



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**ODREĐIVANJE EKSPRESIJE
E6 I E7 GENA KAO
POKAZATELJA ONKOGENE
AKTIVNOSTI VISOKORIZIČNIH
TIPOVA HUMANIH PAPILOMA
VIRUSA U CERVICALNIM
INTRAEPITELNIM LEZIJAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Vera Gusman

Kandidat:

Nataša Nikolić

Novi Sad, 2022. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Наташа Николић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Вера Гусман, ванредни професор Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Одређивање експресије Е6 и Е7 гена као показатеља онкогене активности високоризичних типова хуманих папилома вируса у цервикалним интраепителним лезијама
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 175 Поглавља: 8 Референци: 365 Табела: 33 Слика: 11 Графикона: 10 Прилога: 6
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Медицинска микробиологија (вирусологија)
Кључне речи / предметна одредница:	карцином грлића материце; цервикалне интраепителијалне неоплазије; инфекције папилома вирусима; <i>real time</i> PCR; иРНК; онкогени; туморски биомаркери; фактори ризика; демографија; узраст
Резиме на језику рада:	Увод: Процењује се да се скоро сваки четврти случај малигне болести у свету може довести у везу са инфективним агенсом од којих је приближно сваки трећи узрокован ХПВ. Карцином грлића материце узрокован перзистентном инфекцијом високоризичним генотиповима ХПВ је други водећи узрок смрти код жена узраста од 15 до 44 године. Тестови засновани на молекуларно биолошким методама који се данас уобичајено користе у дијагностици ХПВ инфекција омогућавају доказивање присуства генома и одређивање појединачних типова ХПВ у узорцима цервикалних брисева. Међутим, овај дијагностички приступ не пружа увид у врсту инфекције (транзијентна или перзистентна) и процену ризика од настанка цервикалног карцинома. Последњих година бројна истраживања се баве унапређењем примарног теста у циљу проналажења одговарајуће дијагностичке методе, којом би се стекао увид у тип инфекције. Циљеви истраживања су били усмерени на утврђивање и међусобно поређење онкогене активности најчешће дијагностикованих високоризичних ХПВ у узорцима цервикалних брисева применом иРНК теста, као и поређење у односу на степен тежине цервикалне интраепителне лезије.

Материјал и методе: Истраживањем је било обухваћено 365 узорак цервикалних брисева пацијенткиња старијих од 18 година, упућених од стране гинеколога у Центар за вирусологију, Института за јавно здравље Војводине у периоду од 2017–2021. године. Узорци су били груписани према степену тежине цервикалне интраепителне лезије по 2014 Bethesda System класификацији (NILM, ASCUS, LSIL, HSIL). У свакој групи се налазило најмање 25 узорака цервикалних брисева у којима је доказано присуство ХПВ ДНК. Евидентирани су демографски подаци и фактори ризика који доприносе стицању и перзистирању ХПВ инфекције цервикалног епитела. Применом квалитативног *real time* PCR теста је извршено доказивање и генотипизација ХПВ ДНК у узорцима цервикалних брисева, док је методом реверзне транскрипције и амплификације циљне секвенце доказано присуство иРНК онкогена Е6/Е7, односно онкогена активност испитаних ХПВ. Статистичка анализа извршена је применом параметарских и непараметарских тестова, као и корелационе, униваријантне и мултиваријантне логистичке регресионе анализе.

Резултати указују да су најзаступљенији генотипови у популацији жена Јужнобачког округа ХПВ 16, 31, 33 и 51. У 84,3% анализираних узорака доказана је инфекција изазвана појединачним генотипом, док је у 15,7% случајева присутна удружена инфекција. Утврђена је статистички значајна разлика у заступљености броја позитивних налаза ХПВ 16 ($p = 0,035$) и ХПВ 31 ($p = 0,017$) у зависности од степена тежине цитолошког налаза, што није утврђено за ХПВ 33 и 51. Присуство ХПВ 16 подједнако је заступљено у свим узрасним категоријама, детекција ХПВ 31 и 33 генотипова се смањује са годинама живота, док се ХПВ 51 повећава. Онкогена активност је доказана код 64,5% ХПВ позитивних пацијенткиња. Статистички значајна разлика је утврђена у броју позитивних налаза иРНК Е6/Е7 ХПВ 16 у односу на цитолошки статус ($p = 0,000$) и узрасне категорије ($p = 0,026$). Приближно сваки други ХПВ 16 генотип је онкогено експримиран (48,6%) и најзаступљенији је у групи пацијенткиња са HSIL цитолошким налазом (64,2%), док је присуство иРНК Е6/Е7 ХПВ 31 најмање детектовано у HSIL (7,5%). Дистрибуција онкогене активности преосталих генотипова је приближно иста кроз различите цитолошке групе и задржава се на ниском нивоу (2,2% – 11,4%). Компарација тестова за детекцију ХПВ и њихове онкогене активности у циљу процене прогресије цервикалне интраепителне лезије указала је да је статистички значајно већа специфичност (89,1%) и позитивна предиктивна вредност (69,8% – 78,7%) исказана за иРНК Е6/Е7 тест, док се значајно већа сензитивност бележи при употреби ХПВ ДНК теста (67,6% – 88%). Резултати ROC криве детерминишу већу вероватноћу детекције ХПВ инфекције за 7% коју пружа иРНК тест. У коначном делу резултата дефинисан је статистички значајан финални модел, при чему су као најјачи предиктори за настанак преканцерозних лезија именовани онкогена активности ХПВ 16 и узрасна категорија ХПВ позитивних пацијенткиња. Анализа параметара посматраних демографских фактора и фактора ризика ХПВ позитивних испитаница указала је на одређене разлике у односу на степен тежине цервикалне лезије.

Закључци: Највећи удео инфицираних жена Јужнобачког округа изазван је високоризичним генотиповима ХПВ 16, 31, 33, 51 који су у више од половине испитаних случајева онкогено активни. Укупна онкогена активност испитаних генотипова ХПВ расте са порастом степена тежине цервикалне интраепителне лезије, при чему се онкогено активан ХПВ 16 најчешће детектује у високостепеним цервикалним лезијама. Насупрот томе, заступљеност онкогено активног ХПВ 31 се најмање детектује у високостепеним лезијама, док је заступљеност ХПВ 33 и 51 ниска и није сразмерна степену тежине цервикалне лезије. Заступљеност ХПВ инфекције је обрнуто пропорционална узрасту пацијенткиња Јужнобачког округа што указује да је регресија инфекције доминантан процес који је у складу са адекватним имунским одговором организма. Већа специфичност и позитивна предиктивна вредност иРНК теста у

	односу на ХПВ ДНК тест указује на већу вероватноћу детекције перзистентне ХПВ инфекције приликом његове употребе. Онкогена активност најчешће детектованих високоризичних ХПВ има предиктивни потенцијал у процени настанка високостепене лезије цервикалног епитела. Биомаркери са најјачим предиктивним вредностима за настанак ових лезија су онкогена активност ХПВ 16 и узраст пацијенткиња.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	01. фебруар 2018. године
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	
Напомена:	

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Natasa Nikolic
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Vera Gusman, MD, PhD, associate professor Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Thesis title:	Determination of E6 and E7 gene expression as indicators of oncogenic activity in high-risk genotypes of human papillomavirus in cervical intraepithelial lesions
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages: 175 Chapters: 8 References: 365 Tables: 33 Illustrations: 11 Graphs: 10 Appendices: 6
Scientific field:	Medical sciences
Scientific subfield (scientific discipline):	Medical Microbiology (Virology)
Subject, Key words:	Uterine Cervical Neoplasms; Cervical Intraepithelial Neoplasia; Papillomavirus Infections; Real-Time Polymerase Chain Reaction; RNA, Messenger; Oncogenes; Biomarkers, Tumor; Risk Factors; Demography; Age Factors
Abstract in English language:	<p>Introduction: It is estimated that almost one-quarter of worldwide malignancy can be associated with infectious agents, of which approximately one third is caused by HPV. Cervical cancer caused by persistent infection with high-risk HPV genotypes is the second leading cause of death in women aged 15 to 44. Tests based on molecular biological methods commonly used today in diagnosing HPV infections enable genome detection and determination of individual HPV genotypes in cervical smear samples. However, this diagnostic approach does not provide insight into the type of infection and assessment of the risk of cervical cancer. In recent years, numerous studies have focused on improving the primary test to find an appropriate diagnostic method to provide insight into the type of infection.</p> <p>The study's objectives were to determine the oncogenic activity of the most commonly diagnosed high-risk HPVs in cervical smear samples using the mRNA test and compare the results according to the severity of the cervical intraepithelial lesion.</p> <p>Material and methods: The study included 365 samples of cervical swabs of women older than 18 years, referred by gynecologists to the Center for Virology, Institute of Public Health of Vojvodina from 2017 to 2021. According to the Bethesda classification, samples were grouped according to</p>

the severity of the cervical intraepithelial lesion (NILM, ASCUS, LSIL, HSIL). There were at least 25 samples of cervical smears in each group in which the presence of HPV DNA was proven. Demographic data and risk factors that contribute to the acquisition and persistence of HPV infection of the cervical epithelium were recorded. Using a qualitative real time PCR test, HPV DNA was detected and genotyped in cervical smear samples, while the reverse transcription and amplification method proved the presence of mRNA oncogenes E6 and E7, the oncogenic activity of tested HPV. Statistical analysis was performed using parametric and nonparametric tests, correlation, univariate, and multivariate logistic regression analysis.

The results indicate that the most common genotypes in the female population of South Bačka District are HPV 16, 31, 33, and 51. In 84.3% of the analysed samples, the infection caused by a single genotype was proven, while in 15.7% of cases, a co-infection is present. A statistically significant difference was found for HPV 16 ($p = 0.035$) and HPV 31 ($p = 0.017$) depending on the severity of the cytological results, which did not determine for HPV 33 and 51. The presence of HPV 16 is equally present in all age categories. The detection of HPV 31 and 33 genotypes decreases with years of life, while HPV 51 increases. The oncogenic activity was demonstrated in 64.5% of HPV-positive women. A statistically significant difference was found in the number of positive mRNA E6/E7 HPV 16 results concerning cytological status ($p = 0.000$) and age categories ($p = 0.026$). Approximately every other HPV 16 genotype was oncogenically active (48.6%). It was most prevalent in women with HSIL cytological results (64.2%), while the presence of mRNA E6/E7 HPV 31 was minimally detected in HSIL (7.5%). The distribution of oncogenic activity of the remaining genotypes is approximately the same through different cytological groups and remains at low level (2.2% – 11.4%). A comparison of tests for the detection of HPV and their oncogenic activity to assess the progression of cervical intraepithelial lesion indicated that statistically significantly higher specificity (89.1%) and positive predictive value (69.8% – 78.7%) were expressed for mRNA E6/E7 test, while significantly higher sensitivity is recorded when using the HPV DNA test (67.6% – 88%). The results of the ROC curve determine the higher probability of detecting HPV infection by 7% provided by the mRNA test. A statistically significant final model was defined. The oncogenic activity of HPV 16 and the age category of HPV-positive women were named as the strongest predictors for the development of precancerous lesions. Analysis of the parameters of the observed demographic factors and risk factors of HR HPV-positive subjects showed a difference concerning the severity of the cervical lesion.

Conclusions: The largest number of infected women in the South Bačka District is caused by high-risk genotypes HPV 16, 31, 33, 51, which are oncogenic in more than half of the examined cases. The total oncogenic activity increases with increasing severity of the cervical intraepithelial lesion, with oncogenic active HPV 16 being most commonly detected in high-grade cervical lesions. In contrast, the prevalence of oncogenic active HPV 31 is minimally detected in high-grade lesions, while the prevalence of HR HPV 33 and 51 is low and not proportional to the severity of the cervical lesion. The prevalence of HPV infection is inversely proportional to the age of women in the South Bačka District, which indicates that regression of infection is the dominant process following the adequate immune response. The higher specificity and positive predictive value of the mRNA test than the HPV DNA test indicate a higher probability of detecting persistent HPV infection. The oncogenic activity of the most commonly detected high-risk HPVs has a predictive potential in assessing the occurrence of high-grade cervical epithelial lesions. The oncogenic activity of HPV 16 and age were the

	biomarkers with the strongest predictive values for the development of these lesions.
Accepted on Scientific Board on:	1 February 2018
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	
Note:	

²The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Karakteristike Humanih papiloma virusa (HPV).....	2
1.1.1 Morfologija i struktura HPV	2
1.1.2 Organizacija genoma HPV	2
1.2 Klasifikacija HPV	4
1.3 Životni ciklus HPV	9
1.4 Onkogeni potencijal visokorizičnih HPV genotipova	13
1.4.1 Onkogeni potencijal proteina E5 HR HPV	13
1.4.2 Onkogeni potencijal proteina E6 HR HPV	14
1.4.3 Onkogeni potencijal proteina E7 HR HPV	16
1.5 HPV posredovana onkogeneza cervikalnog epitela.....	19
1.6 Imunski odgovor tokom HPV infekcije.....	26
1.7 Faktori rizika za nastanak karcinoma grlića materice.....	31
1.8 Molekularna dijagnostika HPV infekcije.....	33
1.8.1 Metode signalne amplifikacije.....	34
1.8.2 Metode ciljne amplifikacije	35
1.8.3 Sekvenciranje produkata PCR reakcije.....	38
1.9 Prevenција i terapijske vakcine HPV infekcije.....	42
1.9.1 Prevenција HPV infekcije.....	42
1.9.2 Terapijske vakcine	46
1.10 Epidemiologija karcinoma cerviksa.....	48
1.10.1 Epidemiologija cervikalnog karcinoma u Republici Srbiji.....	50
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	52
3. MATERIJAL I METODE	54

3.1 Klinički uzorci	55
3.2 Hemikalije.....	55
3.3 Obrada uzoraka cervikalnih briseva.....	56
3.4 Citološka dijagnoza.....	56
3.5 Dokazivanje i genotipizacija visokorizičnih HPV	56
3.5.1 Izolacija virusne DNK	57
3.5.2 Izvođenje <i>real time</i> PCR testa za dokazivanje i genotipizaciju HR HPV DNK.....	57
3.5.3 Analiza rezultata <i>real time</i> PCR testa	58
3.6 Dokazivanje iRNK E6/E7 visokorizičnih HPV	59
3.6.1 Izolacija ukupne RNK.....	59
3.6.2 Uklanjanje kontaminanata iz uzoraka izolovane ukupne RNK	60
3.6.3 Izvođenje <i>real time</i> RT-PCR testa za dokazivanje iRNK E6/E7 HR HPV	60
3.6.4 Analiza rezultata iRNK E6/E7 HR HPV testa.....	62
3.7 Upitnik	63
3.8 Statistička obrada podataka.....	63
4. REZULTATI	65
4.1 Genotipizacija visokorizičnih HPV	66
4.1.1 Distribucija HR HPV 16, 31, 33 i 51 genotipova	67
4.1.2 Distribucija pojedinačnih i udruženih HR HPV infekcija	68
4.1.3 Distribucija HR HPV 16, 31, 33 i 51 prema citološkom nalazu.....	69
4.1.4 Analiza starosne strukture žena sa dokazanom HR HPV 16, 31, 33, 51 infekcijom.	71
4.2 Analiza onkogene aktivnosti visokorizičnih HPV 16, 31, 33 i 51	76
4.2.1 Distribucija onkogene aktivnosti u odnosu na HR HPV DNK 16, 31, 33 i 51.....	77
4.2.2 Analiza onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na citološke nalaze..	78
4.2.3 Analiza onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51 prema uzrasnoj kategoriji .	81

4.2.4	Evaluacija testa za određivanje onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51	81
4.3	Komparacija testova za detekciju visokorizičnih genotipova HPV i njihove onkogene aktivnosti u cilju procene progresije cervikalne intraepitelne lezije.....	87
4.3.1	Grafički prikaz parova senzitivnosti i specifičnosti.....	91
4.3.2	Korelacija između faktora progresije cervikalne intraepitelne lezije i citološkog statusa	92
4.3.3	Prediktivni modeli za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.....	94
4.4	Demografske karakteristike i faktori rizika HR HPV infekcije.....	100
5.	DISKUSIJA	105
6.	ZAKLJUČCI	133
7.	LITERATURA	136
8.	PRILOZI	163
	LISTA SKRAĆENICA.....	176
	LISTA SLIKA	180
	LISTA TABELA	181
	LISTA GRAFIKONA.....	184

1. UVOD

1.1 Karakteristike Humanih papiloma virusa (HPV)

Procenjuje se da su papiloma virusi (lat. *Papilloma Viruses*, PV) nastali pre 350 miliona godina (1) paralelno sa pojavom tetrapoda u karbonskom periodu paleozojske ere, što ih svrstava u pripadnike jedne od najstarijih virusnih familija (2). Molekularnim filogenetskim analizama je ustanovljeno da potiču iz Afrike, odakle su se kasnije proširili na ostale kontinente (3). Zbog izgleda kožnih promena sa kojima su se ovi virusi prvi put doveli u vezu, naziv su dobili spajanjem latinske reči „*papilla*”, kojom se označava bradavica ili pustula, i sufiksa grčke reči „*oma*”, koji se koristi za formiranje imenica koje označavaju tumore (4).

1.1.1 Morfologija i struktura HPV

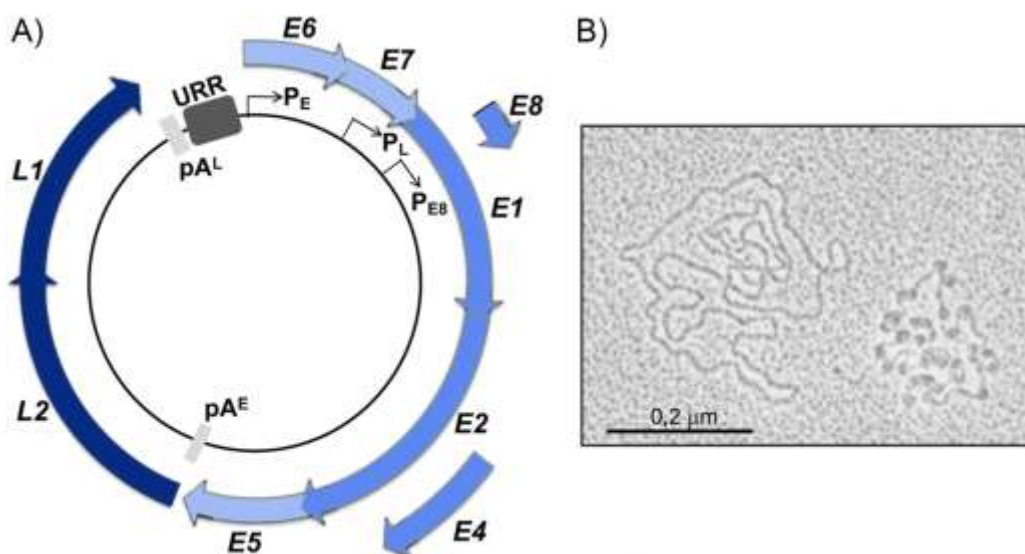
Iako se dovode u vezu sa različitim oboljenjima, svi papiloma virusi imaju zajedničku građu. To su male, sferične virusne čestice ikozaedarne simetrije, bez omotača, dijametra oko 50–60 nm. Genetski materijal čini jedan molekul dvolančane cirkularne DNK koji sadrži od 6.953 do 8.607 baznih parova (engl. *base pair*, bp) vezan za histone koji formiraju hromatinu sličan kompleks (5–8). Nukleinska kiselina je smeštena unutar proteinskog omotača, kapsida koji je građen od 72 pentamerne kapsomere povezane disulfidnim vezama koje ga stabilizuju. Svaka od kapsomera je građena od dve vrste strukturnih kasnih proteina (tzv. *L-late*) L1 i L2, odnosno, od pentamera L1 proteina (55 kDa) koji čini 80% mase kapsomera i monomera L2 proteina (75 kDa) (9). Ove virione karakteriše otpornost na fizičke i hemijske agense (10).

1.1.2 Organizacija genoma HPV

Organizacija genoma kod svih humanih papiloma virusa je veoma slična. Broj gena je ograničen malom veličinom genoma i sastoji se od šest do osam otvorenih okvira čitanja (engl. *Open Reading Frames*, ORFs) koji su lokalizovani na jednom lancu virusne DNK (9,11,12). Uprkos razlici u veličini i broju ORFs, svi papiloma virusi sadrže dobro konzervirane gene uključene u replikaciju virusnog genoma (E1 i E2) i formiranje kapsida (L1 i L2) (13–15), dok je prisutan diverzitet preostalih gena (E4, E5, E6 i E7) (1).

U odnosu na svoju poziciju i položaj u genomu geni se svrstavaju u rani (engl. *Early*, E) i kasni (engl. *Late*, L) region. U funkcionalnom pogledu mogu se podeliti u tri regiona, jedan nekodirajući i dva kodirajuća (Slika 1.1) (14,16–18):

1. Dugi kontrolni region (engl. *Long Control Region*, LCR) ili uzvodni regulatorni region (engl. *Upstream Regulatory Region*, URR) od oko jedne kilobaze (engl. *kilobase*, kb) nema ulogu u ekspresiji proteina, ali ima ulogu promotora i regulatornog faktora transkripcije virusnih gena (15);
2. Rani, E region od oko 4 kb se sastoji do 8 ORFs jedinica (E1–E8) koji kodiraju sintezu nestrukturnih proteina neophodnih za replikaciju i onkogenezu (19);
3. Kasni, L region od oko 3 kb kodira L1 i L2, strukturne proteine virusa (12).



Slika 1.1. Organizacija genoma HPV (A) i slika genoma i nikleoproteina HPV dobijena elektronskim mikroskopom (B) (modifikovano prema *Burley i Roberts* (19), dostupno putem dozvole: CC BY 4.0).

Regulacija složene ekspresije virusnih gena se odvija pod kontrolom humanih, ali i virusnih transkripcionih faktora koji su sadržani u dugom kontrolnom regionu, gde *cis* aktivnim elementima regulišu virusnu transkripciju i početak replikacije (9,14,19). Svi papiloma virusi sadrže URR, bez obzira na varijaciju broja i veličine ORFs (7,9). Iako URR sadrži oko 10% celokupnog virusnog genoma, nije značajno konzerviran pa je prisutna varijabilnost u nukleotidnom sastavu između pojedinačnih genotipova (9,20).

Rani region sadrži do osam gena (E1–E8) koji kodiraju proteine sa mnogobrojnim funkcijama. Ovi proteini su ključni za virusnu transkripciju i replikaciju (E1 i E2), za sazrevanje i oslobađanje virusnih čestica (E4), transformaciju ćelije domaćina (E5, E6, E7) i ćelijsku imortalizaciju (E6, E7). Geni kasnog regiona L1 i L2 kodiraju oba kapsidna proteina, od kojih je L1 ORF gen najviše konzerviran među svim genotipova HPV, a njegov proteinski produkt je najzastupljeniji i izuzetno je imunogen (20).

Transkripcija se odvija kroz tri faze (rana, intermedijalna i kasna) i zavisna je od ćelijske diferencijacije epitela domaćina (16). Rana faza transkripcije započinje u nediferenciranim keratinocitima bazalnog sloja pločastoslojevitog epitela, počevši od ranog promotora (engl. *Promotor Early*, PE) i završava se na ranom mestu poliadenilacije (engl. *Early polyadenylation site*, pAE) (20). Mesto odvijanja intremedijalne transkripcije su suprabazalne ćelije epitela u kojima se transkripcija odvija od kasnog promotora (engl. *Late Promoter*, PL) pa sve do mesta rane poliadenilacije što rezultira povećanjem nivoa proteina replikacije E1 i E2, neophodnih za amplifikaciju DNK (16). Poslednja, kasna faza transkripcije odvija se od mesta kasnog promotora do mesta kasne adenilacije i rezultira ekspresijom strukturnih proteina kapsida L1 i L2. Ova faza se odvija samo u ćelijama epitela koje odlikuje produkcija virusa (16). Pojava mutacija i rekombinacija u genomu virusa su retki događaji što ga čini izuzetno stabilnim, a njegov genom statičnim (13,20).

1.2 Klasifikacija HPV

Porodicu *Papilomaviridae* čine raznoliki, drevni DNK virusi koji imaju sposobnost da inficiraju raznovrsne domaćine kao što su sisari, ptice, gmizavci i ribe (6). Do sada je otkriveno više od 650 različitih genotipova papilomavirusa, od kojih je 440 koevolucijom opstalo u humanoj populaciji (21).

Humani papilomavirusi i poliomavirusi su prvobitnom klasifikacijom bili svrstani u jednu familiju *Papovaviridae* zbog zajedničkih morfoloških osobina i sličnosti u organizaciji genoma (10,13,22). Međutim, sekvenciranjem njihovih nukleotidnih nizova došlo se do saznanja koja se odnose na razlike u veličini, organizaciji i homologiji sekvence genoma, kao i načinu replikacije (23). Ono što je zajedničko za genome ovih virusa je homologni segment koji se odnosi na E1 gen papilomavirusa i T antigen poliomavirusa, što ukazuje na zajedničko poreklo proteina rane faze (24). Ustanovljene razlike su izdvojile

papilomaviruse u posebnu familiju *Papillomaviridae* što je prihvaćeno od strane Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) (25).

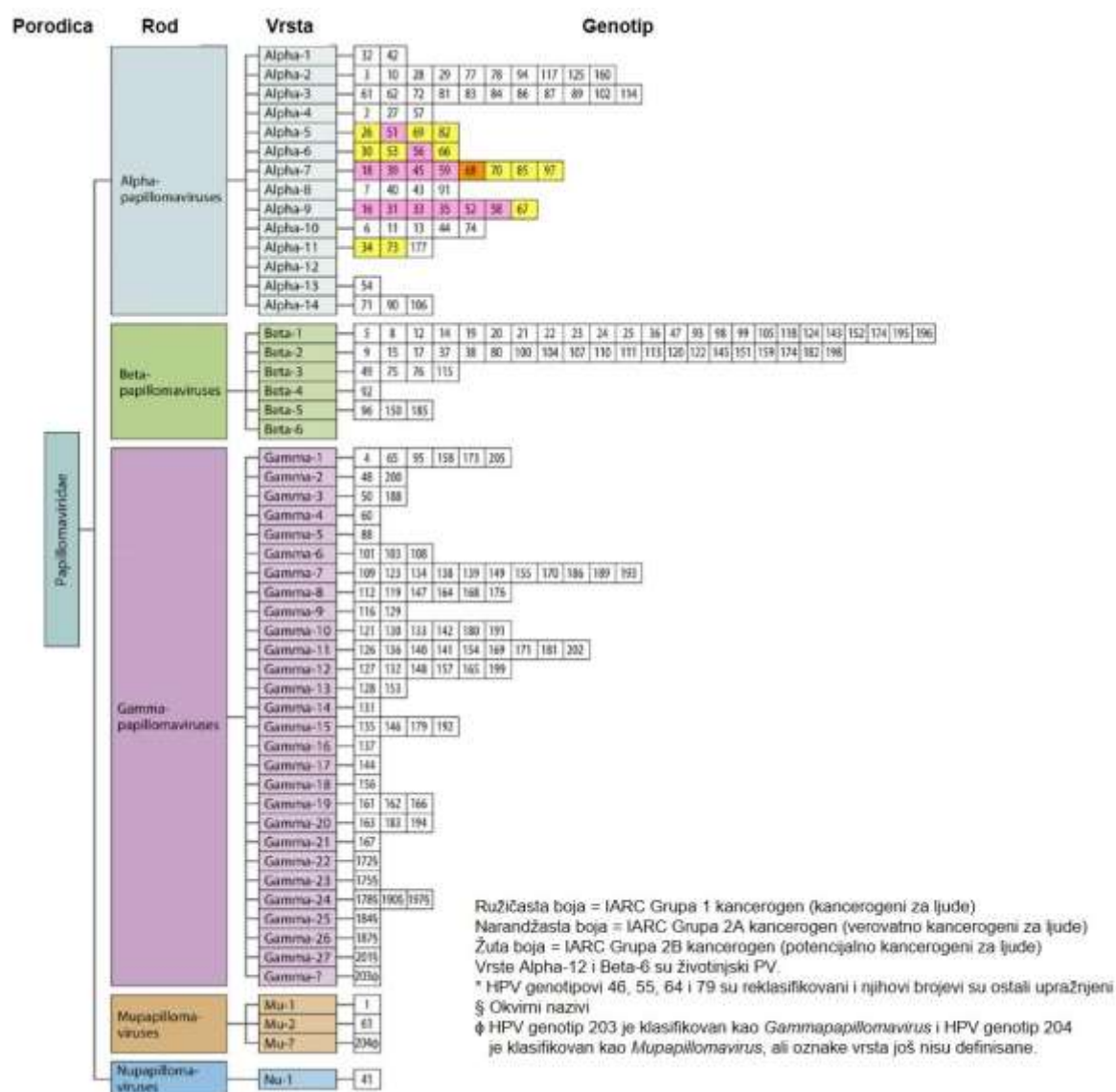
Iako su zahtevi za priznavanje zvaničnog sistema klasifikacije PV postojali od 1980. godine, nemogućnost pronalaska adekvatnih sistema ćelijske kulture za umnožavanje ovih virusa je predstavljala glavnu prepreku u njihovom proučavanju i taksonomskom poređenju (13). Prva klasifikacija koja je bila opšte prihvaćena, formirana je 2004. godine, od strane De Villiersovog tima, za 118 genotipova PV i zasnivala se na podudarnosti sekvence genoma (25,26). Kasnije, na osnovu homologije sekvence L1 ORF gena, koji je u okviru familije najviše konzerviran (13,26,27), izvršena je klasifikacija i filogenetska analiza koja ukazuje da identičnost divergentnih sekvenci L1 gena različitih subfamilija može da iznosi do 45% (13,25).

Sadašnja klasifikacija i nomenklatura papilomavirusa, prihvaćena od strane ICTV (Slika 1.2), na osnovu preporuka Grupe za proučavanje papilomavirusa, podrazumeva njihovu podelu na: rodove, vrste, (geno)tipove, podtipove i varijante (13,25,28). Filogenetska analiza PV zasnovana na poređenju nukleotidnih nizova četiri kodirajuća regiona virusnog genoma (E1, E2, L1 i L2) determiniše dve subfamilije: *Firstpapillomavirinae* koju čini preko 50 rodova i više od 130 vrsta i *Secondpapillomavirinae* sa pojedinačnim rodom i vrstom (10). Rod predstavlja najveću kategoriju klasifikacije. Papilomavirusi su klasifikovani u 53 roda, od kojih samo 5 spada u HPV (13). Svaki od njih je obeležen slovima grčkog alfabeta (10), dok su genotipovi označeni numeričkim obeležjem koji se označava na osnovu redosleda njihovog otkrića (13). Različiti rodovi HPV genotipova imaju do 60% identičnosti u nukleotidnoj sekvenci L1 ORF, dok je identičnost sekvence unutar jedne vrste 60% – 70% (13,25).

Tokom poslednje decenije došlo je do ubrzanog povećanja broja identifikovanih genotipova HPV, prvenstveno zbog primene novih tehnologija, poput sekvenciranja nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS), sa tendencijom daljeg rasta njihovog broja (8). Iako se smatra da ima više od 400 HPV genotipova, do sada su kompletne sekvence identifikovane za preko 200 genotipova HPV (10). Svi do sada identifikovani genotipovi HPV imaju u 71% do 89% identičnu nukleotidnu sekvencu (13), dok su podtipovi unutar istog tipa ili intertipske varijante identični 90% – 98% (20,26).

Nižom taksonomskom kategorijom definisane su varijante čija sličnost sekvence iznosi preko 98% (13). Različitost u pojavi varijanti kod najznačajnijih HR HPV genotipova se dovodi u direktnu vezu sa pojavom malignog fenotipa ćelije. U nekoliko studija se navodi da su identifikovane različite intratipske varijante E6 HR HPV 16 koje se dovode u vezu sa postojanošću HPV infekcije. *Mirabello* i saradnici navode da se na osnovu analize sekvence kompletnog genoma 5.570 uzoraka mogu dokazati varijacije E7 HR HPV 16 koje se u velikoj meri razlikuju od svog prototipskog modela i dovode do smanjenog rizika od razvoja onkogeneze. Shodno navedenom, intratipske varijante, iako su filogenetski srodne, mogu biti definisane na osnovu onkogenog potencijala (29).

Odbor za nomenklaturu papilomavirusa (engl. *Papillomavirus nomenclature Committee*) je zauzeo stav da se svaka varijanta HPV može dalje diferencirati na filogenetske linije ukoliko je razlika unutar sekvence L1 ORF gena najmanje 1% (28,30,31). Ovo diferenciranje se vrši na osnovu njihove geografske rasprostranjenosti, virulentnosti, regulatornih osobina transkripcije i imunskog odgovora (32). Najznačajniji za nastanak prekanceroznih i kanceroznih promena, visokorizični genotip HPV 16 se svrstava dalje u 4 filogenetske linije: A, B, C i D. Mnogobrojne studije ukazuju da pripadnici pojedinih varijanti, odnosno, linija pokazuju veći stepen patogenosti, a samim tim i veći rizik od nastanka perzistentne infekcije i malignih lezija. Na osnovu dosadašnjih istraživanja linija D ovog genotipa HPV ima značajno veći onkogeni potencijal u odnosu na pripadnike drugih linija istog genotipa (33,34). Na kraju, najuža kategorija klasifikacije je podlinija (*sublinage*), koja se definiše na osnovu razlika u nukleotidnoj sekvenci genoma od 0,5% – 1% (28,30,31).



Slika 1.2. Šematski prikaz klasifikacije HPV (modifikovano prema Wang i sar. (35), dostupno putem dozvole: CC BY 4.0).

Humani papiloma virusi su grupisani u pet rodova: *Alphapapillomavirus* (α -HPV), *Betapapillomavirus* (β -HPV), *Gammapapillomavirus* (γ -HPV), *Nupapillomavirus* (ν -HPV) i *Mupapillomavirus* (μ -HPV) (13,25,36). Vrste pripadajućeg roda se obeležavaju arapskim brojevima (npr. *Alphapapillomavirus*-9) (28).

Pripadnici različitih rodova HPV su evoluirali u cilju prilagođavanja različitim ekološkim nišama u okviru svog domaćina (37) zbog čega se smatraju jednim od najuspešnijih virusa koji inficiraju kičmenjake (7). Smatra se da su razlike nastale u tkivnom tropizmu posledica razlika u genskoj ekspresiji, odnosno, njenog uticaja na regulatorne procese epitela različitih lokaliteta (38). Na osnovu ovih činjenica, HPV rodovi se mogu

svrstati u tri grupe: one koji uzrokuju prvenstveno kožne lezije, potom one kod kojih kao posledica njihovog dejstva nastaje promena na sluzokoži i promene povezane sa veruciformnom epidermoplazijom (lat. *Epidermodysplasia Verruciformis*, EV) (20).

Virusi unutar rodova *Beta*, *Gamma*, *Mu* i *Nu* inficiraju prvenstveno kožni epitel. Pripadnici roda *Alpha* mogu inficirati epitel sluzokože i kože i zbog svoje povezanosti sa karcinomima imaju najveći medicinski značaj. Dalje, mukozni genotipovi HPV se prema onkogenom potencijalu, svrstavaju u niskorizične (engl. *Low Risk*, LR) i visokorizične (engl. *High-Risk*, HR) genotipove HPV (37).

Najznačajniji predstavnici roda *Alphapapillomavirus* su najčešći uzročnici karcinoma grlića materice i smatraju se odgovornim za nastanak 5% svih karcinoma (39,40). Na osnovu svojih epidemioloških i bioloških osobina, Međunarodna agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) je proglasila 12 HR HPV humanim karcinogenima. Rod *Alphapapillomavirus* obuhvata 14 vrsta ($\alpha 1-14$) i 65 identifikovanih genotipova (8). Tu spadaju humani papilomavirusa tipa 16 i 18 koji pripadaju vrstama 9 i 7 (30). Procenjeno je da je povezanost pomenutog HR HPV 16 sa karcinomom cerviksa deset puta jača od ostalih pripadnika istog roda, kao što su HR HPV 31 i 33 (41). Ostali visokorizični genotipovi HPV koji se dovode u vezu sa nastankom karcinoma grlića materice su deo vrsta 5, 6, 7, 9 i 11 (13). Pripadnici vrste 10 ovog roda, genotipovi HPV 6 i 11, se dovode u vezu sa nastankom genitalnih bradavica, dok se HPV genotip 7 povezuje sa nastankom kožnih promena (42).

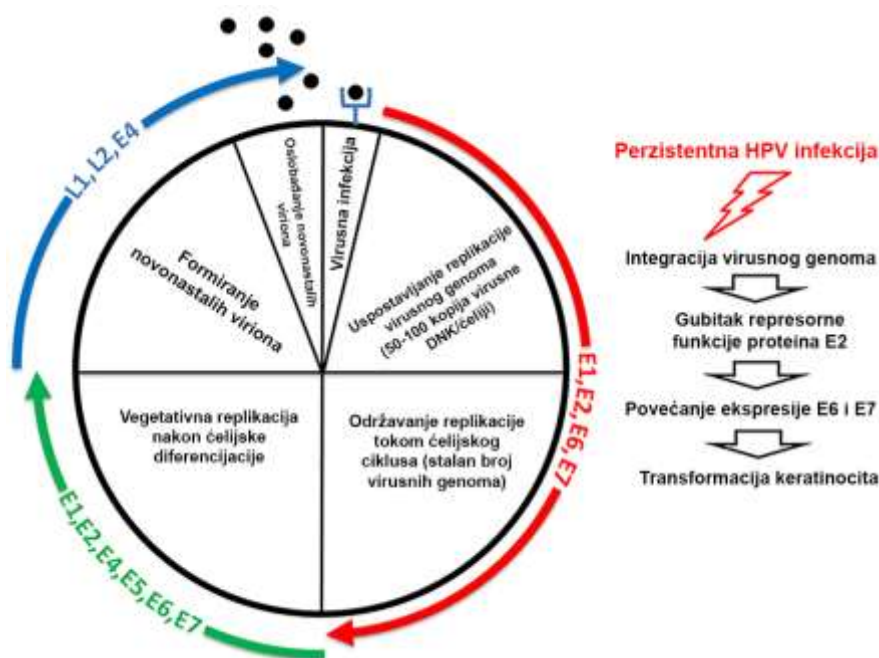
Rod *Betapapillomavirus* obuhvata 5 vrsta ($\beta 1-5$), u okviru kojih se nalazi više od 54 genotipa (43). Prvenstveno su izazivači lezija lokalizovanih u blizini noktiju i folikula dlaka, apokrinog i ekrinog znojnog aparata (44). Genotipovi HPV 5 i 8 koji pripadaju vrsti 1 ovog roda se najčešće identifikuju u obolelih od EV i asimptomatskih nosilaca kod kojih ne dolazi do manifestacije kožnih lezija (1,42). Značajna činjenica kojom se objašnjava uloga pripadnika ovog roda u patogenezi oboljenja je da se njihov virusni genom ne nalazi integrisan u genomu domaćina i ne raspolaže se dokazima ekspresije glavnih onkogenih HPV, što znači da je njihova uloga ograničena na inicijaciju, ali ne utiče na održavanje onkogenog procesa (45).

Rod *Gammapapillomavirus* čini većina do sada poznatih HPV, 98 različitih genotipova unutar 27 različitih vrsta (Y1–27) koji uzrokuju kožne promene, uglavnom papilome ili bradavice (43). Najznačajniji predstavnik roda *Mupapillomavirus*, u okviru kog su identifikovana 3 tipa je HPV genotip 1 koji je uzročnik palmarnih bradavica. Genotip 41 je jedini predstavnik roda *Nupapillomavirusa* i uzročnik je benignih kožnih lezija (20).

1.3 Životni ciklus HPV

Velika raznolikost PV i mogućnost inficiranja različitih vrsta, uključujući i ljudsku je posledica njihove evolutivne adaptacije različitim ekološkim nišama. Uopšteno, izazivajući hronične, perzistentne infekcije ovi virusi su razvili mnogobrojne mehanizme opstanka sa produkcijom viriona uz minimalan rizik od imunske posredovane eliminacije (7). Životni ciklus epiteliotropnih HPV uslovljen je diferencijacijom stratifikovanog epitela kože i sluzokože domaćina (12,38). Većina genotipova HPV uglavnom pokazuje tropizam za određenu vrstu tkiva, iako određeni genotipovi mogu da inficiraju i perzistiraju u različitim histološkim strukturama, koži i sluzokoži (46).

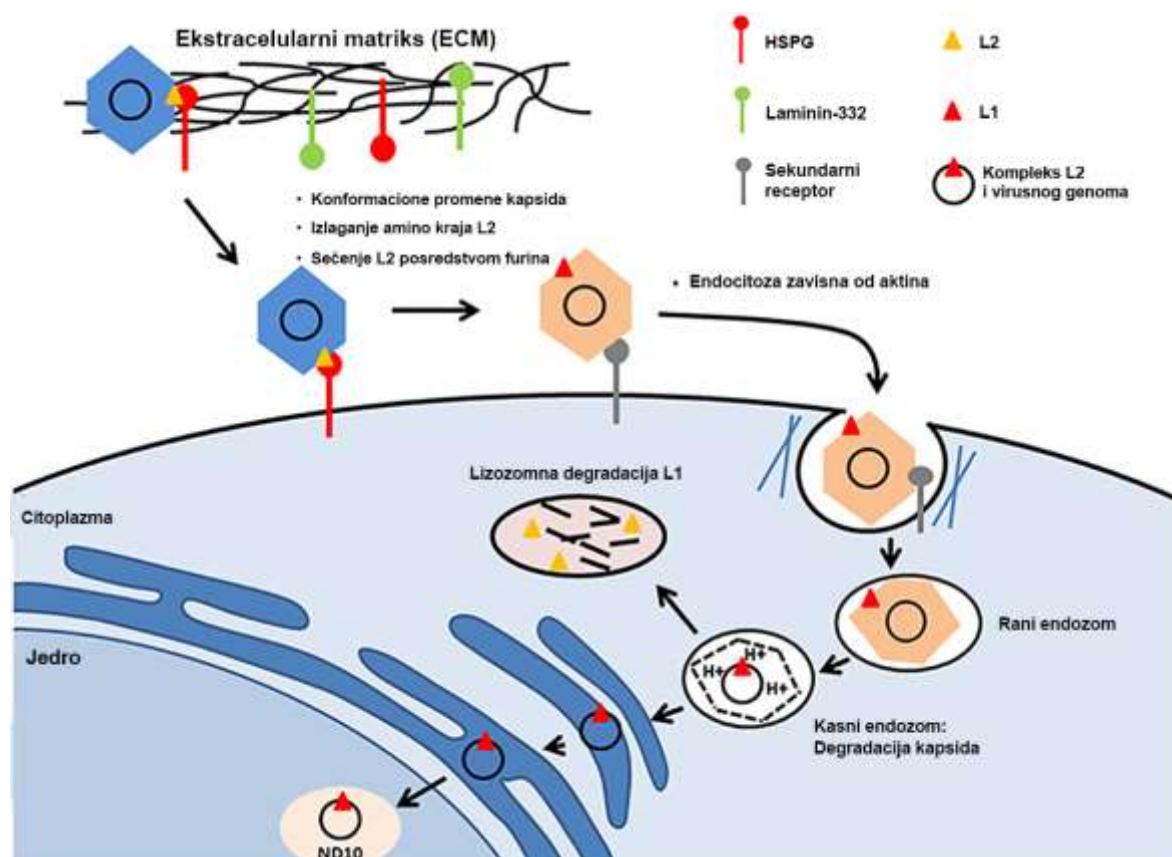
Različiti događaji tokom životnog ciklusa virusa se pokreću u različitim fazama migracije ćelija stratifikovanog epitela (Slika 1.3).



Slika 1.3. Životni ciklus HPV (modifikovano prema *Gheit* (8), dostupno putem dozvole: CC BY 4.0).

Da bi infekcija HPV bila započeta, neophodno je da dođe do infekcije mitotski aktivnih ćelija bazalnog sloja epitela (38). Mikrotraume, najčešće nastale tokom seksualne aktivnosti su najzastupljeniji put ulaska virusa. Takođe, HPV infekcija genotipovima *Alpha* roda može nastati i autoinokulacijom, kao i vertikalnim putem sa inficirane majke na plod uzrokujući kliničke i subkliničke forme bolesti (47).

Ulazak HPV u ćelije se ostvaruje vezivanjem za receptore koji se nalaze na površini ćelija (Slika 1.4). Za sada, primarni receptor koji je neophodan za internalizaciju još uvek nije sa sigurnošću utvrđen (14). Smatra se da $\alpha 4\beta 6$ integrin učestvuje u adsorpciji virusa. Isto tako, postoje dokazi da se ovaj virus putem proteina L1 vezuje za heparin sulfatproteoglikane (engl. *Heparan Sulphate Proteoglycans*, HSPGs) na bazalnoj membrani ili tranzijentni receptor laminin-332 ekstracelularnog matriksa (engl. *Extracellular Matrix*, ECM). Ceganje L2 posredovano furinom se smatra neophodnim za nastanak infekcije, ali ne postoji sigurna potvrda njegove uloge u ranoj fazi vezivanja za ćeliju. Potom dolazi do niza konformacionih promena kapsida i gubitka afiniteta za primarni receptor što omogućava ulazak virusa putem nedefinisanog sekundarnog receptora keratinocita (38,48,49). Virusne partikule HPV dospevaju u bazalne keratinocite procesom endocitoze tokom koje dolazi do insercije membrane posredovane L2 proteinom i formiranja membranske vezikule, koja potom putem citoplazmatskih faktora transporta, duž mikrotubula, dospeva do mreže Goldžijevog aparata (50,51). Ovaj process internalizacije virusa ostvaruje se tokom 2 do 4 sata nakon njegovog vezivanja za površinu ćelije (9,40).



Slika 1.4. Ulazak HPV u ćeliju (modifikovano prema *Gheit* (8), dostupno putem dozvole: CC BY 4.0).

Nakon inokulacije uspostavlja se stabilna infekcija u kojoj se replikacija genoma virusa odvija sinhrono sa replikacijom humanog genoma (52,53). Uobičajeno, nakon internalizacije virusnog agensa u citoplazmu ćelije domaćina dolazi do prepoznavanja strane DNK i njene destrukcije putem snažnog antivirskog odgovora (54). Međutim, razvoj koevolucionih mehanizama HPV je doveo do uspešnog izbegavanja ove senzorne intracelularne detekcije sa mogućnošću njihovog opstanka (51). Ulazak virusa u jedro se ostvaruje dezintegracijom jedarnog omotača tokom mitoze, dok središnji deo L2 kapsidnog proteina virusa olakšava vezivanje za hromozom (11,55).

Procenjeno je da je za početak transkripcije virusnog genoma potrebno 1 do 3 dana od momenta vezivanja za površinu ćelije, a ukoliko su inficirane ćelije bliže mitozu i kraće. (40). Nakon završetka mitoze, genom virusa dospeva u subnuklearne strukture, odnosno, promijelocitna leukemična tela (engl. *Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies*, PML-NBs) za koja se pretpostavlja da su mesto na kome započinje transkripcija i replikacija virusne DNK (9,12,56).

Proces replikacije virusne DNK se odvija kroz tri faze: početna amplifikaciona faza, faza održavanja i vegetativna faza amplifikacije (9,11,52,57). Tokom početne, amplifikacione faze dolazi do ponavljanja nekoliko replikativnih ciklusa DNK čime se obezbeđuje nastanak malog broja ekstrahromozomske DNK u formi epizoma ili plazmida koja perzistira u bazalnim ćelijama epitela čineći infektivni rezervoar perzistentne HPV infekcije godinama ili čak decenijama (11,12,16,40). Faza održavanja virusne replikacije se odvija u proliferativnim ćelijama epitela istovremeno sa replikacijom ćelija domaćina. Naime, istovremena replikacija ekstrahromozomskog genoma virusa vezanog za hromatin ćelije domaćina obezbeđuje njegovo razdvajanje na ćerke ćelije tokom mitoze. Jedna od novonastalih ćelija postaje nova bazalna ćelija, dok druga migrira u više slojeve epitela gde nastavlja dalju diferencijaciju (16,19,36). Ovo održavanje broja kopija virusnog genoma na konstantnom nivou, od 50 do 100, je obezbeđeno replikativnim mehanizmima ćelije domaćina jer se replikacija odvija jednom tokom ćelijske deobe, a regulacija replikacije i opstanak epizomalne forme virusne DNK su pod kontrolom proteinskog produkta E1 i E2 gena (58). U ovoj fazi amplifikacije ekspresija ranih gena se održava na niskom nivou i uglavnom se proizvode proteini E1, E2, E6 i E7 (1). Ovaj mali broj kopija virusnog genoma se konstantno održava sve do faze diferencijacije ćelija u kojoj dolazi do njihovog pomeranja u više slojeve epitela, odnosno, visokog nivoa amplifikacije i ekspresije ranih i kasnih gena (14,59).

U diferenciranim ćelijama odvija se transformacija epizoma u vegetativnu DNK, odnosno, HPV aktiviraju replikativne mehanizme ćelije domaćina što omogućava sintezu vegetativne virusne DNK (40). U ovoj fazi dolazi do aktivacije promotora gena E7 i produkcije visokih nivoa proteina E1 i E2 (16). Protein E2 ostvaruje vezu sa LCR što rezultira usmeravanjem E1 proteina na početno mesto replikacije. Ekspimiranje gena E6 i E7 omogućava inficiranoj ćeliji ponovni ulazak u S fazu sa sledstvenim povećanjem broja virusnih partikula (1). Dalja replikacija se nastavlja nezavisno od ćelijske deobe domaćina, a broj novonastalih kopija virusnih čestica se kreće do hiljadu po ćeliji (9,36,60). U površnim slojevima epitela dolazi do ekspimiranja gena E4 i pojačane sinteze kasnih proteina L1 i L2 (36). Potom, dolazi do povezivanja glavnog kapsidnog proteina L1 u pentamere, koji sa manjim i varijabilnim brojem L2 molekula obrazuje ikozaedarni kapsid (61). Nastali kapsidni proteini obuhvataju virusni genom formirajući novonastale virione. Vezivanje

proteina E4 virusa za keratinske filamente ćelije domaćina narušava njenu strukturu i dovodi do deskvamacije ćelija bez njihove lize i oslobađanja novostvorenih viriona (1,14).

1.4 Onkogeni potencijal visokorizičnih HPV genotipova

Evolutivni razvoj HR HPV, kao što je navedeno, doveo je do razvoja različitih mehanizama koji su omogućili uspešnu replikaciju virusnog genoma, prilagođavanje i opstanak u različitim ekološkim nišama uz uspešno izbegavanje efektorskih mehanizama imunskog odgovora domaćina (7,52,62). Proteinski produkti virusnih onkogeno E5, E6 i E7 HR HPV dovode do neregulisane ćelijske proliferacije i diferencijacije, zbog čega se smatraju glavnim akterima virusom indukovane onkogeneze cervikalnog karcinoma (9).

1.4.1 Onkogeni potencijal proteina E5 HR HPV

E5 je mali transmembranski protein primarno lokalizovan u endoplazmatskom retikulumu (9,63). Pokazano je da samostalna ekspimiranost gena E5 HR HPV iskazuje slab onkogeni potencijal. Ipak, njegovo prisustvo u ćeliji povećava transformišuću aktivnost virusnih onkoproteina E6 i E7 HR HPV kroz nekoliko različitih mehanizama (9).

Transmembranska lokalizacija, hidrofobni karakter i mogućnost stvaranja dimera omogućavaju onkoproteinu E5 učestće u procesu fuzije, odnosno spajanju ćelija (9,64). *Hu* i saradnici (64) su pokazali da je upravo onkoprotein E5 HPV genotipa 16 neophodan i dovoljan za pokretanje fuzije, što vodi stvaranju tetraploidne ćelije i hromozomske nestabilnosti. Ovi procesi omogućavaju integraciju HR HPV genoma i dalje ubrzavaju ekspimiranje onkogeno E6 i E7 (65). Iz tog razloga ćelijska fuzija indukovana onkoproteinom E5 predstavlja ključni događaj u ranoj fazi onkogeneze cervikalnog karcinoma (66).

Kao dodatni mehanizam navodi se sposobnost onkoproteina E5 da povećava broj receptora za epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) na površini keratinocita (67), kao i da pojačava njihovu aktivnost u slučajevima odsustva prirodnog liganda intereagujući sa ATP fosfohidrolazama lokalizovanim u vakuolama. Na ovaj način dolazi do promene pH vrednosti endozoma, odnosno do njegovog oštećenja acidifikacijom. Ovi procesi rezultuju povećanom „recikliranju“ EGFR, odnosno dovode do konstitutivne signalizacije u ćeliji (68). Ostale aktivnosti koje se pripisuju onkoproteinu E5

HR HPV uključuju smanjenje površinskih nivoa glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I (engl. *Major Histocompatibility Complex class I*, MHC I) i ciklooksigenaze (engl. *Cyclooxygenase*, COX), modifikovanjem aktivnosti mitogenima-aktiviranih proteinskih kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs), odnosno MAPK signalnog puta. Takođe, zapažena je uloga onkoproteina E5 HR HPV u promeni nivoa kaveolina 1. Ovi događaji su bitni faktori u održavanju perzistencije HPV infekcije (9,68).

Iako je zapažena značajna uloga proteina E5 u onkogenezi, dokazano je da njegovo eksprimiranje nije uvek prisutno nakon integracije virusne DNK, što ukazuje da nema ulogu u održavanju fenotipa prethodno transformisane ćelije cervikalnog karcinoma (14).

1.4.2 Onkogeni potencijal proteina E6 HR HPV

Onkoprotein E6 HR HPV je mali protein koji se karboksilnim krajem vezuje za PDZ domene (akromin nastao od naziva proteina za koje se prvo otkrilo da u svojoj strukturi imaju ovakav domen; engl. *Postsynaptic Density protein*, PSD95; engl. *Drosophila disc large tumor suppressor*, DlgA i engl. *zonula occludens-1 protein*, zo-1) više od 14 različitih proteina (9). Ovaj deo proteina E6 označen je kao PDZ vezujući motiv (engl. *PDZ Binding Motif*, PBM) (69). Upravo ove mnogobrojne interakcije mu omogućavaju ostvarivanja onkogenog potencijala (63). Najvažnija razlika između proteina E6 visokorizičnih genotipova HPV u odnosu na E6 niskorizičnih genotipova HPV je prisusvo ovog domena (69).

Najznačajnija funkcija onkoproteina E6 je u smanjenju delovanja tumor-supresorskog proteina p53, putem različitih mehanizama, što finalno rezultuje proliferacijom ćelija (Slika 1.5). Jedan od pomenutih mehanizama je degradacija proteina p53 u proteazomima koja zavisi upravo od aktivnosti onkoproteina E6 HR HPV. Ovaj proces se karakteriše vezivanjem E6 HPV za E3 ubikvitin ligazu (engl. *E6-Associated Protein*, E6AP), odnosno stvaranjem trimernog kompleksa E6-E6AP-p53, što dalje vodi povećanju ubikvitinacije tumor-supresora p53, odnosno njegovom obeležavanju za proteazomalnu degradaciju (70). Oba onkoproteina, E6 HR HPV i E6 LR HPV se vezuju sa p53, ali je interakcija jača kod visokorizičnih genotipova (71). Drugi mehanizam obuhvata delovanje onkoproteina E6 HR HPV na proces transkripcije i ogleda se u njegovom vezivanju za kompleks histon acetiltransferazu p300 i proteina koji se vezuje za vezujući protein elementa

odgovora na cAMP (engl. *cAMP-Response Element-Binding Protein*, *CREB-Binding Protein*, CBP), kao i za transkripcioni koaktivator proteina p53, ali i komponentu histon-acetiltransferaznog kompleksa (engl. *Human Alteration/Deficiency in Activation 3*, hADA3), što sve rezultira sprečavanjem acetilacije proteina p53, odnosno inhibicijom njegove aktivatorske uloge. Na ovaj način dolazi do inhibicije eksprimiranja gena čija transkripcija je pod kontrolom tumor-supresora p53 (68,72). Onkoprotein E6 HR HPV inhibiše proces programirane ćelijske smrti, apoptoze, koja bi trebala da nastane kao odgovor na prisustvo odgovarajućih citokina. Inhibicija apoptoze posredovana onkoproteinom E6 HR HPV ostvaruje se putem različitih mehanizama (Slika 1.5). Prvenstveno, interakcijom E6 HR HPV sa receptorom faktora nekroze tumora α (engl. *Tumour Necrosis Factor (TNF)- α Receptor*, TNFR1), kaspazom 8 i adaptornim proteinom FAS-vezanog proteina sa domenom smrti (engl. *FAS-associated protein with Death Domain*, FADD). Drugi mehanizam inhibicije apoptoze obuhvata uticaj onkoproteina E6 HR HPV na proces degradacije proapoptotičkih proteina BAX (engl. *Bcl-2-Associated X protein*) i BAK (engl. *Bcl Antagonist/Killer*) (68).

