



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ
CITOLOGIJE, KOLPOSKOPIJE,
HPV TESTA I JEDNO-
KARBONSKIH METABOLIČKIH
PARAMETARA U
NEINVAZIVNOJ DIJAGNOSTICI
CERVIKALNIH
INTRAEPITELIJALNIH
NEOPLAZIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Ljiljana Mladenović Segedi

Kandidat:
Branislava Baturan

Novi Sad, 2023. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Бранислава Батуран
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Љиљана Младеновић Сегеди, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
Наслов рада:	Дијагностички значај цитологије, колпоскопије, ХПВ теста и једно-карбонских метаболичких параметара у неинвазивној дијагностици цервикалних интраепителијалних неоплазија
Језик публикације (писмо):	Српски језик (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 164 Поглавља: 9 Референци: 338 Табела: 39 Слика: 3 Графикона: 15 Прилога: 5
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Гинекологија и акушерство; Гинеколошка онкологија
Кључне речи / предметна одредница:	Цервикална интраепителијална неоплазија; папа тест; хумани папилома вирус ДНА тестови; колпоскопија; фолна киселина; витамин Б12; хомоцистеин; дијагноза.
Резиме на језику рада:	Увод: Инциденца ЦИН промена које захтевају хируршки третман достиже врхунац око 30-те године живота, и зато су ефекти лечења на будућу репродуктивну функцију од посебног значаја. Неопходно је лечити само промене које имају прави потенцијал прогресије, те се тежи све већој индивидуализацији у приступу пацијента и прилагођавању лечења. Због ограничених нехируршких опција за ерадикацију утврђене ХПВ инфекције у цервикалном ткиву, идентификација било ког реверзибилног кофактора, као што су параметри једнокарбонског метаболизма (витамин Б9, витамин Б12 и хомоцистеин) који могу модулирати експресију ХПВ вредни су проучавања. Циљ: Утврдити дијагностички значај испитиваних неинвазивних дијагностичких тестова у дијагностици ЦИН промена и одабир оптималних дијагностичких критеријума на основу којих се поуздано могу проценити преканцерозне промене склоне регресији, које не захтевају примену допунских инвазивних дијагностичко-терапијских

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

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

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>поступака.</p> <p>Материјал и методе: Истраживање је спроведено у форми проспективне опсервационе кохортне студије и обухватило је 183 испитаница са абнормалним налазом цитолошког бриса и/или сумњивом колопоскопском сликом. Након попуњавања анкетног упитника везаног за факторе ризика за ХПВ инфекцију, свакој испитаници је узет цервикални брис за цитолошко и ХПВ тестирање, извршен колпоскопски преглед и узет патохистолошки узорак. Одређивање једнокарбонских метаболичких параметара (вит Б9, вит Б12, хомоцистеин) вршено је из узорака крви. На основу патохистолошког налаза испитанице су подељене у контролну групу без ЦИН промена (61 испитаница) и испитиване групе са ЦИН променама (122 испитанице).</p> <p>Резултати: Сензитивност, специфичност, ППВ, НПВ и тачност за Папа брис износила је 0.92; 0.63; 0.71; 0.89; 0.78; за хрХПВ тест: 0.90; 0.56; 0.67; 0.85; 0.73; за ХПВ16/18: 0.62; 0.86; 0.81; 0.68; 0.72; за колпоскопију: 0.39; 0.95; 0.88; 0.61; 0.67(редом). У односу на АУЦ вредности које су статистички значајне, Папа тест (АУЦ 0.775) и хрХПВ тест (АУЦ 0.731) представљају добре, док је колпоскопија (АУЦ 0.668) довољно добра дијагностичка метода. Од једнокарбонских параметара, ниво хомоцистеина у највећој мери кореспондира са ЦИН променама ($p < 0.01$), док је низак ниво витамина Б9 забележен у групи са најтежим ЦИН променама ($p < 0.05$). На основу РОЦ анализе добијене су <i>cut-off</i> вредности витамина Б9 $\leq 19.5 \text{ nmol/L}$ и хомоцистеина $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0.01$, АУЦ:0.635 95%ИП:0.554-0.716) које удружене представљају дијагностички предиктор ЦИН2+ лезија. Вредности витамина Б12 нису се показале као релевантан параметар за диференцирање ЦИН промена. На основу резултата ове студије као дијагностички значајан одређен је класификациони скор од 0.39 ($p < 0.001$ АУЦ 0.880 95%ИП: 0.831-0.929). Што је скор нижи извесније је да ће испитаница имати ЦИН2+ лезију, док скорови већи од 0.39 предвиђају ЦИН промену нижег степена или њено одсуство.</p> <p>Закључак: Папа брис и хрХПВ тест показали су подједнаку сензитивност и специфичност, те се равноправно могу користити као дијагностички тестови у детекцији преинвазивних промена грлића материце. Вредности хомоцистеина су у позитивној корелацији са ЦИН променама. Вредности витамина Б9 $\leq 19.5 \text{ nmol/L}$ и хомоцистеина $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ могу послужити као параметри у одлучивању суплементације фолатима и витБ12 у клиничкој пракси за конзервативан третман ХПВ инфекције. За потврду тачности добијеног класификационог скорa, потребно је спровести студију праћења.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	20. новембар 2018. године
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Branislava Baturan
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Ljiljana Mladenović Segedi, PhD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad.
Thesis title:	Diagnostic Significance of Cytology, Colposcopy, HPV Test and One-Carbon Metabolic Parameters in Non-Invasive Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia
Language of text (script):	Serbian language (Latin)
Physical description:	Number of: Pages: 164 Chapters: 9 References: 338 Tables: 39 Illustrations: 3 Graphs: 15 Appendices: 5
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Obstetric and Gynecology; Gynecological Oncology
Subject, Key words:	Uterine Cervical Dysplasia; Papanicolaou Test; Human Papillomavirus DNA Tests; Colposcopy; Folic Acid; Vitamin B 12; Homocysteine; Diagnosis
Abstract in English language:	<p>Introduction: The incidence of CIN lesion requiring surgical treatment peaks around the age of 30, so the effects of treatment on future reproductive function are of particular importance. It is necessary to treat only lesions that have a real potential for progression. The goal is to increase the individualisation of the patient's approach and treatment. There are limited nonsurgical options for eradicating established HPV infection in cervical tissue. Identification of any reversible cofactors, such as parameters of one-carbon metabolism (vitamin B9, vitamin B12 and homocysteine) that may modulate HPV expression are worthy of study.</p> <p>Objective: Diagnostic significance of the non-invasive tests in the diagnosis of CIN lesions, and selection of optimal diagnostic criteria that can determine which precancerous lesion do not require additional invasive diagnostic and therapeutic procedures.</p> <p>Study design: This was prospective observational cohort study that included 183 patients with abnormal cytological smear and/or suspicious colposcopic images. After completing a questionnaire related to risk factors for HPV</p>

