



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Gordana Kovačević

TIPIZACIJA HUMANIH PAPILOMA VIRUSA (HPV) I MOLEKULARNE
VARIJANTE IDENTIFIKOVANIH TIPOVA

- doktorska teza -

Novi Sad, 2016

Zahvalnica

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji Centra za virusologiju, Instituta za javno zdravlje Vojvodine, mikrobiološkoj laboratoriji Departmana za Biologiju i Ekologiju PMF-a u Novom Sadu i laboratoriji Instituta za Mikrobiologiju i Imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Posebno želim da se zahvalim mojim mentorima dr Vesni Milošević, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i dr Petru Kneževiću, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na stručnoj pomoći, savetima i smernicama koji su doprineli kvalitetu rada, ali i svakodnevnoj pomoći i podršci tokom izrade i pisanja ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Aleksandri Knežević, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Beogradu, članu komisije, na stručnim savetima i pomoći u toku eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se članovima komisije, dr Ivani Hrnjaković-Cvjetković, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i dr Mihajli Đan, vanrednom profesoru PMF-a, za savete i smernice tokom pisanja ove disertacije.

Hvala kolegama, dipl. biologu Vesni Kukucka i mr. sci. biol. Milanu Dilasu, za pomoć u toku eksperimentalnog rada. Zahvaljujem se dr Branislavu Kovačeviću i dipl. ing. elektrotehničke Zoranu Topalovu za pomoć pri statističkoj obradi podataka.

Hvala kolektivu virusologije i svim kolegama koji su na posredan ili neposredan način doprineli izradi ove disertacije.

*Mojoj deci Sanji, Milošu i Zoranu,
bez kojih nijedan uspeh nije vredan, posvećujem ovu disertaciju*

LISTA SKRAĆENICA

- acc.no:** pristupni broj (eng. *Accession Number*)
- ak:** aminokiselina
- ASCC:** Američko društvo za kolposkopiju i cervikalnu patologiju (eng. *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*)
- ACIP:** Savetodavni komitet za imunizaciju (eng. *Advisory Committee on Immunization Practices*)
- ADSQ:** adenoskvamozni karcinom
- AIS:** adenokarcinom *in situ*
- ATP:** adenozin trifosfat
- BLAST:** osnovni bioinformatički alat za poravnanje sekvenci (eng. *The Basic Local Alignment Search Tool*)
- bp:** bazni parovi
- CI:** interval poverenja (eng. *Confidence interval*)
- CIN:** cervikalna intraepitelna neoplazija
- CIS:** karcinom *in situ*
- CTL:** citotoksični T limfociti
- ddNTP:** dideoksinukleotidi
- DNK:** dezoksiribonukleinska kiselina
- E6AP:** E6-asocirani protein (engl. *E6 associated protein*)
- EGFR:** epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*)
- FDA:** Agencija za kvalitet hrane i lekova SAD (eng. *Food and Drug Administration*)
- HPV:** humani papiloma virus
- HPV2:** bivalentna vakcina
- HPV4:** kvadrivalentna vakcina
- HPV9:** devetivalentna vakcina
- HR-HPV:** visoko rizični tipovi humanih papiloma virusa (eng. *high risk HPV*)
- HSIL:** visoko-gradusna intraepitelna lezija (eng. *high-grade squamous intraepitel lesion*)
- IARC:** Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*)
- ICTV:** Međunarodni Savet za Taksonomiju Virusna (eng. *International Council on Taxonomy of Viruses*)
- IFN:** interferon
- iRNK:** informaciona ribonukleinska kiselina
- IU:** internacionalna jedinica (eng. *International Units*)
- kDa:** kilo Dalton
- HSPGs:** heparan sulfat proteoglikan
- LR-HPV:** nisko rizični tipovi humanih papiloma virusa (eng. *low risk HPV*)
- LSIL:** nisko-gradusna intraepitelna lezija (eng. *low-grade squamous intraepitel lesion*)

MEGA: programski paket koji sadrži bioinformatički alat za filogenetsku analizu sekvenci (eng. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)

ML: maksimalna verovatnoća (eng. *Maximum Likelihood*)

NIBSC: Nacionalni institut za biološke standarde i kontrolu (eng. *The National Institute for Biological Standards and Control*)

NJ: (eng. *neighbor-joining* metod) algoritam za konstruisanje filogenetskih stabala na osnovu međusobne udaljenosti svakog para sekvenci, spajanjem „najbližih suseda”

nt: nukleotid

NTP: nukleozid trifosfat

OR: unakrsni odnos (eng. *Odds ratio*)

ORF: otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame*)

PCR: lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

RFLP: polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNK: ribonukleinska kiselina

SPI: seksualno prenosiva infekcija

VLP: virusu slična partikula (eng. *Virus like particule*)

WHO: Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*)

LISTA ILUSTRACIJA

Slika 2. 1.	Filogenetska analiza 170 tipova HPV-a, bazirana na sekvenci L1 gena	6
Slika 2.2.	Genotipske varijante HPV u okviru <i>Alpha-9</i> vrste	8
Slika 2.3.	Humani papilomavirus	9
Slika 2.4.	Linearni prikaz organizacije i strukture HPV genoma	10
Slika 2.5.	Proces nastanka E1 heksamerne helikaze na početnom mestu replikacije-ori	12
Slika 2.6	Struktura HPV E2 proteina i proteinskih izoformi	13
Slika 2.7.	Uloga HPV E2 proteina u vezivanju za ćelijski genom	13
Slika 2.8	Uloga HPV E5 onkoproteina u sprečavanju apoptoze	15
Slika 2.9.	Struktura 6 onkoproteina	16
Slika 2.10.	Uloga E6 onkoproteina u imortalizaciji ćelije	17
Slika 2.11.	Uloga E7 onkoproteina u imortalizaciji HPV inficirane ćelije	18
Slika 2.12.	Kristalna struktura HPV 16 L1 kapsidnog proteina	20
Slika 2.13.	Vezivanje virusne čestice za receptore na površini bazalne ćelije	22
Slika 2.14.	Mehanizmi endocitoze kod HPV 16, BPV 1 i HPV 31	23
Slika 2.15.	Poliadenilacija i alternativno prekrajanje na primeru HPV 16	25
Slika 2.16.	Uporedni sistem citološke i histološke klasifikacije	28
Slika 2.17.	Podela HPV prema onkogenom potencijalu	31
Slika 2.18.	Uloga virusnih proteina u produktivnoj infekciji	34
Slika 2.19.	Povezanost displastičnih lezija na grliću materice sa epizomalanim i integrisanim genomom HPV	35
Slika 2.20.	Uloga HPV E6 i E7 onkoproteina u razvoju maligniteta	37
Slika 2.21.	Algoritam za primenu HPV testa u skriningu raka grlića materice	48
Slika 2.22.	Konsenzus prajmeri za umnožavanje regiona L1 gena	52
Slika 5.1.	Gel elektroforeza za L1 gen HPV PCR	82
Slika 5.2.	Primer hromatograma koji prikazuje HPV infekciju sa jednim genotipom na osnovu analize L1 gena dužine 450 bp	83
Slika. 5.3.	Primer hromatograma mešovite HPV infekcije na osnovu analize L1 gena dužine 450 bp	83
Slika 5.4.	Primer konsenzus sekvence nakon poravnanja u 5' i 3' pravcu	84
Slika 5.5.	Identifikacija dobijenih sekvenci BLAST programom	84
Slika 5.6.	Upoređivanje dobijene sekvence sa sekvencama u genskoj bazi podataka primenom BLAST metode	85
Slika.5.7.	Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu 39 nukleotidnih sekvenci HPV tipova: 16, 18,31 i 33, na nivou L1 gena, poreklom iz AP Vojvodine	87
Slika 5.8.	Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci 28 izolata HPV 16 na nivou L1 gena	88
Slika.5.9.	Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci pet izolata HPV 18 L1 gena	89
Slika 5.10	Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci tri izolata HPV 31 L1 gena	90
Slika 5.11.	Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci tri izolata HPV 33 L1 gena	90

Slika. 5.12.	Kladogram konstruisan na osnovu PCR-RFLP in silico rezultata za različite linije i podlinije HPV tipa 51	97
Slika. 5.13.	PCR produkti na nivou L1 gena isečeni restrikcijom endonukleazom DraI i TaqI	98
Slika 5.14.	PCR produkti na nivou L2 gena isečeni restrikcijom endonukleazom TaqI	98
Slika. 5.15.	PCR produkti na nivou L2 gena isečeni restrikcijom endonukleazom PstI	99
Slika 5.16.	PCR produkti na nivou E1 gena isečeni restrikcijom endonukleazom DraI	99
Slika 5.17	Filogram sa položajem 11 ispitivanih uzoraka, na kome se jasno uočava da svi ispitivani uzorci pripadaju liniji A, podliniji A1	100

LISTA TABELA:

Tabela 2.1.	Uporedni sistem citološke klasifikacije	29
Tabela 2.2.	Funkcije E6 i E7 onkoproteina kod HPV tipova visokog i niskog onkogenog potencijala	32
Tabela 4.1.	Oligonukleotidna sekvenca MY09/MY11 prajmera	62
Tabela 4.2.	HPV sekvence preuzete iz GenBank baze podataka korišćene u filogenetskoj analizi	65
Tabela 4.3.	Oligonukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje L1, L2 i E1 gena HPV tipa 51	67
Tabela 4.4.	Karakteristike restrikcijom enzima korišćenih za RFLP PCR produkata	68
Tabela 5.1.	Rezultati analize varijanse za prisustvo HPV tipova prema citološkoj dijagnozi i starosnoj dobi u ispitivanom uzorku žena Južnobačkog okruga	73
Tabela 5.2.	Rezultati NZR testa za prisustvo individualnih HPV tipova u odnosu na starost ispitanica	74
Tabela 5.3.	Rezultati NZR testa za prisustvo individualnih HPV tipova u odnosu na citološku dijagnozu	76
Tabela 5.4.	Povezanost demografskih karakteristika sa HPV infekcijom	78
Tabela 5.5.	Povezanost ponašanja rizičnih po seksualno i reproduktivno zdravlje sa HPV infekcijom	79
Tabela 5.6.	Povezanost ponašanja koja se odnose na brigu o reproduktivnom zdravlju sa HPV infekcijom	80
Tabela 5.7.	Model Multivarijantne logističke regresije	81
Tabela 5.8.	Proračun genetičke udaljenosti identifikovanih izolata HPV tipa 16 na nivou L1 gena u odnosu na referentne genotipove koji pripadju linijama A, B, C i D	92
Tabela 5.9.	Proračun genetičke udaljenosti identifikovanih izolata HPV tipa 18 na nivou L1 gena u odnosu na referentne genotipove koji pripadaju linijama A, B i C	93
Tabela 5.10.	Genetička udaljenost identifikovanih izolata HPV tipa 31 u odnosu na referentne genotipove linija A, B i C	94
Tabela 5.11.	Genetička udaljenost identifikovanih izolata HPV tipa 33 u odnosu na referentne genotipove linija A, B i C	97
Tabela 5.12.	Rezultati in silico restrikcijom digestije PCR produkata	96
Tabela 6.1.	Šema brze diferencijacije A i B linije i odgovarajućih podlinija HPV tipa 51 primenom PCR-RFLP metode	117

LISTA GRAFIKONA:

Grafikon 5.1.	Zastupljenost HPV infekcije u ispitivanom uzorku žena Južnobačkog okruga, AP Vojvodine (n=564)	70
Grafikon 5.2.	Distribucija 12 visokorizičnih tipova HPV među pozitivnim ženama Južnobačkog okruga, AP Vojvodine (n=292)	71
Grafikon 5. 3.	Zastupljenost pojedinačnih i višestrukih infekcija HPV među HPV DNK pozitivnim ženama (n=292)	71
Grafikon 5.4.	Distribucija visokorizičnih tipova HPV u odnosu na starost	72
Grafikon 5.5.	Distribucija visokorizičnih HPV u odnosu na citološki nalaz	75
Grafikon 5.6.	Distribucija onkogenih tipova HPV koji su u sastavu preporučenih profilaktičkih vakcina u nevakcinisanih žena Južnobačkog okruga	80

Sadržaj

Zahvalnica	i
Lista skraćenica	ii
Lista ilustracija, tabela i grafikona	iv
Sadržaj	vii
1.0. UVOD	1
2.0. OPŠTI DEO	3
2.1. FAMILIJA PAPILOMAVIRIDAE	4
2.1.1. Nomenklatura i klasifikacija	4
2.1.2. Intratipske varijante	7
2.2. HUMANI PAPILOMA VIRUSI	9
2.2.1. Struktura virusnog genoma	9
2.2.2. Građa viriona	10
2.2.3. Karakteristike i uloga ranih virusnih proteina	11
2.2.4. Karakteristike i uloga kasnih virusnih proteina	19
2.3. ŽIVOTNI CIKLUS HUMANIH PAPILOMA VIRUSA	21
2.3.1. Virusna adsorpcija, penetracija i dekapidacija	21
2.3.2. Virusna replikacija, transkripcija, translacija	23
2.3.3. Sklapanje i izlazak virusnih čestica	25
2.4. PODELA HUMANIH PAPILOMA VIRUSA	26
2.4.1. Podela HPV na osnovu lokalizacije infekcije	26
2.4.2. Podela HPV prema onkogenom potencijalu	30
2.5. KARAKTERISTIKE HPV INFEKCIJE	33
2.5.1. Vrste HPV infekcije	33
2.5.2. Mehanizam maligne transformacije	36
2.5.3. Imunološki odgovor na HPV infekciju	37
2.6. KOFAKTORI RIZIKA	40
2.7. EPIDEMIOLOGIJA RAKA GRLIĆA MATERICE	44
2.8. PREVENCIJA RAKA GRLIĆA MATERICE	45
2.8.1. Primarna prevencija	45
2.8.2. Sekundarna prevencija	47
2.8.2.1. Skrining program za prevenciju raka grlića materice na teritoriji Republike Srbije	48
2.8.3. Tercijerna prevencija	49
2.9. METODE ZA DOKAZIVANJE I GENOTIPIZACIJU HPV	50
2.9.1. Tradicionalne metode	50
2.9.2. Serološke metode	50
2.9.3. Molekularne metode za dokazivanje HPV DNK	50
2.9.4. Molekularne metode za dokazivanje HPV iRNK	52
2.9.5. Tehnike prognostičkih biomarkera	53
2.9.6. Metode sekvenciranja DNK genoma	54
2.9.7. PCR/RFLP–PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism	55
3.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	58

4. 0. MATERIJAL I METODE	59
4.1. Materijal	60
4.1.1. Studijska grupa	60
4.1.2. Uzorak	60
4.1.3. Anketni upitnik	60
4. 2. Metode HPV dijagnostike	61
4.2.1. Izolacija DNK	61
4.2.2. Genotipizacija visokorizičnih HPV real-time PCR metodom	61
4.2.3. Određivanje nukleotidne sekvence	62
4.2.3.1. Amplifikacija HPV L1 gena	62
4.2.3.2. Prečišćavanje PCR produkata	63
4.2.3.3. Sekvenciranje HPV izolata na nivou L1 gena	63
4.2.4. Bioinformatička obrada podataka	64
4.2.5. PCR-RFLP metoda	66
4.3. Statistička analiza	68
5.0. REZULTATI	69
5.1. Opšte karakteristike ispitivane populacije	70
5.2. Distribucija HPV genotipova	70
5.2.1. Distribucija visokorizičnih tipova HPV u odnosu na starost	72
5.2.2. Distribucija visokorizičnih tipova HPV u odnosu na citološki nalaz	74
5.2.3. Distribucija visokorizičnih HPV tipova u odnosu na zastupljenost u profilaktičkim vakcinama	76
5.3. Uticaj kofaktora na sticanje i perzistiranje HPV infekcije	77
5.4. Genomske sekvence HPV izolata	82
5.4.1. Rezultati analize PCR produkata za L1 gen HPV DNK	82
5.4.2. Analiza hromatograma sekvenci L1 HPV DNK	82
5.4.3. Identifikacija nukleotidnih sekvenci BLAST metodom	84
5.5. Filogenetske analize	86
5.5.1. Izrada filogenetskog stabla	86
5.5.2. Genetske udaljenosti nukleotidnih sekvenci	91
5.6. Rezultati PCR-RFLP metode	95
6.0. DISKUSIJA	101
6.1. Zastupljenost visokorizičnih tipova HPV na području Južnobačkog okruga, AP Vojvodine	102
6.2. Uticaj kofaktora na sticanje i perzistiranje HPV infekcije	108
6.3. Varijabilnost HPV genotipova	112
7.0. ZAKLJUČCI	120
8.0. LITERATURA	124
9.0. PRILOZI	141

1.0. Uvod

Humani papilomavirusi (HPV) su najvažniji onkogeni virusi koji uzrokuju oko 5-10% svih neoplazija kod čoveka. Prisustvo HPV je utvrđeno u više od 99,7% slučajeva invazivnog karcinoma grlića materice, više od 60-90% raka anusa i vagine, 50% raka vulve, 30-50% raka penisa, 25-30% raka ždrela, a povezanost sa malignim bolestima nekih drugih lokalizacija se intenzivno istražuje. Zbog toga je Humani papilomavirus od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC engl. *International Agency for Research on Cancer*) svrstan u prvu grupu karcinogena za ljude, a Svetska zdravstvena organizacija je 2009. godine ukazala na važnost raka grlića materice i druga oboljenja povezana sa HPV, koja predstavljaju globalni javno-zdravstveni problem.

Invazivni karcinom grlića materice je najučestaliji maligni tumor kod žena širom sveta. Globalno, među karcinomima, rak grlića materice je četvrti po učestalosti i drugi vodeći uzrok smrti kod žena. Srbija se već duži niz godina nalazi u vrhu evropskih zemalja po učestalosti ovog oboljenja (standardizovana stopa incidencije je 23,8 na 100.000 žena). Na godišnjem nivou, u Srbiji od raka grlića materice oboli 1501, a umre 609 žena, odnosno svakog dana obole četiri žene, a jedna umre od ove bolesti. Posebno je zabrinjavajući podatak da se starosna granica obolelih žena pomera ka mlađoj životnoj dobi, pa je među ženama starosti od 15-44 godine, karcinom grlića materice drugi po učestalosti.

Značajno smanjenje incidencije i mortaliteta raka grlića materice postignuto je uvođenjem Papanikolau testa, koji je do 50-tih godina prošlog veka predstavljao prvu liniju u skriningu ove bolesti. Međutim, u odnosu na standardni skrining, novi koncepti prevencije zasnovani na rezultatima HPV DNK testa pokazuju porast osetljivosti i specifičnosti u otkrivanju premalignih promena. Zbog velike senzitivnosti i negativne prediktivne vrednosti, pozitivan HPV DNK test je dobar pokazatelj prevalencije infekcije i ukazuje na povećan rizik od razvoja prekančeroznih i kanceroznih lezija.

Tokom poslednje decenije, razvoj veoma osetljivih i specifičnih molekularnih metoda rezultirao je velikim brojem komercijalnih testova namenjenih dijagnostici HPV. Pored toga, inovativne tehnologije doprinele su otkrivanju ne samo novih tipova, nego i otkrivanju velikog broja molekularnih varijanti već poznatih tipova.

U novije vreme sve veći broj studija sugerše da se genotipske varijante HPV, uprkos filogenetskoj srodnosti, mogu razlikovati u patogenosti i različito doprineti razvoju cervikalnih neoplazija. Iz tog razloga, heterogenost genomskih varijanti HPV i njihov

biomedicinski značaj je polje koje se intenzivno istražuje. Postojeći naučni dokazi nametnuli su potrebu prikupljanja izolata pojedinih genotipova HPV iz celog sveta, kako bi se napravio svojevrsan "katalog" genomskih varijanti. Sumirani podaci o njihovoj geografskoj zastupljenosti neophodni su za razvoj profilaktičkih i terapijskih vakcina, racionalan dizajn dijagnostičkih testova, kao i strategije skrininga, zbog čega je svaki podatak vezan za ovu problematiku izuzetno koristan.

2.0. Opšti deo

2.1. FAMILIJA *Papillomaviridae*

Porodica *Papillomaviridae* obuhvata veliku grupu malih DNK virusa, koji inficiraju gotovo sve kopnene kičmenjake-Tetrapode (*Harari i sar., 2014*). Papiloma virusi su genetski izrazito stabilni i evolutivno konzervirani. Odlikuje ih specifičnost za vrstu, a raspoloživi podaci ukazuju da nisu zabeleženi slučajevi prelaska „barijere vrste“ (*Van Doorslaer i sar., 2013*). Tokom evolucije, sa svojim prirodnim domaćinom, razvili su jednostrani interspecijski odnos u vidu komensalizma, što ih ubrajaja u grupu najuspešijih infektivnih agenasa na planeti (*Bravo i Félez-Sánchez, 2015*).

Do danas je poznato preko 240 tipova ovih virusa, od kojih oko 170 inficira humanu populaciju (<http://pave.niaid.nih.gov/>). Ova velika grupa je prema svom prirodnom domaćinu, nazvana *Humani Papiloma Virusi* (HPV). HPV pokazuju afinitet za epitelne ćelije kože ili sluzokože. U najvećem broju slučajeva uzrokuju benigne samoograničavajuće lezije, papilome (bradavice) i kondilome (genitalne bradavice). Međutim, glavni interes za njihovo pručavanje leži u povezanosti sa nastankom karcinoma. Danas je poznata činjenica da su HPV povezani sa 5-10% svih humanih neoplazija (*Echenique i Phillips, 2011; Van Doorslaer i sar., 2013*).

2.1.1. Nomenklatura i klasifikacija

U prvobitnoj klasifikaciji iz 1971. godine, papilomavirusi su zajedno sa polyomavirusima, pripadali porodici *Papovaviridae* (*de Villiers i sar., 2004*). Međutim, na VII sednici Međunarodnog Saveta za Taksonomiju Virusa (ICTV, *engl. International Committee on the Taxonomy of Viruses*) porodica *Papovaviridae* je podeljena na dve nove familije: *Papillomaviridae* i *Polyomaviridae* (*van Regenmortel i sar., 2000; ICTV, 2002*). Humani papilomavirusi su taksonomski uvršteni u porodicu *Papillomaviridae*, zajedno sa ostalim animalnim vrstama.

Prva opšte prihvaćena klasifikacija humanih papilomavirusa objavljena je 2004. godine (*de Villiers i sar., 2004*). Ova klasifikacija je rezultat rada grupe istraživača u Međunarodnom Referentnom centru za humane papilomaviruse, istraživačkog Instituta za kancer u Heidelbergu, na čelu sa Prof. dr Ethel-Michele de Villiers. Zadatak ovog referentnog centara, osnovanog 1985. godine, je bio potvrđivanje nukleotidnih sekvenci novih genotipova HPV, odobravanje službene numeričke klasifikacije i čuvanje

referentnih bioloških uzorka pojedinih genotipova (*Bernard i sar., 2010*). Tokom 2012. godine Međunarodni HPV Referentni centar je premešten u Karolinska Institutut u Švedskoj pod vođstvom Prof. dr Joakim Dillner (*Bzhalava i sar., 2015*).

Papiloma virusi pripadaju grupi virusa u kojoj klasifikacioni sistem iznad nivoa porodice nije postignut. Međutim, kriterijumi za razvrstavanje u niže taksonomske kategorije su jasno definisani. S obzirom da je u genomu familije *Papillomaviridae*, kasni gen L1 najviše stabilan, nukleotidna sekvenca ovog gena koristi se u filogenetskoj analizi i klasifikaciji (*de Villiers i sar., 2004*).

Na osnovu sličnosti u L1 ORF regionu, izvršena je sledeća podela:

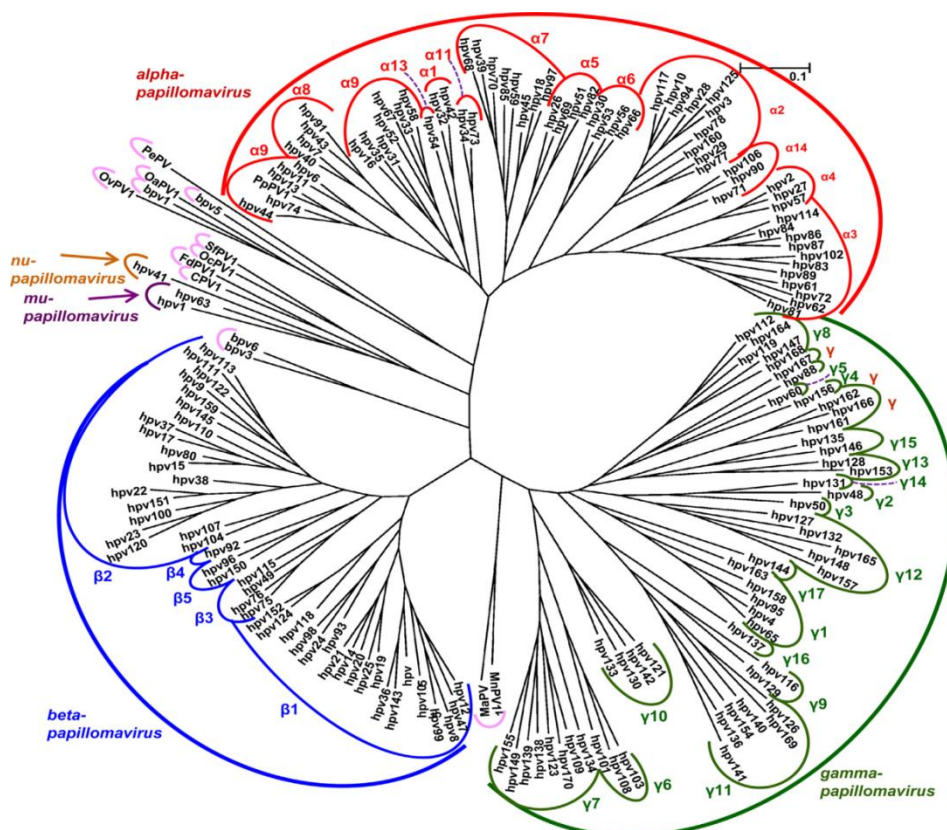
1. u isti rod (genus) svrstavaju se virusi koji imaju više od 60% sličnosti
2. u istu vrstu (species) svrstavaju se virusi koji imaju 60-70% sličnosti
3. u istu tip svrstavaju se virusi koji imaju 71-89% sličnosti
4. u isti subtip svrstavaju se virusi koji imaju 90-98% sličnosti
5. u istu varijantu svrstavaju se virusi koji imaju više od 98% sličnosti

Burk i sar. (2013) i Chen i sar. (2011; 2013) predlažu izbegavanje termina serotip, soj i sl. i preporučuju podelu na varijantne linije i podlinije. Izolati istog HPV tipa po njima pripadaju istoj varijantnoj liniji, ako je razlika na nivou DNK sekvence 1-10%, a istoj podliniji ako je razlika 0,5-1,0%. S obzirom na to da je autor Robert Burk trenutno predsedavajući član radne grupe ICTV za papilomaviruse, u radu je prihvaćena ova terminologija, odnosno podela tipova na varijantne linije i podlinije.

Prema klasifikaciji de Villiers i sar. (2004), rodovi papiloma virusa označeni su slovima grčkog alfabeta, dok su tipovi ovog virusa nosili numeričku oznaku, prema vremenskom redosledu otkrića. Klinički najznačajniji genotipovi humanih papiloma virusa prema tadašnjoj klasifikaciji ubrajaju se u rodove: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Nupapillomavirus* i *Mupapillomavirus*. Uvođenje novih molekularnih dijagnostičkih metodologija, a naročito metagenomsko sekvenciranje, dovelo je do naglog povećanja broja identifikovanih tipova HPV. Stručnjaci u Karolinska Institutu pretpostavljaju da ukupan broj postojećih HPV nadmašuje 400 (*Bzhalava i sar., 2015*), ali do danas su kompletne sekvence poznate za oko 170 tipova HPV (slika 2.1), koji su grupisani u pet glavnih rodova (*de Villiers i sar., 2013*).

Rod *Alphapapillomavirus* obuhvata 14 vrsta (α -14) čiji predstavnici uglavnom inficiraju mukozne membrane. Kompletne sekvence su poznate za 65 tipova ovog roda,

pri čemu je 12 tipova od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC, engl. *International Agency for Research on Cancer*) proglašeno humanim karcinogenima.



Slika 2.1. Filogenetska analiza 170 tipova HPV-a, bazirana na sekvenci L1 gena (prema: *de Villers i sar., 2013*)

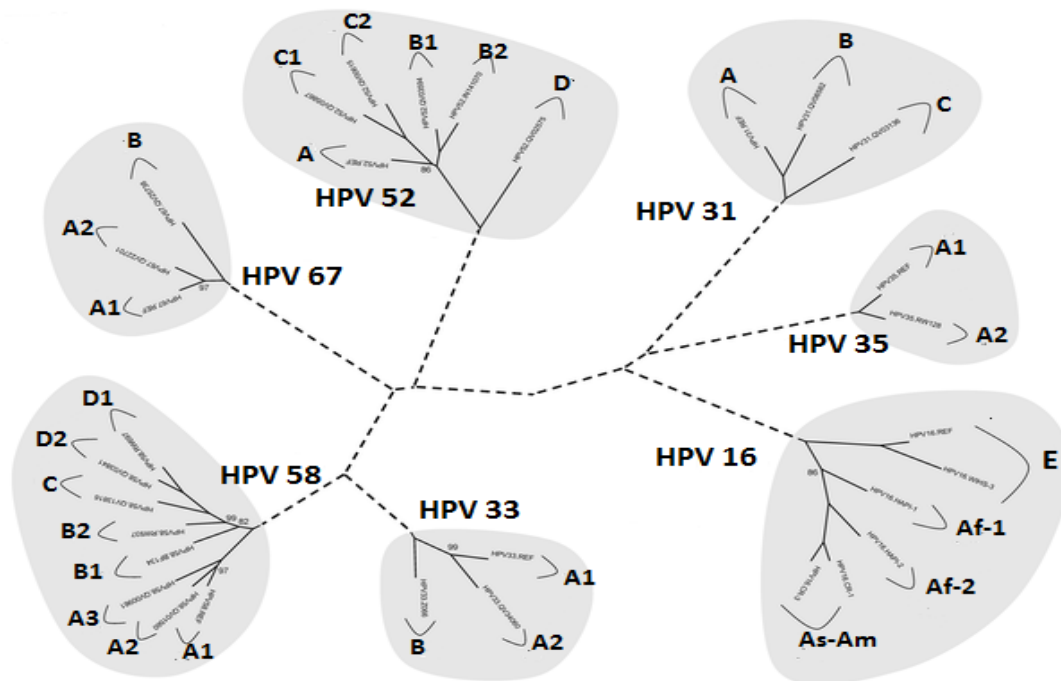
Rod *Betapapillomavirus* obuhvata šest vrsta (β , 1-6), čiji predstavnici najčešće uzrokuju benigne promene na koži. Nedavne studije su pokazale da su vrste *Beta-1*, *Beta-2* i *3* odgovorne za nastanak skvamoznog ćelijskog karcinoma kože. Vrste roda *Gammapapillomavirus* (γ , 1-20) pretežno su povezane sa kožnim lezijama. U proteklih pet godina najveći broj dobijenih izolata pripada ovom rodu, koji do danas broji 79 kompletno sekvencioniranih tipova (*Bzhalava i sar., 2015*). Tipovi HPV1 i HPV63 još uvek su jedini predstavnici roda *Mupapillomavirus*, a HPV41 roda *Nupapillomavirus* (*de Villers i sar., 2013; ICTV, 2014*).

2.1.2. Intratipske varijante

Izolati istog HPV tipa prvobitno su smatrani „varijantom“ ukoliko se razlike u nukleotidnoj sekvenci L1 gena kreću do 2% (*de Villers i sar., 2004*). HPV varijante su grupisane u filogenetske klastere i subklastere, koji su obično dobijali naziv u zavisnosti od geografske pripadnosti (npr. evropske i ne-evropske varijante). Međutim, razlike na nivou L1 gena nisu dovoljno informativne, jer HPV varijante sadrže nukleotidne promene različito pozicionirane u genomu. Iz tog razloga, radna grupa ICTV (*engl. International Committee on Taxonomy of Viruses*) predložila je novi sistem za klasifikaciju HPV varijanti, koji uključuje sekvencu kompletnog genoma (*Bernard i sar., 2010*). Kao što je naglašeno, HPV varijante su grupisane u linije (*engl. lineage*) i sublinije (*engl. sublineages*). Ukoliko razlike između punih genoma istih HPV tipova iznose približno 1,0-10,0 % varijante se grupišu u linije, dok sublinija podrazumeva razlike od 0,5-1,0% između linija. Svaka linija varijanti je alfa-numerički označena (slika 2.2). Referentni tip uvek pripada liniji A i/ili subliniji A1. Nomenklatura linija i sublinija nedavno je ažurirana (*Chen i sar., 2011; Burk i sar., 2013*).

S obzirom da HPV tipovi 16 i 18 uzrokuju oko 70% slučajeva karcinoma grlića materice, nukleotidna varijabilnost navedenih genotipova je najviše istraživana. Studije sprovedene širom sveta, pružile su dokaze da varijante HPV tipa 16 i 18 pokazuju geografske i etničke razlike i time odražavaju moguće šablone ljudskih migracija tokom istorije (*Chen i sar., 2011; Cornet i sar., 2012; Chen i sar., 2009*). Poređenjem nukleotidnih sekvenci utvrđene su brojne varijante HPV tipa 16, koje su prema prvobitnoj klasifikaciji svrstane u 5 glavnih filogenetskih grana: evropske, azijske, azijsko-američke, afričke-1 i afričke-2 (*Yamada i sar., 1995*). Međutim, nova filogenetska nomenklatura svrstava varijante HPV tipa 16 u četiri loze (*engl. lineage*). U liniju A, koja obuhvata sublinije: A1, A2, A3 i A4 svrstane su evro-azijske varijante; linija B obuhvata afričke varijante (Af-1); linija C obuhvata afričke varijante predhodno označene kao Af-2; D linija sa sublinijama D1, D2 i D3 obuhvata severno-američke i azijsko-američke varijante (*Burk i sar., 2013; Chen i sar., 2011*). Opsežnim proučavanjem genoma HPV tipa 16, uočene su mnogobrojne polimorfne pozicije, koje mogu uticati na upornost HPV infekcije i povećani rizik od progresije prekanceroznih lezija u karcinom grlića materice (*Cornet i sar., 2013*).

Genomske varijante HPV 18, prema prvobitnoj klasifikaciji svrstane u tri glavne grane: evropske, afričke i azijsko-američke (*Ong i sar., 1993*).



Slika 2.2. Genotipske varijante HPV u okviru Alpha-9 vrste (adaptirano iz: *Chen i sar., 2011*)

Nova klasifikacija prema Chen i sar. (2013) svrstava varijante HPV tipa 18 u tri linije. Linija A sadrži pet sublinija (A1-A5), pri čemu sublinije A1 i A2 obuhvataju azijsko-američke varijante, a sublinije A3 i A4 evropske varijante. Liniju A5 čini samo jedan izolat, označen kao CU11, dobijen od pacijentkinje sa Tajvana (*Lurchachaiwong i sar., 2010; Chen i sar., 2013*). Linija B (sa sublinijama: B1, B2 i B3) i linija C obuhvataju afričke varijante (*Burk i sar., 2013; Chen i sar., 2013*). U poređenju sa varijantama HPV tipa 16, varijante HPV 18 pokazuju manji procenat genetičke heterogenosti. Takođe je zapaženo da se manji broj ključnih nukleotidnih pozicija može koristiti za razlikovanje glavnih linija, kao i sublinija (*Schlecht i sar., 2005*). Pored toga, pokazano je da se neevropske varijante češće nalaze u adenokarcinomima nego u cervikalnim skvamoznim karcinomima (*Villa, 2000; Sichero i sar., 2007; Burk i sar., 2013*).

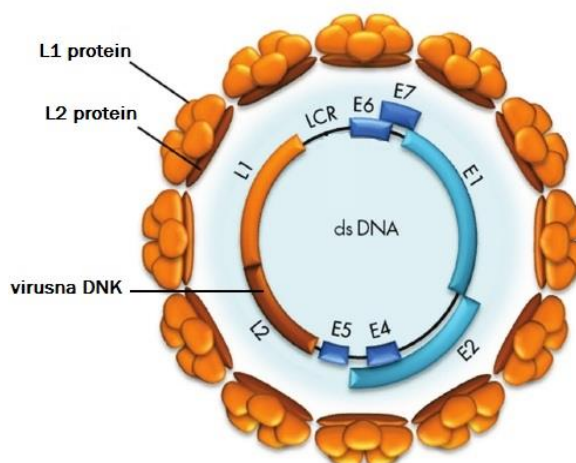
Genomska raznolikost i filogenetska srodnost ostalih onkogenih tipova HPV je istraživana u manjoj meri. Do sada je poznato da su varijante HPV31 grupisane u A, B i C linije, dok HPV33 varijante grade dihotomo filogenetsko stablo (*Chen i sar., 2011*). Pored GenBank i EMBL baze podataka, većina sekvenci Humanih Papiloma virusa je dostupna na sajtu <http://pave.niaid.nih.gov/>

2.2. HUMANI PAPILOMA VIRUSI

2.2.1. Struktura virusnog genoma

Humani papiloma virusi (HPV) imaju morfološke, biofizičke i biohemijske karakteristike porodice i roda kome pripadaju. To su ikozaedarno simetrični virusi, građeni od spoljašnjeg kapsidnog omotača unutar koga je smešten virusni genom. Prosečna veličina virusne čestice iznosi oko 55 nm u prečniku (*Fauquet i sar., 2005*).

Kapsidni omotač izgrađen je od dve vrste strukturnih proteina: L1 (*engl.major*) i L2 (*engl.minor*) proteina. Glavna belančevina kapsida, L1 protein, čini 80% težine virusne čestice, dok je L2 protein zastupljen u manjoj količini, odnosno njihov molarni odnos iznosi 30 : 1 (*Varsani i sar., 2003*).



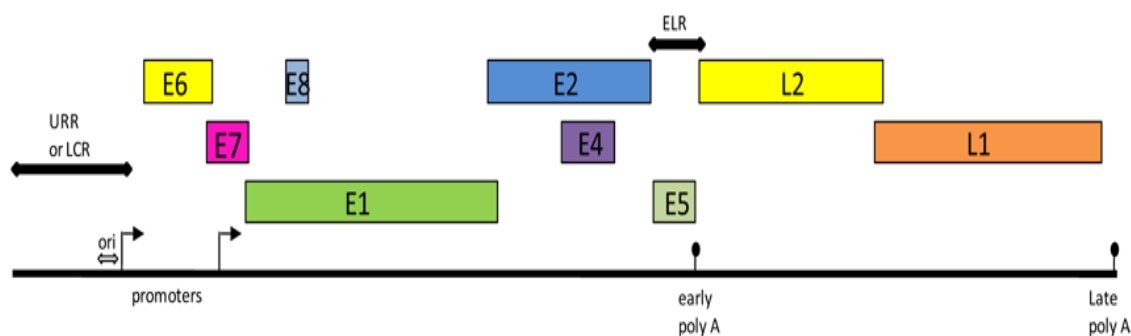
Slika 2.3. Humani papilomavirus. Adaptirano iz: *Medicinska virologija: Kocjan BJ, Poljak M. Papiloma-virusi. Medicinski razgledi, eds. Ljubljana; 2011. p. 41-60.*

Humani papiloma virusi imaju dvolančani, kružni, kovalentno zatvoren genom DNK od približno 8000 parova baza (bp). Molekulska masa DNK iznosi 47×10^6 Da. Virusni kapsid je građen od 360 molekula L1 proteina, koji su raspoređeni u 72 pentamere (60 heksavalentnih i 12 pentavalentnih pentamera). Za svaku L1 pentameru vezan je jedan monomer L2 proteina (*Kocjan i sar., 2011; Doobar i sar., 2015*). DNK zauzima oko 10-13% od ukupne težine viriona (slika 2.3). DNK zrelog viriona je udružena sa histonskim proteinima H2a, H2b, H3 i H4 u hromatinskom kompleksu viriona (*Fauquet i sar., 2005*).

HPV nemaju lipidne ovojnice, što doprinosi njihovoj otpornosti na 70% etanol, deoksiholate, etar i hloroform. HPV virioni pokazuju otpornost na visoke temperature, isušivanje, niske pH vrednosti i delovanje proteaza (Sapp, 2013).

2.2.2. Građa viriona

Genomska organizacija *Humanih papiloma virusa (HPV)* je visoko konzervisana. Sva kodirajuća područja ORF (eng. *open reading frame*) smeštena su na jednom DNK lancu i sastoje se od gena koji se delimično preklapaju (slika 2.4). Genom HPV kodira osam glavnih proteina (McBride i Jang, 2013).



Slika 2.4. Linearni prikaz organizacije i strukture HPV genoma (adaptirano iz: McBride i Jang, 2013)

Na osnovu lokacije otvorenih okvira čitanja (ORF) i genske ekspresije u različitim vremenskim intervalima, genom je funkcionalno podeljena na tri regiona:

1. **Rani kodirajući region**-označen velikim slovom E (prema engl. *early*),
2. **Kasni kodirajući region**-označen velikim slovom L (prema engl. *late*),
3. **Nekodirajući, regulatorni region** (engl. *Non-coding long control region*-LCR ili *Upstream regulatory region*-URR) sadrži oko 400-1000 bp (10% od HPV genoma), razdvaja rane od kasnih gena i ne kodira sintezu belančevina. Sadrži niz cis-elementa koji su potrebni za regulaciju ekspresije pojedinih gena, replikaciju i inkorporiranje virusnog genoma u virusnu česticu (Bernard, 2013).

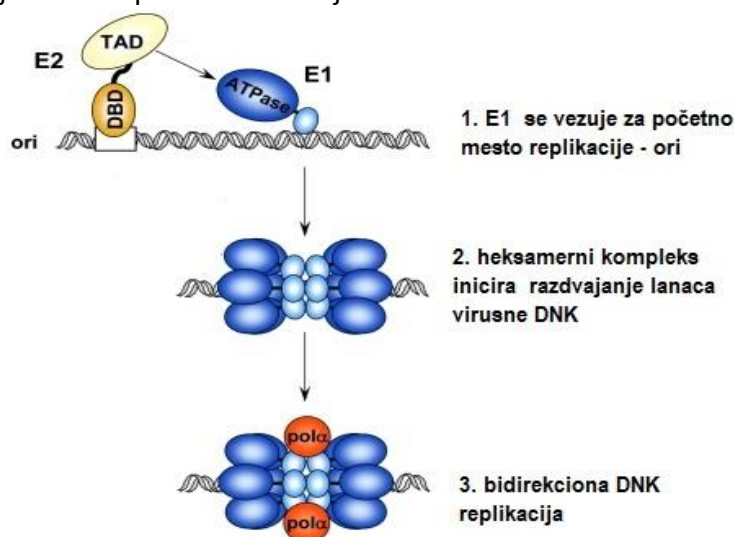
Ove tri regije su odvojene poliadenilacionim (PA) signalima, pri čemu je rani poliadenilacioni signal pAE (*engl. early polyadenylation*) terminalno postavljen i razdvaja rane od kasnih gena, dok kasni pAL (*engl. late polyadenylation*) razdvaja kasne gene od nekodirajuće regije. Iako je broj virusnih gena ograničen malom veličinom HPV genoma, broj kodiranih proteina je mnogo veći, jer ekspresija virusnih gena podrazumeva korišćenje višestrukih promotera i složene obrasce prekranja (*Doobar i sar., 2015*).

2.2.3. Karakteristike i uloga ranih virusnih proteina

Rani kodirajući region je označen velikim slovom E (prema *engl. early*), veličine je oko 4,5 kb i obuhvata oko 50% virusnog genoma. Većina genotipova HPV ima šest različitih ranih gena: E1, E2, E4, E5, E6 i E7, dok postoje i tipovi koji sadrže ORF E3 i ORF E8 (*Fauquet i sar., 2005*). Međutim, uočeno je i odstupanje od ovakve genomske organizacije. Tako na primer, nekoliko predstavnika vrste *Alpha* i *Alpha-6*, kao i roda *Gammapapillomavirus* u okviru ranog regiona ne sadrže E5 gen, dok HPV 101, HPV 103 i HPV 108 ne sadrže E6 gen (*de Villers i sar., 2013*). Proteinski produkti ranih gena imaju ulogu u replikaciji i transkripciji virusne DNK i oslobađanju zrelih viriona iz ćelije domaćina. U inficiranim keratinocitima moduliraju imunološki odgovor, ometanjem ćelijskih signalnih puteva i procesa apoptoze. Kod genotipova visokog rizika, rani geni učestvuju u malignoj transformaciji inficiranih ćelija (*Doobar, 2005*).

Gen za E1 protein je najveći gen u genomu papiloma virusa i relativno je dobro očuvan među različitim tipovima. Produkt ovog gena, E1 protein, je veličine oko 70 kDa i izražava se već u ranom stadijumu virusnog životnog ciklusa (*Pang i Thierry, 2013*). Njegova najvažnija uloga je u virusnoj replikaciji i amplifikaciji. E1 protein sadrži tri funkcionalna domena: N-terminalni regulatorni domen, DNK vezujući domen (DBD, Dimer Binding Domain) i C-terminalni ATP-aza/helikaza domen (*D'Abramo i Archambault, 2011*). E1 protein se specifično vezuje za početno mesto replikacije-ori uz pomoć virusnog E2 proteina. Nastali heksamerni kompleks ima helikaznu aktivnost i inicira odmotavanje i razdvajanje lanaca virusne DNK (slika 2.5). Pored interakcije sa virusnim E2 proteinom, E1 ostvaruje vezu sa nizom ćelijskih proteina (histon H1, SV1/SNF5, ciklin E /Cdk2, Hsp40/Hsp70 i Ubc9). Iako fiziološki značaj nekih od ovih interakcija

tek treba da se utvrdi, izvesne interakcije su dobro poznate. Interakcija sa H1 histonom važna je u uklanjanju histona pre odmotavanja virusne DNK.

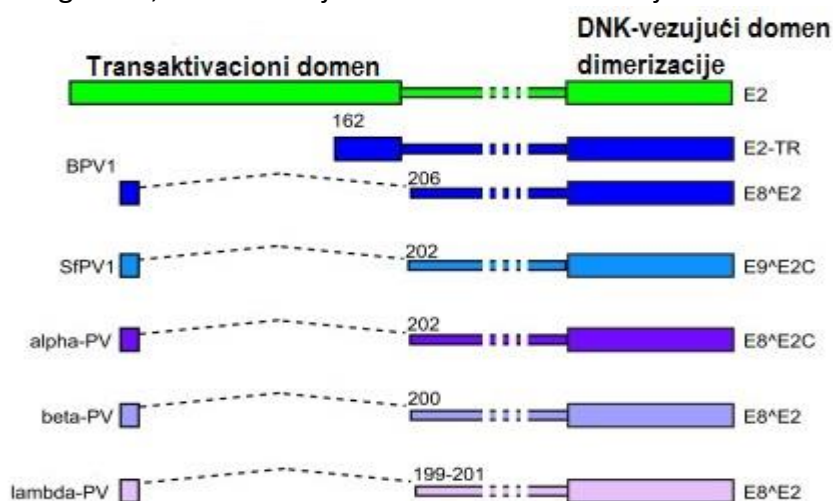


Slika 2.5. Proces nastanka E1 heksamerne helikaze na početnom mestu replikacije-ori (adaptirano iz: *D'Abramo i Archambault, 2011*)

Usmeravanje ćelijske DNK replikacione mašinerije na početno mesto virusne replikacije-ori, omogućeno je interakcijom E1 proteina sa p180 podjedinicom ćelijske DNK polimeraze α - primaze. Nakon helikazne aktivnosti E1 stupa u interakciju sa replikacionim proteinom A (RPA), što rezultira u brznoj stabilizaciji jednolančane DNK (*Pang i Thierry, 2013*). E1 protein je značajan za održavanje virusne DNK u formi epizoma. Integracijom u humani genom, E1 i E2 ORF se brišu, što rezultira u disregulaciji virusne genske ekspresije i replikacije (*Pang i Thierry, 2013; Doobar i sar., 2015*).

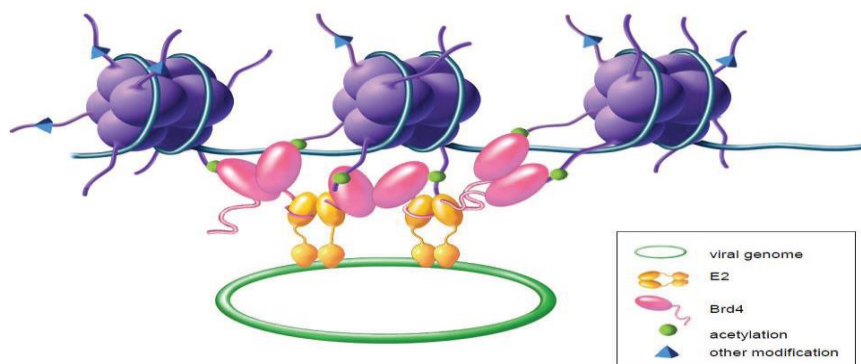
Gen za E2 protein kodira proteinski produkt tercijerne strukture, čija je veličina oko 350 do 500 amino kiselina. E2 je multifunkcionalni protein koji ima centralnu ulogu u virusnom životnom ciklusu, jer reguliše virusnu replikaciju i transkripciju, a odgovoran je i za održavanje virusnog genoma u epizomalnoj formi. Svi papiloma virusi imaju sposobnost prepisivanja celog ORF E2, ali i potencijal da kodiraju kraće forme E2 proteina (*McBride i Jang, 2013*). Prepisivanjem E2 ORF u punoj dužini nastaje protein veličine 40-58kD, koji se sastoji od dva konzervisana modularna domena: N-terminalni transaktivacioni domen (TAD, Trans Activation Domain) i C-terminalni dimer veđujući domen (DBD, Dimer Binding Domain). Ova dva domena su spojena preko zglobnog regiona čija je dužina promenljiva u zavisnosti od HPV genotipa (slika 2.6) (*McBride i Jang, 2013*). Amino-terminalni domen je od suštinskog značaja za interakciju sa E1

proteinom, dok je uloga karboksilno-terminalnog domena (E2BS) vezana za regulaciju transkripcije (Pang i Thierry, 2013). E2 protein može biti pozitivan i/ili negativan transkripcioni regulator, a ova funkcija zavisi od mesta vezivanja



Slika 2.6. Struktura HPV E2 proteina i proteinskih izoformi (adaptirano iz: McBride i Jang, 2013)

na dugom kontrolnom regionu (LCR) (Doobar, 2005; Fauquet i sar., 2005). Kod svih HPV, u okviru LCR postoje najmanje četiri pozicije za vezivanje E2 proteina. Koordinisano regulisanje virusne DNK transkripcije i replikacije, E2 protein ostvaruje i interakcijom sa nizom celularnih faktora. Treba napomenuti i da je E2 protein visokorizičnih tipova negativan regulator ekspresije E6 i E7 onkogena. Novija istraživanja su pokazala da E2 protein ima ulogu u vezivanju virusnog genoma za ćelijske hromosome (slika 2.7), putem celularnog proteina poznatog kao Bromodomain-4 (Brd4). Vezivanjem za nuklearne matrice ćelijskog genoma se postiže distribucija virusnih genoma u svaku kćerku ćeliju posle ćelijske deobe (McBride i Jang, 2013).