U sklopu svoje uloge u onkogenezi protein E6 HR HPV učestvuje i u promociji imortalizacije, odnosno dovođenja ćelije u stanje besmrtnosti inhibicijom procesa skraćivanja telomera, odnosno utišavanjem ćelijskog odgovora na perzistentnu proliferaciju (Slika 1.5). Ovo je omogućeno interakcijom PBM E6 HR HPV sa transkripcionim faktorima: specifičnim transkripcionim faktorom (engl. *Specific Protein 1*, SP1), onkoproteinom MYC, nuklearnim faktorom transkripcije (engl. *Nuclear Factor X box-binding protein-123*, NFX123) i E6AP, čime se povećava ekspresija reverzne transkriptaze telomeraze (engl. *human Telomerase Reverse Transcriptase*, hTERT) i telomeraza, što dalje vodi ka sprečavanju skraćivanju telomera (68).

Onkoprotein E6 HR HPV vezujući se za PDZ domene određenih proteina može da dovede do njihove degradacije, što uzrokuje gubitak ćelijske polarnosti, odnosno indukuje hiperplaziju. Primer ovakvog delovanja je vezivanje za fokalnu adhezionu kinazu (engl. *Focal Adhesion Kinase*, FAK) i time delovanje na protein paksilin, čime se omogućava ćelijski rast bez njenog vezivanja za ECM. Ovakav proces je neophodan za malignu transformaciju ćelije (68).

1.4.3 Onkogeni potencijal proteina E7 HR HPV

Onkoprotein označen kao E7 je dominantno lokalizovan u jedru. U njegovoj strukturi mogu se uočiti tri konzervirana regiona (engl. *Conserved Region*, CR), označena kao CR1–CR3 (73). Na karboksilnom kraju CR3 regiona nalazi se specifičan Cys-X-X-Cys domen za vezivanje cinka, tzv. „cinkani prsti“, pomoću kojeg onkoprotein E7 stupa u interakciju sa brojnim ćelijskim proteinima (63). Onkoprotein E7 je fosforilisan kazein kinazom II (engl. *Casein Kinase II*, CK II) na amino kraju i neidentifikovanom protein kinazom na karboksilnom kraju. Njegov poluživot je kratak i brzo se razgrađuje proteazomalnim putem (74). Svoju ulogu u onkogenezi ćelija cervikalnog epitela ostvaruje kroz nekoliko zasebnih mehanizama (Slika 1.5).

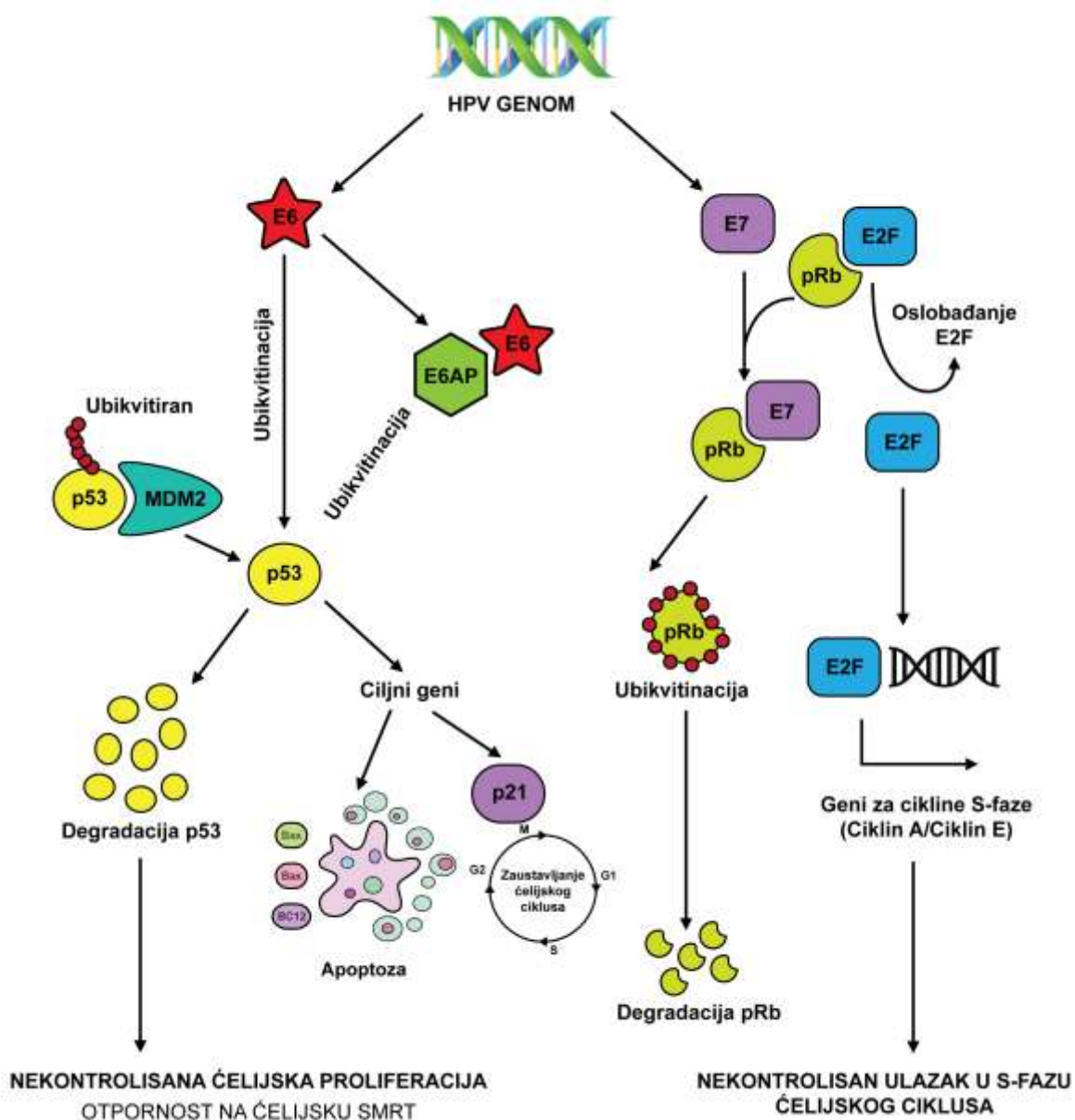
Osnovni proces na koji utiče onkoprotein HR HPV E7 je kontrola ćelijskog ciklusa, gde su mu ciljni molekuli proteinska porodica retinoblastoma (Rb). HR HPV E7 stupa u interakciju sa članovima porodice Rb preko očuvanog LXCXE motiva, koji je prisutan u njegovom amino kraju (75). Predstavnici proteinske familije Rb kontrolišu aktivnost E2F familije transkripcionih faktora (engl. *Transcription Factor*, TF), koji su ključni u kontroli tranzicije G1/S posredovanjem transkripcione aktivacije mnogih gena potrebnih za progresiju ćelijskog ciklusa i replikaciju DNK (76). U netransformisanim ćelijama, tumor supresorni protein Rb u svom hipofosforilisanom obliku kreira kompleks sa E2F i tako deluje represorski u ranoj G1 fazi ćelijskog ciklusa. Nakon fosforilacije Rb od strane kinaze zavisne od ciklina (engl. *Cyclin Dependant Kinase*, CDK) dolazi do prekida interakcije između transkripcionih faktora, pri čemu E2F deluje kao transkripcioni aktivator ekspimiranja gena za cikline A i E, odnosno promoviše S fazu ćelijskog ciklusa. Kontrola ćelijskog ciklusa u tački prelaska G1 u S fazu se gubi u ćelijama koje prekomerno ekspimiraju onkoprotein E7 HR HPV, što dovodi do nekontrolisane proliferacije ćelija. Pokazano je da E7 HR HPV inrerakcijom sa proteinima Rb narušava komplekse Rb-E2F (68). Takođe, pokazano je da je razgradnja Rb u proteazomima posredovana E7 HR HPV. Efikasno ukidanje supresorne funkcije Rb od strane onkoproteina E7 HR HPV dovodi i do povećanja ćelijskog nivoa p53. Upravo degradiranje ovog proteina od strane onkoproteina E6 HR HPV, putem ranije opisanog mehanizma, je evolutivni odgovor virusa na ostvarene mehanizme. Dodatni mehanizam uticaja E7 HR HPV na ćelijski ciklus uključuje ekspimiranje gena S faze direktnom interakcijom sa E2F faktorima i sa histon deacetilazom

(engl. *Histone deacetylase*, HDAC). Interakcijom sa CDK onkoprotein E7 inhibira i inhibitore ove kinaze: p21 (CDKN1A) i p27 (CDKN1B), koji su odgovorni za ulazak ćelije iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, odnosno započinjanje ćelijske deobe. Intereagujući sa inhibitorima CDK (engl. *CDK Inhibitors*, CDI), CDK 4 i CDK 6 i supresore rasta p15 Ink, E7 HR HPV utiče na smanjenje inhibicije transformišućeg faktora rasta $\beta 1$ (engl. *Transforming Growth Factor- $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$) (9,68).

Slično onkoproteinu E6, E7 HR HPV deluje na aktivnost paksilina, fibulina i p600, što rezultira promenama u diferencijaciji ćelija, odnosno, programiranoj ćelijskoj smrti zavisnoj od ćelijskog usidrenja u ECM. Ovaj proces se označava kao anoikis. Pokazan je inhibitorski uticaj onkoproteina E7 na proces programirane ćelijske smrti. Naime, tokom infekcije HPV onkoprotein E7 ostvaruje vezu sa različitim citokinima, inhibira stvaranje interferona (engl. *interferon*, IFN) i vezujući se za receptor TNFR1 sprečava ćelijsku komunikaciju. Ovi procesi normalno vode ka apoptozi (9).

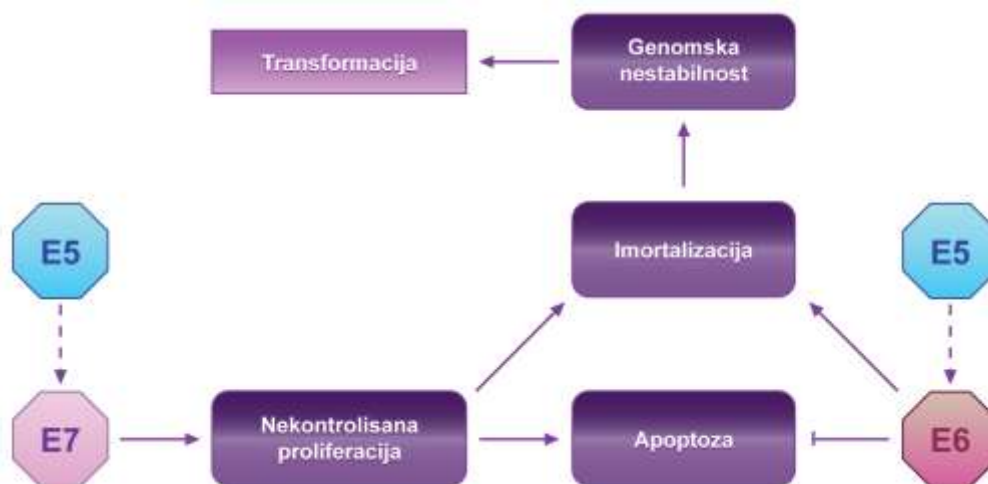
Transformišuća uloga onkoproteina E7 ogleda se i u njegovom uticaju na stvaranje genske nestabilnosti, gde je dokazano da utiče na poremećaj regulacije centriola, odnosno dovodi do aneuploidije (77).

Integracija genoma HPV se često odigrava u Myc lokusu što čini da se promena u eksprimiranju onkoproteina c-myc može smatrati indikatorom cervikalnog karcinoma. Međusobna uloga onkoproteina E6, E7 i c-myc direktno dovodi do ćelijske imortalizacije putem ekspresije hTERT, a indirektno preko različitih proteina, do stvaranja i održavanja signalnih puteva koji vode u nekontrolisanu proliferaciju ćelije (63).



Slika 1.5. Mehanizmi delovanja onkoproteina E6 i E7 HR HPV (modifikovano prema Pal i Kundu (63), dostupno putem dozvole CC BB 4.0).

Danas se sa sigurnošću zna da su onkoproteini E6 i E7 glavni pokretači onkogeneze delujući na šest ključnih tačaka ovog procesa, kao što su pokretanje i održavanje signalnih puteva koji dovode do transformacije, proliferacije, telomerazne aktivnosti, angiogeneze, izbegavanja apoptoze i imunskog odgovora sa potencijalnom invazijom i diseminacijom u okolna tkiva (Slika 1.6) (63).



Slika 1.6. Molekularni mehanizmi sinergističkog delovanja onkoproteina HPV u kancerogenezi cervikalnog epitela.

1.5 HPV posredovana onkogeneza cervikalnog epitela

Infektivna priroda karcinoma grlića materica bila je predmet brojnih istraživanja vekovima unazad. Napredak u razvoju molekularno-bioloških metoda, omogućio je 1965. godine prikaz genetičkog materijala, odnosno DNK papiloma virusa izolovanih iz kožnih lezija (78). Visokorizični HPV 16 je prvi genotip koji je izolovan iz displastičnih lezija cerviksa, primenom tehnike *Southern blot* hibridizacije i identifikovan je u preko 60% biopata karcinoma cerviksa (79). Nedugo zatim, još jedan genotip HPV je dokazan u istom tipu genitalnih promena i nazvan je HPV 18 (80). U narednom periodu su usledila brojna istraživanja koja su dovela do značajnih otkrića, presudnih za razumevanje onkogeneze posredovane ovim virusom. Tako je 1985. godine potvrđena ekspresija onkogeni E6 i E7 sa posledičnom delecijom DNK prilikom integracije virusnog genoma u genom domaćina (81). Eksperimentalni dokazi onkogenog potencijala ovih gena prvobitno su potvrđeni kod glodara (82), a potom i humanih keratinocita (83,84). Virusolog Harald zur Hausen je ukazao na značaj HPV kao etiološkog faktora u nastanku karcinoma cerviksa i za to otkriće je 2008. godine dobio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju (47,85). Nakon prve epidemiološke studije objavljene 1987. godine, nizom narednih kako epidemioloških tako i molekularno-bioloških istraživanja, koji su se bavili povezanošću HPV i karcinoma cerviksa, potvrđeno je da je infekcija uzrokovana određenim genotipovima HPV neophodan faktor u patogenezi ovog tipa karcinoma (20).

Procenjeno je da se približno svaki četvrti malignitet može dovesti u vezu sa infektivnim uzročnikom, odnosno, njegovim učešćem u različitim fazama razvoja karcinoma (17,86,87) Najmanje četvrtina ovog učešća se odnosi na HPV (8,12,88–90).

Danas se raspolaze značajnim dokazima koji potvrđuju povezanost HR HPV kao direktnog kancerogena ili promotera u nastanku malignih oboljenja različitih lokaliteta (91,92). Na prvom mestu su neoplazije genitalnog trakta, gde je dokazan u skoro svim cervikalnim karcinomima, zatim u polovini vulvarnih i oko 70% vaginalnih maligniteta (93,94). Procenjuje se da je uzročnik 20% – 60% orofaringealnih karcinoma (12), zatim u oko 50% penilnog, oko 90% analnog karcinoma (95), 30% skvamoznog karcinoma kože, kao i da ima mogućnost učešća u onkogenezi karcinoma bronha i bešike. Kako se navodi u pojedinim epidemiološkim studijama, prisustvo HPV je dokazano i u karcinomu dojke (94). Humana kancerogeneza se definiše pre svega genomskom nestabilnošću, a prisustvo obeležja genomske nestabilnosti i somatskih mutacija je potvrđeno u visokostepenim cervikalnim lezijama uzrokovanim HR HPV (14,96).

Čvrste dokaze za HPV uzročnu etiologiju karcinoma različitih lokalizacija navela je IARC koja je klasifikovala HPV prema potencijalu da izazovu malignu alteraciju ćelija, na sledeći način (63):

- Grupa 1 (kancerogeni za ljude) obuhvata HPV genotipove: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, i 59
- Grupa 2A (verovatno kancerogeni) obuhvata HPV genotip 68
- Grupa 2B (potencijalno kancerogeni) obuhvata HPV genotipove: 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69, 85 i 97
- Grupa 3 (niskorizični), gde spadaju HPV genotipovi 6 i 11

U odnosu na navedeni onkogeni potencijal, infekcija pojedinim HR HPV genotipom nosi određen rizik za razvoj ćelijske transformacije i maligniteta (97). Naime, jedna od najvažnijih odrednica stepena patogenosti različitih genotipova HPV, kao što je prethodno navedeno, jesu funkcionalne razlike između njihovih onkogenih E6 HR HPV i E7 HR HPV (98).

Perzistentna HPV infekcija je najvažniji faktor rizika i neizostavan uslov za nastanak cervikalnog karcinoma, što je potvrđeno prisustvom HR HPV u 99,7% uzoraka karcinoma grlića materice (12,99–102). Preciznije, dokazano je da su HR HPV 16 i 18 najvirulentniji i

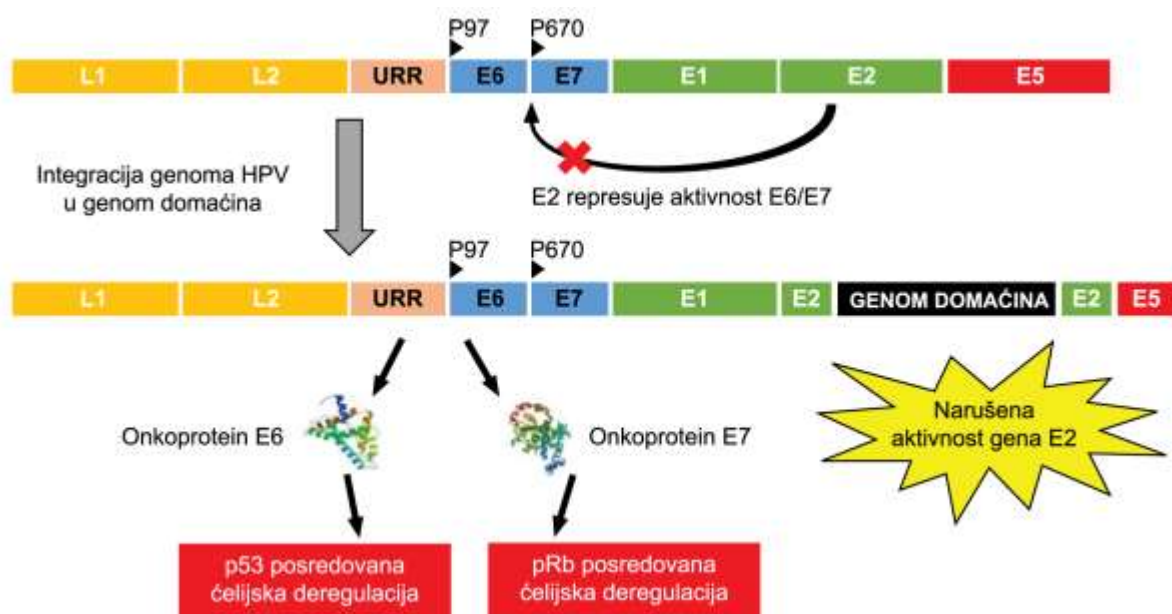
da uzrokuju 70% slučajeva raka grlića materice (41,93,103,104), dok su zajedno sa HR HPV 31, 33, 45, 52 i 58 uzročnici više od 90% svih slučajeva prekursorskih neoplastičnih lezija i karcinoma cerviksa (93).

Infekcija uzrokovana HPV je jedna od najčešćih seksualno prenosivih infekcija i smatra se da preko 80% seksualno aktivnih žena u nekom momentu svog života biva inficirano ovim virusom (12). Period inkubacije uobičajeno traje od 3–4 nedelje do par meseci ili godina zavisno od infektivne doze virusa (90). U najvećem broju slučajeva, u vremenskom periodu od 12 do 24 meseca nakon uspostavljanja infekcije, posredstvom celularnog imuniteta virus se eliminiše ili inaktivise iz organizma (105,106). Vreme eliminacije zavisi od genotipa HPV, infektivne doze virusnog inokuluma, imunokompetentnosti inficirane osobe i mesta infekcije (107). Ova inicijalna infekcija protiče bez razvoja klinički manifestne bolesti (108,109) i vrh njene stope specifične incidencije se registruje u ranim dvadesetim godinama života (102). Međutim, u oko 10% slučajeva infekcija uzrokovanih HR HPV dolazi do razvoja perzistentne infekcije. Perzistentna infekcija dovodi do nastanka intraepitelnih lezija cerviksa različitog stepena koje se progresijom bolesti mogu razviti u karcinom (91,100,110–112).

Cervikalne intraepitelne lezije se najčešće dijagnostikuju u tzv. epitelnoj zoni transformacije, mestu prelaza cilindričnog epitela endocerviksa u pločasto slojeviti epitel egzocerviksa (113–116). Bazalne ćelije ove zone su manje slojevite u odnosu na epitel drugih lokalizacija, što ih uz podložnost hormonskom uticaju estrogena i progesterona čini naročito osetljivim za razvoj HPV indukovanih promena (9). U ovoj tranzitornoj zoni nezrelih stem ćelija kao rezultat adaptacije nastaje metaplazija. Metaplastični epitel se karakteriše poremećenom regulacijom u stvaranju i održavanju receptora, adhezionih i signalnih molekula, kao i citoskeletnih proteina što rezultira promenama u difrencijaciji, lokalnom imunskom odgovoru i većom podložnošću za mehanička oštećenja epitela. Takođe, povećana osetljivost metaplastičnih ćelija za hormone doprinosi kancerogenezi HPV inficiranih ćelija ovog područja (9). Nakon infekcije epitelnih ćelija bazalnog sloja, HR HPV koriste njihov proliferativni potencijal i mehanizme transkripcije za održavanje niskog nivoa virusnog genoma u formi epizoma (57). Virusni genom se replikuje jednom, tokom S faze ćelijskog ciklusa, formirajući perzistentnu infekciju koja može trajati godinama, zbog čega se ova faza životnog ciklusa HPV naziva latentnom fazom.

U većini slučajeva, HPV infekcija protiče bez klinički manifestnih znakova i simptoma oboljenja u uslovima efikasnog nadzora imunskog sistema (40).

Najviši nivo ekspresije onkogeni je u gornjoj trećini epitela (90). Uzročni mehanizam prelaska u produktivnu fazu infekcije nije tačno poznat. Smatra se da je u pitanju multifaktorijalan proces, a kao uzroci navode se kako genetski tako i epigenetski faktori (117). Iako se integracijom virusnog genoma u genom ćelije domaćina završava životni ciklus HPV, ona je najčešća pojava kod karcinoma grlića materice (11,118). Mesto prekida virusnog genoma je značajan faktor u mehanizmu razvoja onkogeneze. Virusni genom u formi epizoma se najčešće prekida između E2 i E4 gena, prelazeći iz cirkularnog u linearan oblik i ugrađuje se u hromozom ćelije domaćina (119). Prekid E2 gena rezultira gubitkom represivnog dejstva na ekspimiranje onkogeni E6 i E7 koji igraju ključnu ulogu u procesu onkogeneze (Slika 1.7) (11,120). Ugradnja genoma HPV se najčešće dešava na fragilnim mestima humanog genoma (121), tzv. „ključnim tačkama integracije” i može biti lokalizovana pojedinačno ili multifokalno (122).



Slika 1.7. Integracija genoma HPV u genom domaćina (modifikovano prema *Pal i Kundu* (63), dostupno putem dozvole CC BB 4.0).

Virusna DNK se može integrisati na dva načina. Prvi integrativni tip podrazumeva delimični ili potpuni gubitak E2 regiona zajedno sa gubitkom gena na mestu poliadenilacije. Ovaj mehanizam dovodi do stvaranja transkripta nastalog fuzijom gena domaćina i virusa, koji se smatra postojanijim čak i od samog virusa (118). Drugi integrativni tip čini više integrisanih kopija virusne DNK pri čemu se selektuju ćelije koje sadrže transkriptivno aktivna mesta (123). Kao posledica ovog događaja, uočeno je da se u ćelijama visokostepenih lezija i karcinoma, na mestima integracije HPV, nalaze različite hromozomske aberacije (117). Procenjeno je da je prisutnost integracije genoma HPV srazmerna progresiji lezije tako da je u niskostepenim lezijama forma epizoma zastupljenija, dok je integrisani genom HPV prisutan u preko 80% uzoraka cervikalnog karcinoma pozitivnih na HPV (120,124). Ovaj sled događaja ukazuje da se proces integracije dešava u kasnim fazama razvoja patogeneze karcinoma (120).

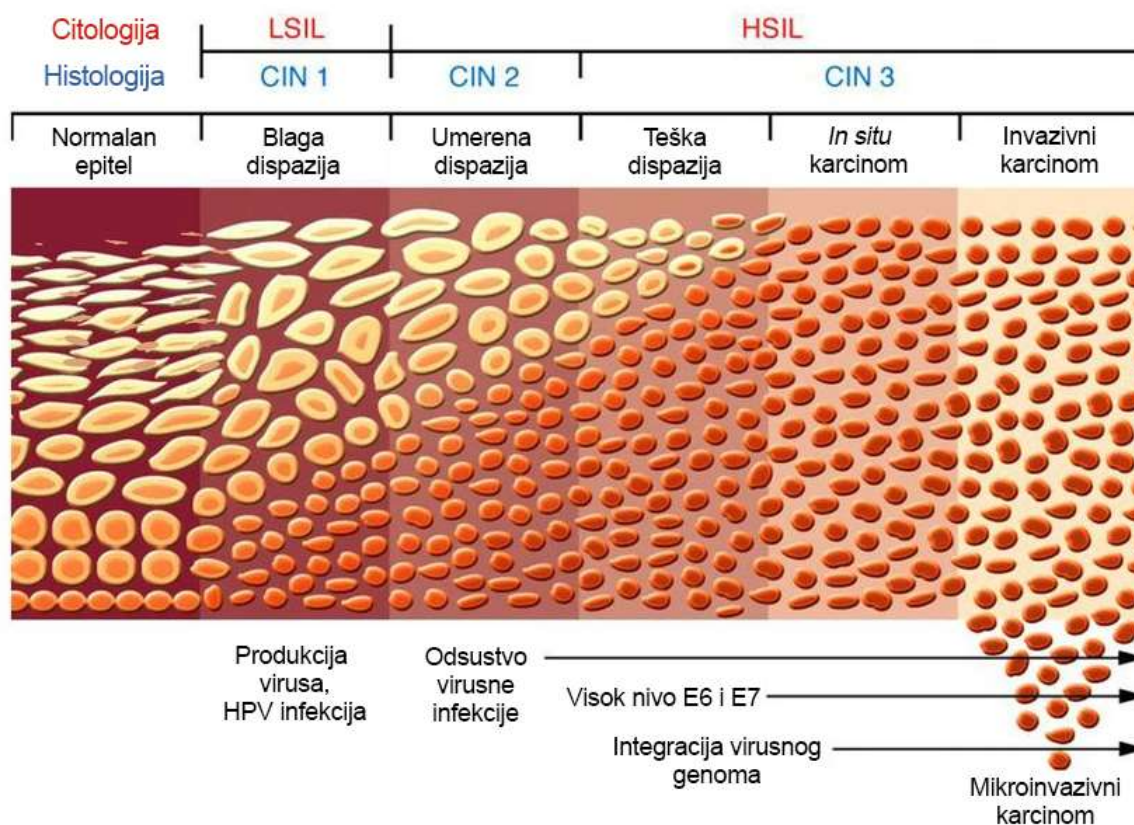
U malom broju slučajeva cervikalnog karcinoma dolazi do opstanka virusnog genoma u formi epizoma sa očuvanim integritetom ORF E2 (125). Međutim, potvrđeno je da je ekspresija onkogeni E6 i E7 HR HPV integrisane sekvence genoma HPV jače izražena u odnosu na onu koja se ostvaruje kod forme epizoma što dovodi do efikasnijeg nastajanja i održavanja izmenjenog fenotipa inficiranih ćelija (120). Zapaženo je da se ekstahromozomski oblik virusne DNK ipak održava u malom procentu ćelija cervikalnog karcinoma (120,126). Nastanak maligniteta se u tom slučaju objašnjava povećanom ekspresijom onkoproteina usled povećanja broja kopija epizoma pri čemu se krajnji rezultat izjednačava sa efektom transformacije ćelija integrisanog genoma HPV (125).

Procenat zastupljenosti integracije zavisi od genotipa HR HPV. Visokorizični genotip HPV 16 se nalazi integrisan u humani hromozom u približno 80% slučajeva, dok se HR HPV 18 i 45 nalaze u skoro svim uzorcima cervikalnog karcinoma kod kojih je potvrđeno prisustvo njihovog genoma (11,120), HR HPV 31 je zastupljen u 81% (120), a HR HPV 33 u približno 40% karcinoma (127).

Prema literaturnim navodima koji su se bavili procenom rizika razvoja cervikalne intraepitelne neoplazije (lat. *Cervical Intraepithelial Neoplasia*, CIN) u odnosu na HR HPV, procenjeno je da je rizik od razvoja CIN najveći prilikom infekcije sa HR HPV 16 i 33, potom sa HR HPV 18, 31, 45 (128). Cervikalne intraepitelne neoplazije indukovane HR

HPV se razvijaju kroz niz promena epitela i smatraju se prekursorima cervikalnog karcinoma (117,129).

Trenutno je aktuelna upotreba dva sistema klasifikacije pomoću kojih se opisuju rezultati citološkog pregleda. Nakon dugogodišnje upotrebe *Papanikolau* sistema citološke klasifikacije, 1988. godine uveden je novi sistem klasifikacije citoloških nalaza pod nazivom *Bethesda System* (engl. „*The Bethesda System 1988*”), koji je revidiran 2001. godine, pa zatim 2014. godine („*Bethesda System 2014*”) (130). Preporuka Evropskog vodiča za obezbeđenje kvaliteta u skriningu karcinoma cerviksa je da se svi citološki nalazi izražavaju sistemom *Bethesda* klasifikacije, a da se termini CIN upotrebljavaju za histološke interpretacije nalaza. Međutim, od 2015. godine i u histološkoj praksi se koristi nova terminologija (97) (Slika 1.8).



Slika 1.8. Prekursorske lezije cervikalnog karcinoma (modifikovano prema *Preinvasive Cervical Neoplasia* (131)).

Upotrebom *Bethesda System 2014* citološke klasifikacije cervikalne intraepitelne neoplazije se klasifikuju kao skvamozne intraepitelne lezije (engl. *Squamous Intraepithelial Lesion*, SIL) (132). U CIN sistemu klasifikacije stepen promena cervikalnog epitela se izražava kao:

- CIN I (blaga displazija) koju karakteriše celularna atipija u donjoj trećini epitela sluznice grlića materice;
- CIN II (srednje teška displazija) lezija zahvata pored bazalnih ćelija i površne slojeve, odnosno, dve trećine epitela;
- CIN III (teška displazija, lat. *Carcinoma in situ*, Ca) intraepitelne promene zahvataju sve slojeve epitela (97).

Karcinom cerviksa karakterišu cervikalne lezije koje pored celokupne debljine epitela probijaju bazalnu membranu sa potencijalnom hematogenom i/ili limfogenom diseminacijom u udaljene organske sisteme (97).

Pravac razvoja CIN direktno je srazmeran stepenu težine lezije. Spontana regresija je svojstvena za CIN1, dok CIN2 2 i 3 pokazuju veću verovatnoću progresije u invazivni karcinom cerviksa (120), odnosno CIN 1 u preko 70% regredira tako da u većini slučajeva ne predstavlja rizik od progresije bolesti. CIN 2 u vremenskom periodu od 4 do 6 godina progredira u oko 2% slučajeva u CIN 3, dok CIN 3 ima mogućnost da u 30% slučajeva netretiranih lezija progredira u invazivni karcinom tokom višegodišnjeg perioda (133).

Bethesda System 2014 citološke klasifikacije izražava citološke promene epitela cerviksa kao:

- NILM – negativan za intreaepitelnu leziju ili malignitet (engl. *Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy*) – nalaz u kome nisu uočene abnormalnosti;
- ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (engl. *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) – karakteriše citološke promene koje mogu odgovarati reaktivnim promenama ili displaziji;
- ASC-H – atipične skvamozne ćelije koje govore u prilog displaziji (engl. *Atypical Squamous Cells – a High grade squamous intraepithelial lesion cannot be excluded*)

- AGC – atipične žlezdane ćelije neodređenog značaja (engl. *Atypical Glandular Cells*)
- LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena (engl. *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) – odgovara displaziji srednjeg stepena (CIN 1);
- HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (engl. *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) – odgovara displaziji teškog stepena (CIN2 i 3)
- AIS – adenokarcinom *in situ* (engl. *Adenocarcinoma In Situ*) (132).

Epigenetske promene bilo da se odnose na sam virus ili na domaćina mogu biti pospešene integracijom virusnog genoma. Istraživanja potvrđuju metilaciju onkogeno E2 HPV 16 sa posledičnom inhibicijom u represiji transkripcije onkogeno E6 i E7 HR HPV (134), kao i da je metilacija gena L1 direktno srazmerna učešću integracije genoma i težini stepena lezije (135).

1.6 Imunski odgovor tokom HPV infekcije

HPV infekcija je lokalnog, intraepitelnog karaktera i hroničnog inaparentnog toka u kojoj je opstanak virusa moguć tokom više meseci ili godina (1). Uspešno uspostavljanje i opstajanje infekcije uzrokovane HPV leži u činjenici da je životni ciklus HPV vezan isključivo za diferencijaciju stratifikovanog epitela. Nizak nivo produkcije virusnih antigena u nižim slojevima nediferenciranog epitela ili pak produkcija kasnih gena i sklapanje viriona u terminalno diferenciranim ćelijama skvamoznog epitela koje su podložne prirodnoj deskvamaciji čini da ovi virusi ostanu dugo ili trajno sakriveni od imunskog sistema (57). Preciznije, nizak nivo ekspresije virusnih proteina uz odsustvo viremije i izostanak citolize su glavni mehanizmi izbegavanja imunskog odgovora domaćina (90,136).

Iako se približno 80% – 90% genitalnih infekcija uzrokovanih HPV uspešno kontoliše, zaustavlja i eliminiše imunskim odgovorom (102), razvoj perzistentne HPV infekcije dovodi do niza promena u regulatornim putevima urođene imunosti (137). Potvrđeno je da je sinergističko dejstvo onkoproteina E6 i E7 HR HPV neophodno za represiju gena zaduženih za regulaciju ovog tipa imuniteta (engl. *Innate Immune Genes*, IIG) (89). Na taj način se izbegavaju njegove glavne aktivnosti kao što su prepoznavanje virusne DNK u inficiranim ćelijama, aktivacija i kontrola različitih signalnih puteva, kao i produkcija proinflamatornih citokina (138).

Prvi korak u cilju otkrivanja ćelijskog oštećenja, nakon uspostavljanja HPV nfekcije, dovodi do aktivacije antigen prezentujućih ćelija (engl. *Antigen Presenting Cells*, APC) cervikalnog epitela. Antigen prezentujuće ćelije, kao što su Langerhansove (engl. *Langerhans Cells*, LC) i dendritske ćelije (engl. *Dendritic Cells*, DC), obrađuju, prezentuju antigene i dovode do produkcije proinflamatornih citokina i hemokina. Ove ćelije migriraju u regionalne limfne čvorove gde dolazi do prezentacije obrađenog antigena imunološki naivnim ćelijama i sledstvene aktivacije efektorskih ćelija: CD4⁺ (engl. *Cluster of Differentiation*, CD), odnosno pomoćničkih T limfocita (engl. *T-helper cells*, Th), a potom i CD8⁺, odnosno citotoksičnih T limfocita (engl. *T-cytotoxic cells*, odnosno *cytotoxic T lymphocytes*, CTL) (139).

Uobičajeno, uloga *Toll*-sličnih receptora (engl. *Toll Like Receptors*, TLR) u prepoznavanju patogena, ispoljenih na keratinocitima genitalnog epitela, dovodi do aktivacije prvenstveno Th1 posredovanog citotoksičnog odgovora i produkcije IFN tip 1 (IFN 1). Produkcija oba podtipa IFN 1, IFN- α i IFN- β , ima ulogu antivirusnog, antiproliferativnog, antianginoznog i imunomodulatorskog dejstva, kao i ulogu posrednika između urođenog i stečenog imuniteta (57). Nasuprot ovome, tokom perzistiranja HPV infekcije, aktiviraju se brojni mehanizmi izbegavanja efikasnog imunskog odgovora. Zbog odsustva signala koji bi bili indukovani citolizom, dolazi do smanjenog lučenja proinflamatornih citokina što smanjuje aktivaciju APC (LC, DC i makrofaga) HPV inficiranog epitela. Isti efekat ispoljava i HPV L2 protein koji delujući na LC dovodi do smanjenja njihove funkcije (57).

Kao i većina drugih DNK virusa, i HPV svojim brojnim mehanizmima inhibira delovanje antivirusnog efekta IFN 1, što uz nishodnu regulaciju APC i TLR dovodi do uspešnog izbegavanja aktivacije urođenog, pa sledstveno i stečenog imuniteta (57).

Inhibicija stvaranja interferona ostvaruje se na različite načine. Jedan je da onkoproteini E6 i E7 HR HPV direktno utiču na regulaciju signalnog puta IFN, stupajući u reakciju sa proteinima urođenog imunskog odgovora. Tačnije, onkoprotein E7 HR HPV se vezuje i inhibira funkciju regulatornog faktora interferona tipa 1 (engl. *IFN Regulatory Factor-1*, IRF1) (140), dok onkoprotein E6 HR HPV stupa u reakciju sa IRF3 (89). Blokodom aktivacije regulatornih faktora dolazi do smanjenja produkcije IFN- β , dok blokodom aktivnosti TLR dolazi do smanjenog oslobađanja citokina koji za krajnji cilj

imaju eliminaciju intracelularnog agensa. S druge strane, smanjena produkcija interferona, povratnom spregom dovodi do smanjene ekspresije interferon inducibilnih gena (9).

Poznato je da su proteini koji su odgovorni za: produkciju IFN preko protein prenosioca signala i aktivatora transkripcije 1 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*, STAT1), prepoznavanje virusnih receptora (TLR3, gen I inducibilne retinoične kiseline (engl. *retinoic acid-inducible gene-1*, RIG1) i antigena povezanog sa diferencijacijom melanoma 5 (engl. *melanoma differentiation-associated protein 5*, MDA5)) i apoptoznu aktivnost (TNF-sličan ligand koji indukuje apoptozu (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRIL) i XAF1 (engl. *XIAP Associated Factor 1*)), inhibirani dejstvom HR HPV 16, 18 i 31 (141). Ova inhibicija je posledica supresivnog dejstva onkogena E6 na IFN κ (69). Slabljenje produkcije IFN κ i liganda za hemokine CXCL14 i CXCL20 (engl. *C-X-C Motif Chemokine Ligand*) slabi ulogu APC na mestu delovanja HPV i ometa adekvatnu aktivaciju stečenog imunskog odgovora (96). Ovaj poremećaj u regulaciji IFN, ogleda se i u uticaju na aktivaciju signalnog puta cGAS-STING (engl. *cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes*) proteina. Vezujući motiv onkoproteina E7, koji je odgovoran za degradaciju Rb, inhibira signalnu kaskadu intrizičnog receptora, odnosno, intacelularnog DNK senzora (cGAS) koja je ključna u detekciji virusne DNK (142,143).

Dolazi do aktivacije obe subpopulacije limfocita. Th1 subpopulacija CD4⁺ ćelija produkuje tumor supresivne citokine i stimuliše produkciju CD8⁺ ćelija koje učestvuju u eliminaciji HPV inficiranih ćelija. Subpopulacija Th2 luči tumor promovišuće citokine i povećava produkciju neutrališućih antitela od strane B limfocita nakon prepoznavanja L1 proteina virusa (144). Ova specifična antitela, u vidu transudata ili eksudata dospevaju u sekret mukoznog epitela gde mogu stupiti u specifičnu reakciju samo sa virusnim agensima, ali ne i sa HPV inficiranim ćelijama. Prema tome, uloga neutrališućih antitela se ogleda u sprečavanju eventualne naredne infekcije i nema značajnu ulogu u kontrolisanju postojeće. Upravo ovo ukazuje da je imunski odgovor usmeren protiv specifičnog genotipa HPV posredovan prvenstveno celularnim imunitetom (139).

Efikasnost T ćelijski posredovanog imunskog odgovora, putem CD8⁺ i CD4⁺ limfocita je takođe smanjena tokom perzistentne infekcije uzrokovane onkogenim genotipovima HPV. Glavni onkoproteini ovog virusa dovode do disregulacije efektorskih

mehanizama stečenog imunskog odgovora na tri načina: kroz smanjenu aktivaciju APC, sniženje nivoa unosa virusnog antigena u ove ćelije i antigene prezentacije na površini MHC i molekula inficiranih keratinocita (145).

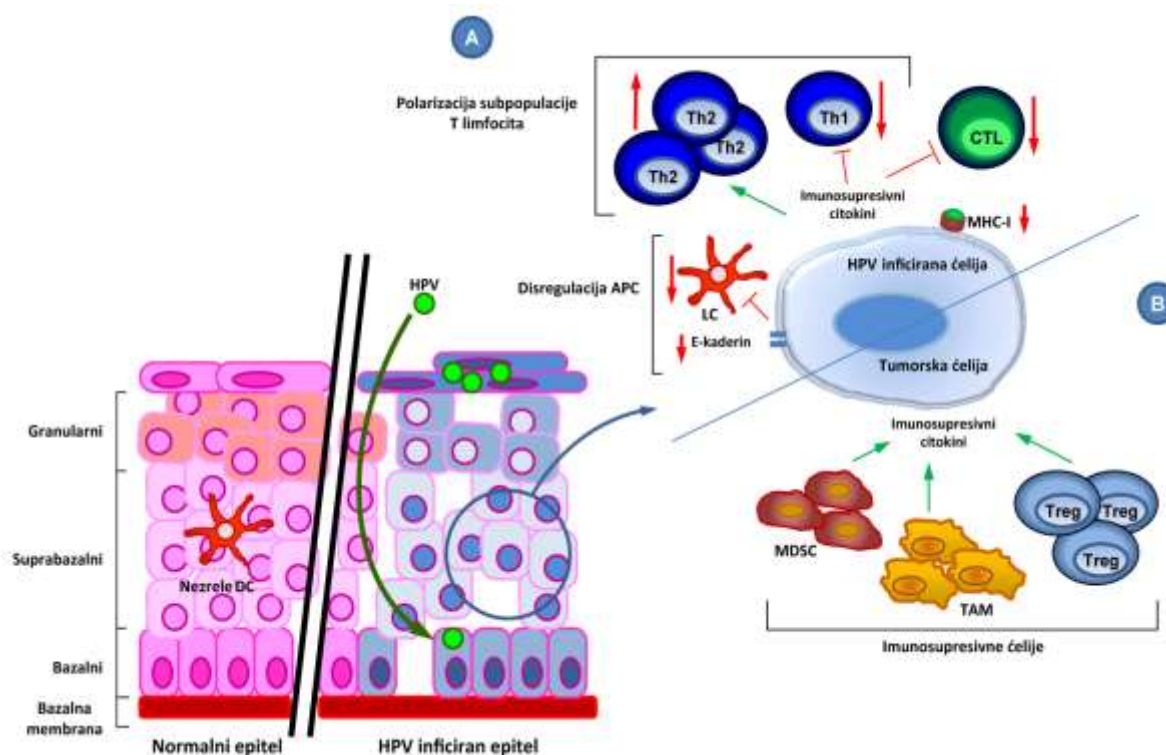
HR HPV infekciju karakteriše promena u odnosu između Th1 i Th2 subpopulacije limfocita. Ova dominacija Th2 subpopulacije ogleda se u promenama u regulaciji ekspresije citokina. U inficiranim ćelijama dolazi do smanjenog lučenja proinflamatornih citokina IL-1 (engl. *interleukine-1*), IL-6, TNF- α i TNF- β , i povećanog lučenju antiinflamatornih citokina, kao što je IL-10 (146). Istovremeno, smanjena je produkcija IFN- α , - β , i - κ , a smanjena ekspresija IFN κ vodi ka negativnoj regulaciji ekspresije gena odgovornih za produkciju IFN. Kao posledica redukcije ovih citokina dolazi do ograničene infiltracije inficiranog tkiva od strane različitih imunskih ćelija (147). Smanjena aktivnost ovog tipa imuniteta se, između ostalog, objašnjava i dejstvom onkoproteina E5, E6 i E7 HR HPV na smanjenu ekspresiju molekula MHC I, a time i CTL posredovanu eliminaciju inficiranih ćelija. Dalje, acidifikacija endozoma, koja je rezultat aktivnosti E5 onkoproteina, dovodi do ograničene mogućnosti antigene prezentacije u APC (148). Njegovom aktivnošću dolazi i do nishodne regulacije MHC I (149) i MHC I sličnog glikoproteina (CD1d) čija je uloga prezentacija antigena NK (engl. *Natural Killer cells*) ćelijama što sledstveno rezultira njihovom smanjenom aktivnošću (9) (Slika 1.9).

Mehanizam koji se takođe smatra bitnim u izbegavanju imunskog odgovora tiče se građe HR HPV onkoproteina. Naime, građa HR HPV E7 onkoproteina i nekoliko proteina humanih ćelija pokazuju izvesnu sličnost koja dovodi do smanjene imunogenosti ovog proteina (9). U prilog ovim dešavanjima, imunohistohemijski je potvrđeno da progresija CIN1 u CIN3 dovodi do smanjene aktivnosti efektorskih mehanizama imunskog odgovora, odnosno, smanjene ekspresije alfa4 i beta7 integrina CD8+ T limfocita (57). Takođe, zna se da inficirane ćelije sa virusnim genomom u formi epizoma bivaju eliminisane nakon ekspozicije IFN- β , dok ih prisustvo integrisanog genoma u istom tipu ćelija čini zaštićenim od dejstva ovih antivirusnih faktora (150).

Novija istraživanja koja su se bavila značajem cervikovaginalnog mikrobioma u razvoju infekcije HR HPV ukazuju da promene u broju i kvalitetu bakterijske populacije direktno utiču na postojanost infekcije i rizik od progresije u intraepitelne lezije visokog

stepena. Ovaj podatak ukazuje da pojedini bakterijski uzročnici mogu ujedno biti biološki indikatori, ali i terapijski ciljni molekuli tokom razvoja ovog oboljenja (151,152).

Ovaj sled događaja dovodi do relativno dugog vremenskog perioda u kome je omogućena nesmetana virusna replikacija HR HPV, ekspresija glavnih onkoproteina E6 i E7 HR HPV sa posledičnom genskom nestabilnošću koja omogućava transformaciju ćelija u pravcu razvoja malignog oboljenja (8).



Slika 1.9. Imunski odgovor HPV infekcije (modifikovano prema *Grabowska* (153), dostupno putem dozvole CC BY-NC 3.0).

1.7 Faktori rizika za nastanak karcinoma grlića materice

Imajući u vidu različit tok i ishod, kao i dug period latencije između inicijalne infekcije HPV i nastanka maligniteta ove lokalizacije dolazi se do zaključka da HR HPV infekcija iako je neophodan nije i jedini, odnosno dovoljan uzrok koji dovodi do raka grlića materice (154–156). Danas je poznato da maligni fenotip ćelije nastaje kao posledica dejstva mnogobrojnih faktora koji mogu poticati od virusa, domaćina i/ili okruženja (157), kao i regulatornih mehanizama epigenetskih faktora koji dovode do poremećaja u raznoteži aktivnosti tumor supresora i onkoproteina (158).

Faktori koji doprinose nastanku i razvoju HPV infekcije sa progredijetnim tokom su:

- Rani početak seksualne aktivnosti i broj seksualnih partnera, odnosno promiskuitet već dugo se navode kao faktori koji povećavaju rizik od nastanka i razvoja perzistentne infekcije HPV (159–161). Stupanje u seksualne odnose pre 18 godine se dovodi u vezu sa dvostruko većim rizikom od nastanka cervikalnog karcinoma u odnosu na osobe koje seksualnu aktivnost započinju kasnije (162) što je povezano sa kulturološkim razlikama prisutnim u različitim geografskim područjima (155).
- Pušenje, bilo aktivno ili pasivno, je povezano sa većim rizikom od nastanka karcinoma (163). Povećanje rizika je direktno srazmerno broju konzumiranih cigareta na dnevnom nivou i dužini pušačkog staža. Dokazano prisustvo metaboličkih produkata razgradnje duvana, poput benzopirena u cervikalnom sekretu žena, se smatra glavnim karcinogenim agensom. Ovaj genotoksin doprinosi modulaciji imunskog odgovora (164) ili genomskog oštećenja što direktno povećava rizik od virusne perzistencije i razvoja onkogeneze (165,166).
- Udružene polno prenosive infekcije (engl. *Sexually Transmitted Infections*, STI) povećavaju rizik od nastanka i progresije lezija nastalih usled infekcije HPV bilo da su u pitanju bakterijski uzročnici (lat. *Chlamydia trachomatis*, CT), virusi (lat. *Herpes Simplex Virus*, HSV; engl. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV), mikoplazme (lat. *Mycoplasma hominis*, lat. *Ureaplasma urealyticum*), gljivice (lat. *Candida spp.*) ili protozoe (lat. *Trichomonas vaginalis*) (167).

Mnogobrojne studije su potvrdile da CT, kao najčešća bakterijska seksualno prenosiva infekcija, doprinosi nastanku i perzistiranju infekcije HPV kroz procese

hronične inflamacije i odložene apoptoze (168). Takođe, HSV-2 se smatra značajnim induktorom nastanka ovog oboljenja, jer pored pojave hronične inflamacije dovodi i do ulceroznih promena na epitelu cerviksa i time olakšava put ulaska HPV do bazalnog epitela, zbog čega se ova infekcija pet puta češće dijagnostikuje kod obolelih od cervikalnog karcinoma (169). Dugogodišnja istraživanja koja su se bavila ovom temom ističu jasnu povezanost između pojedinih faktora, kao što su pušenje i koinfekcija uzrokovana CT ili HSV-2, sa povećanim rizikom od nastanka perzistentne infekcije HPV i njenim razvojem u pravcu malignog oboljenja (170).

Hronična inflamacija uzrokovana infekcijom HPV, ali i dejstvom pomenutih infektivnih uzročnika je značajan faktor u razvoju karcinoma cerviksa (171). Prekomerna produkcija reaktivnih kiseoničnih čestica (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i reaktivnih azotnih čestica (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) sa posledičnim povećanjem proinflamatornih citokina i slobodnih radikala dovodi do mutacija, delecija i rearanžiranja gena, odnosno, nakupljanja oštećenja DNK. Dokazano smanjenje aktivnosti oksidativnih enzima u tkivu karcinoma cerviksa, poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze govori u prilog ovoj činjenici. Poznato je da akumulacija genske nestabilnosti nastale na ovaj način doprinosi integraciji genoma virusa i daljoj onkogenezi (120).

- Dugotrajna primena oralnih kontraceptivnih sredstava (engl. *Oral Contraceptive*, OC) se smatra nezavisnim faktorom rizika i u korelaciji je sa rizikom od razvoja cervikalnog karcinoma, naročito žlezdanog epitela. Rezultati multicentrične studije ukazuju da je rizik od dalje progresije HPV infekcije tri puta veći kod žena koje su na kontraceptivnoj terapiji duže od pet godina (160).
- Multiparitet (više od tri porođaja) se takođe navodi kao faktor koji učestvuje u etiopatogenezi karcinoma cerviksa (155,162), a njegov doprinos se objašnjava oštećenjem cervikalnog epitela koje nastaje kao posledica traume, odnosno, porođaja. Ovo stanje dovodi do povoljnih lokalnih uslova za nastanak infekcije, ali i sistemskih izmena putem suprimiranosti adekvatnog imunskog odgovora, uticaja izmenjenog hormonskog i nutritivnog statusa (172).
- Povećana vrednost indeksa telesne mase (engl. *Body Mass Index*, BMI) i gojaznost se dovode u vezu sa nastankom mnogobrojnih oboljenja hroničnog toka i maligniteta

različitih lokalizacija. Karcinom cerviksa je jedan od njih, što je potvrđeno njegovom pozitivnom korelacijom sa vrednošću BMI i smanjenom primenom fizičke aktivnosti. Biološki mehanizmi kojima se objašnjava ova veza odnose se na regulaciju dejstva endogenih hormona, kao što su polni hormoni, insulin, insulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin-like Growth Factor*, IGF) i dr. (173).

- Faktori životne sredine (dim cigareta, derivati katrana uglja, sanitarni proizvodi na bazi katrana i dr.), za koje je dokazano da imaju pozitivan uticaj na disregulaciju signalnih puteva HPV inficiranih keratinocita, su od velikog značaja za razvoj ovog oboljenja u nerazvijenim zemljama. Identifikovano je preko 80 hemijskih jedinjenja koji se mogu smatrati značajnim u kontekstu HPV indukovane kancerogeneze. Iako je tačan mehanizam delovanja pomenutih faktora rizika predmet intenzivnih istraživanja, smatra se da je njihovim delovanjem rizik od progresije perzistentne infekcije znatno povišen (174,175).

Nadzor statusa infekcije HPV i faktora koji se dovode u vezu sa njenim tokom doprinose tačnijem razumevanju patofizioloških mehanizama onkogeneze i pružaju mogućnost za planiranje različitih strategija i informativnih programa u cilju prevencije i kontrole ove bolesti (164).

1.8 Molekularna dijagnostika HPV infekcije

Primena konvencionalnih dijagnostičkih metoda koje se koriste u dijagnostici virusnih infekcija, poput izolacije virusa u kulturi ćelija, elektronske mikroskopije, imunohistohemijskih i seroloških metoda nije primenljiva ili ima ograničenu dijagnostičku vrednost (109,176,177).

Tokom infekcije HPV, ekspresija različitih virusnih proteina dovodi do razvoja humoralnog imunskog odgovora. Vremenski period u kome se mogu indukovati i detektovati antitela je različit, čak i do nekoliko godina (178), što serološke metode čini nepouzdanim pri određivanju akutne ili prošle infekcije (87,179). Naime, tokom prirodne infekcije dolazi do spore produkcije antitela, pri čemu prosečno vreme serokonverzije iznosi 8 meseci za visokorizični genotip HPV 16. Pomenuta serokonverzija je direktno srazmerna stepenu težine cervikalne lezije i registruje se u niskom titru u 50% – 70% slučajeva (95,99).

Iz navedenih razloga, metode izbora za laboratorijsku dijagnostiku HPV su zasnovane na detekciji nukleinske kiseline. Razvoj molekularno-bioloških metoda, visoke senzitivnosti i specifičnosti je omogućio rano otkrivanje infekcije HPV, a samim tim i prevenciju karcinoma grlića materice (177,180). Ove metode omogućavaju ranu detekciju i procenu zastupljenosti genotipova HPV kod pojedinačne i/ili udružene infekcije, odabir pojedinih genotipova HPV i njihovo učešće u sastavu vakcine, kao i procenu uticaja vakcinacije na prevalenciju genotipova HPV u postvakcinalnom periodu (177).

Neophodno je razlikovati analitičku senzitivnost koja se odnosi na najmanji broj HPV genoma u uzorku kojim se može detektovati pozitivan rezultat, dok je klinička senzitivnost udeo pozitivnih žena koje se testom potvrđuju kao inficirane (181).