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

56 – Statement on the authority,

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

5r – Statement on copyright licenses.

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

	<p>infection, a cervical smear was taken for cytological and HPV testing, colposcopic examination was performed and pathohistological sample was taken. Determination of one-carbon metabolic parameters (vitamin B9, vitamin B12, homocysteine) was performed from blood samples. Based on the pathohistological findings, the subjects were divided into a control group without CIN lesion (61 subjects) and test group with CIN lesion (122 subjects).</p> <p>Results: Sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy for Pap smear was 0.92; 0.63; 0.71; 0.89; 0.78; for hrHPV test: 0.90; 0.56; 0.67; 0.85; 0.73; for HPV16/18: 0.62; 0.86; 0.81; 0.68; 0.72; for colposcopy: 0.39; 0.95; 0.88; 0.61; 0.67 (respectively). According to AUC values which are statistically significant, the Pap test (AUC 0.775) and the hrHPV test (AUC 0.731) are good, while colposcopy (AUC 0.668) is a sufficiently good diagnostic method.</p> <p>From one-carbon parameters, the level of homocysteine corresponds to the greatest extent with CIN lesions ($p < 0.01$), while a low level of vitamin B9 was recorded in the group with the most severe CIN lesions ($p < 0.05$). Based on the ROC analysis, the cut-off values of vitamin B9 $\leq 19.5 \text{ nmol/L}$ and homocysteine $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0.01$, AUC:0.635 95%IP:0.554-0.716) together represents a diagnostic predictor of CIN2+ lesions. Vitamin B12 values did not prove to be a relevant parameter for differentiating CIN lesion.</p> <p>Based on the results of this study, a classification score of 0.39 was determined as diagnostically significant ($p < 0.001$ AUC 0.880 95%IP: 0.831-0.929). The lower the score, the more certain the subject will have a CIN2+ lesion, while scores greater than 0.39 predict a lower-grade CIN lesion or its absence.</p> <p>Conclusion: The Pap smear and the hrHPV test showed similar sensitivity and specificity, and equally can be used as diagnostic tests in the detection of preinvasive changes in the cervix. Homocysteine values are positively correlated with CIN lesions. Values of vitamin B9 $\leq 19.5 \text{ nmol/L}$ and homocysteine $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ can serve as parameters for deciding on folate and vitB12 supplementation in clinical practice as conservative treatment of HPV infection. To confirm the accuracy of the obtained classification score, it is necessary to conduct a follow-up study.</p>
Accepted on Scientific Board on:	November 20 th , 2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	
Note:	

Neizmernu zahvalnost na savetima, strpljenju i dragocenoj pomoći prilikom izrade disertacije dugujem prof. dr Ljiljani Mladenović Segedi.

Veliko hvala prof. dr Srđanu Đurđeviću, na entuzijazmu i viziji u odabiru teme istraživanja, stručnim sugestijama i nesebičnoj pomoći, kao i ličnom i profesionalnom zalaganju u izradi teze.

Svojim roditeljima i sestri Aleksandri hvala na pruženoj ljubavi, bezgraničnom strpljenju, podršci i ogromnom razumevanju tokom čitavog školovanja.

Hvala mojoj porodici, suprugu Luki i najsjajnijoj zvezdici Milošu, što ste uz mene. Vi ste mi najveća podrška i snaga. Hvala vam na svemu, nije vam bilo lako.

Disertaciju posvećujem mami, koja je verovala u mene kada ni sama nisam.