Slika 2.7. Uloga HPV E2 proteina u vezivanju za ćelijski genom (adaptirano iz: McBride i Jang, 2013)

Gen za E4 protein kodira mali protein, veličine oko 16-17kD, lokalizovan u citoplazmi i jedru. E4 gen se preklapa sa E2 genom, u rasponu od 73 amino kiseline (HPV 34) do 326 aminokiselina (HPV 21). Međutim, ova dva gena imaju različite okvire čitanja i za sada ne postoje dokazi o njihovom intragenetskom dupliranju (*Doobar, 2005*). Proizvodi E4 ORF gena eksprimiraju se u manjoj meri tokom rane faze virusne infekcije. Ekspresija ovog gena u kasnoj fazi infekcije kontinuirano raste i može činiti i do 30% sadržaja virusnih proteina inficirane ćelija (*Doobar i sar., 1988*). Pretpostavlja se da E4 protein ima direktnu ulogu u izlasku virusa iz inficirane ćelije. E4 protein se vezuje za keratinski citoskelet, što dovodi do kolapsa citoskeleta i raspadanja ćelije (*Doobar, 2005; Fauquet i sar., 2005*).

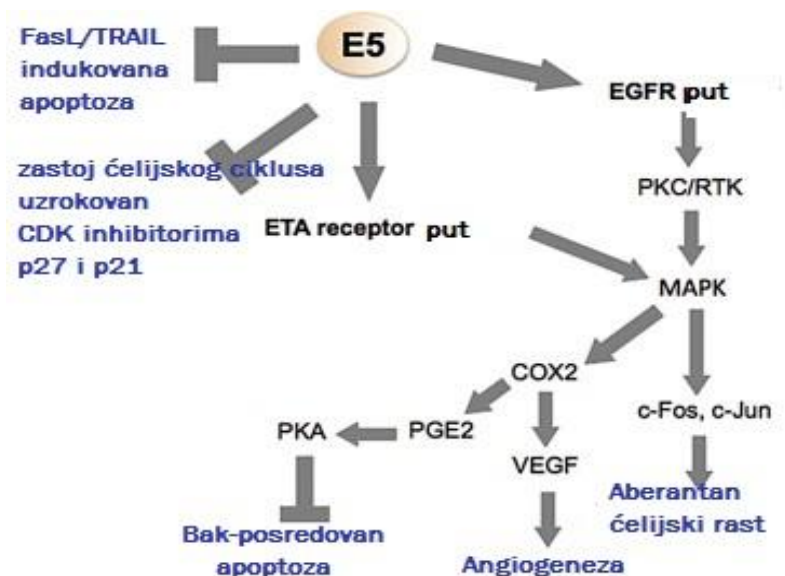
Gen za E5 protein kodira mali, hidrofobni protein, dužine oko 83 aminokiseline i veličine oko 10kD, koji se nalazi nizvodno od E2 ORF. U inficiranoj ćeliji, E5 protein je smešten na membrani endoplazmatičnog retikuluma, goldžijevog aparata i jedra. Filogenetska analiza je pokazala da su sekvence ORF E5 najdivergentnije među papiloma virusima (*Pang i Thierry, 2013*) i da postoje četiri forme E5 proteina: alfa, beta, gama i delta. Visoko rizični tipovi HPV kodiraju E5-alfa protein, dok su E5-gama i E5-delta proteini kodirani samo od strane nisko rizičnih tipova (*Bravo i Alonso, 2004*). Međutim, postoje predstavnici HPV koji u genomu ne sadrže ORF E5 (*Alphapapillomaviruses-species 5, HPV: 26, 51, 69, 82, 88; Alphapapillomaviruses-species 6, HPV: 30, 53, 56 kao i neki predstavnici Gamapapillomavirusa*).

Kod HPV tipova visokog rizika, E5 u saradnji sa E6 i E7 onkoproteinima, doprinosi pojavi malignog fenotipa. Pri tome, glavna uloga E5 onkoproteina je stvaranje povoljnih uslova za virusnu replikaciju i održavanje perzistentne infekcije (*Pang i Thierry, 2013*).

U cilju promocije ćelijskog rasta, E5 može potisnuti promotor p21 gena i destabilizovati p27 proteine radi prevazilaženja p21CIP1/p27KIP1-posredovanog zastoja ćelijskog ciklusa. Vezujući se za 16K proteolipidnu podjedinicu membranske protonske pumpe, ovaj protein igra važnu ulogu u aktivaciji receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR engl. *epidermal growth factor receptor*). Na taj način inicirane su višestruke signalne kaskade, koje dovode do proliferacije inficirane ćelije (*Sur, 2014*).

Iako je prisustvo virusnih proteina u ranim fazama virusnog životnog ciklusa svedeno na minimum, ipak postoji mogućnost aktiviranja ćelijskih mehanizama odbrane i apoptoze, te je druga važna uloga E5 proteina ostvarena kroz moduliranje imunog odgovora i sprečavanje moguće apoptoze (slika 2.8). Uloga E5 proteina u inhibiciji apoptoze ostvaruje se sprečavanjem apoptoze indukovane FasL-TRAIL interakcijom i apoptoze indukovane stresom endoplazmatičnog retikuluma. E5 protein štiti inficirane

ćelije od anti-virusnih odbrambenih mehanizama suprimiranjem nekoliko ključnih ćelijskih proteina: COX-2, KSBP-1 i IRE1a, (Pang i Thierry, 2013).

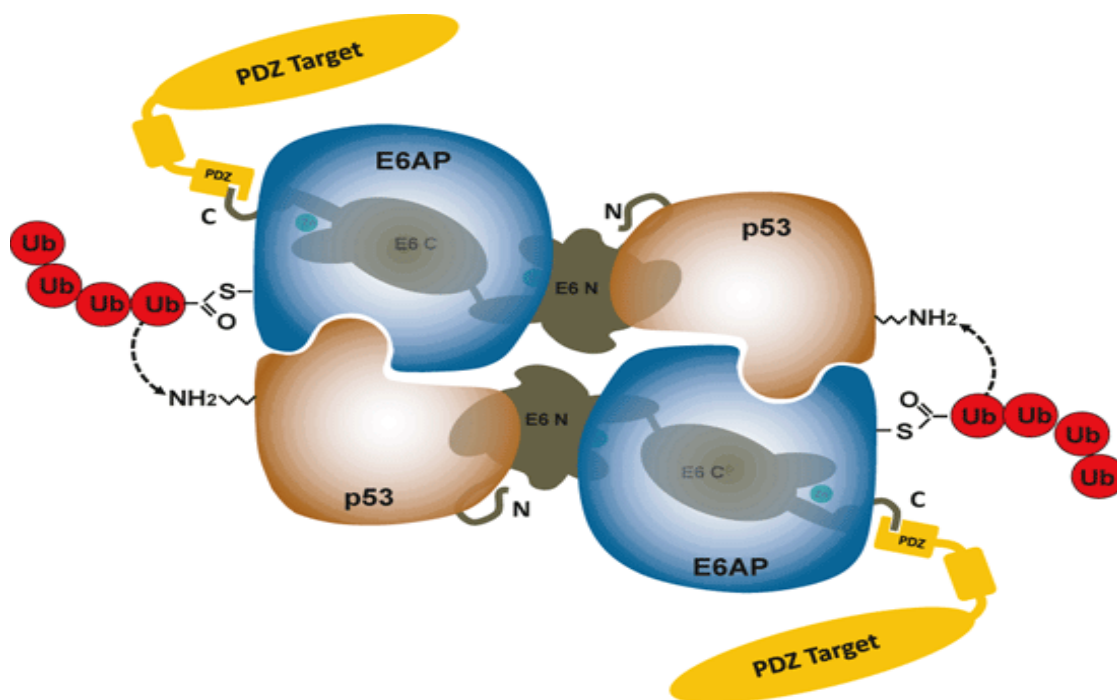


Slika 2.8. Uloga HPV E5 onkoproteina u sprečavanju apoptoze (adaptirano iz: Pang i Thierry, 2013)

Međutim, primećeno je da se tokom integracije virusnog genoma u genom domaćina, sekvence E5 gena brišu, te se smatra da ovaj gen nije potreban za održavanje malignog fenotipa (Doobar, 2005).

E6 protein je molekulske mase oko 18 kDa i sastoji se od 150 aminokiselina. E6 protein sadrži dva cink vezujuća domena, pri čemu svaki domen ima dva C-x-x-C motiva (Pang i Thierry, 2013). Cinkovi domeni sadrže hidrofilne amino-terminalne (E6N) i karboksilne (E6C) domene. Kratki karboksi-terminalni domen predstavljen je PDZ domenom (slika 2.9). Naziv PDZ je izveden od početnih slova prva tri proteina: PSD-95 (95 kDa protein uključen u signalizaciju), DLG (Drosophila disk veliki protein) i ZO1 (zonula occludens 1- protein koji je uključen u održavanje polariteta epitelnih ćelija) (Pim i sar., 2012). PDZ domen je prisutan samo kod visokorizičnih HPV tipova i predstavlja molekularni potpis za onkogeni potencijal u različitim HPV tipovima. U modelu kulture tkiva, kao i transgenim modelu miševa, pokazana je neophodnost PDZ domena u malignoj transformaciji. Osim toga, ovaj domen igra važnu ulogu u životnom ciklusu virusa, jer gubitak PDZ domena rezultira u smanjenu replikativnog kapaciteta i u mnogim

slučajevima, nemogućnosti održavanja virusnog genoma u formi epizoma (*Pim i sar., 2012*).

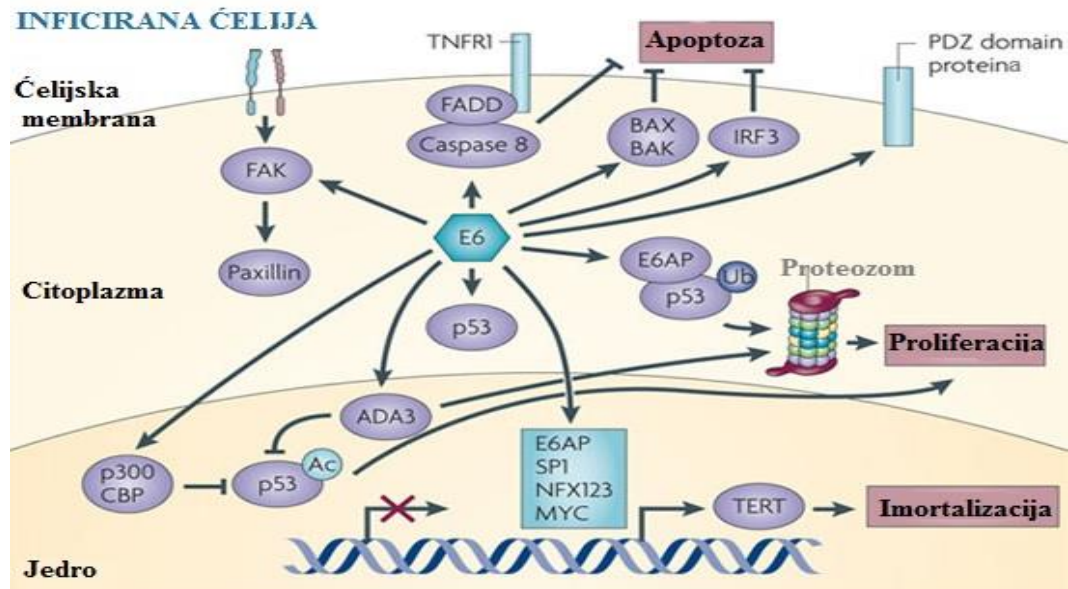


Slika 2.9. Struktura E6 onkoproteina (adaptirano iz: *Pim i sar., 2012*)

E6 onkoprotein nema enzimsku aktivnosti i većinu aktivnosti obavlja posredstvom protein-protein interakcije. Onkogeni efekat E6 proteina postiže se vezivanjem kratkih peptida, cinkovih domena, koji sadrže LxxLL sekvencu ili PDZ domena za ciljane ćelijske proteine (*Pang i Thierry, 2013*). Najčešći protein koji interaguje sa HPV E6 je E6-asocirani protein (E6AP engl. *E6 associated protein*), tačnije ubikvitin ligaza. Jedan od glavnih ciljnih molekula E6 proteina je tumor supresorski protein p53, koji je specifični faktor transkripcije DNK i jedan od ključnih signalnih koordinatora u ćeliji nakon genotoksičnog ili citotoksičnog stresa.

E6 protein se veže za p53 uz pomoć E6AP i vrši degradaciju preko ubikvitin-proteosomskog puta. Pored toga, E6 proteini HPV tipova visokog rizika blokiraju alternativni put p53 aktivacije, tako što inhibiraju transkripciju gena odgovornih za nastanak p53 (okvir čitanja p14/ARF) interakcijom sa histonskim aciltransferazama, hADA3. Pored p53-posredovane apoptoze, postoji alternativni put apoptoze, u koji su uključeni proteini iz porodice Bcl-2. Istraživanja su pokazala da se E6 vezuje za pro-apoptotičke Bak proteine i degradira ih, čime uništava i još jedan nezavisni put apoptoze

(Jiang i Yue, 2014). Strategija kojom virus zaobilazi apoptozu moćno doprinosi njegovom onkogenom potencijalu (slika 2.10). Svrha ove interakcije je nastavak deobe ćelije domaćina sa oštećenom DNK (Moody i Laimins, 2010; Jiang i Yue, 2014).



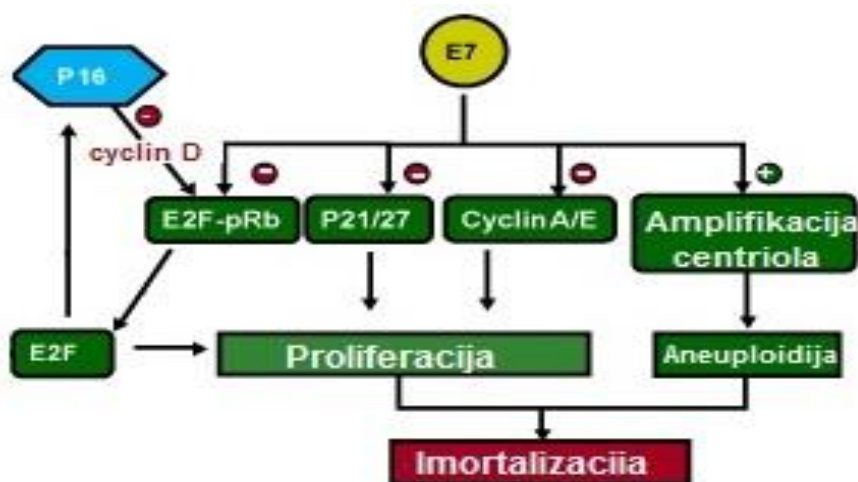
Slika 2.10. Uloga E6 onkoproteina u imortalizaciji ćelije (adaptirano iz: Moody i Laimins, 2010)

Interakcijom E6 i E6AP sa ćelijskim proteinima SP1, Myc i NFKS123 aktivira se telomerazna reverzna transkriptaza (hTERT), kao i telomeraza. Na taj način onemogućeno je skraćenje telomere u odgovoru na perzistentnu proliferaciju, što rezultira u promovisanju imortalizacije (Moody i Laimins, 2010). Eksperimentalni dokazi ukazuju da je interakcija E6 sa ćelijskim PDZ proteinima (DLG1, Scribble, PSD 95, TIP-2/GIPC, NHERF1, p300/CBP, hDLG, Mupp-1 i dr.) neophodan uslov za razvoj epitelne hiperplazije. Navedeni proteini imaju različite funkcije, uključujući kontrolu ćelijske polarnosti, kontrolu ćelijske adhezije i regulisanje različitih ćelijskih signalnih puteva (Pang i Thierry, 2013). Shodno navedenom, prisustvo onkoproteina E6 doprinosi akumuliranju grešaka na nivou DNK ćelije domaćina i promociji nekontrolisane proliferacije ćelija sa oštećenim genetskim materijalom.

Gen za E7 protein kodira onkoprotein veličine 10-14kD, dužine oko 100 aminokiselina. Sastoji se od tri funkcionalna domena poznata kao konzervirani regioni (CR 1, 2 i 3). CR1 domen je odgovoran za pRB (engl. *Retinoblastom protein*) protein-nezavisnu ćelijsku transformaciju, dok se unutar CR2 domena nalazi LxCxE motif kojim se

E7 vezuje za pRB. CR3 domen je strukturno homolog C-terminalnom domenu E6 onkoproteina (*Bidhu i Aman, 2012; Pang i Thierry, 2013*).

E7 protein se nalazi u jedru, a manjim delom u citoplazmi. Pri stvaranju zrelih viriona u terminalno diferenciranim keratinocitima, vrši reprogramiranje inficirane ćelije. Na taj način E7 indukuje ponovni ulazak u S fazu ćelijskog ciklusa i omogućava ekspresiju ćelijskih proteina koji su potrebni za replikaciju virusnog genoma. Glavna uloga E7 onkoproteina je degradacija Rb proteina, koji prevenira deljenje ćelije sa oštećenom DNK. Porodica Rb proteina kontroliše prelazak G/S fazu ćelijskog ciklusa putem regulisanja aktivnost E2F ćelijskog transkripcionog faktora. Onkoprotein E7 remeti ovaj put vezujući se za hipofosforilisani Rb protein, pri čemu omogućava oslobađanje ćelijskog transkripcionog E2F faktora (*Moody i Laimins, 2010; Pol i Klingelutz, 2013*). Na meti E7 onkoproteina nalaze se i ostali ćelijski proteini (slika 2.11) koji imaju ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, a uključuju inhibitore ciklin-zavisnih kinaza (proteine p21 i p27), kao i cikline A i E (*Bidhu i Aman, 2012*).



Slika 2. 11. Uloga E7 onkoproteina u imortalizaciji HPV inficirane ćelije (adaptirano iz: *Bidhu i Aman, 2012*)

Međutim, postoje brojni dokazi da E7 onkoprotein ostvaruje interakcije sa mnoštvom nuklearnih i citoplazmatičnih proteina domaćina, što doprinosi njegovom transformišućem potencijalu (*Pang i Thierry, 2013*). U transformisanim keratinocitima HPV E7 onkoprotein ima sposobnost da direktno aktivira proteinski produkt gena DNMT1 (DNA-cytosine-5-methyltransferase 1), što doprinosi inibiciji ekspresije E-kadherin proteina. Gubitak ključnog adhezionog molekula, koji povezuje aktinske

filamente susednih ćelija, povećava migraciju tumorskih ćelija, što vodi invaziji i povećanju metastatskog potencijala (*Pang i Thierry, 2013*).

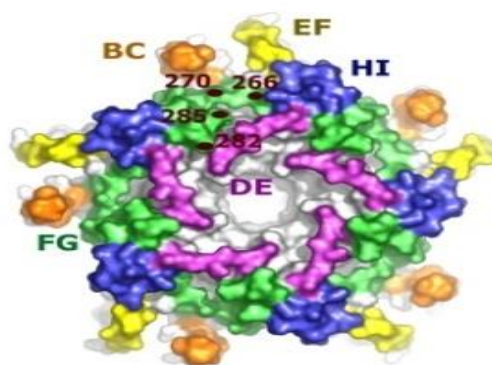
Ćelije zaražene virusom obično će odgovoriti proizvedeći interferone (IFN), koji imaju antivirusno i antitumorsko dejstvo. Istraživanja na primeru HPV16 su pokazala da E7 onkoprotein blokira aktivnost IFN- α i vrši inhibiciju promotora IFN- β . Ekspresija E7 je takođe povezana sa abnormalnim brojem hromozoma. E7 indukuje amplifikaciju centrozoma, formiranjem višestrukih nezrelih centriola iz jedne centriole majke (*Duensing i sar., 2007*), što vodi do nestabilnosti genoma. Centralna uloga E7 onkoproteina je deregulacija ćelijskog ciklusa i genomska nestabilnost, što vodi promociji maligne transformacije (*Moody i Laimins, 2010; Pol i Klingelutz, 2013*).

2.2.4. Karakteristike i uloga kasnih virusnih proteina

Kasni kodirajući region označen slovom L (engl. *late*) obuhvata oko 40% virusnog genoma; veličine je oko 2,5 kb; kodira strukturne proteine (L1 i L2) koji su potrebni za sklapanje viriona.

Gen za L1 protein obuhvata sekvencu približne dužine oko 1200 bp koja kodira veliki strukturni protein. L1 protein odlikuje izuzetno konzervativan redosled aminokiselina među mnogim papilomavirusima (*Bishop i sar., 2007*). Iz tog razloga nukleotidna sekvenca ovog gena se koristi u filogenetskoj analizi i klasifikaciji papilomavirusa (*de Villers, 2004*). L1 protein je veoma imunogen, poseduje konformacione epitope koji indukuju produkciju neutrališućih antitela specifičnih za tip virusa.

Međutim, površinske petlje ovog proteina mogu se značajno razlikovati (slika 2.12), čak i kod pripadnika iste vrste (*Bishop i sar., 2007*). L1 protein je glavni kapsidni protein koji sadrži važne determinante neophodne za početno vezivanje virusnih čestica za površinski ćelijski receptor, heparan sulfat proteoglikan (HSPGs) (*Schiller i sar., 2010*). Bitna karakteristika L1 proteina je sposobnost spontanog samosklapanja u pentamerne kapsomere. L1 kapsomere *in vitro* su osnova profilaktičke vakcine protiv nekoliko tipova HPV.



Slika 2.12. Kristalna struktura HPV 16 L1 kapsidnog proteina
(adaptirano iz: *Bishop i sar., 2007*)

L2 gen je manje konzerviran u poređenju sa L1 genom. L2 gen kodira protein veličine oko 70 kD, koji predstavlja manji strukturni protein kapsida, čija je uloga multifunkcionalna (*Fahey i sar., 2009; Doobar i sar., 2015*). Karboksilni domen ovog proteina bogat je amino-kiselinom prolin, što mu omogućava savijanje i olakšava prolaz kroz centralnu šupljinu L1 pentamere (*Fahey i sar., 2009*). Amino-terminalni domen sadrži unakrsno-neutrališuće epitope. Iako L2 nije potreban u formiranju virusu slične partikule (eng. virus like particule-VLP), neohodan je u formiranju infektivnog viriona (*Doobar i sar., 2015*).

Strukturne studije su pokazale da nakon infekcije virusni kapsid prolazi kroz konformacione promene koje razotkrivaju amino-terminalni domen. Na taj način L2 epitopi postaju izloženi dejstvu neutrališućih antitela (*Doobar i sar., 2015*). Glavne neutrališuće epitope se nalaze u rasponu od 17. do 36. amino-kiseline i predstavljaju kandidata za široko zaštitne vakcine tzv. Pan-vakcine (*Fahey i sar., 2009*).

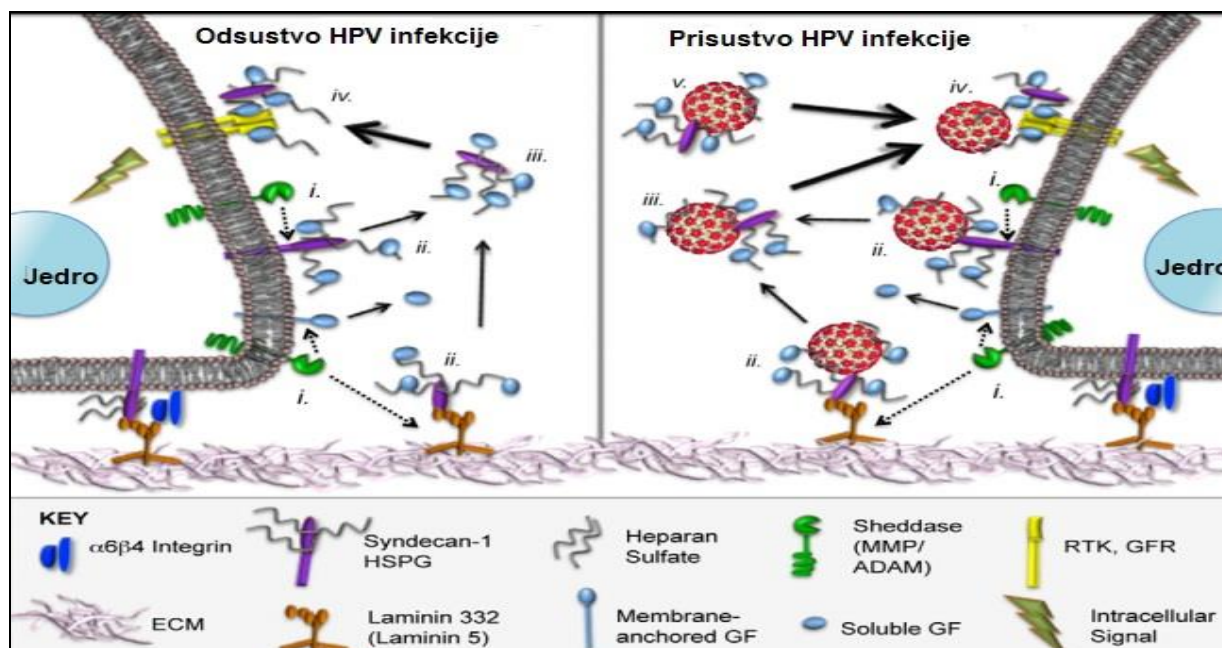
2.3. ŽIVOTNI CIKLUS HUMANIH PAPILOMA VIRUSA

Životni ciklus Humanih papiloma virusa se odvija u stratifikovanom epitelu kože ili sluzokože. Epitel se karakteriše trajnim gubitkom (deskvamacijom) diferenciranih zrelih ćelija i obnavljanju novim ćelijama iz bazalnog sloja epitela. HPV se prilagodio dinamičnom diferenciranju epitelnih ćelija i inficira matične-bazalne epitelne ćelije smeštene iznad bazalne membrane. Papiloma virusi inicijalno inficiraju mitotski aktivne ćelije bazalnog sloja, a do infekcije dolazi usled abrazija ili mikrotrauma epitela (*Hebner i Laimins, 2006*). Životni ciklus papiloma virusa precizno prati kretanje inficiranih keratinocita prema površini epitela. U skladu sa programom diferencijacije ćelije domaćina, ekspresija virusnih gena je pažljivo regulisana, a virusni proteini se ekspimiraju u određeno vreme (*Hebner i Laimins, 2006; Doobar i sar., 2015*)

2.3.1. Virusna adsorpcija, penetracija i dekapidacija

Jedan od prvih koraka tokom HPV infekcije je vezivanje virusne čestice za receptore na površini ćelije. Mnogobrojni eksperimenti su pokazali da je heparan sulfat proteoglikan (HSPGs) veoma važan primarni receptor (*Sapp i Bienkowska-Haba 2009*), neophodan za infektivni transfer i produktivnu infekciju. U novije vreme, sve je veći broj dokaza da je vezivanje za heparan sulfat proteoglikan evolutivno očuvan proces, karakterističan za gotovo sve tipove HPV (*Sapp i Bienkowska-Haba, 2009*).

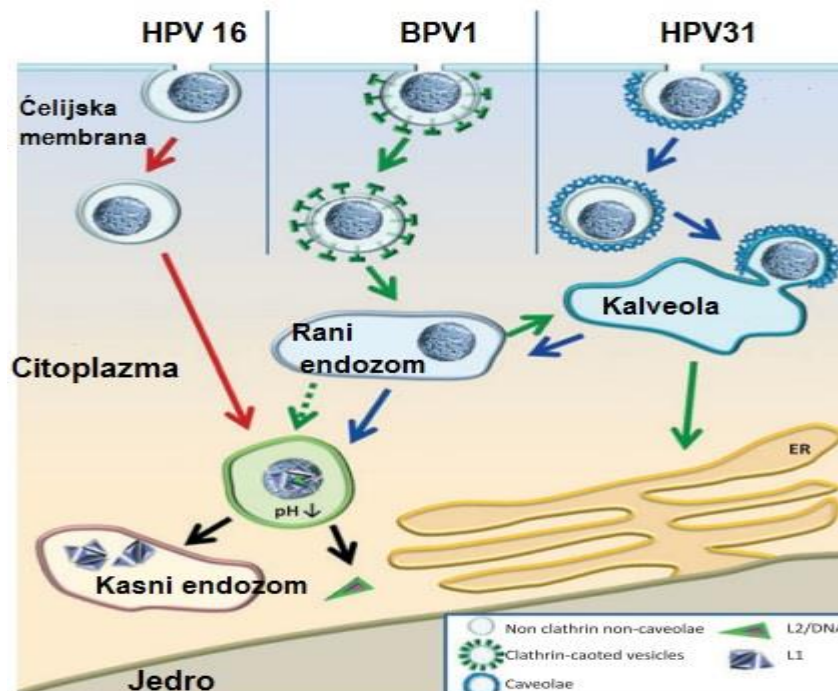
Nakon početnog vezivanja viriona za primarni receptor, dešava se nekoliko diskretnih strukturnih promena u obe subjedinice kapsida (slika 2.13). Kritična konformaciona promena je proteolitičko cepanje manje subjedinice kapsida, enzimom poznatim kao furin (proteinska konvertaza). Ovaj proces dovodi do izloženosti linearnih epitopa amino-terminalnog domena L2, što je od suštinskog značaja za uspešnu infekciju. Konformacione promene rezultiraju prelazom sa heparin-osetljivog na heparin-neosetljivi oblik viriona.



Slika 2.13. Vezivanje virusne čestice za receptore na površini bazalne ćelije (adaptirano iz: *Surviladze i sar., 2012*)

Radi dalje internalizacije, virus mora preći na različite sekundarne receptore (*Schiller i Lowy, 2012*). Uprkos intenzivnim eksperimentima, priroda sekundarnih receptora za sada nije dovoljno poznata. Nekoliko novijih studija zastupa hipotezu da se ne radi o jednom molekulu. Kandidati za sekundarne receptore uključuju: Alpha 6 integrin, tetraspanin CD151 i aneksin A2 heterotetramer. Sekundarni receptori su poznati po vezi sa HSPG kompleksima (slika 2.13) i pokazuju visok nivo ekspresije u okviru bazalne membrane epitela (*Surviladze i sar., 2012*).

Ulazak HPV u nukleus bazalne ćelije je spor i može da potraje i do 14 sati (*Schiller i sar., 2010*). Nasuprot mišljenju da se prenos viriona do jedra odvija procesom endocitoze preko klatrin obložene vezikule, novija istraživanja su pokazala da različiti tipovi HPV imaju posebne mehanizme endocitoze (slika 2.14) (*Sapp i Bienkowska-Haba, 2009*). Dekapsidacija se odvija u citoplazmi, razaranjem disulfidnih veza između kapsomera, a oslobođena DNK se transportuje do jedra i usmerava na ND10 tela (Nuclear domain 10), područja visoke transkripcione aktivacije (*Sapp i Bienkowska-Haba, 2009*).



Slika 2.14. Mehanizmi endocite kod HPV 16, BPV 1 i HPV 31
(adaptirano iz: *Sapp i Bienkowska–Haba, 2009*)

2.3.2. Virusna replikacija, transkripcija i translacija

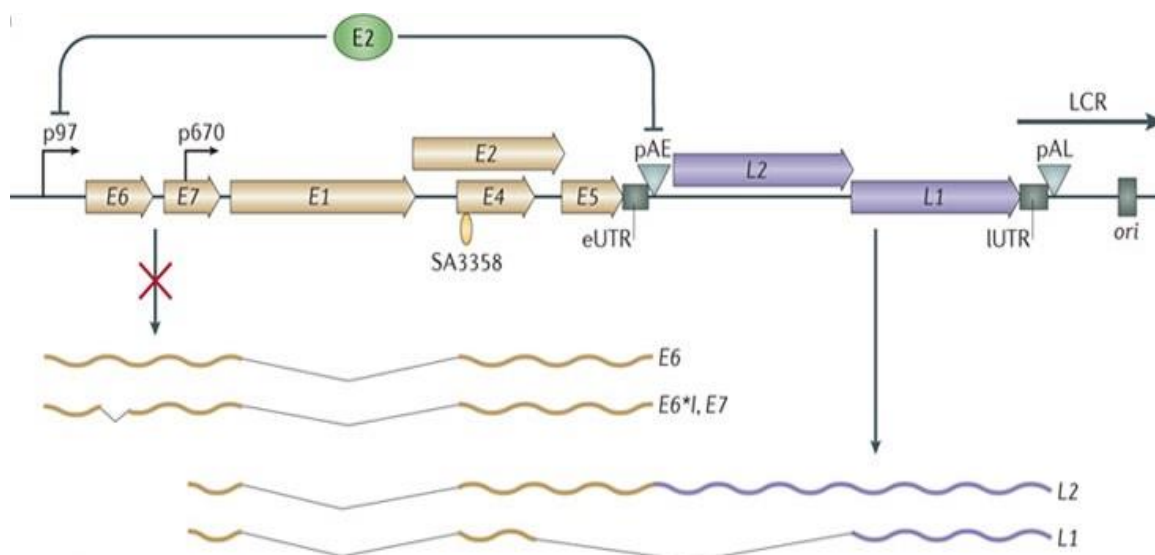
Većina autora navodi da su za HPV karakteristična tri načina replikacije. Prvi način ostvaruje se u početnom stadijumu infekcije. Za pokretanje inicijalne replikacije neophodna je ekspresija E2 virusnog gena, čiji protein usmerava E1 helikazu ka početnom mestu replikacije (replication origin). Sofisticirana kaskada ekspresije virusnih gena održava minimalan broj virusnih DNK kopija po ćeliji, što iznosi 20-100 kopija (*Hebner i Laimins, 2006*). Drugi način replikacije povezan je sa uspostavljanjem infekcije bazalnog sloja. Tokom ove faze neophodno je da replikacija teče brzo da bi se kopirani HPV genomi distribuirali ravnomerno između kćerki ćelija. Virus se umnožava ekspresijom E1 i E2 ranih virusnih gena, koristeći replikacione mehanizme ćelije domaćina. Ovo je faza održavanja virusnog genoma u formi epizoma, a replikacija je svedena na umereni nivo i sinhronizovana sa ćelijskom proliferacijom (*Hebner i Laimins, 2006; Kajitani i sar., 2012*).

Kako inficirane kćerke ćelije migriraju prema površinskim slojevima epitela, otpočine treći vid tzv. vegetativne replikacije, čija je svrha proizvodnja infektivnih viriona u što većem broju. Za vegetativnu replikaciju neophodno je prisustvo produkata svih ranih gena. S obzirom da se ovaj vid replikacije odigrava u suprabazalnom sloju koji sadrži diferentovane ćelije, potpuno je zavistan od replikacionih mehanizama ćelije domaćina (*Hebner i Laimins, 2006*). Virusni E1 i E2 su DNK vezujući proteini koji regulišu transkripciju i replikaciju virusnog genoma. E1 protein ima ulogu helikaze, dok je E2 protein faktor transkripcije. Uloga E5 proteina je u povećanju aktivnosti epidermalnog faktora rasta. S druge strane, rani geni E6 i E7 reaktiviraju ponovni ulazaka ćelije u S-fazu, čime je omogućeno aktiviranje replikacionih mehanizama ćelije domaćina (*Doobar i sar., 2015*).

Transkripciona aktivnost HPV je kontrolisana od strane LCR regiona, u okviru koga se nalazi transkripcioni signalni pojačivači sa kojim se povezuju različiti virusni i ćelijski transkripcioni faktori. Visoko rizični HPV imaju dva glavna promotora, mada su opisani i drugi promotori koji imaju značajnu ulogu u virusnom životnom ciklusu. Rani promotor se nalazi uzvodno od E6 gena, dok je kasni promotor u okviru E7 gena (*Hebner i Laimins, 2006*).

Rani promotor i terminalno postavljen poliadenilacioni signal pAE (engl. *early polyadenylation*) neophodni su za ekspresiju E6, E7, E1, E2, E4 i E5 proteina. Kako ćelije napreduju kroz diferencijacijski proces aktivira se kasni promotor koji u saradnji sa pAE omogućava kodiranje visokog nivoa E4, E1 i E2 proteina. Za ekspresiju L1 i L2 kapsidnih proteina, koji se javljaju u kasnoj fazi diferencijacije, koristi se kasni promotor i kasni poliadenilacioni signal pAL (engl. *late polyadenylation*) (*Hebner i Laimins, 2006*).

Transkripcija virusnog genoma se vrši samo na jednom DNK lancu, a značajna karakteristika svih transkripata papiloma virusa je njihovo prepisivanje u bicistranskom ili policistranskom obliku, sa dva ili više okvira čitanja (ORF). Prelazak prekursorske RNK (pre-mRNK) u zrele mRNK omogućen je posttranskripcionom regulacijom, koja obuhvata poliadenilaciju i alternativno prekrajanje (engl. *splicing*). Papiloma virusi su tokom evolucije razvili složene mehanizme alternativnog splajsovanja prekursorske mRNK (slika 2.15), što je povećalo ograničeni protein-kodirajući kapacitet njihovog genoma (*Johansson i Schwartz, 2013*).



Slika 2.15. Poliadenilacija i alternativno prekranje na primeru HPV 16
(adaptirano iz: *Johansson i Schwartz, 2013*)

2.3.3. Sklapanje i izlazak virusnih čestica

U površinskim slojevima epitela, povećava se ekspresija kasnih virusnih gena, dolazi do sinteze strukturnih L1 i L2 proteina i sklapanja virusnih čestica. Pokazano je da se sintetisani L1 protein (približno 360 kopija) spontano organizuje u pentamerne kapsomere, a zatim u prisustvu L2 proteina (približno 12 kopija), dolazi do organizovanja ikozaedrnog kapsida od 72 kapsomere. Iako sklapanje kapsida ne zahteva prisustvo L2, smatra se da prisustvo L2 proteina podstiče proces samosklapanja kapsomera, odnosno utiče na infektivnost viriona (*Doobar, 2005; Hebner i Laimins, 2006*).

Papiloma virusi nisu citolitički virusi, tako da je izlazak virusa iz jedra, odnosno ćelije, uslovljen migracijom inficiranih ćelija na površinu epitela i njihovom deskvamacijom. Predpostavka je da E4 protein ima direktnu ulogu u izlasku virusa iz inficirane ćelije. E4 protein se vezuje za keratinski citoskelet, što dovodi do kolapsa citoskeleta, raspadanja ćelije i time se omogućava efikasan izlazak virusa. Time, virus kompletira svoj životni ciklus, stvarajući nove virusne čestice, koje napuštaju inficirane ćelije (*Doobar, 2005*).

2.4. PODELA HUMANIH PAPILOMA VIRUSA

Humani papiloma virusi su vrlo heterogena grupa virusa koji su razvrstani u različite genotipove prema genetičkoj srodnosti. Kao što je već spomenuto, do danas je poznato preko 170 genotipova ovih virusa, a svakodnevno se otkrivaju novi (*Bzhalava i sar., 2015*). Podela papilomavirusa izvršena je na osnovu afiniteta za pojedinu vrstu tkiva, kao i onkogenom potencijalu (*Bernard i sar., 2010*).

2.4.1. Podela HPV na osnovu lokalizacije infekcije

HPV odlikuje izražen tkivni tropizam, što uslovljava raznolikost u lokalizaciji infekcija koje prouzrokuju. Na osnovu klinički lokalizovane infekcije HPV tipovi su podeljeni na: kožne tipove, mukozne tipove i tipove specifične za razvoj Epidermodysplasia verruciformis (*Munoz i sar., 2003; Gómez i Santos, 2007*).

Kožne HPV infekcije

Kožni tipovi HPV obuhvataju oko 75% do sada opisanih tipova, koji najčešće izazivaju benigne proliferativne promene (papilome), ali se mogu naći i na zdravoj koži (*Forsslund i sar., 2004*). Benigni papilomi mogu imati različite lokalizacije i uključuju: obične bradavice (*Verrucae vulgares*), bradavice na stopalima (*Verrucae plantares*), ravne bradavice (*Verrucae planae*), mladalačke bradavice (*Verrucae planae juveniles*), končaste bradavice (*Verrucae filiformes*) i sl. (*Burd i sar., 2003; Gómez i Santos, 2007*). Za razliku od mukoznih tipova, karcinogeneza kutanih tipova je i dalje nejasna. Osim toga, kod imunosuprimiranih pacijenata, *Betapapillomavirusi* su često nađeni u premalignim i malignim lezijama kože.

HPV infekcije mukoznih membrana

HPV koji inficiraju sluzokožu, uglavnom pripadaju rodu *Alphapapillomavirusa*. Trenutno je poznato oko 50 HPV tipova povezanih sa infekcijom anogenitalne regije (*Munoz i sar., 2003*). Pored toga, pripadnici ovog roda inficiraju sluzokožu usne duplje,

konjuktivu, larinks, respiratorni trakt i druga tkiva (*zur Hausen, 2009*). Veliki broj tipova HPV izaziva tipične lokalne infekcije mukoznih membrana (*Burd i sar., 2003*).

Benigne promene mukoznih membrana

Najčešće kliničke manifestacije infekcije uzrokovane HPV anogenitalnog trakta su izrasline na koži i sluznicama, koje se obično nazivaju polnim bradavicama ili kondilomima; takvi kondilomi mogu biti šiljati (*Condylomata acuminata*), najčešće izazvani HPV tipovima 6 i 11 i lokalizovani na granici kože i sluzokože, a u retkim slučajevima javljaju se i gigantski kondilomi (*Buschke-Löwenstein*). Kondilomi ravne površine (*Condylomata plana*) su lokalizovani na sluznicama (*Gómez i Santos, 2007*).

Prekancerozne i kancerozne promene grlića materice

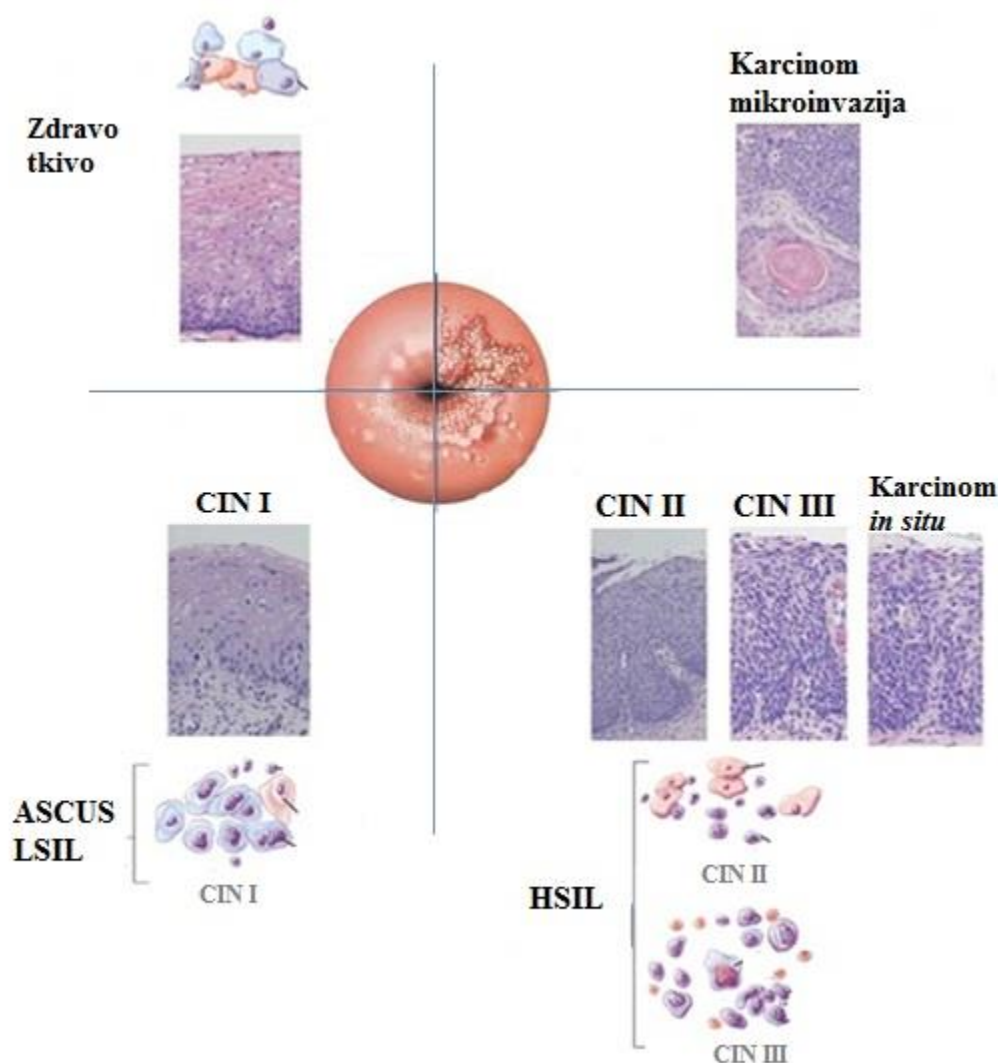
Razvoj karcinoma grlića materice se odvija preko niza patoloških promena ili cervikalnih intraepitelnih neoplazija (CIN) (slika 2.16), ali na moguće prisustvo neoplastične lezije ukazuje i abnormalan citološki nalaz. Preporuka Evropskog "vodiča za obezbeđenje kvaliteta u skriningu za rak grlića materice" je da svi sistemi citološke terminologije budu prevedeni na Bethesda klasifikaciju, a da se terminologija intraepitelne neoplazije koristi za histološke izveštaje (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*).

Cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) su prema težini lezije podeljene u tri gradusa:

CIN 1 označava najblaži oblik niskostepenih intraepitelijalnih promena sluznice grlića materice-diskarioza lakog stepena. Ova histološka dijagnoza ukazuje na sumnju na infekciju onkogenim HPV virusom i zahteva molekularnu DNK analizu (*Jordan i sar., 2008*)

CIN 2 označava srednje tešku displaziju, sa prisustvom nezrelih ćelija i takođe ukazuje na moguću infekciju onkogenim HPV virusom (*Jordan i sar., 2008*)

CIN 3 je prekancerozno stanje s maksimalno izraženim citomorfološkim i histološkim znacima atipije ćelija domaćina. U potpunosti nedostaju znaci regularne građe epitela kao i sazrevanje ćelija. Diskariotične ćelije, kao i mitoze prisutne su na celoj debljini epitela i najverovatnije su u korelaciji sa dugotrajnom infekcijom onkogenim HPV virusom (*Bosh i sar., 2008*)



Slika 2.16. Uporedni sistem citološke i histološke klasifikacije

(kombinovano: Holschneider, 2008 i sa sajta: http://www.hopkinsmedicine.org/kimmel_cancer_center/centers/cervical_dysplasia/abnormal_pap_test.html)

Prema Bethesda klasifikaciji iz 2001. godine (Solomon i sar., 2002) citološke promene se mogu podeliti na: **NILM** (negativan za intraepitelnu leziju ili malignitet)-normalan citološki nalaz u kome nisu uočene abnormalnosti; **ACSUS** (atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja)-najčešća abnormalnost u citologiji, obično udružena sa stanjima (infekcija, reparacija, atrofija); **L-SIL** (skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena)-posledica prolazne infekcije HPV virusom; **HSIL** (skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena)-obuhvata promene karakteristične za CIN 2/3 ili invazivni karcinom; **AIS**-endocervikalni adenokarcinom in situ (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Uporedni sistem citološke klasifikacije (adaptirano iz: *Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*)

Papanikolau sistem	Bethesda sistem
Neadekvatan uzorak	Nezadovoljavajući nalaz/ Neadekvatan uzorak
I Normalan nalaz	Negativan za intreaepitelnu leziju ili malignitet (nisu uočene abnormalnosti) NILM
II Prisutna inflamacija, benigne reaktivne i reparativne promene	
III a Atipične ćelije neodređenog značaja <ul style="list-style-type: none"> • skvamozne • glandularne 	ASC-US (u prilog reaktivnim promenama) ASC-H (u prilog displaziji) AGC
IIIb Diskarioza lakog stepena Diskarioza srednjeg stepena	L-SIL (CIN 1) H-SIL (CIN 2)
IV Diskarioza teškog stepena	H-SIL (CIN 3) AIS
V Maligne ćelije	Invanzivni karcinom

Karcinom grlića materice je najozbiljnija posledica HPV infekcije mukoznih membrana. Od početne infekcije do nastanka maligne bolesti potrebno je nekoliko godina ili decenija (*Schiffman i Kjaer, 2003*), što ovaj karcinom svrstava u grupu bolesti koje se mogu rano otkriti i uspešno izlečiti. Epidemiološki podaci su pokazali da vrste *Alpha-9* i *Alfa-7* izazvaju oko 91% invazivnih karcinoma, pri čemu su HPV 16, 18 i 45 odgovorni za 75% karcinoma skvamoznih ćelija i 74% slučajeva adenokarcinoma (*Smith i sar., 2007*).

HPV tipovi 16 i 18 su najčešći kancerogeni tipovi širom sveta, a njihova učestalost varira u različitim geografskim oblastima. Prevalencija navedenih tipova u kanceru grlića materice je nešto veća u Evropi, Severnoj Americi i Australiji (74-77%), nego u Africi, Aziji i Centralnoj Americi (65-70%). Relativni značaj ostalih visokorizičnih HPV pokazuje regionalne razlike. Identifikacijom i karakterizacijom genomskih sekvenci cirkulišućih HPV tipova, utvrđena je važna uloga HPV varijanti u nastajanju i razvoju cervikalnih neoplazija. HPV varijante se razlikuju u hemijskim i biološkim osobinama i patogenosti. Onkogeni potencijal HPV varijanti varira u zavisnosti od geografskog položaja i etničkog porekla stanovništva i u novije vreme se intenzivno istražuje (*Chen i sar., 2011*).

Epidermodysplasia verruciformis

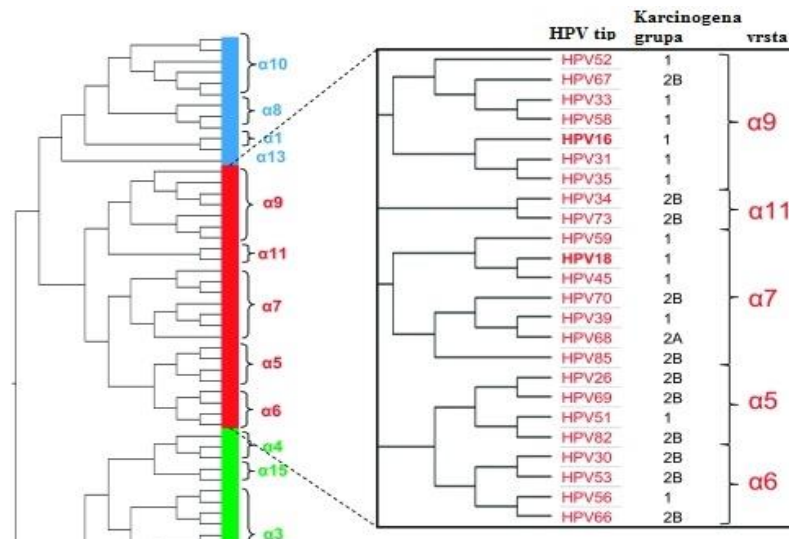
Epidermodysplasia verruciformis (EV) je retka autosomno recesivna nasledna bolest izazvana mutacijom EVER1 ili EVER2 gena, na hromozomu 17k25. Ovaj poremećaj su prvi put opisali Levandovski i Lutz 1922. godine. Bolest nosi veliki rizik od nastanka skvamoznih karcinoma kože. Uglavnom se radi o lokalnim malignim procesima, ali može doći i do razvoja udaljenih metastaza. Pored toga, primećeno je da se ovi karcinomi javljaju na delovima kože koji su izloženi suncu, odnosno UV zračenju (*Emsen i Kabalar, 2010*). Noviji podaci govore da su među obolelim od EV nađeni kutani tipovi HPV 5 i HPV8 (*Gómez i Santos, 2007*). Bolest najčešće počinje u dečijem uzrastu i može trajati decenijama. Kao rezultat HPV infekcije na predilekcionim mestima (dorzumi šaka, podlaktice, lice, stopala i trup) nastaje erupcija pojedinačnih ili konfluiranih papula (*Emsen i Kabalar, 2010*).