Parametri koji se koriste za procenu kliničkog učinka HPV testova su: klinička senzitivnost, klinička specifičnost, pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV). Klinička senzitivnost je udeo (u procentima) pacijentkinja sa potvrđenom bolešću kod kojih će test imati pozitivan rezultat. Klinička specifičnost je udeo (u procentima) pacijentkinja sa potvrđenim odsustvom bolesti koji imaju negativan rezultat ispitivanja. Na oba parametra može uticati sama priroda testa i manjim delom priroda uzorka koji se ispituje. PPV je mogućnost iskazana u procentima kojom pozitivna vrednost HPV testa ukazuje na prisustvo određenog oboljenja. NPV je mogućnost iskazana u procentima da negativna vrednost HPV testa ukaže na odsustvo određenog oboljenja. Oba parametra testa zavise prevashodno od prevalencije oboljenja u ciljnoj populaciji (181).

Tehnike molekularne detekcije koje se koriste u laboratorijskoj dijagnostici HPV se mogu grupisati u dve grupe. Prvu čine one koje se zasnivaju na signalnoj amplifikaciji, dok drugu čine tehnike koje se zasnivaju na ciljnoj amplifikaciji. Ove metode se uglavnom zasnivaju na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) (177).

1.8.1 Metode signalne amplifikacije

Metoda hvatanja hibrida (engl. *Hybride Capture assay*, HC2) je postala deo dijagnostičkih metoda detekcije HPV 1995. godine (177), a zasniva se na hibridizaciji HPV DNK sa obeleženim RNK probama u tečnoj fazi. Sintetičke RNK probe su deo tzv. koktela proba i komplementarne su sekvencama genoma pet niskorizičnih genotipova HPV (6, 11, 42, 43 i 44) i trinaest visokorizičnih genotipova HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,

52,56, 58, 59 i 68). Ukoliko je HPV DNK prisutna u uzorku, nastali hibridi će se vezati za monoklonalna antitela specifična za RNK-DNK hibride koja su obeležena hemiluminiscentnim supstratom i fiksirana za zidove bunarčića mikrotitarskih ploča. Nastala hemiluminiscentna reakcija, odnosno, intenzitet emitovane svetlosti srazmeran je koncentraciji ciljne sekvence HPV DNK u uzorku i izražava se semikvantitativno u relativnim svetlosnim jedinicama (176,182). Procenjeno je da senzitivnost ovog testa iznosi oko 93%. Međutim, detekcija svih onkogenih genotipova HPV nije moguća. Primećeno je da postoji ukrštena reaktivnost niskorizičnih genotipova HPV 6 i 11 (177), različitih proba koktela kao i da niža analitička senzitivnost može smanjiti mogućnost detekcije klinički relevantnih uzoraka (182,183).

1.8.2 Metode ciljne amplifikacije

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Ovo je molekularna metoda koja se zasniva na umnožavanju ciljne sekvence DNK pomoću nukleotidnih nizova (prajmera) u prisustvu termostabilne DNK polimeraze (177). Nakon reakcije dobijeni produkti se vizualizuju putem agarozne gel elektroforeze. Senzitivnost i specifičnost PCR metode zavise od faktora, kao što su: izbor lokalizacije i vrsta uzorka, način uzorkovanja, transport i skladištenje uzorka, specifičnosti dizajniranih prajmera, dužine PCR produkta i karakteristika DNK polimeraze (177). Procenjuje se da analitička senzitivnost ove metode iznosi približno 10 do 100 virusnih genoma u oko 100 ng izolovane DNK (184).

Uzorkovanje, izolacija i amplifikacija, kao koraci svakog PCR testiranja moraju biti strogo standardizovani, kako bi dobijeni rezultati bili uporedivi. Nakon izbora uzorka i načina uzorkovanja, stabilnost uzorka tokom transporta i skladištenja je ključna kako bi se izbegla degradacija endogenim nukleazama i obezbedilo održavanje integriteta DNK (177).

Prilikom dokazivanja HPV DNK ovom metodom, mogu se koristiti dve vrste prajmera: prajmeri specifični za određeni genotip i univerzalni prajmeri za nukleotidni niz koji se najfrekventnije pronalazi u pozicijama poravnatih sekvenci, odnosno za konsenzus sekvencu. Upotrebom specifičnih prajmera dolazi do detekcije pojedinačnog, specifičnog genotipa, dok se upotrebom univerzalnih prajmera dokazuje konzervirani deo genoma L1, karakterističan za veći broj različitih genotipova HPV (182). Upotrebom svakog seta prajmera

nastaju produkti različitih dužina, što može uticati na senzitivnost dokazivanja određenog genotipa HPV, posebno u uzorcima pozitivnim na više različitih genotipova (185).

Prajmeri dizajnirani na osnovu komplementarnosti sa genom L1 su u najširoj upotrebi (185). Razlikuju se tri vrste L1 konsenzus prajmera. Prvi prajmeri ove vrste, su opisani 1989. godine i nazvani su degenerativnim prajmerima. Sadrže izmenjenu sekvencu u cilju prevazilaženja razlike u sekvencama različitih HPV genotipova. Njihov primer je set prajmera MY09/MY11 čija smeša sadrži 24 specifične oligonukleotidne sekvence. Primer za drugu vrstu prajmera je GP5+/GP+. Kreirani su tako da su komplementarni konzerviranom regionu jednog ili više HPV genoma. S obzirom da komplementarnost nije moguća sa svim genotipovima HPV, nepodudaranja u sekvencama se prevazilaze nižom temperaturom vezivanja prajmera (184). Treća vrsta prajmera prevazilazi eventualne razlike u komplementarnosti sekvenci. Inozin u njihovom sadržaju im daje mogućnost vezivanja za bilo koji nukleotid. Primer za ovu vrstu su prajmeri SPF10 i PGMY (177). Rezultati poređenja njihove upotrebe u dijagnostici HPV infekcije ukazuju da se upotrebom prajmera PGMY09/11 postiže najveća senzitivnost (95,8%) (186), dok se upotreba univerzalnih prajmera koji se odnose na detekciju E1 regiona nije našla u širokoj upotrebi (182).

Iako na PCR reakciju utiče izbor prajmera, neophodno je voditi računa i o veličini PCR produkta. Poznato je da je efikasnost PCR reakcije obrnuto srazmerna sa dužinom amplikona, odnosno fragmanata DNK umnoženog u reakciji (183).

Analiza dužine restriktivnih fragmenata nakon PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms, PCR-RFLP*)

PCR-RFLP je metoda kojom se detektuju razlike u dužini PCR produkta, upotrebom restriktivnih endonukleaza (177). Detekcija restriktivnog mesta se vrši kompjuterski, odgovarajućim programskim paketom. Potom se nastali fragmenti različite dužine detektuju upotrebom agarozne gel elektroforeze, a efikasnost metode zavisi od mogućnosti detekcije određenih mutacija putem restriktivnih enzima (182).

Analiza PCR produkata masenom spektrometrijom (engl. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Mass Polymorphism, PCR-RFMP*)

PCR-RFMP je metoda koja se zasniva na upotrebi restrikcionih enzima, PCR amplifikaciji i analizi nastalih produkata pomoću masene spektrometrije sa analizatorom vremena leta, odnosno matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*, Maldi Tof). Upotrebom restrikcionih enzima dolazi do prepoznavanja, a zatim odvajanja nukleotida na tačno određenim distancama što omogućava detekciju različitih genotipova HPV za relativno kratko vreme (187).

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *real time Polymerase Chain Reaction, real time PCR*)

PCR tehnika koja se zasniva na upotrebi nespecifičnih fluorescentnih interkalirajućih boja ili specifičnog oligonukleotida obeleženog fluorescentnom bojom (probe). Kao rezultat reakcije emituje se fluorescentni signal, koji se meri u realnom vremenu. U cilju procene koncentracije DNK, nakon svakog ciklusa reakcije, izmerena fluorescencija može da se poredi sa poznatom referentnom kontrolom. Nastali intenzitet fluorescencije je srazmeran količini nastalog produkta, odnosno, početnom broju kopija virusne DNK u uzorku. Ovom metodom moguće je istovremeno kvantifikovati nekoliko ciljnih sekvenci (multipleks reakcija) (182). Prednosti *real time* PCR metode su: mogućnost detekcije malih količine DNK koje nije moguće dokazati klasičnom PCR reakcijom, mogućnost kvantifikacije DNK u uzorku, istovremena detekcija više genotipova primenom multipleks reakcije; kao i vrlo visoka senzitivnost i reproducibilnost metode (177).

Reverzna transkripcija i PCR u jednom koraku (engl. *Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR*)

Ova metoda se zasniva na primeni enzima reverzne transkripteze koji je zaslužan za sintezu komplementarnog DNK lanca (engl. *Complementary DNA, cDNK*), koji se sintetiše na osnovu RNK matrice. Nakon razgradnje nastalog hibrida RNK-cDNK, sledi sinteza drugog DNK lanca na osnovu komplementarne DNK koji se potom amplifikuje klasičnim ili *real time* PCR. U molekularnoj dijagnostici HPV, najčešće se koristi za detekciju specifične

iRNK, odnosno, detekciju ekspresije onkogena E6 i E7 HR HPV čime se dobija uvid u onkogeni potencijal HPV i omogućava nadzor toka perzistentne infekcije (188).

1.8.3 Sekvenciranje produkata PCR reakcije

Tehnike za sekvenciranje DNK i RNK predstavljaju lak i pouzdan način za otkrivanje primarne strukture nukleinske kiseline. Ove metode su danas automatizovane i smatra se da je njihovom upotrebom, odnosno, prevođenjem redosleda nukleotida u redosled proteina lakše odrediti primarni redosled aminokiselina u proteinu. Kao zlatni standard u molekularnoj biologiji DNK i RNK molekula, koristi se *Sanger* osnovano sekvenciranje automatskom metodom (189).

Postoji više tehnika sekvenciranja koje se jedna u odnosu na drugu razlikuju u principima rada. To su: *Maxam Gilbert*, *Sanger*, pirosekvenciranje, automatsko sekvenciranje i NGS (190).

Maxam Gilbert tehnika sekvenciranja

Ova tehnika podrazumeva upotrebu radioaktivnog obeležavanja na 5' kraju DNK. Hemijskom reakcijom (mravlja kiselina, dimetilsulfat, hidrazin) nastaju prekidi u nukleotidnim bazama, sa odvajanjem modifikovanih DNK. Nastali fragmenti se elektroforetski razdvajaju u poliakrilamidnom gelu koji se potom vizuelizuju rentgenskim filmom za autoradiografiju. Sekvenca se potvrđuje prisustvom ili odsustvom određenih obeleženih fragmenata (190).

Sangerova tehnika terminacije sinteze lanaca

Ova tehnika je razvijena 1970-tih godina od strane Frederika Sangera. Zasniva se na upotrebi 2',3'-dideoksi-nukleotid trifosfata (engl. *Dideoxynucleotide triphosphate*, ddNTP), pri čemu usled nedostatka 3'-OH grupe izostaje vezivanje sledećeg nukleotida i prestaje sinteza DNK (189). Pre planirane reakcije sekvenciranja potrebno je amplifikovati željenu DNK sekvencu, a nakon PCR reakcije prečistiti PCR produkt, odnosno, matricu koja služi za dalje sekvenciranje. Potom se prečišćeni PCR produkt, čiji je redosled nukleotida potrebno odrediti, procesira u reakciju sekvenciranja, tj. inkubira se sa ddNTP i uobičajenim PCR komponentama. PCR reakcija se odvija uobičajeno i nastali DNK fragmenti se razdvajaju na poliakrilamidnom gelu i detektuju autoradiografijom (190).

Automatsko sekvenciranje

Automatsko sekvenciranje je omogućeno razvojem fluorescentnih markera i aparata novijih tehnologija koji su unapredili preciznost i brzinu metode. Naziva se i *Sanger* bazirano sekvenciranje jer se zasniva na Sangerovoj metodi, odnosno, primeni ddNTP. Za razliku od bazične metode na kojoj se zasniva, ddNTP su u ovoj reakciji obeleženi različitim fluorescentnim bojama. Nastaju oligonukleotidi različite veličine koji se potom razdvajaju elektroforezom, detektuju preko laserskog snopa pri čemu se meri nastala fluorescencija. Talasna dužina emitovane fluorescencije se instrumentalno beleži, nastala boja se identifikuje, a time i nukleotid kojim se DNK fragment završava. PCR fragmenti se razdvajaju na sekvencer mašini gde se kao krajnja informacija dobija sekvenca. Analiza podataka se vrši pomoću sofisticiranih bioinformatičkih programskih paketa (189,190).

Sekvenciranje nove generacije

Ova metoda pruža mogućnost sekvenciranja velikog broja fragmenata DNK u isto vreme. Redosled nukleotida DNK, za razliku od prethodnih tehnika sekvenciranja, se određuje ne samo u jednom delu ili celom lancu DNK, nego u ogromnom broju istih delova ili lanaca DNK koji su predmet sekvenciranja. Prednosti ove tehnike sekvenciranja su: kraće vreme do konačnog rezultata analize u odnosu na druge metode sekvenciranja, sekvenciranje celog genoma, kao i manja početna količina DNK molekula. Veliki broj dobijenih podataka o sekvenciranim fragmentima se bioinformatički obrađuje u cilju raspoređivanja sekvence gena kojima se potom određuje redosled nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (190).

Tehnike sekvenciranja genoma se u okviru virusološke laboratorijske dijagnostike najčešće koriste za genotipizaciju i formiranje filogenetskih stabala. Primena tehnika sekvenciranja dovodi do novih informacija u pogledu genotipskih i fenotipskih karakteristika, kao i njihovih uzročno posledičnih veza, što dovodi do boljeg razumevanja mutacija DNK molekula i mogućnosti njihovog dijagnostikovanja (189).

Tehnike koje koriste probe specifične za određeni genotip:

1. Genotipizacija pomoću DNK čipa (engl. *DNA Microarray genotyping assays*)

Tehnika se zasniva na kolekciji DNK proba koje su kovalentnom vezom vezane za čvrstu fazu. Probe sadrže specifične DNK sekvence koje hibridizuju sa cDNK molekulima koji su fluorescentno obeleženi. Monohromatsko svetlo detektuje emisiju fluorescencije koju programski paket očitava i prezentuje u spotovima. Ova tehnika daje mogućnost detekcije velikog broja različitih ciljnih sekvenci i naročito je pogodna za testiranje velikog broja uzoraka (177).

2. Genotipizacija suspenzije (engl. *Suspension Array genotyping, HPV-SA*)

Zasniva se na upotrebi različitih mikroelemenata koje sadrže odgovarajuće molekule kao što su oligonukleotidne probe, antitela i dr molekuli. Svaki od mikroelemenata koji je suspendovan u rastvoru ima različite optičke karakteristike pri čemu se detektuju razlike u kvalitetu i intenzitetu njihovih boja, odnosno, ciljnih molekula. Upotrebom različitih DNK proba specifičnih za svaki genotip HPV omogućena je istovremena detekcija različitih genotipova HPV u kratkom vremenskom periodu (188).

3. Reverzni linijski test (engl. *Reverse Line-Blot, RLB*)

Primenom ove tehnike se prvo vrši PCR amplifikacija HPV DNK, pomoću specifičnih prajmera obeleženih biotinom. Nastali produkti se potom denaturišu i hibridizuju HPV specifičnim probama koje su imobilisane na nitroceluloznoj membrane ili najlonu. Detekcija nastalih hibrida obeleženih biotinom se omogućava dodavanjem streptavidin konjugovane alkalne fosfataze ili peroksidaze koja se vezuje za njih, a zatim se inkubira sa hromogenim supstratima. Nastali obojeni precipitati, odnosno, HPV genotipovi se vizuelno upoređuju i tumače u odnosu na referentni test za svaki ciljani HPV genotip (188).

4. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization, FISH*)

Tehnika koja omogućava direktnu detekciju HPV DNK u preparatima ćelija i tkiva koji su fiksirani i ukalupljeni u fiksacione rastvore u cilju očuvanja genetičkog materijala.

Zasniva se na vezivanju obeležene probe sa komplementarnom sekvencom virusnog genoma. Ova tehnika se sastoji od sledećih koraka: fiksacije tkiva, genotip specifične hibridizacije i detekcije HPV pozitivnih ćelija. Genotipovi HPV se identifikuju pomoću specifičnih proba koje su najčešće obeležene enzimima, kao što su: peroksidaza, alkalna fosfataza, biotin streptavidin, dok se ređe koriste radioaktivni izotopi. Produkt reakcije hibridizacije, obojeni hibridi HPV DNK proba se u vidu precipitata evaluiraju mikroskopskom tehnikom. Ovu tehniku karakteriše niska senzitivnost (50%), što je čini nepovoljnom za analizu većeg broja uzoraka (177).

5. Southern blot test hibridizacije

Od svih navedenih testova, ovaj se prvi put koristio za klasifikaciju novih genotipova HPV i u cilju dokazivanja integrisanog genoma HPV. Metoda obuhvata restrikcionu digestiju izolovanih genoma HPV. Nakon poliakrilamid elektroforeze sa natrijum dodecilsulfatom (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) vrši se prenos odvojenih produkata na nitroceluloznu membranu koji se potom obeležavaju genotip specifičnim probama. Probe su najčešće obeležene radioizotopima, a nastali DNK obeleženi hibridi detektuju se autoradiografski. Senzitivnost ove metode je oko 70% pa stoga nije pogodna za rutinsku upotrebu (177).

Mnogobrojni HPV DNK testovi koji se koriste u dijagnostici infekcije HPV pokazuju visok nivo senzitivnosti, ali ne i specifičnosti u detekciji HPV uzrokovanih visokostepenih lezija na grliću materice. Nemogućnost razlikovanja tranzitorne od perzistentne infekcije predstavlja glavni razlog za pronalazak i procenu specifičnih biomarkera progresije epitelnih lezija indukovanih ovim virusom. Idealan biomarker bi bio onaj koji bi svojom prediktivnom vrednošću jasno definisao različite faze infekcije HPV, kao što su regresija, perzistencija i progresija nastalih promena. Ove karakteristike proksi indikatora bi dale potencijalnom testu visoku pozitivnu prediktivnu vrednost što je ključno u proceni progresije kancerogeneze (177).

Metode kojima je moguće odrediti vrednosti potencijalnih biomarkera progresije oboljenja su: kvantitativno određivanje prisustva partikula HPV u uzorku (engl. *HPV viral load*), markeri DNK metilacije, HPV DNK sekvenciranje, određivanje nuklearnog proteina Ki-67 i drugih markera proliferacije ili regulacije ćelijskog ciklusa, određivanje telomarazne

aktivnosti i određivanje ekspresije inhibitora ciklin-zavisne kinaze p16 (INK4a), kao i detekcija iRNK E6 i/ili E7 HR HPV (177). Procena značaja i efikasnosti ovih biomarkera, kao i njihova klinička primena, predmet su brojnih istraživanja i kliničkih studija koje se sprovode u cilju unapređenja laboratorijsko-dijagnostičkih metoda detekcije ove infekcije.

1.9 Prevencija i terapijske vakcine HPV infekcije

1.9.1 Prevencija HPV infekcije

Razumevanje karakteristika HPV infekcije i razvoja premalignih promena su omogućile da se prevencija cervikalnog karcinoma ostvari na primarnom, sekundarnom i tercijalnom nivou. Primarna prevencija podrazumeva primenu HPV vakcinacije, uticaj na bezbedno seksualno ponašanje i smanjenje faktora rizika, kao i druge mere zdravstvenog prosvetavanja koje imaju za cilj sprečavanje nastanka HPV infekcije, prekanceroznih promena i karcinoma cerviksa (97). Implementacija HPV vakcine je jedan od najznačajnijih koraka koji se odigrao u cilju unapređenja ženskog reproduktivnog zdravlja u poslednjih pola veka (170). S tim u skladu, projekcije koje se mogu dobiti upotrebom matematičkih modela ukazuju da bi 20 godina postvakinalne ere u pojedinim zemljama, poput Australije, moglo doneti eradikaciju cervikalnog karcinoma (191).

Podaci o najvećoj učestalosti HPV infekcije ukazuju da je rizik za nastanak infekcije najveći nakon početka seksualne aktivnosti. Upravo zato najveći nivo zaštite se postiže ukoliko se sa primenom vakcinacije počne pre izlaganja ovom virusu (192,193). Jedan od najbitnijih faktora koji utiče na vakcinalnu imunogenost je uzrast primaoca. Istraživanja potvrđuju da je visina titra zaštitnih anti-L1 VLP IgG (virusu slične čestice, engl. *virus-like particles*, VLPs) kod devojčica uzrasta 10 do 17 godina, nakon primene dvovalentne vakcine, najmanje dva puta viša u odnosu na zaštitni titar koji se postiže u starijem uzrastu od 18 do 25 godina. Iz ovih razloga, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je definisala preporučeni uzrast za vakcinaciju u periodu od 9 do 15 godina (139). Efikasnost vakcine za uzrast mlađih od 9 godina nije ispitana, dok je za uzrast devojčica starijih od 14 godina, bez prethodne seksualne aktivnosti, procenjeno da se stiče visoka zaštita. Kod seksualno aktivnih osoba uzrasta od 12 do 26 godina imunogenost nakon HPV vakcinacije se postiže u značajno manjoj meri (97).

Trenutno su u upotrebi tri licencirane vakcine. Prva vakcina koja je prihvaćena 2006. godine od strane Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) bila je četvorovalentna vakcina protiv HPV infekcije uzrokovane HPV genotipovima: 6, 11, 16 i 18 (proizvođača *Gardasil*, *Merck & Co.*, inc.) (12). Naredne godine licencu je dobila dvovalentna vakcina protiv HPV genotipova: 16 i 18 (proizvođača *Cervarix*, *Glaxo Smith Kline*), da bi se 2015. godine pojavila devetovalentna vakcina protiv sledećih HPV genotipova: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 (proizvođača *Gardasil9*, *Merck & Co.*, inc.) (99). Sve navedene vakcine sadrže VLP, L1 protein genotipova sadržanih u vakcini koji se dobija rekombinantnom tehnologijom, ekspresijom putem rekombinantnih gljivičnih (*Saccharomyces cerevisiae*) i insekatskih (*Baculovirus*) vektora. Ove vakcine karakteriše odsustvo virusne DNK što obezbeđuje nemogućnost nastanka infekcije tokom njihove upotrebe (95).

U više studija je potvrđeno da nakon primene HPV vakcine dolazi do snažnije indukcije humoralnog imunskog odgovora u odnosu na prirodnu infekciju (39,194). Mehanizam delovanja vakcine se objašnjava visokim titrom produkovanih anti-L1 VLP IgG antitela u eksudatu nastalih mikroabrazija epitela, koji se vezuju za L1 protein HPV i na taj način sprečavaju ulazak virusa u ćelije (Slika 1.10). Proces internalizacije virusa u ćelije na početku infekcije traje nekoliko sati i dovoljno je dug vremenski period koji omogućava delovanje ovih već prethodno stvorenih antitela (139). Viševalentne vakcine indukuju produkciju anti-L1 VLP antitela specifičnih za određene genotipove sadržane u vakcini. Takođe, šira mogućnost zaštite je potvrđena pojavom ukrštene reaktivnosti, odnosno, delovanjem antitela protiv srodnih genotipova HPV, iako oni nisu sadržani u vakcini (195,196). Titar produkovanih anti-L1 VLP antitela dostiže najviši nivo mesec dana nakon poslednje doze vakcine, nakon čega se pojava titra održavanja u vidu platoa registruje od 18. do 24. meseca (197). U odnosu na prirodnu infekciju, nakon vakcinacije se registruje 10 puta viši nivo, a mehanizam njenog nastanka se objašnjava dejstvom adjuvansa u sadržaju vakcine (99). Serokonverzija nakon primene vakcine se registruje u skoro 100% vakcinisanih (198), a visina titra anti-L1 VLP antitela je obrnuto srazmerna njihovom uzrastu (95). Podaci dosadašnjih ispitivanja ukazuju da postvakcinalna zaštita traje preko 10 godina (199,200).

Iako se vakcinacija ne primenjuje u sklopu tretmana već uspostavljenih infekcija, njeni benefiti su i u tom slučaju dokazani. Naime, nakon lokalnog tretmana CIN, i dalje postoji nezanemarljiv rizik od reinfekcije i razvoja invazivnog karcinoma. U prilog učinkovitosti vakcine, dokazano je da je rizik od rekurentne CIN2 niži kod vakcinisanih u odnosu na nevakcinisane žene (201). Rezultati kliničkih studija koje su imale za predmet istraživanja efikasnost dvovalentne i kvadrivalentne vakcine protiv nastanka cervikalne HPV infekcije u kojima je učestvovalo preko 70.000 učesnica, potvrđuju da ona iznosi preko 95% za vakcinalne genotipove, uz prisustvo ukrštene reaktivnosti za HR HPV koji nisu sadržani u vakcini (99). S tim u vezi, procenjuje se da ukrštena reaktivnost za filogenetski srodne genotipove iznosi: 77% za HPV 31, zatim 43% za HPV 33 i 79% za HPV 45 (202), dok se primenom devetovalentne vakcine smanjuje rizik od nastanka infekcije i visokostepenih lezija za preko 95% (198). Iako, sve vrste vakcina dovode do održavanja stabilnog nivoa antitela i smanjene prevalencije onkogenih genotipova, indukovani imunski odgovor se razlikuje. Dokazano je da se primenom vakcine koja sadrži aluminijum adjuvans postiže viši nivo titra specifičnih anti-L1 VLP, odnosno povećana produkcija Th2 subpopulacije limfocita sa visokim nivoima IgG1 i IgG4, i IgA (203). Razlike u postignutoj imunogenosti se objašnjavaju delovanjem različitih adjuvanasa i proizvodnih sistema koji se koriste za konstruisanje VLP prilikom proizvodnje različitih vakcina (139).

HPV vakcinacija je implementirana u nacionalni program 76 zemalja, od kojih samo 1% čine zemlje u razvoju (204). Od pomenutih vakcina, u našoj zemlji su registrovane dve vrste, dvovalentna (HPV 16 i 18) i kvadrivalentna (HPV 6, 11, 16 i 18). Primena HPV vakcina u Srbiji još uvek nije deo programa obavezne imunizacije (97). U skladu sa Zakonom o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti predviđena je preporučena HPV imunizacija koja se odnosi na primarnu vakcinaciju dece uzrasta od 9–14 godina oba pola, kao i adolescenata. Bitno je istaći da je, bez obzira na vakcinalni status pojedinca, neophodno poštovati sve mere nacionalnog programa za skrining cervikalnog karcinoma. Primena bilo koje od registrovanih HPV vakcina ne obezbeđuje 100% zaštitu jer se zna da su visokorizični genotipovi HPV koji nisu sadržani u vakcini odgovorni za nastanak oko 30% slučajeva cervikalnih karcinoma (205).

Sekundarna prevencija cervikalnog karcinoma podrazumeva uvođenje nacionalnog skrining programa u cilju ranog otkrivanja raka grlića materice, smanjenja broja obolelih i umrlih od ovog oboljenja (97). Da bi se smatrao idealnim i prihvatljivim skrining test treba da bude: tačan, lako primenljiv, bezbedan po zdravlje i ekonomičan (206). Značaj dobro organizovanog skrininga potvrđuje činjenica smanjene incidencije i mortaliteta u zemljama njegove primene (97). Evidentno je da je uvođenje organizovanog skrininga tokom protekle dve decenije dovelo do redukcije smrtnosti uzrokovane cervikalnim karcinomom, a u nekim zemljama, kao što su zemlje Severne i Zapadne Evrope, taj procenat iznosi i do 90% (207). Evropske preporuke za rano otkrivanje raka grlića materice savetuju da skrining treba da se započne najranije 3 godine nakon stupanja u seksualne odnose, a najkasnije od 21. godine života. Ukoliko je citološki nalaz nakon dva uzastopna pregleda u razmaku od 6 meseci normalan, periodični pregledi *Papanikolau* testa (Papa test) se mogu raditi na 3–5 godina kod žena prosečnog rizika, sve do navršениh 65 godina života (97).

Saznanja do kojih se došlo u poslednjih nekoliko decenija su nesumnjivo ukazala na etiološku ulogu HPV u onkogenezi karcinoma grlića materice, što je dovelo do unapređenja laboratorijske dijagnostike ovog oboljenja i uvođenja HPV DNK analize kao dela osnovnog skrining testa, uz primenu citološkog testiranja u različitoj meri (88). Više vrednosti senzitivnosti HPV DNK testa i negativne prediktivne vrednosti od oko 100% u odnosu na konvencionalni Papa test ukazuju na minimalan rizik od nastanka cervikalnog karcinoma kod žena sa HPV DNK negativnim nalazom. Ova činjenica je dovela do odobrenja i preporuke njegove upotrebe u svrhu skrininga 2014. godine od strane Američke agencije za kontrolu hrane i lekova (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) (208) i godinu dana kasnije od strane Evropskog vodiča za osiguranje kvaliteta skrininga. Primarni HPV DNK test, se prema preporukama, primenjuje od 30 do 65 godine života, sa skrining intervalom od 5 godina kod žena sa HPV negativnim nalazom. Kod HPV DNK pozitivnih žena retestiranje se vrši na 6–12 meseci (209). Rezultati studija ukazuju da bi upotrebom ovog testa mortalitet koji nastaje kao posledica invazivnog karcinoma mogao biti redukovana za približno 50% (88). Za razliku od visokog učešća (88%) u Severnoj Evropi, organizovani skrining program na nacionalnom nivou je implementiran u samo 11% zemalja Južne i Istočne Evrope (210). Nedostatak sveobuhvatnog skrininga na teritoriji Republike Srbije bio je razlog započinjanja aktivnosti za uvođenje organizovanog skrininga 2006. godine, da bi

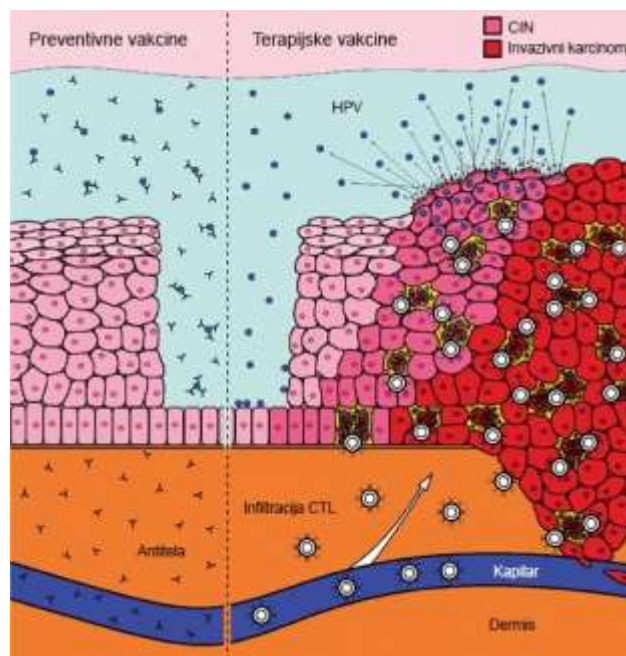
Nacionalni program za prevenciju raka grlića materice bio usvojen dve godine kasnije. Program je saglasan sa smernicama SZO i podrazumeva upotrebu periodičnih ginekoloških pregleda na 3 godine uz citološki pregled cervikalnog brisa koji ima za cilj ranu detekciju cervikalnog karcinoma sa ciljem smanjenja morbiditeta i mortaliteta uz poboljšanje kvaliteta života žena (97).

1.9.2 Terapijske vakcine

Tercijalna prevencija cervikalnog karcinoma podrazumeva lečenje prekanceroznih lezija u cilju sprečavanja razvoja invazivne forme bolesti (97). S obzirom da tematika ovog istraživanja naglašava značaj detekcije ekspresije onkoproteina E6 i E7 HR HPV i da se zna da oni imaju ključnu ulogu u razvoju i održavanju transformisane ćelije (211), ovo poglavlje se odnosi na terapijske vakcine čiji razvoj počiva na ovim molekulima. Poznato je da je HPV infekcija neizostavni faktor u razvoju karcinoma, ali ne i jedini dovoljan. Upravo zbog toga razvoj imunoterapije koji se zasniva na prevazilaženju nedovoljnog nadzora imunskog sistema predstavlja mogućnost unapređenja tretmana HPV posredovane onkogeneze (208). Procenjeno je da je za razvoj HR HPV infekcije u malignu bolest potreban višedecenijski period, što je dovoljan vremenski okvir koji pruža mogućnost delovanja imunoterapijskih procedura kroz prevenciju progresije niskostepenih lezija i regresiju postojećih. Podatak da je spontana regresija visokostepenih lezija prisutna u 30% slučajeva potvrđuje da je smer bolesti moguće promeniti mehanizmima imunskog odgovora (205). Metodologija aktuelne imunoterapije podrazumeva primenu: terapijskih vakcina, ciljnih antitela, T ćelijskih inhibitora v+ kontrolne tačke i transfera adaptivnih T ćelija (208). Smatra se da bi se udruženim delovanjem različitih terapijskih principa moglo doći do bolje potencijalne učinkovitosti tretmana lezija uzrokovanih HPV (212). U tom smislu, imunomodulatorne vakcine čije se delovanje zasniva na upotrebi agenasa koji menjaju uslove ćelijske sredine za razvoj onkogeneze mogu uticati na povećanje njihove efektivnosti. Ciljni molekuli ovih imunomodulatora su: regulatorne T ćelije (engl. *regulatory T cells*, Tregs), makrofagi asocirani tumorom (engl. *tumor associated macrophages*, TAMs), supresorske ćelije izvedene iz mijeloida (engl. *myeloid derived suppressor cells*, MDSCs) (213). Njihovom upotrebom dolazi do aktivacije niza signalnih molekula koji kontrolišu faktore rasta transformisanih malignih ćelija (214) (Slika 1.10).

U istom cilju se istražuje primena kombinovanja različitih vrsta terapijskih vakcina radi povećanja njihove učinkovitosti, kao i primena kombinacija profilaktičkih i terapijskih vakcina. Istraživači navode da primena imunostimulatora TLR agonista (215), kao i tzv. imunskih „inhibitora kontrolnih tačaka” (engl. *programmed death-ligand 1*, PD-1 i engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated transmembrane receptor 4*, CTLA-4) dovodi do aktivacije ćelijski posredovanog imunskog odgovora i brže eliminacije virusa (216). Činjenica da su trenutno u upotrebi samo profilaktičke vakcine, bez terapijskog efekta na postojeću bolest, čini potrebu za terapijskim vakcinama neophodnom (205). Iako su brojna klinička istraživanja različitih strategija lečenja u toku, najbliže cilju su dva kandidata: terapijska DNK vakcina VGX-3100 i ADXS11-001 vakcina bazirana na bakterijskom vektoru. Proizvodnja biološki aktivnih supstanci, odnosno vakcina, zasnovana na biljnim sistemima se smatra dobrim načinom prevazilaženja visokih cena proizvodnje sa mogućnošću njihove upotrebe u nerazvijenim zemljama gde je ova bolest i najzastupljenija (211).

Razvoj genske terapije, naročito aktuelan poslednjih godina, za lečenje HPV posredovanog karcinoma usmeren je na prekomernu ekspresiju ključnih onkoproteina E6 i E7 HR HPV i predstavlja obećavajuću strategiju za budući tretman. Zasniva se na internalizaciji strane DNK sekvence u ćeliju domaćina, što ima za cilj funkcionalnu izmenu humane ćelije (217).



Slika 1.10. Mehanizam delovanja preventivnih i terapijskih vakcina (modifikovano prema Han i Sin (218), dostupno putem dozvole: CC BY-NC 3.0).

1.10 Epidemiologija karcinoma cerviksa

Maligna oboljenja su vodeći uzrok smrti u svakoj zemlji širom sveta. Procenjuje se da je tokom 2020. godine približno 10 miliona ljudi umrlo od posledica malignih bolesti, a istovremeno je registrovano skoro dvostruko više novih slučajeva. Žene čine 47% od ukupnog broja, odnosno 9,2 miliona novoobolelih (219).

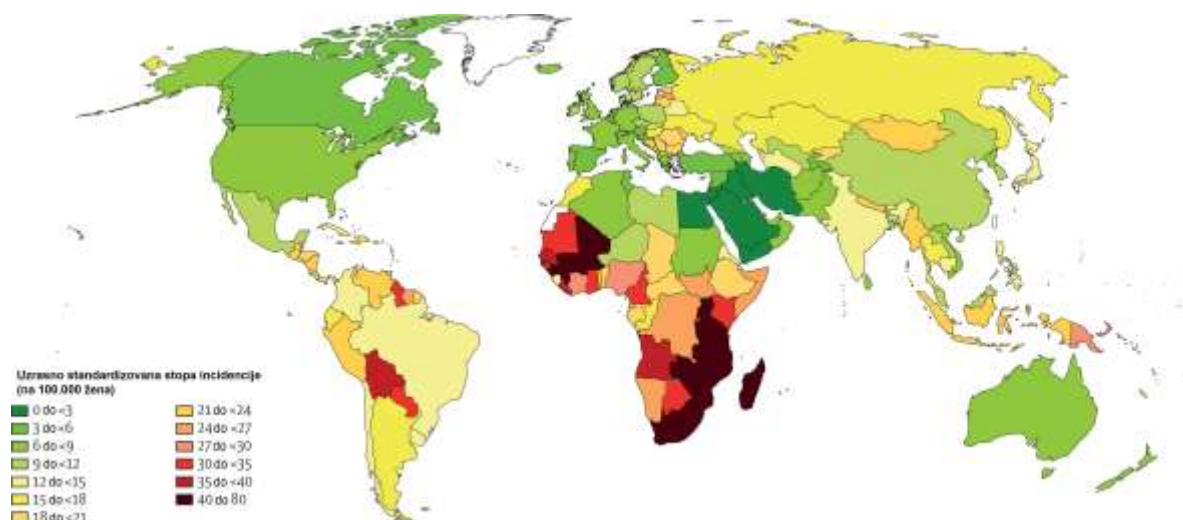
Karcinom cerviksa uzrokovan perzistentnom infekcijom HR HPV je jedan od najzastupljenijih malignih tumora kod žena (170,192). Sa prosečno 300.000 smrtnih slučajeva svake godine svrstava se među vodeće javno zdravstvene probleme u svetu (220,221). Prema procenama SZO, odnosno, IARC-a u svetu je tokom 2020. godine registrovano 604.000 novoobolelih i 342.000 smrtnih slučajeva, što ga čini četvrtim najčešće dijagnostikovanim karcinomom kod žena (219).

Karcinom cerviksa je najčešće dijagnostikovan lokalitet maligne bolesti u 28 zemalja i vodeći je uzrok smrtnosti u 42 zemlje (222). Incidencija značajno varira širom sveta i prvenstveno zavisi od socijalno-ekonomskog statusa stanovništva država u kojima se registruje (223). Naime, većina dijagnostikovanih slučajeva (više od 85%) je zastupljena u zemljama u razvoju (220,222,224,225), pa se shodno tome procenjuje da će tokom narednih 10 do 20 godina ovaj karcinom biti dijagnostikovan kod čak 11 miliona žena u ovim zemljama (174).

Najviše stope incidencije (> 40 na 100.000 žena) i mortaliteta (> 28 na 100.000) su registrovane na teritoriji Podsaharske Afrike, Melanezije, Južne Amerike i Jugoistočne Azije (220,222,226). Procenjuje se da će, ukoliko ne dođe do unapređenja socijalno-ekonomskih uslova i faktora koji se odnose na smanjenje mogućnosti nastanka perzistentne HPV infekcije broj smrtnih slučajeva godišnje, do 2030. godine nadmašiti 443.000 sa zastupljenošću od 90% u Podsaharskoj Africi (227). U Kini se registruje najveći broj novoobolelih slučajeva godišnje, dok se u Indiji registruje najveći broj smrtnih ishoda kao posledica karcinoma cerviksa. Ove dve zemlje zajedno čine 35% ukupnog broja dijagnostikovanih slučajeva karcinoma cerviksa i smrtnih ishoda uzrokovanih ovom bolešću (174,220).

Nasuprot tome, u Severnoj Americi, Australiji, Novom Zelandu i zapadnoj Aziji se beleži 7 do 10 puta niža stopa incidencije (192), a stope mortaliteta variraju i do 18 puta manje (228). U Severnoj, Zapadnoj i Južnoj Evropi se registruju niže stope incidencije (< 10 na 100.000 žena). Najniža stopa incidencije se beleži u zemljama Zapadne Azije (< 5 na

100.000 žena) (220) dok se najniža stopa mortaliteta registruje u Australiji i Novom Zelandu (1,7 na 100.000 žena) (174) (Slika 1.11).



Slika 1.11. Uzrasno standardizovana stopa incidencije (engl. *Age Standardised Rate*, ASR) cervikalnog karcinoma prema podacima pojedinačnih država (procenjeno za 2018. godinu) (modifikovano prema Arbyn i saradnici (220), dostupno putem dozvole: CC BY 4.0).

Iako se tokom poslednjih nekoliko decenija registruje opadajući trend stope incidencije (sa 18,8 na 11,3 na 100.000) i mortaliteta (sa 12,4 na 5,2 na 100.000) širom sveta, one i dalje ostaju disproporcionalno više u zemljama u razvoju u odnosu na razvijene zemlje (222).

U Centralnoj i Istočnoj Evropi cervikalni karcinom se nalazi na petom mestu po učestalosti (220). Svake godine se registruje oko 60.000 novoobolelih slučajeva, dok 25.000 žena umre od ove bolesti. Najvišu stopu incidencije i mortaliteta među Evropskim zemljama ima Crna Gora (26,2, odnosno, 10,5 na 100.000), potom Rumunija (22,6, odnosno, 9,6 na 100.000) dok se Srbija (18,7, odnosno, 7,9 na 100.000) i Litvanija (18,7, odnosno, 6,7 na 100.000) nalaze na trećem, tj. četvrtom mestu (229). Kumulativni rizik obolevanja pre 75. godine života u Istočnoj Evropi je 4 do 5 puta veći u odnosu na zemlje Zapadne Evrope i Skandinavije (230). Takođe, stopa incidencije cervikalnog karcinoma je više nego dvostruko veća u zemljama Centralne i Istočne Evrope (16,6 na 100.000 žena) u odnosu na zemlje Zapadne Evrope (7 na 100.000 žena) (229).

U proteklih 30 godina udeo mladih žena u ukupnom broju obolelih žena sa dijagnostikovanim cervikalnim karcinomom je značajno veći i iznosi 10% – 40% (231). Cervikalni karcinom je drugi po učestalosti, kao i drugi vodeći uzrok smrti kod žena uzrasta od 15 do 44 godine (232). Najčešće se dijagnostikuje kod žena prosečne starosti 53 godine (44–68 godina), dok je prosečna godina života u kojoj se završava smrtnim ishodom 59 (45–76 godina) (220). Korelacija između prevalencije HR HPV infekcije i incidencije cervikalnog karcinoma je odavno ustanovljena i procenjeno je da raste posle 35 godine, odnosno, najjača je između 55 i 64 godine. Širom sveta se zapažaju dva obrasca kretanja uzrasno specifične prevalencije HPV posredovane infekcije. Prvi se može predstaviti bimodalnom krivom koja pokazuje vrh prevalencije među ženama ≤ 25 godina, koga prati plato prevalencije tokom srednjih godina da bi došlo do ponovnog skoka prevalencije kod žena ≥ 45 godina. Ovaj obrazac je zastupljen u Centralnoj i Južnoj Americi, kao i većem delu Afrike. Drugi obrazac koji se primećuje ima inicijalni vrh kod žena do 25 godina starosti, potom sledi postepeni pad u starijem uzrastu, što se beleži u Severnoj Americi, Aziji i Evropi (170).

1.10.1 Epidemiologija cervikalnog karcinoma u Republici Srbiji

Republika Srbija je 2002. godine imala najvišu stopu incidencije cervikalnog karcinoma u Evropi (223). Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka iz 2021. godine, u pogledu učestalosti obolevanja i mortaliteta, cervikalni karcinom je na 5. mestu među svim lokalitetima maligne bolesti kod žena, sa stopom incidencije 18,7 na 100.000. Ona je i dalje skoro dva puta viša od prosečne stope u Evropi (10,6 na 100.000). Standardizovana stopa mortaliteta od 7,9 na 100.000 žena svrstava Srbiju, takođe, na 5. mesto u Evropi (229).

Prema podacima Registra za rak iz 2018. godine koji se odnose na Centralnu Srbiju standardizovana stopa incidencije je najviša u Borskom (46,1 na 100.000) i Zaječarskom okrugu (26,4 na 100.000), dok se najniže stope beleže u Braničevskom (12,3 na 100.000) i Mačvanskom (12,8 na 100.000). Okruzi sa najvišom standardizovanom stopom mortaliteta karcinoma grlića materice su Pomoravski (9,8 na 100.000 žena) i Borski (9,6 na 100.000 žena) (233).

U AP Vojvodini je standardizovana stopa incidencije karcinoma grlića materice u 2018. godini iznosila 20,5 na 100.000 žena, pri čemu je najviša vrednost registrovana u Severnobanatskom okrugu (27,4 na 100.000). Standardizovana stopa mortaliteta u Vojvodini iznosila je 6,1 na 100.000 žena pri čemu je najviša u Severnobačkom okrugu (8,6 na 100.000 žena) (233).

Kako u svetu tako i kod nas, karcinom cerviksa se najčešće dijagnostikuje u uzrastu od 45 do 65 godina (> 60 na 100.000). Stope incidencije do 35 godina života imaju niže vrednosti (10,2 na 100.000) da bi nakon tog perioda naglo rasle i kreću se između 35,7 i 57,5 na 100.000 žena (234). Porast stope mortaliteta srazmeran je uzrastu žena pa se najveći mortalitet beleži u najstarijoj životnoj dobi, gde je skoro izjednačen sa stopom incidencije. Visoke vrednosti stopa incidencije i mortaliteta su neprihvatljive i ukazuju na nepovoljnu epidemiološku situaciju kako širom sveta tako i kod nas (235).

Nemogućnost ili nedovoljno sprovođenje imunizacije protiv HPV, organizovanog skrininga i visoka prevalencija HPV infekcije u zemljama sa ograničenim sociološko-ekonomskim resursima su glavni razlozi koji dovode do uočljivih međunarodnih razlika u učestalosti obolevanja i umiranja od ove bolesti (220). Smatra se da sprovođenje imunizacije sa visokim obuhvatom u mlađim uzrastima i preventivni organizovani skrining kod žena od 30. godine starosti koji omogućava ranu detekciju prekanceroznih promena cerviksa, daju najbolje rezultate u prevenciji progresije ovog oboljenja kada su i mogućnosti za njegovo izlečenje najveće. Upravo iz ovih razloga, u novembru 2020. godine, SZO je inicirala i promovisala globalnu strategiju suzbijanja karcinoma cerviksa do eliminacije. U dostizanju ovog cilja će učestvovati 194 zemlje sveta (236).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj ovog istraživanja je usmeren na evaluaciju kliničkog značaja primene testa za detekciju onkogene aktivnosti najčešće zastupljenih visokorizičnih genotipova HPV.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi onkogeno aktivnost tri najčešće dijagnostikovana HR HPV određivanjem iRNK E6 i E7 onkoproteina u uzorcima cervikalnih briseva
2. Uporediti onkogeno aktivnost tri najčešće dijagnostikovana HR HPV u odnosu na stepen težine cervikalne intraepitelne lezije (NILM, ASCUS, LSIL, HSIL)
3. Uporediti onkogeno aktivnost tri najčešće dijagnostikovana HR HPV u uzorcima cervikalnih briseva
4. Izvršiti komparaciju kliničkih karakteristika HPV DNK i iRNK testa za detekciju visokorizičnih genotipova HPV i njihove onkogene aktivnosti u cilju procene progresije cervikalne intraepitelne lezije
5. Utvrditi prediktivni potencijal pojedinih faktora rizika na verovatnoću nastanka visokostepene lezije.

Hipoteze u odnosu na specifične ciljeve istraživanja su:

1. Tri najčešće dokazana HR HPV su onkogeno aktivna u najmanje 20% uzoraka cervikalnih briseva
2. Zastupljenost onkogeno aktivnih HR HPV raste sa porastom stepena težine cervikalne intraepitelne lezije
3. Visokorizični tip 16 HPV je najčešće onkogeno aktivan
4. iRNK test iskazuje veću specifičnost i pozitivnu prediktivnu vrednost u odnosu na HPV DNK test
5. Onkogeno aktivnost najčešće detektovanih HR HPV ima prediktivni potencijal u proceni nastanka visokostepene lezije.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je odobreno od strane Komisije za etičnost kliničkih ispitivanja na čoveku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu (broj dozvole: 01-39/136/1) i Etičkog odbora Instituta za javno zdravlje Vojvodine (broj: 01-252/3).

3.1 Klinički uzorci

Istraživanjem su bili obuhvaćeni uzorci cervikalnih briseva pacijentkinja starijih od 18 godina, upućenih od strane ginekologa u Centar za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine, u periodu od septembra 2017. godine do jula 2021. godine. Prilikom predaje uzorka, pacijentkinje su bile upoznate sa ciljevima istraživanja, a potpisivanjem informisanog pristanka potvrdile su učešće u istraživanju (Prilog 1). Uzorci su grupisani prema stepenu težine cervikalne intraepitelne lezije po *2014 Bethesda System* klasifikaciji (NILM, ASCUS, LSIL, HSIL). U svakoj grupi se nalazi najmanje 25 uzoraka cervikalnih briseva u kojima je dokazano prisustvo HR HPV DNK. U cilju ispitivanja uticaja starosne dobi na HR HPV DNK nalaz formirane su sledeće uzrasne kategorije: pacijentkinje do navršanih 31 godine starosti (mlađa uzrasna kategorija), uzrasta od 31 do 44 godine (srednja uzrasna kategorija) i starije od 44 godina (starija uzrasna kategorija). Uvođenje uzrasnih kategorija je u skladu sa važećim algoritmom za HPV testiranje objavljenom u okviru Vodiča za cervikalni skrining (engl. *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening*) (209) koje je formiran u odnosu na pojavu regresije (≤ 30 godina) ili progresije (> 30 godina) cervikalnih abnormalnosti, odnosno beleženjem bimodalne krive prevalencije dobno specifične stope, sa prvim pikom do 25. godine i drugim nakon 45. godine starosti (170).

3.2 Hemikalije

Kompleti korišćeni u radu nabavljeni su od sledećih proizvođača: *ThinPrep Pap* od *Hologic Inc.* (Marlboro, Masačusets, SAD), *SaMag STD DNA Extraction Kit* i *HPV High Risk Typing Real-TM* od *Sacace Biotechnologies* (Komo, Italija). Testovi su komercijalnog tipa i odobreni su za *in vitro* molekularnu dijagnostiku.

Komplet *miRNeasy Mini Kit* nabavljen je od *Qiagen* (Hilden, Nemačka). *Invitrogen™ TURBO DNA-free™ Kit*, prajmeri i fluorescentno obeležene probe za *real time* RT-PCR reakciju, kao i ultračista voda oslobođena od nukleaza tretiranjem sa dietilpirokarbonatom (engl. *diethylpyrocarbonate*, DEPC) (*Invitrogen DEPC-Treated Water*) nabavljeni su od proizvođača *Invitrogen* (deo kompanije *Thermo Fisher Scientific*) (Voltam, Masačusets, SAD). Inhibitor RNK nukleaze (*RNase Inhibitor*) i *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit* su nabavljeni od proizvođača *Applied Biosystems* (deo kompanije *Thermo Fisher Scientific*) (Voltam, Masačusets, SAD).

3.3 Obrada uzoraka cervikalnih briseva

Uzorci cervikalnih briseva prikupljeni su pomoću ginekološkog kompleta *ThinPrep Pap test*. Ovaj komplet omogućava da se iz jedinstvenog uzorka pored citoloških izvrše i molekularno biološka testiranja na prisustvo nukleinskih kiselina uzročnika seksualno prenosivih bolesti, uključujući HPV. Na ovaj način se poboljšava kvalitet uzorka, što komplet čini prikladnijim za dijagnostičku proceduru (237).

Nakon prijema, uzorci cervikalnih briseva su čuvani na temperaturi od 4–8 °C u periodu do 15 dana od dana uzorkovanja. Priprema uzorka obuhvatala je odvajanje 2 mL ćelijske suspenzije u tubicu oslobođenu od nukleaza i centrifugiranje ($8.000 \times g$, 5 min.). Formiran ćelijski talog je rastvoren u 300 μ L ultračiste vode oslobođene od nukleaza i dalje je korišćen za izolaciju nukleinskih kiselina.

3.4 Citološka dijagnoza

Uzorci su grupisani u odnosu na stepen težine cervikalne intraepitelne lezije prema *2014 Bethesda System* klasifikaciji.

3.5 Dokazivanje i genotipizacija visokorizičnih HPV

Dokazivanje i genotipizacija HR HPV DNK u uzorcima cervikalnih briseva izvedeni su primenom kvalitativnog *real time* PCR testa. Postupak je obuhvatao izolaciju DNK iz uzorka, amplifikaciju ciljnih gena HR HPV putem *real time* PCR testa i analizu dobijenih rezultata.

3.5.1 Izolacija virusne DNK

Izolacija virusne DNK izvršena je pomoću kompleta *SaMag STD DNA Extraction Kit*, uz upotrebu aparata za automatsku izolaciju nukleinskih kiselina *SaMag-12 Automatic Nucleic Acids Extraction System* (*Sacace Biotechnologies*, Komo, Italija) u skladu sa uputstvom proizvođača.

Metodološki princip izolacije nukleinske kiseline iz uzorka zasnovan je na vezivanju molekula DNK za magnetne čestice (238). U prvoj fazi izolacije, ćelije se liziraju u prisustvu denaturišućeg pufera koji sadrži guanidin-tiocijanat. Nakon toga, molekule DNK se vezuju za magnetna zrnca, dok se nevezana jedinjenja prisutna u uzorku (poput soli, raznih metabolita, solubilnih makromolekula) ispiraju u nekoliko koraka, kako bi se sprečio njihov inhibitorski uticaj na aktivnost polimeraze u *real time* PCR reakciji. U poslednjoj fazi izolacije, molekuli DNK se eluiraju sa površine magnetnih zrnaca u zapremini od 100 μ L pufera za eluciju (239).

3.5.2 Izvođenje *real time* PCR testa za dokazivanje i genotipizaciju HR HPV DNK

HPV High Risk Typing Real-TM komplet je upotrebljen za kvalitativno dokazivanje prisustva HPV DNK i genotipizaciju 12 visokorizičnih tipova HPV, označenih kao: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59 genotip. Testiranje je zasnovano na primeni fluorescentnih *TaqMan* proba i izvedeno je prema uputstvu proizvođača testa.

Svaki uzorak je ispitan u četiri odvojene višestruke, odnosno multipleks (engl. *multiplex*) *real time* PCR reakcije. Svaka pojedinačna reakcija je sadržala pufer za PCR reakciju i DNK polimerazu *Hot Start*, kao i odgovarajuće smeše prajmera i fluorescentno obeleženih *TaqMan* proba. Ove smeše su sadržale prajmere i *TaqMan* probe specifične za sekvence DNK tri genotipa HR HPV i humani β -globinski gen. Dokazivanje prisustva humanog β -globinskog gena je služilo kao interna kontrola endogenog tipa (engl. *internal control*, IC), čime se prati kvalitet uzorka. Na ovaj način omogućeno je prepoznavanje lažno negativnih rezultata nastalih usled nedovoljnog broja epitelnih ćelija u uzorku. U svako testiranje bile su uključene pozitivne kontrole za svaku pojedinačnu multipleks *real time* PCR reakciju. Kao negativna kontrola služila je ultračista voda oslobođena od nukleaza. *TaqMan* probe za detekciju DNK HR HPV genotipova 16, 39, 33 i 58 bile su obeležene FAM (6-karboksifluorescein) bojom, DNK HR HPV genotipova 31, 45, 35, i 52 JOE (4',5'-

dihloro-2',7'-dimetoksi-5(6)-karboksifluorescein) bojom, DNK HR HPV genotipova 18, 59, 56 i 51 ROX (6-karboksi-X-rodamin) bojom, a IC sa Cy5 (indodikarbocianin) bojom (240).