Sadržaj

1. Uvod	4
1.1. Epidemiologija karcinoma grlića materice	4
1.2. HPV virus.....	6
1.2.1. HPV infekcija	7
1.2.2. Faktori rizika za HPV infekciju i perzistenciju	9
1.2.2.1. <i>Seksualno ponašanje</i>	10
1.2.2.2. <i>Hormonska kontracepcija</i>	10
1.2.2.3. <i>Paritet</i>	11
1.2.2.4. <i>Pušenje</i>	12
1.2.2.5. <i>Vaginalni mikrobiom</i>	12
1.3. Cervikalne intraepitelijalne neoplazije - CIN (Skvamozne intraepitelijalne lezije-SIL)	13
1.4. Citologija.....	15
1.5. HPV test	18
1.6. Skrining.....	20
1.7. Kolposkopija	22
1.8. Tretman SIL/CIN	26
1.8.1. Preporuke tretmana CIN	27
1.8.1.1. <i>Tretman LSIL promena</i>	27
1.8.1.2. <i>Tretman HSIL promena</i>	28
1.8.2. Preporuke tretmana CIN kod mlađih pacijentkinja	30
1.8.3. Posledice lečenja CIN	31
1.9. Jednokarbonski metabolizam.....	33
2. Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	39
3. Materijal i metode istraživanja.....	40
3.1. Citološki (Papa) bris	40
3.2. HPV testiranje	41
3.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka.....	41
3.2.2. Metoda određivanja	42
3.3. Kolposkopski pregled	42
3.4. Jednokarbonski parametri	43
3.4.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka.....	43
3.4.2. Metode određivanja	44

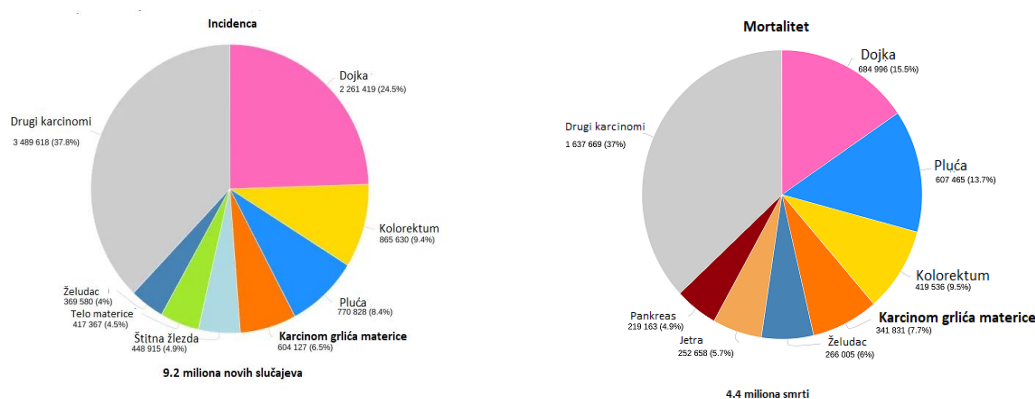
3.5. Patohistološki uzorci	44
3.6. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka.....	46
3.6.1. Određivanje veličine uzorka	47
3.6.2. Uzorak.....	47
3.7. Statističke metode	48
4. Rezultati	53
4.1. Socio-demografski i klinički opis uzorka i testiranje razlika između patohistoloških grupa	54
4.2. Distribucija citoloških, virusoloških, kolposkopskih i patohistoloških nalaza u ispitivanom uzorku.....	59
4.2.1. Zastupljenost citoloških, virusoloških i kolposkopskih nalaza po patohistološkim grupama	61
4.3. Parametri jednokarbonskog metabolizma u ukupnom uzorku.....	67
4.3.1. Jednokarbonski parametri u odnosu na patohistološki nalaz.....	67
4.4. Interkorelacije ispitivanih dijagnostičkih parametara i patohistoloških nalaza ..	71
4.5. Vrednosti jednokarbonskih parametara u odnosu na CIN i HPV status	72
4.6. Ispitivanje dijagnostičke značajnosti neinvazivnih metoda	74
4.7. ROC analiza PAPA testa, kolposkopije i hrHPV/HPV 16 i 18 pozitivnih slučajeva.....	76
4.8. Određivanje cut-off vrednosti jednokarbonskih parametara.....	78
na osnovu ROC analize.....	78
4.9. Verovatnoća HPV infekcije u odnosu na vrednosti jednokarbonskih parametara i Papa nalaza	81
4.10. Verovatnoća CIN2+ promena u odnosu na vrednosti jednokarbonskih parametara i HPV infekcije.....	83
4.11. Modeliranje dijagnostičkih parametara pomoću logističke regresije	85
4.11.1. Predikcioni modeli	87
4.11.1.1. Model 1: Enter metoda binarna logistička regresija.....	87
4.11.1.2. Model 2: Backward metoda binarna logistička regresija.....	89
4.11.1.3. Predviđanje pripadnosti patohistološkoj grupi na osnovu klasifikacionog skora.....	90
4.11.1.4. Utvrđivanje razlike između patohistoloških grupa na osnovu klasifikacionog skora.....	92
4.12. Da li je opravdano pratiti CIN2 promene?.....	94
4.13. Zaključak o dobijenom dijagnostičkom modelu.....	96