2.4.2. Podela HPV prema onkogenom potencijalu

Prema sposobnosti, odnosno potencijalu da izazovu maligne promene, radna grupa Međunarodne agencije za istraživanje raka (*IARC Monographs, 2009*) je klasifikovala HPV na sledeći način:

- Grupa 1 (kancerogeni za ljude) obuhvata HPV tipove : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, i 59
- Grupa 2A (verovatno kancerogen) obuhvata HPV tip 68
- Grupa 2B (potencijalno kancerogeni) obuhvata HPV tipove: 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69, 85 i 97
- Step 3 (nisu kancerogeni), gde spadaju HPV tipovi 6 i 11 (slika 2.17)

Za HPV 16 i HPV 18 je dokazano da su najznačajniji onkogeni virusi, odgovorni za više od 70% svih dijagnostikovanih karcinoma grlića materice širom sveta (*Schiffman i sar., 2011*). U istraživanju koje je obuhvatilo 10.656 žena starosti od 15 do 26 godina i 1.858 žena starosti od 24 do 45 godina, procenjivana je kumulativna učestalost pojedinačnih kancerogenih HPV u intraepitelijalnim niskostepenim promenama sliznice grlića materice (CIN) i početnim malinignim promenama žlezdanog tkiva sluznice glića materice (adenokarcinom in situ-AIS).



Slika 2.17. Podela HPV prema onkogenom potencijalu (adaptirano iz: *Schiffman i sar., 2011*)

Sedam onkogenih tipova HPV: 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 dokazani su u 43-55% cervikalnih intraepitelnih promena gradus 1 (CIN1), 70-78 % cervikalnih promena gradus 2 (CIN2), 85-91% cervikalnih promena gradus 3 (CIN3) i 95-100% AIS. Ostali tipovi HPV (35, 39, 51, 56, 59) sa liste kancerogena za humanu populaciju, nađeni su u 23-30% CIN1; 7-14% CIN2; 3-4% CIN3; 0% AIS lezijama (*Joura i sar., 2014*).

Tipovi niskog onkogenog potencijala (engl. low risk LR: 6, 11, 40, 42, 43, i 44) nemaju sposobnost ugrađivanja u genom domaćina. U inficiranom tkivu uzrokuju niskostepene skvamozne intraepitelne promene tipa LSIL, CIN1 i benigne proliferativne promene-polne bradavice (*Schiffman i sar., 2011*).

Razlike u onkogenoj aktivnosti tipova visokog i niskog rizika proizilaze iz različitih strategija u izražavanju E6 i E7 onkoproteina (*Raybould i sar., 2011*). Tipovi niskog rizika, kao što su HPV 1, 2, 6 i 11, ekspresiju E6 i E7 gena vrše preko dva nezavisna promotora, a za RNK poliadenilaciju koriste rani pAL nizvodno od E5 kodirajućeg regiona. Rani transkripti tipova niskog rizika ne sadrže intron i ne podležu RNK splajsovanju. Kao rezultat takvog načina genske ekspresije, nastaju genski produkti prepisani u punoj dužini (*Ajiro i Zheng, 2014*).

Nasuprot tome, visokorizični tipovi kao što su: HPV16, 18, 31, 45 i 58 se prepisuju u jednu policistronsku E6E7 pre-mRNK iz jednog ranog promotora uzvodno od E6 gena (P97 kod HPV16). Kod visokorizičnih HPV tipova, onkoproteini E6 i E7 supresijom p53 i pRb indukuju genomsku nestabilnost ćelije i nakupljanje mutacija. Kod niskorizičnih tipova onkogeni E6 i E7 imaju nizak afinitet za tumor supresorske gene ćelije domaćina. Zato infekcije nisko rizičnim tipovima dovode do razvoja benignih kožnih i mukoznih

lezija (Gómez i Santos, 2007; Doobar i sar., 2015). Razlike između HPV tipova visokog i niskog onkogenog potencijala prikazane su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Funkcije E6 i E7 onkoproteina kod HPV tipova visokog i niskog onkogenog potencijala (adaptirano iz: Doobar i sar., 2015)

	Visokorizični HPV tipovi	Niskorizični HPV tipovi
E6	kodira E* produkte	ne kodira E* produkte
	vezivanje i degradacija • p53 • specifičnih PDZ domena proteina (Dig, MAGI-1, Scribble)	slabo vezivanje za • p53 • bez vezivanja za PDZ domen proteina
	Interakcija sa E6APubikvitin ligaza inhibicija p53 transaktivacije i acetilacija	
	Inhibicija apoptoze	nepoznato
	Zaobilazi zastoj u ćelijskom ciklusu zbog oštećenja DNK	Normalan zastoj u ćelijskom ciklusu zbog oštećenja DNK
	Inhibicija diferencijacije keratinocita	nepoznato
	Inhibicija interferenskog odgovora	Slaba inhibicija interferenskog odgovora
	Aktivacija signalnih puteva: • Akt • Wnt • Notch • mTORC1	nepoznato
	Telomerazna aktivacija	bez aktivacije
	c-mycaktivacija	bez aktivacije
E7	Vezivanje i degradacija: • pRb • p107 • p130 vezivanje (bez degradacije) • E2F1 • Culin2 • HDAC	Slabo vezivanje (bez degradacije) • pRb • p107 vezivanje za • p130
	Vezivanje za regulatorne proteine: E2F6, p600, HAT, PP2A Uloga u genomskoj amplifikaciji	
	Indukcija genomske nestabilnosti	Bez stimulacije nestabilnosti
	Supresija STAT-1 funkcije	Bez supresije
	Imortalizacija i transformacija	Bez
	Aktivacija signalnih puteva • Akt	nepoznato

2.5. KARAKTERISTIKE HPV INFEKCIJE

2.5.1. Vrste HPV infekcije

Kao rezultat produkcije zrelih virusnih partikula nastaju različite citopatološke ili histopatološke promene u inficiranoj ćeliji. Međutim, postoji i latentna infekcija koja se karakteriše prisutnošću HPV DNA u ćeliji, dok se makroskopskim i kolposkopskim promena ne uočava. U izvesnom broju slučajeva HPV genom se ugrađuje u humani genom. Na osnovu toga postoji nekoliko formi HPV infekcije: latentna infekcija, produktivna infekcija i integracija (*Doobar i sar., 2015*). Na osnovu dužine trajanja, HPV infekcije se mogu podeliti na: tranzitorne i perzistentne.

Latentna infekcija

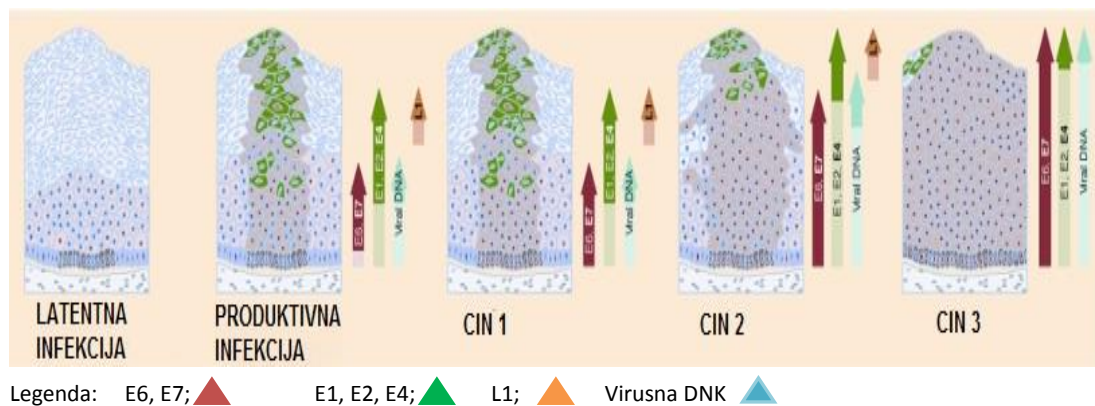
Latentnu infekciju karakteriše prisutnost virusnog genoma u inficiranim bazalnim ćelijama, pri čemu se broj virusnih DNK kopija održiva na minimumu, svega 20 do 100 po ćeliji. Ovako inficirane bazalne ćelije u kojima se ne stvaraju kompletni virioni, histološki nije moguće razlikovati od neinficiranih ćelija. U latentnoj infekciji karakteristični citopatogeni efekat izostaje, a prisustvo HPV se može utvrditi jedino molekularnim testovima (*Schiffman i Kjaer, 2003; Pyeon i sar., 2009; Doobar i sar., 2015*).

Aktivna ili produktivna infekcija

Aktivna ili produktivna infekcija je vezana za intermedijalni i superficijalni sloj. U navedenim slojevima dolazi do diferencijacije epitelnih ćelija. Rani protein E5 povećava nivo mitogenih faktora povećavajući proliferaciju bazalnih ćelija čime se odgađa ćelijska diferencijacija. Svrha ovog procesa je povećanje broja inficiranih ćelija. Kada je infekcija sigurno uspostavljena, HPV se širi prema gornjim slojevima. U toku diferencijacije inficiranih ćelija dolazi do obilne ekspresije ranih, a potom i kasnih gena, što vodi vegetativnoj replikaciji (*Doobar i sar., 2015*).

Kao rezultat produkcije zrelih virusnih partikula nastaju citopatogene promene čiji je efekat vidljiv u gornjem sloju epitela. Kada je u pitanju infekcija visokorizičnim tipovima HPV, citološki nalazi tipa ASCUS (atipija pločastih ćelija-prisustvo atipičnih ćelija koje imaju okrugla, uvećana jedra sa promenjenim rasporedom hromatina, ukazuje na različitu cervikalnu patologiju, od blagih inflamatornih promena, reparatornih procesa

tipa nezrele metaplazije do displazija višeg stepena i invazivnog karcinoma) ili /LSIL uz pozitivan HPV nalaz, smatraju se manifestacijama aktivne infekcije (Doobar i sar., 2015). Produktivna infekcija je zapažena u nisko stepenim cervikalnim lezijama (CIN1), dok se visoko stepene lezije, gradusa CIN2 i CIN3 odlikuju ograničenom produkcijom viriona (slika 2.18) (Doobar i sar., 2015).



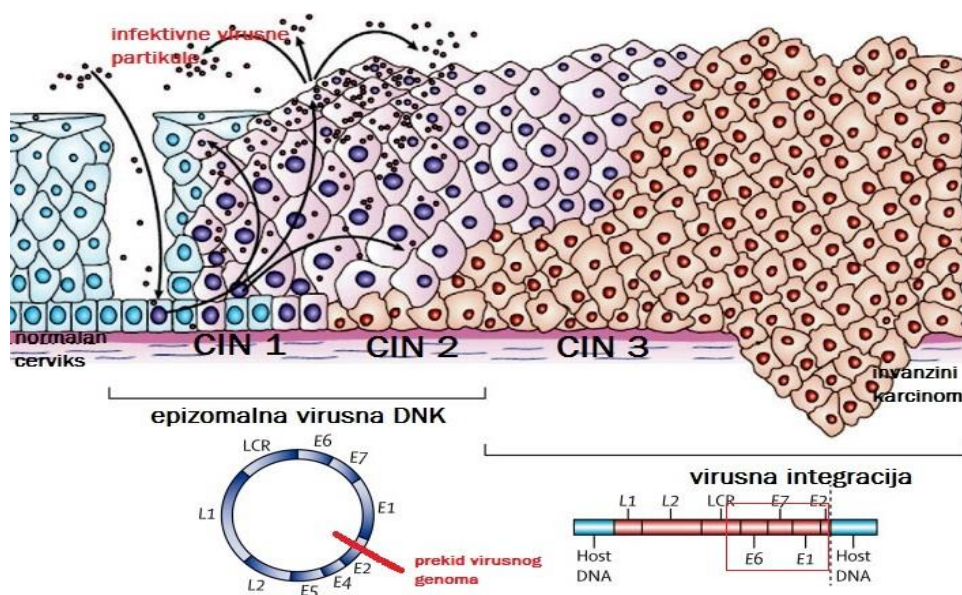
Slika 2.18. Uloga virusnih proteina u produktivnoj infekciji
(adaptirano iz: Doobar i sar., 2015)

Ovo je u skladu sa osobinama tumorskih virusa koji mogu pokrenuti tumorigenezu na mestu gde sinteza virusne partikule nije moguća. Ključni događaj u progresiji visokostepenih neoplazmi je deregulacija u ekspresiji virusnih proteina (E6 i E7), što dovodi do povećane ćelijske proliferacije u nižim epitelnim slojevima i nemogućnosti reparacije DNK ćelije domaćina (von Knebel Doeberitz, 2002). Produktivna infekcija niskorizičnim tipovima HPV najčešće izaziva lokalizovane epitelne proliferacije u vidu bradavica i/ili kondiloma (Burd, 2003).

Integracija

Molekularne analize su pokazale da se HPV genom u benignim bradavicama i displastičnim lezijama nižeg gradusa održava u ekstrahromozomskoj formi, dok se u displastičnim lezijama težeg gradusa i karcinomima virusna DNK nalazi integrisana u genom domaćina (slika 2.19). Virusna integracija ne spada u normalan deo životnog ciklusa papiloma virusa zbog gubitka ili funkcionalne inaktivacije velikog dela virusnog

genoma. Ukoliko dođe do integracije, u genom domaćina najčešće se ugrađuju virusni E6 i E7 geni, dok se E2, E4 i E5 brišu (Raybould i sar., 2011).



Slika 2.19. Povezanost displastičnih lezija na grliću materice sa epizomalanim i integrisanim genomom HPV (adaptirano iz: Raybould i sar., 2011)

Mehanizmi po kojim HPV DNK biva integrisana u humani genom nije u potpunosti razjašnjen i postoji veliki broj hipoteza koji objašnjava ovaj događaj (Wentzensen i sar. 2004). Virusni HPV genom je uvek prekinut na istom mestu-između E1 i E2 gena (Raybould i sar., 2011).

Brojne studije su pružile dokaze da sposobnost integracije imaju samo visokorizični tipovi HPV. U sistematskoj reviji Wentzensena i sar. (2004) analizirano je oko 190 integracionih lokusa, gde je pokazano da se integracija najčešće dešava u regionima DNK označenim kao hromozom fragilna polja. Integrisani fragmenti HPV DNK su pronađeni u različitim humanim hromozomima i različitim hromozomskim regijama i predstavljaju jedinstven događaj za svaki klinički uzorak (Wentzensen i sar. 2004).

U normalnom životnom ciklusu HPV, ekspresija virusnih E6 i E7 proteina potrebna je u terminalno diferentovanim epitelnim ćelijama radi reaktiviranja ćelijskih replikacionih mehanizama. Nasuprot tome, kada su genski produkti E6 i E7 gena prekomerno ekspimirani u nediferenciranim, ćelijama bazalnih i parabazalnih slojeva, ometaju normalnu ćelijsku DNK replikaciju, što dovodi do genomske nestabilnosti i virusne i humane DNK. S obzirom da je regija E2 gena odgovorna za represiju

transkripcije onkogeni E6 i E7, gubitak njegove funkcije uslovljava nekontrolisanu ekspresiju navedenih proteina. HPV integracija uslovljava kraj virusnog životnog ciklusa, a virusni onkogeni E6 i E7 se održavaju i bivaju favorizovani.

Učestalost integracije pokazuje značajne razlike među pojedinim HPV tipovima. HPV tipovi: 16, 18 i 45 se nalaze znatno češće u integrisanom stanju u poređenju sa drugim tipovima (*Vinkurova i sar., 2011*).

Tranzitorna i perzistentna infekcija

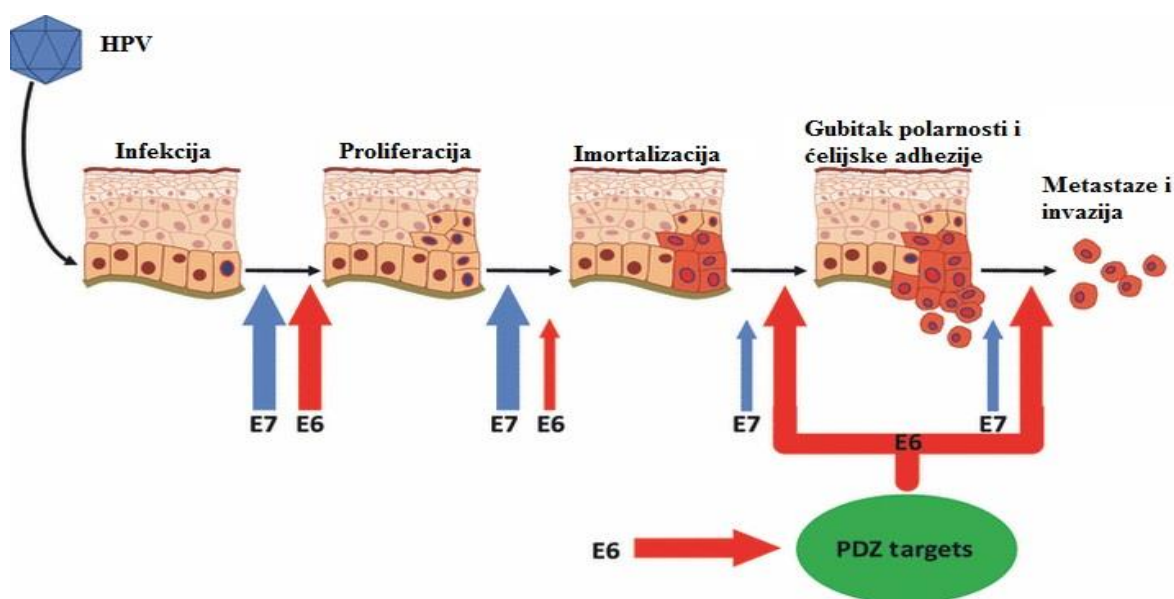
Infekcija HPV je jedna od najčešćih seksualno prenosivih infekcija kod oba pola. Epidemiološki podaci su pokazali da 40-60% osoba nakon nezaštićenog seksualnog kontakta stekne infekciju ovim virusom (*Sudenga i Shrestha, 2013*). Incidenca HPV infekcija je dobno zavisna i najčešća je među mladim seksualno aktivnim osobama. Veliki procenat infekcija je prolaznog i asimptomatskog karaktera, bez kliničkih manifestacija. Ipak, spontana eliminacija infekcije zavisi od HPV tipa. Za spontanu eradikaciju HPV tipova niskog rizika potrebno je oko 4 meseca, dok je za visoko- rizične HPV tipove potreban duži vremenski interval. Tako na primer, infekcija HPV16 spontano nestaje u periodu od 18-23 meseci; HPV 18, HPV 31, HPV 33 i HPV 52 oko 12-18 meseci, a kod ostalih HPV tipova visokog rizika za 6-7 meseci (*Lehtinen i Dillner, 2013*).

Dugotrajna infekcija sa visokorizičnim tipovima HPV je najvažniji faktor rizika za razvitak raka grlića materice i lezija koje mu prethode (*Schiffman i Kjaer, 2003*). U meta-analizi koja je obuhvatila podatke 86 studija i uzorak od približno 100.000 žena, perzistentna HPV infekcija je u 73% studija definisana kao otkrivanje HPV-pozitivnih rezultata dva ili više puta, pri čemu je srednji interval testiranja 6 meseci (*Rositch i sar., 2013*).

2.5.2. Mehanizam maligne transformacije

Humani papiloma virusi visokog rizika proizvode tri onkoproteina: E5, E6 i E7, koji imaju uticaj na ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (*Pim i sar., 2012*). Eksperimentalne studije su pokazale da HPV E5 onkoprotein igra važnu ulogu u ranom toku virusne infekcije jer doprinosi stvaranju povoljnih uslova za virusnu replikaciju i perzistenciju (*Sur, 2014*). Produkti ranih virusnih gena E6 i E7 značajno remete glavne kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i otvaraju put malignoj alteraciji ćelije (slika 2.20). Ugradnjom virusne DNK u genom ćelije domaćina, nastaje ireverzibilno oštećenje

genetskog materijala zaražene ćelije. U tom slučaju dolazi do povećane produkcije proteina p53 (Jiang i Yue, 2014), koji je produkt tumor supresorskog gena p53.



Slika 2.20. Uloga HPV E6 i E7 onkoproteina u razvoju maligniteta (adaptirano iz: Pim i sar., 2012)

Protein p53 ima ključnu ulogu u prenosu signala koji moduliraju zaustavljanje ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa, prvenstveno podsticanjem stvaranja inhibitora ciklin-zavisne kinaze p21CIP (Moody i Laimins, 2010; Pol i Klingelhutz, 2013), tako što inaktivira ciklin zavisne inhibitore kinaze p21CIP-1 i p27KIP-1. Gubitak funkcije p53 i pRb dovodi do kontinuirane replikacije i proliferacije ćelija (Pim i sar., 2012; Pol i Klingelhutz, 2013). Kooperativne aktivnosti E6 i E7 onkoproteina dovode do umnožavanja ćelija sa oštećenom DNK, nakupljanja genetskih grešaka, uz istovremenu inhibiciju programirane ćelijske smrti. Imortalizovane ćelije dobijaju selektivnu prednost u preživljavanju, što postaje uzročni mehanizam karcinogeneze (Pim i sar., 2012).

2.5.3. Imunološki odgovor na HPV infekciju

HPV infekcije su isključivo lokalne, intraepitelijalne, u kojoj virus od infekcije do pojave lezije ostaje u domaćinu više nedelja, meseci, ili godina, ukazujući da efikasno izbegava domaćinovu imunološku odbranu (Stanley, 2009). U toku trajanja HPV infekcije mehanizmi čovekove odbrane ne reaguju na virusne antigene, ponašaju se kao da

poznaju virusne antigene već duže vreme, tako da je imunološki odgovor na HPV infekciju često nedovoljan za eliminaciju virusa i pogoduje razvoju perzistentne infekcije, naročito kod visokorizičnih HPV tipova. Humani papiloma virusi imaju sposobnost da izbegnu imuni odgovor domaćina, pošto se DNK replikacija i sazrevanje virusa događa u visoko diferentovanim keratinocitima koji su predodređeni za apoptotičku smrt i deskvamaciju, procesi koji su uobičajeni, prirodni i ne stimulišu imunološku aktivnost. Pošto se HPV eliminišu deskvamacijom inficiranih keratinocita-koilocita, kontakt između HPV proteina i makrofaga je ograničen na fagocitozu deskvamiranih ćelija. Iako izgleda da bi papilomavirusi mogli da se vezu i inficiraju i druge ćelije osim keratinocita, virusna ekspresija gena i sinteza virusnih proteina je ograničena na keratinocite. Nema sinteze proteina u antigen prezentujućim ćelijama. Dok boravi u donjim slojevima epitela HPV produkuje male količine ranih virusnih proteina, tako da održava nizak nivo stimulacije imunog odgovora. Ograničena je ekspresija gena koji kodiraju rane proteine E1, E2, E5, E6 i E7. Ovi proteini su uglavnom smešteni u jedru i na taj način zaštićeni od nadzora koji sprovode antigen prezentujuće ćelije. Antigenske proteine odgovorne za humoralni imuni odgovor ili odgovor antitelima, virus ne eksprimira sve do kasne faze replikacijskog ciklusa koji se događa u diferentovanim keratinocitima stratuma spinosum i granulozuma skvamoznog epitela (*Hebner i Laimins, 2006; Kajitani i sar. 2012*).

Nedostatak citolize ili citopatogene smrti kao posledice replikacije, maturacije i oslobađanja zrele virusne partikule iz keratinocita odlaže ekspresiju receptora za prepoznavanje patogena na membrani keratinocita (Toll-like receptora). Zbog toga, izostaje pokretanje signala za sintezu pro-inflamatornih citokina kao što je interleukin 6 (IL-6) i tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) i lučenje interferona tip I aktivacijom interferon gena, putem aktivacije transkripcionih faktora interferonskog regulatornog faktora 3 (IRF3) ili 7 (IRF7), važnih za regrutovanje, aktivaciju i migraciju antigen prezentujućih ćelija i specifičnih imunih efektorskih T ćelija. HPV je isključivo intraepitelijalni patogen i nema viremije ili je veoma niska u toku infekcije. Infekcija virusom se događa putem mikroabrazije, kada virus dospeva do bazalne membrane koju napušta bez oštećenja i širi se sa mukoznih i kožnih površina daleko od krvnih sudova, tako da je slab pristup drenažnim limfnim čvorovima u kojima i započinju specifične imune reakcije. Sve ovo ukazuje da virus efikasno izbegava odbranu domaćina, odnosno dovodi do nemogućnosti prepoznavanja virusnih antigena od strane imunološke obrane (*Pang i Thierry, 2013*). Uobičajeni odgovor organizma na infekciju je aktivacija lokalnih makrofaga (APC-engl. *antigen presenting cells*) odnosno Langerhansovih dendritskih ćelija. Aktivirane Langerhansove ćelije kreću prema prvom drenažnom limfnom čvoru i

prezentuju virusni antigen naivnim T limfocitima. T limfociti se diferenciraju u različite efektorske ćelije, koje kreću prema mestu infekcije u cilju uništenja zaraženih ćelija. Međutim, kod infekcije HPV izostaje takav imuni odgovor (*Pang i Thierry, 2013*).

Papiloma virusi utiču na promenu imunološkog odgovora domaćina na dva načina: a) indirektno, samom prirodom replikacije virusa koju HPV sprovodi u epitelu, čime virus nije izložen imunološkim nadzornim ćelijama u cirkulaciji i izbegava humoralni imuni odgovor; b) direktno, kod infekcije visoko rizičnim genotipovima-interferencijom sa domaćinovim antivirusnim imunim mehanizmima, uključujući interferonski odgovor i ćelijsku imunost posredovanu HLA antigenima klase I. E7 smanjuje stvaranje interferona α i β , što ima za posledicu smanjenje ekspresije HLA molekula klase I, a interferencijom E5 proteina sa ciklusom formiranja polipeptidnih lanaca HLA molekula ometa ekspresiju HLA molekula klase I i procese razgradnje virusnih proteina u peptide i njihovo vezivanje sa HLA molekulom (*Vince i Židovec-Lepej, 2010*).

HPV infekcije u genitalnom traktu su česte kod seksualno aktivnih mladih osoba i kod većine su tranzitorne bez vidljivih kliničkih manifestacija. Kod infekcija kod kojih se razvijaju benigne lezije zahvaljujući efikasanom ćelijski posredovanom imunom odgovoru lezije regresiraju. Regresiju anogenitalnih bradavica histološki prati masivna lokalna infiltracija mononuklearnim ćelijama (CD4+, CD8+ CD56+ i makrofagima) i izlučivanje Th1 citokina. Nedostatak u razvoju ćelijski posredovanog imunog odgovora koji bi eliminisao ili kontrolisao infekciju, doprinosi nastanku perzistentne infekcije i u slučaju onkogenih HPV tipova povećava mogućnost progresije u visokostepene intraepitelijalne neoplazije i invazivni karcinom.

Uspešno izbegavanje nespecifičnog imunog prepoznavanja i aktivacije specifičnog imunog odgovora domaćina je od presudnog značaja za HPV infekciju. Produženo trajanje HPV infekcije je rezultat nedostatka nespecifičnog imunog signalnog puta u inficiranim keratinocitima, pro-inflamatornih citokina i sekrecije tip 1 interferona i signala za aktivaciju i migraciju Langerhansovih, dendritskih ćelija i makrofaga, kao i aktivacije specifičnog imuniteta. Progresija u visokostepene intraepitelijalne neoplazije sa istovremenom povećanom produkcijom E6 i E7 onkoproteina je udružena sa smanjenom regulacijom imunološki važnih molekula, naročito hemotaktičkih hemokina i njihovih receptora na keratinocitima i endotelnim ćelijama kapilara, ograničavajući ili prevenirajući citotoksične efekte u lezijama (*Stanley, 2015*).

2.6. KOFAKTORI RIZIKA

Tokom proteklih nekoliko decenija, različiti polno prenosivi mikroorganizmi kao što su *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* i Herpes simplex virus tip 2 (HSV-2) smatrani su etiološkim agensima u cervikalnoj karcinogenezi (zur Hausen i sar., 1986). Hipotezu o povezanosti HPV i karcinoma grlića materice postavio je nemački lekar i mikrobiolog Harald zur Hausen, 1974. godine, a 2008. godine je dobio Nobelovu nagradu za svoje istraživanje (Vince i Židovec-Lepej, 2010). Danas je dobro poznata činjenica da je nastanak karcinoma grlića materice multifaktorijalan i dinamičan događaj kome pored infekcije visokorizičnim tipom HPV doprinose i brojni drugi kofaktori rizika (Jo i Kim, 2005). Mehanizmi delovanja kofaktora u podsticanju razvoja karcinoma nisu još jasno definisani, ali se pretpostavlja da mogu delovati tako što povećavaju rizik za sticanje HPV infekcije, remete ćelijski imuni odgovor ili podstiču rast i proliferaciju HPV inficiranih ćelija.

Kofaktori rizika za sticanje HPV infekcije

Polna aktivnost je faktor rizika za sticanje genitalne HPV infekcije (Burchell i sar., 2006). Statistički podaci koji se odnose na SAD govore da mlade žene stupanjem u polne odnose stiču oko 40% HPV infekcija u roku od tri godine, dok 50% do 80% seksualno aktivnih žena, bar jednom u životu, biva zaraženo nekim od tipova HPV (Crum i sar., 2003). Starost je važna determinanta za rizik od HPV infekcije. Aktivna zona transformacije sa ranim metaplastičnim epitelom veoma je osetljiva na dejstvo različitih faktora koji mogu podstaći transformaciju ćelija u displastične. Upravo se najveći rizik od infekcije HPV poklapa sa najvećom metaplastičnom transformacijom. HPV prevalenca dostiže pik kod mladih odraslih osoba (18 do 30 godina starosti) i opada u starijim godinama. Međutim, rak grlića materice je češći kod žena starijih od 35 godina, što ukazuje na nastanak infekcije u mlađem uzrastu i sporog napredovanja ka karcinomu. Rizik raste i sa povećanjem broja seksualnih partnera ili kontaktom sa partnerom sklonom promiskuitetnom ponašanju. Promiskuitetno ponašanje povećava rizik za sticanje infekcije i do deset puta (Castellsagué i Munoz, 2003). Pored rizika za dobijanje HPV infekcije, raste rizik za nastanak drugih seksualno prenosivih infekcija koje doprinose lakšem razvoju promena na grliću materice (Gómez i Santos, 2007).

Seksualno prenosive infekcije-tokom poslednjih decenije ispitivana je etiološka povezanost velikog broja različitih seksualno prenosivih mikroorganizama sa nastankom cervikalnog karcinoma. Infekcija vrstom *Chlamydia trachomatis* često je udružena sa citološkim atipijama i displazijama cervikalnog epitela. Podaci multicentrične studije sprovedene od IARC navode da žene sa hlamidijskom infekcijom grlića materice, imaju dva puta veći rizik za nastanak cervikalne displazije (*Smith i sar., 2002*). HSV-2 spada u seksualno prenosive uzročnike koji su pokazali povezanost sa pojavom displastičnih lezija na grliću materice. Serološke studije su pokazale veću prevalencu HSV kod žena sa neoplazijama grlića materice nego u kontrolnoj grupi (*de Sanjose i sar., 1994*). Mikoplazme direktno oštećuju ćelijske membrane (stvaranjem hidroksilnih radikala i anjona peroksida), što olakšava prodor seksualno prenosivih patogena (uključujući i HPV) u citoskelet ćelije. Inflamacija koja prati posebno hronične infekcije, rezultuje produkcijom nespecifičnih antimikrobnih oksidanasa koji direktno oštećuju ćelijsku DNK i uvode ćeliju u malignu transformaciju (*Jenkins i sar., 2008*). Sinergizam seksualno prenosivih patogenih agenasa u toku koinfekcije ubrzava progresiju ka težim oblicima HPV infekcije tj. ka cervikalnom karcinomu. Cervikalna inflamacija izazvana drugim uzročnicima, kod HPV pozitivnih žena je kofaktor u nastanku karcinoma grlića materice.

Prezervativ-upotreba kondoma je efikasna zaštita od mnogih polno prenosivih infekcija, ali u slučaju infekcija HPV zaštita nije kompletna (*Schiffman i Kjaer, 2003*). Razlog je prisustvo HPV i na koži genitalija koja nije pokrivena kondomom. Jedina, s tim u vezi urađena studija je utvrdila da kontinuirana upotreba kondoma smanjuje rizik od HPV infekcije za 70% u odnosu na osobe koje nikada nisu koristile kondom (*Winer i sar., 2006*).

Kofaktori rizika za malignu transformaciju ćelija

Pušenje-produkti sagorevanja duvanskog dima mogu podstaći karcinogeni efekat na organima koji nisu direktno izložena duvanskom dimu, npr. u pankreasu, bubregu, bešici i grliću materice (*IARC, Working Group, 1986*). Hipotezu da pušenje duvana može biti faktor rizika za nastanak raka grlića materice prvi je predložio Winkelstein još 1977 (*Winkelstein i sar., 1977*). Ova hipoteza je podržana kasnijim epidemiološkim studijama (*Castellsague i sar., 2002*). Sagorevanjem duvana nastaju specifični policiklični aromatični ugljovodonici, kao što su benzopiren i nitrozamina, koji su moćni induktori kancerogeneze (*Alam i sar., 2008*). Studija Alam i sar. (2008) je pokazala da sastojci iz

duvanskog dima stimulišu sintezu HPV viriona u inficiranim ćelijskim kulturama. Pušenje cigareta je povezano sa značajnim smanjenjem u broju Langerhansovih ćelija u epitelu grlića materice, čime se objašnjava način na koji pušenje doprinosi razvoju cervikalnih neoplazija (Barton i sar., 1988).

Oralna kontracepcija-podaci nekoliko studija ukazuju da visoki nivoi polnih hormona mogu biti uključeni u cervikalnu kancerogenezu. Tako estrogen podstiče HPV gensku ekspresiju, utiče na cervikalni imuni odgovor i stimulišu proliferaciju ćelija u zoni transformacije (Gariglio i sar., 2009). Međutim, podaci naučnih studija koji se odnose na povezanost upotrebe oralnih kontraceptiva (Ocs, engl. *Oral contraceptives*) i nastanka karcinoma grlića materice su u disparitetu. Analizom podataka osam studija, koje su obuhvatile žene obolele od invazivnog karcinoma cerviksa ili karcinoma *in situ*, primećeno je da kod žena koje su koristile OCs 5 do 9 godina, rizik za nastanak cervikalnog karcinoma iznosi 2,82; kod žena koje su OCs upotrebljavale 10 godina ili duže 4,03. U istraživanju Smith i sar. (2003), navodi se da se rizik smanjuje po prekidu medikacije, odnosno, da se za 10 godina vraća na nivo prisutan kod žena koje nisu nikada koristile hormonsku kontracepciju. U studiji, sprovedenoj u Danskoj, Jensen i sar. (2013), tokom 13 godina praćenja 1353 žene, nisu uočili povezanost između upotrebe OCs i nastanka karcinoma grlića materice.

Porodjaji i pobačaji-Multicentrična studija sprovedena od Međunarodne agencije za istraživanje karcinom (IARC) je pokazala da veliki broj porođaja povećava rizik od nastanka maligne bolesti na gliću materice kod HPV DNK pozitivnih žena (Munoz i sar., 2002). Zbirni podaci studija koje su uključile 1853 žene obolele od karcinoma grlića materice pokazali su da je rizik za nastanak maligne bolesti 3,8 puta veći (95% CI: 2,7 - 5,5) kod žena koje su imale sedam i više porođaja naspram rizika od 2,3 (95% CI: 1,6 -3,2) kod žena sa jednim ili dva porođaja (Munoz i sar., 2002). Mada razlozi ove pojave nisu dovoljno poznati, moguće objašnjenje uključuje hormonske faktore povezane sa trudnoćom i ponavljane ozlede grlića materice (Castellsagué i sar., 2002). Isto tako, rizik od cervikalnog karcinoma povezan je sa godinama prvog porođaja; među ženama koje su rodile sa 16 godina rizik je iznosio 4,4, a među onima koji su bile starije od 20 godina rizik je iznosio 2,2 (Munoz i sar., 2002).

Nepravilna ishrana-o mogućoj ulozi ishrane u HPV-karcinogenezi za sada postoje ograničeni dokazi. Sprovedene studije dosledno pokazuju da je ishrana bogata voćem i povrćem povezana sa smanjenim rizikom od raka grlića materice. Uloga vitamina A i/ili

beta-karotena je slabo potvrđena, dok su podaci koji se odnose na dodavanje vitamina C i E u ishrnu umereno konzistentni. Podaci epidemioloških studija su takođe u suprotnosti u pogledu uloge folata u etiologiji cervikalnih neoplazija (*Castellsague i Munoz, 2003*).

Genetska predispozicija je važna komponenta u nastanku raka grlića materice. Nađeno je da genetska heritabilnost čini 27% efekta osnovnih faktora za razvoj tumora (*Gómez i Santos, 2007*). Heritabilnost može uticati na mnoge faktore koji doprinose razvoju raka grlića materice, uključujući sklonost HPV infekciji, sposobnosti eliminisanja infekcije, kao i vreme za razvoj bolesti. Familijarno opterećenje za razvoj raka grlića materice iznosi 2%. U izvesnom broju studija pruženi su dokazi da genetski polimorfizam u tumor supresorskom genu TP53 može biti povezan sa HPV perzistencijom i progresijom do karcinoma (*Gómez i Santos, 2007*).

2.7. EPIDEMIOLOGIJA RAKA GRLIĆA MATERICE

Epidemiologija karcinoma grlića materice u svetu

Internacionalna agencija za istraživanje raka (IARC) je 2008. godine pokrenula projekat „GLOBOCAN“, sa ciljem sagledavanja incidencije i mortaliteta glavnih tipova karcinoma za 184 zemalje sveta. Rezultati su sumirani i dostupni u sveobuhvatnoj bazi podataka po polu, tipu karcinoma, kontinentu i naciji (<http://globocan.iarc.fr/>) Prema podacima Globocan studije, karcinom grlića materice je četvrti po učestalosti, sa procenjenih 528.000 novih slučajeva i 266.000 smrtnih slučajeva u svetu u toku 2012. godine (*Ferlay i sar., 2013^a*). Većina novih slučajeva ovog karcinoma (oko 80%) otkrivena je u manje razvijenim regionima sveta. Pri tome, među ženama 13 do 23 regiona u svetu, rak grlića materice se po učestalosti nalazi na prvom ili drugom mestu. Najveća stopa smrtnosti od ove bolesti, tokom 2012. godine, zabeležena je u zemljama istočne Afrike i iznosi 27,6 na 100.000 žena. U toku iste godine u nekim zemljama Zapadne Evrope, Australiji i Novom Zelandu na 100.000 žena, umrlo je svega dve žene, a u muslimanskim zemljama sa konzervativnim seksualnim nazorima, uključujući Egipat, Jordan, Saudijsku Arabiju i Iran, stopa smrtnosti iznosi 1,2 na 100.000 žena (*Ferlay i sar., 2013^a*). Prema podacima Nacionalnog Instituta za kancer (SAD), srednje godine američkih žena svih rasa obolelih od cervikalnog karcinoma iznosi 49 godina, pri čemu je 60% mlađe od 50 godina (*National Cancer Institute, 2015*).

Epidemiologija karcinoma grlića materice u Srbiji

Srbija ima populaciju od 3.85 miliona žena starosti od 15 godina i starijih, koje su u riziku od razvoja raka grlića materice. Trenutne procene pokazuju da se svake godine kod 1500 žena dijagnostikuje rak grlića materice, a umre 609 žena (*Bruni i sar., 2015*). Naša zemlja je 2002. godine imala najveću incidenciju raka grlića materice (27,3 na 100.000) u Evropi (*Kesić i sar, 2012*). Prema poslednjim podacima Globocan studije, Srbija je sada na četvrtom mestu po incidenciji (23,8 na 100.000 žena) posle Rumunije, Bugarske i Litvanije. Ipak, ova incidencija je dvostruko veća od prosečne stope incidencije u Evropi (10,6 na 100.000). Sa udelom od 5,5% u Centralnoj Srbiji i 5,94% u Vojvodini, rak grlića materice je peti uzrok smrti među malignim neoplazmama kod žena Srbije.

Starosna distribucija raka grlića materice ranije je pokazivala tipičan porast posle 30 godine, sa vrhom učestalosti u žena starosnih grupa od 45-49 i 70-74 godine. Poslednjih godina vrh u oboljevanju se pomera prema mlađim starosnim grupama. U dve trećine slučajeva bolest se otkriva u odmaklom stadijumu, kada su već zahvaćene limfne žlezde karlice. Postoje velike razlike u oboljevanju i smrtnosti od karcinoma grlića materice među pojedinim regionima centralne Srbije (*Kesić i sar, 2012*). U većini regiona stope oboljevanja se kreću između 20 i 30 na 100.000 žena, međutim u Jablaničkom regionu zabeležena je incidencija od 40,1 na 100.000 žena. Standardizovana stopa incidencije ispod 20 na 100.000 žena registrovana je jedino u Mačvanskom, Rasinskom i Nišavskom regionu. Regioni sa visokom stopom mortaliteta su Pirotski (14,3 na 100.000), Pomoravski (12,8 na 100.000) i Sremski (10,4 na 100.000), dok je smrtnost najniža u Rasinskom regionu (3,5 na 100.000) (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*).

2.8. PREVENCIJA RAKA GRLIĆA MATERICE

Prirodni tok HPV infekcije i biološko ponašanje prekanceroznih promena omogućavaju da se prevencija raka grlića materice ostvari na primarnom, sekundarnom i tercijernom nivou (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*).

2.8. 1. PRIMARNA PREVENCIJA

Primarna prevencija obuhvata mere u sprečavanju širenja infekcije Humanim papiloma virusom putem vakcinacije, uticaja na seksualno ponašanje i pojačanju zdravstveno-edukativnih aktivnosti. U poslednjih nekoliko godina, razvoj i uspešna implementacija vakcina protiv HPV u nacionalne skrining programe mnogih zemalja, učinili su važan korak u prevenciji infekcija HPV. Trenutno se na svetskom tržištu nalaze tri profilaktičke vakcine: dvovalentna vakcina protiv HPV tipova: 16 i 18 (proizvođača *Cervarix, Glaxo SmithKline*), četverovalentna vakcina protiv infekcije HPV tipovima: 6, 11, 16 i 18 (proizvođača *Gardasil, Merck & Co., inc.*) i devetovalentna vakcina protiv HPV tipova: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 (proizvođača *Gardasil, Merck & Co., inc.*) (*Markowitz i sar., 2014*)

Bivalentna vakcina (HPV2) „Cervarix” sadrži VLP L1 proteine genotipova 16 i 18, proizvedene tzv. bakulovirusnom ekspresijom u ćelijama insekta *Trichoplusiani*. Vakcinalni antigen je adsorbovan na adjuvant $AlSO_4$. Adjuvant se sastoji od aluminijum-

hidroksida i 3-0-dezakil-4-monofosforil-lipida. Kvadrivalentna vakcina (HPV4) „Gardasil” se sastoji od VLP L1 proteina HPV tipova: 6, 11, 16 i 18 proizvedenim u kvascu. Vakcinalni antigen je adsorbovan na aluminijumski adjuvant. Vakcina sadrži natrium hlorid i L-histidin polisorbitat 80. U toku 2014. godine kompanija Merck & Co je licencirala devetovalentnu vakcinu, koja pored četiri postojeća HPV tipa, obuhvata i tipove: 31, 33, 45, 52 i 58. Tipovi uključeni u nanovalentnu vakcinu odgovorni su za oko 90% invanzivih cervikalnih karcinoma

U kliničkim studijama potvrđeno je nastajanje stabilnog imuniteta aplikacijom navedenih vakcina, sa relativno zadovoljavajućim nuspojavama. Sve tri profilaktičke vakcine odobrene su od strane Američke agencije za kontrolu hrane i lekova (FDA engl. *Food and Drug Administration*) (FDA: 2006; 2009; 2014).

Do kraja avgusta 2014. godine, 58 zemalja je prihvatilo HPV vakcine u nacionalni program vakcinacije (WHO, 2014). Preporuke za primenu profilaktičkih vakcina se razlikuju po kontinentima i regionima. U najvećem broju zemalja za sada se vrši vakcinacija samo osoba ženskog pola. Uopštena je preporuka da vakcinacijom budu obuhvaćene osobe od 9-26 godina. Iako je u oktobru 2011. godine, od strane ACIP (*Advisory Committee on Immunization Practices*) odobreno vakcinisanje dečaka starosti od 9 do 26 godina, vakcinisanje se za sada sprovodi u SAD, nekim provincijama Kanade, Australiji i Novom Zelandu (CDC, 2011).

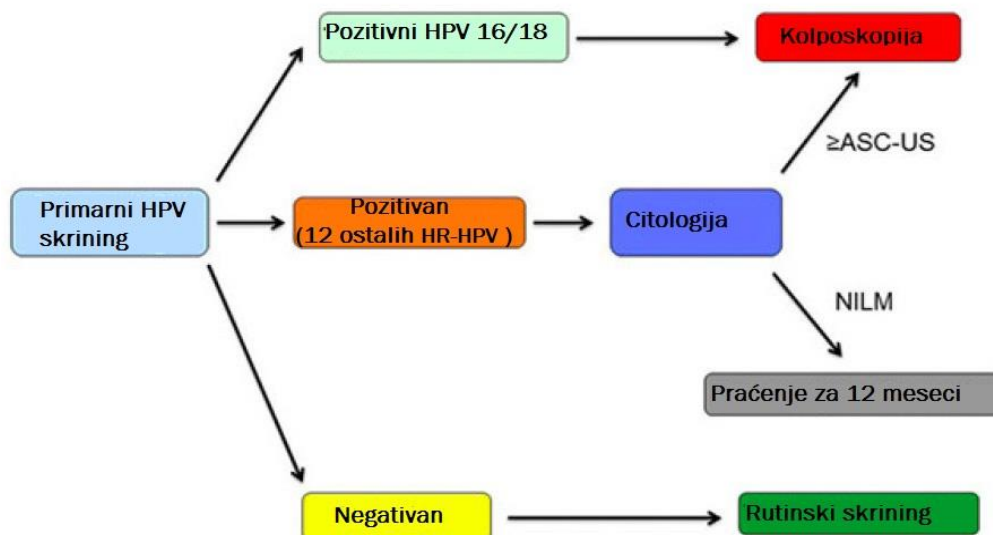
U budućnosti se očekuje da će imunoterapijske HPV vakcine dati značajan efekat u pogledu lečenja hroničnih perzistentnih HPV infekcija, genitalnih bradavica i anogenitalnih displazija (Kim i sar., 2014). Trenutno se u I ili II fazi kliničkih studija nalazi nekoliko terapijskih vakcina: *ProCervix*, (GenticeL, France), *GKS-188E*, (Genexine, Inc. Koreja), *VGX-3100*, (Inovio Pharmaceuticals, Inc. USA) itd. S obzirom da su HPV onkoproteini E6 i E7 potrebni za indukciju i održavanje malignog fenotipa, većina istraživanja iz oblasti terapijske vakcine su usmerena na ove proteine. Terapijske vakcine su različito dizajnirane i mogu biti bazirane na vektoru, peptidima, proteinima, zasnovane na DNK ili himerima VLP. Aplikacija terapijskih vakcina je najčešće intramuskularna, ali predviđeno je da pojedine vakcine budu aplicirane elektroporacijom (Kim i sar., 2014).

2.8.2. SEKUNDARNA PREVENCIJA

Sekundarna prevencije raka grlića materice sprovodi se cervikalnim citološkim pregledom tj. Papanikolau testom. Metodu je prvi opisao američki naučnik grčkog porekla Papanikolau, po kome je i dobila ime (kraćeno Papa test). Pomoću ovog relativno jeftinog testa ćelije epitela grlića materice se razmazuju na predmetno staklo, a nakon bojenja, mikroskopski evaluiraju (*Massad i sar., 2001*). Od kako je ovaj test primenjen u sklopu organiziranog skrining programa u mnogim zemljama, smrtnost od karcinoma cerviksa se smanjila za više od 80 %. Osjetljivost Papa testa je oko 50–70%, pa se ovom metodom može prepoznati do 70% ćelijskih abnormalnosti (*Dijkstra i sar., 2014*). U nastojanju da se poveća osetljivost konvencionalnog Papa testa, poslednjih godina razvijena je LBC metoda (eng. liquid based cytology) sa novim načinom tehničke pripreme uzorka i kompjuterizovanom citološkom analizom (*Ronco i sar., 2007*).

Tokom poslednje decenije vođene su mnogobrojne polemike o ulozi HPV DNK testa u skriningu raka grlića materice. Istraživanja su pokazala da je osetljivost HPV DNK testa (84-100%), uz visoku negativnu prediktivnu vrednost (oko 100%), veća nego konvencionalnog Papa testa. Stoga je američka agencija za kontrolu hrane i lekova (FDA) tokom 2011. godine odobrila upotrebu HPV DNK testa (*FDA Approves Roche HPV Test, 2011*) u skriningu raka grlića materice u kombinaciji sa Papa testom. Međutim, podaci velike radnomizirane studije Athena koja je obuhvatila oko 47.000 žena sa područja SAD, pružili su nove podatke o značaju HPV DNK testa u poređenju sa rezultatom cervikalne citologije. Zbog toga je u aprilu 2014. godine FDA odobrila prvi HPV DNK test (*Cobas 48000, Roche*), koji se može koristiti kao samostalan dijagnostički test u skriningu raka grlića materice (*Warner i sar., 2015*).

S obzirom da FDA odobrenje ne sadrži preporuke za pripremu HPV testa u cervikalnom skriningu, društvo Ginekološke Onkologije (GO) i Američko društvo za kolposkopiju i cervikalnu patologiju (ASCCP) u saradnji sa predstavnicima nekoliko nacionalnih zdravstvenih organizacija USA (ACS, ASCP, ASC, CAP) doneli su panel privremenih smernica (slika 2.21):



Slika 2.21. Algoritam za primenu HPV testa u skriningu raka grlića materice (preporučeno od: Društva ginekološke onkologije (GO) i Američkog društva za kolposkopiju i cervikalnu patologiju (ASCCP) u saradnji sa ostalim nacionalnim zdravstvenim organizacijama USA (ACS, ASCP, ASC, CAP) (adaptirano iz: Warner i sar., 2015)

- HPV DNK test kao primarni test u skriningu raka grlića materice može se sprovesti kod žena ≥ 25 godina starosti.

-HPV DNK pozitivne žene na tipove 16 i 18 uputiti na kolposkopiju.

-HPV DNK pozitivne žene na ostale visokorizične tipove uputiti na citološko testiranje.

-preporučeni skrining interval za HPV DNK negativne žene sa normalnim citološkim nalazom je tri godine (Warner i sar., 2015).

2.8.2.1. Skrining program za prevenciju raka grlića materice na teritoriji Republike Srbije

Republika Srbija je 03. jula 2006. godine imenovala posebnu radnu grupu za prevenciju raka grlića materice sa zadatkom da sačini Nacionalni program za prevenciju raka grlića materice. Program je usvojila Vlada Republike Srbije i objavljen je u službenom listu br. 54 od 23. maja 2008. godine. Sačinjeni Nacionalni program za prevenciju raka grlića je u skladu sa preporukama SZO, čiji je cilj "rano otkrivanje raka grlića materice, adekvatna dijagnostika i terapija sa ciljem smanjenja mortaliteta i poboljšanja kvaliteta života žene" (WHO, 2002). Program organizovanog skrininga raka

grlića materice sprovodi se na teritoriji Republike Srbije od 2012/13.godine (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*).

