim grupama citološkog nalaza iz cervikalnih promena izolovani su *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*, ali su češće bili prisutni kod pacijentkinja sa infekcijom niskorizičnim tipovima HPV.
16. Intervencije na grliću materice povećavaju rizik za nastanak HSIL promena dva puta.
17. Upotreba kondoma predstavlja protektivni faktor koji smanjuje rizik za razvoj CIN svih stepena. Izostanak primene kondoma, pri infekciji HR-HPV, povećava šansu za nastanak HSIL preko 5 puta, LSIL preko 4 puta i nastanak ASCUS oko 2 puta.
18. Poređenjem rezultata HR-HPV genotipizacije dobijenih metodom sekvenciranja i rezultata dobijenih komercijanim testom za HPV tipizaciju uočeno je slaganje u 85,2% slučajeva.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem, posebno utvrđivanje citokinskog profila pacijentinja sa HR-HPV infekcijom mogli bi da budu model za dizajniranje dijagnostičkih algoritama koji bi pravovremeno omogućili predikciju u kom pravcu će se odvijati tok perzistentne HR-HPV cervikalne infekcije. Takođe, dobijeni rezultati jasno ukazuju na značaj kofaktora koji su važni činioci za nastanak cervikalne bolesti udružene sa HPV. Ovakvi programi obezbedili bi dalji, uspešan i personalizovan terapijski pristup u tretmanu perzistentne HR-HPV cervikalne bolesti, odnosno prevenciji nastanka cervikalnog karcinoma.

7. Literatura

Al-Ouqaili MTS, Al-Kubaisy SH, Al-Aethwy AMT. Molecular Screening Study on Low and High-Risk genotypes of Human Papillomavirus among Patients with Benign and Malignant Cervical Lesions. University of Acbar, 2017;11.

Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:1654-1663.

Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006;103:631-636.

Akinyemiju T, Ogunsina K, Sakhuja S, Ogbhodo V, Braithwaite D. Lifecourse socioeconomic status and breast and cervical cancer screening: Analysis of the WHO9s Study on Global Ageing and Adult Health (SAGE). *BMJ Open* 2006;6:e012753.

Anttila A, Ronco G. Description of the national situation of cervical cancer screening in the member state of the European Union. *Eur J Cancer* 2009;45:2685-2708.

Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;118:1481-1495.

Aynaud O, Buffet M, Roman P, Plantier F, Dupin N. Study of persistence and recurrence rates in 106 patients with condyloma and intraepithelial neoplasia after CO₂ laser treatment. *Eur J Dermatol* 2008;18:153-158.

Azzimonti B, Hertel L, Aluffi P, Pia F, Monga G, Zocchi M, et al. Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 1999;59:110-116.

Babapour N, Mehramiz M, Rastgar Moghadam A, Behboodi N, Yousefi Z, Maftouh M, et al. Association of TNF-308 G>A polymorphism located in tumor necrosis factor a

- with the risk of developing cervical cancer and results of pap smear. *J Cell Biochem* 2019;120:5444-5448.
- Baldwin A, Huh KW, Münger K. Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Dysregulates Steroid Receptor Coactivator 1 Localization and Function. *J Virol* 2006;80:6669-6677.
- Barut MU, Kale A, Kuyumcuoglu U, Bozkurt M, Agaçayak E, Ozekinci S, et al. Analysis of Sensitivity, Specificity, and Positive and Negative Predictive Values of Smear and Colposcopy in Diagnosis of Premalignant and Malignant Cervical Lesions. *Med Sci Monit* 2015;21:3860-3867.
- Baskaran K, Kumar PK, Karunanithi S, Sethupathy S, Thamaraiselvi B, Swaruparani S. Detection of High-Risk Human Papillomaviruses in the Prevention of Cervical Cancer in India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:8187-8190.
- Benard VB, Johnson CJ, Thompson TD, Roland KB, Lai SM, Cokkinides V, et al. Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus-associated cancers. *Cancer* 2008;113:2910-2918.
- Berg AO, Atkins D. Screening for cervical cancer: recommendations and rationale. U. S. Preventive Services Task Force. 3rd ed. Agency for healthcare research and quality, Rockville, MD; 2003.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401:70-79.
- Binesh F, Akhavan A, Pirdehghan A, Davoodi M. Does oral contraceptive pill increase the risk of abnormal Pap smear? *Iran J Reprod Med* 2013;11:761-766.
- Blumenthal PD, Lauterbach M, Sellors JW, Sankaranarayanan R. Training for cervical cancer prevention programs in low-resource settings: focus on visual inspection with acetic acid and cryotherapy. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;89:30-37.
- Bodily J, Lamins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011;19:1:33-39.

- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-265.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. *EMBO J* 1984;3:1151-1157.
- Botha M. Preventing cervical cancer. *CME* 2009;27:444-449.
- Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2005;202:1789-1799.
- Buonaguro FM. HIV/HPV coinfection: state-of-the-art. *Retrovirology* 2010;7:22.
- Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 2013;445:232-243.
- Calil LN, Igansi CN, Meurer L, Albano Edelweis MI, Bozzetti MC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus coinfection: association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of patients with pre-neoplastic and neoplastic lesion. *Braz J Infect Dis* 2011;15:126-131.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*;2003;348:1625-1638.
- Capra G, Giovannelli L, Matranga D, Bellavia C, Guarneri MF, Fasciana T, et al. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on HPV related low-and high-grade cervical intraepithelial lesions: a referral hospital-based study in Sicily. *Hum Vaccin Immunother* 2017;8:1839-1843.
- Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *JNCI Monographs* 2016;31,:20-28.

- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002;89:191-199.
- Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients – assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *JNCI Monographs* 2003;31:29-34.
- Chan PK, Chang AR, Yu MY, Li WH, Chan MY, Yeung AC, et al. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. *Int J Cancer* 2010;126:297-301.
- Chatzistamatiou K, Katsamagas T, Zafrakas M, Zachou K, Orologa A, Fitsiou F, et al. Smoking and genital human papilloma virus infection in women attending cervical cancer screening in greece. *World J Obstet Gynecol* 2013;2:53.
- Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Vryzas D, Chatzaki E, Kaufmann AM, Koch I, et al. Cigarette Smoking Promotes Infection of Cervical Cells by High-Risk Human Papillomaviruses, but not Subsequent E7 Oncoprotein Expression. *Int J Mol Sci* 2018;19:422.
- Chen X, Han S, Wang S, Zhou X, Zhang M, Dong J, et al. Interactions of IL-12A and IL-12B Polymorphisms on the Risk of Cervical Cancer in Chinese Women. *Clin Cancer Res* 2009;15:400-405.
- Ciuffo G. Positive transfer with a filtrate of the common wart. *Gior Ital D Mal Ven* 1907;48:12-17.
- Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman CB. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *Eur J Cancer* 2010;46:405-411.
- D Abramo CM, Archambault J. Small Molecule Inhibitors of Human papillomavirus Protein - Protein Interactions. *Open Virol J* 2011;5:80-95.
- Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern PL, et al. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2010;102:1129-1136.

- DeMasi J, Chao MC, Kumar AS, Howley PM. Bovine Papillomavirus E7 Oncoprotein Inhibits Anoikis. *J Virol* 2007;81:9419-9425.
- de Carvalho VCV, de Macedo JL, de Lima CAD, et al. IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. *Mol Biol Rep* 2012; 39:7627–7634.
- de Viliers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori* 1978;64:549-553.
- Diamantis ML, Bartlett BL, Tyring SK. Safety, efficacy & recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts. *Skin Therapy Lett* 2009;14:1-3.
- Doorbar J, Quint W. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses, *Vaccine* 2012;30: 55-70.
- Duelli DM, Padilla-Nash HM, Berman D, Murphy KM, Ried T, Lazebnik Y. A virus causes cancer by inducing massive chromosomal instability through cell fusion. *Curr Biol* 2007;17:431-437.
- Dunn AE, Ogilvie MM. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J Ultrastr Res* 1968;22:282-295.
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-3815.
- Fitzgerald DW, Bezak K, Ocheretina O, Riviere C, Wright TC, Milne GL, et al. The Effect of HIV and HPV Coinfection on Cervical COX-2 Expression and Systemic Prostaglandin E2 Levels. *Cancer Prev Res* 2012,5:34-40.

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:359-386.
- Fernandes JV, de Medeiros Fernandes TAA. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis, Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective, Dr. Davy Vanden Broeck (Ed) 2012.
- Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, Nees M, Baker PD, Evans CH, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Mol Carcinog* 2000;27:97-109.
- Gao P, Zheng J. High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Virology* 2010;7:1-3.
- Gargano JW, Nisenbaum R, Lee DR, Ruffin MT, Steinau M, Horowitz IR, et al. Age-group differences in human papillomavirus types and cofactors for cervical intraepithelial neoplasia 3 among women referred to colposcopy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:111-121.
- Garland SM, Kjaer SK, Munoz N, Block SL, Brown DR, DiNubile MJ, et al. Impact and effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine: a systemic review of ten years of real-world experience. *Clin Infect Dis* 2016;63:519-527.
- Gey A, Kumari P, Sambandam A, Lecuru F, Cassard L, Badoual C, et al. Identification and characterization of a group of cervical carcinoma patients with profound downregulation of intratumoral Type 1 (IFN γ) and Type 2 (IL-4) cytokine mRNA expression. *Eur J Cancer* 2003;39:595-603.
- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010; 40:1-13.
- Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery JW, et al. Oral Contraceptive Use and Risk of Breast, Cervical, Colorectal, and