5. Diskusija.....	98
5.1. Faktori rizika za HPV infekciju	98
5.2. Papa bris.....	101
5.3. hrHPV PCR test.....	102
5.4. Kolposkopija.....	104
5.5. Jednokarbonski parametri	105
5.5.1. Folati i hrHPV.....	105
5.5.2. Folati i CIN	107
5.5.3. Folati i Papa bris	108
5.5.4. Folati i hipometilacija	108
5.5.5. Vitamin B12 u karcinogenezi	109
5.5.6. Homocistein i HPV infekcija.....	111
5.5.7. Homocistein i CIN promene	112
5.5.8. Homocistein i ostali ispitivani dijagnostički parametri	113
5.5.9. Fortifikacija/Suplementacija.....	114
5.6. Predikcioni model	115
5.7. Praćenje CIN2 promena?	116
6. Zaključak.....	121
7. Prilog.....	123
7.1. Prilog 1: Informisani pristanak.....	123
7.2. Prilog 2: Anketni upitnik.....	125
7.3. Prilog 3: Tabela A: Senzitivnosti i verovatnoća falš pozitivna za vrednosti homocisteina.....	127
7.4. Prilog 4: Tabela B. Senzitivnosti i verovatnoća falš pozitivna za vrednosti B9.....	129
7.5. Prilog 5. Tabela C. Senzitivnosti i verovatnoća falš pozitivna za vrednosti klasifikacionih skorova modela 2 logističke regresije.....	132
8. Skraćenice.....	133
9. Literatura.....	135

1. Uvod

1.1. Epidemiologija karcinoma grlića materice

Prema podacima *Globocan-a* (eng. *Global Cancer Observatory*) iz 2020. godine, karcinom grlića materice bio je četvrti najčešće dijagnostikovani karcinom i četvrti vodeći uzrok smrti među ženama sa procenjenih 604.000 (6.5%) novih slučajeva godišnje i 342.000 smrtnih slučajeva (7.7%) na globalnom nivou (grafikon 1) [1].



Grafikon 1. Incidencija i mortalitet od karcinoma kod žena na globalnom nivou prema podacima GLOBOCAN 2020. (modifikovano prema Sung i saradnicima [1])

Većina slučajeva karcinoma grlića materice otkriva se u manje razvijenim zemljama gde stopa incidencije iznosi 18.8 na 100.000 žena u odnosu na razvijene zemlje gde je stopa 11.3 na 100.000 žena. Slično oboljevanju, i stope mortaliteta su neproporcionalno visoke u manje razvijenim regionima (12.4 na 100.000 žena) u odnosu na razvijene zemlje gde iznose 5.2 na 100.000 žena [1]. Svetska zdravstvena organizacije (SZO) navodi da je oko 90% smrtnih slučajeva raka grlića materice u zemljama sa niskim i srednjim prihodima jer postoji ograničen pristup preventivnim programima, a kada se rak grlića dijagnostikuje već je u uznapredovalom stadijumu sa prisutnim simptomima [2]. Najviše stope incidencije i mortaliteta registruju se u

zemljama podsaharske Afrike, dok su stope incidencije u zemljama Severne Amerike, Australiji, Zapadnoj Aziji 7-10x manje, sa stopama mortaliteta nižim čak i do 18 puta [3].

Svake godine u Evropi više od 25.000 žena umre od karcinoma grlića materice. Stopa incidencije karcinoma grlića je dvostruko veća u zemljama Centralne i Istočne Evrope (16.6 na 100.000) u odnosu na zemlje Zapadne Evrope gde stopa incidencije iznosi 7 na 100.000 [4].

Prema podacima Registra za rak Republike Srbije, karcinom grlića materice u 2020. godini bio je zastupljen sa 5.6% u ukupnom oboljevanju (četvrti po redu) i sa 4.9% u ukupnom mortalitetu (peti po redu) malignih tumora ženske populacije [5]. Zabeleženo je 1087 novih slučajeva raka grlića materice, od toga 17% ili svaka šesta žena ima manje od 40 godina. Standardizovana stopa incidencije iznosi 18.6 na 100.000, i skoro je dva puta veća od prosečne u Evropi (10.6 na 100.000), ukazujući na manjkavost skrining programa u našoj zemlji [4]. Broj umrlih žena od karcinoma grlića u apsolutnim brojevima bio je 453, čineći tako standardizovanu stopu mortaliteta 6.5 na 100.000.

U mnogim razvijenim zemljama, zdravstvenim obrazovanjem, programima podizanja svesti o infekciji humanim papiloma virusom (HPV), te skriningom i ranim otkrivanjem premalignih promena, smanjen je mortalitet od karcinoma grlića materice i do 80% [6]. Skorašnje istraživanje analiziralo je 46 zemalja širom Evrope o strategijama primarne i sekundarne prevencije raka grlića materice kao i dostupnost online informacija o HPV, raku grlića materice i pristupu vakcinaciji i pokazalo veliku diskrepancu među zemljama [7]. Uprkos dostupnoj vakcinaciji i skrining programu u našoj zemlji, informacije i edukacija o HPV infekciji i merama prevencije je niska i iznosi svega 67,4%, što nas stavlja u “narandžastu” zonu Evrope.