Skrining programom obuhvaćene su žene starosti od 25-69 godina. Ciljna grupa identifikuje se preko biračkih spiskova ili baze jedinstvenih matičnih brojeva i liste osiguranika Republičkog zavoda za zdravstveno osiguranje. Svim ženama iz ciljne grupe dostavlja se poziv na testiranje. Testiranje podrazumeva citološki pregled cervikalnog brisa (Papanikolau test) u skladu sa stručno-metodološkim uputstvima. Skrining interval je tri godine (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*).

2.8.3. TERCIJERNA PREVENCIJA

Tercijarna prevencija podrazumeva adekvatno lečenje maligne bolesti i program rehabilitacije kojima se poboljšavaju prognoza bolesti i kvalitet života obolele osobe. Ukoliko dođe do pojave cervikalne intraepitelijalne neoplazije (CIN) ili karcinoma grlića materice, izbor metode lečenja se određuje u zavisnosti od težine lezije i starosti pacijentkinje. Redovne kontrole su vrlo važne kod žena lečenih od premalignih promena i karcinoma grlića materice. Kontrolni pregledi uključuju ginekološki pregled, Papanikolau test i druge laboratorijske nalaze među kojima HPV DNK testiranje ima važnu ulogu (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*).

2.9. METODE ZA DOKAZIVANJE I GENOTIPIZACIJU HPV

2.9.1. Tradicionalne metode

Humani papiloma virusi (HPV) se razmnožavaju samo u terminalno diferenciranim epitelnim ćelijama, tako da je njihovo istraživanje bilo otežano, s obzirom da ne postoji adekvatan živi sistem za njihovu kultivaciju. U novije vreme razvijen je izvestan broj ćelijskih kultura pogodnih za izučavanje virusne replikacije, dok je sinteza kompletnih viriona i dalje ograničena. Raspoložive metode ćelijske kulture su komplikovane za izvođenje, ograničene na nekoliko tipova HPV i stoga nisu pogodne za kliničke ili epidemiološke studije (*Chow, 2015*).

2.9.2. Serološke metode

Imunološki odgovor domaćina na HPV infekciju obuhvata kako humoralni, tako i ćelijski posredovan imunitet. Humoralni odgovor na HPV infekciju, usmeren je protiv konformacionih epitopa u promenljivim regionima velikog virusnog strukturnog proteina L1 (*Stanley, 2012*). Koristeći trenutno raspoložive testove, utvrđeno je da se humoralni odgovor javlja kasno i slab je, sa niskim nivoom tipski specifičnih antitela, koja su detektovana u oko 50-70 % inficiranih osoba. Serokonverzija se dogodi oko 6 do 18 meseci nakon infekcije (*Stanley, 2012*).

Nivo antitela protiv HPV predstavlja kumulativnu meru izloženosti ovom virusu, što je korisno u seroepidemiološkim studijama vakcinisane i nevakcinisane populacije. Trenutno, analiza specifičnih antitela protiv HPV nema veću dijagnostičku vrednost i potrebni su novi pristupi koji bi povezali imunološki odgovor produkcijom specifičnih antitela sa ishodom bolesti. Zbog toga je većina seroepidemioloških studija fokusirana na potvrđivanje odnosa između prisustva HPV specifičnih antitela i detekcije anogenitalnih kancera ili prekanceroznih stanja (*Di Bonito i sar., 2006*).

2.9.3. Molekularne metode za dokazivanje HPV DNK

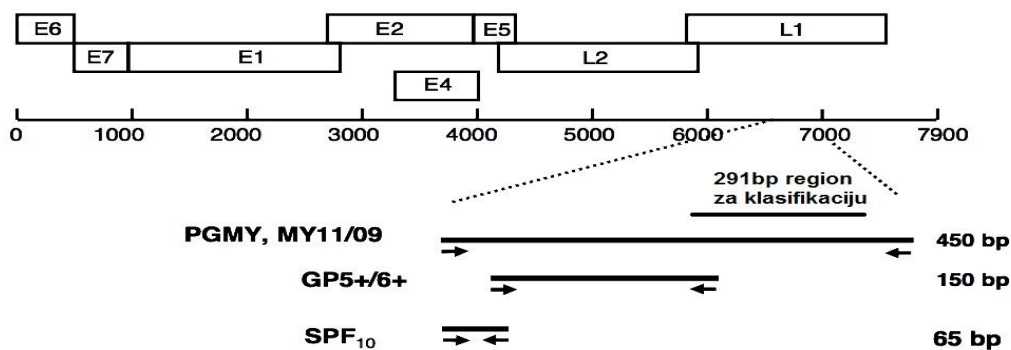
Tokom poslednje tri decenije razvoj molekularnih testova baziranih na detekciji nukleinskih kiselina doneo je veliki napredak u različitim aspektima istraživanja genoma

HPV, kao i u kliničkoj dijagnostici HPV infekcija. U cilju dokazivanja HPV najčešće se primjenjuju metode klasičnog PCR-a (engl. *polymerase chain reaction*), PCR u realnom vremenu (engl. *Real-time PCR*), hibridizacija nukleinskih kiselina, sekvenciranje pojedinih regiona HPV genoma, tehnologija mikročipova itd. (*Snijders i sar., 2010; Torres i sar., 2012*).

Dijagnostički testovi za utvrđivanje prisustva HPV infekcije najčešće su bazirani na detekciji virusne DNK korišćenjem PCR metode. Osetljivost i specifičnost primenjene metode može da varira, u zavisnosti izabranog seta prajmera, veličine PCR proizvoda, reakcionih uslova i performansi DNK polimeraze koja se koristi u reakciji (*Villa, 2009*). PCR protokoli za dokazivanje HPV DNK najčešće koriste dve vrste prajmera: 1) opšti ili tzv. konsenzus prajmeri koji su dizajnirani za visoko konzervirane sekvence ORF L1 ili ORF E1 regiona i koriste se za screening; 2) tip specifični prajmeri koji su dizajnirani za detekciju pojedinačnog HPV tipa (*Molijn i sar., 2005; Snijders i sar., 2010; Kroupis i Vourlidis, 2011*).

Veliki broj PCR protokola koristi tkz. opšte ili konsenzus prajmere koji omogućavaju umnožavanje širokoga spektra HPV genotipova u jednoj reakciji. Postoje tri grupe konsenzus prajmera (slika 2.22). U prvim konsenzus PCR analizama koristio se MY09/11 par prajmera, koji cilja sekvencu L1 regiona, dužine od 450 baznih parova (*Manos i sar., 1989*). MY09/11 su degenerativni prajmeri koji se sastoje od mešavine različitih nukleotida. Iz ovog seta izvedena je druga generacija prajmera GP5/6 i njihova proširena verzija GP5 +/- 6 kojom se umnožava sekvencu od oko 150 baznih parova u oblasti u L1 regiona (*de Roda Husman i sar., 1995*), dok tzv. SPF10 set umnožava najviše 65 bp u oblasti istog gena (*Hesselink i sar., 2008*). Identifikacija amplifikovanog produkta kod klasičnog PCR-a vrši se na kraju reakcije (end point analiza) najčešće procesom elektroforeze na gelu. Međutim, određivanje HPV genotipa zahteva upotrebu dodatnih metoda. U tu svrhu najčešće se primenjuju: PCR-RFLP metoda (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), Southern blotting analiza i metoda sekvenciranja (*Villa, 2009; Kroupis i Vourlidis, 2011*). Interpretacija dobijenih rezultata olakšana je razvitkom real-time PCR metode. Označavanjem prajmera i izborom većeg broja fluorescentnih boja, omogućena je amplifikacija i detekcija većeg broja segmenata DNK, čak i ukoliko su oni približno jednake dužine (*Iftner i Villa, 2003*). HPV DNK testovi su sastavni deo rutinske dijagnostike HPV infekcija, a u novije vreme postali su i važan deo smernica za skrining raka grlića materice (*Torres i sar., 2012; van Alewijk i sar., 2013*). Na globalnom tržištu trenutno je dostupan širok spektar komercijalnih HPV DNK testova, koji se pored razlika u mogućnosti individualne genotipizacije odlikuju i različitim karakteristikama

analitičkih performansi. Međutim, u kliničkim studijama potvrđena je i validirana pouzdanost svega malog broja HPV DNK testova (Torres i sar., 2012).



Slika 2.22. Konsenzus prajmeri za umnožavanje regiona L1 gena (adaptirano iz: Molijn i sar., 2005)

Indikacije za primenu testova za detekciju HPV DNK su: (1) trijaža žena sa dvosmislenim citološkim rezultatima skrininga, koji pokazuje prisustvo ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*), kako bi se utvrdilo koje pacijentkinje treba da budu upućene na kolposkopiju; (2) praćenje žena sa abnormalnim citološkim rezultatima skrininga, koje su negativne na početnoj kolposkopiji/biopsiji; (3) predviđanje ishoda nakon terapijskog tretmana CIN2; (4) primarni skrining žena starosti 30 godina i više, u kombinaciji sa Papa testom, kako bi se otkrilo postojanje prekursora raka grlića materice (Wasserman i sar., 2007; Origoni i sar., 2012; Poljak, 2015).

2.9.4. Molekularne metode za dokazivanje HPV iRNK

Dijagnostičke metode zasnovane na detekciji virusnog genoma (HPV DNK) pokazuju samo da je virus prisutan u ćeliji, ali ne daju informaciju o onkogenoj aktivnosti virusa, niti da li infekcija ima prolazni ili dugotrajan karakter. Novije tehnologije preporučuju koncepte koji se baziraju na detekciji iRNK profila (Villa, 2009).

Onkoproteini HPV E6 i E7 imaju ključnu ulogu u malignoj transformaciji inficirane ćelije, pa je detekcija iRNA potvrda toga, da je u inficiranoj ćeliji prisutna dugotrajna sinteza virusnih onkoproteina i da infekcija nema samo prolazni karakter. Dokazivanje

iRNK onkogena E6 i E7 ima veliki klinički značaj, jer izdvaja pacijentkinje koje su pod direktnim rizikom za razvoj karcinoma grlića materice (*Kroupis i Vourlidis, 2011; Ratnam i sar., 2011*).

HPV E6/7 transkripti se u kliničkim uzorcima mogu detektovati sa visokom osetljivošću korišćenjem PCR metoda, uključujući prethodno reverznu transkripciju (RT-PCR), kvantitativni real-time PCR itd. Pored toga, danas je u upotrebi i nekoliko komercijalnih testova za kvantifikaciju iRNA: Pretect Porfer, Norvay; Biomeruieux, France; Aptima, Hologic USA (*Villa, 2009; Kroupis i Vourlidis, 2011*).

2.9.5. Tehnike prognostičkih biomarkera

HPV DNK pozitivne žene spadaju u grupu žena koje su sa visokim rizikom za razvoj karcinoma grlića materice i zahtevaju praćenje, naročito ako su starije od 30 godina(). Zbog toga, postoji interesovanje za definisanje sekundarnih markera, koji imaju potencijalnu primenu u identifikaciji žena koje treba da se prate radi bolje kontrole infekcije. Nekoliko biomarkera koji prate specifičnu fazu u prirodnoj istoriji HPV infekcije ujedno ukazuju i na progresiju prekanceroznih lezija u invanzivni karcinom grlića materice. Ovi markeri uključuju dokazivanje: virusnih nukleinskih kiselina, virusnih proteina, epigenetičke događaje u virusnom i humanom genomu, kao i istraživanja virusnih varijanti metodama sekvenciranja itd.

Najčešće korišćeni imunohistohemijski biomarker koji ukazuje na onkogenu aktivnost visoko-rizičnih HPV tipova je protein p16, uključen u kontroli ćelijskog rasta i deobe, a koji se u novije vreme često koristi u kombinaciji sa KI-67 markerom (*Darragh i sar., 2012*). Tokom poslednjih godina razvijeno je nekoliko veoma osetljivih i specifičnih postupaka radi otkrivanja metilacionog profila pojedinih tumor supresorskih gena. DNK-metilacija je glavna epigenetska promena u ćelijama sisara, a predstavlja kovalentnu modifikaciju koja se najčešće javlja na CpG dinukleotidima. Metilacija citozina unutar promotora nekih tumor supresorskih gena je često povećana u toku napredovanja karcinoma. Prisustvo genske metilacije u ćelijama domaćina može biti značajno u trijaži žena pozitivnih na visoko rizične HPV (*Kroupis i Vourlidis, 2011*).

2.9.6. Metode SEKVENCIRANJA DNK genoma

U mnoštvu molekularnih tehnika koje imaju dijagnostičku i istraživačku primenu, određivanje redosleda nukleotida u molekulu DNK, metodom sekvencioniranja, ima poseban značaj. Određivanje DNK sekvence uključeno je u bazična istraživanja u oblasti medicine, biologije, forenzike, sistematike i drugih oblasti. Metode za određivanja DNK sekvence razvijene su krajem sedamdesetih godina prošlog veka, a koristile su se dve metode: Maksim Žilbertova (*Maxam i Gilbert, 1977*) i Frederik Sangerova metoda (*Sanger i sar., 1977*).

Gilbertova metoda se danas retko koristi, ali je u početku bila popularnija, jer je zahtevala samo prečišćen sadržaj DNK na kome se obavljala degradacija i sekvenciranje upotrebom hemijskih sredstava sa radioaktivnim markerima. **Sangerova metoda** je zahtevala DNK polimerizaciju i tačnu terminaciju rasta DNK lanca, kao i radioaktivne markere.

Automatsko sekvenciranje DNK, koje se izvodi u današnje vreme, zasniva se na kombinaciji PCR metode i metode koju su razvili Sanger i saradnici i poznato je pod nazivom *cycle sequencing* (*Morozova i Marra, 2008*). Aparati za automatsko sekvenciranje uz pomoć DNK-polimeraze ugrađuju ddNTP koji su obeleženi fluorescentnim bojama na 3' kraju (eng. dye terminators). Bojama se obeležavaju i prajmeri na 5' kraju (engl. dye primers). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Upotreba PCR metode u automatskom sekvenciranju omogućava da se u sukcesivnim ciklusima denaturacije, hibridizacije i elongacije linearno amplifikuju ekstenzioni produkti (*Morozova i Marra, 2008*).

Rezultat reakcije je mešavina oligonukleotida različite dužine. Kada DNK fragmenti putujući kroz poliakrilamidni gel u procesu elektroforeze "pređe" mesto gde se nalazi snop lasera, fluorescentna boja se pobuđuje i emituje svetlosni signal koji se instrumentalno beleži. Na osnovu talasne dužine emitovane fluorescencije, instrument je u stanju da identifikuje boju, odnosno nukleotid koji se nalazi na kraju DNK fragmenta. Emitovana fluorescencija iz boja se skuplja putem CCD kamere (engl. *charge-cupled device*) i čuva kao digitalni zapis u kompjuteru, nakon čega se obrađuje odgovarajućim softverom (*Morozova i Marra, 2008*). Na osnovu formata poliakrilamidnog gela razlikuju se dva tipa automatskih sekvenatora: automatski sekvenatori koji koriste gelove za

sekvenciranje u obliku ploče i kapilarni automatski sekvenatori u kojima je akrilamidni gel smešten u tankoj cevčici (*Carrilho, 2000*).

Nakon što je završen proces sekvenciranja, sledeći vrlo važan korak je obrada podataka, odnosno mapiranje očitanih fragmenata na referentni genom. Od skoro je razvijen čitav niz bioinformatičkih programa koji se upotrebljavaju za analizu, tumačenje i primenu podataka dobijenih sekvenciranjem genoma i proteoma (*Morozova i Marra, 2008*).

Druga i treća generacija tehnologije sekvenciranja

Tokom 2004. godine pojavila se nova tehnologija sekvenciranja, razvijena od kompanije Roch 454TM, a u narednim godinama, odnosno, između 2006. i 2009. pojavile su se još dve nove platforme. U poređenju sa tradicionalnom Sangerovom tehnologijom inovativna rešenja novih tehnologija pružaju brže generisanje podataka i jeftiniji proces sekvenciranja (*Morozova i Marra, 2008; Niedringhaus i sar., 2011*). Platforme za sekvenciranje druge generacije su: (1) sekvenciranje amplifikacijom na perlama (*Roche/454FLKS*) ili pirosekvenciranje; (2) sekvenciranje vezivanjem (*SOLiDTM sistem Life Technology*); (3) sekvenciranje sintezom (*Illumina/Solexa Genom analizator*).

U novije vreme, razvijena je i treća generacija tehnologije sekvenciranja (*Heliscope-true single molecule sequencing, Nanopore DNA sequencer, Ion Torrent DNA sequencer*), čiji je cilj smanjenje cene instrumenata tzv. sekvencera, pojednostavljivanje postupka sekvenciranja i dobijanje velikih količina sekvenci u kraćem vremenskom intervalu (*Niedringhaus i sar., 2011*). Iako zahtevaju kompleksnost enzimatskih reakcija, upotrebu specifičnih reagenasa, podršku softverskih i optičkih instrumenata, kao i predhodnu pripremu biblioteke uzoraka, opisane tehnologije zauzimaju sve značajniju ulogu na svetkom tržištu (*Morozova i Marra, 2008*).

2.9.7. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Endonukleaze su restrikcioni enzimi koji seku fosfodiesterne veze unutar polinukleotidnog lanca DNK. Mesto endonukleaznog prepoznavanja, vezivanja i enzimskog delovanja na molekuli DNK, varira po dužini i po redosledu nukleotida. Dužina specifične sekvence za koju se vezuju endonukleaze uglavnom je između 4 i 8 nukleotida, koji su palindromični tj. imaju isti redosled kad se čitaju sa oba kraja molekule (*Raliya i sar., 2013*).

RFLP metoda se može primeniti u genotipizaciji HPV. Metoda se izvodi tako što se deo virusnog genoma umnoži upotrebom konsenzus prajmera, a PCR produkti izlože enzimskoj razgradnji. U zavisnosti od prisustva ili odsustva ciljnih sekvenci za primenjenu endonukleazu, dobijaju se fragmenti različitih dužina, koji se potom razdvajaju elektroforezom. Specifični raspored fragmenata odgovara određenim genotipovima. Opisano je više različitih RFLP metoda koje se razlikuju u broju i vrsti upotrebljenih endonukleaza, kao i delu HPV genoma kojeg seku (*Bernard i sar., 1994*).

3.0. Ciljevi istraživanja

Uzimajući u obzir visok stepen incidencije karcinoma grlića materice i nepostojanje podataka o učestalosti onkogenih tipova HPV i njihovih molekularnih varijanti za područje AP Vojvodine, definisani su sledeći ciljevi:

- Definisati zastupljenost različitih onkogenih tipova HPV kod ispitanica sa područja Južnobačkog okruga (AP Vojvodina);
- Odrediti molekularnu varijabilnost najprevalentnijih genotipova HPV, analizom DNK sekvenci i / ili RFLP metodom;
- Odrediti karakteristike nukleotidnih sekvenci HPV izolata iz AP Vojvodine u odnosu na referentnu sekvencu odgovarajućeg genotipa;
- Definisati filogenetske odnose HPV izolata iz AP Vojvodine u odnosu na izolate iz Evrope i ostalih geografskih područja.

4.0. *Materijal i metode*

4.1. Materijal

4.1.1. Studijska grupa

Istraživanje je sprovedeno u periodu od januara 2014. do novembra 2015. godine. Ispitano je 564 osobe ženskog pola, starosti od 18 do 69 godina. Biološki materijal za analizu dobijen je od pacijentkinja koje su od strane ginekologa bile upućene u Centar za Virusologiju, Instituta za Javno zdravlje Vojvodine radi HPV dijagnostike. Sve ispitanice uključene u istraživanje potpisale su dobrovoljni informisani pristanak i popunile anketni upitnik. Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije Instituta za javno zdravlje Vojvodine i Etičke komisije Medicinskog fakulteta, Univeziteta u Novom Sadu (u prilogu).

4.1.2. Uzorak

Biološki uzorci za ispitivanje molekularnim dijagnostičkim metodama su bili endocervikalni brisevi ispitanica. Brisevi su uzimani prema indikacijama tokom rutinskog ginekološkog pregleda. Materijal za ispitivanje je odložen u komercijalni transportni medijum (Copan) i do obrade čuvan na -76°C .

4.1.3. Anketni upitnik

Anketiranje pacijentkinja je sprovedeno u Institutu za javno zdravlje Vojvodine, tokom prikupljanja endocervikalnih briseva. U istraživanju je korišćen nestandardizovani anketni upitnik u cilju dobijanja sledećih podataka:

- A) **Sociodemografske karakteristike:** starost, nivo obrazovanja, bračno stanje, broj porođaja
- B) **Reproduktivne karakteristike i briga o reproduktivnom zdravlju:** menarha, menopauza, broj pobačaja (spontanih i namernih), primena oralnih kontraceptiva, prisustvo seksualno prenosivih infekcija (SPI), urađen Papa test, redovne posete ginekologu

- C) **Seksualne navike ispitanica:** godine stupanja u prvi seksualni odnos, ukupan broj seksualnih partnera u poslednje dve godine, upotreba prezervativa
- D) **Životni stil ispitanica:** pušački status, konzumiranje alkohola
- E) **Familijarno opterećenje malignim bolestima**
- F) **Predhodne analize na HPV i saznanja o uticaju HPV na ljudsko zdravlje**

4.2. METODE HPV DIJAGNOSTIKE

4.2.1. Izolacija DNK

Protokol izolacije virusne DNK izvršen je prema originalnom uputstvu proizvođača (*Kit za ekstrakciju DNA, Sorb A, Sacace, Italy*). U cilju preveniranja kontaminacije, procedura DNK ekstrakcije izvršena je u laminarnoj komori uz korišćenje filtera sa aerosol barijerom i PCR sterilnih tubica. Uzorak je prvo liziran pod visoko denaturišućim uslovima koje obezbeđuje Lysis solucija. U primenjenom protokolu DNK se veže za Sorbent u vidu precipitata. Potom se vrši ispiranje precipitirane nukleinske kiseline radi uklanjanja inhibitora amplifikacije. Za eluciju nukleinske kiseline upotrebljeno je 100 µl pufera za eluciju. DNK izolovana na predhodno opisan način, čuvana je na -76°C i korišćena u daljim fazama istraživanja.

4.2.2. Genotipizacija visokorizičnih HPV real time PCR metodom

Genotipizacija 12 visokorizičnih tipova HPV izvršena je upotrebom komercijalnog kita *HPV High Risk Typing Real-TM* proizvođača Sacace (*Sacace Biotechnologies, Italy, CE, IVD*). Ovim kitom za *in vitro* dijagnostiku, pored amplifikacije ciljane DNK moguća je i kvalitativna detekcija i genotipizacija 12 tipova HPV. U procesu amplifikacije, kao targetni region, korišćen je virusni E7 gen. Osetljivost testa iznosi 5×10^2 kopija/ml.

Multipleks PCR reakcija je izvršena u zapremini od 13 µl. Svaka od četiri odgovarajuće PCR reakcije mešavine, koje umnožavaju tri određena genotipa HPV, dodate su u zapremini od 8 µl. U sastav PCR reakcije mešavine ulaze sledeće komponente: PCR-mix-1, PCR pufer FRT i Hot star DNK Polymerasa. Ispitivani uzorak,

pozitivna i negativna kontrola dodate su u zapremini od 5 μ l. Proces amplifikacije se izvodio u 45 ciklusa, pod sledećim uslovima: 15 min na 95 °C; 20 sekundi na 95 °C; 60 sec na 60 °C.

4.2.3. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNE SEKVENCE

4.2.3.1 Amplifikacija HPV L1 gena

Za potrebe sekvenciranja, specifičan segment HPV L1 gena, dužine \approx 450 bp je umnožen lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). Za umnožavanje DNK fragmenata, korišćen je AmpliTaq Gold 360 Master Mix (*Applied Biosystems*) uz upotrebu koncenzus prajmera (MY09/11), čije su sekvence prikazane u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Oligonukleotidna sekvenca MY09/MY11 prajmera

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina amplikona (bp)
L1	MY09	5' -CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	450
	MY11	5' -GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	

Varijabilne nukleotidne pozicije: M=A ili C; R=A ili G; W=A ili T; Y=C ili T

PCR reakciona smeša, ukupne zapremine od 25 μ l po reakciji, je obuhvatala sledeće komponente: 12,5 μ l AmpliTaq Gold PCR Master Mix-a; 1,25 μ l prajmera MY09 (konc.1 μ mol); 1,25 μ l MY11 prajmera (konc.1 μ mol) i 5 μ l ekstrahovane DNK (50-100 ng). Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR mašini (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*).

Umnožavanje ciljane sekvence je izvedeno po sledećem protokolu: (1) inicijalna denaturacija: 9 min na 95 °C; (2) replikacioni ciklus se ponavljao se 40 puta i sastojao od 3 koraka: 60s na 95 °C, 60s na 55 °C, 70s na 72 °C; (3) završna ekstenzija DNK lanaca: 8 minuta na 72 °C i (4) završetak reakcije na 4 °C. U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola i negativna kontrola (NT, eng. *no template*). Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

4.2.3.2. Prečišćavanje PCR produkata

U cilju dobijanja što preciznijih rezultata sekvenciranja, izvršeno je prečišćavanje PCR produkata upotrebom komercijalnog kompleta (*QIAquick PCR Purification Kits*; QIAGEN: P/N 28104) prema uputstvu proizvođača.

Upotrebom ovog kita, prečišćavanje DNK se odvija u ultrafiltracionim spin kolonama. U prvom koraku vrši se adsorpcija nukleinske kiseline za površinu silika membrane u prisustvu pufera (pH<7,5) i visoke koncentracije soli. Tokom faze adsorpcije prajmeri i ostale nečistoće (neinkorporirani nukleotidi, agarozna, boje, etidijum bromid, ulja, deterdženti i soli) prolaze kroz kolonu, ne vezujući se za silika membranu. Rezidue soli ispiraju se puferom PE koji sadrži etanol. Višak PE pufera uklanja se centrifugiranjem. Elucija DNK vrši se EB puferom (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Kvalitet prečišćenih fragmenta proveren je na 2% agaroznom gelu. Koncentracija i čistoća eluata određivana je merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm.

4.2.3.3. Sekvenciranje HPV izolata na nivou L1 gena

Za potrebe ovog istraživanja sekvenciranje regiona od interesa sprovedeno je u laboratoriji Instituta za Mikrobiologiju i Imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Procedura sekvenciranja se odvijala u nekoliko koraka:

1. Sekvenciranje je izvršeno uz upotrebu istog para prajmera (MY09 ili MY11) kao i proces amplifikacije. U prvom koraku, svaki uzorak je pripremljen za sekvenciranje u oba pravca, odnosno, pripremljene su dve reakcione smeše, svaka sa po jednim prajmerom (MY09 ili MY11). Reakciona smeša se sastojala od: 2 µl BigDuy Terminator Mix; 2 µl Big Duy Terminator pufera; 1,25 µl prajmera MY09 ili MY11 (konc. 1 µmol); 2,75 µl sterilne vode bez nukleaza i 2 µl HPV DNK (L1 gen). Ukupni volumen reakcione smeše je iznosio 10 µl.

Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR mašini (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*) po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija 1 min na 96°C; replikacioni ciklus u 30 ponavljanja-denaturacije 10 sekundi na 96°C, vezivanja prajmera 5 sekundi na 55°C i ekstenzija DNK lanaca 4 sekunde na 60°C ; završetak reakcije na 4°C.

2. U drugom koraku, dobijeni produkti cikličnog umnožavanja su prečišćeni izopropanolom. U tubicu sa produktom cikličnog umnožavanja dodato je 80 μ l 75% izopropanola; smeša je inkubirana 15 min. na sobnoj temperaturi, zaštićena od izvora svetlosti. Smeša je zatim centrifugirana 45 minuta na 2000g. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen. Tubice su okrenute naopako i centrifugirane 2 minuta na 700g, a zatim osušene na vazduhu.

3. U trećem koraku u produkte cikličnog umnožavanja je dodato 10 μ l Hi-Di TN formaldehida (PE Applied Biosystems, Foster, CA, SAD), a potom je izvršena denaturacija: 2min na 95°C; 2 min. na 4°C. Po završenoj denaturaciji uzorci su stavljeni u sekvenator.

4. Za određivanje redosleda nukleotida korišćena je Sangerova „dideoksi” metoda. Automatsko sekvenciranje amplifikovanih fragmenata genoma HPV rađeno je na automatskom sekvenatoru ABI Prism BigDye 3.1 (PE Applied Biosystems, Foster, CA, SAD). Digitalni zapisi automatskog očitavanja sekvenci tokom kapilarne elektroforeze obrađeni su putem ABISequencing Analysis softvera 5.1 i predstavljeni u vidu elektroferograma.

4.2.4. Bioinformatička obrada podataka

SeqScape software

Eksperimentalno dobijene nukleotidne sekvence u vidu elektroferograma analizirane su u cilju provere kvaliteta sekvenciranja. Sekvence su proverene u oba pravca i izvršena je manuelna obrada praznina. Upoređivanje (engl. *alignment*) dobijenih sekvenci u 5' i 3' pravcu izvršeno je upotrebom SeqScape software, v 2.5. Na taj način dobijena je kompletna (konsenzus) sekvenca, koja je u cilju identifikacije dalje analizirana.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Upotrebom BLAST programa (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sar., 1990) konsenzus sekvence su upoređene sa sekvencama odgovarajućeg regiona HPV genoma, dostupnim u GenBank bazi podataka, odnosno, NCBI (*National Center for*

Biotechnology Information, Nacional Institutes) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Za identifikaciju određenog HPV genotipa neophodno je da nukleotidna sekvenca ima dužinu od najmanje 291 bp, a sličnost sa poznatim HPV tipom mora biti veća od 95%.

Tabela 4.2. HPV sekvence preuzete iz GenBank baze podataka korišćene u filogenetskoj analizi

Vrsta	Tip	Linija	Sublinija	GenBank accession no.	Predhodni naziv
Alpha-9	HPV 16	A	A1	KO2718	Evropean (E)
Alpha-9	HPV 16	A	A2	AF536179	Evropean (E)
Alpha-9	HPV 16	A	A3	HQ644236	Evropean (E)
Alpha-9	HPV 16	A	A4	AF534061	Asian, E(As)
Alpha-9	HPV 16	B	B1	AF536180	African-1, Afr1a
Alpha-9	HPV 16	B	B2	HQ644298	African-1, Afr1b
Alpha-9	HPV 16	C	C1	AF472509	African-2, Afr2a
Alpha-9	HPV 16	D	D1	HQ644257	North American (NA)1
Alpha-9	HPV 16	D	D2	AY686579	Asian-American (AA)2
Alpha-9	HPV 16	D	D3	AF402678	Asian-American (AA)1
Alpha-9	HPV31	A	A1	J04353	-
Alpha-9	HPV31	A	A2	HQ537675	-
Alpha-9	HPV31	B	B1	HQ537676	-
Alpha-9	HPV31	B	B2	HQ537680	-
Alpha-9	HPV31	C	C1	HQ537682	-
Alpha-9	HPV31	C	C2	HQ537684	-
Alpha-9	HPV31	C	C3	HQ537685	-
Alpha-9	HPV33	A	A1	M12732	A
Alpha-9	HPV33	A	A2	HQ537698	B
Alpha-9	HPV33	A	A3	EU918766	B
Alpha-9	HPV33	B	B1	HQ537705	C
Alpha-9	HPV33	C	C1	KF436865	C
Alpha-7	HPV18	A	A1	AY262282	AsAi; AA; E1
Alpha-7	HPV18	A	A2	EF202146	AsAi; AA; E1
Alpha-7	HPV18	A	A3	EF202147	E; E2
Alpha-7	HPV18	A	A4	EF202151	E; E2
Alpha-7	HPV18	A	A5	GQ180787	E
Alpha-7	HPV18	B	B1	EF202155	Af; Af1
Alpha-7	HPV18	B	B2	KC470225	Af
Alpha-7	HPV18	B	B3	EF202152	Af; Af2
Alpha-7	HPV18	C	C1	KC470229	Af

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

Filogenetska je prvo obuhvatala poravnavanje setova sekvenci sa ciljem da broj neuparenih mesta u ispitivanim sekvencama bude što manji, primenom CLUSTAL W

algoritma u okviru MEGA 5.1 (engl. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) softverskog paketa. MEGA program je bionformatički alat koji pored programa za poravnanje sekvenci *Clustal W* (Larkin i sar., 2007), sadrži programe za konstruisanje filogenetskih stabala, pretragu baze podataka (PubMed, BLAST), procenu stope mutacija, testiranje evolutivnih hipoteza i određivanje genetičkih distanci.

Algoritam maksimalne verovatnoće (engl. Maximum likelihood) i algoritam pridruživanja taksona (engl. Neighbor joining) u programu MEGA upotrebljeni su za procenu evolutivne srodnosti sekvenci, određivanje njihove evolutivne udaljenosti i konstrukciju filogenetskih stabala. Butstrep analiza (engl. bootstrep) je urađena u većem broju ponavljanja (100-1000) u cilju provere stabilnosti i izračunavanja statističke podrške topologiji stabla. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0. MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Baze podataka

U cilju definisanja filogenetskih odnose HPV izolata iz Srbije u odnosu na HPV izolate iz Evrope i ostalih geografskih područja, u radu su korišćene sekvence navedene u NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka. NCBI predstavlja skup nukleotidnih i proteinskih sekvenci iz nekoliko izvora, uključujući GenBank, RefSeq (eng. *Reference Sequence Database*). Sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za potrebe ovog istraživanja su prikazane u tabeli 4.2.

4.2.5. PCR-RFLP metoda

Radi određivanja heterogenosti unutar HPV tipa 51, izvršena je molekularna karakterizacija 11 odabranih HPV DNK pozitivnih izolata na nivou E1, L1 i L2 gena (tabela 4.3). Za potrebe istraživanja, prajmeri koji umnožavaju odabrane regione, dizajnirani su na osnovu referentnog soja tipa 51 za sva tri gena, a za L1 i L2 gene uključene su i sekvence koje su u tom trenutku bile dostupne u GenBank bazi podataka sojevi (13UK27; 13UK25; 13UK22; 13UK21; 13UK20; 13UK18; 13UK17; 13UK13; 13UK09; 13UK04; 13UK03;13UK02; 13UK00; 13IT152T0; 13IT138T6; 13IT097T0; 13IT063T0; 13IT061T0; 13IT053T0; 13IT013T0; 13IT005T0 i Ma).

Reakciona smeša za PCR reakciju sastojala se od: 12,5 μ l AmpliTaq Gold 360 Master Mix (*Applied Biosystems*), 1 μ mol „forward“ (fw) i 1 μ mol „reverse“ (rev) prajmera, 5 μ l DNK matrice (50-100 ng) i sterilne vode bez nukleaza, koja je dodata do ukupne zapremine PCR reakcije 25 μ l. PCR reakcija se odvijala po sledećim uslovima: 1) inicijalna denaturacija DNK 9 min na 95°C; 2) replikacioni ciklus se ponavljao se 35 puta i obuhvatao je: 30 s denaturacije na 95°C; 30s za vezivanje prajmera na 53-55°C; 60s polimerizacije DNK lanca na 72°C; 3) završna ekstenzija 7 min na 72°C; 4) završetak reakcije na 4°C. Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

Tabela 4.3. Oligonukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje L1, L2 i E1 gena HPV tipa 51

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina ampikona (bp)
L2	F-HPV51_L2	5' TGATTGATACAGGGTTTGGAGC 3'	900
	R-HPV51_L2	5' GTTTGGCTGAAGAGGAAGAGGA 3'	
E1	F-HPV51_E1	5' ATGGCGTTTACAGAACAGT3'	552
	R-HV51_E1	5' GTTGC GTTTGTCGTGTAATCCA3'	
L1	F-HPV51_L1	5' ATAGGTTGGTGTGGGGTTGTG 3'	1213
	R-HPV51_L1	5' CGTTTGGCTGAAGAGGAAGA 3'	

Dobijeni PCR produkti su zatim izloženi delovanju restrikcionih enzima. Reakcija je vršena u zapremini od 20 μ L primenom FastDigest enzima (*ThermoFisher Scientific, Litvanija*), a sastojala se od PCR produkta, FastDigest pufera i 0.5 U enzima, prema preporuci proizvođača. Ova mešavina inkubirana je u termobloku 20 min na 37°C. Uzorak, kao i DNK marker dodati su na prethodno pripremljeni 2% agarozni gel sa etidijum bromidom. Fragmenti su razdvojeni u električnom polju i fotografisani.

Za potrebe ovog istraživanja korišćeno je 4 restrikciona enzima: Dral, TaqI, Acil I i PstI. Pozicije za restrikcionu digestiju prikazane su u tabeli 4.4.

Na osnovu dobijenih produkata in silico i produkata dobijenih u ovom radu, konstruisan je kladogram, primenom matriksa sličnosti (Neighbor-joining) i Jaccard-ovog koeficijenta.

Tabela 4.4. Karakteristike restrikcioni enzima korišćenih za RFLP PCR produkata

Naziv enzima	Izošizomeri	Restrikciono mesto (5' → 3')
DraI	AhaIII	TTT [^] AAA
Taq I	Taq ^α I, TthHB8I	T [^] CGA
PstI	BspMAI	CTGCA [^] G

4.3. STATISTIČKA ANALIZA

Za svaku promenljivu izračunati su osnovni opisni statistički pokazatelji. Oni uključuju: aritmetičku sredinu, minimalnu i maksimalnu vrednost i sledeće mere varijabilnosti: standardnu devijaciju, koeficijent varijabilnosti i standardnu grešku.

Efekat ispitivanih izvora variranja ispitan je analizom varijanse, a značaj razlika među tretmanima testom najmanjih značajnih razlika. U cilju dobijanja normalne distribucije frekvencija podaci koji opisuju učešće u populaciji su transformisani arcsin transformacijom. Poređenje distribucije frekvencija pojedinih kategorija atributivnih obeležja između pojedinih grupa ispitanika vršeno je χ^2 testom (*Chi square test*).

Za procenu značaja ispitivanih faktora rizika korišćene su univarijantna i multivarijantna logistička regresija, a rezultati su predstavljeni kao odnos rizika (OR engl. *odds ratio*) i 95% interval poverenja CI (engl. *confidence interval*, 95% CI).

Kao prag statističke značajnosti u zaključivanju korišćen je dozvoljeni nivo greške procene manji od 5% ($p < 0.05$)

Za upisivanje, rangiranje, grupisanje, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2003 programskog paketa. U obradi podataka korišteni su statistički programi StatView i Statistica 12 (*StatSoft, Inc. 2013*).

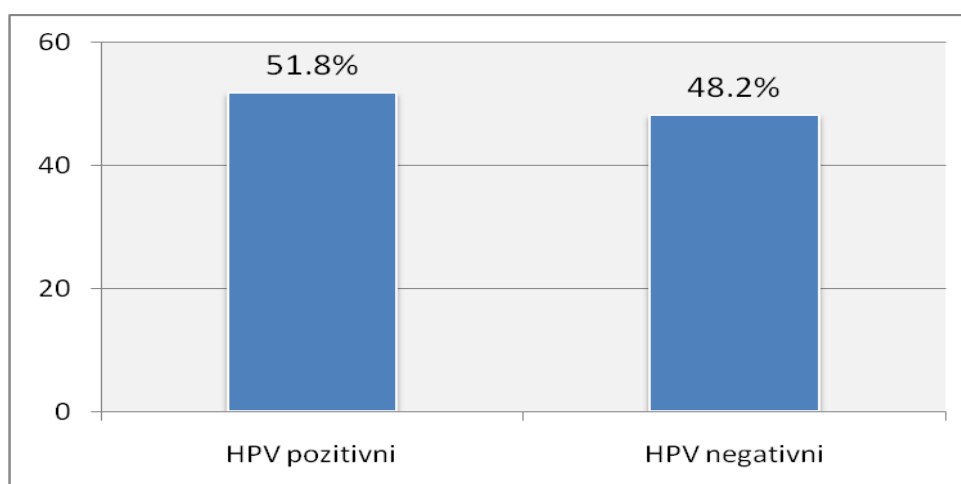
5.0. Rezultati

5.1 Opšte karakteristike ispitivane populacije

U periodu od 1. januara 2014. godine do 01. novembra 2015. godine, ispitano je prisustvo HPV infekcije na grliću materice kod 564 žena različite životne dobi (od 18 do 69 godina) sa područja Južnobačkog okruga, AP Vojvodine. Prosečna starost ispitivanih žena je bila 35,8 godine (95% CI: 34,61- 3619)(SD=9,589). Ispitivani uzorak je činilo: 55 (9,8%) mladih žena do 25 godina; 102(18,1%) žena starosti od 25 do 29 godina; 135 (24%) od 30 do 34 godine; 94(16,6%) od 35 do 39 godina; 76(13,4%) od 40 do 44 godine; 48(8,5%) od 45 do 50 godina i 54(9,6%) žena starijih od 50 godina.

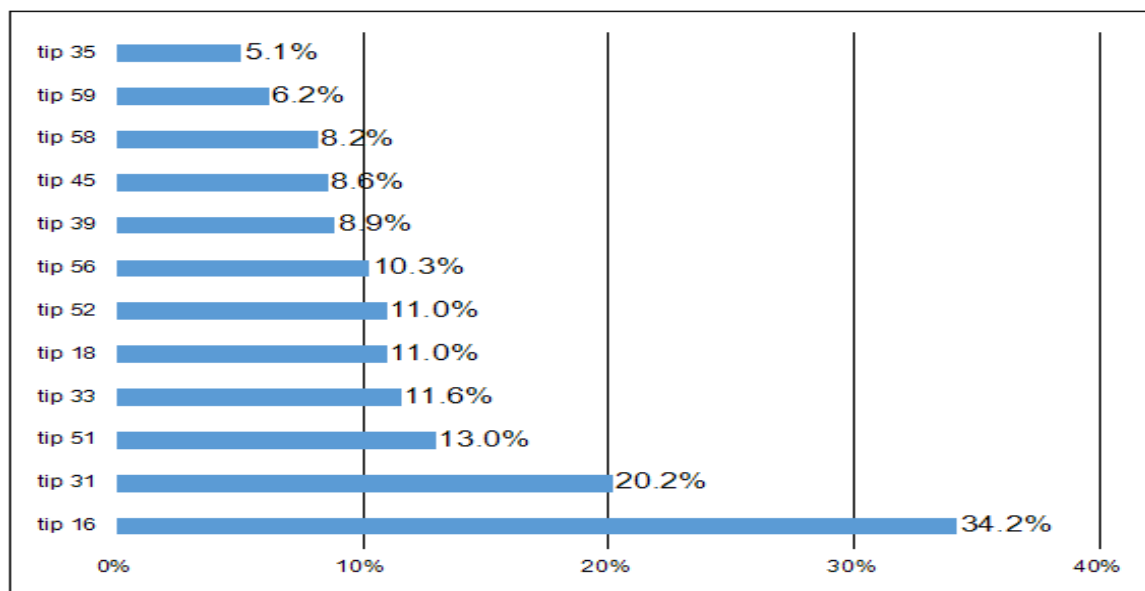
5.2. Distribucija HPV genotipova

U uzoraku od 564 endocervikalnih briseva, primenom dijagnostičkog kita *HPV High Risk Typing Real-TM (Sacace Biotechnologies, Italy)* izvršeno je otkrivanje i genotipizacija 12 visoko-rizičnih tipova HPV. U procesu PCR amplifikacije, kao targetni region, korišćen je virusni E7 gen. Svi testirani uzorci su bili pozitivni na β -globin gen, što ukazuje na prisustvo adekvatnog broja epitelnih ćelija u uzorcima. HPV DNK pozitivan rezultat nađen je kod 292/564 (51,8%) ispitivanih žena (grafikon 5.1).

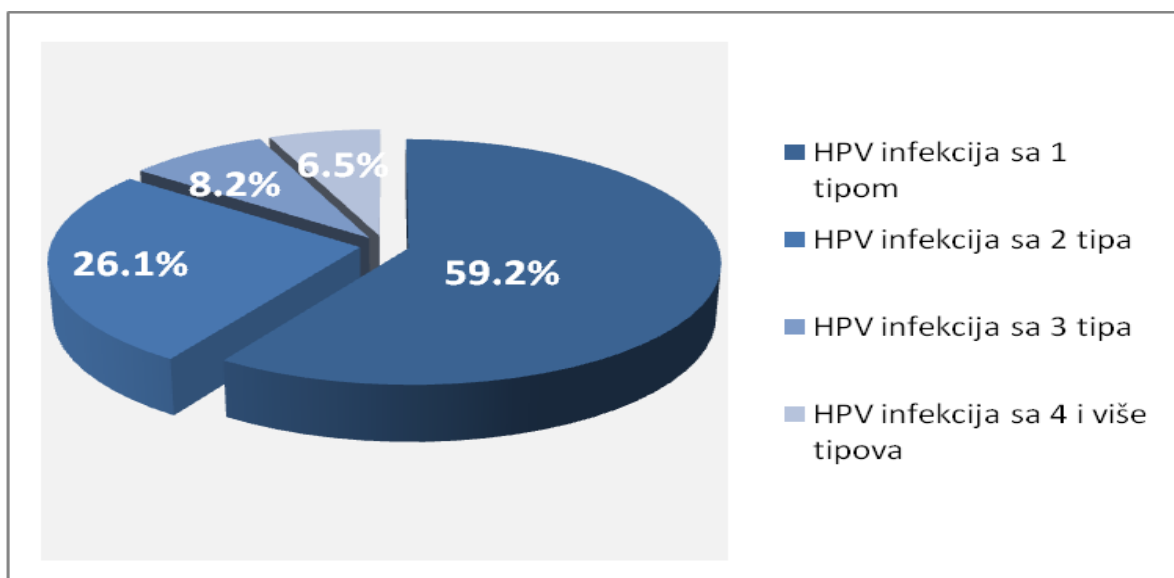


Grafikon 5.1. Zastupljenost HPV infekcije u ispitivanom uzorku žena Južno bačkog okruga, AP Vojvodine (n=564)

Među HPV DNK pozitivnim ženama (n=292), rezultati genotipizacije pokazali su sledeću distribuciju HPV tipova: 34,2% HPV 16; 20,2% HPV 31; 13% HPV 51; 11,6% HPV 33; 11,0% HPV 18; 11,0 % HPV 52; 10,3% HPV 56; 8,9% HPV 39; 8,6% HPV 45; 8,2% HPV 58; 6,2% HPV 59; 5,1% HPV 35 (grafikon 5.2).



Grafikon 5.2. Distribucija 12 visokorizičnih tipova HPV među pozitivnim ženama Južnobačkog okruga, AP Vojvodine (n=292)



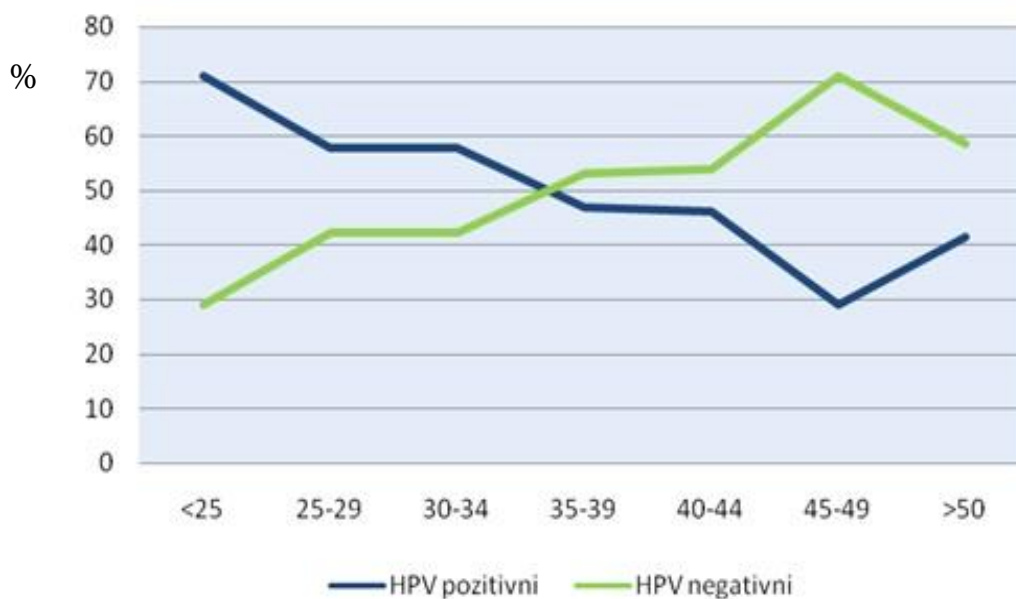
Grafikon 5.3. Zastupljenost pojedinačnih i višestrukih infekcija HPV među HPV DNK pozitivnim ženama (n=292)

U ispitivanom uzorku žena Južnobačkog okruga, 119/292 (40,8%) ispitanica je imalo mešovitu infekciju HPV infekciju, dok je infekcija sa jednim HPV tipom utvrđena kod 173/292 (59,2%) HPV pozitivnih žena; infekciju sa dva tipa je imalo 76/292 (26,1%); sa tri tipa 24/292 (8,2%), dok je infekciju sa četiri i više tipova imalo 19/292(6,5%) ispitanica (grafikon 5.3).

5.2.1. Distribucija visokorizičnih tipova HPV u odnosu na starost

Stopa rasprostranjenosti HPV infekcije među ženama različite životne dobi prikazana je na grafikonu 5.4.

U grupi mladih žena do 25 godina zastupljenost HPV infekcije je iznosila 39/55 (70,9%); kod žena starosti od 25 do 29 godina 59/102 (57,8%); od 30 do 34 godina 78/135 (57,7%); od 35 do 39 godina 45/94 (47,8%); od 40 do 44godine 35/76 (46%); od 45 do 50 godina 14/48(29,1%) i kod žena starijih od 50 godina 22/54 (40,7%).



Grafikon 5.4. Distribucija visokorizičnih tipova HPV u odnosu na starost

Radi procene povezanosti dijagnoze i starosne dobi sa prisustvom ispitivanih HPV genotipova primenjena je dvofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA). Statistička značajnost razlike u prisustvu svakog pojedinačnog HPV genotipa kod ispitivanih starosnih grupa (do 30 godina; 30-39; 40-49; 50 i više) proverena je NZR testom (tabela 5.1). Prema prezentovanim rezultatima analize varijanse, kod šest ispitivanih HPV tipova: 16, 18, 31, 51, 52 i 56 je potvrđena statistički značajna veza dijagnoze i prisustva navedenih tipova. Takođe, utvrđeno je da je variranje prisustva barem jednog tipa virusa u značajnoj vezi sa pripadnošću starosnim grupama i postavljenom dijagnozom. Samo se prisustvo tipova 51 i 56 značajno razlikovalo između ispitivanim starosnim grupama, a interakcija starosna dob × dijagnoza je bila značajna samo za HPV tip 56.

Tabela 5.1. Rezultati analize varijanse za prisustvo HPV tipova prema citološkoj dijagnozi i starosnoj dobi u ispitivanom uzorku žena Južnobačkog okruga

HPV tip	F-test		
	Starost	Citološka dijagnoza	Interakcija starost x dijagnoza
16	0,495	4,296 **	1,009
18	2,683	3,104 *	0,456
31	1,620	4,292 **	1,031
33	1,184	0,907	0,987
35	0,753	0,744	0,381
39	1,183	0,195	0,374
45	0,490	0,910	1,630
51	3,051 *	5,368 **	2,050
52	1,390	3,554 *	0,494
56	8,949 **	7,311 **	6,996 **
58	1,676	0,533	0,584
59	1,606	2,146	1,906
Total	3,350 *	34,913 **	0,624

* F-test značajan na nivou $\alpha=0,05$; ** F-test značajan na nivou $\alpha=0,01$

Statistička značajnost svakog pojedinačnog HPV genotipa u odnosu na određenu starosnu grupu (do 30 godina; 30-39; 40-49; 50 i više) proverena je NZR testom. U grupi mladih žena do 30 godina, najprevalentniji su: HPV 16 (19,94%), HPV 51 (12,29%), i HPV 31 (8,16%). U starosnoj grupi žena od 31-40 godina dominiraju: HPV 16 (25,51%); HPV 31

(7,16%) i HPV 33 (6,21%). U grupi žena od 41-50 godina najčešći su HPV 16 (17,66%), HPV 31 (2,84%) i HPV 56 (2,38%), dok su u grupi žena od 50 godina i više najzastupljeniji: HPV 16 (5,31%), HPV 33 (3,05%), HPV 39 (3,19%) i HPV 56 (3,58%) (tabela 5.2).