- Endometrial Cancers: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22:1931-1943.
- Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 1977;76:569-580.
- Gonçalves AK, Cobucci RN, Rodrigues HM, Melo AG, Giraldo PC. Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: A systematic quantitative review. *Braz J Infect Dis* 2014;18:651-659.
- Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007;178:3186-3197.
- Hasan UA, Caux C, Perrot I, Doffin AC, Menetrier-Caux C, Trinchieri G, et al. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs. *PNAS*, 2007;104:8047-8052.
- Heilman SA, Nordberg JJ, Liu Y, Sluder G, Chen JJ. Abrogation of the Postmitotic Checkpoint Contributes to Polyploidization in Human Papillomavirus E7-Expressing Cells. *J Virol* 2009;83:2756-2764.
- Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant* 2002;2:560-567.
- Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papilloma virus: a randomized clinical trial. *I J Cancer* 2003;107:811-810.
- Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 2009;384:324-334.
- Howley PM, Schiller JT, Lowy DR. Papillomaviruses. In: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley PM (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2013;1662-1704.

Hu L, Plafker K, Vorozhko V, Zuna RE, Gorbsky GJ, Plafker SM, et al. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* 2009;384:125-134.

ICTV, Virus Taxonomy, Washington, DC, 2018. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Pristupljeno 26.12.2018. godine.

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, et al. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J* 2002;21:4741-4748.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;118:1481-1495.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16573 women with cervical cancer and 35509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *The Lancet* 2007;10:1609-1621.

Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer* 2013;108:234-239.

Jovanović J, Čupić M, Stanojević M, Knežević A, Lazarević I. Osnovi molekularne virusologije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Quark, Beograd, 2005.

Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchrad C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med* 2015;372:711-723.

- Kadaja M, Sumerina A, Verst T, Ojarand M, Ustav E, Ustav M. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J* 2007;26:2180-2191.
- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Tar* 2007;7:79-89.
- Kamio M, Yoshida T, Ogata H, Douchi T, Nagata Y, Inoue M, et al. SOCS1 inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein. *Oncogene* 2004;23:3107-3115.
- Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet-Gregg P, Gewin LC, Gafken PR, Galloway DA. NFX1-123 and Poly(A) Binding Proteins Synergistically Augment Activation of Telomerase in Human Papillomavirus Type 16 E6-Expressing Cells. *J Virol* 2007;81:3786-3796.
- Kavanagh K, Pollock KG, Cuschieri K, Palmer T, Cameron RL, Watt C, et al. Changes in the prevalence of human papillomavirus following a national bivalent human papillomavirus vaccination programme in Scotland: a 7-year cross-sectional study. *Lancet Infect Dis* 2017; 17:1293-1302.
- Khan MJ, Partridge EE, Wang SS, Schiffman M. Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer* 2005;104:61-70.
- Kim J, Kim BK, Lee CH, Seo SS, Park SY, Roh JW. Human papillomavirus genotypes and cofactors causing cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22:1570-1576.
- Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2007;9:289-320.
- Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Pawade J, Glewa S. TNFa polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 2004; 92:675-679.

- Knipe DM, Howley PM. Fields virology, 6th edition. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2013;2456.
- Knežević A. Molekularna analiza HPV izolata sa grlića materice žena u reproduktivnom periodu, Beograd, 2008;44-61.
- Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-Mccune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol* 2008;1:412-420.
- Kohen PA, Jhingran A, Oakin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* 2019;393:169-182.
- Kubistova Z, Mrazek F, Petrek M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009;153:93-102.
- Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, et al. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 2002;22:5801-5812.
- Kumar A, Hussain S, Yadav IS, Gissmann L, Natarajan K, Das BC, et al. Identification of human papillomavirus-16 E6 variation in cervical cancer and their impact on T and B cell epitopes. *J Virol Methods* 2015;218:51-58.
- Lacey CJ, Goodall RL, Tennvall GR, Maw R, Kinghorn GR, Fisk PG, et al. Randomised controlled trial and economic evaluation of podophyllotoxin solution, podophyllotoxin cream, and podophyllin in the treatment of genital warts. *Sex Transm Infect* 2003;79:270-275.
- Lacey JV Jr, Swanson CA, Brinton LA, Altekrose SF, Barnes WA, Gravitt PE, et al. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 2003;98:814-821.
- Lam JU, Rebolj M, Dugué PA, Bonde J, von Euler-Chelpin M, Lynge E. Condom use in prevention of Human Papillomavirus infections and cervical neoplasia: systematic review of longitudinal studies. *J Med Screen* 2014;21:38-50.