Imajući u vidu da je karcinom grlića materice skoro u potpunosti preventabilna bolest, a da i dalje predstavlja jednu od najvećih globalnih pretnji za zdravlje i život žena, SZO postavila je ambiciozni cilj da eliminiše rak grlića materice do 2030. godine (postići stopu incidencije manju od 4 na 100.000 žena) kroz 90-70-90 strategiju [8]. Ona podrazumeva da se 90% devojčica do 15 godina u potpunosti vakciniše HPV vakcinom, da se 70% žena podvrgne nekom obliku skrininga dva puta do 45 godine života, i da 90% žena sa promenama na grliću dobije optimalan i adekvatan tretman.

1.2. HPV virus

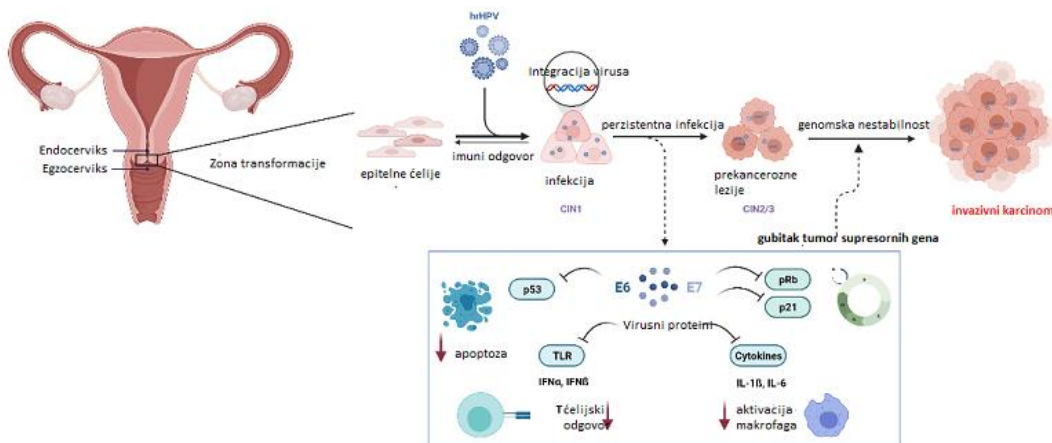
Humani papiloma virus je mali, dvolančani epitelotropni DNK virus bez omotača koji pripada porodici *Papillomaviridae*. Virusna sekvenca HPV otkrivena u više od 99.7% slučajeva karcinoma grlića materice dokaz je da je humani papiloma virus neophodan uzročni faktor karcinoma grlića materice [9,10,11]. Više od 200 različitih tipova HPV je identifikovano, od kojih je svega dvadesetak povezano sa razvojem invazivnog cervikalnog karcinoma [12,13].

Na osnovu epidemiološke klasifikacije, visokorizični HPV tipovi (eng. *high-risk*, hrHPV) imaju visok onkogeni potencijal i smatraju se kancerogenim virusima (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), HPV 68 je verovatno kancerogen, a HPV tipovi 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97 moguće kancerogeni [14]. Niskorizični tipovi (eng. *low-risk*, lrHPV) HPV (6, 11, 42, 43, 44) ograničeni su na virusnu replikaciju i nisu u stanju da pokrenu razvoj neoplastičnih lezija [15]. Najčešći onkogeni tipovi HPV 16 i 18 otkriveni su u 50% i 20% slučajeva raka grlića materice [16,17]. Iako je HPV16 najčešći tip nađen kod karcinoma grlića materice, HPV18 infekcija je obično povezana sa lošijom prognozom [18,19].

1.2.1. HPV infekcija

Genom i kodovi za dva kapsidna proteina L1 i L2, i šest nestrukturalnih regulatornih proteina (E1, E2, E4, E5, E6, E7), igraju glavnu ulogu u HPV ciklusu replikacije i transformaciji ćelija domaćina u neoplastične ćelije [16,20,21].

Životni ciklus HPV virusa počinje infekcijom bazalnih epitelnih ćelija genitalne sluzokože kroz mikrotraume koje narušavaju epitelijalnu barijeru [22,23]. Na početku infekcije, HPV genom održava nizak broj kopija, međutim kako se epitelne ćelije diferenciraju, virus počinje da se umnožava do velikog broja kopija i on eksprimira L1 i L2 kapsidne proteine. Ovo rezultira proizvodnjom novih viriona potomaka koji se oslobađaju iz površnog epitela. Visokorizični tipovi HPV-a skloniji su aktiviranju proliferacije ćelija u bazalnim i diferenciranim slojevima, promovišući transformaciju epitela. Kada hrHPV infekcija perzistira dolazi do integracije HPV DNK u genom domaćina, što dovodi do tačke prekida u E2 genetskoj sekvenci, glavnog inhibitora E6 i E7, te dolazi do prekomerne ekspresije ovih onkoproteina koji su odgovorni za početne promene u epitelnim ćelijama [22,24]. E6 sprečava aktivnost tumor supresora gena domaćina p53, dok E7 inhibira protein retinoblastoma (pRb), koji kontroliše deobu ćelija blokiranjem aktivnosti transkripcionih faktora (slika 1) [25,26]. Inaktivacija ovih proteina domaćina remeti mehanizme popravke DNK i apoptozu ćelija, što dovodi do brze proliferacije ćelija. Geni uključeni u popravku DNK, ćelijsku proliferaciju, aktiviranju faktora rasta, geni angiogeneze i mitogeneze postaju visoko izraženi u displastičnim promenama i kod karcinoma. Ova genomska nestabilnost podstiče ćelije inficirane HPV-om da napreduju ka invazivnom karcinomu [27].