Tabla 5.2. Rezultati NZR testa za prisustvo individualnih HPV tipova u odnosu na starost ispitanica

Starost/ HPV tip	< 30	31-40	41-50	>50
16	19,94 ^{ab*)}	25,51 ^a	17,66 ^{ab}	5,31 ^b
18	7,04 ^a	1,38 ^b	0,21 ^b	0,15 ^b
31	8,16 ^a	7,16 ^a	2,84 ^a	1,42 ^a
33	2,30 ^a	6,21 ^a	0,88 ^a	3,05 ^a
35	0,18 ^a	0,35 ^a	0,63 ^a	2,60 ^a
39	0,00 ^b	0,87 ^{ab}	1,61 ^{ab}	3,19 ^a
45	4,71 ^a	2,21 ^a	1,17 ^a	0,95 ^a
51	12,29 ^a	0,91 ^b	0,81 ^b	2,20 ^b
52	5,99 ^a	1,70 ^{ab}	0,65 ^b	0,18 ^b
56	7,13 ^a	0,29 ^b	2,38 ^{ab}	3,58 ^{ab}
58	1,93 ^{ab}	2,16 ^a	0,07 ^b	0,18 ^{ab}
59	1,57 ^a	0,81 ^a	0,16 ^a	1,20 ^a
Total	64,35^a	52,25^{ab}	37,5^{bc}	41,5^c

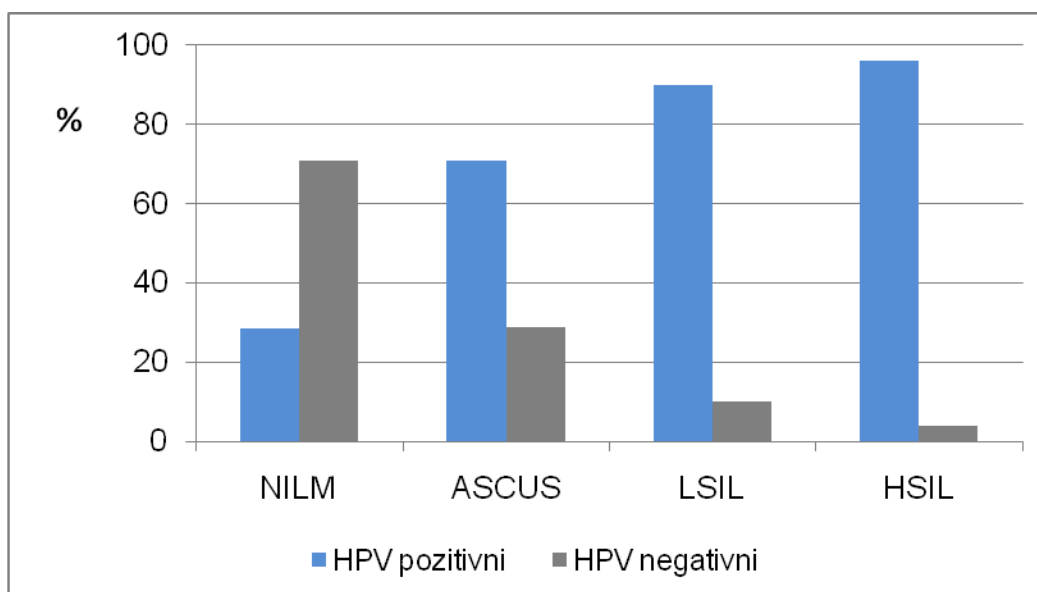
*) vrednosti tretmana koje imaju isto slovo pored sebe pripadaju istoj homogenoj grupi nivou značajnosti od $\alpha=0,05$

5.2.2. Distribucija visokorizičnih HPV tipova u odnosu na citološki nalaz

Ispitivani uzorak je obuhvatio: 297(52,7%) žena sa normalnim citološkim rezultatom (NILM-negativan za intraepitelijalnu leziju ili malignitet), 188(33,3%) sa ASCUS (Atipične skvamozne ćelije nedeterminisanog značaja), 54(9,3%) LSIL (nisko stepena intraepitelijalna lezija) i 25(4,4%) HSIL (visoko stepena intraepitelijalna lezija).

Stopa rasprostranjenosti infekcije HPV među ženama sa različitom citološkom dijagnozom je prikazana na grafikonu 5.5. Zastupljenosti HPV infekcije raste sa težinom citološke promene, kod žena sa normalnom citologijom zastupljenost HPV infekcije je

iznosila 28,6%; kod žena sa ASCUS citologijom 71,2% ; LSIL 90,7% i HSIL citologijom 96%. Dobijene razlike su statistički značajne ($\chi^2=31,197$; $p<0.001$).



Grafikon 5.5. Distribucija visokorizičnih HPV u odnosu na citološki nalaz

Oznake citoloških nalaza: **NILM**-negativan za intraepitelijalnu leziju ili malignitet; **ASCUS**-Atipične skvamozne ćelije nedeterminisanog značaja; **LSIL**-nisko stepena intraepitelijalna lezija; **HSIL**-visoko stepena intraepitelijalna lezija;

NZR testom su ispitane razlike u prisustvu posmatranog HPV genotipa između citoloških dijagnoza (tabela 5.3). U grupi žena sa normalnim citološkim nalazom, najprevalentniji su: HPV 16 (2,41%), HPV 31 (3,23%) i HPV 51 (1,28%). Među ženama sa nejasnom citologijom tipa ASCUS, najzastupljeniji su HPV 16 (11,35%) i HPV 31 (11,97%), a u nešto manjem procentu se mogu naći: HPV 52, HPV 33 i HPV 18. U grupi žena sa nisko stepenim intraepitelijalnim lezijama (LSIL) najčešći su HPV 16 (31,50%), HPV 51 (7,95%) i HPV 45 (5,62%), dok su u grupi žena sa visoko stepenim intraepitelijalnim lezijama (HSIL) najprisutniji: HPV 16 (53,59%) i HPV 33 (10,33%).

Tabla 5.3. Rezultati NZR testa za prisustvo ispitivanih HPV tipova u odnosu na citološku dijagnozu

Citološka dijagnoza/ HPV tip	NILM ²⁾	ASCUS	LSIL	HSIL
16	2,41 ^{c 1)}	11,35 ^{bc}	31,50 ^{ab}	53,59 ^a
18	0,69 ^{bc}	4,16 ^a	2,07 ^{ab}	0,00 ^c
31	3,23 ^b	11,97 ^a	4,62 ^{ab}	0,43 ^b
33	0,61 ^b	4,57 ^{ab}	0,95 ^b	10,33 ^a
35	0,05 ^a	0,43 ^a	1,86 ^a	1,93 ^a
39	0,61 ^a	0,96 ^a	1,57 ^a	2,55 ^a
45	0,54 ^b	2,39 ^{ab}	5,62 ^a	1,36 ^{ab}
51	1,28 ^b	3,44 ^{ab}	7,95 ^a	0,26 ^b
52	0,70 ^b	5,49 ^a	2,10 ^{ab}	0,00 ^b
56	0,55 ^b	1,70 ^{ab}	5,22 ^a	5,65 ^a
58	0,44 ^a	1,58 ^a	1,00 ^a	0,43 ^a
59	0,41 ^a	1,46 ^a	0,15 ^a	1,70 ^a
Total	28,6 ^c	71,2 ^b	90,7 ^a	96,0 ^a

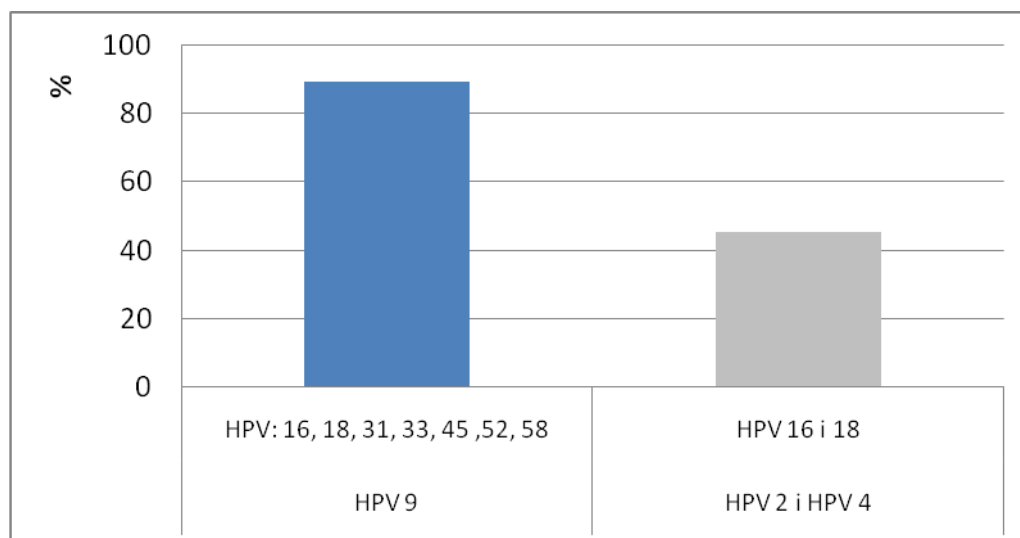
1) Vrednosti tretmana koje imaju isto slovo pored sebe pripadaju istoj homogenoj grupi na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$

2) Oznake citoloških nalaza: **NILM**-negativan za intraepitelijalnu leziju ili malignitet; **ASCUS**-Atipične skvamozne ćelije nedeterminisanog značaja; **LSIL**-nisko stepena intraepitelijalna lezija; **HSIL**-visoko stepena intraepitelijalna lezija;

5.2.3. Distribucija visokorizičnih HPV tipova u odnosu na zastupljenost u profilaktičkim vakcinama

Na grafikonu 5.6. prikazana je zastupljenost onkogenih tipova HPV koji cirkulišu na području Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, a sadržani su u preporučenim profilaktičkim vakcinama: bivalentnoj (HPV2), kvadrivalentnoj (HPV4) i devetovalentnoj (HPV9).

U uzorku od 564 nevakcinisanih žena, HPV tipovi: 16 i 18 su dijagnostikovani kod 127/292 (45,5%), a HPV tipovi: 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 kod 261/292 (89,3%) HPV DNK pozitivnih žena.



Grafikon 5.6. Distribucija onkogenih tipova HPV koji su u sastavu preporučenih profilaktičkih vakcina u nevakcinisanih žena Južnobačkog okruga

5.3. UTICAJ KOFAKTORA NA STICANJE I PERZISTIRANJE HPV INFEKCIJE

Prevalenca HPV infekcije po demografskim karakteristikama

Za identifikaciju faktora rizika korišćena je binarna logistička regresija, a rezultati predstavljeni kao Odds Ratio (OR; *unakrsni odnos*) uz 95% CI (*95% interval poverenja*) i *p*-vrednost. U prvom koraku, svi parametri su analizirani u univarijantnom modelu, a statistički značajni faktori zatim su uključeni u multivarijantnu analizu.

Tabela 5.4. prikazuje prevalencu HPV infekcije u odnosu na sociodemografska obeležja ispitivane populacije. Ispitivane varijable su uključile: starost, bračni status, nivo obrazovanja, broj porođaja i broj prekinutih trudnoća. Među anketiranim ženama u bračnoj zajednici je 56,7% žena, neudatih je 29%, razvedeno je 11% i 1,1% je udovica. U pogledu obrazovne strukture, polovina ispitanica (52,3%) ima srednjoškolsko obrazovanje. Visoku stručnu spremu ima 43%, dok je sa osmogodišnjom obrazovanjem 4,7% žena. Jedan porođaj je imalo 26% žena obuhvaćenih istraživanjem; dva porođaja je imalo 35%; tri i više porođaja 6%; dok 33% žena nije rađalo. Kada su u pitanju prekidi trudnoće (spontani i namerni) do momenta istraživanja, jedan prekid je imalo 19%; dva je imalo 12,3%; dok je tri i više prekida imalo 7,3% žena, a 61,3% ispitanica nije imalo prekid trudnoće.

Univarijantna analiza sociodemografskih karakteristika je pokazala statističku značajnost za parametare koji se odnose na: životnu dob, bračni status i broj porođaja. Životna dob predstavlja varijablu koja je povezana sa HPV pozitivnim rezultatom. U poređenju sa ženama starijim od 50 godina, mlade žene do 25 godina imaju 3,4 (95% CI:1,546-7,630) puta veći rizik za sticanje HPV infekcije, a žene od 30-34 godine 1,928 (95% CI:1,012–3,673). Među ženama koje se nalaze u bračnoj zajednici, rizik za sticanje HPV infekcije je upola (0,547 (95% CI:0,376-0,795) manji u poređenju sa neudatim ženama. Ispitanice koje su imale jedan (OR=0,654) ili dva porođaja (OR=0,489) imaju manju verovatnoću pozitivnog HPV rezultata u odnosu na one koje nisu rađale.

Tabela 5.4. Povezanost demografskih karakteristika sa HPV infekcijom

Demografske karakteristike	HPV negativni (N=272)		HPV pozitivni (N=292)		Univarijantni Odds Ratio CI 95%	p
	n	%	n	%		
Starost (godine)						
<25	16	29,1%	39	70,9%	3,435 (1,546-7,630)	0,002**
25-29	43	42,2%	59	57,8%	1,933 (0,986 – 3,790)	0,055
30-34	57	42,2%	78	57,8%	1,928 (1,012 – 3,673)	0,046*
35-39	49	52,2%	45	46,8%	1,240 (0,628 – 2,448)	0,535
40-44	41	53,9%	35	46,1%	1,203 (0,592 – 2,443)	0,609
45-49	34	70,8%	14	29,2%	0,580 (0,253 – 1,328)	0,198
>50	32	59,3%	22	40,7%	referentna vrednost	
Bračni status						
neudate	68	70,9%	109	61,6%	referentna vrednost	
udate	170	57,8%	149	46,7%	0,547 (0,376-0,795)	0,002*
razvedene	30	57,8%	32	51,6%	0,665 (0,371-1,192)	0,171
Udovice	4	46,8%	2	33,3%	0,312 (0,056-1,749)	0,185
Nivo obrazovanja						
osnovna škola	13	44,8%	16	55,2%	1,266 (0,581-2,759)	0,553
SSS	150	46,9%	170	53,1%	1,165 (0,825-1,647)	0,386
VSS	109	50,7%	106	49,3%	referentna vrednost	
Broj porođaja						
nisu rađale	88	38,3%	142	61,7%	referentna vrednost	
jedan porođaj	72	48,6%	76	51,4%	0,654 (0,431-0,993)	0,047*
dva porođaja	101	60,8%	65	39,2%	0,399 (0,265-0,601)	0,000*
tri i više porođaja	11	55,0%	9	45,0%	0,507 (0,202-1,273)	0,148
Broj prekida trudnoće						
nisu imale abortus	174	47,4%	193	52,6%	referentna vrednost	
jedan prekid	55	48,7%	58	51,3%	0,951 (0,623-1,450)	0,814
dva prekida	21	42,9%	28	57,1%	1,202 (0,659-2,194)	0,549
tri i više prekida	22	62,9%	13	37,1%	0,533 (0,260-1,090)	0,085

OR (Odds ratio); CI (95% interval poverenja); * p-statistički signifikantno; ** p-statistički veoma signifikantno

Kada su u pitanju ponašanja rizična za seksualno i reproduktivno zdravlje, u univarijantnom modelu analizirane su sledeće varijable: upotreba kondoma pri svakom seksualnom odnosu, broj seksualnih partnera (u poslednje dve godine, pušenje cigareta, konzumiranje alkohola, upotreba oralnih kontraceptivnih sredstava i prisustvo ostalih SPI (seksualno prenosivih infekcija). Rezultati analize prikazani su u tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Povezanost ponašanja rizičnih po seksualno i reproduktivno zdravlje sa HPV infekcijom

Reproduktivno zdravlje	HPV negativni (N=272)		HPV pozitivni (N=292)		Univarijantni Odds Ratio CI 95%	p
	n	%	n	%		
Upotreba prezervativa						
Ne	204	75,0%	225	77,1%	referentna vrednost	
Da	68	25,0%	67	22,9%	0,893 (0,607-1,315)	0,568
Cigarete						
Ne	197	72,4%	198	67,8%	referentna vrednost	
Da	75	27,6%	94	32,2%	1,247 (0,868-1,791)	0,232
Alkohol						
Ne	257	94,8%	261	90,0%	referentna vrednost	
Da	14	5,2%	29	10,0%	2,040 (1,053-3,949)	0,034*
Godine stupanja u sex odnos						
<18	78	28,7%	98	33,6%	1,256 (0,878-1,797)	0,211
≥18	194	71,3%	194	66,4%	referentna vrednost	
Broj sex partnera u poslednje 2 god						
jedan	218	83,2%	191	67,0%	referentna vrednost	
dva	28	10,7%	49	17,2%	1,997 (1,207-3,304)	0,007* *
tri i vise	16	6,1%	45	15,8%	3,210 (1,757-5,865)	0,000* *
Upotreba oralnih kontraceptiva						
Ne	214	78,7%	236	80,8%	1,142 (0,757-1,723)	0,526
Da	58	21,3%	56	19,2%	referentna vrednost	
Bakterijske infekcije						
Ne	248	91,2%	266	91,1%	referentna vrednost	
Da	24	8,8%	26	8,9%	1,010 (0,565-1,806)	0,973

OR (Odds ratio); CI (95% interval poverenja); * p-statistički signifikantno; ** p-statistički veoma signifikantno

Prosečne godine stupanja u seksualni odnos kod ispitanica u ovoj studiji iznosi 18,9 godina. Prosečan broj seksualnih partnera u poslednje dve godine je 1,23. Skoro trećina ispitanica (29,9 %) su sadašnji pušači; prosečan pušački staž iznosi 14,5 godina; pri čemu svakodnevni pušači, na dnevnom nivou, potroše 16 cigareta. Podatak o konzumiranju alkohola dalo je 7,6% ispitanica. Oko 21 % ispitanica je koristilo oralna

kontraceptivna sredstva. Pri svakom seksualnom odnosu kondom je koristilo 23,9 % ispitanica, a 10% je dalo podatak o prisutvu neke od SPI (seksualno prenosivih infekcija). Univarijantnom analizom ispitivanih faktora statistička značajnost je pokazana za parametre koji se odnose na: konzumiranje alkohola i broj seksualnih partnera u posljednje dve godine.

Žene koje konzumiraju alkohol imaju 2,040 (95% CI:1,053-3,949) veći rizika za prisustvo HPV infekcije u odnosu na one koje ne koriste alkohol. U poređenju sa ženama koje su dale podatak da su u poslenje dve godine imale vezu sa jednim parnerom, ispitanice koje su ostvarile vezu sa dva partnera imaju dva puta veći rizik OR=1,997 (95% CI:1,207-3,304) za sticanje i prisustvo HPV infekcije, dok u grupi žena koje su imale tri i više partnera rizik raste na 3,2 puta (95% CI: 1,757-5,865).

Tabela 5.6. prikazuje rezultate univarijantne analize koji se odnose na individualnu brigu o reproduktivnom zdravlju, kao i znanja ispitanica o značaju HPV za ljudsko zdravlje.

Tabela 5.6. Povezanost ponašanja koja se odnose na brigu o reproduktivnom zdravlju sa HPV infekcijom

Znanja o HPV	HPV negativni (N=272)		HPV pozitivni (N=292)		Univarijantni Odds Ratio CI 95%	p
	n	%	n	%		
Redovne ginekološke kontrole						
Da	232	85,3%	233	79,7%	referentna vrednost	
Ne	40	14,7%	59	20,3%	1,475 (0,949-2,292)	0,814
Familijarno opterećenje malignim bolestima						
Ne	208	76,5%	233	79,8%	referentna vrednost	
Da	64	23,5%	59	20,2%	0,823 (0,552-1,228)	0,340
Znanja o HPV						
Ne	210	77,2%	208	71,2%	referentna vrednost	
Da	62	22,8%	84	28,8%	1,368 (0,935-2,000)	0,106
Predhodne analize na HPV						
Ne	215	79,0%	233	79,8%	referentna vrednost	
Da	57	21,0%	59	20,2%	0,955 (0,635-1,437)	0,826

OR (Odds ratio); CI (95% interval poverenja);

Većina žena (82,2%) ide redovno na ginekološke preglede; 8,6% ginekološku kontrolu obavlja svake dve godine; 1,9% jednom u pet godina; dok se 7,3% ispitanica javlja ginekologu samo po pojavi tegoba. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između HPV pozitivnih i HPV negativnih žena u odnosu na redovne ginekološke kontrole, a uočeno je da se na redovne ginekološke kontrole procentualno ređe javljaju HPV

pozitivne žene (20,3%) u odnosu na HPV negativne (14,7%). HPV pozitivane žene su imale veće znanje (28,8%) o značaju humanih papiloma virusa kao uzročniku seksualno prenosivih infekcija u odnosu na HPV negativne ispitanice (22,8%). Analizu na humane papiloma viruse ranije je radilo 20,7% žena i nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na prisustvo HPV infekcije. Familijarno opterećenje malignim bolestima ima 21,8% žena, a statistički značajna razlika između HPV pozitivnih i HPV negativnih ispitanica nije utvrđena.

Multivarijantna analiza

Multivarijantna analiza urađena je korišćenjem logističkog regresionog modela koji sadrži sve varijable koje su pri univarijantnoj analizi pokazale statističku značajnost (tabela 5.7). Najjači prediktor HPV pozitivnosti je broj seksualnih partnera, odnosno, postojanje tri i više seksualnih partnera u poslednje dve godine (OR=2,505). Ispitanice koje su u poslednje dve godine imale tri i više seksualnih partnera imaju 2,5 puta veću šansu za prisustvo HPV infekcije od ispitanica koje su imale jednog partnera.

Tabela 5.7. Model Multivarijantne logističke regresije

Prediktor	OR (95% CI)	p
Broj porođaja		
Nisu rađale	referentna vrednost	
Jedan porođaj	0,859 (0,551-1,340)	0,503
Dva porođaja	0,489 (0,318-0,752)	0,001*
Tri i više porođaja	0,571 (0,217-1,502)	0,256
Alkohol		
Ne	referentna vrednost	
Da	1,843 (0,910-3,375)	0,090
Broj sex partnera u poslednje 2 god		
jedan	referentna vrednost	
dva	1,877 (1,121-3,175)	0,017*
Tri i više	2,505 (1,338-4,692)	0,004**

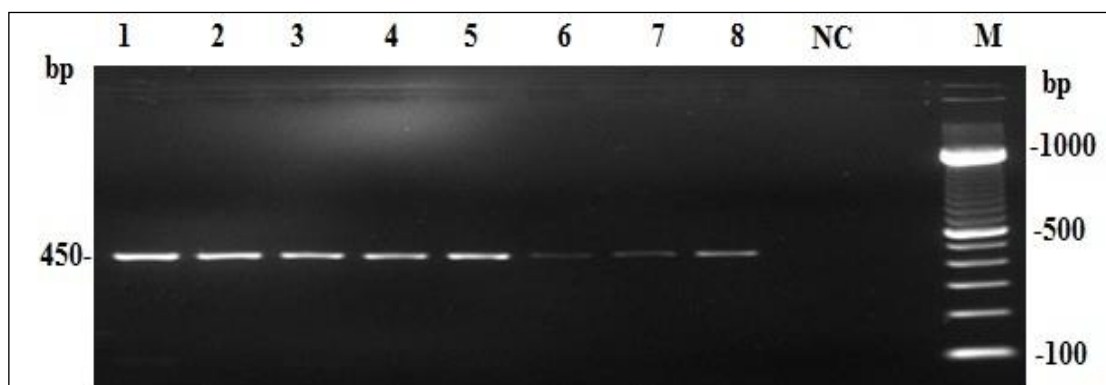
OR (Odds ratio); CI (95% interval poverenja); * p-statistički signifikantno; ** p-statistički veoma signifikantno

One koje su imale dva seksualna partnera (OR=1,877) imaju približno 1,9 puta veću šansu za pozitivni HPV rezultat od ispitanica koje su imale jednog partnera. Ispitanice sa dva porođaja imaju za manju verovatnoću za HPV pozitivnost (OR=0,489) u odnosu na one koje nisu rađale. Konzumiranje alkohola u multivarijantnom modelu nije bio statistički značajan parametar.

5.4. GENOMSKE SEKVENCE HPV IZOLATA

5.4.1. Rezultati analize PCR produkata za L1 gen HPV DNK

Analiza PCR produkata HPV L1 gena izvršena je na osnovu rezultata gel elektroforeze (slika 5.1). Veličina dobijenih PCR produkata određena je poređenjem sa DNK standardom (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific*) koji sadrži smešu DNK fragmenata različite dužine. Izolati u kojima je utvrđeno prisustvo PCR produkata dužine ≈ 450 bp korišćeni su u daljem postupku sekvenciranja.

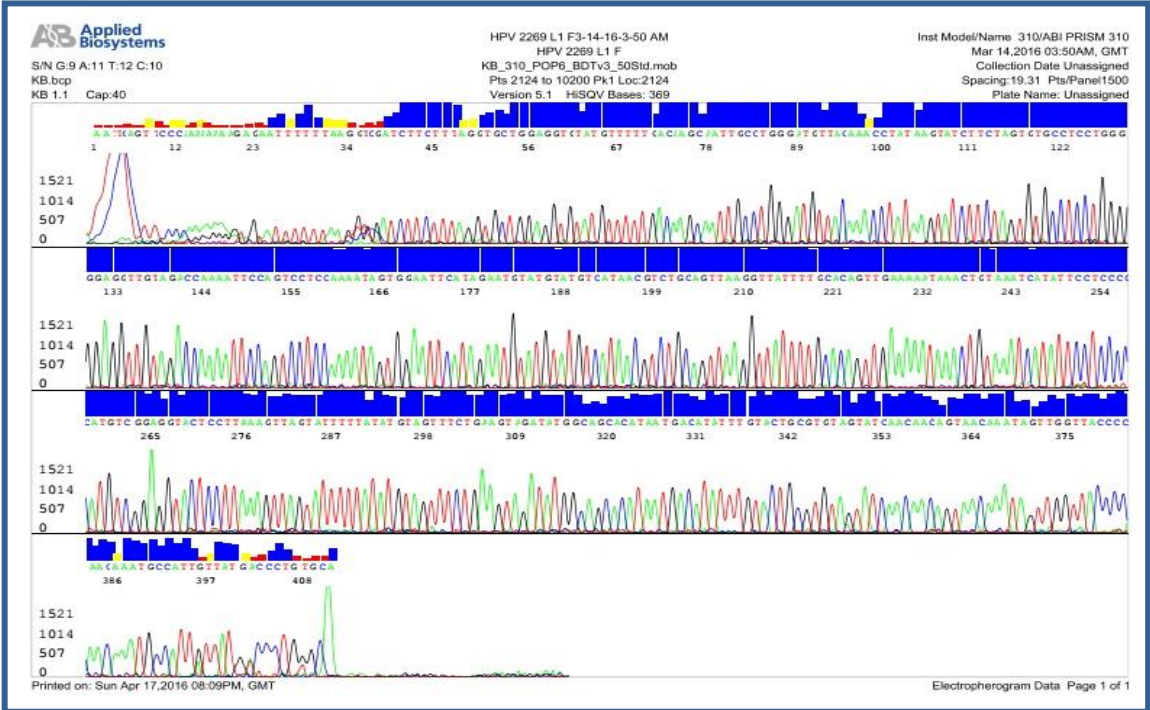


Slika 5.1. Gel elektroforeza za L1 gen HPV PCR. Reprezentativni uzorci: 1-8
NC (Negativna kontrola); (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)

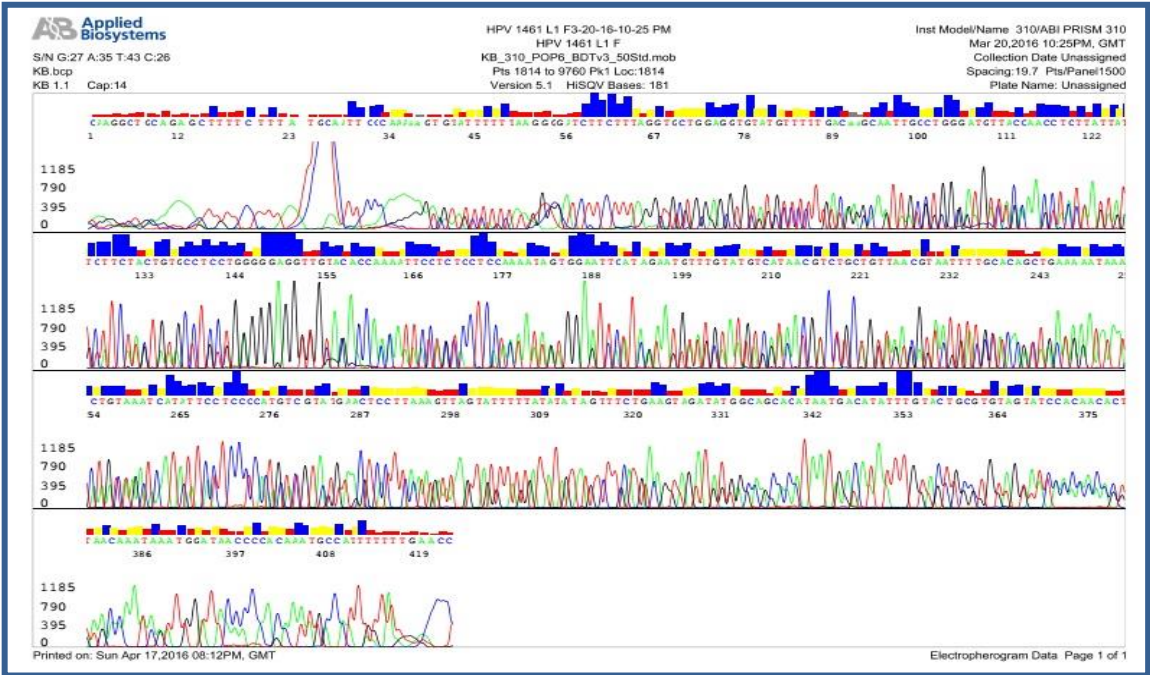
5.4.2. Analiza hromatograma sekvenci L1 HPV DNK

Rezultati sekvenciranja dobijeni su u vidu hromatograma. S obzirom da se hipervarijabilni regioni HPV genotipova na nivou ciljane sekvence L1 gena nalaze se u prve dve trećine 5' kraja sekvence, prisustvo pojedinačnih jasnih pikva u tom regionu

ukazivalo je na infekciju sa jednim HPV tipom (slika 5.2), dok je prisustvo preklopljenih pikova ukazivalo na mešovite infekcije sa dva ili više tipova (slika 5.3).



Slika 5.2. Primer hromatograma koji prikazuje HPV infekciju sa jednim genotipom na osnovu analize L1 gena dužine 450bp



Slika 5.3. Primer hromatograma mešovite HPV infekcije na osnovu analize L1 gena dužine 450 bp

5.4.3. Identifikacija nukleotidnih sekvenci BLAST metodom

U prvom koraku analize izvršeno je međusobno upoređivanje dobijenih sekvenci u 5' i 3' pravcu radi dobijanja kompletne (konsenzus) sekvence (slika 5.4). Upotrebom BLAST programa (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) konsenzus sekvenca je upoređena sa sekvencama odgovarajućeg regiona HPV genoma, dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Identifikacija (slika 5.5 i slika 5.6) je izvršena poređenjem sa poznatim sekvencama na osnovu više od 95% sličnosti.

```

GenBank  Graphics  PopSet
Human papillomavirus type 16 strain SRB236AK L1 protein (L1)
gene, partial cds
AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCAT
TATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAAGGAGTACCTACGACATGG
GGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAAATAACCTTAAGTGCAGACGTTATGACATAC
ATACATTCATGAATCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACAC
TAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAA
AGAAGATCCCCTAAAAAATACACTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGAT
C

```

Slika 5.4. Primer konsenzus sekvence nakon poravnjanja u 5' i 3' pravcu

The screenshot shows the NCBI BLAST web interface. At the top, there are logos for NIH (U.S. National Library of Medicine) and NCBI (National Center for Biotechnology Information). The main heading is "BLAST® >> blastn suite" with "Home" and "Rece" links. Below this is the "Standard Nucleotide BLAST" section. There are tabs for "blastn", "blastp", "blastx", "tblastn", and "tblastx". A sub-header reads "BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...". The "Enter Query Sequence" section contains a text area with the following text: "> L1 HPV 16 izolat 483" followed by the sequence: "AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCAT TATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAAGGAGTACCTACGACATGG GGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAAATAACCTTAAGTGCAGACGTTATGACATAC ATACATTCATGAATCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACAC". To the right of the text area are "Clear" and "Query subrange" options with "From" and "To" input fields. Below the text area is a "Job Title" field containing "L1 HPV 16 izolat 483" and a "Choose File" button. At the bottom, there is a checkbox for "Align two or more sequences".

Slika 5.5. Identifikacija dobijenih sekvenci BLAST programom

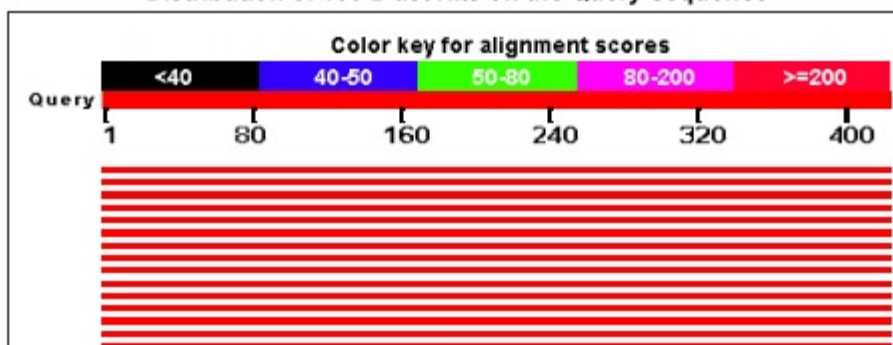
BLAST Results

Nucleotide Sequence (424 letters)

RID [H7VNXWHS01B](#) (Expires on 04-19 04:14 am)
Query ID |Query_142507 **Database Name** nr
Description None **Description** Nucleotide collection (nt)
Molecule type nucleic acid **Program** BLASTN 2.3.1+
Query Length 424

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Range 1: 1039 to 1459 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
778 bits(421)	0.0	421/421(100%)	0/421(0%)	Plus/Plus
Query 1	AATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACA	60		
Sbjct 1039	AATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACA	1098		
Query 61	AATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAACTAACTTT	120		
Sbjct 1099	AATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAACTAACTTT	1158		
Query 121	AAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAA	180		
Sbjct 1159	AAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAA	1218		
Query 181	ATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTGGAG	240		
Sbjct 1219	ATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTGGAG	1278		
Query 241	GACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTT	300		
Sbjct 1279	GACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTT	1338		
Query 301	GTAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCC	360		
Sbjct 1339	GTAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCC	1398		
Query 361	CTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGAT	420		
Sbjct 1399	CTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGAT	1458		
Query 421	C 421			
Sbjct 1459	C 1459			

Slika 5.6 Upoređivanje dobijene sekvence sa sekvencama u genskoj bazi podataka primenom BLAST metode

5.5. FILOGENETSKE ANALIZE

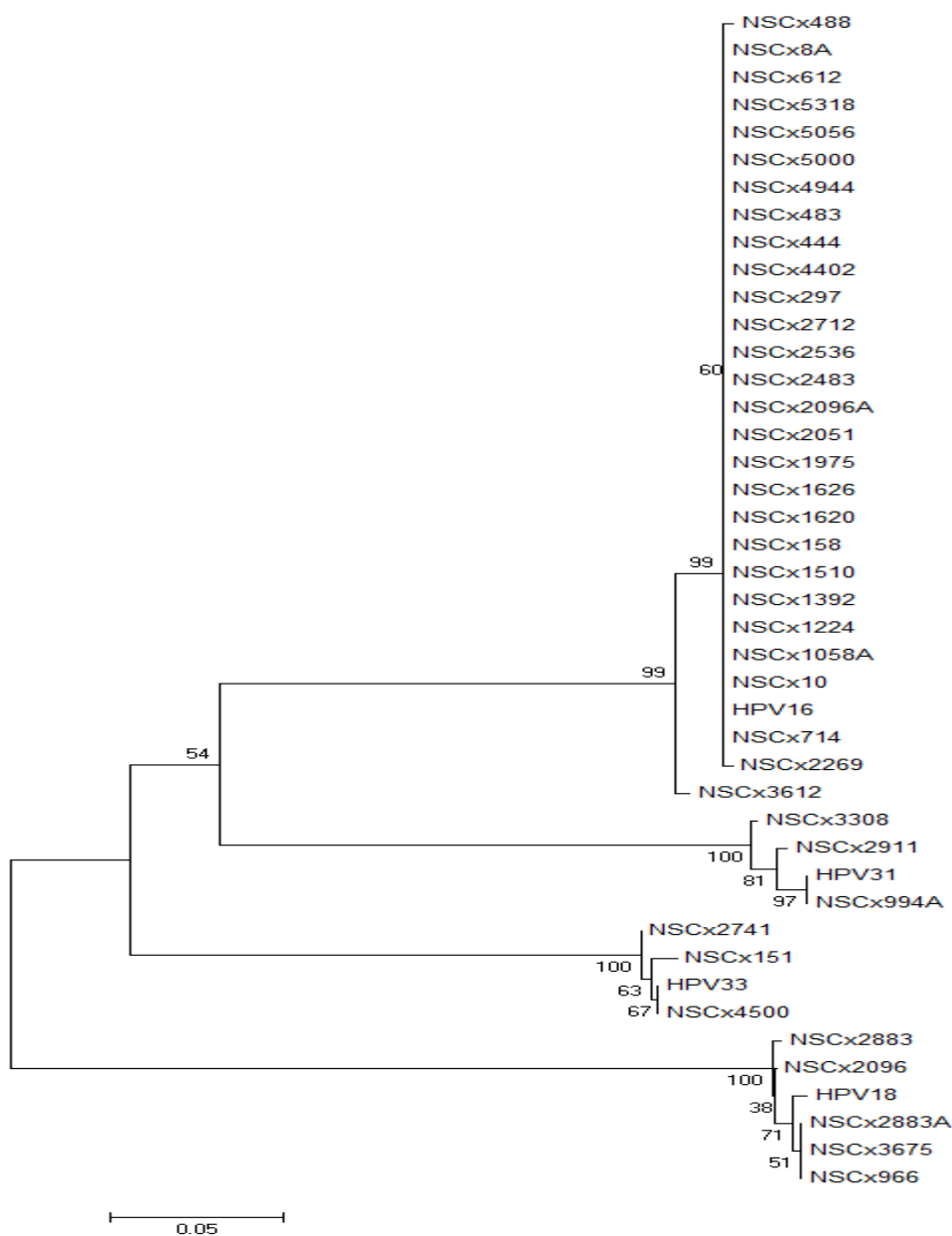
U cilju molekularne karakterizacije najzastupljenijih visoko onkogenih tipova HPV (HPV: 16, 18, 31 i 33) koji cirkulišu na području Južnobačkog okruga AP Vojvodine, u filogenetsku analizu je bilo uključeno 39 nukleotidnih sekvenci. Nukleotidne sekvence dobijene u ovom radu prikazane su u prilogu 1. Sekvence će se deponovati u GenBank bazu podataka. Filogenetska analiza je prvo urađena za sve sekvence, a potom za sekvence svakog pojedinačnog HPV genotipa. Pre konstrukcije filogenetskog stabla izvršena su višestruka poravnanja sekvenci uz pomoć programskog paketa Clustal W. Izvršeno je potpuno poravnanje, dok su za kaznene bodove za otvaranje, zatvaranje i produživanje upotrebljene standardne vrednosti definisane u samom programskom paketu (*Larkin i sar., 2007*).

5.5.1. Izrada filogenetskog stabla

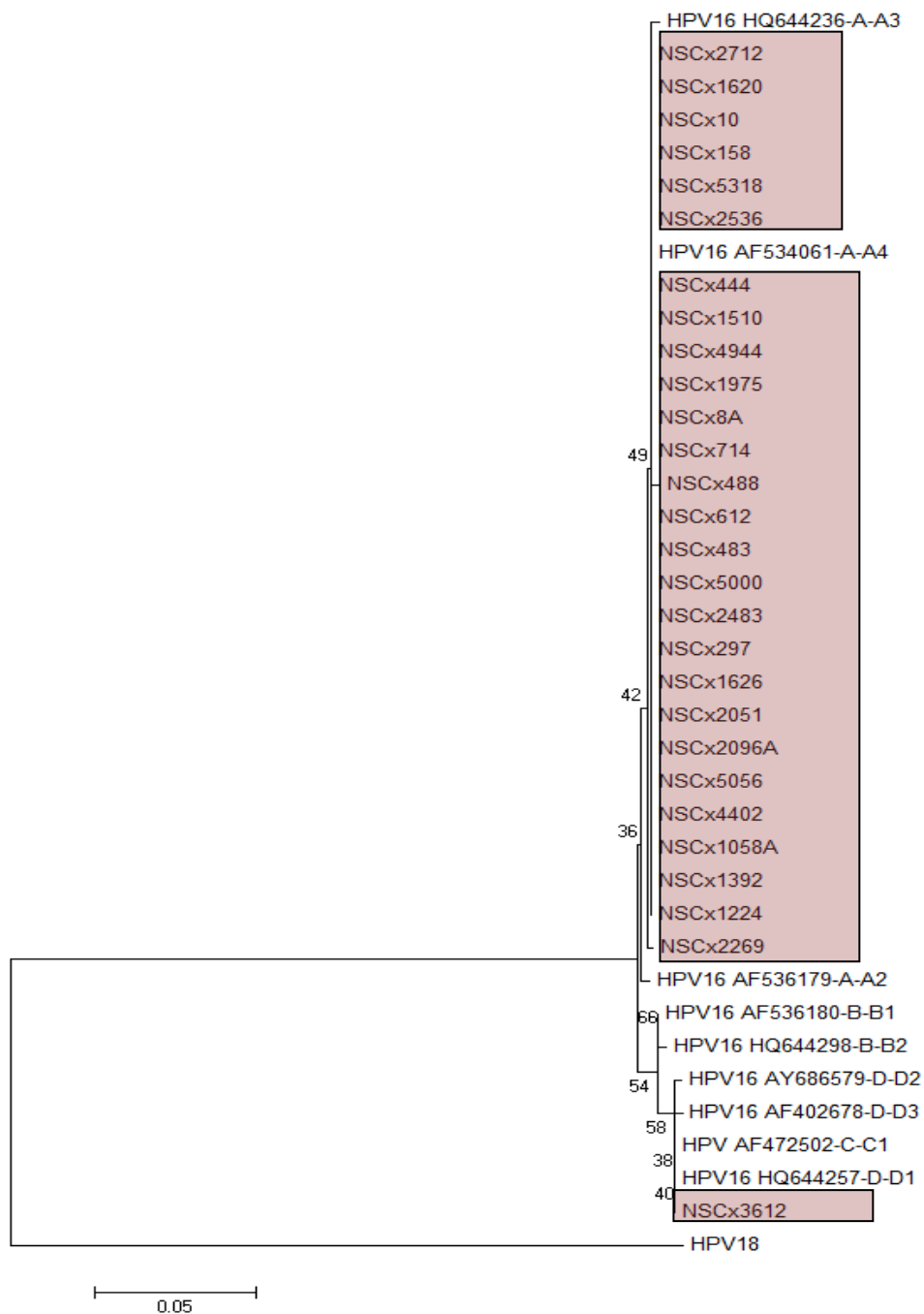
Za vizuelizaciju genetičkih odnosa između i/ili unutar ispitivanih genotipova konstruisani su dendogrami metodom povezivanja suseda (engl. *Neighbour-Joining*, NJ), a kao statistički metod izabrana je metoda najveće sličnosti (engl. *Maximum likelihood*, ML), (Tamura i sar., 2013). Pouzdanost nodusa dendograma određena je metodom pseudoponavljanja (eng. *bootstrap*) na osnovu 1000 permutacija.

Filogenetska analiza 39 HPV izolata poreklom od žena Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, na nivou L1 gena je urađena u odnosu na referentne HPV genotipove (slika 5.7). Filogenetska analiza je pokazala da su svi identifikovani genotipovi, u okviru ovog istraživanja, pripadali rodu *Alphapapillomavirus*. Potvrđeno je da HPV tipovi 16, 31 i 33 pripadaju vrsti 9, a HPV tip 18 vrsti 7.

Filogenetsko stablo za HPV tip 16 je prikazano na slici 5.8. Na dobijenom dendogramu, izdvojena su četiri klastera, koja su identifikovana kao linije A, B, C i D. Najveći procenat 27/28 (96,4%) izolata HPV tipa 16 sa našeg područja je klasifikovano u evropske varijante, odnosno, u liniju A. Pri tome, 6/27 (22,2%) je pripadalo podliniji A3, a 21/27 (77,7%) podliniji A4, dok je jedan izolat 1/28 (3,6%) pripadao ne-evropskim varijantama i svrstan je u liniju D (podlinija D1).

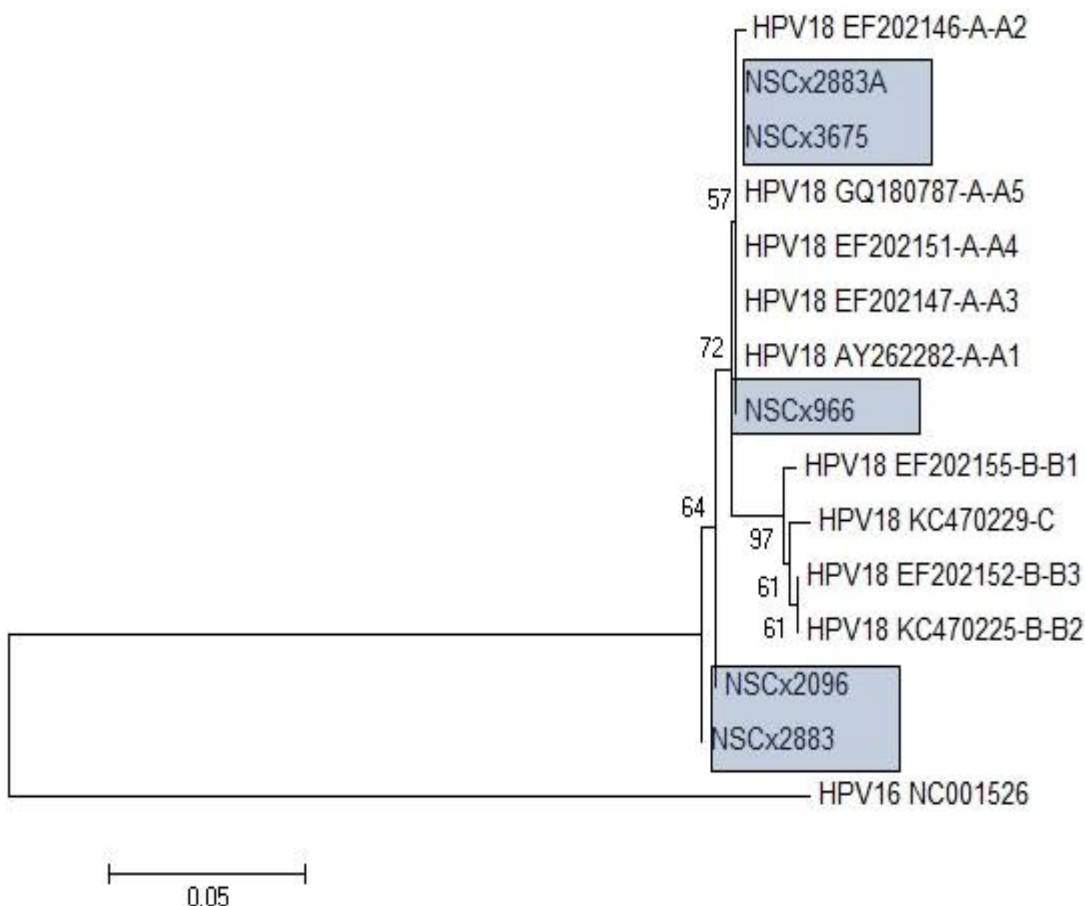


Slika 5.7. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu 39 nukleotidnih sekvenci HPV tipova: 16, 18, 31 i 33, na nivou L1 gena, poreklom iz AP Vojvodine. Stablo je nacrtano korišćenjem MEGA softvera, upotrebom pridruživanja suseda (engl. Neighbor joining), kao statistički metod korišćena je Maximum parsimony metoda. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0, sa bootstrap analizom od 1000 ponavljanja.



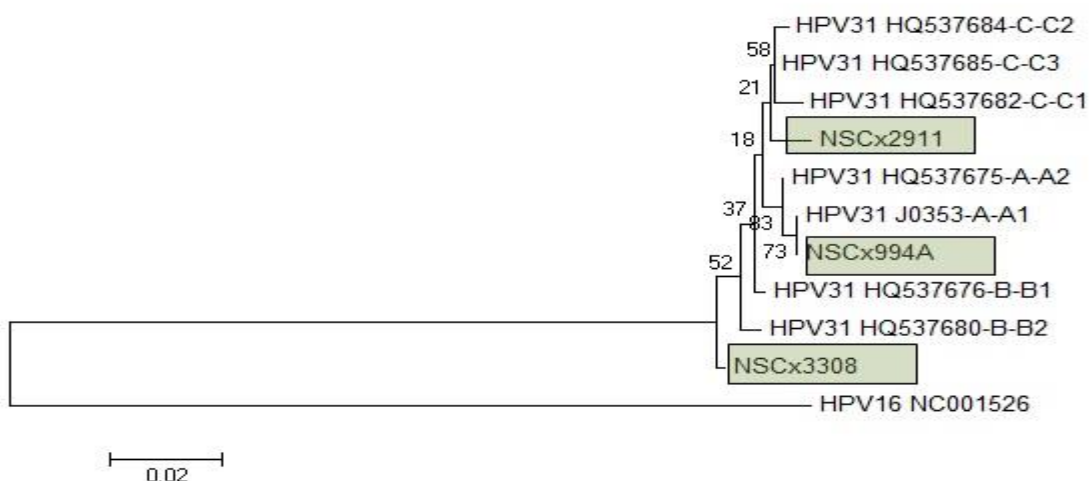
Slika 5.8. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci 28 izolata HPV 16 L1 gena. Stablo je nacrtano korišćenjem MEGA softvera, upotrebom algoritama pridruživanja suseda (engl. *Neighbor joining*), kao statistički metod korišćena je *Maximum parsimony* metoda. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0, sa bootstrap analizom od 1000 ponavljanja. Izolati iz AP Vojvodine su naznačeni crvenom bojom. Tip 18 je uzet kao predstavnik koji ne pripada ispitivanoj grupi (eng. *outlier*).