Izvođenje *real time* PCR testa vršeno je korišćenjem *SaCycler-96 Real Time PCR System* (*Sacace Biotechnologies*, Komo, Italija) i *TaqMan* tehnologije (241). Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 13 μ L sadržala je: 8 μ L odgovarajuće reakcione smeše koja je pored ostalog sadržala parove uzvodnih i nizvodnih prajmera, kao i fluorescentno obeleženih *TaqMan* proba i 5 μ L izolovane DNK. Nakon početne aktivacije DNK polimeraze na 95 °C tokom 15 min. izvedeno je 5 ciklusa umnožavanja (amplifikacije) u sledećim uslovima: 95 °C/5 s., 60 °C/20 s., 72 °C/15 s., a potom 40 ciklusa PCR amplifikacije: denaturacija molekula DNK (95 °C/5 s.), vezivanje prajmera (60 °C/30 s.) i ekstenzija nukleotidnog lanca (72 °C/15 s.). Podaci o nivou emitovane fluorescencije, snimani su u toku 40 ciklusa PCR amplifikacije za vreme faze vezivanja prajmera (60 °C/30 s.). Svaki uzorak je analiziran u jednoplikatu.

3.5.3 Analiza rezultata *real time* PCR testa

Kinetika detektovanih fluorescentnih signala praćena je upotrebom *SaCycler-96* programskog paketa (*Sacace Biotechnologies*, Komo, Italija). Dobijeni rezultati u vidu amplifikacionih kriva su automatski obrađeni u istom programskom paketu. Amplifikacione krive predstavljaju grafički sigmoidni prikaz porasta nivoa fluorescencije koji obuhvata eksponencijalnu, logaritamsku i fazu platoa, praćen tokom 40 ciklusa amplifikacije. Ciklus u kojem amplifikaciona kriva dostiže pragovni nivo fluorescencije (engl. *threshold*) predstavlja *Ct* (engl. *Cycle threshold*) vrednost. Ova vrednost je obrnuto proporcionalna količini ciljne sekvence u uzorku, odnosno, niža *Ct* vrednost ukazuje na njenu veću početnu količinu u datom uzorku.

Dobijeni rezultati *real time* PCR testa za dokazivanje i genotipizaciju HR HPV DNK, odnosno HR HPV DNK testa, su smatrani validnim ukoliko su rezultati testiranja svih kontrola bili zadovoljavajući prema uputstvu proizvođača. Uzorak je smatran negativnim na prisustvo HR HPV DNK ukoliko nije detektovan fluorescentni signal, dok je uzorak označen kao pozitivan na prisustvo HR HPV DNK ukoliko je uočena amplifikaciona kriva sa zadovoljavajućom *Ct* vrednošću. Interpretacija dobijenih rezultata pozitivnih na prisustvo HR HPV DNK vršena je u saglasnosti sa uputstvom proizvođača (240).

3.6 Dokazivanje iRNK E6/E7 visokorizičnih HPV

Dokazivanje iRNK E6/E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51 u ukupnom uzorku izvedeno je primenom metode reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real time Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction, real time RT-PCR*). Postupak je obuhvatao izolaciju ukupne RNK iz uzorka, uklanjanje kontaminanata, izvođenje *real time RT-PCR* testa i analizu dobijenih rezultata.

3.6.1 Izolacija ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK izvršena je upotrebom komercijalnog kompleta *miRNeasy Mini Kit* u skladu sa uputstvom proizvođača (242). Ovaj komercijalni komplet je prilagođen izolaciji ukupne RNK prisutne u uzorku vezivanjem za silikatnu membranu spin-kolonica. Izolacija ukupne RNK vršena je pomoću aparata za automatsku izolaciju nukleinskih kiselina *QIAcube Connect* (*Qiagen*, Hilden, Nemačka) upotrebom pomenutog kompleta.

U prvoj fazi izolacije, ćelije su lizirane i homogenizovane u prisustvu denaturišućeg pufera koji sadrži fenol i guanidin-tiocijanat. Tokom liziranja, dolazi do degradacije proteina i DNK, kao i do inaktivacije RNK nukleaza čime se obezbeđuje prečišćavanje intaktnih molekula RNK. Nakon toga, dodavanjem hloroforma i centrifugiranjem izvršeno je razdvajanje vodene faze (supernatant) u kojoj se nalaze molekule RNK, međufaze sa molekulama DNK i organske faze sa proteinima. Supernatantu je dodat etanol u cilju optimizacije uslova za vezivanje molekula RNK za silikatnu membranu spin-kolone. U naredna dva koraka ispirani su proteini, nukleaze i druga jedinjenja koje mogu inhibitorno uticati na *real time RT-PCR* reakciju, a zatim je ukupna RNK eluirana u zapremini od 50 µL ultračiste vode oslobođene od nukleaza.

3.6.2 Uklanjanje kontaminanata iz uzoraka izolovane ukupne RNK

Upotreba *miRNeasy Mini Kit* kompleta obezbeđuje izolaciju molekula RNK visokog kvaliteta. Ipak, uzorci izolovane ukupne RNK su podvrgnuti postupku koji je imao za cilj digestiju molekula DNK, potom inaktivaciju DNK nukleaza, kao i eliminaciju tragova dvovalentnih jona, magnezijuma i kalcijuma. Upotrebom *Invitrogen™ TURBO DNA-free™* kompleta, uz pridržavanje preporuka proizvođača (243), izvršeno je uklanjanje ovih potencijalno prisutnih kontaminanata, koji mogu da degradiraju izolovane molekule RNK. Pored toga, ovim postupkom se pruža dodatna sigurnost da je pozitivan rezultat dobijen u *real time* RT-PCR reakciji, rezultat prisustva iRNK E6/E7 HR HPV, a ne posledica prisustva HR HPV DNK. Rutinski postupak uklanjanja kontaminanata upotrebom pomenutog kompleta obuhvatao je dodavanje 5 µL pufera *10xTURBO DNase Buffer* i 1 µL enzima *TURBO DNase* u pojedinačni uzorak izolovane ukupne RNK (zapremine 50 µL), uz inkubaciju u trajanju od 20 do 30 min. na temperaturi od 37 °C. Nakon delovanja enzima dodato je 5 µL inaktivacionog reagensa (*Dnase Inactivation Reagent*), uz inkubaciju u trajanju od 5 min., na sobnoj temperaturi i povremeno mešanje. Nakon toga, izvršeno je centrifugiranje (90 s., 10.000 × g). Izdvojeni supernatant je pažljivo prenet u zasebnu čistu tubicu oslobođenu od nukleaza.

3.6.3 Izvođenje *real time* RT-PCR testa za dokazivanje iRNK E6/E7 HR HPV

Nakon postupaka izolacije ukupne RNK iz uzorka i uklanjanja kontaminanata, uzorci su podvrgnuti kvalitativnom ispitivanju prisustva iRNK E6/E7 pomoću *real time* RT-PCR testa. Test je izveden upotrebom prajmera i *TaqMan* proba specifično dizajniranih za prepoznavanje E6/E7 regiona genoma pojedinih tipova HR HPV. Nukleotidni nizovi prajmera i *TaqMan* proba preuzeti su iz prethodno objavljenog rada *Lindh* i saradnika (244). Svaki set se sastojao od dva oligonukleotidna prajmera uzvodno (engl. *Forward*, F) i nizvodno (engl. *Reverse*, R) i dvostruko obeležene *TaqMan* probe. Na 5' kraju *TagMan* probe su bile obeležene FAM (6-karboksifluorescein) *reporter* bojom, a na 3' kraju TAMRA (6-karboksitetrametilrodamin) *quencher* bojom. Dužina dobijenih amplicona je bila u opsegu 74–113 bp (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Nukleotidni niz uzvodnih i nizvodnih prajmera i obeleženih proba za dokazivanje iRNK E6/E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51.

Genotip	Nukleotidni niz prajmera i fluorescentno obeleženih proba	Dužina amplikona (bp)
HR HPV 16	F: 5'-TTGCAGATCATCAAGAACACGTTAGA-3' R: 5'-CAGTAGAGATCAGTTGTCTCTGGTTGC-3' P: 5' FAM -AATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA- TAMRA -3'	113
HR HPV 31	F: 5'-ATTCCACAACATAGGAGGAAGGTG-3' R: 5'-CACTTGGGTTTCAGTACGAGGTCT-3' P: 5' FAM -ACAGGACGTTGCATAGCATGTTGGA- TAMRA -3'	76
HR HPV 33	F: 5'-ATATTTCTGGGTCGTTGGCA-3' R: 5'-ACGTCACAGTGCAGTTTCTCTACGT-3' P: 5' FAM -GGACCTCCAACACGCCGCACA- TAMRA -3 [*]	74
HR HPV 51	F: 5'-AAAGCAAAAATTGGTGGACGA-3' R: 5'-TGCCAGCAATTAGCGCATT-3' P: 5' FAM -CATGAAATAGCGGGACGTTGGACG- TAMRA -3'	81

F – uzvodni prajmer (engl. *Forward*); R – nizvodni prajmer (engl. *Reverse*); P – *TaqMan* Proba; FAM – 6-karboksifluorescein; TAMRA – 6-karboksitetrametilrodamin; * – antisens.

Za izvođenje *real time* RT-PCR testa upotrebljen je komplet *AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit*, prema uputstvu proizvođača (245). Prajmeri su korišćeni u konačnoj koncentraciji od 300 nM, dok je konačna koncentracija *TaqMan* proba bila 200 nM. Zapremina pufera *2X RT-PCR Buffer* koja se dodaje u reakcionu smešu je bila 12,5 µL, dok je zapremina smeše enzima *AgPath 25X RT-PCR Enzyme Mix* bila 1 µL. U reakcionu smešu dodat je i 1 µL reagensa *RNase Inhibitor*. Ovaj reagens sadrži rekombinantni enzim koji inhibira aktivnost RNK nukleaza i tako sprečava degradaciju molekula RNK u uzorku. Za svaki set prajmera i *TaqMan* proba, pripremljena je zasebna reakciona smeša. U svaki bunarčić ploče za odvijanje PCR reakcije (tzv. reakcione ploče) dodato je 20 µL odgovarajuće reakcione smeše i 5 µL izolovane RNK. Reakcione ploče su nakon prekrivanja adhezivnim filmom centrifugirane 30 s. pri brzini od 500 × g, a zatim prenete u *real time* PCR aparat.

Radi dokazivanja prisustva ciljnih iRNK, uzorak je prvo podvrgnut reakciji reverzne transkripcije u toku koje su se na osnovu nukleotidnih nizova prisutnih molekula RNK sintetisane komplementarne molekule DNK, odnosno formirali su se lanci cDNK. U narednoj fazi reakcije novosintetisane molekule cDNK komplementarne iRNK E6/E7 odgovarajućih HR HPV tipova su se, zahvaljujući specifičnosti setova prajmera i *TaqMan* proba, selektivno amplifikovale. Za izvođenje *real time* RT-PCR testa upotrebljen je *real time* PCR aparat *Applied Biosystems 7500* proizvođača *Applied Biosystems* (deo kompanije

Thermo Fisher Scientific) (Voltam, Masačusets, SAD). Temperatura i vreme trajanja odgovarajućih faza reakcije zadati su pomoću programskog paketa *Applied Biosystems Software v2.0.6*. Reakcija reverzne transkripcije se odvijala u trajanju od 30 min. na temperaturi od 48 °C. Potom je sledila faza u trajanju od 10 min. tokom koje se vrši inaktivacija reverzne transkriptaze i aktivacija *Taq* polimeraze pri temperaturi od 95 °C. Nakon toga izvedeno je 45 ciklusa PCR amplifikacije: denaturacija molekula cDNK (95 °C/15 s.) i faza vezivanja prajmera *TaqMan* proba i ekstenzije nukleotidnog lanca (58 °C/1 min.). Podaci o nivou emitovane fluorescencije prikupljeni su tokom faze vezivanja prajmera i *TaqMan* proba u svakom ciklusu amplifikacije. Svaki uzorak je analiziran u jednoplikatu.

3.6.4 Analiza rezultata iRNK E6/E7 HR HPV testa

Dobijeni rezultati *real time* RT-PCR testa su obrađeni i prikazani u vidu amplifikacionih kriva i Ct vrednosti pomoću programskog paketa *Applied Biosystems Software v2.0.6*. Uzorak je dalje označen kao pozitivan na prisustvo iRNK E6/E7 određenog genotipa HR HPV, ukoliko je sa odgovarajućim setom prajmera i *TaqMan* probom dobijena amplifikaciona kriva. Opisana analiza ekspresije označena je kao iRNK E6/E7 HR HPV test. U cilju olakšane interpretacije dobijenih *real time* RT-PCR rezultata izvršena je kategorizacija onkogene aktivnosti u odnosu na stepen ekspimiranja iRNK E6/E7 HR HPV pri datim uslovima reakcije: niska onkogene aktivnost ($Ct \geq 30$), umerena onkogene aktivnost ($25 \leq Ct < 30$), visoka onkogene aktivnost ($20 \leq Ct < 25$) i veoma visoka onkogene aktivnost ($15 \leq Ct < 20$). Sagledavanje razlika u dobijenim Ct vrednostima omogućeno je analizom njihove disperzije.

3.7 Upitnik

Analiza demografskih podataka i faktora rizika za nastanak cervikalnih intraepitelnih lezija je vršena na osnovu pismene, anonimne ankete, popunjavanjem upitnika (Prilog 2) koji je sadržao pored osnovnih i demografskih podataka o pacijentkinjama, podatke o seksualnim i drugim navikama, kao i dodatnim faktorima koji su prema podacima iz dostupne literature značajni za nastanak cervikalne intraepitelne neoplazije posredovane HPV infekcijom (246). Kako bi se analizirali faktori rizika, obrađene su ankete HR HPV DNK pozitivnih žena koje su ih dobrovoljno popunile. Upitnik je odobren od strane Etičkog odbora Instituta za javno zdravlje Vojvodine, broj: 07-1086/3-a.

3.8 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket za interaktivnu ili grupnu statističku analizu *IBM Statistical Package for Social Sciences* – IMB SPSS 21 (247). Numerička obeležja (Ct vrednost HR HPV, uzrast) su prikazana putem srednjih vrednosti (aritmetička sredina) i mera varijabiliteta (opseg vrednosti, standardna devijacija), a atributivna obeležja (ostala koja nisu numerička) korišćenjem frekvencija i procenata.

Komparacija vrednosti numeričkih obeležja između dve grupe vršena je primenom Studentovog t-testa, dok je za poređenje vrednosti između tri ili više grupa podataka primenjena jednosmerna analiza varijanse (engl. *analysis of variance*, ANOVA), kao i *Bonferroni post hoc* test.

Testiranje razlike frekvencija atributivnih obeležja vršeno je primenom Hi-kvadrat (χ^2) testa nezavisnosti i kvaliteta podudaranja. Međusobna podudarnost testova vršena je primenom binominalne distribucije Maknemarovim (engl. *McNemar*) testom. Ispitivanje povezanosti dva obeležja vršeno je primenom Pirsonovog (r) i Spirmanovog (ρ) koeficijenta korelacije. U cilju kvantifikovanja dijagnostičkih sposobnosti izabranog testa i proceni njegovog značaja korišćena je ROC (engl. *Receiver Operating Characteristics*) kriva, koja omogućava testiranja značajnosti razlika diskriminacionih potencijala različitih varijabli za isti binarni ishod. Zasnovana je na grafičkom prikazu parova senzitivnosti i specifičnosti koji se mogu dobiti procenom granične vrednosti po svim vrednostima diskontinuiranih varijabli uzorka.

Za ispitivanje povezanosti dva ili više obeležja, odnosno generisanje adekvatnih statističkih modela, korišćena je univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza. Univarijantnom multinominalnom logističkom regresijom postupno su ispitani pojedinačni faktori koji označavaju povećanu verovatnoću za nastanak lezija visokog stepena cervikalnog epitela. Prediktivni model sadrži četiri nezavisne promenljive: HR HPV DNK 16, iRNK E6/E7 HR HPV, iRNK E6/E7 HR HPV 16, uzrasnu kategoriju pacijentkinja, dok je HSIL lezija, kao predstavica visokog stepena cervikalne atipije, predstavljala zavisnu promenljivu u odnosu na sve analizirane relevantne faktore. Multivarijantna logistička regresiona analiza je primenjena na onkogenu aktivnost ispitanih genotipova HPV i potvrđene relevantne faktore, u cilju konstrukcije prediktivnih modela kojima bi se imenovali najjači prediktori, kada se posmatra uticaj svih prediktora zajedno za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.

Statistički značajnim se smatraju vrednosti nivoa značajnosti $p < 0,05$. Rezultati su prikazani tabelarno i/ili grafički.

4. REZULTATI

4.1 Genotipizacija visokorizičnih HPV

Ukupno je testirano 365 uzoraka, od kojih je 246 (67,4%) bilo pozitivno na prisustvo najmanje jednog od 12 ispitanih visokorizičnih genotipova HPV, dok je 119 bilo negativno na prisustvo istih genotipova (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Analiza prisustva 12 HR HPV DNK u ispitivanom uzorku.

12 HR HPV DNK	n	(%)
Pozitivno	246	67,4
Negativno	119	32,6
Ukupan broj uzoraka:	365	100

n – broja pacijentkinja.

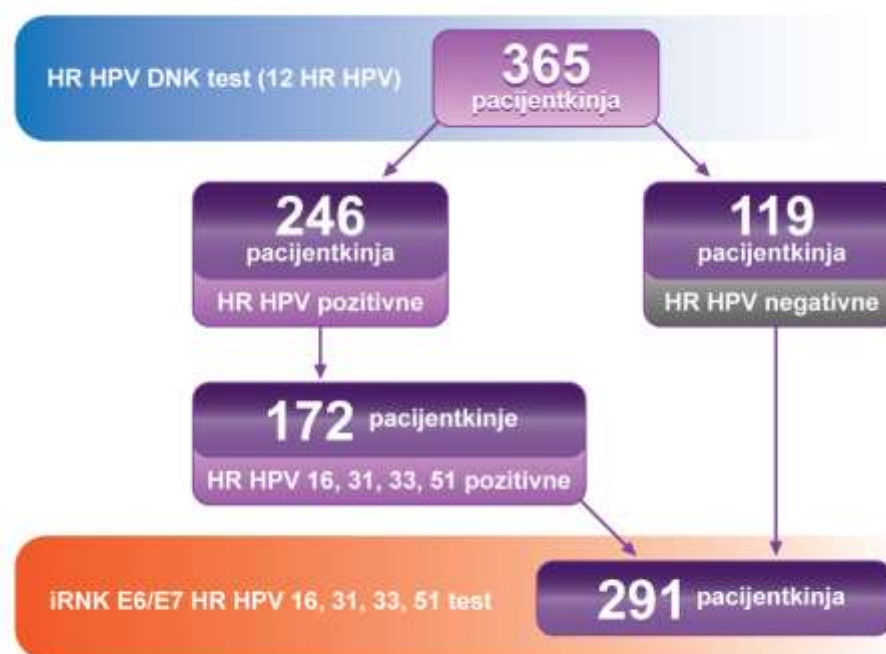
Rezultati pokazuju da su najčešće zastupljeni HR HPV genotipovi: 16 (38,3%), 31 (17,2%), 33 (8,8%), i 51 (8,8%) i čine 73% (200/274) detektovanih genotipova (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Distribucija 12 HR HPV genotipova.

HR HPV	n	%
HPV DNK 16	105	38,3
HPV DNK 31	47	17,2
HPV DNK 33	24	8,8
HPV DNK 51	24	8,8
HPV DNK 56	15	5,5
HPV DNK 52	13	4,7
HPV DNK 58	11	4,0
HPV DNK 18	10	3,6
HPV DNK 59	10	3,6
HPV DNK 45	7	2,6
HPV DNK 35	5	1,8
HPV DNK 39	3	1,1
Ukupan broj genotipova:	274	100
Ukupan broj uzoraka:	246	

n - broj HR HPV genotipova. Ružičasta boja označava četiri najčešće zastupljena HR HPV.

Uzorak za dalju analizu je obuhvatio 291 cervikalni bris, od kojih je 172 bilo pozitivno na prisustvo najmanje jednog od četiri najzastupljenija HR HPV DNK genotipa, a 119 negativno (Grafikon 4.1). S obzirom na mogućnost detekcije različitih genotipova u svakom pojedinačnom uzorku cervikalnog brisa, rezultati su iskazani u odnosu na ukupan broj pacijentkinja i/ili detektovanih genotipova.



Grafikon 4.1. Konstrukcija uzorka za analizu.

4.1.1 Distribucija HR HPV 16, 31, 33 i 51 genotipova

Kod HR HPV pozitivnih pacijentkinja, najzastupljeniji genotip je bio HR HPV 16 (61%). Sledeći po učestalosti bio je HR HPV 31 zastupljen u 27,3% slučajeva, dok su HR HPV 33 i HR HPV 51 bili podjednako zastupljeni kod 14% ispitanih pacijentkinja (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Distribucija HR HPV DNK 16, 31, 33 i 51 u odnosu na ukupan broj HR HPV pozitivnih pacijentkinja.

HR HPV DNK		Pacijentkinje		χ^2	<i>p</i>
		n	(%)		
HR HPV DNK 16	+	105	61,0	87,7	0,000***
	-	67	39,0		
	Ukupno:	172	100		
HR HPV DNK 31	+	47	27,3		
	-	125	72,7		
	Ukupno:	172	100		
HR HPV DNK 33	+	24	14,0		
	-	148	86,0		
	Ukupno:	172	100		
HR HPV DNK 51	+	24	14,0		
	-	148	86,0		
	Ukupno:	172	100		

n – broj pacijentkinja; *** $p < 0,001$.

Utvrđena je statistički značajna razlika između broja pacijentkinja sa pozitivnim HR HPV 16, 31, 33 i 51 genotipovima kod pacijentkinja Južnobačkog okruga ($\chi^2 = 87,7$; $p < 0,001$).

4.1.2 Distribucija pojedinačnih i udruženih HR HPV infekcija

U 84,3% analiziranih uzoraka dokazana je infekcija izazvana pojedinačnim genotipom, dok je u 15,7% slučajeva prisutna udružena infekcija. HR HPV 16 je najčešće pojedinačno zastupljeni genotip (48,3%), dok su ostali ispitani genotipovi imali niže učešće u strukturi (9,3% – 16,3%). Među udruženim infekcijama HR HPV 16 i 31 su prisutni najčešće (7,6%), dok se prisustvo ostalih ispitanih genotipova u udruženim infekcijama potvrđuje u manjem procentu (0,6% – 3,5%) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Distribucija HR HPV 16, 31, 33 i 51 pojedinačno i u udruženim infekcijama.

Udružena HR HPV DNK infekcija	HR HPV DNK	n	(%)	n	(%)
Ne	16	83	48,3	145	84,3
	31	28	16,3		
	33	18	10,5		
	51	16	9,3		
Da	16, 31	13	7,6	27	15,7
	16, 51	6	3,5		
	31, 33	3	1,7		
	16, 33	2	1,2		
	31, 51	2	1,2		
	16, 31, 33	1	0,6		
Ukupan broj uzoraka:		172	100	172	100

n – broj pacijentkinja.

4.1.3 Distribucija HR HPV 16, 31, 33 i 51 prema citološkom nalazu

Visokorizični genotip 16 je pozitivan u najvišem procentu bez obzira na stepen težine citološkog nalaza (od 44,8% do 75,5%). Učešće pozitivnih nalaza HR HPV 31 opada sa stepenom težine citološkog nalaza i najniže je u visokostepenoj leziji cervikalnog epitela (11,3%). Preostali HR HPV tipovi su pozitivni u manje od 20,7% bez obzira na stepen težine citološkog nalaza (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Distribucija HR HPV DNK pozitivnih uzoraka prema genotipu i citološkom nalazu.

HR HPV DNK		Citološki nalaz								χ^2	<i>p</i>
		NILM		ASCUS		LSIL		HSIL			
		n	%	n	%	n	%	n	%		
HR HPV 16	+	13	44,8	28	60,9	24	54,5	40	75,5	8,628	0,035*
	-	16	55,2	18	39,1	20	45,5	13	24,5		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100		
HR HPV 31	+	11	37,9	16	34,8	14	31,8	6	11,3	10,214	0,017*
	-	18	62,1	30	65,2	30	68,2	47	88,7		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100		
HR HPV 33	+	6	20,7	6	13,0	5	11,4	7	13,2	1,398	0,706
	-	23	79,3	40	87,0	39	88,6	46	86,8		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100		
HR HPV 51	+	4	13,8	5	10,9	8	18,2	7	13,2	1,045	0,790
	-	25	86,2	41	89,1	36	81,8	46	86,8		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100		

NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena; n – broj pacijentkinja; * $p < 0,05$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđena je statistički značajna razlika u zastupljenosti između broja pozitivnih nalaza HR HPV 16 (χ^2 test, $p = 0,035$) i HR HPV 31 (χ^2 test, $p = 0,017$) u zavisnosti od stepena težine citološkog nalaza, što nije utvrđeno za HR HPV 33 i 51 (χ^2 test, $p = 0,706$, odnosno, $p = 0,790$).

Učešće pozitivnih nalaza pojedinačnih HR HPV infekcija raste sa stepenom težine citološkog nalaza (16,6% – 31,7%). Kod udruženih infekcija najveće učešće pozitivnih nalaza registrovano je kod ASCUS (33,3%). Prema 2014 Bethesda System klasifikaciji bez registrovane celularne atipije bilo je najmanje uzoraka 16,9%. Slična zastupljenost se zapaža u grupama ASCUS i LSIL citoloških nalaza (26,7%, odnosno 25,6%), dok se najveći broj pozitivnih HR HPV DNK nalaza klasifikuje kao visokostepena lezija cervikalnog epitela (30,8%) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Distribucija pojedinačnih i udruženih infekcija prema citološkom nalazu.

Citološki nalaz	Prisustvo udružene infekcije					
	Ne		Da		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
NILM	24	16,6	5	18,5	29	16,9
ASCUS	37	25,5	9	33,3	46	26,7
LSIL	38	26,2	6	22,2	44	25,6
HSIL	46	31,7	7	25,9	53	30,8
Ukupno:	145	100	27	100	172	100

NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena; n – broj pacijentkinja.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u broju pacijentkinja sa različitim citološkim nalazom u odnosu na postojanje pojedinačne i udružene infekcije ($\chi^2 = 0,962$; $p = 0,811$).

4.1.4 Analiza starosne strukture žena sa dokazanom HR HPV 16, 31, 33, 51 infekcijom

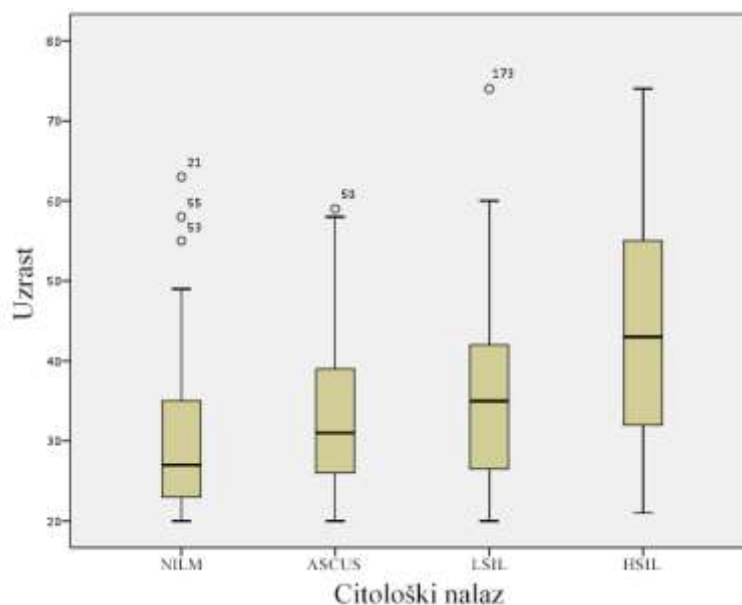
Najmlađa pacijentkinja u ispitivanom uzorku je imala 20 godina, a najstarija 74 godine, dok je prosek bio $36,7 \pm 12,6$ godina. Najveći broj pacijentkinja sa normalnim nalazom pripadale su mlađoj uzrasnoj kategoriji (27,9%), sa prosečnom starosnom dobi od 31 godine. Podjednak broj pacijentkinja sa nedefinisanim citološkim nalazom pripadale su mlađoj (30,9%) i srednjoj uzrasnoj kategoriji (33,9%), sa prosečnom starosnom dobi od 33 godine. Najveći broj pacijentkinja sa niskostepenim lezijama cevikalnog epitela pripadale su srednjoj uzrasnoj kategoriji (29%), sa prosečnom starosnom dobi od 36 godina. Najveći broj pacijentkinja sa visokostepenim lezijama cevikalnog epitela pripadale su starijoj uzrasnoj kategoriji (57,1%), sa prosečnom starosnom dobi od 43 godine. Među ženama Južnobačkog okruga najveća ukupna zastupljenost ispitanih HR HPV se beleži kod mlađih žena do 30 godina (39,5%), nešto niža kod pripadnica srednje životne dobi (36%), a najmanja kod žena starijih od 45 godina (24,4%) (Tabela 4.7; Grafikon 4.2).

Tabela 4.7. Starosna struktura ispitanih pacijentkinja prema citološkom nalazu.

Uzrasna kategorija (godine)	Citološki nalaz				Ukupno	
	NILM n (%)	ASCUS n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	n	%
≤ 30	19 (27,9)	21 (30,9)	17 (25,0)	11 (16,2)	68	39,5
31–44	5 (8,1)	21 (33,9)	18 (29,0)	18 (29)	62	36,1
≥ 45	5 (11,9)	4 (9,5)	9 (21,5)	24 (57,1)	42	24,4
χ^2	29,500				172	100
<i>p</i>	0,000***					
Prosek[#]	30,9 ± 12,2	33,4 ± 9,2	35,8 ± 11,5	43,4 ± 6,8***	172	100
<i>p</i>	0,000***	0,000***	0,012*	-		

n – broj pacijentkinja; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; # prikazana je srednja vrednost ± standardna devijacija. NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđena je statistički značajna razlika u broju pacijentkinja sa različitim citološkim nalazom i u odnosu na uzrasne grupe (χ^2 test; $\chi^2 = 29,500$; $p < 0,001$). Utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na citološki nalaz i starost pacijentkinja, gde su pacijentkinje sa HSIL nalazom bile značajno starije u odnosu na druge grupe (ANOVA; $F = 9,321$; $p < 0,001$). *Bonferroni post hoc* testom je utvrđeno da su pacijentkinje sa visokostepenim lezijama statistički značajno starije od onih sa nedefinisanim citološkim promenama ($p < 0,001$), normalnim citološkim nalazom ($p < 0,001$) i onih sa niskostepenim lezijama ($p = 0,012$).



Grafikon 4.2. Uzrasna struktura ispitanih pacijentkinja prema citološkom nalazu.

NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Prikazan je minimum, maksimum, donji i gornji kvartil i medijana. Kvartili dele distribuciju na četiri jednaka dela, a svaki deo sadrži 25% rezultata distribucije. Kružići predstavljaju identifikacione brojeve pacijentkinja.

U Tabela 4.8 i Grafikon 4.3 prikazana je distribucija ispitanih pacijentkinja prema genotipizaciji HR HPV i njihov prosečan uzrast, odnosno godina života najmlađe i najstarije pacijentkinje sa datim HR HPV DNK nalazom.

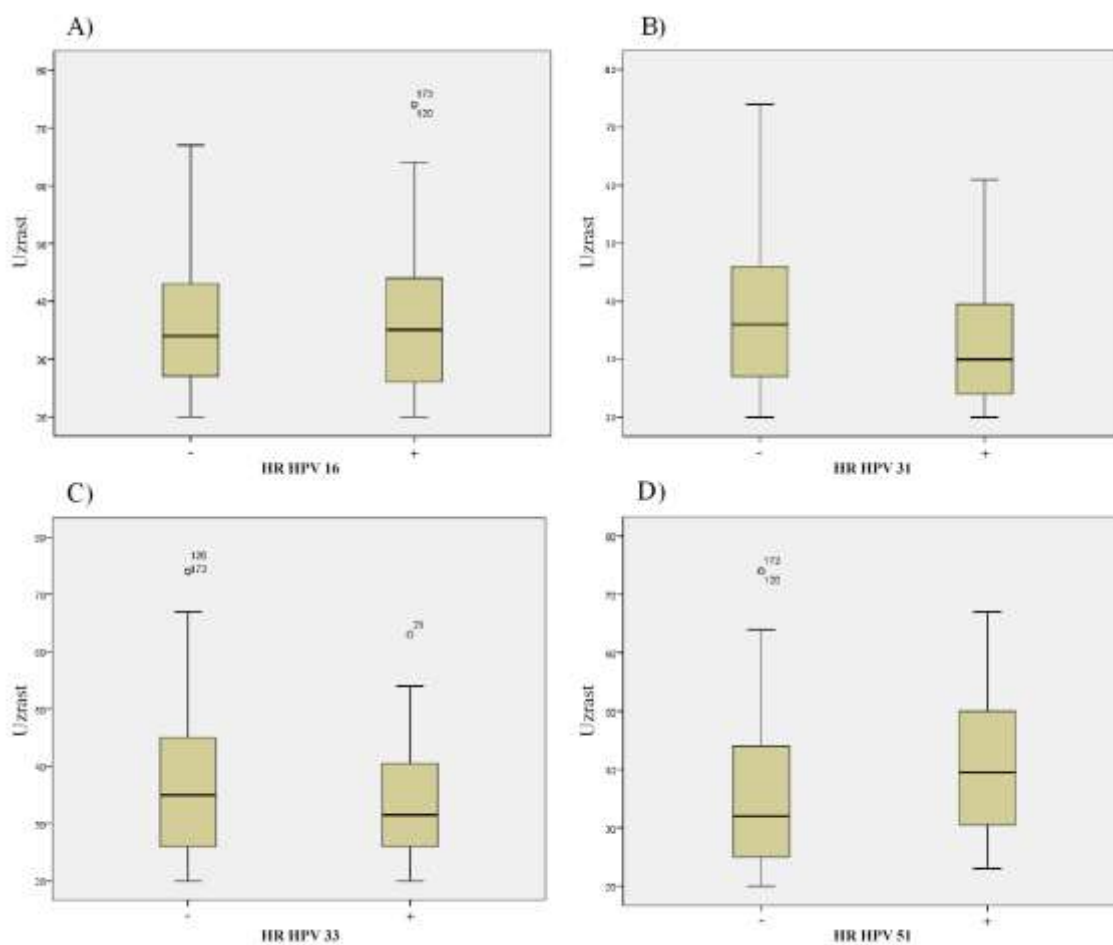
Prema genotipizaciji HR HPV pozitivnih nalaza se uočava da je prisustvo HPV 16 podjednako zastupljeno u svim uzrasnim kategorijama, detekcija HR HPV 31 i 33 genotipova smanjuje se sa godinama života, dok se HR HPV 51 povećava (Tabela 4.8, Grafikon 4.3).

Tabela 4.8. Analiza HR HPV DNK pozitivnih nalaza u odnosu na uzrast.

HR HPV DNK +	Uzrasna kategorija (godine)								χ^2	<i>p</i>	Srednja vrednost ± s.d. (godina)	Minimum (godina)	Maksimum (godina)	<i>t</i>	<i>p</i>
	≤ 30		31–44		≥ 45		Ukupno								
	n	%	n	%	n	%	n	%							
HR HPV 16	41	60,3	39	62,9	25	59,5	105	61,0	0,147	0,929	36,9 ± 12,9	20	74	0,289	0,773
HR HPV 31	24	35,3	15	24,2	8	19,0	47	27,3	3,930	0,140	33,1 ± 10,8	20	61	2,317	0,022*
HR HPV 33	10	14,7	10	16,1	4	9,5	24	14,0	0,963	0,618	34,1 ± 11,2	20	63	1,077	0,283
HR HPV 51	6	8,8	11	17,7	7	16,7	24	14,0	2,489	0,298	40,5 ± 12,7	23	67	1,610	0,109

n – broj pacijentkinja; s.d. – standardna devijacija; t – t-test: * $p < 0,05$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Pacijentkinje sa laboratorijski potvrđenim HR HPV 31 su statistički značajno mlađe (33 godine) u odnosu na preostale HR HPV pozitivne pacijentkinje ($t = 2,317$, $p = 0,022$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u broju pozitivnih HR HPV u odnosu na definisane uzrasne kategorije ispitivanih pacijentkinja.



Grafikon 4.3. Uzasna struktura ispitanih pacijentkinja prema HR HPV genotipu: HR HPV DNK 16 (A), HR HPV DNK 31 (B), HR HPV DNK 33 (C) i HR HPV DNK 51 (D). Prikazan je minimum, maksimum, donji i gornji kvartil i medijana. Kvartili dele distribuciju na četiri jednaka dela, a svaki deo sadrži 25% rezultata distribucije. Kružići predstavljaju identifikacione brojeve pacijentkinja.

Zastupljenost udruženih infekcija kod pacijentkinja različite uzrasne kategorije pokazuje da je procenat udruženih infekcija najmanji kod pacijentkinja ≥ 45 godina (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Zastupljenost udruženih infekcija u odnosu na uzrasne kategorije ispitanih žena.

Udružena HR HPV infekcija	Uzrasna kategorija (godine)						Ukupno	χ^2	<i>p</i>	
	≤ 30		31–44		≥ 45					
	n	%	n	%	n	%				
Da	12	17,6	13	21,0	2	4,8	27	15,7	5,292	0,071
Ne	56	82,4	49	79,0	40	95,2	145	84,3		
Ukupno:	68	100	62	100	42	100	172	100		

n – broj pacijentkinja.

Razlika u zastupljenost udruženih HR HPV infekcija prema stratifikovanim uzrasnim kategorijama nije utvrđena na statistički značajnom nivou.

4.2 Analiza onkogene aktivnosti visokorizičnih HPV 16, 31, 33 i 51

Analiza eksprimiranja onkogeni E6 i E7 omogućena je dokazivanjem iRNK E6/E7 HR HPV u ukupnom uzorku (291 cervikalnih briseva). Utvrđeno je prisustvo 115 iRNK E6/E7 HR HPV (16, 31, 33, 51) kod 111 pacijentkinja, koje čine 38,1% ukupnog uzorka odnosno 64,5% HR HPV pozitivnih pacijentkinja (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Analiza prisustva iRNK E6/E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51 u ispitivanom uzorku.

iRNK E6/E7 HR HPV	Ukupan broj pacijentkinja		HR HPV DNK +	
	n	(%)	n	(%)
Pozitivan	111	38,1	111	64,5
Negativan	180	61,9	61	35,5
Ukupno:	291	100	172	100

n – broj pacijentkinja.

4.2.1 Distribucija onkogene aktivnosti u odnosu na HR HPV DNK 16, 31, 33 i 51

Onkogeno aktivnost je dokazana za 115 (57,5%) HR HPV DNK potvrđenih genotipova. Približno svaki drugi HPV 16 genotip je onkogeno eksprimiran (48,6%), dok je onkogeno aktivnost preostalih ispitanih genotipova viša i iznosi 70,2% za HR HPV 31, 66,7% za HR HPV 33 i 62,5 % za HR HPV 51 (Tabela 4.11).

Tabela 4.11. Analiza prisustva iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51.

iRNK HR HPV		HR HPV DNK			Udeo iRNK E6/E7 HR HPV kod HR HPV + pacijentkinja (%)
		Negativni	Pozitivni		
		n	n	(%)	
iRNK E6/E7 HPV 16	+	0	51	48,6	29,7 (51/172)
	-	67	54	51,4	
	Ukupno:	67	105	100	
iRNK E6/E7 HPV 31	+	0	33	70,2	19,2 (33/172)
	-	125	14	29,8	
	Ukupno:	125	47	100	
iRNK E6/E7 HPV 33	+	0	16	66,7	9,3 (16/172)
	-	148	8	33,3	
	Ukupno:	148	24	100	
iRNK E6/E7 HPV 51	+	0	15	62,5	8,7 (15/172)
	-	148	9	37,5	
	Ukupno:	148	24	100	
Ukupna iRNK HR HPV	+	0	115	57,5	66,9 (115/172)
	-	119	85	42,5	
	Ukupno:	119	200	100	

n – broj HR HPV genotipova.

iRNK E6/E7 HR HPV detektovana je isključivo u HR HPV DNK pozitivnim uzorcima. Shodno navedenom, distribucija rezultata detekcije iRNK E6/E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51 iskazana je u odnosu na ovu frakciju uzorka. Najzastupljenija je bila iRNK E6/E7 HR HPV 16, koja čini 25,5% HPV DNK dokazanih HR HPV genotipova. Sledeća po učestalosti bila je iRNK E6/E7 HR HPV 31 kod 16,5% uzorka, dok su iRNK E6/E7 HR HPV 33 i 51 bile podjednako zastupljene u 8%, odnosno, 7,5% uzoraka (Tabela 4.12).

Tabela 4.12. Distribucija iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na HR HPV DNK genotipove.

iRNK E6/E7 HR HPV		n	%
iRNK E6/E7 HPV 16	–	149	74,5
	+	51	25,5
	Ukupno:	200	100
iRNK E6/E7 HPV 31	–	167	83,5
	+	33	16,5
	Ukupno:	200	100
iRNK E6/E7 HPV 33	–	184	92,0
	+	16	8,0
	Ukupno:	200	100
iRNK E6/E7 HPV 51	–	185	92,5
	+	15	7,5
	Ukupno:	200	100

n – broj HR HPV genotipova.

4.2.2 Analiza onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na citološke nalaze

Eksprimiranje gena E6 i E7 kao pokazatelja onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51 analizirano je u odnosu na citološki nalaz. iRNK E6/E7 HR HPV je najzastupljenija u grupi pacijentkinja sa HSIL citološkim nalazom (88,9%), dok je u grupi pacijentkinja sa LSIL citološkim nalazom dokazana u manjem procentu (60%). Dvostruko niža zastupljenost uočava se u grupi pacijentkinja sa ASCUS citološkim nalazom (29,4%), dok je kod žena sa normalnim citološkim nalazom onkoga aktivnost prisutna u 10,9% slučajeva (Tabela 4.13).

Tabela 4.13. Analiza prisustva iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na citološki nalaz pacijentkinja.

iRNK HR HPV	Citološki nalaz								χ^2	p
	NILM		ASCUS		LSIL		HSIL			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
+	13	10,9	20	29,4	30	60,0	48	88,9	108,623	0,000***
–	106	89,1	48	70,6	20	40,0	6	11,1		
Ukupno:	119	100	68	100	50	100	54	100		

NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena; n – broj pacijentkinja; *** $p < 0,001$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđena je statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza onkogene aktivnosti između stepena težine citološkog nalaza (χ^2 test; $\chi^2 = 108,623$; $p < 0,001$).

Analizirana je distribucija iRNK E6/E7 HR HPV pozitivnih HR HPV DNK uzoraka prema genotipu i citološkom nalazu. iRNK E6/E7 HR HPV 16 je najzastupljenija u grupi pacijentkinja sa HSIL citološkim nalazom (64,2%), dok je u ostalim grupama citološkog nalaza dokazana u manjem procentu (3,4% – 22,7%). Prisustvo iRNK E6/E7 HR HPV 31 je najmanje detektovano u HSIL (7,5%) u odnosu na ostale grupe citološkog nalaza (22,7% – 26,1%). Distribucija onkogene aktivnosti preostalih genotipova je približno ista kroz različite citološke grupe i zadržava se na niskom nivou (2,2% – 11,4%) (Tabela 4.14).

Tabela 4.14. Distribucija E6/E7 iRNK HR HPV pozitivnih HR HPV DNK uzoraka prema genotipu i citološkom nalazu.

iRNK E6/E7 HR HPV		Citološki nalaz										χ^2	<i>p</i>
		NILM		ASCUS		LSIL		HSIL		Ukupno			
		n	%	n	%	N	%	n	%	n	%		
16	–	28	96,6	40	87,0	34	77,3	19	35,8	121	70,3	46,881	0,000***
	+	1	3,4	6	13,0	10	22,7	34	64,2	51	29,7		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100	172	100		
31	–	22	75,9	34	73,9	34	77,3	49	92,5	139	80,8	6,858	0,077
	+	7	24,1	12	26,1	10	22,7	4	7,5	33	19,2		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100	172	100		
33	–	26	89,7	43	93,5	39	88,6	48	90,6	156	90,7	0,682	0,878
	+	3	10,3	3	6,5	5	11,4	5	9,4	16	9,3		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100	172	100		
51	–	26	89,7	45	97,8	39	88,6	47	88,7	157	91,3	-	-
	+	3	10,3	1	2,2	5	11,4	6	11,3	15	8,7		
	Ukupno:	29	100	46	100	44	100	53	100	172	100		

n – broj pacijentkinja; *** $p < 0,001$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Statistički značajna razlika je utvrđena u broju pozitivnih nalaza iRNK E6/E7 HR HPV 16 u odnosu na citološki status ($\chi^2 = 46,881$; $p = 0,000$).

Ukupna onkogeno aktivnost (udružena i pojedinačna) HR HPV DNK infekcija detektovana upotrebom iRNK E6/E7 HR HPV testa raste sa stepenom težine cervikalne lezije (60% – 100%). Onkogeno aktivnost pojedinačnih HR HPV (20% – 85,7%) je veća u odnosu na onkogeno aktivnost udruženih genotipova (0% – 40%) (Tabela 4.15).

Tabela 4.15. Analiza onkogene aktivnosti udruženih HR HPV.

Citološki nalaz	HR HPV DNK	f1	Udružena iRNK E6/E7 HR HPV	f2	Pojedinačna iRNK E6/E7 HR HPV	f3	Udružene iRNK E6/E7 HR HPV* (%)	Pojedinačne iRNK E6/E7 HR HPV** (%)	Ukupna onkogeno aktivnost
NILM	16, 31	1	-	0	-	0	40,0	20,0	60,0
	16, 51	1	-	0	51	1			
	31, 33	2	31, 33	1	-	0			
	31, 51	1	31, 51	1	-	0			
	Ukupno:	5		2	Ukupno:	1			
ASCUS	16, 31	6	-	0	16 31	1 3	22,2	44,4	66,6
	16, 51	1	-	0	-	0			
	31, 33	1	31, 33	1	-	0			
	31, 51	1	31, 51	1	-	0			
	Ukupno:	9		2	Ukupno:	4			
LSIL	16, 31	3	-	0	16 31	1 2	0,0	83,3	83,3
	16, 31, 33	1	-	0	33	1			
	16, 51	2	-	0	51	1			
	Ukupno:	6		0	Ukupno:	5			
HSIL	16, 31	3	16, 31	1	16 31	1 1	14,3	85,7	100
	16, 33	2	-	0	16 33	1 1			
	16, 51	2	-	0	16 51	1 1			
	Ukupno:	7		1	Ukupno:	6			

* $(f2/f1) \times 100$; ** $(f3/f1) \times 100$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.

4.2.3 Analiza onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51 prema uzrasnoj kategoriji

U cilju analize prisustva iRNK E6/E7 HR HPV u odnosu na uzrasnu kategoriju, žene sa dokazanim prisustvom su kategorisane prema uzrasnim kategorijama (≤ 30 , 31–44, ≥ 45 godina). Najmanje iRNK E6/E7 HR HPV 16 se detektuje kod pripadnica mlađe uzrasne kategorije, a najviše kod pacijentkinja uzrasne kategorije preko 44 godine starosti. Detekcija iRNK E6/E7 HR HPV 31 i 33 opada sa porastom godina života pacijentkinja, dok iRNK E6/E7 HR HPV 51 raste (Tabela 4.16).

Tabela 4.16. Analiza iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na uzrasne kategorije pacijentkinja.

iRNK E6/E7 HR HPV		Uzrasna kategorija (godina)						Ukupno		χ^2	p
		≤ 30		31–44		≥ 45					
		n	%	n	%	n	%	n	%		
iRNK E6/E7 HR HPV 16	–	55	80,9	42	67,7	24	57,1	121	70,3	7,331	0,026*
	+	13	19,1	20	32,3	18	42,9	51	29,7		
	Ukupno:	68	100	62	100	42	100	172	100		
iRNK E6/E7 HR HPV 31	–	52	76,5	52	83,9	35	83,3	139	80,8	1,373	0,503
	+	16	23,5	10	16,1	7	16,7	33	19,2		
	Ukupno:	68	100	62	100	42	100	172	100		
iRNK E6/E7 HR HPV 33	–	61	89,7	56	90,3	39	92,9	156	90,7	0,322	0,851
	+	7	10,3	6	9,7	3	7,1	16	9,3		
	Ukupno:	68	100	62	100	42	100	172	100		
iRNK E6/E7 HR HPV 51	–	65	95,6	57	91,9	35	83,3	157	91,3	4,951	0,084
	+	3	4,4	5	8,1	7	16,7	15	8,7		
	Ukupno:	68	100	62	100	42	100	172	100		

n – broj pacijentkinja. * $p < 0,05$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđena je statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza iRNK E6/E7 HR HPV 16 u odnosu na uzrasne kategorije ($\chi^2 = 7,331$; $p = 0,026$).

4.2.4 Evaluacija testa za određivanje onkogene aktivnosti HR HPV 16, 31, 33 i 51

Senzitivnost testa koji detektuje onkogeni aktivnosti ispitanih HR HPV genotipova (16, 31, 33 i 51) prati rast stepena citološke abnormalnosti u poređenju sa referentnom grupom (NILM): ASCUS (29,4%), LSIL (60%), HSIL (88,9%). Ukupna senzitivnost iRNK E6/E7 HR HPV testa u 2014 Bethesda System klasifikovanom nalazu citološke abnormalnosti je 57%, dok je negativna prediktivna vrednost u istom uzorku 58,9%.

Specifičnost ovog testa ista je za sve vrste citološkog nalaza (89,1%) u odnosu na referentnu grupu. Pozitivna prediktivna vrednost prati rast stepena citološki abnormalne lezije (88,3%) (Tabela 4.17).

Tabela 4.17. Kliničke karakteristike iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 testa u odnosu na referentnu grupu.

Citološki nalaz	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)	PPV (%)	NPV (%)
ASCUS	29,4	89,1	60,6	68,8
LSIL	60,0	89,1	70,0	84,1
HSIL	88,9	89,1	78,7	94,6
ASCUS + LSIL + HSIL	57,0	89,1	88,3	58,9

PPV – Pozitivna Prediktivna Vrednost; NPV – Negativna Prediktivna Vrednost; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.

4.2.4.1 Analiza ekspimiranja gena E6 i E7 kao pokazatelja onkogene aktivnosti HR HPV

Kada se posmatraju rezultati ekspimiranja gena E6 i E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51 analiziranjem dobijenih Ct vrednosti, prosečna Ct vrednost je najniža za iRNK E6/E7 HR HPV 51 (Ct = 28,8), a najviša za iRNK E6/E7 HR HPV 33 (Ct = 31,3) (Tabela 4.18).

Tabela 4.18. Prosečna Ct vrednost iRNK E6/E7 HR HPV prema HPV genotipu.

iRNK E6/E7 HR HPV	n	Ct vrednost		
		Srednja vrednost ± s.d.	Minimum	Maksimum
iRNK E6/E7 HR HPV 16	51	29,7 ± 5,4	16	39
iRNK E6/E7 HR HPV 31	33	30,1 ± 5,7	18	40
iRNK E6/E7 HR HPV 33	16	31,3 ± 4,5	25	37
iRNK E6/E7 HR HPV 51	15	28,8 ± 4,1	21	36

n – broj iRNK E6/E7 HR HPV genotipova; s.d. – standardna devijacija.

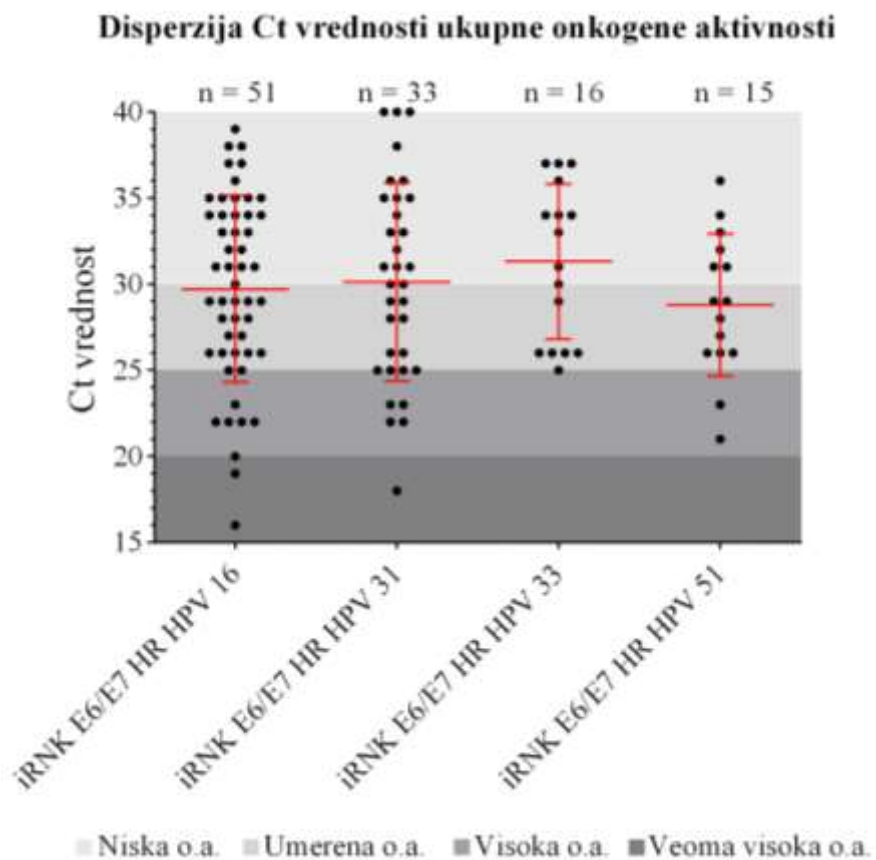
Ne postoji statistički značajna razlika u Ct vrednostima iRNK ispitanih genotipova (ANOVA; $F = 0,640$; $p = 0,591$).

Većina onkogene aktivnosti visokostepene lezije potiče od HR HPV 16, koja se detektuje u najširem opsegu Ct vrednosti (Ct = 16–39). Ovaj genotip iskazuje veoma visoku onkogenu aktivnost. Niska prosečna ekspresija iRNK E6/E7 HR HPV 31 se detektuje u niskostepenim lezijama (Ct = 31,8), dok je u drugim lezijama umerena (Ct = 28,5–29,6). U svim citološkim nalazima iRNK E6/E7 HR HPV 33 se detektuje na niskom nivou (Ct = 30,6–32), dok se iRNK E6/E7 HR HPV 51 detektuje na umerenom nivou (Ct = 26–29,3) (Tabela 4.19, Grafikon 4.4 i Grafikon 4.5, Prilog 3).