Slika 1. Patogeneza HPV infekcije [26].

HPV infekcija je najčešća polno prenosiva bolest, a vjerojatnoća da se žena zarazi HPV virusom tokom života iznosi 84,6% [28]. U meta-analizi 194 studije, koje su uključivale više od milion žena sa normalnim citološkim nalazima, distribucija HPV-a specifična po godinama imala je prvi vrhunac prevalencije u mlađoj dobi (<25 godina) odmah nakon prvog koitusa, niži plato prevalencije u srednjim godinama, praćen ponovnim skokom u starijoj dobi (≥ 45 godina) [29,30].

Rizik od progresije u karcinom je nizak pošto je većina HPV infekcija tranzitorne prirode i oko 60% se povlači spontano u roku od 1 godine, a 90% u roku od 2 godine [31,32]. U preostalim slučajevima, oko 10%, virus ili ostaje u stanju mirovanja u epitelnim ćelijama, nastavljajući replikaciju kada je imuni sistem kompromitovan [33], ili perzistira kao aktivna infekcija [34]. Većina autora perzistentnost označava kao infekciju sa dva uzastopna pozitivna HPV DNK testa u neodređenim vremenskim intervalima [21,35]. Uprkos postojanju nekoliko definicija, perzistentnost je ključni događaj u hrHPV infekciji, jer značajno povećava rizik od skvamoznih lezija visokog stepena, HSIL (eng. high grade squamous intraepithelial lesion) grlića materice [35], čime se povećava i rizik od raka grlića materice [36,37,38]. U meta analizi koja je obuhvatila uzorak više od 100.000 žena, ispitivani su obrasci perzistiranja HPV

infekcije kod žena koje nisu imale nikakav tretman [39]. Procenjeno je da otprilike polovina HPV infekcija perzistira 6 do 12 meseci. Visokorizični tipovi HPV perzistiraju u proseku 9,3 meseca, niskorizičnih tipovi HPV 8,4 meseca, dok HPV 16 perzistira duže (12,4 meseci) u odnosu na HPV 18 (9,8 meseci).

Studija koja je pratila 1.728 žena starosti između 15 i 85 godina sa normalnom citologijom na početku, na svakih 6 meseci ukupno 9 godina, zaključila je da je količina virusne DNK glavna determinanta perzistencije kao i da perzistentna HPV16 infekcija nosi veći rizik od razvoja HSIL promena [40]. Perzistentna HPV infekcija, posebno HPV tipovima 16 i 18, odgovorna je za mnoge HSIL promene koje ako se ne otkriju i ne leče polako napreduju i u proseku za 5–14 godina mogu dovesti do karcinoma zbog povećane mogućnosti integracije virusnog genoma [41].

Neuspeh da se razvije efikasan ćelijski posredovan imuni odgovor na HPV dovodi do perzistentnih infekcija koje traju mesecima. HPV virus je razvio strategije izbegavanja imunološkog sistema domaćina, uključujući modulaciju ekspresije citokina i hemokina, promenu procesa prezentacije antigena i smanjenje interferonskog puta i adhezionih molekula [42]. Virusni infektivni ciklus je isključivo intraepitelijalan, HPV replikacija ne izaziva citolizu, nekrozu ili viremiju kao drugi virusi; virusni proteini se oslobađaju u velikim količinama samo u terminalnim ćelijama koje su već programirane za ćelijsku smrt, čime se izbegava tipičan imunološki odgovor jer ne postoji upala koja bi ga inače aktivirala [43].

1.2.2. Faktori rizika za HPV infekciju i perzistenciju

Faktori rizika za sticanje HPV infekcije su rizično seksualno ponašanje, a epidemiološke studije ukazale su na veliki broj kofaktora koji doprinose perzistenciji

HPV infekcije kao što su dugotrajna upotreba hormonske kontracepcije, visok paritet, pušenje cigareta, vaginalni mikrobiom.

1.2.2.1. Seksualno ponašanje

Postoje jasni dokazi da su neki obrasci seksualnog ponašanja, kao što je početak seksualne aktivnosti u ranom dobu, više seksualnih partnera i prethodna seksualna istorija partnera, direktno povezani sa povećanim rizikom od HPV infekcije [21,44,45].

Seksualni odnos pre 16. godine, nosi veći rizik od HPV infekcije, jer tokom puberteta na grliću materice postoji veća površina zone transformacije nezrelog epitela gde se odvija skvamozna metaplazija, koja je podložnija infekciji i perzistenciji HPV [46,47]. Visok rizik od dobijanja HPV infekcije prijavljen je kod žena starosti od 18 do 24 godine ubrzo nakon prvog seksualnog odnosa, a kumulativna incidencija u 1. godini iznosila je 28.5%, što se povećalo na 39.2% za 2 godine, a za 3 godine na 49.1% [48]. U longitudinalnoj studiji, zaražavanje HPV-a je snažno određeno akumulacijom seksualnih partnera; žene sa ≥ 3 partnera imale su 9 puta veći rizik za dobijanje HPV-a u poređenju sa ženama sa jednim partnerom tokom praćenja [49].