- Landy R, Pesola F, Castanon A, Sasieni P. Impact of cervical screening on cervical cancer mortality. Estimation using stage-specific results from anested case-control study. *Br J Cancer* 2016;115:1140-1146.
- Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002;14:432-436.
- Lee JK, So KA, Piyathilake CJ, Kim MK. Mild obesity, physical activity, calorie intake, and the risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *PLoS ONE* 2013;8:66555.
- Li K, Yin R, Wang D, Li Q. Human papillomavirus subtypes distribution among 2309 cervical cancer patients in West China. *Oncotarget* 2017;8:28502-28509.
- Li S, Wen X. Seropositivity to herpes simplex virus type 2, but not type 1 is associated with cervical cancer: NHANES (1999-2014). *BMC Cancer* 2017;17:726.
- Liao SE, Lee WC, Chen HC, Chuang LC, Pan MH, Chen CJ. Baseline human papillomavirus infection, high vaginal parity, and their interaction on cervical cancer risks after a follow-up of more than 10 years. *Cancer Causes Control* 2012;23:703-708.
- Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC. Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *Formos Med Assoc* 2010;109:4-24.
- Liu L, Yang X, Chen X, Kan T, Shen Y, Chen Z, et al. Association between TNF- α polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012;39:2683-2688.
- Leval A, Herweijer E, Ploner A, Eloranta S, Fridman Simard J, Dillner J, et al. Quadrivalent human papillomavirus vaccine effectiveness: a Swedish national cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:469-474.
- Leto MD, Santos Junior GF, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol* 2011;86:306-317.

- Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 2005;24:1821-1830.
- Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer* 2009;100:1191-1197.
- Luciani S, Gonzales M, Munoz S, Jeronimo J, Robles S. Effectiveness of cryotherapy treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet* 2008;101:172-177.
- Mai S, Welzel G, Ottstadt M, Lohr F, Severa S, Prigge ES, Wentzensen N, et al. Prognostic relevance of HPV infection and p16 overexpression in squamous cell anal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;93:819-827.
- Mancini F, Vescio F, Mochi S, Accardi L, di Bonito P, Ciervo A. HPV and Chlamydia trachomatis coinfection in women with Pap smear abnormality: baseline data of the HPV Pathogen ISS study. *Infez Med* 2018;2:139-144.
- Marinho Dias J, Sousa H. Cytomegalovirus Infection and Cervical Cancer: from Past Doubts to Present Questions. *Acta Med Port* 2013;26:154-160.
- Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E, Tadesse A et al. The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. *Int J Cancer* 2011;128:2962-2970.
- Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, et al. Combined oral contraceptive use increases HPV persistence but not new HPV detection in a cohort of women from Thailand. *J Infect Dis* 2011;204:1505-1513.
- Maruthur NM, Bolen SD, Brancati FL, Clark JM. The association of obesity and cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:375-381.
- Maruthur NM, Bolen SD, Brancati FL, Clark JM. Mild obesity, physical activity, calorie intake, and the risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *PLoS ONE* 2013;8:e66555.

- Maucort-Boulch D, Plummer M, Castle PE, Demuth F, Safaeian M, Wheeler CM, et al. Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer* 2010;126:684-691.
- Mbatani N, Adams T, Wijk L, Behrens C, Tam T, Wright T Jr, et al. Performance of an Human Papillomavirus Test in Samples From Women With Histopathologically Confirmed Invasive Cervical Cancer. *J Low Genit Tract Dis* 2016; 20:151-153.
- McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 2009;143:195-208.
- Meites E, Kempe A, Markowitz LE. Use of a 2-Dose Schedule for Human Papillomavirus Vaccination-Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1405-1408.
- Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 2008;8:351-360.
- Ministrastvo zdravlja Uredba o nacionalnom programu za rano otkrivanje raka grlića materice. Sl. glasnik br 73-2013. Ministarstvo zdravlja.
- Miljuš D, Živković S, Plavšić S, Katalina NM, Rakočević I, Božić Z. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji. Beograd, 2017.
- Mitchell SM, Sekikubo M, Biryabarema C, Byamugisha JJ, Steinberg M, Jeronimo J et al. Factors associated with high-risk HPV positivity in a low-resource setting in subSaharan Africa. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210:81.e1-81.e7.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10:550-560.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;32:43-51.
- Momenimovahed Z, Ghoncheh M, Pakzad R, Hasanpour H, Salehiniya H. Incidence and mortality of uterine cancer and relationship with Human Development Index in the world. *Cukurova Med J* 2017;42:233-240.

- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-11460.
- Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1093-1101.
- Nakagawa S, Huibregtse JM. Human scribble is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 2000;20:8244-8253.
- Nguyen CL, Munger K. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology* 2008;380:21-25.
- Nygaard M, Saah A, Munk C, Tryggvadottir L, Enerly E, Hortlund M, et al. Evaluation of the Long-Term Anti-Human Papillomavirus 6 (HPV6), 11, 16, and 18 Immune Responses Generated by the Quadrivalent HPV Vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2015;22:943-948.
- Oriel JD. Pathogenesis. In: Von Krogh G, Rylander E, editors. GPVI. Genitoanal papillomavirus infection: a survey for the clinician. Karlstad: Conpharm AB; 1989.
- Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, et al. Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-Positive Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Lesions Is Associated with Aberrations in Key Intracellular Pathways. *Intervirology* 2008;51:230-234.
- Pan F, Tian J, Ji CS, He YF, Han XH, Wang Y, et al. Association of TNF-alpha-308 and -238 polymorphisms with risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:5777-5783.
- Panatto D, Amicizia D, Bianchi S, Frati ER, Zotti CM, Lai PL, et al. Chlamydia trachomatis prevalence and chlamydial/HPV co-infection among HPV-unvaccinated young Italian females with normal cytology. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11:270-276.

- Paradkar PH, Joshi JV, Mertia PN, Agashe SV, Vaidya RA. Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:3851-3864.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of Interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by HPV E7 Oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:6764 – 6769.
- Patil S, Rao RS, Amrutha N, Sanketh DS. Analysis of human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma using p16: An immunohistochemical study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2014;4:61-66.
- Pimple SA, Amin G, Goswami S, Shastri SS. Evaluation of colposcopy vs cytology as secondary test to triage women found positive on visual inspection test. *Indian J Cancer* 2010;47:308-313.
- Pindis P, Tsikouras P, Iatrakis G, Zervoudis S, Koukouli Z, Bothou A, et al. Human Papilloma Virus Life Cycle and Carcinogenesis. *Maedica* 2016;11:48-54.
- Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: Pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control* 2003;14:805-814.
- Popadić S, Savić E, Marković M, Ramić Z, Medenica L, Pravica V, Spuran Z, Trajković V, Popadić D, 2015. TNF, IL12B, and IFNG Gene Polymorphisms in Serbian Patients with Psoriasis. *Ann Dermatol* 27, 128-132.
- Poorolajal J, Jenabi E. The association between BMI and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 2016;5:232-238.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-866.

- Prompakay R, Promthet S, Kamsa-Ard S, Suwanrungruang K, Wiangnon S, Bradshaw P. Relationship between the body mass index and abnormal Pap smears. *APJCP* 2013;14:5503-5506.
- Quinónez-Calvache EM, Ríos-Chaparro DI, Ramírez JD, Soto-De León SC, Camargo M, Del Río-Ospina L, et al. Chlamydia trachomatis frequency in a cohort of HPV-infected Colombian women. *PLoS ONE* 2016;11:e0147504.
- Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977;21:26-31.
- Rani SA, Rama D. Comparative analysis od visual inspection with acetic acid and Lugol's iodine and liquiprep TM in cervical cancer screening with cervical biopsy as gold standard. *IOSR-JDMS* 2016;15:54-62.
- Rahangdale L, Lippmann QK, Garcia K, Budwit D, Smith JS, van Le L. Topical 5-fluorouracil for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2: a randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210:314:1-8.
- Reagan-Steiner S, Yankey D, Jeyarajah J, Elam-Evans LD, Curtis CR, MacNeil J, et al. National, Regional, State, and Selected Local Area Vaccination Coverage Among Adolescents Aged 13-17 Years - United States, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:850-858.
- Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 2004;30:302-308.
- Rigoni-Stern A. Statistics relating to cancerous diseases. *Gior Servire Progr Pathol Terap* 1942;2:507-517.
- Rincon-Orozco B, Halec G, Rosenberger S, Muschik D, Nindl I, Bachmann A, et al. Epigenetic silencing of interferon- κ in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res* 2009; 69:8718-8725.