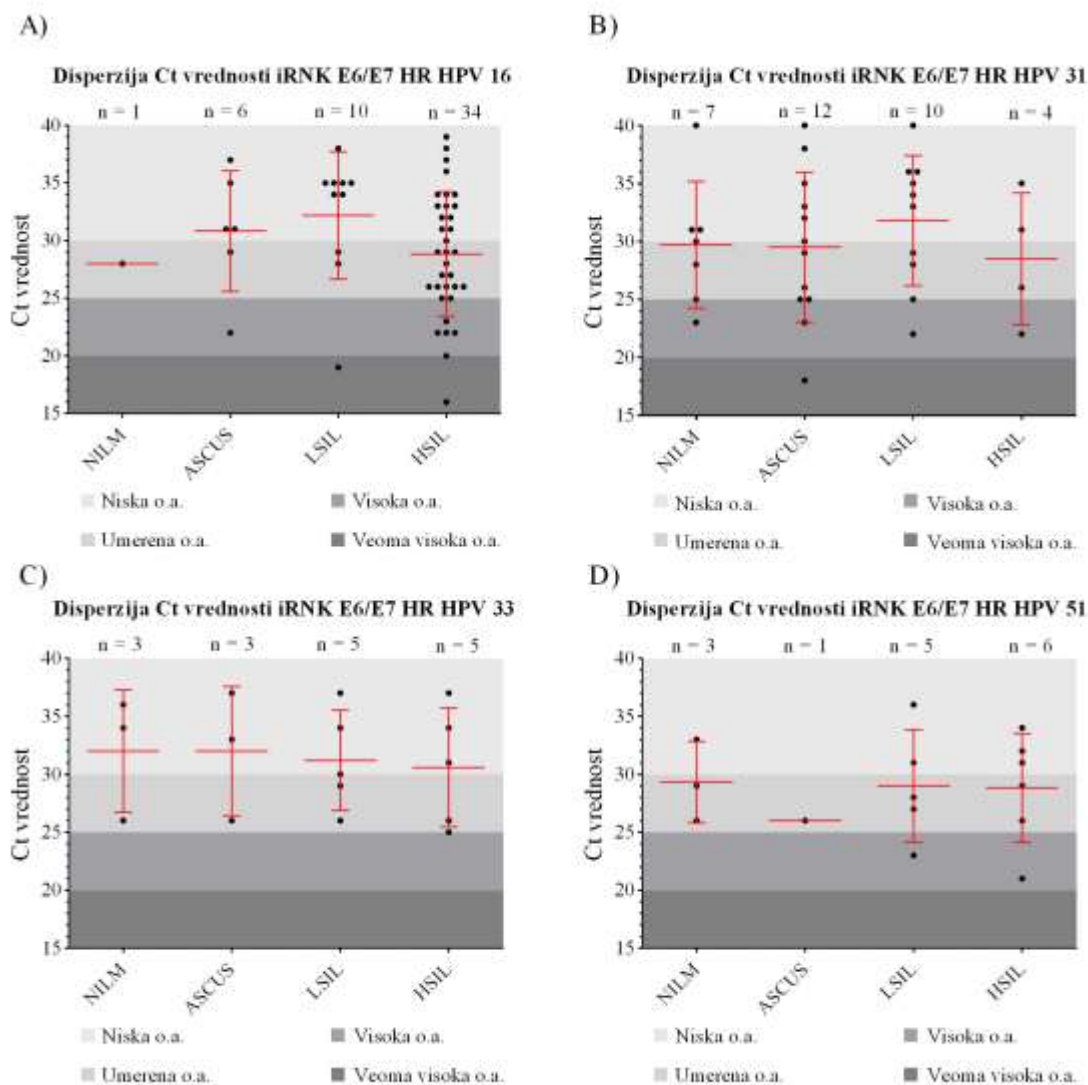
Tabela 4.19. Distribucija Ct vrednosti iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na citološki nalaz.

iRNK E6/E7 HR HPV	Citološki nalaz	n	Ct vrednost			ANOVA F	p
			Srednja vrednost ± s.d.	Minimum	Maksimum		
16	NILM	1	28,0	28	28	-	-
	ASCUS	6	30,8 ± 5,2	22	37		
	LSIL	10	32,2 ± 5,5	19	38		
	HSIL	34	28,8 ± 5,4	16	39		
	Ukupno:	51	29,7 ± 5,4	16	39		
31	NILM	7	29,6 ± 5,1	23	40	0,444	0,723
	ASCUS	12	29,5 ± 6,5	18	40		
	LSIL	10	31,8 ± 5,6	22	40		
	HSIL	4	28,5 ± 5,7	22	35		
	Ukupno:	33	30,1 ± 5,7	18	40		
33	NILM	3	32,0 ± 5,3	26	36	0,073	0,973
	ASCUS	3	32,0 ± 5,6	26	37		
	LSIL	5	31,2 ± 4,3	26	37		
	HSIL	5	30,6 ± 5,1	25	37		
	Ukupno:	16	31,3 ± 4,5	25	37		
51	NILM	3	29,3 ± 3,5	26	33	-	-
	ASCUS	1	26,0	26	26		
	LSIL	5	29,0 ± 4,8	23	36		
	HSIL	6	28,8 ± 4,7	21	34		
	Ukupno:	15	28,8 ± 4,1	21	36		

n – broj iRNK E6/E7 HR HPV genotipova; s.d. – standardna devijacija; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.



Grafikon 4.4. Disperzija Ct vrednosti iRNK E6/E7 HR HPV u odnosu na HR HPV (O.a. – onkogeni aktivnost).



Grafikon 4.5. Disperzija Ct vrednosti iRNK E6/E7 HR HPV 16 (A), iRNK E6/E7 HR HPV 31 (B), iRNK E6/E7 HR HPV 33 (C) i iRNK E6/E7 HR HPV 51 (D) u odnosu na citološki nalaz. NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena; o.a. – onkogeno aktivnost.

4.2.4.2 Analiza eksprimiranja gena E6 i E7 HR HPV u odnosu na uzrasne kategorije

Pacijentkinje mlađe od 30 godina imaju niže vrednosti Ct za genotip 16 u odnosu na one koje pripadaju srednjoj uzrasnoj kategoriji. Prosečna Ct vrednost za iRNK E6/E7 HR HPV 31 i 33 je najviša kod pacijentkinja sa ≥ 45 godina (Ct = 31,4, odnosno, Ct = 32), dok kod iRNK E6/E7 HR HPV 51 pacijentkinje ove uzrasne kategorije imaju najnižu Ct vrednost (28,1) (Tabela 4.20).

Tabela 4.20. Analiza Ct vrednosti iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na uzrasne kategorije.

iRNK E6/E7 HR HPV	Uzrasna kategorija (godina)	n	Ct vrednost			ANOVA F	p	r	p
			Srednja vrednost \pm s.d.	Min.	Maks.				
iRNK E6/E7 HR HPV 16	≤ 30	13	25,8 \pm 3,9	19	33	6,973	0,002**	0,158	0,268
	31–44	20	32,2 \pm 5,9	16	39				
	≥ 45	18	29,8 \pm 4,6	22	38				
	Ukupno:	51	29,7 \pm 5,4	16	39				
iRNK E6/E7 HR HPV 31	≤ 30	16	30,7 \pm 5,4	22	40	0,903	0,416	-0,020	0,909
	31–44	10	28,1 \pm 6,3	18	38				
	≥ 45	7	31,4 \pm 5,5	25	40				
	Ukupno:	33	30,1 \pm 5,7	18	40				
iRNK E6/E7 HR HPV 33	≤ 30	7	30,9 \pm 4,7	26	37	0,067	0,936	0,108	0,691
	31–44	6	31,5 \pm 4,7	25	37				
	≥ 45	3	32,0 \pm 5,3	26	36				
	Ukupno:	16	31,3 \pm 4,5	25	37				
iRNK E6/E7 HR HPV 51	≤ 30	3	32,7 \pm 3,5	29	36	1,915	0,190	-0,296	0,284
	31–44	5	27,4 \pm 3,5	23	31				
	≥ 45	7	28,1 \pm 4,2	21	34				
	Ukupno:	15	28,8 \pm 4,1	21	36				

n – broj iRNK E6/E7 HR HPV genotipova; s.d. – standardna devijacija; Min. – minimalna Ct vrednost; Maks. – maksimalna Ct vrednost; ** $p < 0,01$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Statistički značajna razlika između Ct vrednosti je utvrđena za onkogenu aktivnost HR HPV 16 između mlađe i srednje uzrasne kategorije (*Bonferroni post hoc* test; $p = 0,001$). Ispitana je korelacija (*Pearson correlation*) između uzrasnih kategorija pacijentkinja i onkogene aktivnosti ispitanih genotipova, pri čemu nije uočena statistička značajnost (iRNK E6/E7 HR HPV 16: $r = 0,158$; $p = 0,268$), (iRNK E6/E7 HR HPV 31: $r = -0,020$; $p = 0,909$), (iRNK E6/E7 HR HPV 33: $r = 0,108$; $p = 0,691$), (iRNK E6/E7 HR HPV 51: $r = -0,296$; $p = 0,284$).

4.3 Komparacija testova za detekciju visokorizičnih genotipova HPV i njihove onkogene aktivnosti u cilju procene progresije cervikalne intraepitelne lezije

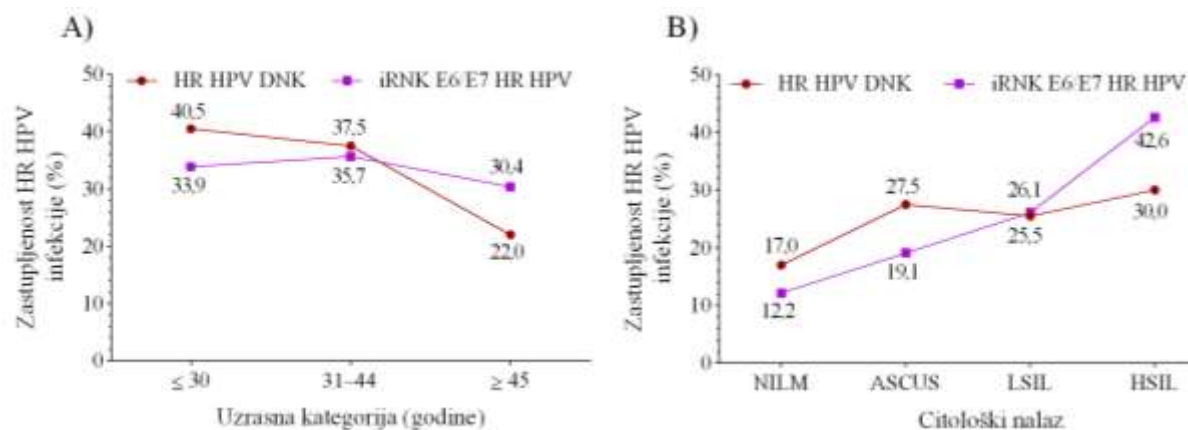
Zastupljenost ispitanih HR HPV genotipova je viša u odnosu na zastupljenost onkogene aktivnosti istih genotipova kod mlađih žena (≤ 30 godina), slična kod žena srednje životne dobi (31–44 godina) i niža kod žena od 45 godina i starijih. Zastupljenost onkogene aktivnosti ispitanih genotipova raste sa stepenom težine cervikalne intraepitelne lezije. Isti parametar je u poređenju sa zastupljenošću ispitanih HR HPV genotipova niži kod žena normalnog i nedefinisanog citološkog nalaza, približno isti kod niskostepene lezije i znatno viši kod visokostepene lezije (Tabela 4.21, Grafikon 4.6).

Tabela 4.21. Zastupljenost ispitanih HR HPV genotipova i njihove onkogene aktivnosti prema starosnoj strukturi i citološkom nalazu.

HR HPV infekcija		HR HPV DNK		iRNK E6/E7 HR HPV		χ^2	<i>p</i>
		n	%	n	%		
Uzrasna kategorija (godina)	≤ 30	81	40,5	39	33,9	2,971	0,226
	31–44	75	37,5	41	35,7		
	≥ 45	44	22,0	35	30,4		
Citološki nalaz	NILM	34	17,0	14	12,2	6,573	0,087
	ASCUS	55	27,5	22	19,1		
	LSIL	51	25,5	30	26,1		
	HSIL	60	30,0	49	42,6		

n – broj ispitivanih HR HPV genotipova/broj iRNK E6/E7 HR HPV genotipova; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u broju dokazanih HR HPV infekcija HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testom u odnosu na uzrasne kategorije ($\chi^2 = 2,971$; $p = 0,226$). Takođe, ne postoji statistički značajna razlika u detekciji pozitivnih HR HPV i njihove onkogene aktivnosti u odnosu na citološki nalaz ($\chi^2 = 6,573$; $p = 0,087$).



Grafikon 4.6. Zastupljenost genotipova i ostvarene onkogene aktivnosti dokazanih HR HPV prema uzrasnoj kategoriji (A) i citološkom nalazu (B). NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.

Senzitivnost i NPV oba testa rastu sa porastom stepena težine cervikalne intraepitelne lezije, pri čemu su kod HR HPV DNK testa iskazane na višem nivou. Specifičnost iRNK HR HPV testa (89,1%) je viša u odnosu na HR HPV DNK test (75,6%). Pozitina prediktivna vrednost HR HPV DNK testa je približno ista za sve vrste citološkog nalaza (61,3% – 64,6%), dok kod iRNK HR HPV testa raste sa porastom stepena cervikalne intraepitelne lezije (60,6% – 78,7%) (Tabela 4.22).

Tabela 4.22. Kliničke karakteristike HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testova.

Test	Citološki nalaz	Senzitivnost	I.P.	Specifičnost	I.P.	PPV	I.P.	NPV	I.P.
		(%)	95%	(%)	95%	(%)	95%	(%)	95%
HR HPV DNK	ASCUS	67,6*** $\chi^2=19,899; p=0,000$	55,2–78,5	75,6	66,9–83,0	61,3 $\chi^2=0,569; p=0,451$	49,4–72,4	80,4* $\chi^2=4,442; p=0,035$	71,8–87,3
	LSIL	88,0** $\chi^2=10,187; p=0,001$	75,7–95,5	75,6	66,9–83,0	60,3	48,1–71,6	93,8* $\chi^2=4,879; p=0,027$	86,9–97,7
	HSIL	98,2 $\chi^2=3,819; p=0,051$	90,1–100,0	75,6	66,9–83,0	64,6	53,3–74,9	98,9 $\chi^2=27,354; p=0,098$	94,0–100,0
iRNK E6/E7 HR HPV	ASCUS	29,4	19,0–41,7	89,1** $\chi^2=7,401; p=0,006$	82,0–94,0	60,6	42,1–77,1	68,8	60,9–76,0
	LSIL	60,0	45,2–73,6	89,1** $\chi^2=7,401; p=0,006$	82,0–94,0	69,8*** $\chi^2=19,760; p=0,000$	53,9–82,8	84,1	76,6–90,0
	HSIL	88,9	77,4–95,8	89,1** $\chi^2=7,401; p=0,006$	82,0–94,0	78,7*** $\chi^2=62,604; p=0,000$	66,3–88,1	94,6	88,7–98,0

Referentna grupa je NILM. I.P. (95%) – Interval Poverenja sa nivoom pouzdanosti od 95%; PPV – Pozitivna Prediktivna Vrednost; NPV – Negativna Prediktivna Vrednost. NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku u karakteristikama testova.

Statistički značajno veća specifičnost (89,1%) i PPV (69,8% – 78,7%) je iskazana za iRNK E6/E7 HR HPV test, dok se statistički značajno veća senzitivnost beleži pri upotrebi HR HPV DNK testa (67,6% – 88%).

Kod žena sa dijagnostikovanim visokostepenim lezijama, dijagnostički testovi su pokazali međusobnu podudarnost za detektovane HR HPV ($p = 0,063$). Detektovana je podudarnost oba dijagnostička pristupa za HR HPV 31, 33 i 51 u svim citološkim grupama ($p > 0,05$) (Tabela 4.23).

Tabela 4.23. Podudarnost HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV dijagnostičkih testova u citološkim nalazima.

iRNK E6/E7 HR HPV	Citološki nalaz											
	NILM			ASCUS			LSIL			HSIL		
	-	+	Maknemar	-	+	Maknemar	-	+	Maknemar	-	+	Maknemar
iRNK E6/E7 HR HPV 16	HR HPV DNK 16			HR HPV DNK 16			HR HPV DNK 16			HR HPV DNK 16		
-	16	12	0,000***	18	22	0,000***	20	14	0,000***	13	6	0,031*
+	0	1		0	6		0	10		0	34	
Ukupno:	16	13		18	28		20	24		13	40	
iRNK E6/E7 HR HPV 31	HR HPV DNK 31			HR HPV DNK 31			HR HPV DNK 31			HR HPV DNK 31		
-	18	4	$p = 0,125$	30	4	$p = 0,125$	30	4	$p = 0,125$	47	2	$p = 0,500$
+	0	7		0	12		0	10		0	4	
Ukupno:	18	11		30	16		30	14		47	6	
iRNK E6/E7 HR HPV 33	HR HPV DNK 33			HR HPV DNK 33			HR HPV DNK 33			HR HPV DNK 33		
-	23	3	$p = 0,250$	40	3	$p = 0,250$	39	0	$p = 1,000$	46	2	$p = 0,500$
+	0	3		0	3		0	5		0	5	
Ukupno:	23	6		40	6		39	5		46	7	
iRNK E6/E7 HR HPV 51	HR HPV DNK 51			HR HPV DNK 51			HR HPV DNK 51			HR HPV DNK 51		
-	25	1	$p = 1,000$	41	4	$p = 0,125$	36	3	$p = 0,125$	46	1	$p = 1,000$
+	0	3		0	1		0	5		0	6	
Ukupno:	25	4		41	5		36	8		46	7	
iRNK E6/E7 HR HPV	HR HPV DNK			HR HPV DNK			HR HPV DNK			HR HPV DNK		
-	90	16	0,000***	22	26	0,000***	6	14	0,000***	1	5	$p = 0,063$
+	0	13		0	20		0	30		0	48	
Ukupno:	90	29		22	46		6	44		1	53	

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđena je statistički značajna razlika u detekciji HR HPV 16, za sve vrste citološkog nalaza, NILM, ASCUS i LSIL ($p < 0,001$), odnosno HSIL ($p = 0,031$). U detekciji svih ispitanih genotipova HPV utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) u svim citološkim nalazima, izuzev HSIL.

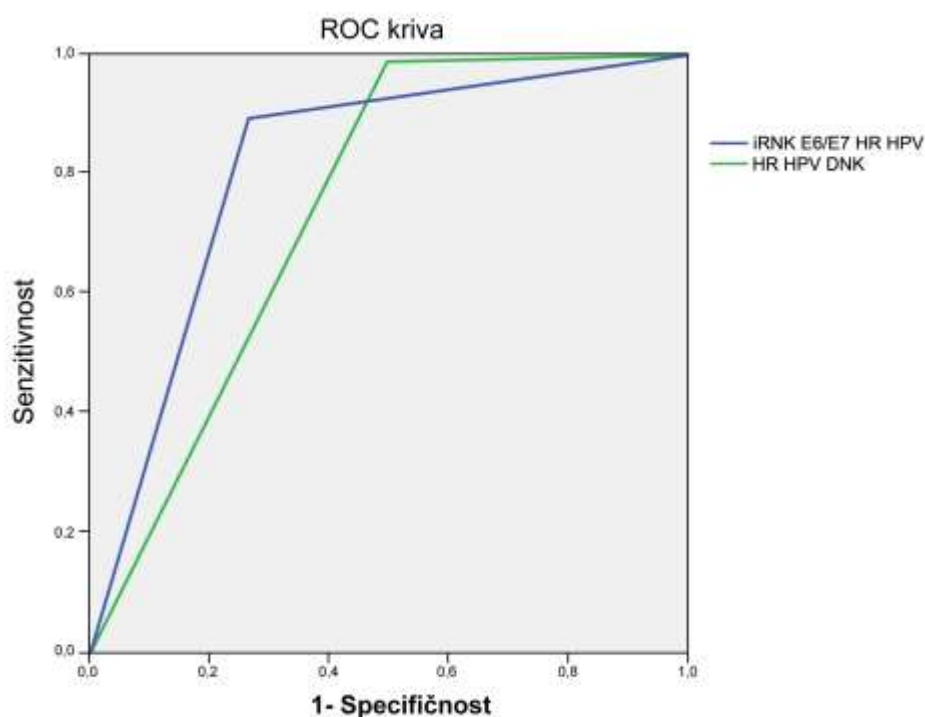
4.3.1 Grafički prikaz parova senzitivnosti i specifičnosti

Površina određena ROC krivom (engl. *Area under the ROC Curve*, AUC) iRNK E6/E7 HR HPV je 0,812 (I.P. (95%): 0,752–0,871), dok je površina ispod ROC krive koja se formira parametrima HR HPV DNK testa 0,740 (I.P. (95%): 0,680–0,799) (Tabela 4.24, Grafikon 4.7).

Tabela 4.24. Prikaz AUC za HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testove u visokostepenim lezijama.

HSIL	AUC ± SE [#]	<i>p</i>	I.P. (95%)
iRNK E6/E7 HR HPV	0,812 ± 0,031	0,000***	0,752–0,871
HR HPV DNK	0,740 ± 0,030	0,000***	0,680–0,799

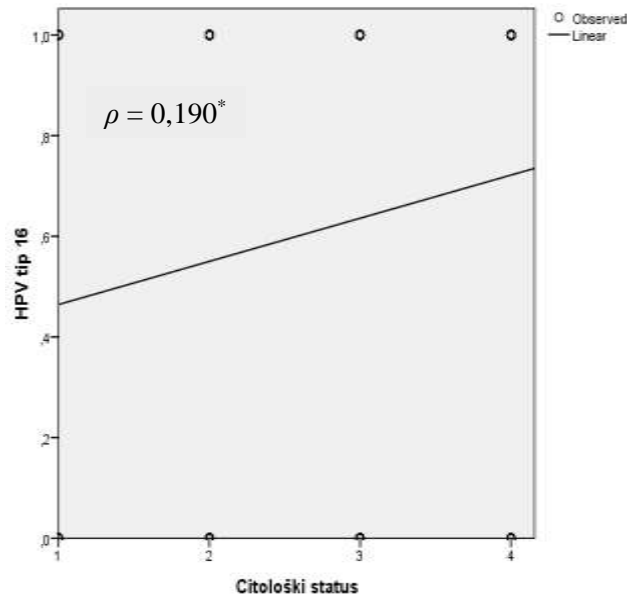
AUC – površina određena ROC krivom (engl. *Area under the ROC Curve*); standardna greška (engl. *Standard Error*, SE); *** $p < 0,001$; I.P. (95%) – Interval Poverenja sa nivoom pouzdanosti od 95%.



Grafikon 4.7. ROC kriva HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testova u visokostepenim lezijama.

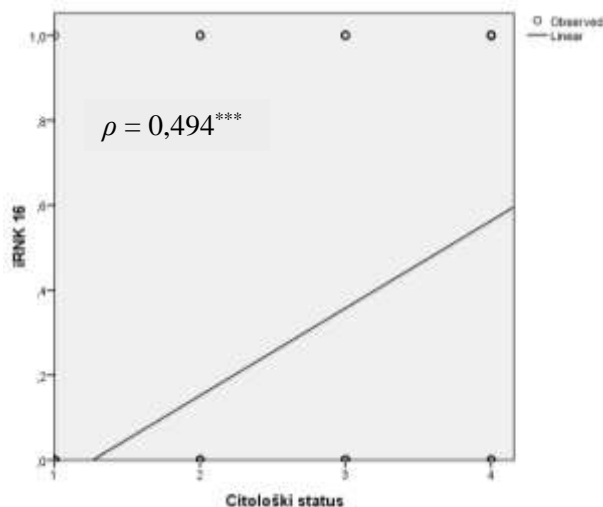
4.3.2 Korelacija između faktora progresije cervikalne intraepitelne lezije i citološkog statusa

U odnosu na vrednosti koeficijenta Spirmanove korelacije može se uvesti sledeća kategorizacija: slaba ($\rho = 0,10-0,29$), srednja ($\rho = 0,30-0,49$) i jaka ($\rho = 0,50-1,0$) (248). Postoji slaba statistički značajna pozitivna korelacija između prisustva HR HPV 16 i stepena težine cervikalne lezije pacijentkinja (Spirmanova korelacija; $\rho = 0,190$; $p = 0,013$) (Grafikon 4.8).



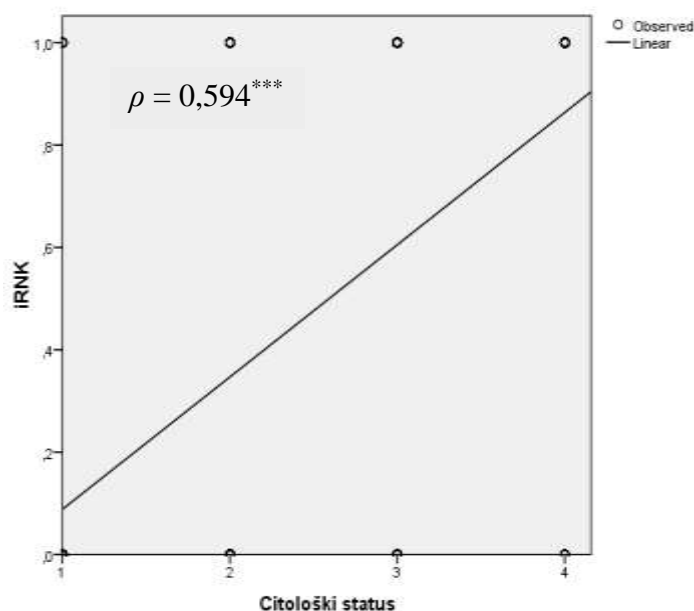
Grafikon 4.8. Korelacija između prisustva HR HPV DNK 16 i citološkog statusa. NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti) (1), ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (2), LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena (3), HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (4); * $p < 0,05$.

Postoji statistički značajna pozitivna korelacija srednje jačine između prisustva onkogene aktivnosti HPV 16 i citološkog statusa (Spirmanova korelacija; $\rho = 0,494$; $p < 0,001$) (Grafikon 4.9).



Grafikon 4.9. Korelacija između prisustva onkogene aktivnosti HPV 16 i citološkog statusa. NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti) (1), ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (2), LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena (3), HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (4); *** $p < 0,001$.

Onkogeni aktivnosti ispitanih HPV genotipova je povezana jakom statistički značajnom pozitivnom korelacijom sa stepenom težine cervikalne intraepitelne lezije (Spirmanova korelacija; $\rho = 0,594$; $p < 0,001$) (Grafikon 4.10).



Grafikon 4.10. Korelacija između prisustva onkogene aktivnosti HPV genotipova i citološkog statusa. NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti) (1), ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (2), LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena (3), HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (4); *** $p < 0,001$.

4.3.3 Prediktivni modeli za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela

Pacijentkinje sa pozitivnim HR HPV 16 imaju 3,8 puta veću verovatnoću pojave (engl. *Odds Ratio*, OR) da njihov citološki nalaz pripada kategoriji HSIL u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja nalaza bez celularne atipije (OR = 3,79; I.P. (95%): 1,44–9,92), odnosno, 2,6 puta veću verovatnoću da njihov citološki nalaz pripada kategoriji HSIL u odnosu na verovatnoću detekcije LSIL nalaza (OR = 2,56, I.P. (95%): 1,08–6,06) (Tabela 4.25).

Tabela 4.25. Analiza uticaja faktora HR HPV 16 za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.

HSIL			OR	I.P. (95%)	<i>p</i>
NILM	HR HPV DNK 16	+	3,788	1,445–9,919	0,007**
		–	1,00 ^a		
ASCUS	HR HPV DNK 16	+	1,976	0,836–4,673	0,121
		–	1,00 ^a		
LSIL	HR HPV DNK 16	+	2,564	1,082–6,061	0,032*
		–	1,00 ^a		

^a - referentna vrednost; OR – *Odds Ratio*, količnik verovatnoće; I.P. (95%) - *Interval Poverenja* sa nivoom pouzdanosti od 95%; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NILM – negativan za intreaepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Za uticaj HR HPV 16 na verovatnoću pojave HSIL citološkog nalaza, utvrđena je statistički značajna prediktivna vrednost kod NILM ($p = 0,007$) i LSIL ($p = 0,032$) citoloških grupa.

Ukoliko pacijentkinje imaju potvrđene pokazatelje onkogene aktivnosti imaće skoro 7 puta veću verovatnoću za dijagnostikovanje HSIL u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja NILM citološkog nalaza (OR = 6,67; I.P. (95%): 23,26–181,93). Pacijentkinje sa pozitivnim iRNK E6/E7 HR HPV imaju 19 puta veću verovatnoću za dijagnostikovanje visokostepene lezije u odnosu na verovatnoću detektovanja nedeterminisane lezije (OR = 19,23; I.P. (95%): 7,09–52,63), odnosno 5 puta veću verovatnoću za detektovanje HSIL u odnosu na LSIL (OR = 5,32; I.P. (95%): 1,30–14,71) (Tabela 4.26).

Tabela 4.26. Analiza uticaja pokazatelja onkogene aktivnosti ispitivanih HPV genotipova za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.

HSIL			OR	I.P. (95%)	<i>p</i>
NILM	iRNK E6/E7 HR HPV	+	6,667	23,255–181,927	0,000***
		–	1,00 ^a		
ASCUS	iRNK E6/E7 HR HPV	+	19,231	7,092–52,631	0,000***
		–	1,00 ^a		
LSIL	iRNK E6/E7 HR HPV	+	5,319	1,294–14,706	0,001**
		–	1,00 ^a		

OR – engl. *Odds Ratio*, količnik verovatnoće; ^a - referentna vrednost; I.P. (95%) – Interval Poverenja sa nivoom pouzdanosti od 95%; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Za uticaj pokazatelja onkogene aktivnosti svih ispitanih HR HPV genotipova (iRNK E6/E7 HR HPV) na pojavu visokostepenih lezija cervikalnog epitela, utvrđena je statistički značajna predikcija iskazana kod svih citoloških grupa, NILM ($p < 0,001$), ASCUS ($p < 0,001$) i LSIL ($p = 0,001$).

Kod pacijentkinje sa pozitivnim nalazom pokazatelja onkogene aktivnosti HPV genotipa 16 verovatnoća za dijagnostikovanje visokostepene lezije je 50 puta veća u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja normalnog citološkog nalaza (OR = 50,00; I.P. (95%): 6,29–333,33). Pacijentkinje sa pozitivnim nalazom iRNK E6/E7 HR HPV 16 imaju 12 puta veću verovatnoću za dijagnostikovanje visokostepene lezije u odnosu na detekciju ASCUS citološkog nalaza (OR = 11,90; I.P. (95%): 4,27–33,33), dok je kod pacijentkinja sa istim nalazom iRNK testa, verovatnoća detekcije HSIL nalaza 6 puta veća od verovatnoće detekcije LSIL nalaza (OR = 6,10; I.P. (95%): 2,47–14,92) (Tabela 4.27).

Tabela 4.27. Analiza uticaja pokazatelja onkogene aktivnosti HPV 16 za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.

HSIL			OR	I.P. (95%)	<i>p</i>
NILM	iRNK E6/E7 HR HPV 16	+	50,000	6,289–333,333	0,000***
		–	1,00 ^a		
ASCUS	iRNK E6/E7 HR HPV 16	+	11,905	4,273–33,333	0,000***
		–	1,00 ^a		
LSIL	iRNK E6/E7 HR HPV 16	+	6,097	2,469–14,925	0,000***
		–	1,00 ^a		

OR – engl. *Odds Ratio*, količnik verovatnoće; ^a - referentna vrednost; I.P. (95%) – Interval Poverenja sa nivoom pouzdanosti od 95%; *** $p < 0,001$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Prilikom pomenute statističke analize uticaja pojedinačne onkogene aktivnosti HR HPV 16, bez obzira na detekciju iRNK drugog genotipa visokorizičnog HPV u istom uzorku, kao pokazatelja za nastanak visokostepene lezije cervikalnog epitela, utvrđena je statistički značajna prediktivna vrednost kod svih vrsta citološkog nalaza, NILM ($p < 0,001$), ASCUS ($p < 0,001$) i LSIL ($p < 0,001$).

Verovatnoća za detekciju visokostepenih lezija u odnosu na normalan nalaz kod HR HPV pozitivnih pacijentkinja je 6,3 puta veća ako one imaju 45 godina i više u poređenju sa ženama do 30 godina starosti (OR = 6,29; I.P. (95%): 2,14–18,52). Slična predikcija za detekciju HSIL-a iskazana je i u odnosu na ASCUS citološki nalaz (6,5 puta) (OR = 6,54; I.P. (95%): 2,15–20,00). Pacijentkinje koje pripadaju najstarijoj uzrasnoj kategoriji imaju 3,4 puta veću verovatnoću za detekciju visokostepene lezije u odnosu na LSIL citološki nalaz od onih iz najmlađe uzrasne kategorije (OR = 3,37; I.P. (95%): 1,19–9,52) (Tabela 4.28).

Tabela 4.28. Analiza uticaja uzrasne kategorije za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.

HSIL			OR	I.P. (95%)	<i>p</i>
NILM	Uzrasna kategorija (godina)	≤ 30	1,00 ^a		
		31–44	1,470	0,582–3,717	0,415
		≥ 45	6,289	2,141–18,518	0,001 ^{**}
ASCUS	Uzrasna kategorija (godina)	≤ 30	1,00 ^a		
		31–44	1,169	0,463–2,958	0,740
		≥ 45	6,536	2,150–20,000	0,001 ^{**}
LSIL	Uzrasna kategorija (godina)	≤ 30	1,00 ^a		
		31–44	2,571	0,330–4,167	0,369
		≥ 45	3,367	1,190–9,524	0,022 [*]

OR – engl. *Odds Ratio*, količnik verovatnoće; ^a - referentna vrednost; I.P. (95%) – Interval Poverenja sa nivoom pouzdanosti od 95%; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Za uzrasnu kategoriju utvrđena je statistički značajna prediktivna vrednost u detekciji perzistentne infekcije uzrokovane onkogenim genotipovima HPV kod svih citoloških grupa, NILM ($p = 0,001$), ASCUS ($p = 0,001$) i LSIL ($p = 0,022$).

Analizom međusobnog uticaja ispitanih relevantnih faktora za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja normalnog citološkog nalaza kao najjači statistički značajan prediktor utvrđena je onkogeni aktivnost HR HPV 16. Ukoliko je detektovana, verovatnoća za dijagnostiku HSIL citološkog nalaza u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja normalnog citološkog nalaza se povećava 19 puta (OR = 19,10; I.P. (95%): 1,54–236,98; $p = 0,022$). Statistički značajan, ali gotovo tri puta slabiji prediktor za detekciju HSIL-a u odnosu na NILM čini pripadnost pacijentkinja najstarijoj uzrasnoj kategoriji (OR = 6,65; I.P. (95%): 1,66–26,60; $p = 0,007$), dok pacijentkinje iz uzrasne kategorije 31–44 godine imaju nešto manju statistički značajnu verovatnoću (OR = 5,38; I.P. (95%): 1,36–21,30; $p = 0,016$) za detekciju iste lezije.

Analizom međusobnog uticaja relevantnih faktora za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela u odnosu na verovatnoću detekcije nedeterminisanog citološkog nalaza kao najjači statistički značajan prediktor utvrđena je uzrasna kategorija. HR HPV DNK pozitivne pacijentkinje koje pripadaju najstarijoj uzrasnoj kategoriji (≥ 45 godina) imaju 8,7 puta veću verovatnoću za dijagnostikovanje HSIL u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja

ASCUS citološkog nalaza u poređenju sa pacijentkinjama koje pripadaju mlađoj uzrasnoj kategoriji (OR = 8,74; I.P. (95%): 2,15–35,57; $p = 0,002$). Nešto manju verovatnoću za detekciju HSIL promene (6,4 puta) u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja ASCUS promene imaju pacijentkinje sa dokazanom onkogenom aktivnošću HPV 16 (OR = 6,38; I.P. (95%): 1,22–33,54; $p = 0,029$).

Analizom međusobnog uticaja relevantnih faktora za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela u odnosu na verovatnoću detekcije niskostepenih lezija kao najjači statistički značajan prediktor utvrđena je onkogeno aktivnost HPV 16 (OR = 5,10; I.P. (95%): 1,09–23,83; $p = 0,038$), dok nešto slabiju statistički značajnu prediktivnost ispoljava pripadnost pacijentkinja određenoj uzrasnoj kategoriji. Pacijentkinje koje pripadaju najstarijoj uzrasnoj kategoriji (≥ 45 godina) imaju 3,7 puta veću verovatnoću za detekciju HSIL promene u odnosu na detekciju LSIL promene u poređenju sa pripadnicama mlađe uzrasne kategorije (≤ 30 godina) (OR = 3,72; I.P. (95%): 1,16–11,92; $p = 0,027$) (Tabela 4.29).

Tabela 4.29. Analiza međusobnog uticaja relevantnih faktora za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.

HSIL ($\chi^2 = 79,046$; $p = 0,000^{***}$)			OR	I.P. (95%)	<i>p</i>
NILM	HR HPV DNK 16	+	1,627	0,351–7,531	0,534
		–	1,00 ^a		
	iRNK E6/E7 HR HPV	+	3,989	0,843–18,882	0,081
		–	1,00 ^a		
	iRNK E6/E7 HR HPV 16	+	19,099	1,539–236,983	0,022*
		–	1,00 ^a		
	Uzrasna kategorija (godine)	≤ 30	1,00 ^a		
31–44		5,382	1,360–21,296	0,016*	
≥ 45		6,654	1,665–26,598	0,007**	
ASCUS	HR HPV DNK 16	+	0,957	0,230–3,988	0,952
		–	1,00 ^a		
	iRNK E6/E7 HR HPV	+	3,910	0,906–16,871	0,068
		–	1,00 ^a		
	iRNK E6/E7 HR HPV 16	+	6,384	1,215–33,545	0,029*
		–	1,00 ^a		
	Uzrasna kategorija (godine)	≤ 30	1,00 ^a		
31–44		1,401	0,469–4,182	0,546	
≥ 45		8,738	2,147–35,568	0,002**	
LSIL	HR HPV DNK 16	+	1,009	0,243–4,192	0,990
		–	1,00 ^a		
	iRNK E6/E7 HR HPV	+	1,636	0,377–7,102	0,511
		–	1,00 ^a		
	iRNK E6/E7 HR HPV 16	+	5,099	1,091–23,832	0,038*
		–	1,00 ^a		
	Uzrasna kategorija (godine)	≤ 30	1,00 ^a		
31–44		1,362	0,464–3,992	0,574	
≥ 45		3,719	1,161–11,920	0,027*	

OR – engl. *Odds Ratio*, količnik verovatnoće; ^a – referentna vrednost; I.P. (95%) – Interval Poverenja sa nivoom pouzdanosti od 95%; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NILM – negativan za intreaepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđeno je da je finalni prediktivni model u celosti statistički značajan, $\chi^2 = 79,046$; $p < 0,001$.

4.4 Demografske karakteristike i faktori rizika HR HPV infekcije

Analiza parametara posmatranih demografskih faktora i faktora rizika 101 ispitanice sa laboratorijski potvrđenom HR HPV infekcijom ukazuje na određene razlike u odnosu na stepen težine cervikalne intraepitelne lezije (Tabela 4.30).

Tabela 4.30. Demografske karakteristike HR HPV DNK pozitivnih žena prema citološkom nalazu.

Demografska karakteristika		HR HPV pozitivni uzorci								χ^2	<i>p</i>
		NILM		ASCUS		LSIL		HSIL			
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Stepen obrazovanja	Srednja ili manje	8	32,0	21	53,8	15	53,6	6	66,7	4,604	0,203
	Viša/Visoka	17	68,0	18	46,2	13	46,4	3	33,3		
Bračni status	Neudata	21	84,0	17	43,6	18	64,3	8	88,9	13,7	0,003**
	Udata	4	16,0	22	56,4	10	35,7	1	11,1		

n – broj ispitanica; ** $p < 0,01$; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Utvrđene razlike uglavnom nisu ispoljile statističku značajnost. Distribucija ispitanica prema stepenu obrazovanja, kao jednom od analiziranih demografskih faktora, je pokazala da su žene koje imaju visokostepene lezije češće srednjeg ili nižeg nivoa stručne spreme (66,7%). Sličnost unutar ispitivanih grupa je uočena i u analizi bračnog statusa ispitanica. Naime, veća učestalost neudatih žena je registrovana kod ispitanica sa HSIL nalazom (88,9%). Ova razlika u zastupljenosti je statistički značajna ($p = 0,003$).

Zastupljenost pušača u svim grupama je bila na sličnom nivou i iznosila je od 44% – 52%. Najkraći pušački staž, do 5 godina, bio je najviše zastupljen u grupi ispitanica sa normalnim citološkim nalazom (46%), dok se najduži period pušenja zapaža u grupi ispitanica sa HSIL (75%) kod kojih se registruje i veći broj konzumiranih cigareta na dnevnom nivou (25%). Nije utvrđena statistički značajna razlika među ispitanim grupama.

Kasnije stupanje žena u prvi seksualni odnos, nakon 18 godina, je bilo češće zastupljeno u grupi ispitanica sa normalnim citološkim nalazom (64%), dok se upotreba kondoma i oralnih kontraceptivnih pilula najmanje registruje u grupi ispitanica sa HSIL nalazom (11%). Nekorišćenje bilo koje kontraceptivne metode bila je najmanje zastupljena

u grupi ispitanica sa normalnim citološkim nalazom (12%), dok je u grupama ispitanica sa detektovanim intraepitelnim lezijama različitog stepena registruje u nešto višem procentu (22% – 36%). Zastupljenost većeg broja (3 ili više) seksualnih partnera u poslednje dve godine (7% – 16%) i dijagnostikovano prisustvo polno prenosivih bolesti (7% – 20%) nije zabeleženo ni u jednoj od ispitanih grupa i kretalo se u približno istom nivou.

Namerni prekid trudnoće se češće registruje među ispitanicama sa visokostepenim lezijama (33%) u odnosu na ispitanice sa drugim citološkim nalazom (14% – 28%), dok se veći broj (dva i više) ginekoloških pregleda na godišnjem nivou zapaža kod žena sa normalnim citološkim nalazom (68%). Prethodna HPV analiza, putem HPV DNK testiranja je bila češće rađena kod ispitanica sa HSIL nalazom (78%). Bitno je napomenuti da se kod žena sa citološki nedefinisanim i lezijama umerenog stepena analiza vršila u manjem procentu (33%, odnosno, 29%). Dinamika ranijih testiranja žena u ispitanim citološkim grupama je bila bez statističke značajnosti ($p = 0,057$) (Tabela 4.31).

Tabela 4.31. Analiza faktora rizika za nastanak cervikalnih intraepitelnih lezija.

Faktor rizika		HR HPV DNK								χ^2	p
		Citološki nalaz									
		NILM		ASCUS		LSIL		HSIL			
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Pušač	Da	13	52,0	20	51,3	14	50,0	4	44,4	0,167	0,983
	Ne	12	48,0	19	48,7	14	50,0	5	55,6		
Pušački staž (godina)	< 5	6	46,2	7	35,0	4	28,6	0	0,0	-	-
	5–10	5	38,5	9	45,0	5	35,7	1	25,0		
	> 10	2	15,4	4	20,0	5	35,7	3	75,0		
Broj cigareta (dnevno)	< 5	5	38,5	6	30,0	2	14,3	2	50,0	-	-
	5–10	7	53,8	10	50,0	9	64,3	1	25,0		
	10–20	1	7,7	4	20,0	3	21,4	1	25,0		
Prvi seksualni kontakt - uzrast (godina)	< 18	9	36,0	20	51,3	13	46,4	4	44,4	1,449	0,694
	≥ 18	16	64,0	19	48,7	15	53,6	5	55,6		
Kontracepcija	Kondom	17	68,0	17	43,6	14	50,0	6	66,7	-	-
	Pilule	1	4,0	0	0,0	1	3,6	0	0,0		
	Oba	4	16,0	8	20,5	5	17,9	1	11,1		
	Ne	3	12,0	14	35,9	8	28,6	2	22,2		
Br. seksualnih partnera u posljednje dve godine	0	1	4,0	1	2,6	1	3,6	2	22,2	-	-
	1	11	44,0	27	69,2	16	57,1	4	44,4		
	2	9	36,0	8	20,5	9	32,1	2	22,2		
	≥ 3	4	16,0	3	7,7	2	7,1	1	11,1		
Polno prenosive bolesti	Da	5	20,0	4	10,3	2	7,4	1	11,1	-	-
	Ne	20	80,0	35	89,7	25	92,6	8	88,9		
Namerni prekid trudnoće	Ne	21	84,0	28	71,8	24	85,7	6	66,7	3,063	0,382
	Da	4	16,0	11	28,2	4	14,3	3	33,3		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	2	8,0	4	10,3	4	14,3	0	0,0	-	-
	1	6	24,0	12	30,8	9	32,1	5	55,6		
	≥ 2	17	68,0	23	59,0	15	53,6	4	44,4		
Prethodna info o HPV	Da	20	80,0	32	82,1	24	85,7	8	88,9	-	-
	Ne	5	20,0	7	17,9	4	14,3	1	11,1		
Prisustvo kondiloma	Da	2	8,0	3	7,7	4	14,3	1	11,1	-	
	Ne	23	92,0	36	92,3	24	85,7	8	88,9		
Ranije rađena analiza HPV	Da	9	36,0	13	33,3	8	28,6	7	77,8	7,535	0,057
	Ne	16	64,0	26	66,7	20	71,4	2	22,2		

NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.

Kada se posmatraju faktori rizika prema genotipu HR HPV može se uočiti da je statistički značajno više ispitanica sa pozitivnim HR HPV 51 koje konzumiraju cigarete ($p = 0,013$) (Prilog 4).

Prilikom analize demografskih faktora prema ukupnoj onkogenoj aktivnosti HR HPV nije se uočila statistički značajna razlika između ispitivanih parametara (Tabela 4.32). Nasuprot tome, sagledavanje istih faktora rizika prema eksprimiranju pojedinačnog HR HPV ukazalo je da je broj ispitanica sa pozitivnim HR HPV 31 nalazom kod kojih nije rađena prethodna HPV analiza bio statistički značajno ($p = 0,029$) veći u odnosu na broj žena kod kojih je HPV analiza rađena (Prilog 5).

Tabela 4.32. Analiza faktora rizika u odnosu na onkogenu aktivnost HR HPV.

Faktor rizika		iRNK E6/E7 HR HPV				χ^2	p
		-		+			
		n	%	n	%		
Pušač	Da	177	49,9	27	55,1	0,473	0,491
	Ne	178	50,1	22	44,9		
Pušački staž (godine)	< 5	61	34,5	7	25,9	1,170	0,557
	5–10	67	37,9	13	48,1		
	> 10	49	27,7	7	25,9		
Broj cigareta na dnevnom nivou	<5	52	29,4	8	29,6	0,988	0,610
	5–10	92	52,0	16	59,3		
	10–20	33	18,6	3	11,1		
Kontracepcija	Kondom	189	53,2	27	55,1	1,450	0,695
	OC	6	1,7	2	4,1		
	Oba	64	18,0	8	16,3		
	Ne	96	27,0	12	24,5		
Broj seksualnih partnera u posljednje dve godine	0	17	4,8	3	6,1	1,570	0,667
	1	201	56,6	31	63,3		
	2	102	28,7	10	20,4		
	≥ 3	35	9,9	5	10,2		
Polno prenosive bolesti	Da	43	12,2	5	10,4	0,129	0,719
	Ne	309	87,8	43	89,6		
Namerni prekid trudnoće	Ne	277	78,0	39	79,6	0,062	0,804
	Da	78	22,0	10	20,4		
Ista maligna bolest kod članova bliže ili dalje porodice	Da	84	25,2	12	26,1	0,247	0,884
	Ne	221	66,2	31	67,4		
	Ne znam	29	8,7	3	6,52		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	35	9,9	5	10,2	3,460	0,177
	1	107	30,1	21	42,9		
	≥ 2	213	60,0	23	46,9		
Prethodna info o HPV	Da	298	83,9	38	77,6	1,260	0,262
	Ne	57	16,1	11	22,4		
Prisustvo kondiloma	Da	37	10,4	3	6,1	0,892	0,345
	Ne	318	89,6	46	93,9		
Ranije rađena analiza HPV	Da	134	37,7	14	28,6	1,560	0,212
	Ne	221	62,3	35	71,4		

OC – oralna kontraceptivna sredstva (engl. *Oral Contraceptive*).

5. DISKUSIJA

Procenjuje se da se skoro svaki četvrti slučaj maligne bolesti u svetu može dovesti u vezu sa infektivnim agensom (17,87) od kojih je približno svaki treći uzrokovan HPV (88). Karcinom grlića materice uzrokovan perzistentnom infekcijom visokorizičnim genotipovima HPV je jedan od najzastupljenijih malignih tumora u žena (170,192). Uloga HPV u etiologiji humanih karcinoma različitih lokaliteta proučavana je već pola veka i danas se raspolaže značajnim dokazima koji potvrđuju povezanost malignih oboljenja sa ovim humanim kancerogenom (92). Procenjuje se da genitalni trakt može da se inficira sa oko 40 tipova *Alpha* roda HPV. S obzirom da je u prekanceroznim lezijama i tkivu karcinoma cerviksa potvrđeno prisustvo 12 genotipova (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) oni su proglašeni visokorizičnim HPV (167). Većina studija je zasnovana na dokazivanju navedenih visokorizičnih genotipova u odgovarajućem uzorku, odnosno genotipizaciji (HPV DNK test). Daljim razvojem molekularnih metoda, stiče se uvid u genetski materijal virusa, ćelijske mehanizme koji su neophodni za razvoj maligne alteracije i ulogu onkoproteina kao ključnih molekula u nastajanju genomske nestabilnosti čime se potencira uloga HPV kao jednih od najvažnijih kancerogena u humanoju populaciji. Detekcija iRNK E6 i E7 HR HPV (iRNK test) može da posluži kao molekularno dijagnostički pokazatelj njihove perzistencije i onkogene aktivnosti, što je jedan od fokusa aktuelnih istraživanja. Ipak, u domenu identifikovanja iRNK E6 i E7 HR HPV kao biomarkera prediktivne vrednosti, studije nisu mnogobrojne (221,249,250).

Imajući u vidu prethodno navedeno, u okviru ovog istraživanja, a u cilju određivanja ekspresije gena E6 i E7 kao pokazatelja onkogene aktivnosti HR HPV genotipizacijom su prvenstveno utvrđeni najčešći visokorizični genotipovi na području Južnobačkog okruga. Analizirana je distribucija najčešćih HPV genotipova prema citologiji i uzrasnim kategorijama. Dalje, ispitana je njihova onkogene aktivnost primenom iRNK testa, odnosno detekcijom transkripata onkogene E6 i E7 HR HPV. Određene su kliničke karakteristike iRNK testa, procenom i poređenjem sa DNK testom. Utvrđen je značaj relevantnih faktora rizika za progresiju cervikalne intraepitelne lezije i procenjen je stepen jačine njihovog uticaja. Dobijeni rezultati pomenutih analiza upotrebljeni su u cilju konstruisanja prediktivnog modela za identifikovanje potencijalnog biomarkera kao najjačeg prediktora za nastanak skvamoznih intraepitelnih lezija cerviksa. Dodatno je izvršena procena pojedinih

bihevioralnih obrazaca za koje je poznato da utiču na sticanje i perzistiranje virusne infekcije.

Uzorci cervikalnih briseva predstavljaju veoma važan izvor za ispitivanje uloge i onkogenog potencijala HPV infekcije u etiopatogenezi cervikalnog karcinoma primenom molekularno bioloških metoda. Pri tome, kao što je već rečeno, *ThinPrep Pap* omogućava da se iz jedinstvenog uzorka pored citoloških izvrše i molekularno biološka testiranja na prisustvo nukleinskih kiselina HPV (237). Poznato je da uzorkovanje na ovaj način povećava senzitivnost i specifičnost metoda detekcije prekanceroznih lezija i karcinoma cerviksa (59). Iz tog razloga u okviru ovog istraživanja analizirani su cervikalni brisevi uzorkovani *ThinPrep Pap*, čime je zadovoljen kriterijum kvaliteta neophodan za dalje ispitivanje onkogenog potencijala HPV infekcije.

Poput pojedinih zemalja regiona, Republika Srbija ne podleže obaveznom prijavljivanju HPV infekcije što rezultira nedovoljnim obimom podataka o incidenciji i prevalenciji ovog virusa. Dostupni podaci se odnose na nekoliko studija (251–254).

Na prisustvo jednog od dvanaest ispitanih visokorizičnih genotipova HPV ukupno je testirano 365 uzoraka pacijentkinja Južnobačkog okruga, AP Vojvodina, Republika Srbija. Od ukupnog broja testiranih, 246 (67,4%) uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo najmanje jednog od 12 ispitanih visokorizičnih genotipova. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prethodno sprovedenih studija kako u našem regionu, tako i u pojedinim državama Evrope gde je registrovana visoka prevalencija HPV, i do 87% (225). U višegodišnjim istraživanjima Kovačević i saradnika HPV infekcija uzrokovana visokorizičnim genotipovima dokazana je u opsegu 50% – 79% ispitanih žena populacije Južnobačkog okruga (252–254). Rezultati studija koje su za predmet istraživanja imale zastupljenost HPV infekcije, a sprovedene su u zemljama regiona, kao što je Republika Hrvatska, pokazale su sličnu zastupljenost (59%) registrovanu tokom istraživanja sprovedenog na 2136 žena (255). Isti procenat HPV infekcije je zabeležen i u studiji sprovedenoj deset godina kasnije, ali se ovog puta odnosio pored visokorizičnih i na niskorizične genotipove HPV (256). Sličan procenat HPV infekcije je zabeležen na teritoriji Bugarske (61%) (257), dok se nešto niža zastupljenost registrovala na teritoriji Italije (53%) (258). Mijović i saradnici su dokazali HPV infekciju kod 44% ispitanih žena Crne Gore (259), dok su *Ursu* i saradnici kod 514 žena Rumunije dokazali prisustvo HPV infekcije u

37% (260). Približna vrednost (36%) HPV prevalencije je utvrđena i od strane Andonovske (261) u uzorku od 7.411 žena iz Severne Makedonije, dok je neznatno manji procenat detektovane HPV infekcije (33%) zapažen kod ispitanica na teritoriji Grčke (262). Studija koja se bavila utvrđivanjem i poređenjem distribucije HPV u populaciji žena Turske, potvrdila je identičnu zastupljenost HPV infekcije (33%) (258). U istraživanju *Filipe* i saradnika HPV infekcija je registrovana kod 15% žena Albanije (263).

Uočene razlike u zastupljenosti HPV infekcije među ispitanim ženama u okviru ove studije i rezultata pojedinih autora mogu se objasniti time što detektovana zastupljenost prvenstveno zavisi od veličine i konstrukcije uzorka, uzrasta ispitanih žena, kao i izbora, odnosno mogućnosti odabira metoda koje se koriste za njenu detekciju (167).

Rezultati istraživanja su ukazali da je među ispitanim ženama Južnobačkog okruga AP Vojvodine, prisustvo HPV 16 (38%) bilo češće potvrđeno u odnosu na ostale ispitane genotipove. Sledeći po učestalosti bili su takođe predstavnici *Alpha-9* vrste, HPV 31 (17%) i HPV 33 (9%). Predstavnik *Alpha-5* vrste, HPV 51, bio je zastupljen u istom procentu kao i HPV 33, odnosno u 9% ispitanih uzoraka. U skladu sa definisanim ciljevima istraživanja, podjednaka zastupljenost HPV 33 i 51 determinisala je da se istraživanje nastavi sa četiri najčešće zastupljena HPV genotipa. Utvrđena je značajna razlika u prisustvu HR HPV 16, 31, 33 i 51 genotipova kod pacijentkinja Južnobačkog okruga. Preostali ispitani genotipovi (HR HPV 52, 56, 45, 18, 59, 58, 39 i 35) su bili prisutni u znatno manjem procentu sa ukupnom zastupljenošću nižom od 30%.

Rezultati genotipizacije dobijeni tokom realizacije projekata „Značaj HPV DNK analize u prevenciji nastanka karcinoma grlića materice-2016” (264) i „Značaj HPV DNK analize u prevenciji nastanka karcinoma grlića materice-2017” (265), podržanih od strane Gradske uprave za zdravstvo Grada Novog Sada, ukazuju da su HPV 16, 31, 33 i 51 četiri najčešće zastupljena visokorizična genotipa kod žena Južnobačkog okruga. Takođe, prema podacima nekoliko nacionalnih i regionalnih studija čije se istraživanje odnosilo na žene sa normalnom i abnormalnom citologijom, HPV 16 je najčešće zastupljen visokorizični genotip u našoj zemlji (251–254).

Prosečna vrednost prevalencije ovog genotipa posmatrana globalno iznosi 32,1% (225), pri čemu su rezultati unutar našeg regiona nehomogeni. U Bosni i Hercegovini, objavljeni rezultati studije ukazuju da su najčešće zastupljeni genotipovi bili HPV 16 (33%), HPV 31 (14%), HPV 51 (10%), HPV18 (8%) (266). Dominacija genotipa HPV 16 (20%) registrovana je u Republici Hrvatskoj, dok je prevalencija preostalih najčešće zastupljenih genotipova bila: HPV 31 (8%), HPV 52 (5%), HPV 18 (4%), HPV 33 (3%), HPV 45 (2%) (256). Na teritoriji Slovenije u najvećem broju slučajeva detektovan je HPV 16 (27%), potom HPV 31 (20%), HPV 51 (14%) i HPV 52 (14%) (267). Frekvencija HPV genotipova u Rumuniji je registrovana sledećim redom: HPV 16 (10%), zatim HPV 53 (5%), HPV 51 (5%), HPV 52 (4%) HPV 18 (3%) i HPV 31 (3%) (260), dok se u Bugarskoj dominacija HPV 16 registrovala u 4 puta većem procentu (46%), HPV 33 je bio sledeći genotip registrovan po učestalosti (14%), potom HPV 31 (10%) i HPV 58 (7%) (257). Rezultati genotipizacije analiziranih cervikalnih briseva ukazuju da su najzastupljeniji visokorizični HPV kod žena našeg okruga prisutni i u infekcijama koje se registruju u državama našeg okruženja. Odgovarajuće preventivne, dijagnostičke i terapijske mere infekcije posredovane ovim virusom, direktno su zavisne od lokalne distribucije ovih genotipova, odnosno, njihovog onkogenog potencijala što naglašava značaj laboratorijske dijagnostike u nadzoru nad ovom infekcijom.