1.2.2.2. Hormonska kontracepcija

Dugotrajna upotreba hormonskih kontraceptiva istorijski je povezana sa povećanim rizikom od raka grlića materice [50], iako noviji podaci dovode ovu povezanost u pitanje [51].

Velika studija koja je uključila 16.573 žene sa rakom grlića materice i 35.509 zdravih žena širom sveta pokazala je da dugotrajna upotrebu oralnih kontraceptiva

(OK) povećava rizik za nastanak invazivnog karcinoma grlića materice [52]. Sa druge strane, meta analiza koja je obuhvatila 16 studija i analizirala 15.619 učesnica nije našla nikakav značajan rizik od raka grlića materice kod osoba koje koriste OK [53]. Oralna kontracepcija promoviše ektopiju grlića materice, što bi moglo da objasni sklonost za infekciju HPV-om prikazanu u nekim studijama. Međutim, postoji više faktora povezanih sa infekcijom HPV-a koji se takođe često poklapaju sa upotrebom hormonske kontracepcije (uključujući reproduktivnu dob, seksualno ponašanje i pušenje) koji svi mogu biti dodatni faktori u istraživanju povezivanja raka grlića materice sa kontraceptivnim sredstvima [32].

1.2.2.3. Paritet

Velika epidemiološka studija, koja je obuhvatila podatke iz 25 studija [54] prijavila je da postoji udruženost između broja donesenih trudnoća sa rizikom od invazivnog karcinoma grlića materice. Relativni rizik (RR=1.76) bio je veći kod višerotki (≥ 7 trudnoća) u odnosu na žene koje su imale 1-2 porođaja. Takođe, žene koje su bile mlađe od 17 godina u prvoj iznesenoj trudnoći u poređenju sa onima ≥ 25 godina, imale su veći rizik od nastanka cervikalne intraepitelijalne lezije gradusa 3 (CIN3) i invazivnog karcinoma. Evropska kohortna studija (EPIC) koja je uključivala 308.036 žena, izvestila je da je broj trudnoća pozitivno povezan sa rizikom od CIN3, iako nije nađena povezanost sa invazivnim karcinomom grlića materice [55].

Moguće objašnjenje biološkog mehanizma za povezanost visokog pariteta i incidencije cervikalnog karcinoma može biti da su povišeni nivoi estrogena i posebno progesterona tokom trudnoće odgovorni za promene na skvamo-kolumnarnom spoju, održavajući zonu transformacije na egzocerviksu dugi niz godina [54,56,57]. Nezero

epitel zone transformacije doprinosi perzistentnosti hrHPV-a i progresiji preko intraepitelijalnih promena visokog stepena do invazivnog karcinoma. Drugi mogući mehanizam je imunosupresija u trudnoći koja može da podstakne onkogeni potencijal HPV infekcije.

1.2.2.4. Pušenje

Epidemiološke studije pokazale su da pušenje povećava rizik od raka grlića materice [58,59], te je Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. International Agency for Research Cancer, IARC) klasifikovala pušenje duvana kao faktor rizika za rak grlića materice [60]. Pušenje cigareta ometa imuni sistem tako što povećava virusno opterećenje [61], potiskuje i humoralni [62,63] i celularni imuni sistem [64], te ima značajnu ulogu u ranim fazama kancerogeneze povezane sa HPV-om [65]. Meta analiza *Su i saradnika*, sa ukupno 384.995 učesnika pokazala je da je i pasivno pušenje povezano sa većim rizikom od nastajanja karcinoma grlića materice (OR=1.70) [66].

1.2.2.5. Vaginalni mikrobiom

Vaginalni mikrobiom može delovati zaštitno ili pak stimulisati nastanak CIN promena i progresiju do raka grlića materice [67,68]. Studije su pokazale da postoji korelacija sastava vaginalnog mikrobioma i HPV statusa sa različitim nivoima težine CIN-a, što ukazuje da vaginalni mikrobiom može biti potencijalni biomarker za progresiju bolesti povezane sa HPV infekcijom [69,70]. Prisustvo *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* i *Lactobacillus iners* zajedno sa niskim nivoom *Lactobacillus crispatus* smatra se najopasnijom kombinacijom za razvoj CIN-a [71,72]. Zaključci

tekućih i budućih studija omogućiće nam bolje razumevanje odnosa vaginalnog mikrobioma i domaćina za potrebe donošenja odluke tokom lečenja bolesti povezanih sa HPV infekcijom.

1.3. Cervikalne intraepitelijalne neoplazije - CIN (Skvamozne intraepitelijalne lezije-SIL)

Karcinomu grlića materice prethodi dugotrajan preinvazivni period (3-10 godina) prepoznatljivih citoloških i histoloških promena koje se mogu uspešno dijagnostikovati i lečiti [73,74]. Krajem šezdesetih godina prošlog veka, Richart i Barron su te promene nazvali cervikalnim intraepitelijalnim neoplazijama (eng. cervical intraepithelial lesion, CIN), da bi naglasili kontinuitet jedne bolesti u rasponu od blage displazije do karcinoma grlića materice, i na osnovu debljine zahvaćenog epitela podelili ih u tri grupe [75]. **CIN 1** koja odgovara lezijama blagog stepena gde promena zahvata 1/3 epitela; **CIN 2** se poklapa sa srednje teškom lezijom i zahvata 2/3 epitela; **CIN 3** teška lezija, promene se nalaze u celoj debljini epitela.