- Rocha DAP, Filho RA, Mariño JM, dos Santos CM. "Hidden" sexually transmitted infections among women in primary care health services, Amazonas, Brazil. *Int J STD AIDS* 2014;25:878-886.
- Rotar IC, Mureşan D, Radu P, Petrişor F, Apostol S, Tanc M, et al. TNF- α 308 G/A Polymorphism and Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Anticancer Res* 2014;34:373-378.
- Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The influence of hormonal factors on the risk of developing cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *PLoS One* 2016;11:e0147029.
- Ruttkay-Nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdil L, Chudobova D, Gumulec J, Masarik M, et al. Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol* 2013;43:1754-1762.
- Sammarco ML, Del Riccio I, Tamburro M, Grasso GM, Ripabelli G. Type-specific persistence and associated risk factors of human papillomavirus infections in women living in central Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;168:222-226.
- Sanchez-Aleman MA, Uribe-Salas FJ, Lazcano-Ponce EC, Conde-Glez CJ. Human papillomavirus incidence and risk factors among Mexican female college students. *Sex Transm Dis* 2011;38:275-278.
- Sankaranarayanan R, Basu P, Wesley RS, Mahe C, Keita N, Mbalawa CC, et al. Accuracy of visual screening for cervical neoplasia: Results from an IARC multicentre study in India and Africa. *Int J Cancer* 2004;110:907-913.
- Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med* 2009; 360:1385-1394.
- Santos Lopez G, Marquez Dominguez L, Reyes Leyva J, Vallejo Ruiz V. General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2015;53:166-171.

- Sarian LO, Hammes LS, Longatto-Filho A, Guarisi R, Derchain SF, Roteli-Martins C, et al. Increased risk of oncogenic human papillomavirus infections and incident high-grade cervical intraepithelial neoplasia among smokers: experience from the Latin American screening study. *Sex Transm Dis* 2009;36:241-248.
- Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Effectiveness of Cervical Screening with Age: Population Based Case-Control Study of Prospectively Recorded Data. *BMJ* 2009;339:2968.
- Schwarz TF. AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 vaccination: recent advances in cervical cancer prevention. *Expert Rev Vaccines* 2008;7:1465-1473.
- Schwarz TF. Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, Cervarix Adv Ther 2009;26:983-998.
- Seraceni S, Campisciano G, Contini C, Comar M. HPV genotypes distribution in Chlamydia trachomatis co-infection in a large cohort of women from north-east Italy. *J Med Microbiol* 2016;65:406-413.
- Shamanin VA, Sekaric P, Androphy EJ. hAda3 degradation by papillomavirus type 16 e6 correlates with abrogation of the p14arf-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *J Virol* 2008;82:3912-3920.
- Shew ML, Fortenberry JD, Tu W, Juliar BE, Batteiger BE, Qadadri B, et al. Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006;160:151-156.
- Shi X, Jia Y, Xie X, Li S. Single-nucleotide polymorphisms of the IL-12 gene lead to a higher cancer risk: a meta-analysis based on 22,670 subjects. *Genes Genet Syst* 2017; 92:173-187.
- Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Törnberg S, Hansson BG, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 2005;116:110-115.

- Simen-Kapeu A, Kataja V, Yliskoski M, Syrjänen K, Dillner J, Koskela P, et al. Smoking impairs human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 capsids antibody response following natural HPV infection. *Scand J Infect Dis* 2008;40:745-751.
- Solomon D. Foreword. In: Nayar R, Wilbur DC (eds): *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*, (ed). New York, Springer 2015.
- Stanilova S, Miteva L. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes Immun* 2005;6:364-366.
- Stanley MA. Immunobiology of genital HPV infection. *CME J Gynecol Oncol* 2009;14:36-43.
- Stanley MA. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Ginecol Oncol Vo* 2008;109:15–21.
- Stanley MA. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24:16-22.
- Stern PL. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol* 2005;32:72-81.
- Stern PL, van der Burg SJ, Hampson IN, Broker T, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine* 2012;30:71-82.
- Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949;72,46-50.
- Tamandani MKK, Sobti RC, Shekari M, Suri MV. Expression and polymorphism of INF- γ gene in patients with cervical cancer. *Exp Oncol* 2008;30:224-229.
- Tao L, Han L, Li X, Gao Q, Pan L, Wu L, et al. Prevalence and risk factors for cervical neoplasia: a cervical cancer screening program in Beijing. *BMC Public Health* 2014;14:1185.
- Tao YP, Wang WL, Li SY, Zhang J, Shi QZ, Zhao F, et al. Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12R β 1, IL-27 gene and serum levels of IL-