Literaturni podaci iz različitih regiona sveta pokazuju da su HPV 16 i 18 najčešće izolovani genotipovi HPV i da su odgovorni za nastanak preko 70% cervikalnih karcinoma. Studije objavljene u Evropi, Aziji, Severnoj i Južnoj Americi, kao i Africi potvrđuju konzistentnost u nalazu zastupljenosti ovih genotipova, dok je relativni značaj preostalih onkogenih HPV zavisan od geografskog područja (225).

Iako se zna da je HPV 16 najčešće izolovan genotip HPV, njegova zastupljenost i distribucija variraju u zavisnosti od uzrasta ispitanica, genetske varijabilnosti i bihevioralnih obrazaca koji su determinisani određenom geografskom i etničkom pripadnošću (268). Pored dominantnog prisustva HPV 16 čest nalaz predstavljaju i HPV 31, 33, 35, 45, 52 i 58 koji se smatraju odgovornim za nastanak 20% slučajeva prekanceroznih lezija i karcinoma grlića materice (229). U Evropi su najčešće izolovani genotipovi HPV 16, 18, 33 i 45, dok rezultati studija iz Severne Amerike, Azije i Afrike pokazuju da se iz karcinoma cerviksa najčešće identifikuju HPV 16, potom HPV 18, 45 i 52 (225).

Može se zaključiti da iako su HPV posredovane infekcije širom sveta uzrokovane uglavnom istim visokorizičnim genotipovima HPV, postoji varijabilnost HPV genotipske prevalencije u odnosu na geografske teritorije (225).

Daljom analizom u okviru ovog istraživanja, a u cilju ispitivanja onkogene aktivnosti, sagledani su najzastupljeniji visokorizični genotipovi HPV u odnosu na citološki status, što ih je predodredilo za istraživanje njihovog učešća u razvoju cervikalnih intraepitelnih lezija i onkogenog potencijala. Procenjuje se da analiza distribucije visokorizičnih genotipova HPV u odnosu na citološki nalaz može poslužiti kao pouzdan pokazatelj njihovog relativnog potencijala u nastanku i razvoju invazivnog karcinoma grlića materice (269).

Među ženama kod kojih je potvrđeno prisustvo visokorizičnog HPV genotipa, najmanji broj uzoraka bio je bez registrovane celularne atipije (17%). Približno ista međusobna zastupljenost se zapaža u grupama ASCUS i LSIL citoloških nalaza (27%, odnosno 26%), dok se veći broj pozitivnih HR HPV nalaza registruje u citološkoj leziji koja je klasifikovana kao visokostepena lezija cervikalnog epitela (31%).

Poznato je da prevalencija HPV infekcije raste sa stepenom težine lezije i da se ovaj virus smatra uzročnikom praktično svih cervikalnih karcinoma (99,7%) (102).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da postoji značajna razlika u zastupljenosti HPV 16, odnosno da je prisustvo HPV 16 češće prisutno (76%) u visokostepenoj u odnosu na niže nivoe lezija cervikalnog epitela. Studije koje su se bavile zastupljenošću HPV 16 genotipa u odnosu na citološki nalaz, potvrđuju ove podatke. Na području Evrope prisustvo HPV 16 u normalnom cervikalnom epitelu dokazano je u 4,8% slučajeva (270), dok je isti genotip potvrđen u 65,5% cervikalnog karcinoma (271). U našoj državi procenat potvrđenog HPV 16 genotipa u tkivu karcinoma cerviksa je veći i iznosi 79% (272). U okviru studije sprovedene među ženama Južnobačkog okruga, HPV 16 je bio potvrđen kod 78% ispitanica sa HSIL citološkim nalazom (254), dok je u istraživanju u okviru doktorske disertacije dr Dijane Tasić (273) HPV 16 detektovan u 89,5% visokostepenih lezija cervikalnog epitela u našoj sredini. Slične vrednosti zastupljenosti ovog genotipa registruju se u nekim državama Evrope, u Španiji (69%) (274) i Holandiji (71%) (229). U Sloveniji se prisustvo HPV 16 u lezijama registruje sa sličnim učešćem (63%) (275). Niža vrednost učešća ovog genotipa u visokostepenim lezijama (49%) od navedenih, utvrđena je u Bosni i Hercegovini (266), dok

je na teritoriji Republike Hrvatske dokazan u 58% istovrsnih lezija (276). Podaci iz Makedonije slični su rezultatima navedenih studija i ovaj genotip je detektovan u 53% HSIL nalaza (277), što je približno utvrđenoj učestalosti (50%) na teritoriji Grčke (278). Studije koje su imale za predmet istraživanja prisustvo HPV 16 u HSIL citološkom nalazu austrijskih i mađarskih žena, utvrdile su približno istu međusobnu zastupljenost od 56% (279), odnosno, 57% (229). Niže vrednosti učešća ovog genotipa su objavljene nakon analize HSIL nalaza u Italiji (36%) (280).

Može se pretpostaviti da razlika između rezultata detekcije HPV 16 genotipa, u visokostepenim lezijama potiče od razlika u vremenskom okviru aktuelnog istraživanja, konstrukciji uzorka, kao i odabira i mogućnosti primene visokosenzitivnih laboratorijsko-dijagnostičkih metoda. U odnosu na druge visokorizične tipove, ovaj genotip pokazuje veću virulentnost, odnosno mogućnost razvoja perzistentne infekcije (281). Autori različitih studija navode da se verovatnoća od progresije promena u visokostepene lezije i karcinom javlja u 40% – 50% slučajeva inficiranog epitela cerviksa u periodu od 10 godina nakon infekcije (282,283).

Drugi po učestalosti (17,2%) visokorizični genotip kod HPV pozitivnih žena Južnobačkog okruga bio je HPV 31. Rezultati analize u kojoj je učestvovalo više od million žena ukazali su da je HPV 31, nakon HPV 16, najčešće zastupljen genotip u Evropi (270). Podaci iz našeg istraživanja potvrđuju ove nalaze pri čemu je HPV 31 dokazan kod svake treće HPV pozitivne žene (31,7%) našeg okruga (255). Sabol i saradnici (259) navode da ovaj genotip zauzima drugo mesto po učestalosti kod žena u Republici Hrvatskoj, što je u saglasnosti sa njegovom pozicijom u rezultatima istraživanja koja su sprovedena na teritoriji Bosne i Hercegovine (266), Severne Makedonije (261), Slovenije (267), Italije (280), Kipra (284) i Finske (285). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da sa progresijom intraepitelne lezije učešće HPV 31 genotipa opada pri čemu je razlika u zastupljenosti HPV 31 pozitivnih pacijentkinja značajno manja. Niži procenat prisustva ovog genotipa beleži se u visokostepenim lezijama (11,3%) što je suprotno od HPV 16 koji je najčešće dijagnostikovani genotip u svim grupama citološkog nalaza. Iako se navodi kao visokorizični genotip HPV koji povećava rizik od nastanka visokostepenih lezija, opadajući trend u zastupljenosti ovog genotipa prema stepenu težine citološke lezije se zapaža i u istraživanjima drugih zemalja (256,269,276,277,280). U skladu sa navedenim, rezultati

meta-analize koja je za cilj istraživanja imala utvrđivanje značaja genotipizacije HPV u stratifikaciji rizika od cervikalnog karcinoma ukazuju na istu pojavu, odnosno, približno četiri puta manju zastupljenost ovog genotipa u analiziranim tkivima karcinoma u odnosu na prekancerozne lezije, što ukazuje na niži onkogeni potencijal u odnosu na druge ispitane genotipove (269). Iako se prema klasifikaciji Međunarodne agencije za istraživanje raka, HPV visokog rizika svrstavaju u prvu grupu humanih kancerogena (167), njihov relativni onkogeni potencijal se međusobno razlikuje u velikoj meri što naglašava neophodnost procene onkogenog potencijala svakog pojedinačnog genotipa u dijagnostičkom pristupu HPV infekcija (286).

Prema rezultatima genotipizacije, sledeći po učestalosti, a podjednako zastupljeni kod žena Južnobačkog okruga bili su visokorizični genotipovi HPV 33 i 51. Posmatrano globalno, HPV 33 se nalazi na četvrtom mestu po učestalosti i glavni je faktor rizika u nastanku 4,2% svih registrovanih cervikalnih karcinoma (229). Poput HPV 31, pad zastupljenosti HPV 33 genotipa u HSIL citološkom nalazu u odnosu na nalaz normalne citologije je registrovan i ovim istraživanjem. Prema podacima iz literature, a suprotno od HPV 16, može se zaključiti da je detekcija HPV 33 u tkivima karcinoma za 40% manje zastupljena u odnosu na visokostepene lezije. Posmatrano u kontekstu uzročnika cervikalnog karcinoma, HPV 51 se ne ubraja u prvih deset najučestalijih HPV genotipova registrovanih širom sveta. Za razliku od prethodno analiziranih genotipova, kako u našem okrugu tako i globalno posmatrano, trend zastupljenosti HPV 51 u odnosu na stepen težine citološke promene je neujednačen. Naime, nakon početno niže zastupljenosti višestruko povećanje detekcije HPV 51 se registruje u niskostepenim lezijama da bi se nakon toga njegova učestalost smanjila i konačno bila odsutna u detekciji cervikalnog karcinoma (229). Međutim, detekcija ovog genotipa u okviru ovog istraživanja kao i prethodno sprovedenih studija u našem okrugu (252) i pojedinim zemljama Evrope (287–293) stavlja ga među prva četiri najzastupljenija genotipa detektovana u prekanceroznim lezijama cerviksa. Uočena pojava sugerise da bi detaljna karakterizacija mehanizma onkogenog delovanja HPV 51 na nivou ćelija cervikalnog epitela mogla predstavljati predmet budućih istraživanja.

Ovo je naročito značajno ako se uzime u obzir da aktuelne komercijalno dostupne vakcine ne obezbeđuju direktnu zaštitu od infekcije posredovane ovim genotipom (287,294), odnosno, potrebna je pažljiva procena u pogledu izbora preventivnih vakcina i mogućnosti uticaja njihovih potencijalnih obrazaca unakrsne zaštite (291).

Značaj primene vakcina u prevenciji karcinoma cerviksa je potvrđen (196). Međutim, procene koje se odnose na mogućnost postignute zaštite primenom profilaktičkih vakcina ne podrazumevaju obezbeđenost imuniteta za sve onkogene HPV genotipove. Za sada se smatra da su nevakcinalni genotipovi (HPV 35, 39, 51, 56, 59 i 68) uzročnici u manje od 10% cervikalnog karcinoma (295), ali se pri tome naglašava da je ovaj procenat veći u pojedinim etničkim grupama zbog čega se čak predlaže zamena učešća vakcinalnih genotipova koji se na njih odnose (196). Naime, ukoliko posmatramo rezultate u okviru ovog istraživanja, podatak o relativno visokom učešću nevakcinalnih genotipova, naročito HPV 51 (8,8%) je značajan u kontekstu procene efikasnosti profilaktičkih HPV vakcina kod žena našeg regiona. U tom smislu, visokorizični genotipovi HPV 16 i 18 su detektovani u 41,9% infekcija, a kada se posmatra zastupljenost vakcinalnih genotipova HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 u ispitanom uzorku, ona iznosi 79,2% infekcija. Na osnovu dobijenih rezultata koji se odnose na zastupljenost onkogenih HPV kod žena Južnobačkog okruga, AP Vojvodine može se pretpostaviti da bi se primenom profilaktičkih dvovalentnih i kvadrivalentnih HPV vakcina infekcija uzrokovana HPV 16 i 18 redukovala za 42%, dok bi primenom devetovalentne vakcine pokrivenost zastupljenih genotipova HPV iznosila približno 80%. Nadalje, mogućnost primene ovih vakcina postavlja pitanja koja bi se mogla odnositi na buduća istraživanja i koja bi mogla dati odgovor na pitanje da li će nastati eventualna promena u zastupljenosti HPV genotipova koji izazivaju karcinom cerviksa nakon masovne vakcinacije, odnosno, da li će doći do pojave njihovih genotipskih mutacija i/ili rekombinacija (36).

Udružene HPV infekcije se navode kao jedan od glavnih faktora rizika koji dovodi do ćelijske transformacije inficiranih ćelija i progresije intraepitelne lezije u karcinom. Međutim, učešće i istovremena detekcija različitih genotipova u udruženim infekcijama varira. Njihova uloga u cervikalnoj bolesti se može objasniti kao mogućnost nasumičnog učešća određenih genotipova ili kao posledica njihovih sinergističkih reakcija (296). Iako se

može uočiti istovremeno prisustvo velikog broja različitih genotipova u niskoj frekvenciji, njihova zastupljenost u istoj leziji pokazuje tendenciju istovremenog pojavljivanja (297).

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju, pokazuju da je u 84% analiziranih uzoraka dokazana infekcija izazvana pojedinačnim genotipom, dok je u 16% slučajeva ispitanih žena Južnobačkog okruga prisutna udružena infekcija. Rezultati, slični ovom istraživanju dobijeni su u Republici Hrvatskoj gde je genotipizacija HPV ukazala na 10% udruženih infekcija, pri čemu je HPV 16 bio zastupljen u više od polovine slučajeva (256). Približno ista zastupljenost koinfekcija uočena je u Rumuniji (14%) (260). Više od jednog detektovanog HPV genotipa imala je svaka peta HPV pozitivna žena Italije (20%) (280), dok je nešto viša zastupljenost koinfekcija uočena u Bugarskoj (24%) (257). U Bosni i Hercegovini je zabeležena učestalost udruženih infekcija od 27% (266). Suprotno, studije sprovedene u populaciji mladih žena (19–26 godina) našeg okruga ukazuju da se udružena infekcija može detektovati kod svake druge ispitanice ovog životnog doba (298) što je podržano činjenicom da se najveća transmisivnost HPV beleži nakon početka seksualne aktivnosti (167). U prilog ovoj činjenici govore rezultati istraživanja koji se odnose na sve uzrasne kategorije naših državljanki pri čemu je registrovana niža zastupljenost udruženih infekcija (36,2%) (252). Nešto veća zastupljenost ovih infekcija se registrovala tokom istraživanja u Severnoj Makedoniji, gde je zauzela učešće u 40% HPV pozitivnih žena (299). Učešće koinfekcija srazmerno je ukupnoj, odnosno, niskoj HPV prevalenciji ispitanih žena tako da je u Sloveniji iznosilo svega 3,6% (267).

Ukoliko se posmatra zastupljenost udruženih infekcija u odnosu na pojedini HPV genotip može se uočiti da je HPV 16 najčešće zastupljen genotip u koinfekcijama žena Južnobačkog okruga. Njegovo učešće u kombinaciji sa HPV 31 pojavljuje se u polovini registrovanih udruženih infekcija, dok se udružen sa HPV 51 registruje sa dva puta manjim učešćem. Različiti obrasci kombinacije dominantnih genotipova se zapažaju u različitim regionima sveta, što dovodi do porasta evaluacije nad ovim infekcijama poslednjih godina (297). Zapaža se da je tendencija istovremenog pojavljivanja određenih genotipova u ovom istraživanju saglasna sa rezultatima drugih studija. Utvrđeno je da se istovremena detekcija HPV 16, 31 i 35 javlja sa većom frekvencijom u abnormalnim citološkim nalazima (300). Najveća zastupljenost pojedinačnog, a samim tim i udruženog pojavljivanja HPV 16 genotipa se zapaža i u studiji *Hajia i Sohrabi* (297), ali ovoga puta u kombinaciji sa HPV 31

i 51, dok se u studiji *Bruno* i saradnici (301) navodi da samo pojava specifičnih kombinacija, kao što su HPV 16 i 31 i HPV 16 i 18 može imati klinički značajan učinak za nastanak visokostepenih lezija.

Ukoliko se zastupljenost koinfekcija posmatra u odnosu na citološki nalaz, nije utvrđena značajna razlika u odnosu na prisustvo pojedinačne i udružene infekcije žena Južnobačkog okruga. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja iz našeg okruženja (266,276,280). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se učestalost koinfekcija češće detektuje u citološkim lezijama u odnosu na normalan citološki nalaz, čime se potvrđuje potencijal udruženih infekcija kao mogućeg faktora rizika u perzistenciji i progresiji cervikalne bolesti (297). S druge strane, rezultati istraživanja sprovedenog na uzorku od 909 žena u Italiji, ukazuju da stepen učešća udruženih infekcija opada sa porastom stepena težine citološkog nalaza, tako da se njihov najveći procenat beleži u niskostepenim lezijama cerviksa (60%). Upravo ovim rezultatom se naglašava tranzitorna uloga udruženih infekcija u patogenezi lezija cerviksa (301).

Detekcija i uloga istovremenog prisustva više različitih HPV genotipova, uprkos njihovoj observaciji, još uvek nije sasvim razjašnjena. Iako se u pojedinim studijama potencijalna uloga udruženih infekcija u nastanku karcinoma uzimala u obzir (302), studije praćenja HPV inficiranih žena sugerišu da njihovo prisustvo ne utiče na tok infekcije (296). *Chaturvedi* i saradnici (303) istražujući HPV koinfekcije, su došli do zaključka da sklonost ka njihovom nastanku ne zavisi od kombinacije pojedinih HPV tipova, što implicira da se razlog za njihovu pojavu u tom slučaju može objasniti uobičajenim faktorima rizika. Smatra se da je njihova pojava nasumičnog karaktera i da svaki od detektovanih genotipova ima nezavisan mehanizam dejstva u etiopatogenezi cervikalne bolesti (304). S tim u vezi, *Bruno* i saradnici (301) navode da se prisustvo udruženih HPV infekcija dovodi u vezu samo sa ranim fazama razvoja intraepitelnih lezija, dok se naglašava odsustvo njihovog značaja u razvoju karcinoma. Iz ovoga proističe pretpostavka da su pre različite ćelije inficirane različitim HPV genotipovima, nego što je moguća njihova intracelularna koegzistencija (301). Navedeni podatak predstavlja osnov za buduća istraživanja nezavisnih mehanizama dejstva svojstvenih pojedinačnim genotipovima HPV.

Zastupljenost HPV infekcija između različitih uzrasnih grupa je neujednačena. Među ženama Južnobačkog okruga najveća zastupljenost se beleži kod žena mlađih od 30 godina (39,5%), nešto niža kod pripadnica srednje životne dobi (36,1%), a najniža kod žena starijih od 45 godina (24,4%). Širom sveta se zapažaju dva obrasca kretanja HPV uzrokovane infekcije. Karakteristična je pojava bimodalne krive koja pokazuje primarni vrh prevalencije među ženama do 30 godina, koga prati plato prevalencije tokom srednjih godina života da bi potom došlo do ponovnog blagog skoka kod žena nakon 45 godine. Međutim, drugi autori navode postojanje obrasca kretanja u kome se primećuje inicijalni vrh kod žena do 25 godina starosti, zatim postepeni pad u starijem uzrastu, što se beleži u Evropi (170). Ovi rezultati su očekivani s obzirom na činjenicu da je seksualna aktivnost, odnosno, rizik od nastanka HPV infekcije najveći u mlađem životnom dobu (167). Može se zaključiti da je dobnog specifična inficiranost žena našeg okruga u skladu sa podacima koji se odnose na region Evrope, kao i da su neophodna dalja istraživanja sa većim obuhvatom žena čime bi se omogućilo preciznije sagledavanje prevalencije HPV infekcije.

Ukoliko se analizira prosek godina u odnosu na klasifikaciju cervikalnog nalaza, zapaža se da su pacijentkinje bez celularne atipije pripadale mlađoj uzrasnoj kategoriji, dok su u grupi pacijentkinja sa HSIL promenama registruju značajno starije pacijentkinje, prosečne starosne dobi 43,4 godine. Kod većine žena inficiranih HPV, u više od 90% slučajeva, doći će do spontanog nestanka infekcije u vremenskom periodu od 12 do 24 meseca, što dokazuje i niža zastupljenost ovih infekcija kod žena nakon 30 godina života. U manjem, preostalom procentu dolazi do razvoja prekanceroznih lezija i karcinoma cerviksa koji se značajno češće dijagnostikuju u starijih pacijentkinja što ukazuje na dug latentni i vremenski zahtevan proces transformacije epitela (8).

U cilju smanjenja mortaliteta i morbiditeta uzrokovanog karcinomom cerviksa, tokom poslednjih 50 godina, mnoge države su uvele skrining programe bazirane na citomorfološkom ispitivanju cervikalnih uzoraka pomoću *Papanikolau* testa. Međutim, ova procedura je pokazala manje nego optimalnu senzitivnost (50%) i visoku interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost (305,306).

Testovi zasnovani na molekularno biološkim metodama poput *real time* PCR danas se uobičajeno koriste u dijagnostici infekcija HPV. Ove metode odlikuje visoka senzitivnost, kao i kratko vreme do dobijanja konačnog rezultata analize. Zasnovane su na dokazivanju specifičnih ciljnih sekvenci genoma HPV (HPV DNK test) u odgovarajućem uzorku i omogućavaju dokazivanje prisustva pojedinačnih genotipova HPV, odnosno genotipizaciju. Genotipizacija omogućava stratifikaciju rizika, odnosno, ukazuje na prognozu i doprinosi izboru terapije, kao i razvoju vakcina i proceni efekta imunizacije. Međutim, samo dokazivanje prisustva genoma HPV u brisu cerviksa, ne pruža uvid u vrstu infekcije. Ono ne daje odgovor na pitanje da li je prisutna tranzitorna ili perzistentna infekcija u kojoj se virus aktivno umnožava i u kojoj postoji visok rizik od razvoja karcinoma, a samim tim postoji i potreba za što ranijim adekvatnim tretmanom pacijentkinja (305).

Ustanovljeno je da je cervikalna kancerogeneza snažno povezana sa nastankom i razvojem HPV uzrokovane infekcije u kojoj dolazi do transkripcije onkogena E6 i E7 HR HPV, sa sledstvenim nastankom iRNK i sintezom istoimenih proteina. Iz ovog razloga, detekcija iRNK E6 i E7 visokorizičnih HPV može da posluži kao molekularno dijagnostički pokazatelj njihove perzistencije i onkogene aktivnosti (307), što bi moglo da omogući bolju procenu rizika od nastanka cervikalnog karcinoma i s tim u vezi da značajno utiče na dalji algoritam praćenja pacijenata (308).

U okviru ovog istraživanja analiza ekspimiranja gena E6 i E7 kao pokazatelja onkogene aktivnosti najzastupljenijih genotipova u žena Južnobačkog okruga (HPV 16, 31, 33, 51) omogućena je dokazivanjem iRNK istoimenih onkoproteina u ukupnom uzorku. Onkogene aktivnost je detektovana u 38,1% ukupno testiranih uzoraka, odnosno, kod 64,5% pacijentkinja sa potvrđenim prisustvom HPV infekcije. Takođe, uočeno je da su pokazatelji onkogene aktivnosti detektovani samo kod prethodno potvrđenih HPV DNK pozitivnih uzoraka. Ovaj relativno visok procenat detektovane onkogene aktivnosti je u saglasnosti sa pojedinim prethodno publikovanim rezultatima koji su se odnosili na najčešće globalno potvrđene visokorizične genotipove HPV 16, 18, 31, 33 i 45 kod žena sa nalazima normalne i abnormalne citologije. *Fontecha* i saradnici (309) su ukazali da se iRNK E6 i E7 HR HPV pozitivnost detektovala u 68% HPV pozitivnih žena, što je vrlo blisko rezultatima dobijenim u multicentričnoj studiji koja se odnosila na pojedine regione Italije (67%) koju su publikovali *Rossi* i saradnici (310). Rezultati istraživanja onkogene aktivnosti visokorizičnih genotipova

HPV pozitivnih žena Turske ukazali su na pozitivnost u 56% abnormalnih citoloških nalaza (308). Isti rezultat detekcije (55%) je dobijen u studiji *Oliveira* i saradnika (311), dok se približna vrednost zastupljenosti onkogene aktivnosti HPV (61%) beleži i u studiji *Yao* i saradnika (312). Rezultati studija koje su se bavile ovom temom, a odnose se na naš region takođe naglašavaju relativno visok procenat onkogene aktivnosti testiranih genotipova HPV. Dabeski i saradnici (299) su potvrdili onkogenu aktivnost u 61% ukupno ispitanih žena normalne i abnormalne citologije, dok se ekspresija onkogeni E6 i E7 HR HPV u žena Bosne i Hercegovine odnosila na 81% HPV pozitivnih žena sa abnormalnom citologijom (313). Onkogeni potencijal cirkulišućih genotipova HPV na nivou populacije Republike Srbije prema podacima iz dostupne literature do sada nije bio predmet istraživanja, što ukazuje i naglašava aktuelnost ove teme.

Ukoliko se onkogeni aktivnost posmatra prema svakom pojedinačno ispitanom genotipu, zapaža se da se ekspresija onkogeni E6 i E7 HR HPV 16 može detektovati kod svake treće HPV pozitivne pacijentkinje (29,7%), odnosno svakog četvrtog detektovanog genotipa (25,5%). Onkogeni aktivnost HPV 31 je potvrđena u cervikalnom uzorku kod svake pete HPV pozitivne žene (19,2%), odnosno svakog šestog detektovanog genotipa (16,6%), dok se onkogeni E6 i E7 HPV 33 i 51 ekspresiraju u približno podjednako, ali dvostruko manjem broju slučajeva (9,3%, odnosno, 8,7%).

Analiza prisustva iRNK najzastupljenijih genotipova HPV 16, 31, 33, 51 u odnosu na citološki nalaz testiranih pacijentkinja Južnobačkog okruga ukazuje da je procenat ekspresiranosti onkogeni E6 i E7 HPV srazmeran stepenu težine cervikalne lezije i da su utvrđene razlike značajne. Može se uočiti da je približno svaka deseta HPV inficirana žena (11%) sa normalnim citološkim nalazom inficirana onkogeno ekspresiranim genotipom, dok je kod visokostepenih lezija ovaj odnos obrnut. Naime, odsustvo pokazatelja onkogene aktivnosti HPV se detektuje kod približno svake desete žene sa HSIL statusom (11,1%). Ovi rezultati pokazuju usklađenost rezultata dobijenih istraživanjem u našoj populaciji sa podacima studija sprovedenih u različitim regionima sveta (310,314–317). Zapažen obrazac prisustva zastupljenosti detektovanih transkripata u odnosu na citološki status se smatrao očekivanim, s obzirom da se zna da pojava prekomerne ekspresije onkogeni E6 i E7 utiče na razvoj neoplastičnih promena cervikalnog epitela (318,319).

Primenom iRNK HPV testa utvrđeno je da približno svaki drugi HPV 16 genotip ima eksprimirane onkogene E6 i E7 (49%). Značajno više pozitivnih iRNK E6/E7 HPV 16 registruje se sa porastom težine citološkog nalaza, odnosno zastupljenost njegove onkogene aktivnosti pokazuje jasan trend rasta u odnosu na stepen težine cervikalne lezije. U cervikalnim nalazima koje karakteriše odsustvo celularne atipije, registrovan je u svega 3%, dok se u HSIL nalazima detektuje kod dve trećine HPV pozitivnih žena (64,2%). Kao što se potvrdilo u ovom istraživanju, tako se i od strane više drugih autora navodi da je transkripcioni produkt HPV 16 najčešće detektovan, što ukazuje da je tendencija ekspresije najznačajnijih onkogeno ovog genotipa u ovoj vrsti lezije znatno veća u odnosu na druge ispitane genotipove (299,308,313), što mu daje status HPV sa najpotentnijim kancerogenim delovanjem (309).

Ukoliko se HPV 31 posmatra u kontekstu ekspresije onkogeno E6 i E7 uočava se da je 70% ovog genotipa detektovano kao aktivno. Međutim, nasuprot ovoj visokoj aktivnosti, ukoliko se njegova zastupljenost posmatra u odnosu na citološki status uočava se suprotan trend prisustva od HPV 16 genotipa. Zapaža se da je iRNK E6/E7 HPV 31 najmanje detektovana (7,5%) u HSIL grupi citološkog nalaza u odnosu na ostale grupe (23% – 26%). Razlog za ovu pojavu se može pretpostaviti i obrazložiti činjenicom da je negativan transkripcioni status ovih onkogeno u većoj meri zastupljen zbog prisustva epizomalne forme virusa ili uspostavljene kontrole transkripcije koja omogućava spontano uklanjanje infekcije posredovane ovim genotipom virusa (309), što potvrđuje i znatno niža detekcija HPV 31 u analiziranim tkivima karcinoma u odnosu na prekancerozne lezije (269), kao i značajno češća prisutnost ovog genotipa kod pripadnica mlađe uzrasne kategorije.

Slično prethodno analiziranom genotipu HPV, pokazatelji onkogene aktivnosti su potvrđeni kod dve trećine ispitanih HPV 33 genotipova. Drugim istraživanjima registruju se različiti procentualni rasponi transkripcione detekcije onkogeno ovog genotipa, od njenog izostanka (320) pa sve do potpune ekspresije od 100%. Uzrok za ovu razliku se može tumačiti prisutnim varijacijama njihovog broja u ukupnom uzorku (309). Suprotno tome, posmatrano u odnosu na citološku leziju, onkogeno aktivnost HPV 33 se detektuje znatno ređe, odnosno, kod približno svake desete pacijentkinje sa dijagnostikovanim visokostepenim lezijama (9,4%), što je blisko detekciji ovog genotipa u istovrsnim lezijama posmatrano globalno, u kojima je njegovo prisustvo potvrđeno kod svake sedme žene (7%) (229).

U okviru ovog istraživanja, rezultati detekcije iRNK HPV 51 su približno isti sa onima koji se odnose na HPV 33 i mogu se interpretirati istom zastupljenošću ova dva genotipa kako u ukupnom uzorku, tako i u distribuciji njihove onkogene aktivnosti kroz različite citološke grupe. Međutim, iako se globalno posmatrano HPV 51 ne registruje u prvih deset HPV genotipova koji posreduju u nastanku karcinoma cervikalnog epitela (229), važna činjenica koja naglašava razliku, a samim tim i potrebu za nadzorom njegovog onkogenog dejstva jeste prisustvo ovog genotipa i njegovog učešća u visokostepenim lezijama kako u našem okrugu tako i u pojedinim regionima sveta (287–293). U istom kontekstu, treba naglasiti da ne postoji pozitivna korelacija između prevalencije HPV infekcije uzrokovane određenim genotipom posmatrane regionalno i učestalosti pojave HPV uzrokovane cervikalne bolesti. Tačnije, ova diskrepancija se objašnjava povezanošću sa molekularnom osnovom infekcije, odnosno, genetskom varijabilnošću određenog genotipa HPV koji je uzrokuje (225), što sugerise opravdanost detaljne analize onkogenog potencijala ovog genotipa u nadzoru cervikalnog karcinoma.

Ukoliko se detekcija transkripcionih produkata onkogeno E6 i E7 posmatra u kontekstu njihovog učešća u pojedinačnim i udruženim HPV infekcijama, može se uočiti da ukupna onkogeno aktivnost detektovana upotrebom iRNK E6/E7 HPV testa raste sa stepenom težine cervikalne lezije (60% – 100%). Onkogeno aktivnost pojedinačnih genotipova (20% – 86%) je veća u odnosu na onkogeno aktivnost udruženih genotipova (0% – 40%) u istoj vrsti lezija i takođe raste sa stepenom njene težine. U ovom slučaju je neophodno pomenuti da mogućnost detekcije iRNK E6 i E7 u udruženim infekcijama zavisi od zastupljenosti integracije virusne DNK u humani genom (321). Ovaj događaj dovodi do gubitka regulacije posredovane E2 represorom i sledstvene disregulacije onkogeno E6 i E7 dominantnog genotipa HPV prisutnog u ćeliji. U ovom kontekstu, istovremena detekcija drugog genotipa HPV se može objasniti njegovim epizomalnim prisustvom koje karakteriše slaba genska ekspresija regulisana adekvatnom funkcijom E2 represora (322). Navodi u literaturi govore u prilog ovoj činjenici jer se smatra da svaki od detektovanih genotipova ima nezavisan mehanizam dejstva u onkogenezi cervikalnog epitela (304,323). Rezultati ovog istraživanja naglašavaju da iako se uočava da je učestalost udruženih infekcija veća u skvamoznim lezijama nego u citološki klasifikovanom normalnom epitelu cerviksa, detekcija njihove onkogene aktivnosti ima obrnut odnos i smanjuje se. Ovaj rezultat je u

saglasnosti sa literaturnim podacima koji prisustvo ovih infekcija dovode u vezu sa ranim fazama razvoja cervikalne bolesti i odsustvom njihovog značaja u razvoju karcinoma (301).

U cilju analize onkogene aktivnosti četiri najčešće dijagnostikovana visokorizična HPV u žena Južnobačkog okruga u odnosu na uzrasne kategorije zapaža se značajno veća zastupljenost pozitivnih nalaza iRNK E6/E7 HPV 16 ka starijim dobnim grupama. Saglasno sa ovim rezultatom, studije koje su istraživale distribuciju pokazatelja onkogene aktivnosti HPV prema uzrasnoj kategoriji ukazale su da je detekcija iRNK E6 i E7 HR HPV znatno veća nakon 30. godine života (316,324). Uzimajući u obzir da su rezultati u okviru ovog istraživanja ukazali na nalaz značajno češće zastupljenosti prekanceroznih lezija kod pripadnica starije uzrasne grupe može se smatrati da detekcija eksprimiranosti raste tokom perioda onkogeneze za koji se navodi da prosečno iznosi od 5 do 15 godina (325). Isti rezultat je podržan i rezultatima epidemioloških studija koji navode da većina mladih žena ima asimptomatsku formu HPV infekcije koja zahvaljujući imunskom odgovoru stiže status tranzitorne (317,326). Procenjeno je da se ova prirodna regresija infekcije događa kod približno dve trećine ovih žena, naročito sa dijagnostikovanim HSIL citološkim nalazom (327), odnosno, da se u vremenskom periodu od šest do osamnaest meseci HPV infekcija kod 43% – 65% žena sa normalnim citološkim nalazom spontano eliminiše (328).

Mnogobrojni HPV DNK testovi koji se koriste u dijagnostici HPV infekcije pokazuju visok nivo senzitivnosti, ali ne i specifičnosti u detekciji visokostepenih lezija na grliću materice. Nemogućnost razlikovanja tranzitorne od perzistentne infekcije predstavlja glavni razlog za istraživanje i procenu specifičnih biomarkera progresije epitelnih lezija indukovanih HPV. Idealan biomarker bi bio onaj koji bi svojom vrednošću jasno definisao različite faze HPV infekcije, kao što su regresija, perzistencija i progresija nastalih promena. Ove karakteristike proksi indikatora bi dale potencijalnom testu visoku pozitivnu prediktivnu vrednost što bi bilo od ključnog značaja u proceni progresije cervikalne lezije (177).

Značaj perzistentne HPV infekcije u nastanku i razvoju cervikalnog karcinoma dokumentovan je u mnogobrojnim literaturnim navodima (102,120,167). Tokom infekcije, virusni onkogeni E6 i E7 su deo ranog kodirajućeg regiona i normalno se ne eksprimiraju. Međutim, u slučaju integracije u genom ćelije domaćina dolazi do nekontrolisane ekspresije onkogeno što omogućava detekciju njihovih produkata transkripcije (329,330). Shodno tome, potvrda prisustva transkripata, iRNK E6 i E7, u cervikalnim lezijama bi mogla da posluži

kao potencijalni biomarker u cilju identifikacije klinički relevantne infekcije sa onkogenim potencijalom (331). Procena značaja i efikasnosti ovih biomarkera, kao i njihova klinička primena predmet su aktuelnih istraživanja i kliničkih studija (221,249,250,332) koje se sprovode u cilju unapređenja laboratorijsko-dijagnostičkih pokazatelja potencijalno progresivne infekcije, odnosno, redukcije tumačenja tranzitorne kao perzistentne HPV infekcije.

Senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost se primenjuju u funkciji evaluacije dijagnostičkih sposobnosti izabranog testa i proceni njegovog kliničkog značaja. Senzitivnost testa koji detektuje onkogenu aktivnosti najčešćih genotipova HPV našeg okruga (iRNK test) prati rast stepena citološke abnormalnosti u poređenju sa referentnom grupom (NILM): ASCUS (29%), LSIL (60%), HSIL (89%). Specifičnost ovog testa ista je za sve vrste citološkog nalaza (89%) u odnosu na referentnu grupu, dok je pozitivna prediktivna vrednost srazmerna stepenu citološke lezije i u odnosu na abnormalnu citologiju je 88%. Bitno je napomenuti da kliničke karakteristike testa onkogene detekcije pokazuju porast sa progresijom lezije i zadržavaju se na visokom nivou što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača (221,315,316).

Studije koje su se bavile procenom pouzdanosti iRNK testa pokazuju heterogene nalaze (333). Rezultati najveće meta-analize ukazuju da se dobijena vrednost senzitivnosti kretala od 41% do 95%, dok je registrovana specifičnost bila u opsegu od 42% – 74% (334). Razlog za ovu naglašenu heterogenost rezultata bi se mogao naći u varijacijama koje se tiču uzoraka, kao i citološkog statusa uzorkovanih pacijentkinja.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su specifičnost (89%) i PPV (70% – 79%) iRNK testa značajno veći, dok se za isti test beleži značajno niža senzitivnost u odnosu na HPV DNK test. Ovi rezultati su u saglasnosti sa navodima pojedinih autora, koji naglašavaju nešto niže vrednosti senzitivnosti iRNK testa u odnosu na senzitivnost HPV DNK testa, dok je specifičnost iskazana na višem nivou (299,315,335), dok drugi sugerišu da je senzitivnost slična i da bi njegova primena značajno unapredila karakteristike testa koje se tiču specifičnosti (232,250,317,336). Takođe, kroz različita istraživanja konstatuju se ekstremne vrednosti procene kliničkih karakteristika koje se odnose na specifičnost (25% – 92,5%) i PPV (21% – 91%) (337). Uočena razlika se objašnjava heterogenim učešćem cervikalne patologije i metodološkog kvaliteta u različitim studijama što naglašava ograničenost pri generalizovanom sagledavanju i interpretaciji ovih karakteristika testa (333). Iako su rezultati iskazani u širokom

spektru, oni zadržavaju jedinstven trend i sugerišu da upotrebom iRNK testa u odnosu na HPV DNK test dolazi do unapređenja specifičnosti (334). Poređenjem kliničkih karakteristika testa može se zaključiti da detekcija iRNK E6 i E7 HR HPV u odnosu na HPV DNK predstavlja mnogo bolji marker za precizniji skrining visokostepene celularne atipije cerviksa u cilju detekcije perzistentne HPV infekcije (315,334). U istom kontekstu, rezultati multicentrične studije u kojoj je učestvovalo preko 5.000 žena ukazuju da je primenom iRNK testa mogućnost detekcije HSIL nalaza za 24% do 29% veća u odnosu na onu vrednost koja se registruje primenom HPV DNK testa (338). Takođe, ne treba zanemariti ni činjenicu koja ukazuje da prilikom integracije HPV u humani genom dolazi do narušavanja celine L1 regiona virusnog genoma što može da rezultira lažno negativnim rezultatom putem primene HPV DNK detekcije, dok se u tim slučajevima HPV perzistentna infekcija nesmetano može potvrditi upotrebom iRNK testa (339).

Poređenjem detekcije najzastupljenijih visokorizičnih genotipova HPV kod žena našeg okruga, upotrebom HPV DNK i iRNK testova, podudarnost u detekciji HPV infekcije je registrovana samo u grupi pacijentkinja sa dijagnostikovanim visokostepenim lezijama, dok se u ostalim grupama citološkog nalaza razlika u detekciji iskazala na značajnom nivou. U odnosu na druge ispitane HPV genotipove, razlika u detekciji genotipa 16 putem ovih testova se registrovala na značajnom nivou u svim grupama citološkog nalaza. Ovaj rezultat navodi na mogućnost daljeg ispitivanja detekcije ovog genotipa u svrhu determinisanja testa sa boljim karakteristikama. Rezultati ovog istraživanja su u delimičnoj saglasnosti sa rezultatima istraživanja Salimović-Bešić i saradnika (313). Slični su u detekciji HPV infekcije za ASCUS i HSIL citološki nalaz, dok se razlike uočavaju u detekciji HPV infekcije za LSIL citološki nalaz. Naime, ista stopa detekcije HPV infekcije primenom oba testa se beleži u visokostepenim lezijama u oba istraživanja. Oba istraživanja pokazuju postojanje značajne razlike u stopi detekciji HPV infekcije primenom oba testa na nivou ASCUS citološkog nalaza. Ipak, suprotno rezultatima istraživanja Salimović-Bešić i saradnika (313), u ovom istraživanju se uočava značajna razlika u stopi detekciji HPV infekcije primenom oba testa na nivou LSIL citološkog nalaza. Visoka podudarnost testova je dokazana samo u HSIL grupi citoloških nalaza i od strane autora iz Severne Makedonije (277), što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

S obzirom da prethodno navedeni rezultati pokazuju međusobnu podudarnost u detekciji visokorizičnih genotipova HPV pri upotrebi DNK i iRNK testova u visokostepenim lezijama, u cilju moguće upotrebe pouzdanijeg testa, većeg dijagnostičkog potencijala, u datim uslovima izvršena je procena njihovih parametara primenom ROC krive. Rezultati ove analize su ukazali da je mogućnost detekcije HPV infekcije iRNK testom (81%) kod pacijentkinja sa visokostepenim lezijama veća u odnosu na mogućnost njihovog dijagnostikovanja putem HPV DNK testa (74%). Istraživanja pojedinih autora čiji se cilj odnosio na pronalaženja boljeg trijažnog testa HPV pozitivnih žena rezultirala su sličnim rezultatima (312,340).

Prethodnim analizama utvrđen je značaj pojedinih faktora na progresiju cervikalne intraepitelne lezije. Utvrđeno je da dokazano prisustvo genotipa HPV 16, njegova onkogeni aktivnost, kao i onkogeni aktivnost svih ispitanih genotipova imaju uticaj na pomenutu progresiju cervikalne bolesti. Utvrđen je značajan uticaj eksprimiranja onkogeni E6 i E7 svih ispitanih genotipova HPV u progresiji perzistentne infekcije i nastanku prekanceroznih lezija cervikalnog epitela, što se ogleda jakom pozitivnom korelacijom. Za potvrdu klinički relevantne HPV infekcije uzrokovane genotipom HPV 16 utvrđen je jači prediktivni značaj iRNK testa (statistički značajna korelacija srednje jačine), dok je prediktivni značaj DNK HPV testa bio slabiji (statistički značajna slaba korelacija). Iako, prema raspoloživim podacima iz dostupne literature korelacija nije primenjena za ovu vrstu analize dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim drugim statističkim metodama. Može se zaključiti da je visok nivo nalaza prekursorskih promena cervikalnog epitela praćen porastom detekcije transkripata onkogeni E6 i E7 svih ispitanih genotipova.

Pored dijagnostičke vrednosti i potencijala, u laboratorijskoj medicini često se ispituje prediktivni potencijal mnogih faktora (341). Prema ranije utvrđenom stepenu uticaja na nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela, odabrani su relevantni faktori, dok je HSIL kao predstavnica visokog stepena celularne atipije označavala zavisnu promenljivu u odnosu na sve analizirane relevantne faktore. Postupno su ispitani faktori koji predstavljaju povišen rizik za nastanak težih cervikalnih promena (genotip HPV 16, ukupna onkogeni aktivnost svih ispitanih genotipova HPV, onkogeni aktivnost HPV 16 i uzrasna kategorija pacijentkinja).

Ukoliko posmatramo uticaj HPV 16 na pojavu HSIL citološkog nalaza vidimo da se ispoljila značajna prediktivna vrednost. Pacijentkinje sa potvrđenim prisustvom HPV 16 genotipa putem DNK testa imaju veću verovatnoću za dijagnostikovanje visokostepenih lezija u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja normalnog citološkog nalaza (3,8 puta) i niskostepene lezije (2,6 puta). U istom kontekstu, studija *Athena* rezultirala je zaključkom da relativni rizik za razvoj prekanceroznih lezija u žena inficiranih sa HPV 16 iznosi 42%, što je više nego pet puta veći rizik u odnosu na žene kod kojih je potvrđeno prisustvo drugog HPV genotipa (342). Rezultati drugih autora navode da prisustvo ovog genotipa povećava rizik za razvoj lezija težeg stepena cerviksa do dvanaest puta. Kako se navodi da ovaj genotip ima najveći onkogeni potencijal i da je njegova povezanost sa prekanceroznim lezijama značajna, pojedini autori potenciraju mogućnost unapređenja posebnih protokola koji bi se odnosili na praćenje HPV 16 pozitivnih pacientkinja (301). Superiornost HPV genotipizacije u odnosu na citologiju je potvrđena i dokumentovana i u navodima pregledne literature *Cochrane* biblioteke (343). Međutim, rezultati genotipizacije, odnosno, identifikacije prisustva određenog genotipa HPV ne pružaju mogućnost za trijažu ovih pacientkinja na osnovu jasne procene statusa infekcije i mogućnosti njene progresije. Iz navedenog proizilazi potreba za pronalaženjem prediktivnijeg biomarkera koji bi doveo do unapređenja skrininga i mogućnosti uvida u onkogeni potencijal virusa čime bi se jasno identifikovao rizik usled detekcije HPV 16 (344).

Kada gledamo uticaj pokazatelja onkogene aktivnosti svih ispitanih HPV genotipova, koja je detektovana iRNK testom, na pojavu visokostepenih lezija cervikalnog epitela utvrđena je značajno veća verovatnoća pojave kod svih citoloških grupa. Pacijentkinje sa pozitivnim nalazom ovog testa će imati skoro 7 puta veću verovatnoću za dijagnostikovanje HSIL lezije u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja nalaza bez celularne atipije, 19 puta veću verovatnoću za dijagnostikovanje HSIL u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja nedeterminisane lezije, odnosno, 5 puta veću verovatnoću za detektovanje HSIL u odnosu na LSIL. Dobijeni rezultati idu u prilog navodima koji se odnose na istraživanja značaja onkogene aktivnosti i koji pokazuju da bi detekcija iRNK E6 i E7 HR HPV mogla imati prognostičku vrednost u praćenju razvoja kancerogeneze (345,346). Rezultati studije *Fontecha* i saradnika (309), koja je za predmet istraživanja imala kliničko praćenje iRNK E6 i E7 HR HPV pozitivnih žena različitog citološkog

statusa, pokazali su da se kod najvećeg procenta ovih žena tokom vremena dijagnostikuje progresija lezije (53%), zatim perzistiranje abnormalnog citološkog nalaza (42%), dok se regresija beleži u deset puta manje slučajeva (4%). U istom kontekstu prognostičkog značaja, a tokom kliničkog nadzora u trajanju od 49 meseci, pokazano je da pacijentkinje sa potvrđeno eksprimiranim onkogenima putem iRNK testa imaju povećan rizik za nastanak visokostepenih lezija. U prilog istom nalazu, nijedna žena sa potvrđenom infekcijom putem HPV DNK testa, a negativnim nalazom iRNK testa nije stekla dijagnostikovanu cervikalnu leziju težeg stepena tokom perioda praćenja od četiri godine (249,250). Prema rezultatima švedskih autora, negativan nalaz onkogene aktivnosti HPV, koji se dobio primenom iRNK testa ukazuje na visoku verovatnoću spontane eliminacije postojeće HPV infekcije u vremenskom periodu od jedne godine (249). U radu *Zorzi* i saradnika (335) se navodi da je upotrebom iRNK testa, tj. njegovim negativnim nalazom moguće identifikovati žene koje nisu u riziku od razvoja invazivnog karcinoma u petogodišnjem periodu. Primena iRNK testa se pokazala superiornom i u okviru kliničke studije *Johansson* i saradnika (345) u kojoj je ukazano da pozitivan nalaz ovog testa ima prediktivnu vrednost sa 100% senzitivnosti u razvoju nepovoljnog citološkog nalaza kod HPV pozitivnih žena sa dijagnostikovanim niskostepenim lezijama. Na osnovu ovoga, pretpostavka je da bi se kod pacijentkinja sa prisutnim niskostepenim lezijama cerviksa i negativnim rezultatom iRNK testa mogao proceniti bezbedan vremenski interval između retestiranja u trajanju od četiri godine (249) što bi moglo značajno da doprinese unapređenju protokola praćenja HPV pozitivnih žena.

Rezultati u okviru ovog istraživanja pokazali su značajnu prediktivnu vrednost pojedinačne onkogene aktivnosti HPV 16, bez obzira na detekciju iRNK drugog tipa visokorizičnog HPV u istom uzorku, za nastanak visokostepene lezije cervikalnog epitela.

Kod pacijentkinja sa pozitivnim nalazom pokazatelja onkogene aktivnosti HPV genotipa 16 utvrđena je značajno veća verovatnoća pojave visokostepene lezije kod svih vrsta citološkog nalaza. Verovatnoća za dijagnostikovanje visokostepene lezije je 50 puta veća u odnosu na verovatnoću dijagnostikovanja normalnog citološkog nalaza, 12 puta veća za dijagnostikovanje visokostepene lezije u odnosu na detekciju ASCUS citološkog nalaza, dok je kod pacijentkinja sa istim nalazom iRNK testa, verovatnoća detekcije HSIL nalaza 6 puta veća od verovatnoće detekcije LSIL nalaza.

Na potrebu za istraživanjem i pronalaskom adekvatnog biomarkera ukazuju i aktuelni nedostaci Vodiča koji se odnose na algoritam praćenja HPV 16 pozitivnih žena. Prema aktuelnim smernicama, dokazano prisustvo HPV 16 genotipa u cervikalnom uzorku ispitivanih žena zahteva poseban klinički nadzor sa neodložnim sprovođenjem kolposkopije (347). S obzirom da je rizik od razvoja lezije u pravcu maligne evidentan, ali varijabilan (348), kao i da manji procenat žena kod kojih je dokazano njegovo prisustvo razvija visokostepenu leziju (349), stratifikacija rizika je neophodna. Istovremena primena oba testa, HPV DNK i iRNK, redukuje upućivanje na neodložnu kolposkopiju za 77,5% (350), što podržava aktuelnu hipotezu da bi iRNK test mogao biti adekvatan prediktivni biomarker u sekundarnom skriningu cervikalnog karcinoma. Upravo zbog toga, primena iRNK testa, koji bi doveo do detekcije onkogene aktivnosti ovog genotipa, omogućila bi identifikaciju potencijalno progresivne infekcije i pravovremeni dalji tretman ovih pacijentkinja, kao i smanjenje primene invazivnih dijagnostičkih procedura (351).

Prema dosadašnjem uvidu u publikovane navode, jedna od retkih prospektivnih studija praćenja koje se bavila prediktivnim značenjem iRNK E6 i E7 HR HPV 16, ukazala je da je putem detekcije ovog biomarkera moguće potvrditi 87,5% progresivnih HPV infekcija uzrokovanih ovim genotipom, odnosno, da je u ovom slučaju rizik od progresije niskostepenih cervikalnih lezija bio deset puta veći u odnosu na onaj koji se detektovao kod iRNK negativnih žena tokom perioda praćenja od 35 meseci (351). U istom kontekstu, mogu se sagledati rezultati eksprimiranja onkogeno E6 i E7 HR HPV iskazani kroz disperziju dobijenih Ct vrednosti. Oni govore da većina onkogene aktivnosti detektovane u HSIL nalazima potiče od HPV 16, koji se detektuje najnižom registrovanom vrednošću (Ct = 16). Značajna razlika između Ct vrednosti je utvrđena za onkogenu aktivnost ovog genotipa, pri čemu se najveći broj transkripata E6 i E7 detektuje kod pripadnica mlađe uzrasne kategorije. Dobijeni rezultati potvrđuju visoku onkogenu aktivnost HPV 16 genotipa.

Polazeći od činjenice da Ct vrednost korelira sa težinom cervikalne abnormalnosti, njena upotreba u trijaži HPV pozitivnih žena bi se mogla primeniti iskazivanjem u odnosu na svaki pojedinačni genotip (352). *Song* i saradnici (353) predlažu uvođenje granične Ct vrednosti (Ct = 33,7) za HPV 16 u cilju unapređenja trijažnog algoritma HPV pozitivnih žena. Noviji literaturni navodi stavljaju ovu temu u fokus istraživanja (332,354). Jedan od njih prikazuje opseg količine transkripata onkogeno E6/E7 HPV 16 (Ct = 16–39) koji je u

saglasnosti sa dobijenim rezultatima u okviru ovog istraživanja i navodi mogućnost upotrebe ovog parametra u individualnom pristupu procene rizika od razvoja cervikalnog karcinoma (332).

Poznato je da se prisustvo HPV infekcije potvrđuje u svim uzrasnim kategorijama. Međutim, pripadnost određenoj uzrasnoj grupi je odrednica koja je značajno povezana sa rizikom od sticanja ove infekcije. Rezultati studija ukazuju da je kod većine mladih žena rizik za sticanje ove infekcije najveći, kao i da je tada prisutna tranzitorna HPV infekcija koja zahvaljujući adekvatnom imunskom odgovoru biva uspešno eliminisana (317,326). Za progrediranje lezija u teže oblike cervikalne bolesti neophodan je vremenski period od 5 do 15 godina tokom kog dolazi do perzistiranja infekcije i odvijanja procesa onkogeneze (325), što odgovara navodima da su žene između 46 i 55 godina u najvećem riziku za nastanak lezija većeg stepena težine (355). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju navedene konstatacije. Može se uočiti da je kod ispitanih žena Južnobačkog okruga uzrasna kategorija značajan prognostički faktor u progresiji perzistentne infekcije uzrokovane onkogenim genotipovima HPV kod svih citoloških grupa. *Loopik* i saradnici (356) ukazuju da se rizik od progresije postojeće lezije visokog stepena povećava sa godinama života, odnosno, da se kod žena starijih od 50 godina rizik od nastanka cervikalnog karcinoma povećava 7 puta, naročito ukoliko je infekcija uzrokovana HR HPV 16, 18 i 31 (357). Rizik od razvoja cervikalnih abnormalnosti u ovom životnom dobu, kao i potrebu za primenom iRNK testa u dijagnostičkom protokolu ovih žena naglašavaju *Asciutto* i saradnici (249). Pretpostavka za koju se navodi da može biti razlog ove pojave je reaktivacija latentne HPV infekcije koja je uzrokovana izmenama imunskog statusa karakterističnim za ovo životno doba. Takođe, smatra se da postojanje eventualne prethodne cervikalne lezije visokog stepena povećava mogućnost za nastanak ponovne HPV infekcije i razvoj *de novo* lezija (356).

U okviru rezultata ovog istraživanja konstruisan je statistički značajan finalni model sa svim prediktorima, koji pokazuje jačinu potencijala ispitanih faktora, odnosno, biomarkera za nastanak prekanceroznih i kanceroznih lezija u žena sa perzistentnom HR HPV infekcijom. Posmatrajući svaku citološku grupu pojedinačno, dve nezavisne promenljive su dale jedinstven statistički značajan doprinos modelu i time su imenovane kao najjači prediktori. To su onkogeni aktivnosti HR HPV 16 i uzrasna kategorija HPV pozitivnih pacijentkinja.