Filogenetsko stablo za HPV tip 18 je prikazano na slici 5.9. Na dobijenom dendogramu, prikazana su tri klastera koja odgovaraju linijama A, B i C. Tri izolata su grupisana u liniju A (podlinije A1 i A2), dok su se 2 izolata izdvojila kao posebne grane.

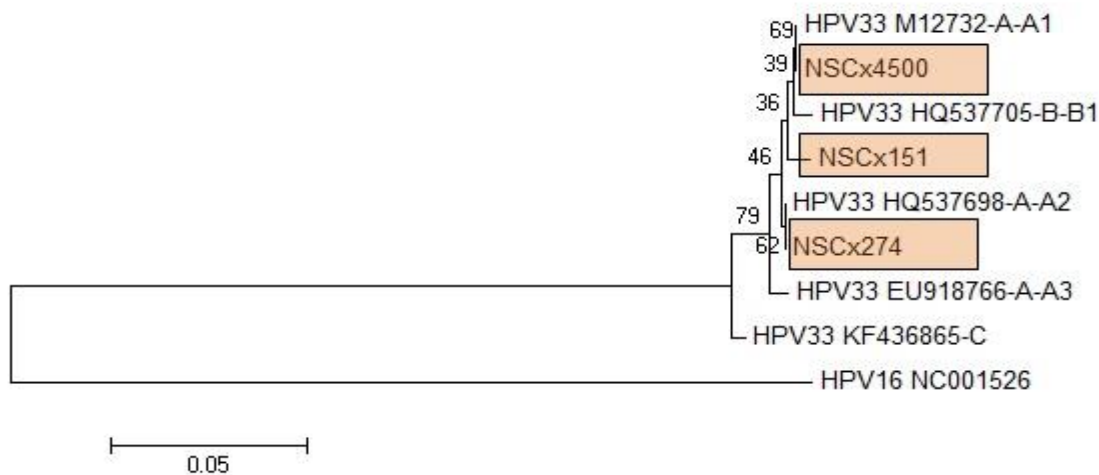


Slika 5.9. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu pet nukleotidnih sekvenci HPV 18 L1 gena. Stablo je nacrtano korišćenjem MEGA softvera, upotrebom algoritama pridruživanja suseda (engl. Neighbor joining), kao statistički metod korišćena je Maximum parsimony metoda. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0, sa bootstrap analizom od 1000 ponavljanja. Izolati iz AP Vojvodine su naznačeni plavom bojom. Tip 16 je uzet kao predstavnik koji ne pripada ispitivanoj grupi (eng. outlier).

Filogenetsko stablo za HPV tip 31 je prikazano na slici 5.10. Filogenetska analiza dobijena tri HPV 31 izolata iz našeg istraživanja je potvrdila pripadnost navedenom genotipu i to tako da svaki od izolata pripada određenim linijama: A (podlinija A1), B (podlinija B2) i C (podlinija C1). Na dobijenom filogenetskom stablu analizom tri HPV 33 izolata, izdvojena su tri klastera koja su identifikovana kao linije A, B i C (slika 5.11). Svi izolati HPV tipa 33 su pripadali liniji A (podlinije A1 i A2), dok linije B i C nisu nađene.



Slika 5.10. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci tri izolata HPV31 L1 gena. Stablo je nacrtano korišćenjem MEGA softvera, upotrebom algoritama pridruživanja taksona (engl. Neighbor joining), kao statistički metod korišćena je Maximum parsimony metoda. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0, sa bootstrap analizom od 1000 ponavljanja. Izolati iz AP Vojvodine su naznačeni zelenom bojom. Tip 16 je uzet kao predstavnik koji ne pripada ispitivanoj grupi (eng. outlier).



Slika 5.11. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci tri izolata HPV33 L1 gena. Stablo je nacrtano korišćenjem MEGA softvera, upotrebom algoritama pridruživanja suseda (engl. Neighbor joining), kao statistički metod korišćena je Maximum parsimony metoda. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0, sa bootstrap analizom od 1000 ponavljanja. Izolati iz AP Vojvodine su naznačeni narandžastom bojom. Tip 16 je uzet kao predstavnik koji ne pripada ispitivanoj grupi (eng. outlier).

5.5.2. GENETSKE UDALJENOSTI NUKLEOTIDNIH SEKVENCI

U cilju sagledavanja genetičkog diverziteta HPV izolata poreklom iz Vojvodine, sekvence dobijene u ovom istraživanju su analizirane zajedno sa sekvencama koje su preuzete iz GenBank baze podataka. Genetička distanca određivana je u programskom paketu MEGA 5.0, opcijom „Compute pairwise distances“. Analizirani su parovi sekvenci (procenjivana je genetička udaljenost za svaki par ponaosob), primenom Tamura-2 parametarske metode i Bootstrap metode za procenu standardne greške (sa 1000 replikata).

Analiza genetičke udaljenosti je pokazala da su nukleotidne distance bile u očekivanom rasponu među genotipovima i unutar istog tipa. Nukleotidna udaljenost među sekvencama istog genotipa je bila od 0-2%, što potvrđuje razlike na nivou varijante.

Genetička distanca između sekvenci HPV tipa 16 poreklom iz našeg regiona se kretala u rasponu 0-1,8% (reprezentativni uzorak je prikazan u tabeli 5.8, a celokupni rezultati su dati u prilogu 2). Maksimalna genetička distanca koja je iznosila 1,8%, utvrđena je između izolata NSxC2269 i izolata NSxC3612. Izolati HPV tipa 16 iz našeg regiona, najbliži su varijantama koje pripadaju liniji A (podlinije A3 i A4). U odnosu na ostale prototipove, najveća razlika je nađena u odnosu na varijante linije D (AY686579 podlinija-D2 i AF402678 podlinija-D3).

Proračun genetičke udaljenosti identifikovanih HPV18 izolata na nivou L1 gena u odnosu na izolate drugih geografskih regiona prikazan je u tabeli 5.9. Prosečna genetička distanca između izolata HPV tipa 18 poreklom iz našeg regiona se kretala od 0-0,7%. Udaljenost naših izolata u odnosu na evropske izolate je bila manja od 2%, što potvrđuje sličnost na nivou varijante. Izolati našeg regiona su pokazali najveću genetičku distancu (2,5%) u odnosu na referentni genotip EF202155 koja pripada liniji B (podlinija B1).

Tabela 5.8. Proračun genetičke udaljenosti identifikovanih izolata HPV tipa 16 na nivou L1 gena u odnosu na referentne genotipove koji pripadaju linijama A, B, C i D

HPV tipovi	A-A2	A-A3	A-A4	B-B1	B-B2	C-C1	D-D1	D-D2	D-D3	3612	444	483	2536	1510	5000	5318	2269
HPV18	8,004	8,826	7,425	7,879	7,953	7,878	7,878	7,856	7,877	7,878	7,425	7,425	7,425	7,425	7,425	7,425	8,279
HPV16_AF536179-A-A2	0,408	0,005	0,004	0,005	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
HPV16_HQ644236-A-A3	0,412	0,008	0,003	0,006	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,007	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004
HPV16_AF534061-A-A4	0,408	0,005	0,003	0,005	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
HPV16_AF536180-B-B1	0,416	0,010	0,013	0,010	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,006
HPV16_HQ644298-B-B2	0,416	0,013	0,015	0,013	0,003	0,005	0,005	0,006	0,006	0,005	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
HPV_AF472502-C-C1	0,415	0,015	0,018	0,015	0,008	0,000	0,000	0,003	0,003	0,000	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007
HPV16_HQ644257-D-D1	0,415	0,015	0,018	0,015	0,005	0,000	0,000	0,003	0,003	0,000	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007
HPV16_AY686579-D-D2	0,411	0,013	0,021	0,018	0,008	0,003	0,003	0,004	0,004	0,003	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,008
HPV16_AF402678-D-D3	0,410	0,018	0,021	0,018	0,008	0,003	0,003	0,005	0,005	0,003	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,008
NSCx3612	0,415	0,015	0,018	0,015	0,005	0,000	0,000	0,003	0,003	0,000	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007
NSCx444	0,408	0,005	0,003	0,000	0,010	0,013	0,015	0,018	0,018	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
NSCx483	0,408	0,005	0,003	0,000	0,010	0,013	0,015	0,018	0,018	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
NSCx2536	0,408	0,005	0,003	0,000	0,010	0,013	0,015	0,018	0,018	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
NSCx1510	0,408	0,005	0,003	0,000	0,010	0,013	0,015	0,018	0,018	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
NSCx5000	0,408	0,005	0,003	0,000	0,010	0,013	0,015	0,018	0,018	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
NSCx5318	0,408	0,005	0,003	0,000	0,010	0,013	0,015	0,018	0,018	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
NSCx2269	0,403	0,008	0,005	0,003	0,013	0,016	0,018	0,021	0,021	0,018	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	

Tabela 5.9. Proračun genetičke udaljenosti identifikovanih izolata HPV 18 na nivou L1 gena u odnosu na referentne genotipove koji pripadaju linijama A, B i C

	A-A1	A-A2	A-A3	A-A4	B-B3	B-B1	A-A5	B-B2	C-C1	3675	2883a	2883	966	2096
HPV16_NC001526	2,495	2,494	2,495	2,495	2,496	2,496	2,495	2,496	2,498	2,495	2,495	2,494	2,495	2,494
HPV18_AY262282-A-A1	0,388	0,002	0,000	0,000	0,006	0,007	0,000	0,006	0,007	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003
HPV18_EF202146-A-A2	0,392	0,002	0,002	0,002	0,007	0,007	0,002	0,007	0,008	0,002	0,002	0,005	0,002	0,004
HPV18_EF202147-A-A3	0,388	0,000	0,002	0,000	0,006	0,007	0,000	0,006	0,007	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003
HPV18_EF202151-A-A4	0,388	0,000	0,002	0,000	0,006	0,007	0,000	0,006	0,007	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003
HPV18_EF202152-B-B3	0,400	0,017	0,020	0,017	0,017	0,003	0,006	0,000	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,007
HPV18_EF202155-B-B1	0,396	0,017	0,020	0,017	0,017	0,005	0,007	0,003	0,006	0,007	0,007	0,008	0,007	0,008
HPV18_GQ180787-A-A5	0,388	0,000	0,002	0,000	0,017	0,017	0,017	0,006	0,007	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003
HPV18_KC470225-B-B2	0,400	0,017	0,020	0,017	0,000	0,005	0,017	0,007	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,007
HPV18_KC470229-C	0,405	0,020	0,022	0,020	0,007	0,012	0,020	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,007	0,008
NSCx3675	0,388	0,000	0,002	0,000	0,017	0,017	0,000	0,017	0,020	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003
NSCx2883A	0,388	0,000	0,002	0,000	0,017	0,017	0,000	0,017	0,020	0,000	0,004	0,004	0,000	0,003
NSCx2883	0,378	0,007	0,010	0,007	0,025	0,025	0,007	0,025	0,027	0,007	0,007	0,004	0,004	0,002
NSCx966	0,388	0,000	0,002	0,000	0,017	0,017	0,000	0,017	0,020	0,000	0,000	0,007	0,004	0,003
NSCx2096	0,383	0,005	0,007	0,005	0,022	0,022	0,005	0,022	0,025	0,005	0,005	0,002	0,005	0,005

Prosečna genetička distanca između izolata koji pripadaju HPV tipu 31 se kretala u rasponu 0-1,7%. Maksimalna genetička distanca od 1,7% utvrđena je između uzorka NSCx2911 i prototip sekvence HQ537680, koja pripada liniji B, podlinija B1 (tabela 5.10). Izolati HPV tipa 33 iz našeg regiona, najbliži su izolatima poreklom iz Evropskog regiona, odnosno liniji A i podliniji A2. U odnosu na ostale referentne genotipove i izolate, razlika je bila u rasponu od 1,7-2,2% posebno u odnosu na liniju C (tabela 5.11).

Tabela 5.10. Genetička udaljenost identifikovanih izolata HPV tipa 31 u odnosu na referentne genotipove linija A, B i C

HPV tipovi	A-A2	-B-B1	-B-B1	C-C1	C-C1	C-C1	A-A1	2911	3308	994A
HPV16_NC001526	0,150	0,148	0,145	0,153	0,152	0,150	0,151	0,148	0,143	0,151
HPV31_HQ537675-A-A2	0,282	0,003	0,005	0,005	0,004	0,003	0,002	0,006	0,006	0,002
HPV31_HQ537676-B-B1	0,275	0,005	0,003	0,005	0,004	0,003	0,004	0,006	0,006	0,004
HPV31_HQ537680-B-B2	0,268	0,010	0,005	0,006	0,005	0,005	0,006	0,007	0,006	0,006
HPV31_HQ537682-C-C1	0,281	0,010	0,010	0,015	0,004	0,003	0,005	0,006	0,006	0,005
HPV31_HQ537684-C-C2	0,282	0,007	0,007	0,012	0,007	0,002	0,005	0,005	0,006	0,005
HPV31_HQ537685-C-C3	0,278	0,005	0,005	0,010	0,005	0,002	0,004	0,004	0,005	0,004
HPV31_J0353-A-A1	0,286	0,002	0,007	0,012	0,012	0,010	0,007	0,006	0,007	0,000
NSCx2911	0,275	0,012	0,012	0,017	0,012	0,010	0,007	0,015	0,006	0,006
NSCx3308	0,268	0,015	0,015	0,015	0,015	0,012	0,010	0,017	0,012	0,007
NSCx994A	0,286	0,002	0,007	0,012	0,012	0,010	0,007	0,000	0,015	0,017

Tabela 5.11. Genetička udaljenost identifikovanih izolata HPV tipa 33 u odnosu na referentne genotipove linija A, B i C

	A-A3	A-A2	B-B1	C	A-A1	4500	151	274	HPV 16
HPV33_EU918766-A-A3	0,005	0,008	0,010	0,006	0,006	0,006	0,007	0,005	5,363
HPV33_HQ537698-A-A2	0,007	0,005	0,009	0,004	0,004	0,004	0,005	0,000	5,366
HPV33_HQ537705-B-B1	0,017	0,010	0,009	0,004	0,004	0,004	0,007	0,005	5,366
HPV33_KF436865-C	0,023	0,020	0,017	0,009	0,009	0,009	0,011	0,009	5,331
HPV33_M12732-A-A1	0,012	0,005	0,005	0,017	0,000	0,000	0,005	0,004	5,365
NSCx4500	0,012	0,005	0,005	0,017	0,000	0,000	0,005	0,004	5,365
NSCx151	0,015	0,007	0,012	0,022	0,007	0,007	0,000	0,005	5,364
NSCx274	0,007	0,000	0,010	0,020	0,005	0,005	0,007	0,000	5,366
HPV16_NC001526	0,398	0,403	0,403	0,392	0,408	0,408	0,415	0,403	

5.6. Rezultati PCR-RFLP metode

In silico PCR sa dostupnim sekvencama pokazao je da većina sojeva daje produkte sa dizajniranim prajmerima. Izuzetak za L1 gen je jedan od dva soja iz podlinije A4. Za L2 gen, pored ovog soja, PCR produkti nisu dobijeni in silico ni sa jednim od dva soja podlinije A3, kao ni sa sva tri soja podlinije B2, što prikazuje tabela 5.12. Na osnovu PCR-RFLP in silico rezultata za različite linije i podlinije HPV tipa 51 konstruisan je kladogram (slika 5.12).

Restrikcijom digestijom PCR produkata dobijenih in silico za L1 gen primenom DraI enzima, utvrđeno je dva različita RFLP profila (prvi 615, 418 i 144 bp, a drugi 1069 i 144 bp), pri čemu su svi produkti imali najmanje jedno mesto za restrikciju digestijom ovim enzimom. Isti produkti ili nisu imali mesto za restrikciju enzimom TaqI, ili su dali jedan od dva moguća profila (prvi 980, 132 i 101 bp, a drugi 980 i 233 bp).

In silico analizom produkata dobijenih na nivou L2 gena primenom TaqI enzima utvrđeno je slično: produkti ili nisu posedovali restrikciono mesto, ili su davali jedan od dva moguća profila (prvi 668, 132 i 100 bp, a drugi 668 i 232 bp). Primena PstI enzima pokazala je prisustvo produkata koji ne poseduju mesto za restrikciju digestijom enzimom i prisustvo produkata koji daju dva različita RFLP profila (prvi 781 i 119 bp, drugi 445, 336 i 119 bp).

Svi produkti dobijeni in silico na nivou E1 gena su imali bar jedno restrikciono mesto za enzim DraI, pri čemu su dobijene dve grupe produkata (prvi 284, 149, 75 i 45 bp, a drugi 284, 194 i 74 bp).

PCR metodom su dobijeni fragmenti očekivanih veličina, sa svim navedenim prajmerima, kada je kao matrica korišćeno 11 odabranih DNK, koje su prethodno bile pozitivne na HPV tip 51. Nakon PCR reakcije u kojoj su korišćeni prajmeri koji se vezuju na nivou L1 gena, svih 11 odabranih pozitivnih uzoraka na tip 51 dali su produkt očekivane veličine od 1213 bp. Produkti su tretirani restrikcijom endonukleazama DraI i TaqI (slika 5.13). Nakon digestije PCR produkata očekivane veličine enzimom DraI, generisano je tri fragmenta koja su odgovarala veličini 651, 418 i 144 bp i koja je u skladu sa veličinom produkta koje daju sve podlinije varijante A (A1-A4), ali i jedan soj podlinije B1. Isti PCR produkti nisu bili osetljivi na digestiju enzimom TaqI, a ovu osobinu pokazuju predstavnici podlinija A1-A3.

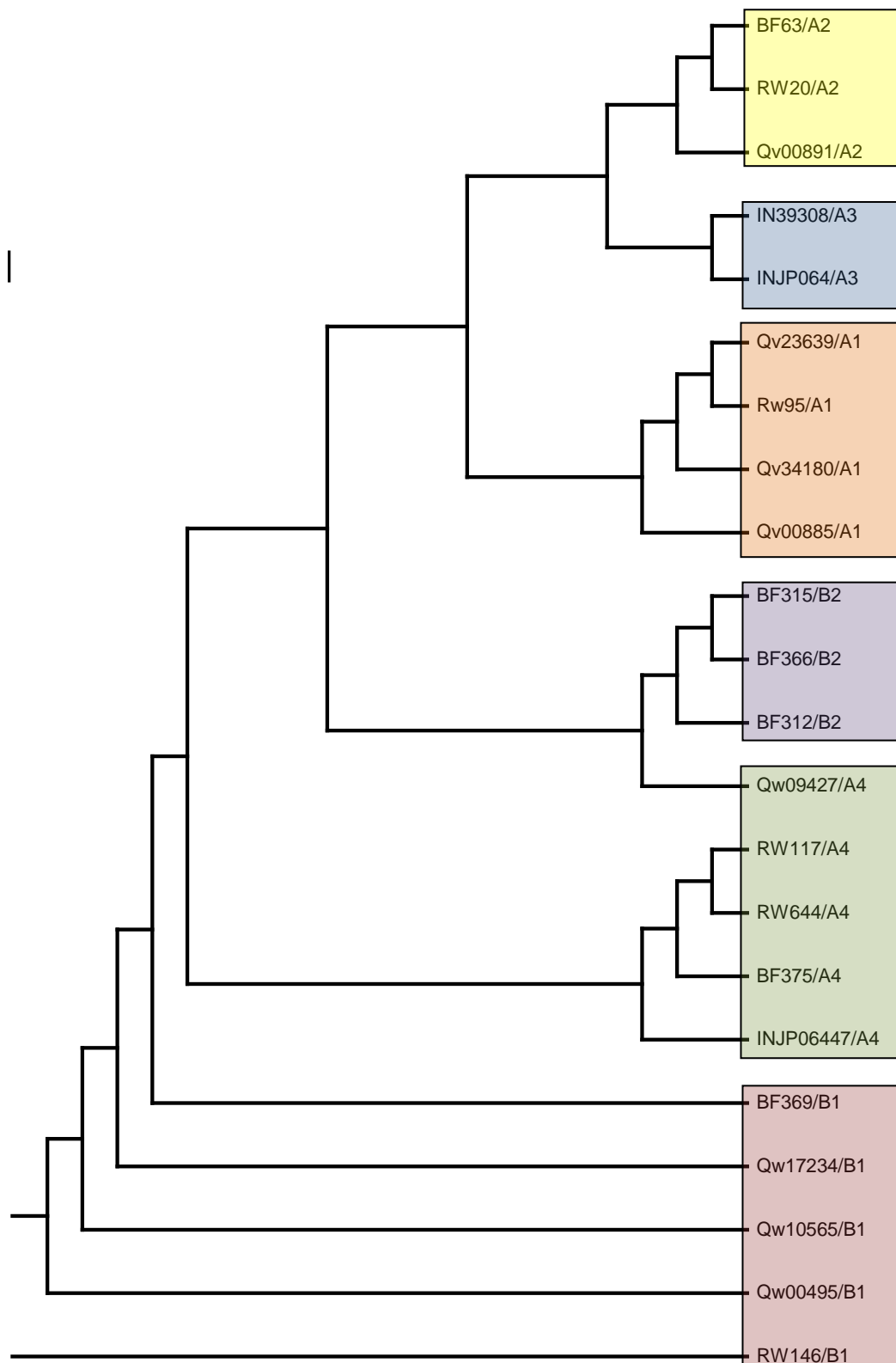
PCR produkti dobijeni primenom prajmera na nivou L2 gena, za 11 odabranih pozitivnih uzoraka DNK, bili su neosetljivi na enzim TaqI i svi su odgovarali veličini od 900 bp. Ovo odgovara podlinijama A1, A2 i A3 (slika 5.14). Nakon digestije PCR produkata

enzimom PstI (slika 5.15), generisana su dva fragmenta koja su odgovarala veličini 781 i 119 bp, što je u skladu sa veličinom produkta koje daju sve podlinije A1, linije A.

Tabela 5. 12. Rezultati in silico restrikcione digestije PCR produkata

Linija/ podlinija	Izolat	Access. No.	RFLP produkti na nivou odgovarajućih gena primenom različitih enzima				
			L1		L2		E1
			Dral*	TaqI*	TaqI*	PstI	Dral*
A/A1	Rw95	KF436869.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	284,149, 74, 45
	Qv23639	KF436868.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	284,149, 74, 45
	Qv34180	KF436867.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	284,149, 74, 45
	Qv00885	KF436866.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	284,149, 74, 45
A/A2	RW20	KF436872.1	651, 418, 144	1213	900	445,336,119	284,194,74
	BF63	KF436871.1	651, 418, 144	1213	900	445,336,119	284,194,74
	Qv00891	KF436870.1	651, 418, 144	1213	900	445,336,119	284,194,74
A/A3	IN393089	KF436874.1	651, 418, 144	1213	-	-	-
	INJP06405	KF436873.1	651, 418, 144	1213	900	445,336,119	-
A/A4	RW117	KF436879.1	651, 418, 144	980,132, 101	668,132,100	445,336,11	284,149, 74, 45
	RW644	KF436878.1	651, 418, 144	980,132, 101	668,132,100	445,336,119	284,149, 74, 45
	BF375	KF436877.1	651, 418, 144	980,132, 101	668,132,100	445,336,119	284,149, 74, 45
	INJP06447	KF436876.1	651, 418, 144	980,132, 101	668,132,100	445,336,119	284,149, 74, 45
	Qv09427	KF436875.1	-	-	-	-	284,149, 74, 45
B/B1	Qv17234	KF436884.1	1069, 144	980, 233	668,232	445,336,119	284,149, 74, 45
	Qv10565	KF436883.1	1069, 144	980, 233	668,232	445,336,119	284,149, 74, 45
	Qv00495	KF436882.1	1069, 144	980, 233	668,232	445,336,119	284,149, 74, 45
	RW146	KF436881.1	1069, 144	980, 233	668,232	445,336,119	284,149, 74, 45
	BF369	KF436880.1	651, 418, 144	980, 233	668,232	445,336,119	284,149, 74, 45
B/B2	BF315	KF436887.1	1069, 144	980, 233	-	-	284,149, 74, 45
	BF366	KF436886.1	1069, 144	980, 233	-	-	284,149, 74, 45
	BF312	KF436885.1	1069, 144	980, 233	-	-	284,149, 74, 45
Nepoznato	13UK27	KP090033.1	651, 418, 144	980, 233	668,232	445,336,119	ND
Nepoznato	13UK25	KP090031.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK22	KP090028.1	1069 i 144	980, 233	668,232	781,119	ND
Nepoznato	13UK21	KP090027.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK20	KP090026.1	651, 418 i 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK18	KP090024.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK17	KP090023.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK13	KP090020.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK09	KP090016.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK04	KP090013.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK03	KP090012.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK02	KP090011.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13UK00	KP090009.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT152T0	KP090008.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT138T6	KP090007.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT097T0	KP090006.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT063T0	KP090004.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT061T0	KP090003.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT053T0	KP090002.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	13IT013T0	KP090001.1	651, 418, 144	980,132, 101	668,132,100	781,119	ND
Nepoznato	13IT005T0	KP090000.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	ND
Nepoznato	Ma	GQ487711.1	651, 418, 144	980,132, 101	668,132,100	445,336,119	ND
Nepoznato	-	M62877.1	651, 418, 144	1213	900	781,119	284,149, 74, 45

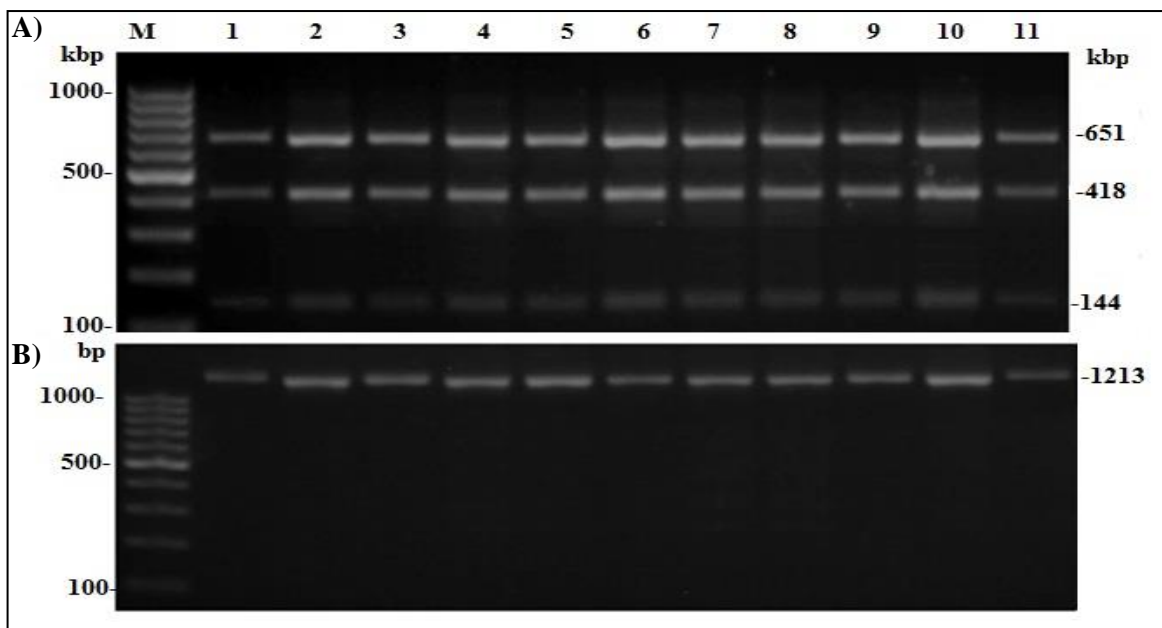
ND-sekvencija je parcijalna i obuhvata samo L1 i L2 gen, tako da deo sekvence za E1 nije dostupan u GenBank bazi podataka



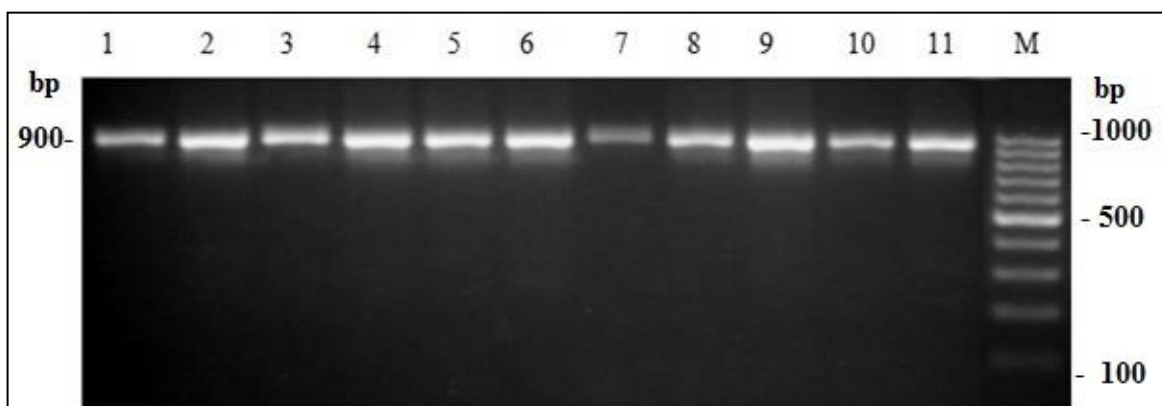
Slika 5.12. Kladogram konstruisan na osnovu PCR-RFLP in silico rezultata za različite linije i podlinije HPV tipa 51

Slika 5.13. PCR produkti na nivou L1 gena isečeni restrikcijom endonukleazom DraI i TaqI. Uzorci (1-11): (1) uzorak NS377; (2) uzorak NS1730; (3) uzorak NS1863; (4) uzorak NS3007; (5) uzorak NS3092; (6) uzorak NS3234; (7) uzorak NS3600; (8) uzorak NS483; (9) uzorak 1641NS; (10) uzorak NS1760; (11) uzorak NS2937; (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific).

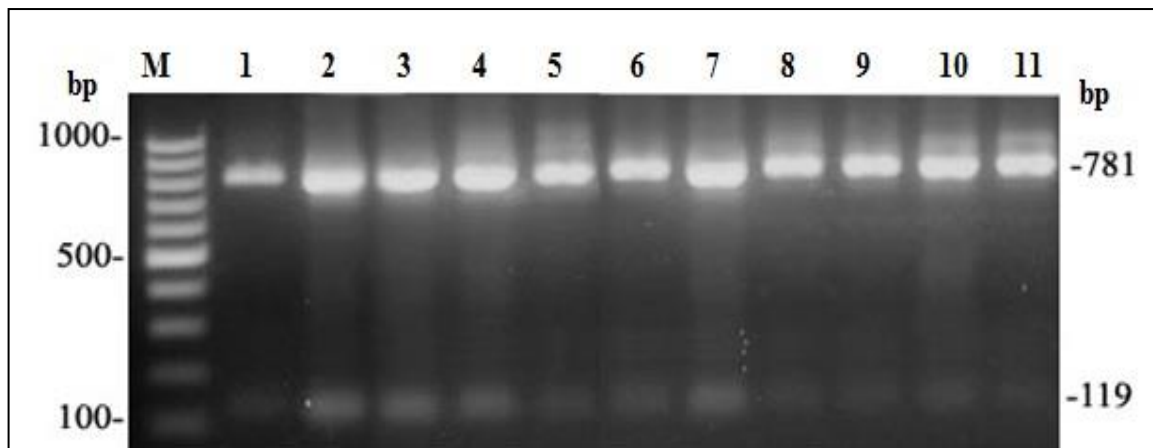
A) nakon digestije sa DraI enzimom dobijeni fagmeti veličine oko 651, 418 i 144 bp; **B)** TaqI enzim nije generisao ni jednog fragmenta, pa se vidi samo produkt od 1213 bp



Slika 5.14. PCR produkti na nivou L2 gena isečeni restrikcijom endonukleazom TaqI. Uzorci (1-11): (1) uzorak NS377; (2) uzorak NS1730; (3) uzorak NS1863; (4) uzorak NS3007; (5) uzorak NS3092; (6) uzorak NS3234; (7) uzorak NS3600; (8) uzorak NS483; (9) uzorak 1641NS; (10) uzorak NS1760; (11) uzorak NS2937; (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Nakon digestije sa TaqI dobijeni su fagmeti veličine oko 900 bp.

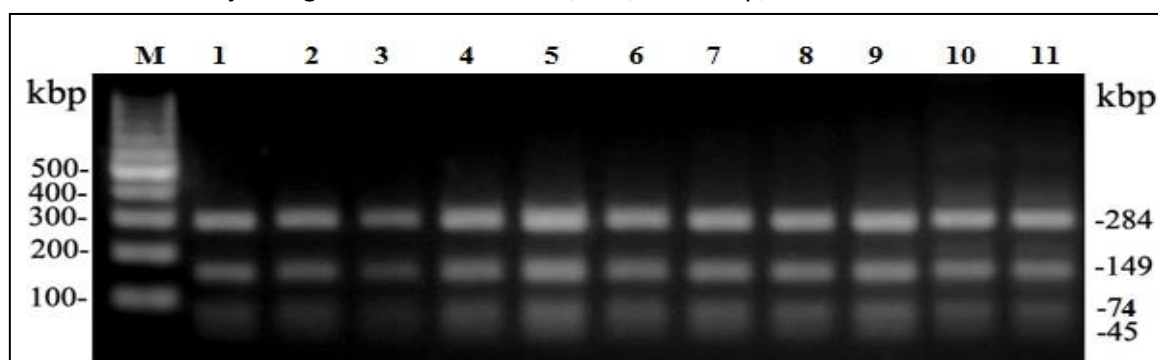


Slika 5.15. PCR produkti na nivou L2 gena isečeni restrikcijom endonukleazom PstI. Uzorci (1-11): (1) uzorak NS377; (2) uzorak NS1730; (3) uzorak NS1863; (4) uzorak NS3007; (5) uzorak NS3092; (6) uzorak NS3234; (7) uzorak NS3600; (8) uzorak NS483; (9) uzorak 1641NS; (10) uzorak NS1760; (11) uzorak NS2937; (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Nakon digestije sa PstI dobijeni su fragmeti veličine oko 781 i 119 bp.

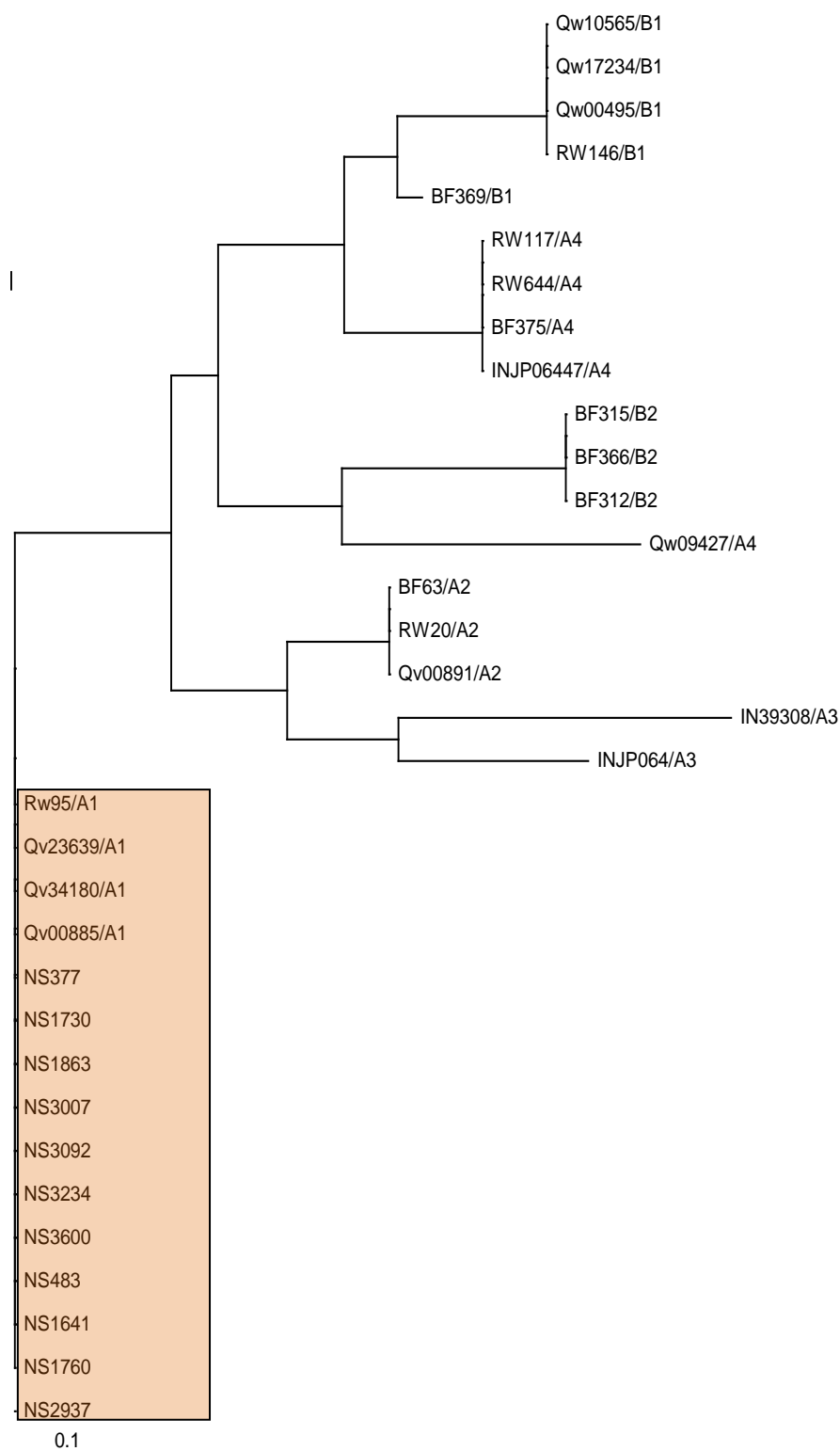


PCR produkti dobijeni sa 11 pozitivnih DNK na tip 51 su sa prajmerima na nivou E1 gena dali produkt od 552 bp. Svi ispitivani produkti imali su tri restrikciona mesta za enzim DraI i davali su 4 produkta: 284, 149, 74 i 45 bp. Ovakav profil daju podlinije A1 i A4, kao i B1 i B2 (Slika 5.16).

Slika 5.16. PCR produkti na nivou E1 gena isečeni restrikcijom endonukleazom DraI. 1) Uzorci (1-11): (1) uzorak NS377; (2) uzorak NS1730; (3) uzorak NS1863; (4) uzorak NS3007; (5) uzorak NS3092; (6) uzorak NS3234; (7) uzorak NS3600; (8) uzorak NS483; (9) uzorak 1641NS; (10) uzorak NS1760; (11) uzorak NS2937; (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Nakon digestije sa DraI enzimom dobijeni fragmeti veličine oko 284, 149, 74 i 45 bp;



Na osnovu dobijenih produkata in silico i produkata dobijenih u ovom radu, primenom matriksa sličnosti (Neighbor-joining) i Jaccard-ovog koeficijenta, konstruisan je filogram koji prikazuje položaj 11 ispitivanih uzoraka, na kome se jasno uočava da svi ispitivani uzorci HPV tipa 51 pripadaju liniji A, podliniji A1 (slika 5.17).



Slika 5.17. Filogram sa položajem ispitivanih 11 uzoraka, na kome se jasno uočava da svi ispitivani uzorci odgovaraju liniji A, podliniji A1

6.0. Diskusija

6.1. Zastupljenost visokorizičnih tipova HPV na području Južnobačkog okruga, AP Vojvodine

Humani papilomavirusi su najvažniji onkogeni virusi koji uzrokuju oko 5-10% svih neoplazija kod čoveka (*Lehtinen i Dillner, 2013*). Infekcija HPV predstavlja najvažniji poznati predisponirajući faktor rizika za razvoj karcinoma grlića materice, vulve, anusa, penisa i karcinoma orofaringealne regije (*zur Hausen, 2009*). Rak grlića materice je najučestaliji karcinom koji uzrokuju ovi virusi, a prema podacima HPV Medical Centra, u svetu na svaka dva minuta, po jedna žena umre od posledica ovog maligniteta (<http://hpvmedicalcenter.com/>). Kod žena u Srbiji, rak grlića materice čini 5,6% svih smrtnih slučajeva, a naša zemlja ima jednu od najvećih stopa učestalosti ovog karcinoma među zemljama Jugoistočne Evrope (*Ferlay i sar, 2013b; Bruni i sar., 2014*). Maligna bolest grlića materice se danas zahvaljujući znanjima o njenoj etiologiji i patogenezi, kao i efikasnim metodama lečenja ranih stadijuma, može smatrati preventabilnom bolešću. Upravo iz tih razloga, prvi i osnovni korak u prevenciji karcinoma grlića materice, predstavlja rana laboratorijska dijagnostika HPV infekcije, odnosno, dokazivanje i određivanje genotipa virusa.

Radi utvrđivanja raširenosti HPV infekcije među ženama Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, u istraživanje je bilo uključeno 564 žena različite životne dobi (od 18 do 69 godina), sa različitim rezultatima citološkog nalaza. Za ispitivanje prevalencije HPV korišćena je visoko osetljiva real time PCR metoda, bazirana na kombinaciji višestrukih prajmera i četiri Taqman probe. Prisustvo HPV DNK je utvrđeno kod 51,8% ispitanica. Prema podacima iz literature, postoje velike varijacije u prevalenciji HPV infekcije među ženama širom sveta. Analizom 194 studije kojima je obuhvaćeno preko milion žena, pokazano je da je globalna prevalencija HPV infekcije 11,7% kod žena sa normalnom citologijom (*Bruni i sar., 2010*).

Prevalenca HPV infekcije u okviru ovog istraživanja je nešto viša, s obzirom da su istraživanjem bile obuhvaćene žene sa normalnom i abnormalnom citologijom. Dobijeni rezultati su približni rezultatima zemalja našeg okruženja. Prevalencija od 60,7% utvrđena je u uzorku 460 rumunskih žena, normalne i abnormalne citologije, korišćenjem Innolipa kita (*Anton i sar., 2011*). U uzorku od 355 žena iz Bugarske, Grozdanov i sar. (2014) su Linear Array HPV genotyping (Rosh Diagnostics) metodom utvrdili prevalencu od 61%. Mijović i sar. (2014) su metodom hibridizacije *in situ* u uzorku 115 žena sa normalnom i abnormalnom citologijom, iz Crne Gore, dokazali prevalencu od 44,3%. Prevalenca HPV zavisi od veličine uzorka, starosti ispitanika, kao i osetljivosti metode za detekciju.

Distribucija HPV infekcija između različitih uzrasnih grupa nije homogena, a sa godinama se menja relativni rizik od sticanja HPV infekcije (*Moscicki i sar., 2006*). Među ženama Južnobačkog okruga, najveća prevalencija (70,9%) je nađena kod mlađih žena do 25 godina, a najmanja (29,1%) je registrovana kod žena starosti od 45-50 godina. Porast u prevalenciji (40,7%) zapažen je i kod žena starijih od 50 godina. Publikovani podaci o učestalosti infekcija kod žena fertilnog doba su slični u gotovo svim geografskim područjima. Infekcija HPV u svim regionima sveta najučestalija je kod žena mlađih od 25 godina, a zatim opada sa godinama starosti (*Smith i sar., 2007*). Rasprostranjenost HPV infekcije kod starijih žena je različita. Izvestan broj studija navodi podatke o smanjenju ili postojanju platoa, dok postoje studije u kojima je uočen blagi porast infekcije. Kao razlog za porast prevalencije kod žena preko 45 godina navode se promene u hormonskom statusu i imunološkom odgovoru organizma (*Smith i sar., 2007*). S ozbirom da je za područje Evrope karakteristična pojava primarnog pika kod žena u mlađim godinama, odnosno do 25 godina i blagi sekundarni pik kod žena preko 50 godina (*de Sanjose i sar., 2007*), može se zaključiti da je dobno specifična inficiranost žena našeg regiona u skadu sa podacima koji se odnose na region Evrope.

Istraživanjem se sagledala zastupljenost onkogenih tipova HPV u odnosu na starost i citološki nalaz. Rezultati istraživanja su pokazali da su među ženama Južnobačkog okruga, AP Vojvodine najfrekventniji HPV tip 16 (34,2%) i HPV tip 31 (20,2%), dok je dodatnih 13% infekcija bilo uzrokovano HPV tipom 51.

Prema rezultatima mnogih autora HPV tip 16 je najučestaliji tip virusa u svetu, a njegova frekvencija varira u zavisnosti od geografske i etničke pripadnosti (*Guan i sar., 2012*). Među ženama Južnobačkog regiona, HPV 16 je dijagnostikovao u svim starosnim grupama, ali je njegova učestalost statistički značajno češća u histološki težoj leziji. HPV tip 16 ima sposobnost da daje perzistentnu infekciju koja traje duže od ostalih visoko rizičnih HPV. *Moscicki i sar. (2006)* su utvrdili da infekcija HPV tipom 16 nosi rizik od 40% za nastanak cervikalne intraepitelijalne neoplazije gradusa 3 (CIN3) u periodu od 5 godina.

HPV 31 je drugi po učestalost visookonkogeni virus kod žena Južnobačkog regiona. Prisutan je u svim starosnim grupama, ali je češće dijagnostikovao kod mlađih žena do 30 godina (8,16%) u odnosu na žene starije od 50 godina (1,42%). Nema statistiki značajane povezanost između HPV 31 i citoloških rezultata. Prema podacima meta-analize sprovedene na pet kontinenata, HPV 31 je češće zastupljen u Evropi (*Bruni i sar., 2010*). HPV 31 se smatra četvrtim po učestalosti tipom HPV u cervikalnim skvamoznim karcinomima širom sveta (*Guan i sar., 2012*).

Preostali članovi *Alpha-9* vrste (HPV: 33, 35, 52 i 58) prisutni su u nižem procentu u našem regionu. HPV33 je najčešći kod žena starosti od 31-40 godina (6,21%) i statistički je bio češći u visokostepenim skvamoznim intraepitelijalnim lezijama (HSIL). Iako je HPV 35 češće nađen kod žena starijih od 50 godina, nije utvrđena statistički značajna povezanost sa cervikalnom citologijom. Podaci studije *de Sanjose i sar. (2013)*, ukazuju da je u Evropi HPV 33 odgovoran za 4%, a HPV 35 za 2% karcinoma grlica materice. HPV 52 i HPV 58 su tipični za region Azije i u tom području su odgovorni za nastanak invazivnih karcinoma grlića materice više nego u drugim delovima sveta (*Takehara i sar., 2011*). Među ženama našeg regiona, učestalost HPV 52 je bila nešto veća (11%) u odnosu na HPV 58 (8,2%), bez statistički značajnije povezanosti oba tipa sa starosti i citološkim rezultatom.

U ovom istraživanju uočena je visoka zastupljenost HPV tipa 51. U istraživanju koje je sproveo *Piana i sar. (2013)* na području Severne Sardinije, Italija, zapažena je visoka zastupljenost HPV 51 među ženama sa teškom displazijom i invazivnim karcinomom grlića materice. To je bila prva studija na području Italije, koja je jasno pokazala da HPV tip 51 ima veliku ulogu u razvoju cervikalne neoplazije. Epidemiološke studije u nekoliko geografskih područja Evrope, ukazuju na visoku frekvenciju HPV tipa 51. *Petry i sar. (2013)* su među mladim ženama u Nemačkoj, HPV 51 rangirali na drugom mestu posle HPV 16, a slični podaci su zabeleženi i u Holandiji (*Mollers i sar., 2013*). Međutim, u studiji koja je sprovedena u nekoliko evropskih zemalja (Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Češka Republika, Francuska, Grčka, Italija, Holandija, Poljska, Portugalija, Španija) HPV 51 je otkriven u samo 1% slučajeva raka grlića materice (*de Sanjose i sar., 2013*). U okviru ovog istraživanja među HPV DNK pozitivnim ženama, HPV 51 je rangiran na trećem mestu sa udelom od 13%. Često se nalazio u sklopu multiplih infekcija, što je zapaženo i u regionu Hrvatske (*Gasparov i sar., 2008*). Rezultati ovog rada su pokazali da je prevalencija HPV 51 najveća među mladim, seksualno aktivnim ženama i da opada sa godinama života. Žene sa citološkim nalazom LSIL imale su statistički značajno češću zastupljenost HPV 51 u poređenju sa ženama normalnog citološkog nalaza. Međutim, takvo zapažanje nije uočeno kod žena sa HSIL citologijom. Dobijeni podaci ukazuju da prisustvo ovog tipa virusa nije u čvrstoj vezi sa incidencom cervikalnog karcinoma u našem regionu. Da bi se opravdala ovakva tvrdnja potrebno je izvršiti istraživanje na većem broju uzoraka malignog tkiva grlića materice pacijentkinja. Podaci o rasprostranjenosti HPV 51 posebno su važni budući da trenutno dostupne profilaktičke vakcine, kao i druga generacija nanovalentne profilaktičke vakcine ne pružaju zaštitu od HPV 51 (*Piana i sar., 2013; Serano i sar., 2012*).

Brojne studije sprovedene u svetu pokazuju da su predstavnici *Alpha-7* vrste, odnosno, HPV tipovi: 18, 45 i 59 odgovorni za 15% invazivnih karcinoma grlića materice, kao i da su snažano povezani sa adenokarcinomima cerviksa (*Schiffman i sar., 2005*). HPV 18 je u našem regionu nađen u mnogo nižem procentu, u poređenju sa HPV tipom 16. Ovakvi rezultati su sličani podacima koji dolaze iz evropskih zemalja (*Bruni i sar., 2010*). Slično mnogim evropskim studijama zapaženo je da je HPV 18 češće nađen kod mlađih žena (do 30 godina) i da njegova zastupljenost opada sa godinama života. Studije iz raznih delova sveta, jasno su pokazale da se prisustvo HPV 18 povećava sa težinom citološke lezije (*Bruni i sar., 2010*). U okviru ovog istraživanja zapaženo je da su žene sa citološkim nalazom ASCUS i LSIL imale veću zastupljenost HPV 18 u poređenju sa ženama normalnog citološkog rezultata. Međutim, HPV 18 u citološkim lezijama tipa HSIL nije dijagnostikovao. Ciljana grupa u sprovedenom istraživanju nisu bile žene obolele od karcinoma, a da bi se došlo do pouzdanijih rezultata istraživanje treba da se uradi na većem uzorku.

U okviru ove studije, HPV 45 je retko otkriven kod žena sa normalnim citološkim rezultatom. Učestalost ovog tipa virusa je bila najveća kod žena sa citološkim nalazom ASCUS i LSIL. Retrospektivna studija preseka, sprovedena u 38 zemalja Evrope, Severne Amerike, Centralne i Južne Amerike, Afrike, Azije i Okeanije je pokazala da je u svetu prosečna starost pacijenatkinja obolelih od raka grlića materice izazvanog HPV tipom 45 je 46,8 godina, u poređenju sa HPV 18 (48,2 godine) i HPV tipom 16 (50 godina) (*de Sanjose i sar., 2010*). Preostali članovi *Alpha-7* vrste (HPV: 59 i 39) bili su zastupljeni u niskom procentu u našem regionu bez statistički značajane povezanosti sa godinama života i cervikalnom citologijom.

U sprovedenoj studiji, učestalost HPV 56, koja pripada *Alpha-6* vrsti, je iznosila 10,3%. Ovaj tip virusa je pokazao statistiku povezanost sa godinama života, a statistički je znatno češće nađen kod žena sa abnormalnim citološkim nalazom, nego kod žena sa normalnom citologijom. Prema rezultatima analize 3085 karcinom grlića materice, HPV 56 je pronađen u 1,2% svih slučajeva širom sveta (*Clifford i sar., 2006*).