- 12p40, IL-27p28 with esophageal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1891–1900.
- Tasić D, Lazarevic I, Knezevic A, Tasic L, Pikula A, Perisic Z, et al. The impact of environmental and behavioural cofactors on the development of cervical disorders in HR-HPV-infected women in Serbia. *Epidemiol Infect* 2018;146:1714-1723.
- Tavares MC, de Macêdo JL, de Lima Júnior SF, de Andrade Heráclio S, Amorim MM, de Mascena Diniz Maia M, et al. Chlamydia trachomatis infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. *Mol Biol Rep* 2014;41:865-874.
- Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:1-7.
- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends-An update. *Cancer Epidem Biomar* 2016;25:16-27.
- Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA. E6 Proteins from Multiple Human Betapapillomavirus Types Degrade Bak and Protect Keratinocytes from Apoptosis after UVB Irradiation. *J Virol* 2008;82:10408-10417.
- Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Clifford GM, et al. Sexual behaviour, condom use and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:326-333.
- Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJ, Dai M, Thomas JO, Hieu NT, et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol* 2008;37:536-546.
- Vaccarella S, Laversanne M, Ferlay J, Bray F. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean, and Asia: Regional inequalities and changing trends. *Int J Cancer* 2017;141:1997-2001.

- Vaccarella S, Lortet-Tieulent J, Plummer M, Franceschi S, Bray F. Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors. *Eur J Cancer* 2013;49:3262-3273.
- van der Burg SH, Palefsky JM. Human immunodeficiency virus and human papilloma virus - why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. *J Transl Med* 2009;7:1-8.
- Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, et al. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. *BMC Infect Dis* 2009;9:16.
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 2008;68:307-313.
- Volpato LK, Siqueira IR, Nunes RD, Piovezan AP. Association between Hormonal Contraception and Injuries Induced by Human Papillomavirus in the Uterine Cervix. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018;40:196-202.
- Vukićević D, Mitić R, Mijović M, Mitić N, Vitković L, Đerković B, et al. Deskriptivno - epidemiološke karakteristike karcinoma grlića materice. *Praxis medica* 2015;44:67-72.
- Wang J, Roden RBS. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus associated malignancies. *Expert Rev Vaccines* 2013;12:1:22.
- Wang J, Nong L, Wei Y, Qin S, Zhou Y, Tang Y. Association of interleukin-12 polymorphisms and serum IL-12p40 levels with osteosarcoma risk. *DNA Cell Biol* 2013; 32:605-610.
- Wang L, Ma K, Wang Z, Mou Y, Ma L, Guo Y. Association between tumor necrosis factor alpha rs1800629 polymorphism and risk of cervical cancer. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:2108-2117.
- Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA, et al. Human papillomavirus (HPV) cofactors by disease progression and HPV types in the Study

to Understand Cervical Cancer Early Endpoints and Determinants (SUCCEED). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:113-120.

Westreich D, Jamal N, Smith JS, Schulze D, Williams S, Michelow P, et al. Injectable and oral contraception and the incidence and progression of cervical disease in HIV-infected women in South Africa. *Contraception* 2014;89:286-291.

Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, et al. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res* 2008;14:178-187.

Welters MJ, Kenter GG, de Vos van Steenwijk PJ, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Essahsah F, et al. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:11895-11899.

Wilson JC, O'Rourke MA, Cooper JA, Murray LJ, Hughes CM, Gormley GJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and cervical cancer risk: a case-control study using the Clinical Practice Research Datalink. *Cancer Epidemiol* 2013;37:897-904.

Wohlmeister D, Barreto Vianna DR, Helfer VE, Gimenes F, Lopes Consolaro ME, Barcellos BE, et al. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016;111:106-113.

Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung CF. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci* 2016;23:75.

Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu TC, et al. Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2016;15:989-1007.

Yang J, Pu YG, Zeng ZM, Yu ZJ, Huang N, Deng QW. Interferon for the treatment of genital warts: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2009;21:156.