Na osnovu literaturnih navoda koji ističu nedostatak aktuelnih smernica koje se odnose na protokol praćenja HPV DNK 16 pozitivnih žena, kao što je navedeno naglašava se potreba za pronalaskom pouzdanijeg biomarkera koji bi se koristio u te svrhe (249,347) Negativan iRNK nalaz odnosi se na visoku verovatnoću regresivnog toka infekcije u vremenskom periodu od jedne godine, dok se kao bezbedan procenjuje vremenski interval između retestiranja u trajanju od četiri godine (249). Zasnvano na ovim činjenicama, a u skladu sa jednim od najjačih prediktora, iRNK E6/E7 HPV 16, identifikovanim kod žena Južnobačkog okruga, naglašava se aplikativna vrednost dobijenih podataka. Naime, u cilju formiranja preporuka i unapređenja postojećeg algoritma praćenja HPV DNK 16 pozitivnih pacijentkinja, a na osnovu rezultata ovog istraživanja i definisanog perioda retestiranja od strane drugih autora (249,345) predložen je potencijalni algoritam (Prilog 6). Treba naglasiti da je neophodno dalje ispitivanje aplikativnosti predloženog algoritma koje bi se odnosilo na veći broj žena i duži vremenski okvir studije praćenja moguće progresije skvamoznih intraepitelnih lezija cerviksa.

Istraživanje onkogene aktivnosti visokorizičnih genotipova HPV, dokazivanjem iRNK onkogen E6/E7 se prvi put sprovodilo u našoj sredini što je omogućilo sticanje uvida u onkogeni aktivnost najzastupljenijih visokorizičnih genotipova HPV na našem području. Kao što je navedeno, testovi zasnovani na molekularno biološkim metodama koje se danas uobičajeno koriste u dijagnostici HPV infekcija omogućavaju dokazivanje genoma i određivanje pojedinačnih tipova HPV u uzorcima cervikalnih briseva. Međutim, ovaj dijagnostički pristup ne pruža uvid u vrstu infekcije i procenu rizika od nastanka cervikalnog karcinoma. Upravo zbog toga, rezultati ovog istraživanja mogli bi da omogućе identifikaciju pacijentkinja sa potencijalno progresivnom infekcijom i pravovremeni dalji tretman. Aplikativna korist dobijenih podataka ogleda se u formiranju potencijalnih preporuka za poboljšanje algoritma za praćenje inficiranih i tretman žena sa HPV infekcijom i promenama na grliću materice. Na taj način bi se omogućilo pravovremeno reagovanje na progresiju premaligne lezije, detekciju karcinoma grlića materice u ranoj fazi i pravovremeni tretman čime bi se značajno smanjila primena invazivnih dijagnostičkih procedura, troškova lečenja, kao i mortalitet uzrokovan ovom bolešću.

Savremena literatura naglašava da je kancerogeneza cervikalnog epitela multifaktorijalan proces. Imajući u vidu različit tok i ishod HPV infekcije, kao i dug period latencije između inicijalne infekcije i nastanka maligniteta dolazi se do zaključka da iako je obavezan nije i jedini uslov koji dovodi do karcinoma ove lokalizacije (154–156). Iz ovog razloga, izvršena je evaluacija pojedinih bihejvioralnih obrazaca za koje se navodi da utiču na sticanje i perzistiranje HPV infekcije.

Analiza parametara posmatranih demografskih faktora i faktora rizika ispitanica sa laboratorijski potvrđenom HR HPV infekcijom ukazuje na određene razlike u odnosu na stepen težine cervikalne lezije. Distribucija ispitanica prema stepenu obrazovanja, kao jednom od analiziranih demografskih faktora je pokazala da su žene koje imaju visokostepene lezije (67%) češće srednjeg ili nižeg nivoa stručne spreme. Ovaj podatak se može obrazložiti uticajem ekonomskih faktora i prisustvom pojedinih obrazaca ponašanja koji su rizični za reproduktivno zdravlje. Niži ekonomski status je povezan sa oskudnom primenom preventivnih mera, ograničenim mogućnostima korišćenja zdravstvene zaštite, nižim kvalitetom ishrane i stanovanja što sve zajedno doprinosi virusnoj perzistenciji i razvoju cervikalne bolesti (167).

Analizom bračnog statusa ispitanica, značajno veća učestalost neudatih žena je registrovana u ispitanica sa HSIL nalazom (89%). Razlog kojim se može objasniti veća zastupljenost ovih lezija kod neudatih žena je povezanost bračnog statusa sa nekim drugim faktorima ponašanja koji su vezi sa sticanjem HPV infekcije, poput monogamnih partnerskih odnosa (358).

Kako se u razvoju cervikalnog karcinoma određuju četiri krucijalna koraka (infekcija, perzistencija, progresija i invazija), tako se i faktori rizika mogu podeliti na one koji su značajni za svaki od njih (246). U okviru ovog istraživanja ispitivani su faktori rizika koji se posmatraju kao determinante za sticanje HPV infekcije, a to su početak seksualne aktivnosti i broj seksualnih partnera, kao i rizična ponašanja i navike koje potencijalno doprinose virusnoj perzistenciji i progresiji cervikalne lezije (pušenje, upotreba kontraceptivnih sredstava (kondom, oralna kontraceptivna sredstva), koinfekcije uzrokovane uzročnicima drugih seksualno prenosivih bolesti).

Kasnije stupanje žena Južnobačkog okruga u prvi seksualni odnos, nakon 18 godina, je bilo češće zastupljeno u grupi ispitanica sa normalnim citološkim nalazom (64%), dok se upotreba kondoma i oralnih kontraceptivnih pilula najmanje registruje u grupi ispitanica sa HSIL nalazom (11%). Ova zapažanja su očekivana s obzirom da se većina HPV infekcija stiže u prvim godinama seksualne aktivnosti i da je rano stupanje u seksualne odnose potvrđen faktor rizika u mnogim studijama (246,359,360). Zna se da je upotreba kondoma protektivnog, ali ipak ograničenog dejstva u odnosu na sticanje i prenošenje HPV infekcije zbog nedovoljne obezbeđenosti kontaktne barijere (361,362). Značaj primene oralnih kontraceptivnih sredstava se razmatra sa aspekta mogućnosti njihovog promotivnog uticaja na razvoj cervikalnog karcinoma. Podaci većine epidemioloških studija, ukazuju da se prilikom duže upotrebe (više od 5 godina) hormonskih kontraceptiva relativni rizik od cervikalnog karcinoma kod HPV pozitivnih žena povećava do 3,3 puta (363). U ovom istraživanju upotreba kondoma i oralnih kontraceptiva su varijable koje nisu pokazale značajnu povezanost sa stepenom težine citološke lezije.

Zastupljenost pušača u svim citološkim grupama je bila na sličnom nivou i iznosila je od 44% – 52%. Najkraći pušački staž, do 5 godina, bio je najviše zastupljen u grupi ispitanica sa normalnim citološkim nalazom (46%), dok se najduži period pušenja (preko 10 godina) zapaža u grupi ispitanica sa HSIL nalazom (75%) kod kojih se registruje i veći broj konzumiranih cigareta na dnevnom nivou (25%). Kada se posmatraju faktori rizika prema genotipu HR HPV može se uočiti da je značajno više ispitanica sa pozitivnim HR HPV 51 koje konzumiraju cigarete ($p = 0,013$). Karcinom grlića materice je 2004. godine od strane IARC-a svrstan među one koji su uzročno povezani sa pušenjem (364). Objavljeni podaci u stručnoj i naučnoj literaturi nisu konzistentni. Značajnu povezanost između pušenja i progresije cervikalne bolesti utvrdili su *Fang* i saradnici (166), dok se suprotni rezultati beleže u istraživanju drugih ispitanica (365). Autori sedmogodišnje studije preseka naglašavaju da neadekvatna veličina uzorka dovodi do nemogućnosti interpretacije rezultata i predlažu odgovarajuću konstrukciju uzorka (više stotina hiljada ispitanica) kako bi se precizno analizirala uzročna veza između navike pušenja i perzistentne HPV infekcije (365). S tim u vezi, odsustvo statističke značajnosti pušenja kao faktora rizika za pojavu progresije intraepitelne lezije cerviksa može se objasniti neadekvatnom veličinom uzorka u ovom istraživanju.

U ovoj studiji namerni prekid trudnoće se češće registrovao među ispitanicama sa visokostepenim lezijama (33%) za čiji razlog se pretpostavlja nastanak traume cervikalnog epitela i narušavanje integriteta tkiva tokom ove intervencije. Veći broj (dva i više) ginekoloških pregleda na godišnjem nivou zapaža se kod žena sa normalnim citološkim nalazom (68%), što se može objasniti pretpostavkom da su redovni ginekološki pregledi od značaja za pravovremenu dijagnostiku i dalji tretman pacijentkinja. Prethodna HPV analiza, putem HPV DNK testiranja je bila češće rađena kod ispitanica sa HSIL nalazom (78%), dok se kod žena sa citološki nedefinisanim i lezijama niskog stepena analiza vršila u manjem procentu (33%, odnosno, 29%). Može se pretpostaviti da je uzrok toga redovno periodično testiranje HPV potvrđenih pacijentkinja u cilju kontrole statusa HPV infekcije. Nasuprot tome, sagledavanje istih faktora rizika prema eksprimiranju onkogeno E6 i E7 pojedinačnog HR HPV ukazalo je da je broj ispitanica sa pozitivnim HR HPV 31 nalazom kod kojih nije rađena prethodna HPV analiza bio značajno veći u odnosu na broj žena kod kojih je HPV analiza rađena (Prilog 5). Kako onkogeno aktivnost ovog genotipa opada sa porastom stepena težine cerviklane intraepitelne lezije, pretpostavka kojom bi se dobijeni rezultat mogao objasniti je da usled odsustva cervikalne abnormalnosti izostaje upućivanje pacijentkinja na HPV DNK testiranje.

Nadzor statusa HPV infekcije i faktora koji se dovode u vezu sa njenim tokom doprinose tačnom razumevanju patofizioloških mehanizama onkogeneze i pružaju mogućnost za planiranje različitih strategija i informativnih programa u cilju prevencije i kontrole ove bolesti (164).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja i diskusije u kontekstu dostupne literature mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Najveći udeo inficiranih žena Južnobačkog okruga izazvan je visokorizičnim genotipovima HPV 16, 31, 33, 51 koji su u više od polovine ispitanih slučajeva onkogeno aktivni.
- ✓ Dominantan visokorizični genotip je HPV 16 koji je onkogeno aktivan kod svake treće ispitanе žene, potom sledi HPV 31 koji je onkogeno aktivan kod svake pete, dok su HPV 33 i 51 onkogeno aktivni kod skoro svake desete pacijentkinje.
- ✓ Ukupna onkogeno aktivnost ispitanih genotipova HPV raste sa porastom stepena težine cervikalne intraepitelne lezije.
- ✓ Onkogeno aktivan HPV 16 se najčešće detektuje u visokostepenim cervikalnim lezijama. Nasuprot tome, zastupljenost onkogeno aktivnog HPV 31 se najmanje detektuje u visokostepenim lezijama, dok je zastupljenost HR HPV 33 i 51 niska i nije srazmerna stepenu težine cervikalne lezije.
- ✓ Pojedinačni genotipovi ispitanih visokorizičnih HPV su nosioci onkogene aktivnosti detektovane u udruženim infekcijama.
- ✓ Zastupljenost HPV infekcije je obrnuto proporcionalna uzrastu pacijentkinja Južnobačkog okruga što ukazuje da je regresija infekcije dominantan proces koji je u skladu sa adekvatnim imunskim odgovorom organizma.
- ✓ Prisustvo visokorizičnog genotipa HPV 16 ne zavisi od uzrasta, ali njegova onkogeno aktivnost raste sa uzrastom za razliku od visokorizičnih HPV 31 i 33. Zastupljenost i onkogeno aktivnost visokorizičnog HPV 51 su proporcionalni uzrastu.

- ✓ Veća specifičnost i pozitivna prediktivna vrednost iRNK testa u odnosu na HPV DNK test ukazuju na veću verovatnoću detekcije perzistentne HPV infekcije prilikom njegove upotrebe.
- ✓ Onkogeni aktivnost najčešće detektovanih visokorizičnih HPV ima prediktivni potencijal u proceni nastanka visokostepene lezije cervikalnog epitela. Biomarkeri sa najjačim prediktivnim vrednostima za nastanak ovih lezija su onkogeni aktivnost HPV 16 i uzrast pacijentkinja.

Na osnovu dobijenih rezultata preporučuju se dalja istraživanja onkogene aktivnosti visokorizičnih genotipova HPV sa ciljem poboljšanja postojećeg dijagnostičkog algoritma za praćenje toka HPV infekcije.

7. LITERATURA

1. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30 (Suppl 5):F55–70.
2. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology*. 2013;445(1–2):213–23.
3. Bernard H-U. Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol*. 1994;2(4):140–3.
4. Fiorillo L, Cervino G, Surace G, De Stefano R, Laino L, D’Amico C, et al. Human Papilloma Virus: Current Knowledge and Focus on Oral Health. *Biomed Res Int*. 2021;2021:6631757.
5. Van Doorslaer K, Burk RD. Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res*. 2010;77:41–62.
6. Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol*. 2010;18(10):432–8.
7. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863–90.
8. Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front Oncol*. 2019;9(355):1–22.
9. Fernandes JV, de Medeiros Fernandes TAA. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. In: Broeck DD Vanden, editor. *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective*. First. Rijeka: InTech Europe; 2012. p. 3–40.
10. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, Desalle R, Dillner J, et al. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*. 2018;99(8):989–90.
11. McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem*. 2017;398(8):919–27.
12. Mehta K, Laimins L. High-Risk Human Papillomaviruses and DNA Repair. In: Wu T-C, Chang M-H, Jeang K-T, editors. *Viruses and Human Cancer, Recent Results in Cancer Research*. Second Edi. Cham: Springer Nature Switzerland AG; 2021.p. 141–55.
13. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27.
14. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Mu K, Hayakawa H, Nguyen CL, et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J. Virol*. 2004;78(21):11451–60.
15. García-Vallvé S, Alonso Á, Bravo IG. Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends Microbiol*. 2005;13(11):514–21.
16. Graham S V. Keratinocyte differentiation-dependent human papillomavirus gene regulation. *Viruses*. 2017;9(245):1–18.
17. Araldi RP, Muro S, Assaf R, Carvalho RF De, Caldas MA, Carvalho R De, et al. Papillomaviruses : a systematic review. 2017;21:1–21.

18. Jing Y, Wang T, Chen Z, Ding X, Xu J, Mu X, et al. Phylogeny and polymorphism in the long control regions E6, E7, and L1 of HPV Type 56 in women from southwest China. *Mol Med Rep.* 2018;17(5):7131.
19. Burley M, Roberts S. Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. *Pathogens.* 2020;9(6):159–71.
20. Leto M das GP, Santos Júnior GF Dos, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol.* 2011;86(2):306–17.
21. Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, et al. The Papillomavirus Episteme: A major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D499–506.
22. Moens U. Human polyomaviruses and papillomaviruses. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):1–5.
23. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Section IV Virology. In: Jawetz, Melnick, Adelberg's, editors. *Medical Microbiology. Twenty-Six.* New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2013. p. 633–51.
24. Rebrikov D V., Bulina ME, Bogdanova EA, Vagner LL, Lukyanov SA. Complete genome sequence of a novel extrachromosomal virus-like element identified in planarian *Girardia tigrina*. *BMC Genomics.* 2002;3:1–9.
25. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, Doorslaer K van, Hausen H zur, Villiers E-M de. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology.* 2010;401(1):70–9.
26. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013;445(1–2):2–10.
27. Melo TC, Carvalho RF, Mazzucchelli-de-Souza J, Diniz N, Vasconcelos S, Assaf SLMR, et al. Phylogenetic classification and clinical aspects of a new putative Deltapapillomavirus associated with skin lesions in cattle. *Genet Mol Res.* 2014;13(2):2458–69.
28. Chen Z, de Freitas LB, Burk RD. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. *Methods Mol Biol.* 2015;1249:3–26.
29. Mirabello L, Yeager M, Yu K, Clifford GM, Xiao Y, Zhu B, et al. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell.* 2017;170(6):1164–74.
30. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology.* 2013;445(1–2):232–43.
31. Kukimoto I, Muramatsu M. Genetic variations of human papillomavirus type 16: Implications for cervical carcinogenesis. *Jpn J Infect Dis.* 2015;68(3):169–75.
32. Ramas V, Mirazo S, Bonilla S, Ruchansky D, Arbiza J. Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women. *Gene.* 2018;654:103–9.
33. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics.* 2009;12:268–80.

34. Mirabello L, Yeager M, Cullen M, Boland JF, Chen Z, Wentzensen N, et al. HPV16 Sublineage Associations with Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(9):1–9.
35. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer. *Front Microbiol.* 2018;9:1–14.
36. Bravo IG, Felez-Sanchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Heal.* 2015;2015(1):32–51.
37. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease associations. *Rev Med Biol.* 2016;25:2–23.
38. Day PM, Schelhaas M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Curr Opin Virol.* 2014;0:24–31.
39. Lehtinen M, Dillner J. Clinical trials of human papillomavirus vaccines and beyond. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(7):400–10.
40. Hardena ME, Munger K. Human Papillomavirus molecular biology. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2017;772:3–12.
41. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518–27.
42. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32S:S1–6.
43. Mühr LSA, Eklund C, Dillner J. Towards quality and order in human papillomavirus research. *Virology.* 2018;519:74–6.
44. Tomaić V. Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites. *Cancers.* 2016;8(95):1–22.
45. Howley PM, Pfister HJ. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. *Virology.* 2015;479–480:290–6.
46. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis.* 2010;118(6–7):422–49.
47. Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. The paediatric story of human papillomavirus. *Oncol Lett.* 2014;8(2):502–6.
48. Bronnimann MP, Calton CM, Chiquette SF, Li S, Lu M, Chapman JA, et al. Furin Cleavage of L2 during Papillomavirus Infection: Minimal Dependence on Cyclophilins. *J Virol.* 2016;90(14):6224–34.
49. Schäfer G, Blumenthal MJ, Katz AA. Interaction of human tumor viruses with host cell surface receptors and cell entry. *Viruses.* 2015;7(5):2592–617.
50. Calton CM, Bronnimann MP, Manson AR, Li S, Chapman JA, Suarez-Berumen M, et al. Translocation of the papillomavirus L2/vDNA complex across the limiting membrane requires the onset of mitosis. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):1–29.
51. DiGiuseppe S, Bienkowska-Haba M, Sapp M. Human Papillomavirus Entry: Hiding in a Bubble. *J Virol.* 2016;90(18):8032–5.

-
52. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent human papillomavirus infection. *Viruses*. 2021;13(2).
 53. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013;445(1–2):115–37.
 54. Chan YK, Gack MU. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(6):360–73.
 55. Aydin I, Villalonga-Planells R, Greune L, Bronnimann MP, Calton CM, Becker M, et al. A central region in the minor capsid protein of papillomaviruses facilitates viral genome tethering and membrane penetration for mitotic nuclear entry. *PLoS Pathogens*. 2017;13:1–31.
 56. Guion L, Bienkowska-Haba M, DiGiuseppe S, Florin L, Sapp M. PML nuclear body-residing proteins sequentially associate with HPV genome after infectious nuclear delivery. *PLoS Pathog*. 2019;15(2):1–27.
 57. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):215–22.
 58. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011;414(2):153–63.
 59. Graham S V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. *Clin Sci*. 2017;131(17):2201–21.
 60. Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD, et al. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol*. 1991;65(5):2254–60.
 61. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. *J Virol*. 2002;76(19):10009–14.
 62. Van Doorslaer K. Evolution of the Papillomaviridae. *Virology*. 2013;445(1–2):11–20.
 63. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020;10(3116):1–15.
 64. Hu L, Plafker K, Vorozhoko V, Zuna RE, Hanigan MH, Gorbysky GJ, et al. Human Papillomavirus 16 E5 Induces Bi-Nucleated Cell Formation By Cell-Cell Fusion. *Virology*. 2009;384(1):125–34.
 65. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kissel'ov F, Eienkel J, Hoeckel M, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*. 2003;22(25):3977–84.
 66. Gao P, Zheng J. High-risk HPV E5-induced cell fusion: A critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Virol J*. 2010;7:9–11.
 67. Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*. 2003;148(8):1445–53.
 68. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*.; 2010;10:550–60.
-

-
69. Yeo-Teh NSL, Ito Y, Jha S. High-risk human papillomaviral oncogenes E6 and E7 target key cellular pathways to achieve oncogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6): 1706.
 70. Yim E-K, Park J-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 2005;37(6):319–24.
 71. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol.* 1994;68(7):4262–73.
 72. 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(8):3912–20.
 73. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002;89(2):213–28.
 74. Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, Schwartz A. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene.* 2000;19(51):5944–50.
 75. Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of c-myc papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989;8(13):4099–105.
 76. Johnson DG, Schneider-broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front in Biosc.* 1998;447–58.
 77. Boulet G, Horvath C, Broeck D Vanden, Sahebbali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2006–11.
 78. Crawford L V. A study of human papilloma virus DNA. *J Mol Biol.* 1965;13(2):362–72.
 79. Durst 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 U S A.* 1983;80(12):3812–5.
 80. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3(5):1151–7.
 81. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 1985;314(6006):111–4.
 82. Yasumoto S, Burkhardt AL, Doniger J, DiPaolo JA. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol.* 1986;57(2):572–77.
 83. Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene.* 1987;1(3):251–6.
 84. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol.* 1987;61(4):1061–6.
-

-
85. Rosini S, Zappacosta R. Overview on Molecular Markers to Implement Cervical Cancer Prevention: Challenges and Perspectives. In: Broeck D Vanden, editor. *Human Papillomavirus and Related Diseases – From Bench to Bedside – Research Aspects*. Rijeka: InTech; 2012. p. 163–202.
 86. Nahand JS, Taghizadeh-boroujeni S, Karimzadeh M, Borran S, Pourhanifeh MH, Moghoofei M, et al. microRNAs: New prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):17064–99.
 87. Shahi Z, Edalatmanesh MA, Kheirkhah B. Molecular detection of human papilloma virus (Type 16,18) using pcr and its frequency in patients with cervical cancer in Iranian women. *J Obstet Gynecol Cancer Res*. 2020;5(3):110–4.
 88. Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, Tommasino M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedalscience*. 2015;9:1–9.
 89. James CD, Fontan CT, Otoa R, Das D, Prabhakar AT, Wang X, et al. Innate Immune Gene Transcription. *Msphere*. 2020;5(1):1–15.
 90. Stanley M. HPV - Immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*. 2010;5(1):1–6.
 91. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013;31(Suppl 7):H1–31.
 92. Kuguyo O, Tsikai N, Thomford NE, Magwali T, Madziyire MG, Nhachi CFB, et al. Genetic susceptibility for cervical cancer in African populations: What are the host genetic drivers? *Omi A J Integr Biol*. 2018;22(7):468–83.
 93. Hartwig S, St Guily JL, Dominiak-Felden G, Alemany L, De Sanjosé S. Estimation of the overall burden of cancers, precancerous lesions, and genital warts attributable to 9-valent HPV vaccine types in women and men in Europe. *Infect Agent Cancer*. 2017;12(1):1–10.
 94. Tulay P, Serakinci N. The role of human papillomaviruses in cancer progression. *J Cancer Metastasis Treat*. 2016;2(6):201–13.
 95. IARC HPV Working Group. Primary End-points for Prophylactic HPV Vaccine Trials. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. (IARC Working Group Reports, No. 7.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304971/>
 96. Burk RD, Chen Z, Saller C, Tarvin K, Carvalho AL, Scapulatempo-Neto C, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 2017;543(7645):378–84.
 97. Kesić V, editor. *Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka grlića materice*. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd: Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse; 2012. p. 1–88.
 98. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*. 2017;231:119–27.
 99. Athanasiou A, Bowden S, Paraskevaidi M, Fotopoulou C, Martin-Hirsch P, Paraskevaidis E, et al. HPV vaccination and cancer prevention. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2020;65:109–24.
-

100. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. *J Oncol*. 2019;1–11.
101. Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Publica Mex*. 2009;51(Suppl 3):S479–88.
102. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(1):1–20.
103. Arney A, Bennett KM. Molecular diagnostics of human papillomavirus. *Lab Med*. 2010;41(9):523–30.
104. Golfetto L, Alves EV, Martins TR, Sincero TCM, Castro JBS, Dannebrock C, et al. PCR-RFLP assay as an option for primary HPV test. *Brazilian J Med Biol Res*. 2018;51(5):e7098:1–7.
105. 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(3):684–91.
106. Stanley MA, Sterling JC. Host responses to infection with human papillomavirus. *Curr Probl Dermatology*. 2014;45:58–74.
107. Gilham C, Sargent A, Kitchener HC, Peto J. HPV testing compared with routine cytology in cervical screening: long-term follow-up of ARTISTIC RCT. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2019;23(28):1–44.
108. Akinlotan M, Bolin JN, Helduser J, Ojinnaka C, Lichorad A, McClellan D. Cervical Cancer Screening Barriers and Risk Factor Knowledge Among Uninsured Women. *J Community Health*. 2017;42(4):770–8.
109. Dixit R, Bhavsar C, Marfatia YS. Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian J Sex Transm Dis*. 2011;32(1):50–2.
110. Woodman CBJ, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: A longitudinal cohort study. *Lancet*. 2001;357(9271):1831–6.
111. Gaffney DK, Hashibe M, Kepka D, Maurer KA, Werner TL. Too Many Women are Dying from Cervix Cancer: Problems and Solutions. *Gynecol Oncol*. 2018;151(3):547–54.
112. Olusola P. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*. 2019;8(622):14–6.
113. Becerril S, Corchado-cobos R, García-sancha N, Revelles L, Revilla D, Ugalde T, et al. Viruses and skin cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10):1–22.
114. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10516–21.

115. Mirkovic J, Howitt BE, Roncarati P, Demoulin S, Suarez-Carmona M, Hubert P, et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. *J Pathol.* 2015;236(3):265–71.
116. Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S, Lai K, Doyle L, McKeon FD, et al. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Mod Pathol.* 2015;28(7):994–1000.
117. Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol.* 2015;235(4):527–38.
118. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: A key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol.* 2007;212:356–67.
119. Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;2003(31):35–40.
120. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011;6(1):45–57.
121. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene.* 2003;22(8):1225–37.
122. Gao G, Johnson SH, Vasmatzis G, Pauley CE, Tombers NM, Kasperbauer JL, et al. Common fragile sites (CFS) and extremely large CFS genes are targets for human papillomavirus integrations and chromosome rearrangements in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosom Cancer.* 2017;56(1):59–74.
123. Tine BA Van, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenberg RDM, et al. Clonal Selection for Transcriptionally Active Viral Oncogenes during Progression to Cancer. *J Virol.* 2004;78(20):11172–86.
124. Burk RD, Chen Z, Saller C, Tarvin K, Carvalho AL, Scapulatempo-Neto C, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature.* 2017;543(7645):378–84.
125. Gray E, Pett MR, Ward D, Winder DM, Stanley MA, Roberts I, et al. In Vitro Progression of HPV16 Episome-Associated Cervical Neoplasia Displays Fundamental Similarities to Integrant-Associated Carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(10):4081–91.
126. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):1–7.
127. 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(1):307–13.
128. Rachel Skinner S, Wheeler CM, Romanowski B, Castellsagué X, Lazcano-Ponce E, Rowena Del Rosario-Raymundo M, et al. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study. *Int J Cancer.* 2016;138(10):2428–38.

129. Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:217–26.
130. Nayar R, Wilbur DC. The pap test and Bethesda 2014. *Acta Cytol*; 2015;59:121–32.
131. Aban M. Preinvasive Cervical Neoplasia [Internet]. Istanbul: Yeditepe University [Dec 2021]. Available from: <https://slideplayer.com/slide/13102502/79/images/21/Precursor+lesions+for+cervical+cancer.jpg>
132. Nayar R, Wilbur DC, editors. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*. Third Edit. Cham: Springer Nature Switzerland AG; 2015; p. 1–321.
133. Moscicki A-B, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and Risks for Regression of CIN-2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*. 2010;116(6):1373–80.
134. Leung TW, Liu SS, Leung RCY, Chu MMY, Cheung ANY, Ngan HYS. HPV 16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis. *J Med Virol*. 2015;87(6):1022–33.
135. Torres-Rojas FI, Alarcón-Romero LDC, Leyva-Vázquez MA, Ortiz-Ortiz J, Mendoza-Catalán MÁ, Hernández-Sotelo D, et al. Methylation of the L1 gene and integration of human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions. *Oncol Lett*. 2018;15(2):2278–86.
136. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus and the development of human papillomavirus vaccines. In: *Human Papillomavirus: Proving and Using a Viral Cause for Cancer*. Cambridge: Academic Press; 2020. p. 283–97.
137. Tummers B, Burg SH Van Der. High-Risk Human Papillomavirus Targets Crossroads in Immune Signaling. *Viruses*. 2015;7(5):2485–506.
138. Scott ML, Woodby BL, Ulicny J, Raikhy G, Orr AW, Songcock WK, et al. Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. *J Virol*. 2020;94(2):1–23.
139. Roden RBS, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(4):240–54.
140. Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett*. 2002;179(2):205–12.
141. Reiser J, Hurst J, Voges M, Krauss P, Münch P, Iftner T, et al. High-Risk Human Papillomaviruses Repress Constitutive Kappa Interferon Transcription via E6 To Prevent Pathogen Recognition Receptor and Antiviral-Gene Expression. *J Virol*. 2011;85(21):11372–80.
142. Karim R, Meyers C, Backendorf C, Ludigs K, Offringa R, Ommen G-JB van, et al. Human Papillomavirus Deregulates the Response of a Cellular Network Comprising of Chemotactic and Proinflammatory Genes. *PLoS One*. 2011;6(3):e17848:1–12.
143. Lau A, Gray EE, Brunette RL, Stetson DB. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science*. 2015;350(6260):568–71.

-
144. Stern PL. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl 1):S72–81.
 145. Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol.* 2019; 9(682): 1–18.
 146. 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):1–13.
 147. 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(22):8718–25.
 148. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, et al. Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer.* 2011;10:1–18.
 149. Ashrafi GH, Salman NA. Pathogenesis of Human Papillomavirus – Immunological Responses to HPV Infection. In: Rajkumar R, editor. *Human Papillomavirus - Research in a Global Perspective* [Internet]. London: IntechOpen; 2016 [cited 2021 Oct 8]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/51256>
 150. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GSH, Shivji MK, Stanley MA, et al. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(10):3822–7.
 151. Brusselaers N, Shrestha S, Wijgert J van de, Verstraelen H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;221(1):9–18.e8.
 152. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2020;127(2):171–80.
 153. Grabowska AK. The Invisible Enemy – How Human Papillomaviruses Avoid Recognition and Clearance by the Host Immune System. *Open Virol J.* 2013;6(1):249–56.
 154. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol;* 2005;6(4):204.
 155. Roik E, Sharashova E, Kharkova O, Nieboer E, Postoev V, Odland J. Sociodemographic characteristics, sexual behaviour and knowledge about cervical cancer prevention as risk factors for high-risk human papillomavirus infection in Arkhangelsk, North-West Russia. *Int J Circumpolar Health.* 2018;77(1):1–10.
 156. Yetimalar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A, Soylu F. Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(3):805–10.

-
157. Chen Z, Han Y, Song C, Wei H, Chen Y, Huang K, et al. Systematic review and meta-analysis of the prognostic significance of microRNAs in cervical cancer. *Oncotarget*. 2018;9(24):17141–8.
 158. Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Micromnas in breastmilk and the lactating breast: Potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(11):13981–4020.
 159. Abila DB, Wasukira SB, Ainembabazi P, Wabinga H. Burden of Risk Factors for Cervical Cancer Among Women Living in East Africa: An Analysis of the Latest Demographic Health Surveys Conducted Between 2014 and 2017. *JCO Glob Oncol*. 2021;(7):1116–28.
 160. Appleby P, Beral V, De González AB, Colin D, Franceschi S, Green J, et al. Cervical carcinoma and sexual behavior: Collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1060–9.
 161. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2014;135(2):453–66.
 162. Li X, Hu SY, He Y, Hernandez Donoso L, Qu KQ, Van Krieking G, et al. Systematic literature review of risk factors for cervical cancer in the Chinese population. *Women's Heal*. 2018;14:1–9.
 163. Nagelhout G, Ebisch RM, Van Der Hel O, Meerkerk GJ, Magnée T, De Bruijn T, et al. Is smoking an independent risk factor for developing cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer? A systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2021;21(7):781–94.
 164. Mandić A. Faktori rizika za nastanak premalignih i malignih bolesti cerviksa. U: Stanimirović B, Perišić Ž, urednici. Otkrivanje i lečenje bolesti cerviksa, vagine i vulve. Beograd: Datastatus; 2019. p. 27–32.
 165. Alam S, Conway MJ, Chen H-S, Meyers C. The Cigarette Smoke Carcinogen Benzo[a]pyrene Enhances Human Papillomavirus Synthesis. *J Virol*. 2008;82(2):1053–8.
 166. Fang, Yu X-M, Zhang S-H, Yang Y. Effect of smoking on high-grade cervical cancer in women on the basis of human papillomavirus infection studies. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(8):184–9.
 167. IARC Working Group. Human Papillomaviruses. In: *Biological Agents, A review of human carcinogens, Volume 100 B*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. p. 255–313.
 168. Deluca GD, Basiletti J, Schelover E, Vásquez ND, Alonso JM, Marín HM, et al. Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. *Brazilian J Infect Dis*. 2011;15(6):567–72.
 169. Okoye JO. Herpes Simplex Virus Type 2: Bystander or Active Player in Cervical Carcinogenesis? *J Gynecol Womens Heal [Internet]*. 2018 [cited 2021 Mart 10];12(2). Available from: <https://juniperpublishers.com/jgwh/pdf/JGWH.MS.ID.555832.pdf>
-

170. Toliman PJ. Innovative approaches for cervical cancer screening in Papua New Guinea : Evaluation of novel point-of-care test and treat algorithms in a high-burden setting. Dissertation. Sydney, Australia: Australia's Global University, 2020.
171. Karimzadeh M, Nasiri M, Mirzaei HR, Hossein M. HHS Public Access. 2021;146(2):305–20.
172. Kour P, Lal M, Panjaliya R, Dogra V, Gupta S. Study of the risk factors associated with cervical cancer. *Biomed Pharmacol J.* 2010;3(1):179–82.
173. 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(6): e66555:1–8.
174. Hull R, Mbele M, Makhafola T, Hicks C, Wang SM, Reis RM, et al. Cervical cancer in low and middle-income countries (Review). *Oncol Lett.* 2020;20(3):2058–74.
175. Goodson WH, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Ali AM, de Cerain Salsamendi AL, et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: The challenge ahead. *Carcinogenesis.* 2015;36:S254–96.
176. Villa LL, Denny L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynecol Obstet.* 2006;94(Suppl 1):S71–80.
177. Dutra I, Foroni I, Couto AR, Lima M, Bruges-Armas J. Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus. In: Broeck D Vanden, editor. *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects.* Rijeka: InTech; 2012. p. 203–46.
178. Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Cruz-Valdez A, Ortiz-Panozo E, Maldonado-Gama M, Chihu-Amparan L, et al. Validation of Serological Antibody Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine (United States).* 2016;95(6):1–11.
179. Zhao C, Crothers BA, Ghofrani M, Li Z, Souers RJ, Hussain M, et al. Human papillomavirus genotyping testing practice in 2014: Results of a College of American Pathologists national survey. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(12):1364–70.
180. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology.* 2012;9(1):1–9.
181. Chan PKS, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2012;49(4):117–36.
182. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32S:S43–51.
183. Aboulnasr A, Sherif N, Ali M, Elmahy M, Shalaby M, Soliman A , Salem M. Molecular Diagnosis of Human Papilloma Virus Infection. *Med J Cairo Univ.* 2020;88(1):471–80.
184. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers;* 2009;24:215–22.

185. Garland SM, Tabrizi S. Methods for HPV Detection: Polymerase Chain Reaction Assays. In: Monsonogo J, editor. *Emerging Issues on HPV Infections: From Science to Practice*. Basel: Karger Publishers; 2006. p. 63–72.
186. Chan PKS, Cheung TH, Tam AOY, Lo KWK, Yim SF, Yu MMY, et al. Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. *Int J Cancer*. 2006;118(1):243–5.
187. Lee JK, Hong YJ, Um TH, Lee EH, Chi HS, Koh JS, et al. Detection and identification of human papillomavirus using a PCR-restriction fragment mass polymorphism assay. *Mol Med Rep*. 2011;4(4):645–50.
188. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 2010;8:1139–62.
189. Savić Pavićević D, Matić G, urednici. *Molekularna biologija 1*. Second. Beograd: NNK International; 2020.
190. Lojo-Kadrić N, Pojskić N, Pojskić L, urednici. *Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji*. Pojskić N, editor. Sarajevo: Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju; 2018.
191. Hall MT, Simms KT, Lew J Bin, Smith MA, Brotherton JM, Saville M, et al. The projected timeframe until cervical cancer elimination in Australia: a modelling study. *Lancet Public Heal*. 2019;4(1):e19–27.
192. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017;123(13):2404–12.
193. Almeida AM, Queiroz JA, Sousa F, Sousa Â. Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins. *Drug Discov Today*. 2019;24(10):2044–57.
194. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):89–99.
195. 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(12):1293–302.
196. Schlecht NF, Diaz A, Nucci-Sack A, Shyhalla K, Shankar V, Guillot M, et al. Incidence and Types of Human Papillomavirus Infections in Adolescent Girls and Young Women Immunized With the Human Papillomavirus Vaccine. *JAMA Netw Open*. 2021;4(8):e2121893:1–13.
197. GlaxoSmithKline Vaccine HPV-007 Study Group, Romanowski B, de Borja PC, Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, Aoki F, Ramjattan B, Shier RM, Somani R, Barbier S, Blatter MM, Chambers C, Ferris D, Gall SA, Guerra FA, Harper DM, Hedrick J SA. Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years. *Lancet*. 2009;374(9706):1975–85.

198. Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, Bouchard 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(8):711–23.
199. Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines – A review of the first decade. *Gynecol Oncol*. 2017;146(1):196–204.
200. Nygård 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(8):943–8.
201. Garland SM, Paavonen J, Jaisamrarn U, Naud P, Salmerón J, Chow SN, et al. Prior human papillomavirus-16/18 AS04-adjuvanted vaccination prevents recurrent high grade cervical intraepithelial neoplasia after definitive surgical therapy: Post-hoc analysis from a randomized controlled trial. *Int J Cancer*. 2016;139(12):2812–26.
202. Malagón T, Drolet M, Boily MC, Franco EL, Jit M, Brisson J, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(10):781–9.
203. Ruiz W, McClements WL, Jansen KU, Esser MT. Kinetics and isotype profile of antibody responses in rhesus macaques induced following vaccination with HPV 6, 11, 16 and 18 L1-virus-like particles formulated with or without Merck aluminum adjuvant. *J Immune Based Ther Vaccines*. 2005;3(1):1–11.
204. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. *Lancet Glob Heal*. 2016;4(7):e453–63.
205. Hancock G, Hellner K, Dorrell L. Therapeutic HPV vaccines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:59–72.
206. Đurđević S, Kesić V, urednici. *Ginekološka onkologija. Maligni tumori grlića materice*. Novi Sad: Udruženje za ginekološku Onkologiju; 2009.
207. Jansen EEL, Zielonke N, Gini A, Anttila A, Segnan N, Vokó Z, et al. Effect of organised cervical cancer screening on cervical cancer mortality in Europe: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2020;127:207–23.
208. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med*. 2018;7(10):5217–36.
209. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res*. 2015;1:22–31.
210. IARC. Cancer screening in the European Union. In: Report on the implementation of the Council Recommendation on cancer screening. Second Report. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 17–18.
211. Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzerth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Res*. 2018;5:46–58.

212. Ma W, Melief CJ, van der Burg SH. Control of immune escaped human papilloma virus is regained after therapeutic vaccination. *Curr Opin Virol.* 2017;23:16–22.
213. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1155–66.
214. Pittet MJ. Behavior of immune players in the tumor microenvironment. *Curr Opin Oncol.* 2009;21(1):53–9.
215. Shen K-Y, Chang L-S, Leng C-H, Liu S-J. Self-adjuvanting lipopeptides for therapeutic HPV vaccine development: potential clinical impact. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14(3):383–94.
216. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol.* 2015;4:1–6.
217. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(1):46–60.
218. Han KT, Sin J-I. Clinical experimental vaccine DNA vaccines targeting human diseases: progresses in animal and clinical studies. *Clin Exp Vaccine Res.* 2013;2:106–14.
219. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
220. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Heal.* 2020;8(2):e191–203.
221. Hui C, Bai H, Liu J, Lu X, Wang S, Zhang Z, et al. Accuracy of HPV E6/E7 mRNA examination using in situ hybridization in diagnosing cervical intraepithelial lesions. *Diagn Pathol.* 2021;16(1):1–10.
222. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941–53.
223. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in Europe. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(9):1423–33.
224. Prabhu M, Eckert LO. Development of World Health Organization (WHO) recommendations for appropriate clinical trial endpoints for next-generation Human Papillomavirus (HPV) vaccines. *Papillomavirus Res.* 2016;2:185–9.
225. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Heal.* 2021;8:1–19.
226. Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha R, et al. The global burden of women's cancers: an unmet grand challenge in global health Europe PMC Funders Group. *Lancet.* 2017;389(10071):847–60.

-
227. 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(5):E359–86.
 228. LaVigne AW, Triedman SA, Randall TC, Trimble EL, Viswanathan AN. Cervical cancer in low and middle income countries: Addressing barriers to radiotherapy delivery. *Gynecol Oncol Rep*; 2017;22:16–20.
 229. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado J, Gómez D, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases Report in World [Internet]. Barcelona: ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre); 2021 [cited 2021 Dec 20]. Available from: www.hpvcentre.com.
 230. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. et al. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 v1.0 [Internet]. Lyon: IARC CancerBase No. 11 [cited 2021 Oct 26]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Databases/>
 231. Song B, Ding C, Chen W, Sun H, Zhang M, Chen W. Incidence and mortality of cervical cancer in China, 2013. *Chinese J Cancer Res*. 2017;29(6):471–6.
 232. Zhang SK, Guo Z, Wang P, Kang LN, Jia MM, Wu ZN, et al. The Potential Benefits of HPV E6/E7 mRNA Test in Cervical Cancer Screening in China. *Front Oncol*. 2020;10:1–7.
 233. Miljus D, Zivkovic Perisic S, Božić Z, urednici. *Maligni tumori u Republici Srbiji*. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”; 2020.
 234. Miljuš D, Zivkovic Perisic S, Božić Z, urednici. *Maligni tumori u Republici Srbiji*. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”; 2017.
 235. Vukićević D, Mitić R, Mijović M, Mitić N, Vitković L, Đerković B, et al. Deskriptivno-epidemiološke karakteristike karcinoma grlića materice. *Prax Med*. 2015;44(1):67–72.
 236. Mattiuzzi C, Lippi G. Cancer statistics: A comparison between World Health Organization (WHO) and Global Burden of Disease (GBD). *Eur J Public Health*. 2020;30(5):1026–7.
 237. Hoda RS, Loukeris K, W. A-KF. Gynecologic Cytology on Conventional and Liquid-Based Preparations: A Comprehensive Review of Similarities and Differences. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(3):257–78.
 238. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;73(3):495–504.
 239. Sacace Biotechnologies. SaMag Extraction kit User Manual, 2014. Como (Italy): Sacace Biotechnologies; 2014.
 240. Sacace Biotechnologies. HPV High Risk Typing Real-TM, 2013. Como (Italy): Sacace Biotechnologies; 2013.
 241. Micalessi IM, Boulet GAV, Bogers JJ, Benoy IH, Depuydt CE. High-throughput detection, genotyping and quantification of the human papillomavirus using real-time PCR. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(4):655–61.
-

-
242. Qiagen. miRNeasy Mini Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies, 2005. Hilden (Germany): Qiagen; 2005.
 243. Invitrogen. TURBO DNA-free™ Kit User Guide, 2018. Waltham (MA, USA): Invitrogen; 2018.
 244. Lindh M, Görander S, Andersson E, Horal P, Mattsby-Balzer I, Ryd W. Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *J Clin Virol.* 2007;40(4):321–4.
 245. Applied Biosystems. AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents, 2015. Waltham (MA, USA): Applied Biosystems; 2015.
 246. Yamaguchi M, Sekine M, Hanley SJB, Kudo R, Hara M, Adachi S, et al. Risk factors for HPV infection and high-grade cervical disease in sexually active Japanese women. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–9.
 247. Pallant J. SPSS: priručnik za preživljavanje; postupni vodič kroz analizu podataka dobijenih pomoću programa IBM SPSS. 6. izdanje. Beograd: Mikro knjiga; 2017.
 248. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Science.* Second edition. Mahwah: Lawrence Erlbaum Associates Inc.; 1988.
 249. Ascitutto KC, Borgfeldt C, Forslund O. 14-type HPV mRNA test in triage of HPV DNA-positive postmenopausal women with normal cytology. *BMC Cancer.* 2020;20(1):1–10.
 250. Austin RM. Technology matters: The clinical utility of HPV mRNA testing compared to DNA testing. *Contemp Ob Gyn [Internet].* 2018; [cited 2021 Dec 6]:1–6. Available from: <https://www.contemporaryobgyn.net/view/technology-matters-clinical-utility-hpv-mrna-testing-compared-dna-testing>
 251. Knežević A, Aleksić G, Soldatović I, Banko A, Jovanović T. Cervical human papillomavirus infection in Serbia: Risk factors, prevalence and genotype distribution in women with normal cervical cytology. *Arch Biol Sci.* 2012;64(4):1277–84.
 252. Kovacevic G, Nikolic N, Jovanovic-Galovic A, Hrnjakovic-Cvjetkovic I, Vuleta D, Patić A, et al. Frequency of twelve carcinogenic human papilloma virus types among women from the South Backa region, Vojvodina, Serbia. *Turkish J Med Sci.* 2016;46(1):97–104.
 253. Kovacevic G, Milosevic V, Knezevic P, Knezevic A, Knezevic I, Radovanov J, et al. Prevalence of oncogenic Human papillomavirus and genetic diversity in the L1 gene of HPV16 HPV 18 HPV31 and HPV33 found in women from Vojvodina Province Serbia. *Biologicals.* 2019;58:57–63.
 254. Kovacevic G, Milosevic V, Nikolic N, Patić A, Dopudj N, Radovanov J, et al. The prevalence of 30 HPV genotypes detected by EUROArray HPV in cervical samples among unvaccinated women from Vojvodina province, Serbia. *PLoS One.* 2021;16:1–13.
 255. Milutin-Gašperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Gree M. Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. *Coll Antropol.* 2007;31(Suppl 2):89–96.
-

-
256. Sabol I, Gašperov NM, Matovina M, Božinovic K, Grubišić G, Fistoncic I, et al. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. *PLoS One*. 2017;12(7):1–12.
257. Grozdanov P, Zlatkov V, Ganchev G, Karagiosov I, Toncheva D, Galabov AS. HPV prevalence and type distribution in women with normal or abnormal pap smear in Bulgaria. *J Med Virol*. 2014;86(11):1905–10.
258. Schettino MT, De Franciscis P, Schiattarella A, La Manna V, Della Gala A, Caprio F, et al. Prevalence of HPV Genotypes in South Europe: Comparisons between an Italian and a Turkish Unvaccinated Population. *J Environ Public Health*. 2019:1–7.
259. Mijović G, Jovanović T, Kapulica NK, Jokmanović N, Bujko M, Golubović M. Frequency and risk factors of cervical human papilloma virus infection in women in Montenegro. *Arch Biol Sci*. 2014;66(4):1653–8.
260. Ursu R, Onofriescu M, Nemescu D, Iancu LS. HPV prevalence and type distribution in women with or without cervical lesions in the Northeast region of Romania. *Viol J*. 2011;8:1–5.
261. Andonovska J. Genotypic distribution and prevalence of the HPV infection in Macedonia. *Int J Infect Dis*. 2014;21S:398.
262. Argyri E, Tsimplaki E, Daskalopoulou D, Stravopodis DJ, Kouikoglou O, Terzakis E, et al. E6/E7 mRNA expression of high-risk HPV types in 849 Greek women. *Anticancer Res*. 2013;33(9):4007–12.
263. Filipi K, Tedeschini A, Paolini F, Celicu S, Morici S, Kota M, et al. Genital human papillomavirus infection and genotype prevalence among Albanian women: A cross-sectional study. *J Med Virol*. 2010;82(7):1192–6.
264. Gradska uprava za zdrastvo Grada Novog Sada. Značaj HPV DNK analize u prevenciji nastanka karcinoma grlića materice-2016. Izveštaj. Novi Sad (RS): Institut za javno zdravlje Vojvodine, Dom zdravlja Novi Sad; 2016. Br.: XII-51-36-10-1/2016
265. Gradska uprava za zdrastvo Grada Novog Sada. Značaj HPV DNK analize u prevenciji nastanka karcinoma grlića materice-2017. Izveštaj. Novi Sad (RS): Institut za javno zdravlje Vojvodine, Dom zdravlja Novi Sad; 2017. Br.: XII-51-49-8-1/2017
266. Salimovic-Bešić I, Hukic M. Potential coverage of circulating HPV types by current and developing vaccines in a group of women in Bosnia and Herzegovina with abnormal Pap smears. *Epidemiol Infect*. 2015;143(12):2604–12.
267. Učakar V, Poljak M, Klavs I. Pre-vaccination prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) types in Slovenian women: A cervical cancer screening based study. *Vaccine*. 2012;30(2):116–20.
268. LeConte BA, Szaniszló P, Fennewald SM, Lou DI, Qiu S, Chen NW, et al. Differences in the viral genome between HPV-positive cervical and oropharyngeal cancer. *PLoS One*. 2018;13(8):1–15.
269. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, De Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(10):2349–59.
-

-
270. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, 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.* 2010;202(12):1789–99.
 271. de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048–56.
 272. Stamenković M, Knežević A, Knežević I, Kuzmanović I, Karalić D, Milenković S, et al. High-risk human papilloma virus genotypes in cervical carcinoma of Serbian women: Distribution and association with pathohistological findings. *Biologicals.* 2016;44(5):412–6.
 273. Tasić D. Povezanost polimorfizama gena za TNF- α , IFN- γ i IL-12 sa nastankom cervikalne intraepitelijalne neoplazije kod žena sa infekcijom humanim papiloma virusom. Disertacija. Beograd, Republika Srbija: Univerzitet u Beogradu, 2019.
 274. Herraiz-Hernandez E, Preda O, Alonso S, Pardo RS, Olmo A. Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens with the HPV Direct Flow CHIP System. *Open Virol J.* 2013;7(1):91–5.
 275. Kovanda A, Juvan U, Kocjan BJ, Seme K, Jan N, Bokal EV, et al. Pre-vaccination distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN 3) lesions in Slovenia. 2009;18(2):47–52.
 276. Karadža M, Lepej SŽ, Planinić A, Grgić I, Ćorušić A, Planinić P, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with high-grade cervical intraepithelial lesions and cervical carcinoma and analysis of human papillomavirus-16 genomic variants. *Croat Med J.* 2021;62(1):68–79.
 277. Dabeski D, Dabeski A, Antovska V, Trajanova M, Todorovska I, Sima A. Human papillomavirus infections in women with and without squamous cell abnormalities of the uterine cervix. *Scr Med (Brno).* 2019;50(2):69–76.
 278. Tsiodras S, Hatzakis A, Spathis A, Margari N, Meristoudis C, Chranioti A, et al. Molecular epidemiology of HPV infection using a clinical array methodology in 2952 women in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(8):1185–8.
 279. Rössler L, Reich O, Horvat R, De Souza SC, Holl K, Joura EA. Human papillomavirus in high-grade cervical lesions: Austrian data of a European multicentre study. *Wien Klin Wochenschr.* 2013;125(19–20):591–9.
 280. Carozzi F, De Marco L, Gillio-Tos A, Del Mistro A, Girlando S, Baboci L, et al. Age and geographic variability of human papillomavirus high-risk genotype distribution in a large unvaccinated population and of vaccination impact on HPV prevalence. *J Clin Virol.* 2014;60(3):257–63.
 281. Ebisch RMF, Ketelaars PJW, Van Der Sanden WMH, Schmeink CE, Lenselink CH, Siebers AG, et al. Screening for persistent high-risk HPV infections may be a valuable screening method for young women; A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2018;13(10):1–11.

-
282. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44(10):910–7.
283. Baba S, Taguchi A, Kawata A, Hara K, Eguchi S, Mori M, et al. Differential expression of human papillomavirus 16-, 18-, 52-, and 58-derived transcripts in cervical intraepithelial neoplasia. *Virol J*. 2020;17(1):1–10.
284. Krashias G, Koptides D, Christodoulou C. HPV prevalence and type distribution in Cypriot women with cervical cytological abnormalities. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–10.
285. Leinonen MK, Anttila A, Malila N, Dillner J, Forslund O, Nieminen P. Type- and age-specific distribution of human papillomavirus in women attending cervical cancer screening in Finland. *Br J Cancer*. 2013;109(11):2941–50.
286. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: A subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*. 2011;12(9):880–90.
287. Bowden SJ, Fiander AN, Hibbitts S. HPV 51: A candidate for type-replacement following vaccination? *MedRxiv* [Internet]. 2021 July [cited 2021 Dec 8]; 195:1–24. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.07.27.21261121v1.full.pdf+html>
288. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, et al. Prevalence and viral load of 51 genital human papillomavirus types and three subtypes. *Int J Cancer*. 2013;132(10):2395–403.
289. Yuce K, Pinar A, Salman MC, Alp A, Sayal B, Dogan S, et al. Detection and genotyping of cervical HPV with simultaneous cervical cytology in Turkish women: A hospital-based study. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286(1):203–8.
290. Mollers M, Boot Hein J, Vriend Henrike J, King Audrey J, van den Broek Ingrid VF, van Bergen Jan EAM, et al. Prevalence, incidence and persistence of genital HPV infections in a large cohort of sexually active young women in the Netherlands. *Vaccine*. 2013;31(2):394–401.
291. Piana A, Sotgiu G, Cocuzza C, Musumeci R, Marras V, Pischedda S, et al. High HPV-51 Prevalence in Invasive Cervical Cancers: Results of a Pre-Immunization Survey in North Sardinia, Italy. *PLoS One*. 2013;8(5):6–11.
292. Dalgo Aguilar P, Loján González C, Córdova Rodríguez A, Acurio Paéz K, Arévalo AP, Bobokova J. Prevalence of High-Risk Genotypes of Human Papillomavirus: Women Diagnosed with Premalignant and Malignant Pap Smear Tests in Southern Ecuador. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2017;2017:12–4.
293. Tang SY, Liao YQ, Hu Y, Shen HY, Wan YP, Wu YM. HPV Prevalence and Genotype Distribution Among Women From Hengyang District of Hunan Province, China. *Front Public Heal*. 2021;9:1–9.
-

-
294. Burger EA, Portnoy A, Campos NG, Sy S, Regan C, Kim JJ. Choosing the optimal HPV vaccine: The health impact and economic value of the nonavalent and bivalent HPV vaccines in 48 Gavi-eligible countries. *Int J Cancer*. 2021;148(4):932–40.
 295. Senkomago V, Jane Henley S, Thomas CC, Mix JM, Markowitz LE, Saraiya M. Morbidity and Mortality Weekly Report Human Papillomavirus-Attributable Cancers-United States, 2012-2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68(33):724–8.
 296. Plummer M, Vaccarella S, Franceschi S. Multiple human papillomavirus infections: The exception or the rule? *J Infect Dis*. 2011;203(7):891–3.
 297. Hajia M, Sohrabi A. Possible synergistic interactions among multiple HPV genotypes in women suffering from Genital Neoplasia. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2018;19(3):785–9.
 298. Kovačević G, Jovanović-Galović A, Petrović V, Vinarž Ž, Marinković G, Brašanac B, et al. Human papillomavirus infection prevalence in female university students in Novi Sad, Serbia. *Srp Arh Celok Lek*. 2016;144(5–6):300–6.
 299. Dabeski D, Duvlis S, Basheska N, Antovska V, Stojovski M, Trajanova M, et al. Comparison Between HPV DNA Testing and HPV E6/E7 MRNA Testing in Women with Squamous Cell Abnormalities of the Uterine Cervix. *Prilozi*. 2019;40(1):51–8.
 300. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2014;26:13–21.
 301. Bruno MT, Scalia G, Cassaro N, Boemi S. Multiple HPV 16 infection with two strains: A possible marker of neoplastic progression. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1–7.
 302. Herrero R. Human papillomavirus (HPV) vaccines: Limited cross-protection against additional HPV types. *J Infect Dis*. 2009;199(7):919–22.
 303. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. Human papillomavirus infection with multiple types: Pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis*. 2011;203(7):910–20.
 304. Quint W, Jenkins D, Moliñ A, Struijk L, Van De Sandt M, Doorbar J, et al. One virus, one lesion - Individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol*. 2012;227(1):62–71.
 305. Boulet GAV, Horvath CAJ, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: Important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(4):810–7.
 306. Wright TC. Cervical cancer screening in the 21st century: Is it time to retire the Pap smear? *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50(2):313–23.
 307. Coquillard G, Palao B, Patterson BK. Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA. *Gynecol Oncol*. 2011;120(1):89–93.
 308. Tüney İ, Altay A, Ergünay K, Önder SÇ, Usubütün A, Salman MC, et al. Hpv types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey. *Turkish J Med Sci*. 2017;47(1):194–200.