Rak grlića materice se nalazi na vrhu skale maligniteta koji se može uspešno izlečiti, jer ima dug preinvazivni period, tokom kojeg je moguće organizovati rano otkrivanje u vidu organizovanog, efikasnog skrininga. Lečenje preinvazivnih lezija i ranih stadijuma bolesti je onda uspešno (*Nacionalni vodič dobre kliničke prakse, 2012*). Najrašireniji postupak u otkrivanju raka grlića materice je konvencionalna citologija po Papanikolau metodi. Ovaj test je počeo da se primenjuje 50-tih godina prošlog veka i od tada je značajno smanjio smrtnost žena od ovog maligniteta, ali je stopa smrtnosti i dalje visoka. Usprkos redovnim godišnjim Papa testovima, u Evropi svake godine oboli oko

60.000, a 25.000 žena umre. Glavni nedostatak Papa testa je niska osetljivost koja se kreće od 50-70%, čime se delimično objašnjava nepotpuna efikasnost citološkog monitoringa. Nedostaci konvencionalnog Papa testa poboljšani su uvođenjem LBC (liquid based cytology), ali zadovoljavajući napredak nije postignut (*Burd, 2003*).

Poboljšanje u ranom otkrivanju rizika od nastanka raka grlića materice, nastalo je primenom validiranih HPV DNK testova. Istraživanja su pokazala da je za cervikalnu intraepitelijalnu leziju gradusa 2 ili 3, senzitivnost HPV DNK testa 94,6% (95% CI: 84,2-100), a specifičnost 94,1% (95% CI: 93,4-94,8) (*Mayrand i sar., 2007*). Na osnovu podataka velike randomizirane studije „ATHENA” koja je obuhvatila oko 47.000 žena sa područja SAD, pokazano je da 1 od 10 žena, sa pozitivnim HPV DNK testom ima prekanceroznu leziju tipa CIN2, iako je PAPA test normalan (*Stoler i sar., 2011*). Uporedo, na području Evrope, tokom 2011. godina sprovedena je studija „ARTISTIC” kojom je praćena senzitivnost HPV DNK testa u odnosu na LBC (liquid based cytology) na uzorku od 24.510 žena. Rezultati studije su pokazali da negativan HPV DNK test ima veću prediktivnu vrednost koja iznosi 0,87% (95%CI: 0,70-1,06), pa samim tim i veći značaj, od negativnog rezultata citološkog testa 1,41% (95% CI: 1,19-1,65) i omogućava bezbedno produženje intervala skrininga i do 6 godina (*Kitchener i sar., 2011*). Uvažavajući dobijene rezultate, Američka agencija za kontrolu hrane i lekova odobrila je u aprilu 2014. prvi HPV DNK test za žene starije od 25 godina, koji se može koristiti kao samostalan dijagnostički test u skriningu raka grlića materice (*FDA approves, Cobas, Roche Diagnostics, 2014*).

Precizna laboratorijska dijagnostika u dokazivanju HPV infekcije je neophodna, što govori i podatak da je grupa stručnjaka na sastanku održanom u Ženevi, 2005. godine, preporučila uspostavljanje globalne HPV laboratorijske mreže (WHO HPV LabNet). Cilj ove međunarodne saradnje je implementacija internacionalnih standardnih procedura za izvođenje molekularnih i seroloških testova, kao i usklađivanje i standardizacija HPV testova za potrebe nadzora HPV vakcine. Zbog različitih analitičkih performansi molekularnih tehnika koje se primenjuju u laboratorijskoj dijagnostici HPV infekcija širom sveta, ukazano je na neophodnost standardizacije laboratorijskih metoda i procedura (*Klug i sar., 2008; Eklund i sar., 2012*). Validacija metoda, odnosno, testova koji se koriste u dijagnostici HPV infekcije doprinelo bi poboljšanju kvaliteta laboratorijskih usluga i omogućilo uporedivost podataka generisanih iz različitih laboratorija širom sveta (*Eklund i sar., 2012*). Pored toga, ukazano je i na problematiku HPV DNK standarda neophodnih za validaciju dijagnostičkih procedura. U 2008. godini od rekombinantnih HPV DNK plazmida napravljeni su prvi međunarodni standardi za HPV tipove 16 i 18. Oba standarda sadrže 5×10^6 međunarodnih jedinica (IU) po ampuli.

Standardi su namenjeni za kalibraciju u laboratorijama koje koriste tkz. in house metod ili kao radni standardi za amplifikaciju i detekciju HPV tipov 16 i 18 (*Wilkinson i sar., 2010*). Navedeni standardi se mogu nabaviti iz Nacionalnog instituta za biološke standarde i kontrolu (NIBSC, eng. *National Institute for Biological Standards and Control*).

Na osnovu podataka iz 57 zemalja sveta, obuhvaćenost žena starosti od 25 do 64 godine, skriningom za rak grlića materice se kreće od 40 do 68%. Pri tome postoji široka varijacija u nivou efektivne pokrivenosti u razvijenim i nerazvijenom zemljama, sa preko 80% u Austriji i Luksemburgu, do 1% ili manje u Bangladešu i Etiopiji (*Gakidou i sar., 2008*). U razvijenim zemljama, u kojima su postignuti visoki nivoi skrininga, postoje podgrupe žena koje se ne odazivaju na pregled. Jedan od razloga može biti skrining na osnovu uzorka endocervikalnih briseva. Obećavajuća alternativa može biti detekcija HPV DNK iz urina. Dokazivanje virusa iz urina je lako dostupna i prihvatljiva metoda za žene koja bi značajno povećala efikasnost cervikalnog skrininga. Zbirni podaci 14 studija pokazuju da otkrivanje HPV DNK u urinu ima osetljivost oko 87% i specifičnosti oko 94%, ali standardizacija metoda za ovakvu vrstu testiranja još uvek nije izvršena (*Pathak i sar., 2014*).

Imunizacija predstavlja najbržu i najefikasniju meru koja direktno utiče na smanjenje incidence i mortaliteta zaraznih bolesti. Brojna istraživanja, tokom devedesetih godina prošlog veka, usmerena na ispitivanje imunološkog odgovora na HPV infekciju, rezultirala produkcijom HPV kapsidne parikule, što je omogućilo razvoj i primenu profilaktičkih vakcina. Koutsky i sar. (2002) su prvi ukazali na preventivne efekte HPV vakcine. U junu 2007. godine, Savetodavni komitet za imunizaciju Svetske zdravstvene organizacije izjasnio se pozitivno u vezi sa bezbednom primenom dostupnih HPV vakcina (*Markowitz i sar., 2007*). Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (ECDC engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*) u januaru 2008. godine je dao smernice za uvođenje HPV vakcina u zemljama Evropske Unije (*Hamers, 2008*). Danas se u svetu, pre svega u razvijenim zemljama, primenjuju dve vrste profilaktičkih vakcina: bivalentna (HPV2) koja sadrži VLP tipova 16 i 18 i kvadrivalentna vakcina (HPV4) usmerena protiv tipova: 6, 11, 16 i 18. U toku 2014. godine odobrena je primena devetovalentne vakcine koja sadrži VLP tipova: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58.

U sprovedenom istraživanju, HPV tipovi 16 i 18 su bili uzročnici 45,5% infekcija, dok su HPV tipovi: 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 bili uzročnici 89,3% infekcija. Na osnovu dobijenih rezultata o zastupljenosti onkogenih tipova HPV u regionu Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, može se pretpostaviti da bi uvođenje profilaktičkih vakcina HPV 2 i HPV 4 samanjilo blizu 50% infekcija izazvanih visokorizičnim tipovima 16 i 18, dok bi

protektivni efekat primenom devetovalentne vakcine iznosio blizu 90%. U oktobru 2009. tri domaća strukovna udruženja u Srbiji: Udruženje za dečju i adolescentnu ginekologiju, Udruženje za ginekološku onkologiju Srbije, Srpsko lekarsko društvo-Sekcija za citologiju i citodijagnostiku, dala su pozitivnu preporuku za primenu HPV vakcina (*SLD-sekcija za citologiju i citodijagnostiku, 2009*). U toku 2014. godine Pokrajinski sekretarijat za zdravstvo, socijalnu politiku i demografiju dao je predlog posebnog programa pod nazivom „Program unapređenja primarne prevencije bolesti uzrokovanih humanim papiloma virusom na teritoriji AP Vojvodine“ (*Kopitović i Stanković-Baričak, 2014*). U Republici Srbiji prevencija karcinoma grlića materice se do decembra 2012. godine oslanjala na oportuni skrining, međutim, prema podacima Kancelarije za skrining raka (<http://www.skriningsrbija.rs/>), organizovani skrining za rak grlića materice se još uvek ne sprovodi ravnomerno na teritoriji cele zemlje. Dodatak vakcinacije na postojeći skrining program bi mogao dodatno smanjiti rizik od raka grlića materice i značajno smanjiti troškove lečenja obolelih od cervikalnog karcinoma.

Značaj primene HPV profilaktičkih vakcina u prevenciji karcinoma grlića materice potvrdile su mnogobrojne studije (*Markowitz i sar., 2014*), dok ima i onih koje navode ograničen doprinos i negativne efekte vakcinacije (*Bakogianni i sar., 2010; Gajski 2014*). Pored toga, primena protektivnih vakcina nametnula je i pitanja na koja trenutno nema odgovora, a to je da li će doći do promene distribucije HPV genotipova koji izazivaju karcinom grlića materice i da li će eradaikacija pojedinih genotipova dovesti do pojave mutantnih genotipova (*Bravo i Alonso, 2015*).

6.2. Uticaj kofaktora na sticanje i perzistiranje HPV infekcije

Danas je dobro poznata činjenica da je nastanak karcinoma grlića materice multifaktorijalan i dinamičan događaj kome pored dugotrajne infekcije visokorizičnim tipom HPV doprinose i brojni kofaktori (*Jo i Kim, 2005*). Iz tog razloga, u okviru ovog rada izvršena je evaluacija različitih faktora rizika za koje je pokazano da utiču na sticanje HPV infekcije, kao i virusnu perzistenciju.

Iako je HPV infekcija rasprostranjena kod žena svih uzrasnih kategorija, životna dob je determinanta koja snažno korelira sa rizikom sticanja HPV infekcije. Mnogobrojne epidemiološke studije su potvrdile da je rizik za sticanje HPV infekcije veći među seksualno aktivnim osobama mlađe životne dobi u odnosu na starije (*Munoz i sar., 2002; Smith i sar., 2007*). Podaci dobijeni u ovom radu potvrđuju pomenuto zapažanje. Među ženama Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, rizik za sticanje HPV infekcije kod žena

mlađih od 25 godina iznosio je 3,4 (95% CI: 1,546-7,630), a kod žena starosti od 25-29 godina i 30-34 godine rizik je iznosio 1,9.

Rezultati univarijantne analize, pokazali su da je bračno stanje značajno povezano sa HPV DNK pozitivnim rezultatom. Žene koje su u bračnoj ili partnerskoj vezi imale su za 0,547 (95% CI: 0,376-0,795) manji rizik u odnosu na neudate ispitanice. Objašnjenje za to je verovatno što bračni status visoko korelira sa nekim drugim faktorima ponašanja. Prema podacima iz literature, veliki broj porođaja se navodi kao faktor rizika za nastanak karcinoma grlića materice. Značajna uloga multipariteta u cervikalnoj karcinogenezi potvrđena je u studijama nekoliko istraživača (*Munoz i sar., 2002; Appleby i sar., 2006*) međutim, postoje i studije u kojima pozitivna korelacija nije nađena (*Deacon i sar., 2000; Ferrera i sar., 2000*). Povezanost pariteta i invanzivnog karcinoma grlića materice nije potvrđena prospektivnoj studiji Castle i sar. (2002) na uzorku od 1812 žena, tokom 10 godina praćenja. Od 564 žene obuhvaćene ovim israživanjem, ispitanice koje su imale jedan ($p < 0.001$) ili dva porođaja ($p = 0,047$) imaju manju verovatnoću pozitivnog HPV rezultata u odnosu na one koje nisu rađale. Slične rezultate dobili su *Bauer i sar., (1993)* u prospektivnoj studiji na uzorku od 500 žena iz SAD i *Kjaer i sar. (1997)* na uzorku od 1000 žena iz Danske. Objašnjenje za ovakve rezultate može biti činjenica da je planiranje porodice u uskoj vezi sa bračnim statusom, što posledično korelira sa monogamnim stilom života.

Niži nivo obrazovanja se vezuje za odluke i ponašanja koja su rizična za reproduktivno zdravlje (*Kahn i sar., 2007*). Od ukupnog broja ispitanica koje su učestvovala u ovom istraživanju, polovina ispitanica (52,3%) ima srednjoškolsko obrazovanje, visoku stručnu spremu ima 43%, dok je sa osmogodišnjom obrazovanjem 4,7% žena. Od svih sociodemografskih determinanti, za žene iz ruralnih područja i zemalja u razvoju, obrazovanje je važan kofaktor koji doprinosi nastanku karcinoma grlića materice.

U okviru ove disertacije, ispitivana su individualna ponašanja i navike koje determinišu rizik za sticanje HPV infekcije (godine stupanja u prvi seksualni odnos, broj seksualnih partnera u poslednje 2 godine) i perzistenciju infekcije (upotreba kondoma, oralnih kontraceptivnih sredstava, pušački status, konzumiranje alkohola). Među ispitivanim varijablama, statističku značajnost pokazale su varijable koje se odnose na broj seksualnih partnera u poslednje dve godine ($p < 0.001$) i konzumiranje alkohola ($p = 0,034$). Prosečne godine stupanja u prvi seksualni odnos u uzorku od 564 ispitanice Južnobačkog regiona je 18,9 godina, a statistička značajnost između HPV pozitivnih i HPV negativnih ispitanica nije nađena ($p = 0,211$). Većina HPV infekcija se stiče u prvim godinama seksualne aktivnosti. U studiji koja je obuhvatila 603 studentkinje, oko 40%

ispitanica je steklo HPV infekciju u roku od 2 godine od prvog seksualnog iskustva (*Winer i sar., 2003*). Rizik za nastanak HPV infekcije se povećava kontaktom sa većim brojem seksualnih partnera (*Castellsagué i Munoz, 2003*), što potvrđuju i rezultati u ovoj studiji. Prema dobijenim podacima, među ženama koje su dale podatak da su u poslednje dve godine imale vezu sa jednim partnerom, ispitanice koje su ostvarile vezu sa dva partnera imaju dva puta veći rizik 1,99 (95% CI:1,207-3,304) za prisustvo HPV infekcije, dok u grupi žena koje su imale tri i više partnera rizik raste na 3,2 (95% CI:1,757-5,865). Prema navodima Castellsagué i Munoz (2003), promiskuitetno ponašanje povećava rizik za sticanje HPV infekcije i do deset puta. Pored rizika za dobijanje HPV infekcije raste i rizik za nastanak drugih seksualno prenosivih infekcija koje doprinose lakšem razvoju promena na grliću materice (*Gómez i Santos, 2007*).

Prema podacima iz literature, upotreba kondoma može smanjiti rizik od prenošenja HPV infekcije, ali ne obezbeđuje potpunu zaštitu (*Winer i sar., 2006*). Podaci o ulozi OCs na HPV infekciju, u najvećem broju studija, su ispitivani sa aspekta povezanosti sa razvjem cervikalnog karcinoma. Dobijeni podaci nisu konzistentni u stručnoj i naučnoj literaturi i kreću se od toga da njihova primena nema uticaja (*Castle i sar., 2002*), preko studija koje nalaze da je rizik od razvoja cervikalnog karcinoma kod korisnica OCs povećan (*Smith i sar., 2003*). Povezanost OCs i prevalencije HPV infekcije može se posmatrati sa aspekta, da korisnice OCs ne koriste kondom sa novim partnerom, odnosno sklonije su nezaštićenim seksualnim odnosima, što povećava mogućnost zaražavanja HPV. U sprovedenom istraživanju upotreba kondoma ($p=0,568$) i oralnih kontraceptivnih sredstava ($p=0,562$) su varijable koje nisu pokazale statističku značajnu povezanost sa HPV DNK pozitivnim rezultatom, a ovakvi rezultati se mogu objasniti činjenicom, da je više od polovine ispitanica (56,7%) u bračnoj zajednici, što smanjuje rizik za sticanje HPV infekcije.

U okviru ovog rada, ispitivan je uticaj navike pušenja na prevalenciju HPV infekcije. Povezanosti HPV infekcije i navike pušenja istraživana u manjem broju studija, a publikovani podaci nisu saglasni. Statistički značajnu povezanost između navike pušenja i inficiranosti HPV utvrdili su Vaccarella i sar. (2008), u velikoj populaciono baziranoj studiji, koja je sprovedena na četiri kontinenta i 10 regiona sveta. Herrero i sar. (2005) su među ženama iz Costa Rike utvrdili povezanost pušenja i infekcije HPV tipom 16. Nasuprot tome, Sellors i sar. (2000) na području Kanade, kao i Kjaer sar. (1997) na području Danske nisu pronašli pozitivnu korelaciju između pušenja i HPV DNK pozitivnosti. Smatra se da produkti duvanskog dima olakšavaju sticanje i perzistentnost HPV infekcije, putem uticaja na smanjenje u broju Langerhansovih ćelija i CD4 limfocita, koji su markeri lokalnog imunog odgovora u grliću materice. Pored toga, pušenje može

smanjiti aktivnost NK ćelija (eng. natural killer) i time uticati na prirodni imuni odgovor organizma. Iako, data varijabla nije bila statistički značajano povezana sa HPV DNK pozitivnim rezultatom ($p=0,232$) treba naglasiti da je procenat pušača u sprovedenom istraživanju bio veći među HPV pozitivnim (32,2%) nego među HPV negativnim ženama (27,6%).

Alkohol je visoko pozicioniran na listi uzročnika pojedinih maligniteta, s obzirom da je od strane IARC svrstan u Grupu 1 karcinogena za ljude. Globalno, 3,6% svih slučajeva karcinoma i 3,5% smrtnih slučajeva od karcinoma, pripisuju se konzumiranju alkohola (*Boffetta i sar., 2006*). Međutim, uticaj konzumiranja alkohola na prevalenciju HPV infekcije, kao i uticaj upotrebe alkohola na nastanak karcinoma grlića materice, istraživana je u ograničenom broju studija (*Weiderpass i sar., 2001*). U jednoj studiji sprovedenoj među Korejskim ženama nađeno je da žene koje konzumiraju alkohol imaju dva puta veću šansu za razvoj CIN1 lezije 2,18 (95% CI 1,22–3,89) u poređenju sa ženama koje ne piju alkohol. Pozitivnu korelaciju između unosa alkohola i povećanog rizik za nastanak invazivnog karcinoma grlića materice kao i kancera vagine potvrdili su švedski istraživači (*Weiderpass i sar., 2001*), koji su ujedno istakli da se konzumiranje alkoholna povezuje sa nepoželjnim stilovima života kao što promiskuitet, pušenje, upotreba kontraceptivnih hormona i nepravilne ishrane. U okviru ovog rada univarijantnom analizom pokazano je da žene koje konzumiraju alkohol imaju dva puta veću verovatnoću ($OR=2,02$) (95% CI:1,053-3,949) za prisustvo HPV infekcije u odnosu na one koje ne koriste alkohol. Međutim, statistička značajnost ove povezanosti nije potvrđena u multivarijacionom modelu.

U sprovedenom istraživanju analizirani su intervali redovnih ginekoloških kontrola, znanja o uticaju HPV na ljudsko zdravlje i prethodno urađene analize na HPV, odnosno faktori povezani sa značajem prevencije i ranog otkrivanja raka grlića materice. Većina žena našeg regiona (82,2%) je dala podatak da odlazi redovno na ginekološke preglede; 8,6% ginekološku kontrolu obavlja svake dve godine; 1,9% jednom u pet godina; dok se 7,3% ispitanica javlja ginekologu samo po pojavi tegoba. S obzirom da su ispitivni uzorak činile žene koje su od strane ginekologa, prema indikacijama upućene na testiranje HPV, podaci se znatno razlikuju od podataka dobijenih u Izveštaju zdravlja stanovnika Republike Srbije za 2013. godinu (*IPSOS Marketing Strategy, 2013*). U periodu od godinu dana pre ispitivanja, svog ginekologa je posetilo 34,9% žena iz Srbije, a razlike u ovom pogledu postoje prema regionu, tipu naselja, obrazovanju i materijalnom stanju domaćinstva. Tako je u poslednjih godinu dana ginekologa posetio najveći procenat visoko obrazovanih žena (52,3%), žena iz najbogatijeg sloja stanovništva (47,8%) i žena iz urbanih naselja (38,7%). Karcinom grlića materice je preventabilan, ako se dijagnostikuje

u ranoj fazi, s obzirom na dugu premalignu fazu i izuzetno efikasno lečenje premalignih promena. Sve ovo ukazuje na značaj prevencije i ranog otkrivanja raka grlića materice. Prema podacima Američkog društva za kancer (*American Cancer Society*) u SAD, većina žena sa dijagnozom raka grlića materice, nikada pre nego što im je dijagnostikovano karcinom, nisu uradile PAPA test ili su ga radile u dužim intervalima nego što je preporučeno (*ACS, 2014*). Kvalitativna studija koja je u Engleskoj istraživala razloge neuspeha skrining programa raka grlića materice, ukazuje na širok spektar barijera: nedostatak znanja o skriningu, nizak stepen percepcije rizika, nelagode ili straha od testa, negativna iskustva iz prošlosti i praktične teškoće, kao što su nedostatak vremena (*Marlow i sar., 2015*). Rezultati ove studije pokazuju da je svega 24% žena sa područja Južnobačkog okruga informisano o postojanju HPV kao uzročniku seksualno prenosivih infekcija, a približno sličan procenat žena je u predhodnom periodu uradio analizu na HPV. Uloga informisanosti žena o HPV kao uzročniku cervikalnog karcinoma doprinosi češćem obavljanju preventivnih pregleda, čime se smanjuje rizik za napredovanje nastalih lezija do karcinoma.

Rezultati dobijeni u ovom radu koji se odnose na uticaj različitih faktora rizika za koje je pokazano da utiču na sticanje HPV infekcije i virusnu perzistenciju su u skladu sa rezultatima istraživanja u drugim delovima sveta. Žene sa HPV infekcijom i sa većim brojem pozitivnih faktora rizika mogu se svrstati u rizičnu grupu za nastanak cervikalnih neoplazija. Takve žene je važno identifikovati na samom početku, pre pojave bolesti, radi efikasnijeg praćenja, tretmana i kontrole. Rezultati istraživanja istovremeno ukazuju na potrebu kontinuirnog sprovođenja edukativnih programa, obezbeđivanje adekvatnih izvora informacija, organizovanje medijskih kampanja usmerenih na očuvanje i unapređenje zdravlja, prevenciju i rano otkrivanje malignih bolesti. Neophodno je uključivanje edukacije o zdravlju u nastavni program ustanova predškolskog, osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja kroz zajedničke programe Ministarstva zdravlja i Ministarstva prosvete.

6.3. Varijabilnost HPV genotipova

U novije vreme sve veći broj studija sugeriše da se genotipske varijante HPV, uprkos filogenetskoj srodnosti, mogu razlikovati u patogenosti (*Chen i sar., 2011; Gurgel i sar., 2015*) i različito doprineti razvoju cervikalnih neoplazija. Ovaj fenomen može se objasniti prirodom varijanti koje menjaju imunogena i / ili kancerogena svojstva virusa (*Burk i sar., 2013*).

Zbog medicinskog značaja, dominantan istraživački fokus je stavljen na povezanost molekularnih varijanti sa prekanceroznim i patološkim lezijama (*Burk i sar., 2013*). Podaci komparativne multicentrične studije bazirane na HPV-pozitivnim uzorcima IARC BioBanke, kao i podaci mnogobrojnih sporadičnih studija širom sveta su pokazali regionalnu rasprostranjenost HPV varijanti i razlike u kapacitetu transformacije humanih keratinocita (*Chen i sar., 2011; Cornet i sar., 2013*). Opsežne studije za proučavanje molekularnih varijanti HPV sprovedene su u raznim delovima sveta (*Yamada i sar., 1995; Sichero i sar., 2007; Perez i sar., 2014; Gurgel i sar., 2015*), dok je na prostorima Jugoistočne Evrope i Balkana ova problematika slabo istražena. Oko 48 HPV izolata poreklom iz naše zemlje, sekvencirano je na nivou L1 i E1 gena i deponovano u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem: EU779709-EU779757. Parcijalna karakterizacija 105 izolata onkogenih tipova HPV do sada je urađena u Grčkoj (*Ntova i sar., 2012*), dok je na području Hrvatske izvršena karakterizacija HPV tipa 16, na nivou E1 i E6 gena (*Sabol i sar., 2012*).

Da bi se približnije sagledala uloga genotipskih varijanti koje cirkulišu na prostoru Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, izvršena je parcijalna molekularna karakterizacija HPV tipova: 16, 18, 31 i 33, na nivou L1 gena, u 39 uzoraka žena sa različitim citološkom dijagnozom. Nukleotidna udaljenost među sekvencama HPV tipa 16 koje su poreklom iz našeg regiona je iznosila 0-2%, što potvrđuje razlike na nivou varijanti. Najveći procenat 27/28(96,4%) izolata HPV tipa 16 iz našeg područja je klasifikovan u evropske varijante, odnosno, u liniju A. Pri tome, 6/27 (22,2%) je pripadalo podliniji A3, a 21/27(77,7%) podliniji A4, dok je jedan izolat 1/28 (3,6%) pripadao ne-evropskim varijantama i svrstan je u liniju D (podlinija D1). Prema klasifikaciji (*Yamada i sar., 1995*) koja se oslanjala na geografsko poreklo varijanti HPV tipa 16, podlinija A3 obuhvata evropske varijante (E), podlinija A4 evro-azijske varijante EAs, dok podlinija D1 pripada severno-američkim (NA1) varijantama. U odnosu na ostale referentne genotipove najveća razlika je nađena u odnosu na azijsko-američke varijante, odnosno podlinije D2 i D3, linije D.

Prema rezultatima u ovom radu, HPV 16 varijante linije A, dominiraju u području AP Vojvodine. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature, koji govore da varijante HPV tipa 16 pokazuju jasne geografske i etničke razlike (*Sichero i Villa, 2006; Chen i sar., 2011; Chen i sar., 2013; Burk i sar., 2013*). Prema Yamada i sar. (1995) evropske (E) varijante HPV tipa 16 dominiraju u Evropi i Severnoj Americi; afričke varijante (Af1 i Af2) nađene su u 92% karcinoma afričkih žena; azijske varijante (As) su pronađene, uglavnom, u jugoistočnoj Aziji, dok je azijsko-američka (AA) varijanta

karakteristična za područje Centralne i Južne Amerike. U uzorcima karcinoma grlića materice među 40 pacijentkinja iz Slovenije, evropske varijante HPV 16 su pronađene u 95% izolata, dok je svega 5% slučajeva bilo povezano sa ne-evropskim varijantama (*Vrtačnik i sar., 2010*). U studiji Cento i sar. (2009) na području Italije, među 39 izolata pozitivnih na HPV16 L1, nađena je izuzetno visoka zastupljenost evropskih varijanti (98,4%), pri čemu je 64,1% izolata pokazalo sličnost sa evropskom prototip sekvencom. U pomenutom istraživanju samo je jedan izolat (1,6%) pripadao azijsko-američkom klasteru (AA). Slične podatke publikovali su i španski autori, a koji pokazuju da su na području Španije zastupljene varijante linije A, odnosno evropske varijante, dok su varijante linije D (azijsko-američke) nađene u nižem procentu (*Perez i sar., 2014*).

Cilj velikog broja studija koje su proučavale genetsku heterogenost varijanti različitih HPV tipova je bio da istraži povezanost varijante određenog HPV tipa sa premalignim i malignim lezijama na grliću materice (*Cornet i sar., 2012; Cornet i sar., 2013; Gurgel i sar., 2015*). Rezultati mnogobrojnih istraživanja ukazuju na to da evropske varijante HPV tipa 16 imaju manji onkogeni potencijal u odnosu na ne-evropske varijante (*Sichero i sar., 2007; Burk i sar., 2013*). U studiji sprovedenoj u Severnom Brazilu, Freitas i sar. (2014) su utvrdili da je 65,8 % izolata HPV tipa 16 pripadalo evropskom klasteru (linija A), a 34,2 % ne-evropskom (linije B, C i D), pri čemu su ne-evropske varijante češće nađene u teškim displazijama tipa CIN3. U studiji Xi i sar. (2006) na području Ujedinjenog Kraljevstva, utvrđeno je da infekcija Af-2 varijantom nosi 2,7 puta veći rizik (95% CI: 1,0-7,0:) od razvoja CIN3 lezija, u dvogodišnjem periodu, u poređenju sa evropskim varijantama, dok infekcija azijsko-američkom varijantom povećava rizik na 3,1 (95% CI: 1,6-6,0).

Pored problematike povezanosti određene varijante sa težinom citološke lezije, u novije vreme sve veći broj studija se bavi problematikom na koji način nukleotidne promene u genskoj sekvenci određenog regiona, dovode do promena u biološkoj funkciji proteina kodiranih ovim genima (*Cornet i sar., 2013; Gurgel i sar., 2015*). Tako je pokazano da nukleotidne promene u okviru HPV 16 L1 gena mogu igrati važnu ulogu u strukturi kapsidnog proteina, imunom prepoznavanju i virusnoj neutralizaciji (*Sichero i sar., 2007; Gurgel i sar., 2015*). Opsežnim proučavanjem genoma HPV tipa 16, uočene su mnogobrojne polimorfne pozicije koje mogu uticati na perzistentnost HPV infekcije i povećani rizik od progresije prekanceroznih lezija u karcinom grlića materice (*Cornet i sar., 2013*). Pokazano da je HPV16 ORF E6 otvoreni okvir čitanja veoma promenljiv. Najčešći polimorfizam u okviru ovog gena je 350G, koji dovodi do promene amino-kiseline leucin u valin, što ima uticaja na upornost HPV infekcije i povećani rizik od progresije nastalih lezija u karcinom grlića materice (*Cornet i sar., 2012*). Varijabilnost E6

proteina pokazuje veću sposobnost degradacije p53 proteina kod azijsko-američkih varijanti u poređenju sa evropskim varijantama (*Sichero i sar., 2007*).

Za razliku od HPV tipa 16 koji predstavlja najučestaliji HPV tip na području Evrope, prevalenca HPV tipa 18 u evropskom regionu je veoma niska (*Bruni i sar., 2010*). HPV18 je povezan sa pojavom adenokarcinoma *in situ* (AIS) i adenoskvamoznog karcinoma (ADSQ). Iako je učestalost adenokarcinoma manja u poređenju sa planocelularnim karcinomom grlića materice, smatra se agresivnijim, a bolest ima znatno lošiju prognozu (*Cole i Danos, 1987*). Distribucija varijanti HPV tipa 18 geografski i etnički je veoma specifična, što potvrđuju mnogobrojne studije (*Villa, 2000; Sichero i sar., 2007; Arroyo i sar., 2012*). Studije zastupljenosti varijanti HPV tipa 18, u odnosu na rasnu pripadnost, su pokazale da su bele američke žene najčešće inficirane evropskim varijantama, dok kod Afro-Amerikanki prevlađuju Afričke varijante (*Sichero i sar., 2007*). Analiza nukleotidne udaljenosti među sekvencama HPV tipa 18 poreklom iz našeg regiona je iznosila 0-2%, što potvrđuje razlike na nivou varijanti. U cilju približavanja hipoteze o potencijalnom geografskom i etničkom poreklu HPV18 varijanti, u okviru ovog rada u filogenetsku analizu su uključeni i referentni genotipovi odgovarajućih linija i podlinija. Rezultati filogenetske analize pokazali su podudarnost sa podacima iz literature. Najveći procenat 3/5 (60%) genomskih varijanti HPV 18 našeg regiona se nalazio na evropskom ogranku, linija A (podlinije A1 i A2), dok su se dva izolata izdvojena kao posebna grana.

Iako je geografska i etnička zavisnost varijanti HPV tipa 18 dobro definisana i dalje postoje polemike u pogledu onkogenog potencijala pojedinih varijanti. Hecht i sar. (1995) su među prvima utvrdili da su varijante HPV 18 sa nižim onkogenim potencijalom uglavnom retko prisutne u karcinomima grlića materice, a njihova zastupljenost u cervikalnim intraepitelijalnim lezijama se kreće oko 40%. Na osnovu analize 250 izolata HPV tipa 18, Villa i sar. (2000) su uočili da su neevropske HPV 18 varijante uporanije i više zastupljene u uznapređovalim invazivnim lezijama. U sistematskoj reviji, Burk i sar. (2013) navode da su azijsko-američke varijante četiri puta češće zastupljene u adenokarcinoma (ADC) u poređenju sa evropskim varijantama. Većina studija potvrđuju da nukleotidne supstitucije mogu igrati važnu ulogu u patogenim svojstvima varijanti HPV tipa 18. Ispitujući intratipsku varijabilnost u okviru E6 gena, de Boer i sar. (2005) su utvrdili da su azijsko-američke varijante, u poređenju sa evropskim varijantama, češće povezane sa adenokarcinomom (ADC), dok su afričke varijanta isključivo povezane sa skvamoznim celularnim karcinomom (SCC).

HPV 31 se smatra četvrtim najčešćim tipom HPV u skvamoznim karcinomima grlića materice, a često je zastupljen i kod asimptomatskih pacijenata širom sveta

(Munoz i sar., 2003). Klinička relevantnost HPV 31 varijanti je i dalje nepoznata (Liu i sar., 2014). Varijante HPV tipa 31 su klasifikovane u tri glavne linije: A (podlinije A1 i A2), B (podlinije B1 i B2) i C (podlinije C1 i C2). Za razliku od varijanti HPV tipa 16 i 18, čija filogenetska analiza pokazuje etničke i geografske klastere, varijante HPV tipa 31 ne pokazuju geografsku i etničku zavisnost (Liu i sar., 2014). Ovaj fenomen je primećen za HPV tipove: 33, 35, 52, 58 i 67 (Chen i sar., 2011). Rezultati u ovom radu saglasni su sa pomenutim zapažanjem. Filogenetska analiza izolata HPV tipa 31 je pokazala da na području AP Vojvodine cirkulišu varijante koje se mogu grupisati u sve tri linije. Međutim, treba naglasiti da je u ovom radu filogenetska analiza izvedena samo sa tri HPV 31 izolata, pa se sa preciznošću ne može utvrditi koja linija dominira u našem regionu. U narednom periodu istraživanje bi trebalo nastaviti na većem broju uzoraka.

Studija koju su sproveli Xi i sar. (2012) imala je za cilj da ispita varijante HPV 31 kao poseban filogenetski entitet i omogući bolje razumevanje njihove patogeneze. U istraživanju je učestvovalo 470 ispitanica iz UK sa ASCUS i LSIL citologijom, koje su praćene u periodu od dve godine. Rezultati studije su pokazali etničke razlike, odnosno da su varijante linije A zastupljenije kod belih žena, dok su varijante C zastupljenije u Afro-Američkoj populaciji. Prema rezultatima „ALTS“ studije, varijante A i B linije pokazuju značajno veći rizik za razvitak CIN2/3 lezija u poređenju sa varijantama linije C (Xi i sar., 2012). U studiji sprovedenoj u Kini nađene su varijante koje pripadaju liniji A (64,3%) i liniji C (35,7%), dok varijante linije B nisu nađene.

HPV 33 čini oko 5% slučajeva raka grlića materice u svetu, sa većim ili manjim varijacijama u zavisnosti od geografskog područja (Li i sar., 2011; Guan i sar., 2012). Tako na primer, HPV33 se nalazi u 5,4% slučajeva raka grlića materice u istočnoj Aziji, dok je u Okeaniji nađen u samo 1,7% slučajeva (Li i sar., 2011). Genetska varijabilnost u okviru HPV 33 je opisana u nekoliko studija (Stewart i sar., 1996; Chen i sar., 2011; Chen i sar., 2013). Varijante HPV tipa 33 su klasifikovane u dve glavne linije: A i B. Linija A obuhvata sublinije: A1, A2 i A3, pri čemu su sublinije A1 i A2 najzastupljenije u Evropi i Severnoj Americi. Linija B obuhvata samo jednu subliniju B1 (Chen i sar., 2011). U julu 2013. godine Burk i sar. su prijavili izolat BF375, koji je svrstan u liniju C.

U novije vreme nekoliko studija daje podatke da je distribucija HPV33 varijanti širom sveta geografski i etnički veoma specifična (Chen i sar., 2014). Podlinija A1 rasprostranjena je širom sveta, a relativna učestalost ove podlinije varira u zavisnosti od regiona. Varijante podlinije A2 se retko otkrivaju u Africi i Južnoj Americi, A3 podlinija je specifičan za Aziju i Okeaniju, dok je linija B specifična za Afriku. Geografska heterogenost varijantnih linija i podlinija HPV tipa 33 otežava mogućnost upoređivanja onkogenog potencijala ovog tipa virusa širom sveta. Koristeći podatke IARC

multicentrične studije, Chen i sar. (2014) su utvrdili značajnu povezanost između varijanti HPV 33 koje pripadaju podliniji A1 i raka grlića materice u Evropi i Africi. Od tri uspešno sekvencirana izolata HPV tipa 33 iz našeg regiona, sva tri su pripadala liniji A (podlinije A1 i A2). Nijedan izolat iz našeg regiona nije pokazao sličnost sa varijantama koje pripadaju liniji B i C. Pomenuti rezultati Chen i sar., (2014) mogu u izvesnoj meri dati objašnjenje za visoku učestalost HPV tipa 33 u visokostepenim lezijama tipa HSIL u našem regionu.

HPV tip 51 je među uzorcima dobijenim od žena sa teritorije Vojvodine imao veoma visoku prevalenciju, odmah posle tipa 16 i 31, zbog čega je ovaj virus odabran za detaljnije analize linija i podlinija. Tip 51 je podeljen na dve linije, A i B, pri čemu linija A ima 4 podlinije (A1-A4), a linija B dve (B1 i B2) (*Burk i sar., 2013*). Analizirano je 11 pozitivnih DNK, koje su odabrane na osnovu kriterijuma monoinfekcije i dovoljne količine materijala za PCR-RFLP analizu. Analiza je pokazala da svi ispitivani virusi tipa 51, na osnovu PCR-RFLP analize odgovaraju liniji A i podliniji A1. Iako tip 51 spada u visokorizične tipove, kada je u pitanju oboljevanje od karcinoma gliča materice, prethodno je dokazano da je samo u malom broju uzoraka sa CIN3+ patologijom dokazan ovaj tip virusa (*Shiffman i sar, 2010*). Takođe, isti autori su utvrdili da je signifikantno veća mogućnost maligne transformacije ćelija inficiranih linijom B, nego linijom A. Ovo je u skladu sa rezultatima ovog rada, u kome je tip 51 detektovan u najvećem broju slučajeva u LSIL grupi, koja histološki odgovara CIN1 patologiji. Dobijeni rezultati ukazuju da tip 51 nema visoki onkogeni potencijal, odnosno linija A.

Na osnovu PCR-RFLP analize, moguće je dobiti informaciju o liniji tipa 51 veoma brzo, a što je sa aspekta onkogenog potencijala B linije, brze dijagnostike i prognostičkog značaja veoma važno. Naime, PCR produkt na nivou L1 gena sa TaqI enzimom daje različite fragmente za A i B linije (Tabela 6.1). U slučaju potrebe za diferenciranjem podlinija A i B može se izvršiti digestija PCR produkta L2 gena sa TaqI i E1 gena sa DraI enzimom, prema prikazanoj šemi.

Tabela 6.1 Šema brze diferencijacije A i B linije i odgovarajućih podlinija HPV tipa 51 primenom PCR-RFLP metode

Podlinije	L1 sa TaqI	L2 sa TaqI	E1 sa Dra I
A1	1213	900	284,149, 74, 45
A2	1213	900	284,194,74
A3	1213	900 ili nema produkta	Nema produkta
A4	980, 132, 101 ili nema produkta	668, 132 i 100 ili nema produkta	284,149, 74, 45

B1	980,233	668 i 232	284,149, 74, 45
B2	980,233	Nema produkta	284,149, 74, 45

Ne treba izgubiti iz vida ni činjenicu da je korišćena mutiplex-real-time PCR metoda zasnovana na prajmerima za E7 gen, a njihova tačna sekvenca nije poznata. Postoji mogućnost da se primenjenom metodom detektuje prvenstveno linija A, odnosno podlinija A1, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi da je ova linija i najučestalija na našem području. Generalno, na osnovu drugih dostupnih kompletnih sekvenci genoma i sekvenci L1 i L2 gena, može se primetiti da većina pripada liniji A i da je ona učestalija u odnosu na liniju B.

Mutacije kod HPV se dešavaju veoma retko. Ovi virusi ne poseduju sopstvenu polimerazu, već koriste polimerazu ćelije za svoju replikaciju, koja je visoko pouzdana, odnosno ima mogućnost otklanjanja grešaka u procesu replikacije DNK. Pretpostavlja se da se mutacije dešavaju na tri načina: HPV menja biohemijsko okruženje u kome se vrši replikacija i može da povećava učestalost mutacija; HPV DNK je ciljani molekul za APOBEC3 citidin-dezaminazu, koja rezultira u C>>T promenama; treći način je delovanjem UV svetlosti u tkivu izloženom sunčevoj svetlosti. I pored toga, HPV kao dsDNK virus, ima veoma nisku stopu mutacija i veoma sporo evoluiru. Za kodirajuće regione genoma, stopa substitucija je 2×10^{-8} - 5×10^{-9} po godini. Ova stopa za nekodirajuće, regulatorne sekvence je dva puta veća. Navedene vrednosti su slične onima za učestalost substitucija kod sisara, što se objašnjava aktivnošću polimeraze domaćina. Pokazano je da se evolucije HPV dešava veoma sporo, da bi mogla da se proučava serijskim uzorkovanjem. Npr. dva izolata BPV1, uzorkovana u Švedskoj i u Viskonsinu, sa vremenskom distancom od 30 godina, pokazala su 99,89% sličnosti DNK sekvence, odnosno i dalje su pripadala istoj podliniji (*Bravo i Felez-Sanchez, 2015*). Drugi način promenljivosti HPV se ostvaruje posredstvom rekominacija. Dokazano je da se u kulturi ćelija mogu rekombinovati npr. tip 18 i 11 (*Orav i sar., 2013*), ali se generalno smatra da su rekombinacije ekstremno retka pojava (*Bravo i Felez-Sanchez, 2015*). Pretpostavka je da se promenljivost ostvaruje prvenstveno akumulacijom genetskih promena na nivou pojedinačnih nukleotida, pri čemu nukleotidni polimorfizam i/ili insercije/delecije teže da se fiksiraju u određenim linijama. Tokom vremena, nukleotidne varijacije određenih linija mogu da dovedu do pojave novih tipova, a tipovi se smatraju ekstremno stabilnim. Naime, da bi dva virusa koji potiču od zajedničkog pretka, ostvarila 10% i više razlika u nukleotidnim pozicijama, što ih čini različitim tipovima, potrebni su milioni godina (*Chen i sar., 2009; Rector i sar., 2007*). Veoma spora evolucija bi mogla biti

objašnjenje za dominaciju određenih tipova i/ili njihovih linija/podlinija, a na osnovu dosadašnjih saznanja, može se pretpostaviti da su detektovani genotipovi sa nižom prevalencom introdukovani kao posledica globalizacije iz drugih etničkih zajednica, odnosno sa udaljenih geografskih područja.

7.0. Zaključci

Na osnovu rezultata, a u skladu sa ciljevima istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Prevalencija HPV infekcije kod testiranih žena Južnobačkog okruga, AP Vojvodine iznosi 51,8%.
- Infekcija jednim HPV tipom potvrđena je kod 59,2% žena, sa dva HPV tipa kod 26,1%, sa tri tipa kod 8,2%, a sa četiri i više tipova kod 6,5% žena pozitivnih na HPV infekciju. Najzastupljeniji visokoonkogeno rizični HPV tipovi su: HPV16 (34,2%), HPV31 (20,2%), HPV51 (13%), HPV33 (11,6%), HPV52 (11%) i HPV18 (11%). HPV tipovi 16 i 33 su najzastupljeniji u starosnoj grupi od 31 do 40 godina (25,5% i 6,21%), dok su HPV tipovi 18, 31 i 51 najčešće dokazani kod žena mlađih od 30 godina (7,04% , 8,16% , i 12,3%).
- Kod žena sa citologijom tipa ASCUS najzastupljeniji su HPV 16 (11,35%) i HPV 31 (11,97%), u grupi žena sa nisko stepenim intraepitelijalnim lezijama (LSIL) najčešći su HPV 16 (31,50%), HPV 51 (7,95%) i HPV 45 (5,62%), dok su u grupi žena sa visoko stepenim intraepitelijalnim lezijama (HSIL) najprisutniji HPV 16 (53,59%) i HPV 33 (10,33%).
- Korelacija prisustva HPV infekcije sa nivoom obrazovanja i brojem prekinutih trudnoća nije utvrđena, ali je utvrđeno da starost, bračni status i broj porođaja predstavljaju rizik za prisustvo HPV infekcije. Rizik od infekcije iznosi 3,4 kod žena mlađih od 25 godina, a kod žena starosti od 45-50 godina rizik je 0,5. Neudate žene imaju veći rizik od nastanka infekcije u odnosu na udate, a takođe žene koje su rađale jednom ili dva puta imaju manji rizik od prisustva infekcije u odnosu na one koje nisu rađale.
- Ispitanice koje su u poslednje dve godine ostvarile vezu sa jednim partnerom imaju dva puta manji rizik za sticanje HPV infekcije u odnosu na žene koje su ostvarile vezu sa dva partnera, dok kod žena koje su ostvarle vezu sa tri i više partnera rizik raste na 3,2;
- Upotreba kondoma pri svakom seksualnom odnosu, pušenje cigareta, upotreba oralnih kontraceptivnih sredstava i prisustvo ostalih seksualno prenosivih

infekcija ne predstavljaju značajne kofaktore rizika za nastanak ili perzistenciju HPV infekcije, ali je utvrđeno da žene koje konzumiraju alkohol imaju dva puta veći rizik u odnosu na one koje ne koriste.

- Visok procent zastupljenosti visokoonkogenih tipova 16 i 18 (45,5%) opravdava primenu bivalentne (HPV2) i kvadrivalentne (HPV4) profilaktičke vakcine, od koje se očekuje smanjenje infekcija i do 50% , a primenom devetovalentne vakcine bi se ostvario preventivni efekat čak kod 90% ispitivanih žena.
- Filogenetskim ispitivanjem 39 HPV izolata, na nivou L1 gena, poreklom iz Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, potvrđena je pripadnost identifikovanih genotipova rodu Alpha-papillomavirus i pripadnost HPV tipova: 16, 31 i 33 visoko onkogenoj vrsti Alpha-9, a HPV tipa 18 vrsti Alpha-7.
- Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci HPV tipa 16 je potvrdila da se najveći broj izolata iz Južnobačkog okruga, AP Vojvodine grupiše u liniju A, (podlinije A3 i A4) dok se jedan izolat izvojio u liniju D (podlinija D1).
- Filogenetska analiza dobijena na osnovu nukleotidnih sekvenci HPV tipa 18 je potvrdila pripadnost navedenom genotipu, pri čemu se tri izolata grupišu u liniju A, dok se dva izolata izvajaju kao posebne grane.
- Filogenetska analiza dobijena na osnovu tri HPV 31 izolata sa našeg područja je potvrdila pripadnost linijama A, B i C.
- Filogenetska analiza dobijenih HPV 33 izolata iz našeg istraživanja je potvrdila pripadnost liniji A (podlinije A1 i A2).
- Sve dobijene nukleotidne distance su pokazale da su razlika između ispitivanih i referentnih HPV sekvenci na nivou varijanti, odnosno manja od 2%.
- Primena PCR-RFLP metode je ukazala da svi izolati HPV tipa 51 pokazuju veoma visok stepen sličnosti liniji A (podliniji A1).

Heterogenost HPV tipova i linija na području AP Vojvodine može se pripisati intenzivnom kretanju i migracijama stanovništava u proteklim decenijama. U pilog tome ide i utvrđena ujednačenost genotipskih varijanti HPV, odnosno nizak procenat nukleotidnih distanci između varijanti iste linije, što je posledica niske stope promenljivosti ovih virusa. Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalje proučavanje distribucije HPV, određenih tipova i genetičkih varijanti u žena vojvođanske populacije. Rutinska detekcija HPV infekcije i odgovarajućih visokoonkogenih tipova virusa u uzorcima je od velikog kliničkog značaja u prevenciji pojave i ranom otkrivanju malignih alteracija ćelija grlića materice .

8.0. Literatura

- Ajiro M., Zheng Z.M. Oncogenes and RNA splicing of human tumor viruses. *Emerg Microbes Infect* 2014; 3(9): e63.
- Alam S., Conway M.J., Chen H.S., Meyers C. The Cigarette Smoke Carcinogen Benzoapyrene Enhances Human Papillomavirus Synthesis. *J Virol* 2008; 82(2): 1053–1058.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410.
- ASC: American Cancer Society. Cervical Cancer Prevention and Early Detection. Last Revised: 12/11/2014. Available online at: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003167-pdf.pdf>.
- Anton G., Peltecu G., Socolov D., Cornitescu F., Bleotu C., Sgarbura Z., et al. Type specific human papillomavirus detection in cervical smears in Romania. *APMIs* 2011; 119(1): 1-9.
- Appleby P., Beral V., Berrington de Gonzáles A., Colin D., Franceschi S., Green J., et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 119: 1108–1124.
- Arroyo S.L., Basaras M., Arrese E., Hernández S., Andía D., Esteban V., et al. Human Papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virology* 2012; 9: 258.
- Bakogianni G.D., Nikolakopoulos K.M., Nikolakopoulou N.M. HPV vaccine acceptance among female Greek students. *Int J Adolesc Med Health* 2010; 22(2):271-3.
- Barton S.E., Maddox P.H., Jenkins D., Edwards R., Cuzick J., Singer A. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet* 1988; 2:652-54.
- Bauer H.M., Hildesheim A., Schiffman M.H., Glass A.G., Rush B.B., Scott D.R., et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-278.
- Bernard H.U., Chan S.Y., Manos M.M., Ong C.K., Villa L.L., Delius H., et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170:1077–85.
- Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401:70–79.
- Bernard H.U. Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 2013; 445(1): 197-204.

- Bidhu K.M., Aman S. Human Papilloma Virus in Head and Neck Cancers-The Present and the Future. *Sci Rep* 2012; 1: 452.
- Bishop B., Dasgupta J., Klein M., Garcea R.L., Christensen N.D., Zhao R. et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 2007; 282(43): 31803-31811.
- Boffetta P., Hashibe M., La Vecchia C., Zatonski W., Rehm J. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer* 2006; 119(4): 884–7.
- Bosch F.X., Burchell A.N., Schiffman M., Giuliano A.R., de Sanjose S., Bruni L., et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine* 2008; 26S: K1–K16
- Bravo I.G., Alonso A. Mucosal Human Papillomaviruses Encode Four Different E5 Proteins Whose Chemistry and Phylogeny Correlate with Malignant or Benign Growth. *J Virol* 2004; 78 (24): 13613-13626.
- Bravo I.G., Féliz-Sánchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *EMPH* 2015; (1): 32–51.
- Bruni L., Diaz, M., Castellsagué M., Ferrer E., Bosch F. X., 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): 1789-1799.
- Bruni L., Brotons M., Barrionuevo-Rosas L., Serrano B., Cosano R., Munoz J., et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Serbia. Summary Report 2014-03-17. [Data Accessed]. Available from: <http://www.hpvcentre.net/>
- Bruni L., Barrionuevo-Rosas L., Albero G., Aldea M., Serrano B., Valencia S., et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Serbia. Summary Report 2015- 12-23. [Data Accessed] Summary Report 2015-12-23. [Data Accessed]. Available from: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/SRB.pdf>
- Burd E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1-17.
- Burchell A.N., Winer R.L., de Sanjosé S., Franco E.L. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24(Suppl 3):S52-61.
- Burk R.D., Harari A., Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 2013; 445: 232–243.
- Bzhalava D., Eklund C., Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* 2015; 476: 341-344.
- Carrilho E. DNA sequencing by capillary array electrophoresis and microfabricated array systems. *Electrophoresis* 2000; 21: 55–65.