- Yanofsky VR, Patel RV, Goldenberg G. Genital Warts A Comprehensive Review. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012;5:25-36.
- Yoon CS, Kim Park SN, Cheong SW. Alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:668-673.
- Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009;19:97-113.
- Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Interleukin-12: Clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. *Growth Factors* 2012;30:176-191.
- Zhang QW, Song JY, Ju YH, Sun MZ, Tang SY, Yang SZ, et al. Polymorphism of IFN- γ +874T/A associated with production of IFN- γ affects human papillomavirus susceptibility in rural women from Luohe, Henan, China. *Onco Targets Ther* 2018;11:4339-4344.
- Zhang HL, Zhang YJ. A systemic assessment of the association between tumor necrosis factor alpha 308 G/A polymorphism and risk of cervical cancer. *Tumour Biol* 2013; 34: 1659-1665.
- Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Müller A, Steger G, et al. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol* 2000;8:2617-2623.
- Zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol* 1975;43:569-571.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 2009;384:260-265.
- Ćupić M, Pravica V, Lazarević I, Banko A, Karalić D, Tasić D, et al. The role of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in viral infections. *Arch Biol Sci* 2014;66: 595-600.

Prilog

UPITNIK O KOFAKTORIMA

(upisati podatak ili zaokružiti ponuđeni odgovor)

- **Poslednji kolposkopski nalaz:** 1 - normalan 2 - atipičan
- **Poslednji Pap-a test:** 1 – II grupa 2 – IIIa grupa (ASCUS) 3 – IIIb grupa
4 – IIIb(LSIL) 5 – IIIb(HSIL) 6 – IV grupa
- **Koliko godina imate?** _____
- **Mesto stanovanja /prebivališta:**
1- Beograd i okolina 2 - drugi grad 3 - unutrašnjost/selo
- **Stručna sprema:**
1- niža 2 – srednja 3 - visoka
- **Bračni status:**
1- udata 2 - neudata 3 - razvedena/udovica
- **Socijalni status:**
1 - zaposlena 2 - nezaposlena
- **Etnička pripadnost:**
1- srpska 2 - druga
- **Pušenje:**
1 -nepuša 2 -pušač: koliko godina _____ broj cigareta na dan _____
- **Telesna težina:** _____ kg **Telesna visina:** _____ cm
- **Vreme dobijanja prve menstruacije :** sa koliko godina _____
1 - redovne 2 - neredovne
- **Prvi seksualni odnos :** sa koliko godina _____
- **Broj seksualnih partnera :**
1 - jedan 2 – dva 3 - tri i više

• **Zaštita od trudnoće :**

1-prekinuti snošaj 2-kondom 3 – spirala 4 - dijafragma

5- kontraceptivne pilule (koliko dugo)_____ 6- NE

• **Broj porođaja :** prirodnim putem_____; carskim rezom_____

• **Broj dece**_____

• **Broj pobačaja :** namerni (abortus) _____; spontani _____

• **Ranije lečenje od seksualno prenosivih bolesti :**

1 -DA kojih:_____ 2- NE

• **Da li je bilo ranijih vaginalnih ili infekcija na grliću metrice:**

1 - DA 2 - NE

• **učestale /ponavljane infekcije:**

1 –DA 2 - NE

• **lečene infekcije:**

1 - DA 2 - NE

• **Postojanje promena (ranica) na grliću matrice:**

1 - DA 2 - NE

• **Da li je bilo medicinskih intervencija na grliću materice:**

1 – DA 2- NE

Da li je bilo ginekoloških bolesti u porodici:(karcinom grlića materice -majka,sestra):

1 - DA 2 - NE

Druge bolesti pacijentkinje (šećerna bolest, hepatitis B/C, srčane, hematološke, maligne bolesti):

1 - DA 2 - NE

Biografija

Dr Dijana Tasić rođena je 04.09.1980. godine u Beogradu. 1999. godine završila je Treću beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer. Redovne studije na Medicinskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu upisala je školske 1999-2000. godine, a završila 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,91. Od 2008. godine zaposlena je na Ginekološko-akušerskoj klinici »Narodni Front«, odeljenju laboratorije, odseku mikrobiologije.

Doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je 2010. godine, studijski program Molekularna medicina, naučna oblast mikrobiologija i uža stručna oblast virusologija. Specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije upisala je 2011. godine i završila 2015. godine položivši specijalistički ispit sa odličnom ocenom.

Do sada je objavila 4 rada u časopisima sa IF liste i jedan revijalan rad u časopisu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu "Medicinski podmladak".

Prilog 1

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Dijana Tasić _____

Broj upisa _____ MM II-16/10 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastakom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 03.04.2019. godine

Potpis doktoranda



Prilog 2

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Dijana Tasić

Broj upisa MM II-16/10

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada „Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom“

Mentor: Prof. dr Maja Ćupić

Potpisani Dijana Tasić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 03.04.2019. godine

Potpis doktoranda



Prilog 3

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastakom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 03.04.2019. godine

Potpis doktoranda