-
309. Fontecha N, Basaras M, Hernáez S, Andía D, Cisterna R. Assessment of human papillomavirus E6/E7 oncogene expression as cervical disease biomarker. *BMC Cancer*. 2016;16(1):1–7.
 310. Rossi PG, Bisanzi S, Allia E, Mongia A, Carozzi F, Gillio-Tos A, et al. Determinants of viral oncogene E6-E7 mRNA overexpression in a population-based large sample of women infected by high-risk human papillomavirus types. *J Clin Microbiol*. 2017;55(4):1056–65.
 311. Oliveira A, Verdasca N, Pista A. Use of the NucliSENS EasyQ HPV assay in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol*. 2013;85(7):1235–41.
 312. Yao Y li, Tian Q fang, Cheng B, Cheng Y fan, Ye J, Lu W guo. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA detection in cervical exfoliated cells: a potential triage for HPV-positive women. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18(3):256–62.
 313. Salimović-Bešić I, Tomić-Čiča A, Smailji A, Hukić M. Comparison of the detection of HPV-16, 18, 31, 33, and 45 by type-specific DNA- and E6/E7 mRNA-based assays of HPV DNA positive women with abnormal Pap smears. *J Virol Methods*. 2013;194(1–2):222–8.
 314. Bruno MT, Ferrara M, Fava V, Rapisarda A, Coco A. HPV genotype determination and E6/E7 mRNA detection for management of HPV positive women. *Virol J*. 2018;15(1):1–5.
 315. Pan D, Zhang CQ, Liang QL, Hong XC. An efficient method that combines the ThinPrep cytologic test with E6/E7 mRNA testing for cervical cancer screening. *Cancer Manag Res*. 2019;11:4773–80.
 316. Pruski D, Millert-Kalinska S, Lewek A, Kedzia W. Sensitivity and specificity of HR HPV E6/E7 mRNA test in detecting cervical squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Ginekol Pol*. 2019;90(2):66–71.
 317. Wang J, Xu X. The diagnostic value of HPV E6/E7 mRNA test in young women with cervical squamous intraepithelial lesion: A Retrospective Analysis. *Res Sq*. 2021;4:1–14.
 318. Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, Marandino F, Carosi M, Rollo F, et al. Diagnostic and prognostic validity of the human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples of HC2-positive patients. *Cancer Causes Control*. 2011;22(6):869–75.
 319. Molina MA, Carosi Diatricch L, Castany Quintana M, Melchers WJG, Andralojc KM. Cervical cancer risk profiling: molecular biomarkers predicting the outcome of hrHPV infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20(11):1099–120.
 320. Baron C, Henry M, Tamalet C, Villeret J, Richet H, Carcopino X. Relationship Between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA Detection and Quantitation and E6/E7 mRNA Detection Among a Series of Cervical Specimens With Various Degrees of Histological Lesions. *J Med Virol*. 2015;87:1389–96.
 321. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Hagmar B. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol*. 2006;100(1):95–100.
-

-
322. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: Biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15(5):727–46.
323. van den Heuvel CNAM, Loopik DL, Ebisch RMF, Elmelik D, Andralojc KM, Huynen M, et al. RNA-based high-risk HPV genotyping and identification of high-risk HPV transcriptional activity in cervical tissues. *Mod Pathol*. 2020;33(4):748–57.
324. Wang HY, Lee D, Park S, Kim G, Kim S, Han L, et al. Diagnostic performance of HPV E6/E7 mRNA and HPV DNA assays for the detection and screening of oncogenic human papillomavirus infection among woman with cervical lesions in China. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2015;16(17):7633–40.
325. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13.
326. Mittal S, Basu P, Muwonge R, Banerjee D, Ghosh I, Sengupta MM, et al. Risk of high-grade precancerous lesions and invasive cancers in high-risk HPV-positive women with normal cervix or CIN 1 at baseline—A population-based cohort study. *Int J Cancer*. 2017;140(8):1850–9.
327. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*. 2010;116(6):1373–80.
328. Ernstson A, Forslund O, Borgfeldt C. Promotion of Cervical Screening among Long-term Non-attendees by Human Papillomavirus Self-sampling. *J Cancer Prev*. 2021;26(1):25–31.
329. Cattani P, Siddu A, D’Onghia S, Marchetti S, Santangelo R, Vellone VG, et al. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2136–41.
330. Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: A review. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2011;51(2):103–8.
331. Origoni M, Cristoforoni P, Carminati G, Stefani C, Costa S, Sandri MT, et al. E6/E7 mRNA testing for human papilloma virus-induced high-grade cervical intraepithelial disease (CIN2/CIN3): A promising perspective. *Ecancermedalscience*. 2015;9:1–10.
332. Bordigoni A, Motte A, Tissot-Dupont H, Colson P, Desnues C. Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. *Sci Rep [Internet]*. 2021 [cited 2021 Dec 30];11(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83489-2>
333. Derby A, Mekonnen D, Woldeamanuel Y, Van Ostade X, Abebe T. HPV E6/E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): A systematic review. *Infect Agent Cancer*. 2020;15(1):1–10.
334. Macedo ACL, Gonçalves JCN, Bavaresco DV, Grande AJ, Chiaramonte Silva N, Rosa MI. Accuracy of mRNA HPV tests for triage of precursor lesions and cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Oncol*. 2019;2019: 6935030:1–14.
-

-
335. Zorzi M, Del Mistro A, Giorgi Rossi P, Laurino L, Battagello J, Lorio M, et al. Risk of CIN2 or more severe lesions after negative HPV-mRNA E6/E7 overexpression assay and after negative HPV-DNA test: Concurrent cohorts with a 5-year follow-up. *Int J Cancer*. 2020;146(11):3114–23.
 336. Forslund O, Miriam Elfström K, Lamin H, Dillner J. HPV-mRNA and HPV-DNA detection in samples taken up to seven years before severe dysplasia of cervix uteri. *Int J Cancer*. 2019;144(5):1073–81.
 337. Iftner T, Becker S, Neis KJ, Castanon A, Iftner A, Holz A, et al. Head-to-head comparison of the RNA-based aptima human papillomavirus (HPV) assay and the DNA-based hybrid capture 2 HPV test in a routine screening population of women aged 30 to 60 years in Germany. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2509–16.
 338. Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjänen K, Smith JS. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (The FASE Study). *Gynecol Oncol*. 2012;125(1):175–80.
 339. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. *Expert Rev Mol Med*. 2017;19(e1):1–20.
 340. Sun J, Yue Y, Li R, Sun Q, Hu C, Ge X, et al. Detection of HPV E6/E7 mRNA in the diagnosis of cervical cancer and precancerous lesions after kidney transplantation. *Am J Transl Res*. 2021;13(6):7312–7.
 341. Galen RS. Application of the predictive value model in the analysis of test effectiveness. *Clin Lab Med*. 1982;2(4):685–99.
 342. Cox JT, Castle PE, Behrens CM, Sharma A, Wright TC, Cuzick J. Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: Results from the ATHENA HPV study. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(3):184.e1–184.e11.
 343. Koliopoulos G, Vn N, Santesso N, Bryant A, Ppl M, Ra M, et al. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PPL, Mustafa RA, Schünemann H, Paraskevidis E, Arbyn M. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;8:CD008587.
 344. Baumann A, Henriques J, Selmani Z, Meurisse A, Lepiller Q, Vernerey D, et al. HPV16 load is a potential biomarker to predict risk of high-grade cervical lesions in high-risk HPV-infected women: A large longitudinal french hospital-based cohort study. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4149.
 345. Johansson H, Bjelkenkrantz K, Darlin L, Dillner J, Forslund O. Presence of high-risk HPV mRNA in relation to future high-grade lesions among high-risk HPV DNA positive women with minor cytological abnormalities. *PLoS One*. 2015;10(4):1–9.
 346. Liu S, Minaguchi T, Lachkar B, Zhang S, Xu C, Tenjimbayashi Y, et al. Separate analysis of human papillomavirus E6 and E7 messenger RNAs to predict cervical neoplasia progression. *PLoS One*. 2018;13(2):6–17.

-
347. Cheung LC, Egemen D, Chen X, Katki HA, Demarco M, Wisner AL, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines: Methods for Risk Estimation, Recommended Management, and Validation. *J Low Genit Tract Dis.* 2020;24(2):90–101.
 348. Clarke MA, Unger ER, Zuna R, Nelson E, Darragh TM, Cremer M, et al. A Systematic Review of Tests for Postcolposcopy and Posttreatment Surveillance. *J Low Genit Tract Dis.* 2020;24(2):148–56.
 349. Tan G, Duan M, Li Y, Zhang N, Zhang W, Li B, et al. Distribution of HPV 16 E6 gene variants in screening women and its associations with cervical lesions progression. *Virus Res* [Internet]. 2019;273:197740. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197740>
 350. Zappacosta R, Gatta DMP, Marinucci P, Capanna S, Lattanzio G, Caraceni D, et al. Role of E6/E7 mRNA test in the diagnostic algorithm of HPV-positive patients showing ASCUS and LSIL: Clinical and economic implications in a publicly financed healthcare system. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(1):137–50.
 351. Martí C, Marimón L, Glickman A, Henere C, Saco A, Rakislova N, et al. Usefulness of E7 mRNA in HPV16-positive women to predict the risk of progression to HSIL/CIN2+. *Diagnostics.* 2021;11(9):1–11.
 352. Duan L, Du H, Wang C, Huang X, Qu X, Shi B, et al. The effectiveness of HPV viral load, reflected by Cobas 4800 HPV-Ct values for the triage of HPV-positive women in primary cervical cancer screening: Direct endocervical samples. *PLoS One.* 2020;15(5):1–10.
 353. Song F, Du H, Wang C, Huang X, Qu X, Wei L, et al. The effectiveness of human papillomavirus load, reflected by cycle threshold values, for the triage of HPV-positive self-samples in cervical cancer screening. *J Med Screen.* 2021;28(3):318–24.
 354. Wu MZ, Li WN, Cha N, Tian LX, Zhang YI, Wu X, et al. Diagnostic Utility of HPV16 E6 mRNA or E7 mRNA Quantitative Expression for Cervical Cells of Patients with Dysplasia and Carcinoma. *Cell Transplant.* 2018;27(9):1401–6.
 355. 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(1):1–9.
 356. Loopik DL, Int'Hout J, Ebisch RMF, Melchers WJG, Massuger LFAG, Siebers AG, et al. The risk of cervical cancer after cervical intraepithelial neoplasia grade 3: A population-based cohort study with 80,442 women. *Gynecol Oncol.* 2020;157(1):195–201.
 357. Sahlgren H, Elfström KM, Lamin H, Carlsten-Thor A, Eklund C, Dillner J, et al. Colposcopic and histopathologic evaluation of women with HPV persistence exiting an organized screening program. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2020;222(3):253.e1–253.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.09.039>
 358. Yang HX, Zhong Y, Lv WH, Yu H. Factors associated with human papillomavirus infection - Findings from a cervical cancer screening program for female employees in Beijing. *Cancer Manag Res.* 2019;11:8033–41.
-

359. Kahn JA, Rosenthal SL, Succop PA, Ho GYF, Burk RD. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *J Pediatr.* 2002;141(5):718–23.
360. Medina MIS, de Amaya MP. Risk factors for cervical cancer and papanicolaou test in marginalized adolescents in bogotá, colombia. *Rev Ciencias la Salud.* 2020;18(1):37–51.
361. Medina-Contreras O, Luvián-Morales J, Valdez-Palomares F, Flores-Cisneros L, Sánchez-López MS, Soto-Lugo JH, et al. Immunonutrition in Cervical Cancer: Immune Response Modulation By Diet. *Rev Invest Clin.* 2020;72(4):219–30.
362. Kelly J. Condoms and STDs: Fact Sheet for Public Health Personnel. *Br J Hosp Med.* 1996;56(7):370.
363. Gadducci A, Cosio S, Fruzzetti F. Estro-progestin contraceptives and risk of cervical cancer: A debated issue. *Anticancer Res.* 2020;40:5995–6002.
364. IARC. TOBACCO SMOKING. Monographs. Vol. 100E. Lyon Int Agency Res Cancer, 2010 [Internet]; 2002:43–211. Available from:
<https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100E-6.pdf>
365. Utami TW, Kusuma F, Winarto H, Anggraeni TD, Peters AAW, Spaans V, et al. Tobacco use and its association with HPV infection in normal uterine cervix: A study from a Sustainable Development Goals perspective. *Tob Induc Dis.* 2021;19:1–7.

Slike iz poglavlja 1 (Uvod) su preuzete sa internet stranica iz naučnih radova sa otvorenim pristupom (engl. *Open access*) uz napomenu odgovarajuće dozvole koja dopušta deljenje, modifikovanje i umnožavanje slika.

8. PRILOZI

Prilog 1. Informacija za učesnice ispitivanja i informisani pristanak.**Informacije za učesnike istraživanja**

Poštovani,

Institut za javno zdravlje Vojvodine sprovodi istraživanje sa ciljem utvrđivanja bioloških osobina humanih papiloma virusa (HPV) što bi u budućnosti moglo da doprinese unapređenju dijagnostike i tretmana žena inficiranih HPV.

Rezultati analize bioloških osobina humanih papiloma virusa i podaci iz ginekološkog izveštaja biće korišteni u naučne svrhe. Rezultati će se čuvati u tajnosti, a Vaši lični podaci će biti zaštićeni i neće biti objavljeni.

Ukoliko odlučite da date pristanak da se bris koji ste dostavili, pored analize koju je tražio Vaš ginekolog, upotrebi i za ispitivanje bioloških osobina humanih papiloma virusa, molimo Vas da svojim potpisom potvrdite saglasnost.

Dodatna analiza ne podrazumeva nikakve dodatne troškove, a rezultati će biti dostavljeni Vašem ginekologu.

Da li želite da učestvujete u istraživanju?

DA

NE

Potpis učesnika

Datum

Prilog 2. Upitnik za sprovođenje anonimne ankete.

ANKETA

Poštovani,

molimo Vas da popunite ovaj kratki anonimni upitnik sa ciljem da se sagleda učestalost faktora rizika koji bi mogli doprineti nastanku promena na polnim organima.

Upitnik se popunjava zaokruživanjem jednog ponuđenog odgovora, osim ukoliko nije drugačije naznačeno.

a. Opšti podaci o pacijentu:

Pol	1.) Muško	2.) Žensko
Životna dob (upisati navršene godine života)		
Bračni status:	1) neudata/neoženjen 2) udata/oženjen/vanbračna zajednica 3) razveden/a 4) udovac/udovica	
Stepen obrazovanja:	1) nepotpuna osnovna škola 2) osnovna škola 3) srednja škola 4) viša škola 5) visoka škola	
b. Faktori rizika:		
Da li ste pušač ?	1) Da 2) Ne 3) Bivši	
Ukoliko ste pušili, pušački staž je iznosio:	1) do 5 godine 2) 5-10 godina 3) 10-20 godina 4) više od 20 godina	
Ako pušite, koliko cigareta dnevno ?	1) do 5 cigareta 2) 5-10 3) 10-20 4) više od 20	
Da li ste nekada čuli za HPV?	1) Da	2) Ne

Nastavak priloga 2. Upitnik za sprovođenje anonimne ankete.

Moguće je zaokružiti više odgovora:

Ako je predhodni odgovor „ DA, „ na koji način ste došli do informacija?	1) U porodici 2) U školi 3) Putem interneta i medija 4) Tokom razgovora sa lekarom 5) Razgovor sa prijateljima i vršnjacima 6) Drugi izvori (navesti koji)
Da li ste ikada imali seksualne odnose ?	1) Da 2) Ne
Kada ste stupili u prvi seksualni kontakt (upisati godine starosti) ?	
Da li ste prilikom prvog seksualnog odnosa koristili prezervativ?	1) Da 2) Ne
Da li redovno koristite prezervativ?	1) Da, uvek 2) Da, ponekad 3) Ne, nikad
Da li koristite oralna kontraceptivna sredstva(anti bebi pilule)	
Ako ste koristili oralna kontraceptivna sredstva (anti bebi pilule), koliko dugo ste ih koristili ili koristite?	1) Da, do pola godine 2) Do godinu dana 3) Više od godinu dana 4) Ne koristim
Broj seksualnih partnera u poslednje dve godine (upisati broj) ?	
Broj slučajnih seksualnih partnera u poslednje dve godine (veza kraća od mesec dana) ?	
Da li imate neku od sledećih polno prenosivih bolesti ?	1) Ne 2) Herpes na genitalijama 3) Infekciju hlamidijom 4) Gonoreju 5) Sifilis 6) Nešto drugo (navesti).....
Pitanje se odnosi samo na žene:	
Da li ste do sada imali namerni prekid trudnoće (abortus)?	1) Nisam 2) Jedanput 3) Dva i više puta
Da li ste bolovali ili bolujete od maligne bolesti?	1) Da,navesti koju..... 2) Ne
Da li je neko u bližoj ili daljoj porodici imao malignu bolest?	1) Da, navesti koju..... 2) Ne 3) Ne znam
Pitanje se odnosi samo na žene:	

Nastavak priloga 2. Upitnik za sprovođenje anonimne ankete.

Da li ste i koliko puta u toku prethodnih godinu dana bili kod ginekologa?	1) Da, puta 2) Pre više od godinu dana 3) Nikada
--	--

Podaci o predhodno dijagnostikovanim HPV:	
Da li imate kondilome (polne bradavice) na polnom organu ili oko analne regije?	1) Da 2) Ne 3) Ne znam
Da li ste nekada radili analizu utvrđivanja infekcije humanim papiloma virusima?	1) Da 2) Ne
Odgovoriti ukoliko je odgovor na prethodno pitanje DA:	
Rezultat je bio:	1) Pozitivan 2) Negativan 3) Ne sećam se
Koji tipovi humanog papiloma virusa su dokazani:	1) 6 2) 11 3) 16 4) 18 5) 31 6) ne znam

Hvala na saradnji!

Prilog 3. Onkogeno aktivnost HR HPV 16, 31, 33 i 51 prikazana prema disperziji dobijenih Ct vrednosti. Nema validnih analiza za statističku obradu.

iRNK E6/E7 hrHPV	Onkogeno aktivnost	Citološki nalaz							
		NILM		ASCUS		LSIL		HSIL	
		n	%	n	%	n	%	n	%
iRNK E6/E7 HR HPV 16	Niska	0	0,0	4	66,7	7	70,0	14	41,2
	Umerena	1	100	1	16,7	2	20,0	12	35,3
	Visoka	0	0,0	1	16,7	0	0,0	6	17,6
	Veoma visoka	0	0,0	0	0,0	1	10,0	2	5,9
	Ukupno:	1	100	6	100	10	100	34	100
iRNK E6/E7 HR HPV 31	Niska	3	42,8	5	41,7	6	60,0	2	50,0
	Umerena	2	28,6	3	25,0	2	20,0	1	25,0
	Visoka	2	28,6	3	25,0	2	20,0	1	25,0
	Veoma visoka	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0
	Ukupno:	7	100	12	100	10	100	4	100
iRNK E6/E7 HR HPV 33	Niska	2	66,7	2	66,7	2	40,0	3	60,0
	Umerena	1	33,3	1	33,3	3	60,0	1	20,0
	Visoka	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	20,0
	Veoma visoka	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Ukupno:	3	100	3	100	5	100	5	100
iRNK E6/E7 HR HPV 51	Niska	1	33,3	0	0,0	2	40,0	3	50,0
	Umerena	2	66,7	1	100	2	40,0	2	33,3
	Visoka	0	0,0	0	0,0	1	20,0	1	16,7
	Veoma visoka	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Ukupno:	3	100	1	100	5	100	6	100

n – broj pacijentkinja; NILM – negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti); ASCUS – atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja; LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena; HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena.

Prilog 4. Analiza faktora rizika u odnosu na HR HPV DNK (n je broj pacijentkinja).

Faktor rizika		HR HPV DNK											
		HR HPV DNK 16					HR HPV DNK 31						
		-		+		χ^2	P	-		+		χ^2	P
		n	%	n	%			n	%	n	%		
Pušač	Da	22	55,0	29	47,5	0,538	0,463	36	53,7	15	44,1	0,834	0,361
	Ne	18	45,0	32	52,5			31	46,3	19	55,9		
Pušački staž (godina)	< 5	7	31,8	10	34,5	0,055	0,973	11	30,6	6	40,0	2,127	0,345
	5–10	9	40,9	11	37,9			13	36,1	7	46,7		
	> 10	6	27,3	8	27,6			12	33,3	2	13,3		
Broj cigareta	do 5	4	18,2	11	37,9	2,501	0,286	11	30,6	4	26,7	-	-
	5–10	14	63,6	13	44,8			17	47,2	10	66,7		
	10–20	4	18,2	5	17,2			8	22,2	1	6,7		
Prvi seksualni kontakt - uzrast (godina)	< 18	18	45,0	28	45,9	0,008	0,929	27	40,3	19	55,9	2,209	0,137
	≥ 18	22	55,0	33	54,1			40	59,7	15	44,1		
Kontracepcija	Kondom	23	57,5	31	50,8	-	-	34	50,7	20	58,8	-	-
	Pilule	2	5,0	0	0,0			1	1,5	1	2,9		
	Oba	7	17,5	11	18,0			15	22,4	3	8,8		
	Ne	8	20,0	19	31,1			17	25,4	29,4			
Br. seksualnih partnera u posljednje dve godine	0	4	10,0	1	1,6	-	-	3	4,5	2	5,9	0,502	0,918
	1	22	55,0	36	59,0			40	59,7	18	52,9		
	2	10	25,0	18	29,5			18	26,9	10	29,4		
	≥ 3	4	10,0	6	9,8			6	9,0	4	11,8		
Polno prenosive bolesti	Da	4	10,3	8	13,1	0,184	0,668	8	11,9	4	12,1	0,001	0,979
	Ne	35	89,7	53	86,9			59	88,1	29	87,9		
Namerni prekid trudnoće	Ne	35	87,5	44	72,1	3,349	0,067	49	73,1	30	88,2	3,019	0,082
	Da	5	12,5	17	27,9			18	26,9	4	11,8		
Ista maligna bolest kod čl. bliže ili dalje porodice	Da	11	28,9	13	22,8	0,994	0,608	16	25,8	8	24,2	0,443	0,801
	Ne	23	60,5	40	70,2			40	64,5	23	69,7		
	Ne znam	4	10,5	4	7,0			6	9,7	2	6,1		
Br. ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	4	10,0	6	9,8	1,105	0,576	8	11,9	2	5,9	1,048	0,592
	1	15	37,5	17	27,9			20	29,9	12	35,3		
	≥ 2	21	52,5	38	62,3			39	58,2	20	58,8		
Prethodna info o HPV	Da	30	75,0	54	88,5	3,157	0,076	49	73,1	30	88,2	3,402	0,065
	Ne	10	25,0	7	11,5			18	26,9	4	11,8		
Prisustvo kondiloma	Da	4	10,0	6	9,8	0,001	0,978	8	11,9	9	26,5	0,067	0,796
	Ne	36	90,0	55	90,2			7	10,4	3	8,8		
Ranije rađena analiza HPV	Da	12	30,0	25	41,0	1,256	0,263	60	89,6	31	91,2	1,152	0,283
	Ne	28	70,0	36	59,0			27	40,3	10	29,4		

Nastavak priloga 4. Analiza faktora rizika u odnosu na HR HPV DNK.

Faktor rizika		HR HPV DNK											
		HR HPV DNK 33				HR HPV DNK 51							
		-		+		χ^2	<i>p</i>	-		+		χ^2	<i>p</i>
		n	%	n	%			n	%	n	%		
Pušač	Da	45	50,6	6	50,0	0,001	0,971	39	45,3	12	80,0	6,135	0,013
	Ne	44	49,4	6	50,0			47	54,7	3	20,0		
Pušački staž (godina)	< 5	15	33,3	2	33,3			14	35,9	3	25,0	0,445	
	5–10	19	42,2	1	16,7			16	41,0	4	33,3		
	> 10	11	24,4	3	50,0			9	23,1	5	41,7		
Broj cigareta	do 5	14	31,1	1	16,7			12	30,8	3	25,0	0,610	0,737
	5–10	23	51,1	4	66,7			21	53,8	6	50,0		
	10–20	8	17,8	1	16,7			6	15,4	3	25,0		
Prvi seksualni kontakt - uzrast (godina)	< 18	43	48,3	3	25,0	2318	0,128	38	44,2	8	53,3	0,431	0,512
	≥ 18	46	51,7	9	75,0			48	55,8	7	46,7		
Kontracepcija	Kondom	47	52,8	7	58,3			47	54,7	7	46,7	-	-
	Pilule	2	2,2	0	0,0			1	1,2	1	6,7		
	Oba	15	16,9	3	25,0			13	15,1	5	33,3		
	Ne	25	28,1	2	16,7			25	29,1	2	13,3		
Br. seksualnih partnera u poslednje dve godine	0	4	4,5	1	8,3			4	4,7	1	6,7	-	-
	1	51	57,3	7	58,3			47	54,7	11	73,3		
	2	25	28,1	3	25,0			27	31,4	1	6,7		
	≥ 3	9	10,1	1	8,3			8	9,3	2	13,3		
olno prenosive bolesti	Da	11	12,5	1	8,3	-	-	11	12,9	1	6,7	-	-
	Ne	77	87,5	11	91,7			74	87,1	14	93,3		
Namerni prekid trudnoće	Ne	69	77,5	10	83,3	0,209	0,647	67	77,9	12	80,0	0,033	0,856
	Da	20	22,5	2	16,7			19	22,1	3	20,0		
Ista maligna bolest kod članova bliže ili dalje porodice	Da	18	21,4	6	54,5			20	25,0	4	26,7	-	-
	Ne	59	70,2	4	36,4			53	66,3	10	66,7		
	Ne znam	7	8,3	1	9,1			7	8,8	1	6,7		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	8	9,0	2	16,7			9	10,5	1	6,7	-	-
	1	28	31,5	4	33,3			25	29,1	7	46,7		
	≥ 2	53	59,6	6	50,0			52	60,5	7	46,7		
Prethodna info o HPV	Da											-	-
	Ne	73	82,0	11	91,7			70	81,4	14	93,3		
Prisustvo kondiloma	Da	16	18,0	1	8,3			16	18,6	1	6,7	-	-
	Ne	9	10,1	1	8,3			9	10,5	1	6,7		
Ranije rađena analiza HPV	Da	80	89,9	11	91,7			77	89,5	14	93,3	0,086	0,769
	Ne	31	34,8	6	50,0			31	36,0	6	40,0		

Prilog 5. Analiza faktora rizika u odnosu na iRNK E6/E7 HR HPV.

Faktori rizika		iRNK E6/E7 HR HPV 16				χ^2	P
		-		+			
		n	%	n	%		
Pušač	Da	45	50,0	6	54,5	0,081	0,776
	Ne	45	50,0	5	45,5		
Pušački staž (godina)	< 5	16	35,6	1	16,7	-	-
	5–10	16	35,6	4	66,7		
	> 10	13	28,9	1	16,7		
Broj cigareta	do 5	12	26,7	3	50,0	-	-
	5–10	25	55,6	2	33,3		
	10–20	8	17,8	1	16,7		
Kontracepcija	Kondom	48	53,3	6	54,5	-	-
	Pilule	2	2,2	0	0,0		
	Oba	16	17,8	2	18,2		
	Ne	24	26,7	3	27,3		
Br. seksualnih partnera u poslednje dve godine	0	5	5,6	0	0,0	-	-
	1	50	55,6	8	72,7		
	2	25	27,8	3	27,3		
	≥ 3	10	11,1	0	0,0		
Polno prenosive bolesti	Da	11	12,4	1	9,1	-	-
	Ne	78	87,6	10	90,9		
Namerni prekid trudnoće	Ne	71	78,9	8	72,7	0,218	0,640
	Da	19	21,1	3	27,3		
Ista maligna bolest kod članova bliže ili dalje porodice	Da	22	25,9	2	20,0	-	-
	Ne	55	64,7	8	80,0		
	Ne znam	8	9,4	0	0,0		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	9	10,0	1	9,1	-	-
	1	29	32,2	3	27,3		
	≥ 2	52	57,8	7	63,6		
Prethodna info o HPV	Da	76	84,4	8	72,7	0,961	0,327
	Ne	14	15,6	3	27,3		
Prisustvo kondiloma	Da	10	11,1	0	0,0	-	-
	Ne	80	88,9	11	100		
Ranije rađena analiza HPV	Da	33	36,7	4	36,4	0,000	0,984
	Ne	57	63,3	7	63,6		

Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Nastavak priloga 5. Analiza faktora rizika u odnosu na iRNK E6/E7 HR HPV.

Faktori rizika		iRNK E6/E7 HR HPV 31				χ^2	P
		-		+			
		n	%	n	%		
Pušač	Da	40	51,3	11	47,8	0,085	0,771
	Ne	38	48,7	12	52,2		
Pušački staž (godina)	< 5	13	32,5	4	36,4	0,617	0,735
	5–10	15	37,5	5	45,5		
	> 10	12	30,0	2	18,2		
Broj cigareta	do 5	12	30,0	3	27,3	0,907	0,636
	5–10	20	50,0	7	63,6		
	10–20	8	20,0	1	9,1		
Kontracepcija	Kondom	40	51,3	14	60,9	-	-
	Pilule	1	1,3	1	4,3		
	Oba	17	21,8	1	4,3		
	Ne	20	25,6	7	30,4		
Br. seksualnih partnera u poslednje dve godine	0	4	5,1	1	4,3	-	-
	1	43	55,1	15	65,2		
	2	23	29,5	5	21,7		
	≥ 3	8	10,3	2	8,7		
Polno prenosive bolesti	Da	9	11,5	3	13,6	0,072	0,789
	Ne	69	88,5	19	86,4		
Namerni prekid trudnoće	Ne	59	75,6	20	87,0	1,335	0,248
	Da	19	24,4	3	13,0		
Ista maligna bolest kod članova bliže ili dalje porodice	Da	19	26,0	5	22,7	0,103	0,950
	Ne	48	65,8	15	68,2		
	Ne znam	6	8,2	2	9,1		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	9	11,5	1	4,3	-	-
	1	22	28,2	10	43,5		
	≥ 2	47	60,3	12	52,2		
Prethodna info o HPV	Da	67	85,9	17	73,9	1,822	0,177
	Ne	11	14,1	6	26,1		
Prisustvo kondiloma	Da	7	9,0	3	13,0	0,330	0,566
	Ne	71	91,0	20	87,0		
Ranije rađena analiza HPV	Da	33	42,3	4	17,4	4,750	0,029*
	Ne	45	57,7	19	82,6		

Nastavak priloga 5. Analiza faktora rizika u odnosu na iRNK E6/E7 HR HPV.

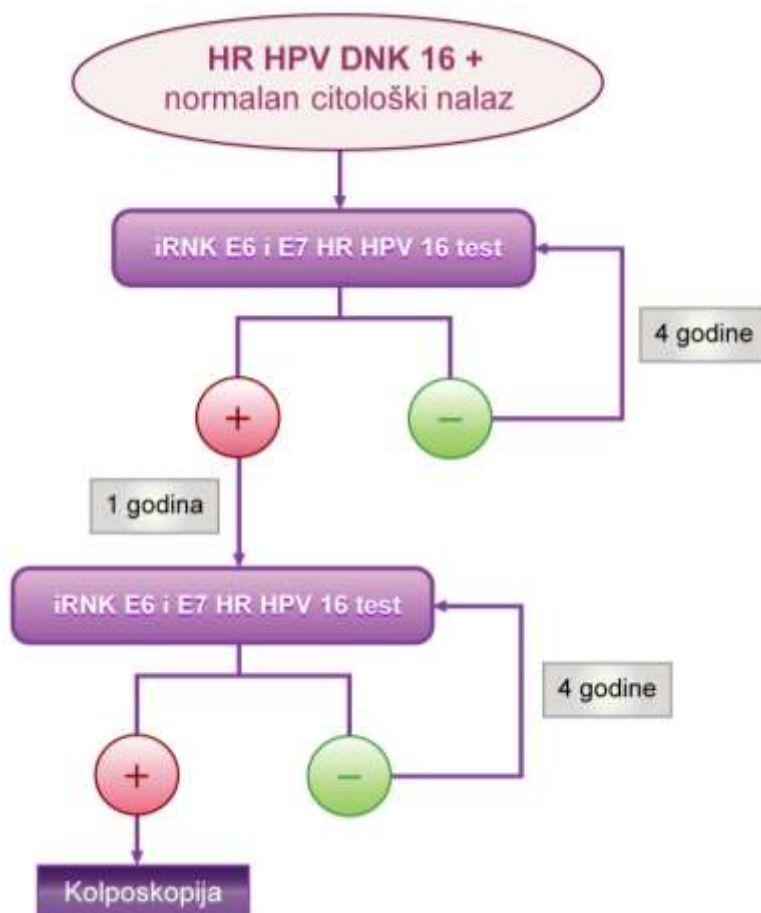
Faktor rizika		iRNK E6/E7 HR HPV 33				χ^2	P
		-		+			
		n	%	n	%		
Pušač	Da	49	52,1	2	28,6	1,446	0,229
	Ne	45	47,9	5	71,4		
Pušački staž (godina)	< 5	16	32,7	1	50,0	-	-
	5–10	19	38,8	1	50,0		
	> 10	14	28,6	0	0,0		
Broj cigareta	do 5	15	30,6	0	0,0	-	-
	5–10	25	51,0	2	100		
	10–20	9	18,4	0	0,0		
Kontracepcija	Kondom	51	54,3	3	42,9	-	-
	Pilule	2	2,1	0	0,0		
	Oba	15	16,0	3	42,9		
	Ne	26	27,7	1	14,3		
Br. seksualnih partnera u poslednje dve godine	0	4	4,3	1	14,3	-	-
	1	54	57,4	4	57,1		
	2	27	28,7	1	14,3		
	≥ 3	9	9,6	1	14,3		
Polno prenosive bolesti	Da	11	11,8	1	14,3	-	-
	Ne	82	88,2	6	85,7		
Namerni prekid trudnoće	Ne	74	78,7	5	71,4	0,203	0,652
	Da	20	21,3	2	28,6		
Ista maligna bolest kod članova bliže ili dalje porodice	Da	21	23,6	3	50,0	-	-
	Ne	60	67,4	3	50,0		
	Ne znam	8	9,0	0	0,0		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	8	8,5	2	28,6	4,091	0,129
	1	29	30,9	3	42,9		
	≥ 2	57	60,6	2	28,6		
Prethodna info o HPV	Da	78	83,0	6	85,7	-	-
	Ne	16	17,0	1	14,3		
Prisustvo kondiloma	Da	10	10,6	0	0,0	-	-
	Ne	84	89,4	7	100		
Ranije rađena analiza HPV	Da	34	36,2	3	42,9	0,125	0,723
	Ne	60	63,8	4	57,1		

Nastavak priloga 5. Analiza faktora rizika u odnosu na iRNK E6/E7 HR HPV.

Faktori rizika		iRNK E6/E7 HR HPV 51				χ^2	P
		-		+			
		n	%	n	%		
Pušač	Da	43	46,2	8	100	-	-
	Ne	50	53,8	0	0,0		
Pušački staž (godina)	< 5	16	37,2	1	12,5	-	-
	5–10	17	39,5	3	37,5		
	> 10	10	23,3	4	50,0		
Broj cigareta	do 5	13	30,2	2	25,0	-	-
	5–10	22	51,2	5	62,5		
	10–20	8	18,6	1	12,5		
Kontracepcija	Kondom	50	53,8	4	50,0	-	-
	Pilule	1	1,1	1	12,5		
	Oba	16	17,2	2	25,0		
	Ne	26	28,0	1	12,5		
Br. seksualnih partnera u poslednje dve godine	0	4	4,3	1	12,5	-	-
	1	54	58,1	4	50,0		
	2	27	29,0	1	12,5		
	≥ 3	8	8,6	2	25,0		
Polno prenosive bolesti	Da	12	13,0	0	0,0	-	-
	Ne	80	87,0	8	100		
Namerni prekid trudnoće	Ne	73	78,5	6	75,0	0,053	0,818
	Da	20	21,5	2	25,0		
Ista maligna bolest kod članova bliže ili dalje porodice	Da	22	25,3	2	25,0	-	-
	Ne	58	66,7	5	62,5		
	Ne znam	7	8,0	1	12,5		
Broj ginekoloških pregleda u prethodnih godinu dana	0	9	9,7	1	12,5	-	-
	1	27	29,0	5	62,5		
	≥ 2	57	61,3	2	25,0		
Prethodna info o HPV	Da	77	82,8	7	87,5	-	-
	Ne	16	17,2	1	12,5		
Prisustvo kondiloma	Da	10	10,8	0	0,0	-	-
	Ne	83	89,2	8	100		
Ranije rađena analiza HPV	Da	34	36,6	3	37,5	0,003	0,958
	Ne	59	63,4	5	62,5		

n – broj pacijentkinja; * $p < 0,05$. Ružičasta boja označava statistički značajnu razliku.

Prilog 6. Predlog algoritma za dalja istraživanja u cilju poboljšanja praćenja toka HPV 16 uzrokovane infekcije uvođenjem iRNK E6 i E7 HR HPV 16 testa.



LISTA SKRAĆENICA

AGC	atipične žlezdane ćelije neodređenog značaja (engl. <i>Atypical Glandular Cells</i>)
AIS	adenokarcinom <i>in situ</i> (engl. <i>Adenocarcinoma In Situ</i>)
ANOVA	analiza varijanse (engl. <i>analysis of variance</i>)
APC	antigen prezentujuće ćelije (engl. <i>Antigen Presenting Cells</i>)
ASC-H	atipične skvamozne ćelije koje govore u prilog displaziji (engl. <i>Atypical Squamous Cells – a High grade squamous intraepithelial lesion cannot be excluded</i>)
ASCUS	atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (engl. <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>)
ASR	uzrasno standardizovana stopa incidencije (engl. <i>age standardised rate</i>)
AUC	(engl. <i>area under the ROC curve</i>)
BAK	(engl. <i>Bcl Antagonist/Killer</i>)
BAX	(engl. <i>Bcl-2-Associated X protein</i>)
BMI	indeks telesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i>)
bp	bazni parovi (engl. <i>base pair</i>)
Ca	teška displazija (lat. <i>Carcinoma in situ</i>)
CBP	(engl. <i>cAMP-Response Element-Binding Protein, CREB-Binding Protein</i>)
CD	(engl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
CDI	inhibitori CDK (engl. <i>CDK Inhibitors</i>)
CDK	(engl. <i>Cyclin Dependant Kinase</i>)
cDNK	komplementarna DNK (engl. <i>complementary DNA</i>)
cGAS-STING	(engl. <i>cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes</i>)
CIN	cervikalna intraepitelna neoplazija (lat. <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>)
CK II	kazein kinaza II (engl. <i>Casein Kinase II</i>)
COX	ciklooksigenaza (engl. <i>Cyclooxygenase</i>)
CR	konzerviran region (engl. <i>Conserved Region</i>)
CT	(lat. <i>Chlamydia trachomatis</i>)
Ct	(engl. <i>Cycle treshold</i>)
CTL	citotoksični T limfociti (engl. <i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CTLA-4	(engl. <i>cytotoxic T lymphocyte-associated transmembrane receptor 4</i>)
CXCL	(engl. <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>)
Cy5	Indodikarbocianin
DC	(engl. <i>Dendritic Cells</i>)
ddNTP	2',3'-dideoksi-nukleotid trifosfat (engl. <i>Dideoxynucleotide triphosphate</i>)

DlgA	(engl. <i>Drosophila disc large tumor suppressor</i>)
E	rani region (engl. <i>Early</i>)
E6AP	(engl. <i>E6-Associated Protein</i>)
ECM	ekstracelularni matriks (engl. <i>Extracellular Matrix</i>)
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EMA	Evropska agencija za lekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EV	veruciformnom epidermoplazijom (lat. <i>Epidermodysplasia Verruciformis</i>)
F	uzvodni prajmer (engl. <i>Forward</i>)
FADD	(engl. <i>FAS-associated protein with Death Domain</i>)
FAK	(engl. <i>Focal Adhesion Kinase</i>)
FAM	6-karboksifluorescein
FDA	Američka agencija za kontrolu hrane i lekova (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (engl. <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
hADA3	(engl. <i>Human Alteration/Deficiency in Activation 3</i>)
HC2	(engl. <i>Hybride Capture assay</i>)
HDAC	histon deacetilaza (engl. <i>Histone deacetylase</i>)
HIV	(engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPV-SA	(engl. <i>Suspension Array genotyping</i>)
HR	visokorizični genotipovi HPV (engl. <i>High-Risk</i>)
HSIL	skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (engl. <i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
HSPGs	heparin sulfatproteoglikani (engl. <i>Heparan Sulphate Proteoglycans</i>)
HSV	(lat. <i>Herpes Simplex Virus</i>)
hTERT	(engl. <i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
I.P.	interval poverenja
IARC	Međunarodna agencije za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IC	interna kontrola (engl. <i>internal control</i>)
ICTV	Međunarodni komitet za taksonomiju virusa (engl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IFN	Interferon
IGF	(engl. <i>Insulin-like Growth Factor</i>)
IIG	(engl. <i>Innate Immune Genes</i>)
IL	(engl. <i>interleukine</i>)
IMB SPSS	(engl. <i>IBM Statistical Package for Social Sciences</i>)
IRF1	(engl. <i>INF Regulatory Factor-1</i>)
IRF1	(engl. <i>INF Regulatory Factor-1</i>)

iRNK	informaciona RNK
JOE	4',5'-dihloro-2',7'-dimetoksi-5(6)-karboksifluorescein
kb	kilobaze (engl. <i>kilobase</i>)
L	kasni region (engl. <i>Late</i>)
LC	(engl. <i>Langehans Cells</i>)
LCR	dugi kontrolni region (engl. <i>Long Control Region</i>)
LR	niskorizični genotipovi HPV (engl. <i>Low Risk</i>)
LSIL	skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena (engl. <i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
Maldi Tof	(engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>)
MAPKs	mitogenima-aktivirane proteinske kinaze (engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MDA5	antigen povezan sa diferencijacijom melanoma 5 (engl. <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>)
MDSCs	(engl. <i>myeloid derived suppressor cells</i>)
MHC I	glavni histokompatibilni kompleks klase I (engl. <i>Major Histocompatibility Complex class I</i>)
NFX123	(engl. <i>Nuclear Factor X box-binding protein-123</i>)
NGS	sekvenciranje nove generacije (engl. <i>Next Generation Sequencing</i>)
NILM	negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet (engl. <i>Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy</i>)
NK	(engl. <i>Natural Killer cells</i>)
NPV	negativna prediktivna vrednost
o.a.	onkogeni aktivnost
OC	oralna kontraceptivna sredstva (engl. <i>Oral Contraceptive</i>)
OR	(engl. <i>Odds Ratio</i>)
ORFs	otvoreni okviri čitanja (engl. <i>Open Reading Frames</i>)
pAE	rano mesto poliadenilacije (engl. <i>Early polyadenylation site</i>)
PBM	PDZ vezujući motiv (engl. <i>PDZ Binding Motif</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	(engl. <i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
PCR-RFMP	(engl. <i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Mass Polymorphism</i>)
PD-1	(engl. <i>programmed death-ligand 1</i>)
PE	rani promotor (engl. <i>Promotor Early</i>)
PL	kasni promotor (engl. <i>Late Promoter</i>)
PML-NBs	promijelocitna leukemična tela (engl. <i>Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies</i>)
PPV	pozitivna prediktivna vrednost
PSD95	(engl. <i>Postsynaptic Density protein</i>)

PV	papiloma virusi (lat. <i>Papilloma Viruses</i>)
R	nizvodni prajmer (engl. <i>Reverse</i>)
Rb	proteinska porodica retinoblastoma
<i>real time</i> PCR	lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
<i>real time</i> RT-PCR	(engl. <i>real time Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>)
RIG1	gen I inducibilne retinoične kiseline (engl. <i>retinoic acid-inducible gene-1</i>)
RLB	reverzni linijski test (engl. <i>Reverse Line-Blot</i>)
RNS	reaktivne azotne čestice (engl. <i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROC	(engl. <i>Receiver Operating Characteristics</i>)
ROS	reaktivne kiseonične čestice (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
ROX	6-karboksi-X-rodamin
RT-PCR	reverzna transkripcija i PCR u jednom koraku (engl. <i>Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
s.d.	standardna devijacija
SDS-PAGE	poliakrilamid elektroforeza sa natrijum dodecilsulfatom (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SE	standardna greška (engl. <i>standard error</i>)
SP1	(engl. <i>Specific Protein 1</i>)
STAT1	(engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>)
STI	polno prenosive infekcije (engl. <i>Sexually Transmitted Infections</i>)
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TAMRA	6-karboksitetrametilrodamin
TAMs	makrofagi asocirani tumorom (engl. <i>tumor associated macrophages</i>)
TF	transkripcioni faktor (engl. <i>Transcription Factor</i>)
TGF- β 1	transformišući faktor rasta β 1 (engl. <i>Transforming Growth Factor-β1</i>)
Th	(engl. <i>T-helper cells</i>)
TLR	(engl. <i>Toll Like Receptors</i>)
TNFR1	receptor faktora nekroze tumora α (engl. <i>Tumour Necrosis Factor (TNF)- Receptor</i>)
Tregs	regulatorne T ćelije (engl. <i>regulatory T cells</i>)
TRIL	(engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
URR	uzvodni regulatorni region (engl. <i>Upstream Regulatory Region</i>)
VLP	virusu slične čestice (engl. <i>virus like particle</i>)
XAF1	(engl. <i>XIAP Associated Factor 1</i>)
zo-1	(engl. <i>zonula occludens-1 protein</i>)
α -HPV	(lat. <i>Alphapapillomavirus</i>)
β -HPV	(lat. <i>Betapapillomavirus</i>)
γ -HPV	(lat. <i>Gammapapillomavirus</i>)
μ -HPV	(lat. <i>Mupapillomavirus</i>)
ν -HPV	(lat. <i>Nupapillomavirus</i>)

LISTA SLIKA

Slika 1.1. Organizacija genoma HPV (A) i slika genoma i nikleoproteina HPV dobijena elektronskim mikroskopom (B)	3
Slika 1.2. Šematski prikaz klasifikacije HPV	7
Slika 1.3. Životni ciklus HPV	9
Slika 1.4. Ulazak HPV u ćeliju	11
Slika 1.5. Mehanizmi delovanja onkoproteina E6 i E7 HR HPV	18
Slika 1.6. Molekularni mehanizmi sinergističkog delovanja onkoproteina HPV u kancerogenezi cervikalnog epitela	19
Slika 1.7. Integracija genoma HPV u genom domaćina	22
Slika 1.8. Prekursorske lezije cervikalnog karcinoma	24
Slika 1.9. Imunski odgovor HPV infekcije	30
Slika 1.10. Mehanizam delovanja preventivnih i terapijskih vakcina	47
Slika 1.11. Uzrasno standardizovana stopa incidencije (engl. <i>Age Standardised Rate</i> , ASR) cervikalnog karcinoma prema podacima pojedinačnih država (procenjeno za 2018. godinu)	49

LISTA TABELA

Tabela 3.1. Nukleotidni niz uzvodnih i nizvodnih prajmera i obeleženih proba za dokazivanje iRNK E6/E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51.	61
Tabela 4.1. Analiza prisustva 12 HR HPV DNK u ispitivanom uzorku.....	66
Tabela 4.2. Distribucija 12 HR HPV genotipova.	66
Tabela 4.3. Distribucija HR HPV DNK 16, 31, 33 i 51 u odnosu na ukupan broj HR HPV pozitivnih pacijentkinja.	68
Tabela 4.4. Distribucija HR HPV 16, 31, 33 i 51 pojedinačno i u udruženim infekcijama. .	69
Tabela 4.5. Distribucija HR HPV DNK pozitivnih uzoraka prema genotipu i citološkom nalazu.....	70
Tabela 4.6. Distribucija pojedinačnih i udruženih infekcija prema citološkom nalazu.....	71
Tabela 4.7. Starosna struktura ispitanih pacijentkinja prema citološkom nalazu.	72
Tabela 4.8. Analiza HR HPV DNK pozitivnih nalaza u odnosu na uzrast.....	74
Tabela 4.9. Zastupljenost udruženih infekcija u odnosu na uzrasne kategorije ispitanih žena. ...	76
Tabela 4.10. Analiza prisustva iRNK E6/E7 HR HPV 16, 31, 33 i 51 u ispitivanom uzorku.	76
Tabela 4.11. Analiza prisustva iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51.....	77
Tabela 4.12. Distribucija iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na HR HPV DNK genotipove.	78
Tabela 4.13. Analiza prisustva iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na citološki nalaz pacijentkinja.	78
Tabela 4.14. Distribucija E6/E7 iRNK HR HPV pozitivnih HR HPV DNK uzoraka prema genotipu i citološkom nalazu.....	79
Tabela 4.15. Analiza onkogene aktivnosti udruženih HR HPV.	80

Tabela 4.16. Analiza iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na uzrasne kategorije pacijentkinja.	81
Tabela 4.17. Kliničke karakteristike iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 testa u odnosu na referentnu grupu.	82
Tabela 4.18. Prosečna Ct vrednost iRNK E6/E7 HR HPV prema HPV genotipu.	82
Tabela 4.19. Distribucija Ct vrednosti iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na citološki nalaz.	83
Tabela 4.20. Analiza Ct vrednosti iRNK HR HPV 16, 31, 33 i 51 u odnosu na uzrasne kategorije.	86
Tabela 4.21. Zastupljenost ispitanih HR HPV genotipova i njihove onkogene aktivnosti prema starosnoj strukturi i citološkom nalazu.	87
Tabela 4.22. Kliničke karakteristike HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testova.	89
Tabela 4.23. Podudarnost HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV dijagnostičkih testova u citološkim nalazima.	90
Tabela 4.24. Prikaz AUC za HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testove u visokostepenim lezijama.	91
Tabela 4.25. Analiza uticaja faktora HR HPV 16 za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.	94
Tabela 4.26. Analiza uticaja pokazatelja onkogene aktivnosti ispitivanih HPV genotipova za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.	95
Tabela 4.27. Analiza uticaja pokazatelja onkogene aktivnosti HPV 16 za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.	96
Tabela 4.28. Analiza uticaja uzrasne kategorije za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.	97
Tabela 4.29. Analiza međusobnog uticaja relevantnih faktora za nastanak visokostepenih lezija cervikalnog epitela.	99

Tabela 4.30. Demografske karakteristike HR HPV DNK pozitivnih žena prema citološkom nalazu.....	100
Tabela 4.31. Analiza faktora rizika za nastanak cervikalnih intraepitelnih lezija.	102
Tabela 4.32. Analiza faktora rizika u odnosu na onkogenu aktivnost HR HPV.	104

LISTA GRAFIKONA

Grafikon 4.1. Konstrukcija uzorka za analizu.	67
Grafikon 4.2. Uzrasna struktura ispitanih pacijentkinja prema citološkom nalazu.....	73
Grafikon 4.3. Uzrasna struktura ispitanih pacijentkinja prema HR HPV genotipu: HR HPV DNK 16 (A), HR HPV DNK 31 (B), HR HPV DNK 33 (C) i HR HPV DNK 51 (D).....	75
Grafikon 4.4. Disperzija Ct vrednosti iRNK E6/E7 HR HPV u odnosu na HR HPV.....	84
Grafikon 4.5. Disperzija Ct vrednosti iRNK E6/E7 HR HPV 16 (A), iRNK E6/E7 HR HPV 31 (B), iRNK E6/E7 HR HPV 33 (C) i iRNK E6/E7 HR HPV 51 (D) u odnosu na citološki nalaz.	85
Grafikon 4.6. Zastupljenost genotipova i ostvarene onkogene aktivnosti dokazanih HR HPV prema uzrasnoj kategoriji (A) i citološkom nalazu (B).....	88
Grafikon 4.7. ROC kriva HR HPV DNK i iRNK E6/E7 HR HPV testova u visokostepenim lezijama.	91
Grafikon 4.8. Korelacija između prisustva HR HPV DNK 16 i citološkog statusa.	92
Grafikon 4.9. Korelacija između prisustva onkogene aktivnosti HPV 16 i citološkog statusa..	93
Grafikon 4.10. Korelacija između prisustva onkogene aktivnosti HPV genotipova i citološkog statusa..	93

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Одређивање експресије Е6 и Е7 гена као показатеља онкогене активности високоризичних типова хуманих папилома вируса у цервикалним интраепителним лезијама
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Институт за јавно здравље Војводине, Нови Сад, Република Србија
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије – Јавно здравље
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Дизајн студије припада Ретроспективној студији. У циљу одређивања експресије гена Е6 и Е7 као показатеља онкогене активности високоризичних ХПВ генотипизацијом су првенствено утврђени најчешћи генотипови код жена Јужнобачког округа на узорку од 365 цервикалних брисева пацијенткиња старијих од 18 година, упућених од стране гинеколога у Центар за вирусологију, Института за јавно здравље Војводине, Нови Сад (2017. – 2021. године). Дистрибуција најчешћих ХПВ генотипова детектованих ДНК тестом је анализирана према цитологији и узрасним категоријама, док је онкогена активност испитана применом иРНК теста. Овим тестом су квалитативно детектовани транскрипти онкогена Е6 и Е7 најзаступљенијих високоризичних ХПВ. Клиничке карактеристике иРНК теста евалуиране су проценом и поређењем са ДНК тестом. Утврђен је значај релевантних фактора ризика и процењен је степен јачине њиховог утицаја за настанак и прогресију цервикалне интраепителне лезије. Добијени резултати поменутих анализа употребљени су у циљу конструисања предиктивног модела за идентификовање потенцијалног биомаркера као најјачег предиктора за настанак сквамозних интраепителних лезија цервикса. Додатно је извршена процена појединих демографских фактора и бихејвиоралних образаца за које је потврђено да утичу на стицање и перзистирање вирусне инфекције.</p>
<p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p>
<p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту ХПВ генотипизација</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p> <p>д) узорци ткива: навести врсту цервикални брисеви</p>

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту **доступна научна литература**

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) **Excel фајл**

б) **SPSS фајл**

в) **PDF фајл**

г) **Текст фајл**

д) **JPG фајл**

е) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли **велики број варијабли**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **365 цервикалних брисева**

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) **не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак измедју поновљених мера је _____

б) варијабле које се више пута мере односе се на _____

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип _____

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта **Ретроспективна студија података сакупљених током рутинског рада**

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

real time PCR апарат

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет добијених резултата је сматран валидним уколико су резултати тестирања свих контрола били задовољавајући према упутству произвођача комерцијалних комплета намењених за одређену врсту молекуларно биолошке анализе. Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и валидацијом добијених података.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у **Репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду**.

3.1.2. URL адреса **<https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>**.

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3. Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Истраживање је одобрено од стране Комисије за етичност клиничких испитивања на човеку Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду (број дозволе: 01-39/136/1) од 02.03.2017. године и Етичког одбора Института за јавно здравље Војводине (број: 01-252/3) од 13.02.2017. године.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално - делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

**Наташа Николић, маил: natasa.nikolic@mf.uns.ac.rs
natasa.nikolic@izjzv.org.rs**

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

**Наташа Николић, маил: natasa.nikolic@mf.uns.ac.rs
natasa.nikolic@izjzv.org.rs**

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

**Наташа Николић, маил: natasa.nikolic@mf.uns.ac.rs
natasa.nikolic@izjzv.org.rs**