- Castle P.E., Shields T., Kirnbauer R., Manos M.M., Burk R.D., Glass A.G., Schiffman M. Sexual behavior, human papillomavirus type 16 (HPV 16) infection, and HPV 16 seropositivity. *Sex Transm Dis* 2002; 29(3): 182-187.
- Castellsague X., Bosch F.X., Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus res* 2002; 89(2): 191-199.
- Castellsague X., Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Inst Monogr* 2003; 31: 20-8.
- CDC panel recommends HPV vaccine for boys, too. October 25, 2011. Available on line at: <http://www.livescience.com/16707-hpv-vaccine-boys-cdc-recommendations>.
- Cento V., Ciccozzi M., Ronga L., Perno C.F., Ciotti M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. *J Med Virol* 2009; 81:1627-1634.
- Chen Z., DeSalle R., Schiffman M., Herrero R., Burk R.D. Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol* 2009; 83: 1443-1455.
- Chen Z., Schiffman M., Herrero R., Desalle R., Anastos K., Segondy M., et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One* 2011; 6(5): e20183.
- Chen Z., Schiffman M., Herrero R., DeSalle R., Anastos K., Segondy M., Burk R.D. Evolution and Taxonomic Classification of Alphapapillomavirus 7 Complete Genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68 and HPV70. *PLoS One* 2013; 8(8): e72565.
- Chen A.A., Heideman D.A., Boon D., Chen Z., Burk R.D., De Vuyst, H., et al. Human papillomavirus 33 worldwide genetic variation and associated risk of cervical cancer. *Virology*, 2014; 448, 356-362.
- Chow L.T. Model systems to study the life cycle of human papillomaviruses and HPV-associated cancers. *Virology* 2015; 30(2): 92-100.
- Clifford G., Franceschi S., Diaz M., Munoz N., Villa L.L. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic disease. *Vaccine* 2006; 24S3, 26-34.
- Cole S.T., Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* 1987; 193(4): 599-608.
- Cornet I., Gheit T., Franceschi S., Vignat J., Burk R.D., Sylla B.S., and IARC HPV Variant Study Group. (2012). Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 2012; 86(12): 6855-6861.
- Cornet I., Gheit T., Iannaccone M.R., Vignat J., Sylla B.S., Del Mistro A., et al. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer* 2013; 108: 240-4.

- Crum C.P., Abbott D.W., Quade B.J. Cervical cancer screening: from the papanicolaou smear to the vaccine era. *J Clin Oncol* 2003; 21(Suppl 10):224–230.
- Deacon J.M., Evans C.D., Yule R., Desai M., Binns W., Taylor C., Peto J. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case–control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2000; 83: 1565–1572
- de Boer M.A., Peters L.A.W., Aziz M.F., Siregar B., Cornain S., Vrede M,A. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* 2005; 114: 422–425.
- de Roda Husman A.M., Snijders P.J., Stel H.V., Van den Brule A.J., Meijer C.J., Walboomers J.M., et al. Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995; 72 : 412 – 417.
- de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17–27.
- de Villiers E.M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013; 445(1): 2-10.
- D'Abramo C.M., Archambault J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein-protein interactions. *Open Virol J* 2011;(5): 80–95
- Darragh T.M., Colgan T.J., Cox J.T., Heller D.S., Henry M.R., Luff R.D, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(10):1266-1297.
- de Sanjose S., Munoz N., Bosch F.X., Reimann K., Pedersen N.S., Orfila J., et al. Sexually transmitted agents and cervical neoplasia in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1994; 56(3): 358-363.
- de Sanjosé S., Diaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L., Muñoz N., Bosch F.X. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(7): 453-459.
- de Sanjose S., Quint W.G., Alemany L., Geraets D.T., Klaustermeier J.E., Lloveras B., et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010; 11: 1048-1056.
- de Sanjosé, S., Alemany L., Ordi J., Tous S., Alejo M., Bigby S.M., et al. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer* 2013; 49, 3450–3461.
- di Bonito P., Grasso F., Mochi S., Accardi L., Donà M.G., Branca M., et al. Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer* 2006; 8(1): 6.

- Dijkstra M.G., Snijders P.J.F., Arbyn M., Rijkaart D.C., Berkhof J., Meijer C.J.L.M. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Ann Oncol* 2014; 25 (5): 927-935.
- Doorbar J., Evans H.S., Coneron I., Crawford L.V., Gallimore P.H. Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *EMBO J* 1988; (3): 825
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 2: 7-15.
- Doorbar J., Egawa N., Griffin H., Kranjec C., Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 2015; 25(S1): 2-23.
- Duensing A., Liu Y., Perdreau S., Kleylein-Sohn J., Nigg E.A., Duensing S. Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 2007; 26(43): 6280-6288.
- Echenique I., Phillips B.R. Anal Warts and Anal Intradermal Neoplasia. *Clin Colon Rectal Surg* 2011; 24(1): 31–38.
- Eklund C., Forslund O., Wallin K.L., Zhou T., Dillner J. The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology. *J Clin Microbiol* 2012; 50(7): 2289-98 .
- Emsen I.M., Kabalar M.E. Epidermodysplasia verruciformis: An early and unusual presentation. *Can J Plast Surg* 2010; 18(1):21-24.
- Fahey L.M., Raff A.B., Da Silva D.M., Kast W.M. A major role for the minor capsid protein of human papillomavirus type 16 in immune escape. *J Immunol* 2009; 183(10): 6151-6156.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus taxonomy. The Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier. Family Papillomaviridae. 2005; pp. 239–255.
- FDA: Approval Letter - Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, 18) Vaccine, Recombinant. June 8, 2006. Available from: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm111283.htm>
- FDA: FDA Approves Roche's HPV Test for Identifying Women at Highest Risk for Cervical Cancer. Basel, 20 April 2011.
- FDA: Approves New Vaccine for Prevention of Cervical Cancer. For Immediate Release:. Available online at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm187048.htm>. Accessed 16 October 2009.
- FDA: FDA approves Gardasil 9 for prevention of certain cancers caused by five additional types of HPV. US Food and Drug Administration. Available :<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm426485.htm>. Accessed Dec 18 2014.
- FDA: Approves Roche's HPV Test for First-Line Primary Screening for Cervical Cancer. Basel, 25 April 2014. Available from:<http://www.roche.com>

- ^aFerlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase 2013; No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>.
- ^bFerlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W., Comber H., et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1374-403.
- Ferrera A., Velema J.P., Figueroa M., Bulnes R., Toro L.A., Claros J.M., Melchers W.J. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* 2000; 29(5): 817-825.
- Forslund O., Lindelöf B., Hradil E., Nordin P., Stenquist B., Kirnbauer R., Dillner J. High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors. *J Invest Dermatol* 2004; 123(2): 388-394.
- Freitas L.B., Chen Z., Muqui E.F., Boldrini N.A.T., Miranda A.E., Spano L.C., et al. Human Papillomavirus 16 Non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One* 2014; 9(7): e100746.
- Gajski L. HPV cjevivo – nepotrebno, beskorisno, štetno. *Nova prisutnost* 2014; 1: 113-128
- Gakidou E., Nordhagen S., Obermeyer Z. Coverage of Cervical Cancer Screening in 57 Countries: Low Average Levels and Large Inequalities. *PLoS Medicine* 2008; 5(6): e132.
- Gariglio P., Gutiérrez J., Cortés .E, Vázquez J. The role of retinoid deficiency andestrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 2009; 40(6): 449-465.
- Gasperov M.N., Sabol I., Matovina M., Spaventi S., Grce M. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathol Oncol Res* 2008; 14(4): 355–363.
- Gomez D.T., Santos J.L. Human papillomavirus infection and cervical cancer: pathogenesis and epidemiology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 2007; 1: 680-8.
- Grozdanov P., Zlatkov V., Ganchev G., Karagiosov I., Toncheva D., Galabov A.S. HPV prevalence and type distribution in women with normal or abnormal Pap smear in Bulgaria. *J Med Virol* 2014; 86(11):1905-10.
- Guan P., Howell-Jones R., Li N., Bruni L., de Sanjos 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): 2349-2359.
- Gurgel A.P.A.D., Chagas B.S., do Amaral C.M., Nascimento K.C.G., Leal L.R.S., Silva Neto J.D.C, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 130828.

- Hamers F.F. European Centre for Disease Prevention and Control. European Centre for Disease Prevention and Control issues guidance for the introduction of human papillomavirus (HPV) vaccines in European Union countries. *Euro Surveill* 2008; 24;13(4). pii: 8022.
- Harari A., Chen Z., Burk R.D. Human papillomavirus genomics: past, present and future. *Curr Probl Dermatol* 2014; 45: 1-18.
- Hebner C.M., Laimins L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006; 16(2): 83-97.
- Hecht J., Kadish A., Jiang G., Burk R. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* 1995; 60:369–376.
- Herrero R., Castle P.E., Schiffman M., et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1796-807
- Hesselink A.T., van Ham M.A., Heideman D.A., Groothuisink Z.M., Rozendaal .L, Berkhof J., et al. Comparison of GP5+/6+-PCR and SPF10-line blot assays for detection of high-risk human papillomavirus in samples from women with normal cytology results who develop grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3215–3221.
- Holschneider C. Chapter 59, Human papillomavirus and the management of the abnormal pap test, *Danforth's Obstetrics and Gynecology*, 2008, Wolters Kluwer, Philadelphia, PA.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975– 2008. Bethesda, April 15, accessed 2011, September 16MD: National Cancer Institute. [Online http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/index.html].
- HPV vakcinacija kao dodatna mera zaštite protiv raka grlića materice. SLD-Sekcija za citologiju i citodijagnostiku 2009.
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses, V.D., International Union of Microbiological Societies. The International Code of Virus Classification and Nomenclature. 2002. http://www.ictvonline.org/codeOfVirusClassification_2002.asp
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses Virus Taxonomy: 2014 Release. EC 46, Montreal, Canada, July 2014.
- IARC Working Group. International Agency for Research on Cancer. Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoking. Lyon:IARC Press; 1986. IARC publication no. 38
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of Human Carcinogens. Part B: Biological Agents. Lyon, France: IARC; 2009. p255-313.
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Part B of Volume 100. Review of Human Carcinogens. Lyon, France: IARC 2011.

- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Part A of Volume 100. Pharmaceuticals. A Review of Human Carcinogens. Lyon, France: IARC 2011.
- Iftner T., Villa L.L. Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies J Natl Cancer Inst Monogr 2003; (31): 80-88
- Ipsos Strategic Marketing, Istrazivanje zdravlja stanovnika Republike Srbije 2013. Available online at: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2014/jul2014/Jul2014IzvestajPreliminarni.pdf>.
- Jenkins D. Human papillomavirus vaccines: a complex decision focused on cancer prevention and cost-effectiveness. Lancet Infect Dis 2008; 8(10): 589.
- Jensen K.E., Schmiedel S., Norrild B., Frederiksen K., Iftner T., Kjaer S.K. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. Br J Cancer 2013; 108(1): 234-239.
- Jiang P., Yue Y. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). Exp Ther Med 2014; 7(1): 3-7.
- Jo H., Kim J.W. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. Cancer Ther 2005; 3: 419-434.
- Johansson C., Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. Nat Rev Microbiol 2013; 11: 239-251.
- Jordan J., Arbyn M., Martin-Hirsch P., Schenk U., Baldauf J.J., Da Silva D., et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. Cytopathology 2008; 19: 342-354.
- Joura E.A., Ault K.A., Bosch F., Brown D., Cuzick J., Ferris D., et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2014; 23(10): 1997-2008.
- Kajitani N., Satsuka A., Kawate A., Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. Front Microbiol 2012; 24 (3): 152
- Kanancelarija za skrining raka. Skrining raka grlića materice. <http://www.skriningsrbija.rs/srl/skrining-raka-grlica-materice/statistika/>
- Kjaer S.K., van den Brule A.J., Bock J.E., Poll .PA., Engholm G., Sherman M.E., et al. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997; 6: 799-805.
- Kahn J.A., Lan D., Kahn RS: Sociodemographic factors associated with high-risk human papillomavirus infection. Obstet Gynecol. 2007, 110: 87-95.
- Kesic V., Poljak M., Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in europe. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2012; 21(9): 1423-1433.

- Kim T.J., Jin H.T., Hur S.Y., Yang H.G., Seo Y.B., Hong S.R., et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. *Nat commun* 2014; 5:5317.
- Kitchener H.C., Gilham C., Sargent A., Bailey A., Albrow R., Roberts C., et al. A comparison of HPV DNA testing and liquid based cytology over three rounds of primary cervical screening: extended follow up in the ARTISTIC trial. *Eur J Cancer* 2011; 47(6):864-71.
- Klug S.J., Molijn A., Schopp B., Holz B., Iftner A., Quint W., et al. Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types. *J. Med. Virol.* 2008; 80:1264–1274.
- Kocjan B.J., Poljak M. *Medicinska virologija: Papiloma-virusi. Medicinski razgledi*, eds. Ljubljana; 2011. p. 41-60.
- Kopitović V., Stanković Baričak D. Programi posebne zdravstvene zaštite u AP Vojvodini. Zbornik radova: II Godišnja Medical Konferencija, 29-31. maj 2014, Bečići, Crna Gora, p.35-36.
- Koutsky L.A., Ault K.A., Wheeler C.M., Brown D.R., Barr E., Alvarez F.B., et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347(21), 1645-1651.
- Kroupis C., Vourlidis N. Human papilloma virus (HPV) molecular diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11):1783–1799
- Kurg R. *The Role of E2 proteins in Papillomavirus DNA replication*. INTECH Open Access Publisher, 2011.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23: 2947-2948.
- Lehtinen M., Dillner J. Clinical trials of human papillomavirus vaccines and beyond. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10(7): 400-410.
- Li N., Franceschi S., Howell-Jones R., Snijders P.J., Clifford G.M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011; 128: 927–935.
- Liu M., He Z., Xi L., Li J., Liu F., Liu Y., Pan Y., et al. The distribution and common amino acid polymorphisms of human papillomavirus (HPV)-31 variants in 2700 women from Northern China. *PLoS One* 2014; 9(6):e99141.
- Lurchachaiwong W., Junyangdikul P., Termrungruanglert W., Payungporn S., Sampatanukul P., Tresukosol, D. Whole-genome sequence analysis of human papillomavirus type 18 from infected Thai women. *Intervirol* 2010; 53(3), 161-166.
- Manos M.M., Ting Y., Wright D.K., Lewis A.J., Broker T.R. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cells* 1989; 7:209–14.

- Markowitz L.E., Dunne E.F., Saraiya M., Lawson H.W., Chesson H., Unger E.R. Quadrivalent human papillomavirus vaccine. *MMWR Recomm Rep* 2007; 56(RR-2), 1-24.
- Markowitz L.E., Dunne E.F., Saraiya M., Chesson H.W., Curtis C.R., Gee J., et al. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2014; 63(RR-05): 1-30.
- Marlow L .A., Waller J., Wardle J. Barriers to cervical cancer screening among ethnic minority women: a qualitative study. *J Fam Plann Reprod Health* 2015; jfprhc-2014-10108.
- Massad L.S., Collins Y.C., Meyer P.M. Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol oncol* 2001; 82(3): 516-522.
- Mayrand M.H., Duarte-Franco E., Rodrigues I., Walter S.D., Hanley J., Ferenczy A., Franco E.L. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007; 357(16): 1579-1588.
- Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(2): 560–564.
- McBride A.A., Jang M.K. Current understanding of the role of the Brd4 protein in the papillomavirus lifecycle. *Viruses* 2013; 5(6): 1374-1394.
- Mijović G., Jovanović T., Kuljić-Kapulica N., 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):1653-1658.
- Mollers M., Boot Hein J., Vriend Henrike J., King Audrey J., van den Broek Ingrid V.F., 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: 394-401.
- Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., L.J., van Doorn. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32S, S43-S51.
- Morozova O., Marra M.A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008; 92(5): 255-264.
- Moody C.A., Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(8): 550-560.
- Moscicki A.B., Schiffman M., Kjaer S., Villa L.L. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3): 42-51.
- Muñoz N., Bosch F.X., 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): 518-527.
- Muñoz N., Franceschi S., Bosetti C., Moreno V., Herrero R., Smith J.S., et al. International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and

- human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359(9312): 1093-1101.
- Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka grlića materice. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd. 2012. http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2012/Novembar/Vodic_ZaDijagnostikovanjeILečenjeRakaGrlicaMaterice.pdf
- National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Cervix Uteri Cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>. Accessed May 7, 2015
- Niedringhaus T.P., Milanova D., Kerby M.B., Snyder M.P., Barron A.E. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anall chem* 2011; 83(12): 4327-4341.
- Nischan P., Ebeling K., Schindler C. Smoking and invasive cervical cancer risk. Results from a case-control study. *Am J Epidemiol* 1988; 128(1): 74-77.
- Ntova C.K., Kottaridi C., Chranioti A., Spathis A., Kassinou D., Paraskevaidis E., et al. Genetic variability and phylogeny of high risk HPV type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 gene in Greek women. *Int J Mol Sci* 2012;13(1):1-17.
- Ong C.K., Chan S.Y., Campo M.S., Fujinaga K., Mavromara-Nazos P., Labropoulou V., et al. Evolution of human papillomavirus type 18: An ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993; 67 (11): 6424–6431.
- Orav M., Henno, L., Isok-Paas H., Geimanen J., Ustav M., Ustav E. Recombination-dependent oligomerization of human papillomavirus genomes upon transient DNA replication. *J virol* 2013; 87(22): 12051-12068.
- Origoni M., Cristoforoni P., Costa S., Mariani L., Scirpa P., Lorincz A., et al. HPV-DNA testing for cervical cancer precursors: from evidence to clinical practice. *Ecancermedalscience* 2012; 6: 258.
- Pang C.L., Thierry F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microb pathog* 2013; 58: 55-65.
- Parkin D.M. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br J Cancer* 2011; 105: S6-S13.
- Pathak N., Dodds J., Zamora J., Khan K. Accuracy of urinary human papillomavirus testing for presence of cervical HPV: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2014; 349:g5264.
- Pérez S., Cid A., Iñarrea A., Pato M., Lamas M.J., Couso B., et al. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia. Spain *PLoS ONE* 2014; 9(8): e104678.
- Petry K.U., Luyten A., Justus A., Iftner A., Strehlke S., Reinecke-Lüthge A. Prevalence of high-risk HPV types and associated genital diseases in women born in 1988/89 or 1983/84-results of

- WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 135.
- 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:e63395.
- Pim D., Bergant M., Boon S.S, Ganti K., Kranjec C., Massimi P., Banks L. Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J* 2012; 279(19): 3530-3537.
- Plummer M., Peto J., Franceschi S. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. *International Journal of Cancer. Int J Cancer* 2012; 130(11): 2638–2644.
- Pol S.B.V., Klingelutz A.J. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 2013; 445(1): 115-137.
- Poljak M. Kada i zašto koristiti HPV testove? Drugi regionalni Simpozijum o prevenciji raka grlića materice: Prevencija raka grlića materice-izazov koji traje. Beograd, 25-26 septembar, 2015; p.33-34.
- Pyeon D., Pearce S.M., Lank S.M., Ahlquist P., Lambert P.F. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 2009; 5(2): e1000318.
- Raliya R., Gulecha K., Choudhary K., Current. Trends in Advancement of Scientific Research and Opinion in Applied Microbiology and Biotechnology. Chapter 9: Enzymes for Genetic Engineering. 2013; p51.
- Ratnam S., Coutlee F., Fontaine D., Bentley J., Escott N., Ghatage P., et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA Test Is as Sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but More Specific at Detecting Cervical Precancer and Cancer. *J Clin Microbiol* 2011; 49(2): 557-564.
- Raybould R., Fiander A., Hibbitts S. Human papillomavirus integration and its role in cervical malignant progression. *Open Clin Cancer J* 2011; 5:1-7.
- Rector A., Lemey P., Tachezy R., Mostmans S., Ghim S.J., Van Doorslaer K., Roelke M., Bush M., Montali R.J., Joslin J., Burk R.D., Jenson A.B., Sundberg J.P., Shapiro B., Van Ranst M., 2007. Ancient papillomavirus-host co-speciation in Felidae. *Genome Biol.* 8, R57.
- Ronco G., Cuzick J., Pierotti P., Cariaggi M.P., Dalla Palma P., Naldoni C., et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening randomised controlled trial. *BMJ* 2007; 335(7609):28.
- Rositch A.F., Koshiol J., Hudgens M.G., Razzaghi H., Backes D.M., Pimenta J.M., et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: A literature review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2013; 133: 1271-1285.
- Sabol I., Matovina M., Si-Mohamed A., Grce M. Characterization and whole genome analysis of human papillomavirus type 16 e1-1374^Δ63nt variants. *PLoS one* 2012; 7(7): e41045.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74(12): 5463-5467.

- Sapp M., Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS journal* 2009; 276(24): 7206-7216.
- Sapp M.J. HPV virions hitchhike a ride on retromer complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(18): 7116-7117.
- Schiller J.T., Day P.M., Kines R.C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 2010; 118(1): S12-S17.
- Schiller J.T., Lowy D.R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10(10): 681-692.
- Schiffman M., Kjaer S.K. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 14-19.
- Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A.C., et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337(1), 76-84.
- Schiffman M., Rodriguez A.C., Chen Z., Wacholder S., Herrero R., Hildesheim A., et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 2010; 70(8): 3159-3169.
- Schiffman M., Wentzensen N., Wacholder S., Kinney W., Gage J.C., Castle P.E. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(5): 368-383.
- Schlecht N.F., Burk R.D., Palefsky J.M., Minkoff H., Xu X., Massad L., et al. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J Gen Virol* 2005; 86 (10):2709-2720.
- Serrano B., Alemany L., Tous S., Bruni L., Clifford G.M., Weiss T., et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer* 2012; 7(1): 38.
- Sellors J.W., Mahony J.B., Kaczorowski J., Lytwyn A., Bangura H., Chong S., Lorincz A., et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ* 2000;163:503-8.
- Sichero L., Villa L.L. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz J Med Biol Res* 2006;39(6):707-17.
- Sichero L., Ferreira S., Trottier H., Duarte-Franco E., Ferenczy A., Franco E.,L. Villa L.L. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer* 2007; 120:1763–1768.
- Smith J.S., Munoz N., Herrero R., Eluf-Neto J., Ngelangel C., Franceschi S. et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and Philippines. *J Infect Dis* 2002; 185: 324-31.

- Smith JS., Green J., Berrington de Gonzales A., Appleby P., Peto J., Plummer M. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systemic review. *Lancet* 2003; 361: 1159-67.
- Smith J.S., Lindsay L., Hoots B., Keys J., Franceschi S., Wine R., et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121(3):621–632.
- Snijders P.J., Heideman D.A., Meijer C.J. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *Apmis* 2010; 118(6-7): 520-528.
- Solomon D., Davey D., Kurman R., Moriarty A., O'Connor D., Prey M., et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* 2002; 287(16): 2114-2119.
- Stanley M.A. Immunobiology of genital HPV infection. *CME J Gynecol Oncol* 2009; 14: 36-43.
- Stanley M., Pinto L.A., Trimble C. Human Papillomavirus Vaccines–Immune Responses. *Vaccine* 2012; 20(5):F83-7.
- Stanley M. Immunology of HPV Infection. *Curr Obstet Gynecol Rep* 2015; 4(4): 195-200.
- StatSoft, Inc (2013). STATISTICA (data analysis software system); version 12. www.statsoft.com
- Stewart A.C., Eriksson A.M., Manos M.M., Muñoz N., Bosch F.X., Peto J., Wheeler C.M. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 1996; 70: 3127-3136.
- Stoler M.H., Wright T.C., Sharma A., Apple R., Gutekunst K., Wright T.L. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol* 2011; 135(3): 468-475.
- Sudenga S.L., Shrestha S. Key considerations and current perspectives of epidemiological studies on human papillomavirus persistence, the intermediate phenotype to cervical cancer. *Int J Infect Dis* 2013; 17(4): e216–e220.
- Sur T. The Role of HPV 16 E5 Protein and Its Interacting Partners in Cervical Cancer Cases. *Journal of Tumor* 2014; 2(7): 179-186.
- Surviladze Z., Dziduszko A., Ozbun M.A. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog* 2012; 8.2: e1002519.
- Takehara K., Toda T., Nishimura T., Sakane J., Kawakami Y., Mizunoe T., Taniyama K. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in uterine cervical squamous lesions from Japanese women. *Patholog Res Int* 2011: 246936.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2725-2729.

- Torres M., Fraile L., Echevarria J., Hernandez Novoa B., Ortiz M. Human Papillomavirus (HPV) Genotyping: Automation and Application in Routine Laboratory Testing. *Open Virol J* 2012; 6: 144–150.
- Xi L.F., Kiviat N.B., Hildesheim A., Galloway D.A., Wheeler C.M., Ho J., et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(15):1045-52.
- Xi L.F., Schiffman M., Koutsky L.A., Hulbert A., Lee S.K., Defilippis V., et al. Association of human papillomavirus type 31 variants with risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *Int J Cancer* 2012; 131(10): 2300-7.
- Vaccarella S., Herrero R., Snijders P.J., Dai M., Thomas J.O., Hieu N.T., et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol* 2008; 37(3): 536-46.
- van Alewijk D., Kleter B., Vent M., Delroisse J.M., de Koning M., van Doorn L.J., et al. An HPV testing algorithm comprising a combination of the L1 broad-spectrum SPF10 PCR and a novel E6 high-risk multiplex type-specific genotyping PCR. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1171-78.
- van Doorslaer K., Tan Q., Xirasagar S., Bandaru S., Gopalan V., Mohamoud Y., et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D571-D578.
- van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L, Calisher C.H., Carsten E.B., Estes M., et al. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses; Academic Press, New-York, San Diego 2000; 3-16.
- Varsani A., Williamson A.L., de Villiers D., Becker I., Christensen N.D., Rybicki E.P. Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16. *J Virol* 2003; 77(15): 8386-8393.
- Villa L.L., Sichero L., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T., Franco E.L. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81(12): 2959-2968.
- Villa L.L. Laboratory Methods for Detection of Human Papillomavirus Infection. In *Human Papillomavirus*. Springer Berlin Heidelberg, 2009; pp. 23-30.
- Vince A., Lepej S.Z. Klinička značajnost molekularne analize humanih papiloma virusa *Infektološki glasnik* 2010; 30(3): 123–129.
- Vinokurova S., Von Knebel D.M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PloS One* 2011; 6(9): e24451.
- Von Knebel Doeberitz M., Reuschenbach M. Human papillomaviruses in the pathogenesis of intraepithelial neoplasia (AIN) and carcinoma of the anus. *Hautarzt* 2010; 61(1):13-20.

- Vrtačnik-Bokal E., Kocjan B.J., Poljak M., Bogovac Ž., Jančar N. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *J Obstet Gynaecol Res* 2010; 36(6): 1204-1213.
- Warner K.H., Kevin A.A., Chelmow D., Davey D.D., Goulart R.A., Garcia F.A., et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: Interim clinical guidance. *Obstet Gynecol* 2015; 136(2): 178-182.
- Wasserman P.G., Schwartz M.R., Darragh T.M. Understanding HPV testing's place in primary screening. *Cap today*, 2007. Available online at: http://www.captodayonline.com/Archives/pap_ngc/0107NGC_HPVTTest.html
- Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3878-84.
- Wilkinson D.E., Baylis, S.A., Padley D., Heath, A.B., Ferguson M., Pagliusi S. R., et al. Establishment of the 1st World Health Organization international standards for human papillomavirus type 16 DNA and type 18 DNA. *Int J Cancer* 2010; 126(12); 2969-2983.
- Winer R.L., Lee S.K., Hughes J.P., Adam D.E., Kiviat N.B., Koutsky L.A. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003; 157:218–226.
- Winer R.L., Hughes J.P., Feng Q, O'Reilly S., Kiviat NB., Holmes K.K., et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl Med* 2006; 354(25): 2645-54.
- Winkelstein Jr., W. Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis. *Am J Epidemiol* 1977; 106: 257-9.
- World Health Organization. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014. Available: <http://www.who.int/wer/2014/wer8943.pdf?ua=1>.
- World Health Organization. Cervical cancer screening in developing countries: report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: WHO 2002.
- Weiderpass E., Ye W., Tamimi T., Trichopoulos D., Nyren O., Vainio H., et al. Alcoholism and Risk for Cancer of the Cervix Uteri, Vagina, and Vulva. *Adami Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:899-901.
- Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L., Stewart A.C., Hildesheim A., Jenison S.A. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6. L2, and L1 coding segments. *J Virol* 1995; 69: 7743–53.
- zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections: human genital cancer resulting from a failing cellular control of papilloma-virus gene expression. *Lancet* 1986; 2(8505): 489-491.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account.
Virology 2009; 384(2): 260-265.

PRILOG 1.

Soj	L1	tip
NSCx3612	<p>TAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACG CAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACCTACATATAAA AATACTAACTTTAAAGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTTGGTTTACAACCTCCTCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATATACTTTTT GGGAAAGTAAATTTAAAGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGAT</p>	16
NSCx 3675	<p>AATGGTGTTTGTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGC AGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATAT GATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTGCA GTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTCTTTAACTGCAGATGTTATGTCCTATATTC ATAGTATGAATAGCAGTATTTTAGAGGATTGGAACCTTTGGTGTTCCCCCCCCGC CAACTACTAGTTTGGTGGATACATATCGTTTTGTACAATCTGTTGCTATTACCTG TCAAAGGATGCTGCACCGGCTGAAAATAAGGATCCCTATGATAAGTTAAAGT TTTGGAATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTTAGACTTGGATCAG</p>	18
NSCx 444	<p>AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTT</p>	16
NSCx 483	<p>AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT</p>	16

NSCx 2536	ATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCA AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTtTCC	16
NSCx 1510	ATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCA AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16
NSCx 5000	ATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCA AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGAT	16
NSCx 5318	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16
NSCx 2269	ATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTCCGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCA AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16

NSCx 4944	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCA	16
NSCx 2483	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16
NSCx 158	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGA	16
NSCx 1975	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16
NSCx 2741	ATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCA GTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATAAAAATG AGAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGT TTCAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGACGTTATGACATATATTCATGCTAT GAATCCAGATATTTTGAAGATTGGCAATTTGGTTTAAACACCTCCTCCATCTGCT AGTTTACAGGATACCTATAGGTTTGTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAA ACAGTACCTCAAAGGAAAAGGAAGACCCCTTAGGTAATATACATTTTGGGA AGTGATTTAAAGGAAAATTTTTCAGCAGATTTAGATCA	33

NSCx 488	<p> AACTGGCATTtTGTTGGGGTAACcaACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACG CAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCAATTTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACaACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT AGGAAGTAaATTTAAAGGAAAAGTTTTc </p>	16
NSCx 297	<p> ACAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACAC GCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATA AAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAG TTTATTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATAC ATTCTATGAATCCAATTTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCC AGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCT GTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTT TTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT </p>	16
NSCx 151	<p> TGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAG TACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAATGACAGTACATATAAAAAATGA GAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGT TCAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGAAGTTATGACATATATTCATGCTAT GAATCCAGATATTTAGAAGATTGGCAATTTGGTTTAAACACCTCCTCCATCTGCT AGTTTACAGGATACCTATAGGTTTGTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAA ACAGTACCTCAAAGGAAAAGGAAGACCCCTTAGGTAATATACATTTTGGGA AGGGGATTTAAAGGAAAATTTTcAgCAGAT </p>	33
NSCx 10	<p> AcAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACG CAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCAATTTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT </p>	16
NSCx 8a	<p> AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCAATTTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT </p>	16

NSCx 1626	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAAcTATTTGTTACTGTTGTTGATAcTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCA AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTG	16
NSCx 1620	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACaACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGAT	16
NSCx 714	TTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATAT GTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAAATACTAACTTT AAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTG TGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCC ACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGAGGCACACTA GAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCAAAAACATACA CCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAAT TTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAG	16
NSCx 2911	TGGCATTGTTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACACGTAG TACCAATATGTCTGTGTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATACTACATTTAAAAG TAGTAATTTTAAAGAGTATTTAAGACATGGTGAGGAATTTGATTTACAATTTAT ATTTCAAGTTATGCAAATAACATTATCTGCAGACATAATGACATATATTCACAGT ATGAATCCTRCTATTTTGGAAAGATTGGAATTTTGGATTGACCACACCTCCTTCAG GTTCTTTAGAGGATACCTATAGGTTTGTAAACCTCACAGGCMATTACATGTCAAA AAACTGCCCCCAAAGCCAAGGAAGATCCATTTAAAGATTATGTATTTTGGG AGGTGAATTTAAAaGAAAAGTTTTCTGCAGAttTAGATCAGT	31
NSCx 2051	ATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCA AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAG	16

NSCx 2712	ATGGCATTGTTGGGGTAACCAacTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAG TACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATcTACTTCAGAACTACATATAAAAAT ACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATT TTTCAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTA TGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAG GCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCAAA AACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACaCTTTTTGGG AAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAG	16
NSCx 3308	AATGGCATTGTTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACTGTGGTAGATACYACACGC AGTACTAATATGTCTGTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATACTACATTTAAA AGTAGTAATTTAAAGAGTATTTAAGACATGGTGAGGAATTTGATTTACAATTT ATATTTCACTTATGCAAAATAACATTATCTGCAGACATAATGACATATATTACA GTATGAATCCTGCTATTTTGGAAAGATTGGAATTTTGGATTGACCACTCCCTC AGGTTCTTTAGAGGATACCTATAGGTTTGTAACTCACAGGCCATTACATGTCA AAAAAcTgCcCcCaAAAGCCaAGGAAGATCCatTTAAAGAtTAtgtaTTTTGGGA gGTTAATTTAAAaGAAAAGTTTTCTGCAGA	31
NSCx 612	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTTCAACTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16
NSCx 2096a	GGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTC ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAG GAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGC AAAATAAcTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTA TTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAA GATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGCAAAAACATACACCT CCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTA AAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGT	16
NSCx2883 a	CAGGGtCATAACAATGGTGTGTTGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGGTA GATACTACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTAC CTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAA TATGATTTGCAGTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTACTTTAACTGCAGATGTTAT GTCCTATATTCATAGTATGAATAGCAGTATTTTAGAGGATTGGAACCTTGGTGT TCCCCCCCCGCAACTACTAGTTTGGTGGATACATATCGTTTTGTACAATCTGTT GCTATTACCTGTCAAAGGATGCTGCACCGGCTGAAAATAAGGATCCCTATGA TAAGTTAAAGTTTTGGAATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTTTAGAC	18

NSCx 4500	AATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGC AGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATAAAAAT GAAAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGT TTTCAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGAAGTTATGACATATATTCATGCTA TGAATCCAGATATTTTAGAAGATTGGCAATTTGGTTTAAACACCTCCTCCATCTGC TAGTTTACAGGATACCTATAGGTTTGTACcTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAA ACAGTACCTCCAAGGAAAAGGAAGACCCCTTAGGTAATATACATTTTGGGA AGTGGATTTAAAGGAAAAATTTTCAGCAGA	33
NSCx 5056	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGT AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAG	16
NSCx 994a	AATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACACGT AGTACCAATATGTCTGTTTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATACTACATTTAAA AGTAGTAATTTTAAAGAGTATTTAAGACATGGTGAGGAATTTGATTTACAATTT ATATTTCACTTATGCAAATAACATTATCTGCAGACATAATGACATATATTCACA GTATGAATCCTGCTATTTTGGAAAGATTGGAATTTTGGATTGACCACACCTCCCT CAGGTTCTTTGGAGGATACCTATAGGTTTGTACCTCACAGGCCATTACATGTC AAAAAACTGCCCCCAAAGGCCAAGGAAGATCCATTTAAAGATTATGTATTTT GGGAGGTTAATTTAAAGAAAAGTTTTCTGCAGATTTAGATCAG	31
NSCx 4402	ATAACAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTA CACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACAT ATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTA CAGTTTATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACA TACATTCTATGAATCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCC CCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTG CTTGCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACA CTTTTGGGAAGtAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTA	16
NSCx 1058a	TGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAG TACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAAT ACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATT TTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTA TGAATCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGAG GCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAA AACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACAcTTTTTGGG AAGtAAATTTAAAGGAAAAGTTTT	16

NSCx 1392	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGC AGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAA AATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTT ATTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATT CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAG GAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTT GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGA	16
NSCx 1224	AATGGCATTGTTGGGGTAACCAAcTATTTGTTACTGTTGTTGATAcTACACGCA GTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA ATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTA TTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTC TATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGG AGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTG GGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGgACC	16
NSCx 2883	GCcCAGGGtCATAACAATGGTGTTTGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTG GTAGATAACCACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTG TACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAG GAATATGATTTGCAGTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTACTTTAACTGCAGATG TTATGTCCTATATTCATAGTATGAATAGCAGTATTTTAGAGGATTGGAACTTTG GTGTTCCCCCCCCGCCAACTACTAGTTTGGTGGATACATATCGTTTTGTACAATC TGTTGCTATTACCTGTCAAAGGATGCTGCACCGGCTGAAAAGGATGATCCCTA TGATAAGTTAAAGTTTTGGAATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTTTAGACTT AGATCAGTTTCC	18
NSCx 966	ACAATGGTGTTTGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTC GCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAAT ATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTGC AGTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTACTTTAACTGCAGATGTTATGTCCTATATT CATAGTATGAATAGCAGTATTTTAGAGGATTGGAACTTTGGTGTTCACCCCCCG CCACTACTAGTTTGGTGGATACATATCGTTTTGTACAATCTGTTGCTATTACCT GTCAAAGGATGCTGCACCGGCTGAAAATAAGGATCCCTATGATAAGTTAAAG TTTTGGAATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTTTAGACTTAGATCAGT	18
NSCx 2096	GCcCAGGGtCATAACAATGGTGTTTGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTG GTAGATAACCACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTG TACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAG GAATATGATTTGCAGTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTACTTTAACTGCAGATG TTATGTCCTATATTCATAGTATGAATAGCAGTATTTTAGAGGATTGGAACTTTG GTGTTCCCCCCCCGCCAACTACTAGTTTGGTGGATACATATCGTTTTGTAATCTG TTGCTATTACCTGTCAAAGGATGCTGCACCGGCTGAAAAGGAGGATCCCTAT GATAAGTTAAAGTTTTGGAATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTTTAGACTTA GATCAGTtTCCCCTgGGACG	18

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Gordana Kovačević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Petar Knežević, vanredni profesor, PMF-a, Univerzitet u Novom Sadu Prof. dr Vesna Milošević, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Tipizacija Humanih papiloma virusa (HPV) i molekularne varijante identifikovanih tipova
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	9 poglavlja/149 stranica/39 slika/19 tabela/6 grafikona/ referenci 223
Naučna oblast: NO	Biologija

Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Humani papiloma virus, genomski varijabilnost, nukleotidna distanca, filogenetski odnosi
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju,
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>Uvod: U novije vreme sve veći broj studija sugerise da se genotipske varijante humanih papiloma virusa (HPV), uprkos filogenetskoj srodnosti, mogu razlikovati u patogenosti i različito doprineti razvoju cervikalnih neoplazija. Cilj ovog rada je bio da se definiše zastupljenost različitih onkogenih tipova HPV kod ispitanica sa područja Južnobačkog okruga (AP Vojvodina) i odredi genotipska varijabilnost najprevalentnijih genotipova HPV, analizom DNK sekvenci i RFLP metodom.</p> <p>Materijal i metode: Istraživanje je sprovedeno u periodu od januara 2014. do novembra 2015. godine. Studija je obuhvatila 564 osobe ženskog pola, starosti od 18 do 69 godina. Genotipizacija 12 visokorizičnih tipova HPV izvršena je upotrebom komercijalnog kita <i>HPV High Risk Typing Real-TM (Sacace Biotechnologies, Italy, CE, IVD)</i>. Automatsko sekvenciranje amplifikovanih fragmenata L1 gena HPV rađeno je na automatskom sekvenatoru ABI Prism BigDye 3.1 (PE Applied Biosystems, Foster, CA, SAD). Bioinformatičkom analizom utvrđene su genetičke distance i filogenetski odnosi HPV izolata dobijenih u AP Vojvodini u odnosu na izolate iz drugih geografskih područja za tipove: 16, 18, 31 i 33. PCR-RFLP metodom ispitivana je heterogenost unutar HPV tipa 51, na nivou E1, L1 i L2 gena 11 odabranih HPV DNK pozitivnih izolata, primenom restrikcionih enzima DraI, TaqI i PstI.</p> <p>Rezultati: Prevalencija HPV infekcije kod testiranih žena je iznosila 51,8%. Učestalost različitih tipova vema je varirala, pri čemu su najprevalentniji bili: HPV16 (34,5%); HPV 31 (20,5%); HPV 51 (13%); HPV33 (11,6%); HPV52 (11%) i HPV18 (11%). HPV tipovi 16 i 33 su najčešće dijagnostikovani u starosnoj grupi od 31-40 godina (25,5% i 6,21%), dok su HPV18 (8,16%), HPV31 (7,04%) i HPV51 (12,3%) najčešće dokazani kod žena mlađih od 30 godina. Određene su genetičke distance i filogenetski odnosi u okviru populacije izolata iz Južnobačkog okruga, AP Vojvodine, u odnosu na</p>

	<p>druge izolate čije su genomske sekvence dostupne u GenBank bazi podataka. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci HPV tipa 16 je potvrdila da se najveći broj izolata iz područja AP Vojvodine grupiše u liniju A, (podlinije A3 i A4) dok se jedan izolat izdvojio u liniju D (podlinija D1). Tri izolata HPV tipa 18 su grupisana u liniju A, a dva izolata kao posebna grupa. Utvrđeno je da genotipske varijante HPV 31 iz našeg područja pripadaju linijama A, B i C. Izolati HPV tipa 33 pripadali su liniji A (podlinije A1 i A2). Dobijene nukleotidne distance su pokazale da je razlika između analiziranih i referentnih sekvenci manja od 2%, što potvrđuje sličnost na nivou varijante. Na osnovu PCR-RFLP analize u odabranim DNK pozitivnim na HPV tip 51, restrikcionom analizom PCR produkata na nivou L1, L2 i E1 gena, utvrđeno je da su prisutni samo genotipovi koji odgovaraju liniji A sa podlinijom A1.</p> <p>Zaključak: Rezultati studije predstavljaju prve dostupne podatke o rasprostranjenosti 12 visokorizičnih tipova HPV, kao i podatke o genomskoj varijabilnosti i filogenetskoj srodnosti najprevalentnijih HPV tipova kod žena sa područja Južnobačkog okruga. Najprevalentniji HPV tipovi našeg regiona su pokazali usklađenost sa evropskim izolatima, ali su nađene i ne-evropske varijante. Nizak procenat genetičkih distanci u okviru istog HPV tipa je u skladu sa niskom stopom mutacija kod ovih virusa. Iako se u današnje vreme RFLP metoda primenjuje u manjoj meri zbog uspona tehnologija sekvenciranja DNK, ova tehnika se može koristiti kao brza i jeftinija metoda za određivanje pojedinih linija ovih virusa. S obzirom da je u većini kliničkih laboratorija sekvenciranje DNK nedostupno, razvijena metoda se može koristiti za diferenciranje dve glavne linije HPV tipa 51, koje imaju različit onkogeni potencijal. Rezultati predstavljaju izuzetan doprinos epidemiološkoj proceni realnih potreba uvođenja rutinske imunizacije protiv visokoprevalentnih genotipova prisutnih u prekanceroznim promena na grliću materice inficiranih žena sa našeg područja. Tipizacija HPV virusa primenjenim metodama može biti od velike koristi u ranom otkrivanju maligne transformacije inficiranih ćelija i prevenciji karcinoma grlića materice.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	25.06.2015.

Datum odbrane: DO	2016. godina
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	
PREDSEDNIK:	Prof. dr Mihajla Đan, vanredni profesor, PMF-a, Univerzitet u Novom Sadu
ČLAN/MENTOR:	Prof. dr Petar Knežević, vanredni profesor, PMF-a, Univerzitet u Novom Sadu
ČLAN/MENTOR:	Prof. dr Vesna Milošević, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
ČLAN:	Prof dr Aleksandra Knežević, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Beograd, Univerzitet u Beogradu
ČLAN:	Prof. dr Ivana Hrnjaković Cvjetković, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Gordana Kovačević
Mentor: MN	Dr Petar Knezevic, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Dr Vesna Milosevic, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Title: TI	Typing of Human Papilloma Virus (HPV) and molecular variants of identified types
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	Serbian (Latin)/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description: PD	9 chapters / 149 pages / 39 figures / 19 tables / 6 graphs/ 223 references
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Microbiology

Subject, Key words SKW	Human papilloma virus, Genome variability, Nucleotide distance, Phylogenetic relations
UC	
Holding data: HD	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21 000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Introduction: In recent times increasing number of researches suggests that genotypic variants of human papillomavirus (HPV), in spite of phylogenetic relations, could differ in virulence and contribute the development of cervical neoplasia. The aim of this work was to define the partition of different oncogenic HPV types in examined women from the area of Juznbacka district (AP Vojvodina) and to determine genotypic variability of the most prevalent HPV genotypes, by DNA sequences' analysis and RFLP method.</p> <p>Material and methods: The research was conducted in period from January 2014 till November 2015. Study included 564 female persons, age from 18 to 69. The genotypization of 12 high-risk HPV types was performed with use of commercial kit HPV High Risk Typing Real-TM (Sacace Biotechnologies, Italy, CE, IVD). The automatic sequencing of amplified fragments of L1 HPV gene was performed on automatic sequencer ABI Prism BigDye 3.1 (PE Applied Biosystems, Foster, CA, USA). By bioinformatic analysis genetic distances, as well as phylogenetic relations of HPV isolates in AP Vojvodina were determined in relation with isolates from other regions for types 16,18, 31 and 33. By PCR-RFLP, the heterogeneity within HPV type 51, at the level of E1, L1 and L2 genes 11 selected HPV DNA positive isolates, by use of restriction enzymes DraI, TaqI and PstI.</p> <p>Results: The prevalence of HPV infection in tested women was 51,8%. The frequency of different types varied considerably, where the most prevalent types were: HPV16 (34,5%); HPV 31 (20,5%); HPV 51 (13%); HPV33 (11,6%); HPV52 (11%) and HPV18 (11%). The HPV types 16 and 33 are diagnosed the most in age group from 31-40 (25,5% and 6,21%), while HPV 18 (8,16%), HPV31 (7,04%) and HPV51 (12,3%) are the most diagnosed in women younger than 30. The genetic distances and phylogenetic relations within samples from population of</p>

	<p>Južnobačka region, AP Vojvodina, are determined in relation to other samples whose genomic sequences are available in GenBank data base. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of HPV 16 confirmed that the most of isolates from the area of AP Vojvodina are grouped in line A (sublines A3 and A4), while one isolate separated to the line D (subline D1). Three isolates of HPV type 18 are grouped in line A, and two isolates grouped as separate group. It was confirmed that genotypic variants of HPV 31 from our region belong to lines A, B and C. Isolates of HPV type 33 belonged to line A (sublines A1 and A2). Gained nucleotide distances showed that difference between analyzed and referent sequences is lower than 2%, which confirms the similarity at the level of variant. Based on PCR-RFLP analysis in selected DNA of persons positive on HPV type 51, by restriction analysis of PCR products on the level of L1, L2 and E1 genes, it is confirmed that only genotypes that correspond to line A, subline A1 are present.</p> <p>Conclusions: The results of study present the first available data on abundance of 12 high-risk types, as well as data on genomic variability and phylogenetic relations of the most prevalent HPV types in females from the Juznobačka region. The most prevalent HPV types of our region showed concordance with European isolates, but non-European variants were also found. Low percentage of genetic distances within the same HPV type is in concordance with low mutation rate of these viruses. Although today RFLP method is applied at lower scale because of rise of DNA technologies, this technique could be used as fast and efficient method for determination of particular lines of these viruses. Regarding that DNA sequencing is unavailable to the most of clinical laboratories, developed technique could be used for discrimination of two main lines of HPV type 51 that have different oncogenic potential. The results present considerable contribution to the epidemiological assessment of real needs for implementation of routine immunization against the high prevalent genotypes, present in precancerous alterations on the cervix of infected women from our area. Typization of HPV viruses by applied methods could be of great benefit in early detection of malignant transformations of infected cells and prevention of cancer of cervix.</p>
Accepted on Senate on: AS	25.06.2015.

Defended: DE	2016
Thesis Defend Board: DB	
PRESIDENT:	Dr Mihajla Djan Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
MEMBER/MENTOR:	Dr Petar Knezevic, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
MEMBER/MENTOR:	Dr Vesna Milosevic, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad
MEMBER:	Dr Aleksandra Knezevic, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Belgrade
MEMBER:	Dr Ivana Hrnjakovic Cvjetkovic, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad

BIOGRAFIJA



Gordana Kovačević, istraživač saradnik

Rođena 20. avgusta 1967. u Vinkovcima, Republika Hrvatska, živi i radi u Novom Sadu

Obrazovanje:

Osnovnu i srednju školu završila u Sremskoj Mitrovici. Godine 1986. upisuje osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, na tadašnjem Institutu za biologiju, gde je 1992. godine diplomirala i time stekla zvanje profesor biologije. Magistarske studije, smer fiziologija biljaka je upisala 1993. na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu. Magistarsku tezu pod nazivom "Uticaj toksičnih koncentracija Cd, Pb i Ni na morfološku i anatomsku građu listova mladih biljaka pšenice (*Triticum aestivum* L.)" odbranila je 1997. godine.

Radno iskustvo:

Od 1999. godine, do danas, radi u Centru za Virusologiju, Instituta za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad. U sklopu istraživačkog tima učestvovala je u dva naučna projekta finansirana sredstvima Republike Srbije i osam Projekta finansiranih od Gradske uprave za zdravstvo, grada Novog Sada:

- 2005.-2007. godine-"Razvoj metoda za ranu detekciju virusa encefalitisa Zapadnog Nila na ugroženom području" (evidencioni broj TR.6920B), projekat u okviru Programa istraživanja u oblasti tehnološkog razvoja, Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

-2011.-2014. godine-"Istraživanje klimatskih promena i njihovog uticaja na životnu sredinu. Praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje" (evidencioni broj III 43007), projekat u okviru Programa sufinansiranja integralnih i interdisciplinarnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

"Prevalenca infekcije HPV kod srednjoškolki i studenta u Novom Sadu"(evidencioni brojevi: XII-51-46-3/2012; XII-51-46-51/2013; XII-51-52-7/2014; XII-51-51-7/2015), "Nadziremo svoj HPV profil"(evidencioni brojevi: XII-51-80-5-1/2013; XII-51-98-3/2014; XII-51-54-3/2015), "Značaj HPV DNK analize u prevenciji nastanka karcinoma grlića materice "(evidencioni broj: XII-51-59-1-1/2015)

Autor ili koautor je: 12 radova štampanih u međunarodnim časopisima; 8 radova u časopisima nacionalnog značaja; 16 saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja; 28 saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja. Majka troje dece.