Novijim saznanjima o etiologiji preinvazivnih promena i HPV infekciji, uvidelo se da nije reč samo o jednoj bolesti sa različitim stadijumima, već o dva različita biološka entiteta. Jedan je *produktivna virusna infekcija*, a drugi pravi *neoplastičan proces* ograničen na epitel [76]. Promene koje su opisivane kao laka displazija ili CIN 1 zapravo predstavljaju produktivnu virusnu infekciju, uglavnom su tranzitorne prirode i karakteriše ih velika mogućnost spontane regresije. Promene obeležene kao srednje teška i teška displazija odnosno CIN 2 i CIN 3 povezane su sa perzistentnom infekcijom hrHPV čiji je DNK po pravilu ugrađen u genom domaćina, pa je i potencijal maligne progresije znatno veći.

Da bi se izbegli nesporazumi i postigla uniformna terminologija koja podržava trenutno znanje o HPV infekciji, SZO je promene na grliću materice svrstala u dve grupe na osnovu biološkog ponašanja:

- skvamozne intraepitelijalne lezije niskog stepena, **L-SIL** (eng. Low squamous intraepithelial lesion) , gde pripada CIN 1
- skvamozne intraepitelijalne lezije visokog stepena **H-SIL** (eng. High squamous intraepithelial lesion) gde spadaju CIN 2 i CIN 3 [77].

Došlo je i do promene terminologije vezano za patohistološke nalaze donjeg genitalnog trakta u vidu LAST projekta (eng. Lower Anogenital Squamous Terminology Project) koji takođe preporučuje primenu naziva LSIL i HSIL [78], uz napomenu da se uz HSIL nalaz, promene kvalifikuju kao CIN2 ili CIN3, s obzirom na heterogenost u stopama regresije i mogućnosti konzervativnog lečenja CIN2 posebno kod mladih žena [79,80]. Ova terminologija je bliska kliničarima jer je uporediva sa citološkim opisom i olakšava komunikaciju između patologa i ginekologa. Reproducibilnost histoloških dijagnoza CIN2 je istorijski loša, sa malim slaganjem među posmatračima [81]. U svrhu bolje patohistološke klasifikacije lezija koje su ranije bile dijagnostikovane kao CIN2 preporučuje se analiza tkiva primenom biomarkera p16 imunodijagnostike da bi se potvrdilo prisustvo aktivne onkogene HPV DNK u ovim lezijama [82] i omogućilo razlikovanje skvamoznih ćelija visokog stepena od onih sa benignim ponašanjem.

Tačnu učestalost skvamoznih intraepitelijalnih lezija nije moguće utvrditi, jer nije bolest koja se prijavljuje, zavisi od populacije koja se pregleda, tako da većina podataka potiče iz ciljanih studija [83]. Približno 1.5 na 1000 žena u razvijenim zemljama ima dijagnozu CIN2 ili CIN3 godišnje, sa najvećom incidencom među ženama starosti između 25 i 29 godina i to 8.1 na 1000 žena [84,85]. Uočeno je da se

prevalencija skvamoznih lezija smanjuje sa povećavanjem starosti: najviša je kod žena od 25-29 (2.6%), a posle 50. godine života smanjuje se na 0.9% [76]. Noviji podaci pokazuju značajno smanjenje incidencije SIL u populacijama koje su vakcinisane protiv HPV [86,87].

Nedavna meta analiza i sistemski pregled literature koja je uključila 89 studija, dala je najnovije podatke o biološkom ponašanju CIN-a [88]. Za žene sa konzervativnim pristupom LSIL (CIN1) ukupna stopa regresije, perzistencije i progresije do CIN 2+ i CIN 3+ iznosila je 60%, 25%, 11% i 2% (redom). Stopa regresije za CIN 2 bila je 55%, perzistencije 23%, i progresije 19%, dok je za CIN 3 stopa regresije bila 28%, perzistencije 67%, a progresije 2%. Slične podatke pokazao je i sistematski pregled gde je među konzervativno posmatranim CIN 2, 50% regrediralo, 32% perzistiralo, a 18% promena je progrediralo do CIN 3+ [79]. Regresija CIN 2 značajno je veća kod žena \leq od 30 godina negativnih na visokorizične hrHPV (66%) [79,88]. Samo 2/7180 (0.03%) slučajeva CIN 1 i 10/3037 (0.3%) slučajeva CIN 2 napredovalo je do karcinoma grlića materice [88]. Zaključak studije je da će većina CIN 1 i CIN 2 spontano regredirati za manje od 24 meseca, sa najvišim stopama kod mladih žena koje su negativne na hrHPV tipove, dok je progresija do karcinoma manja od 0.5%. Konzervativno lečenje treba razmotriti, posebno kod žena u reproduktivnom periodu [88].

1.4. Citologija

Papa test, uveo je 1940-ih Džordž Papanikolau i zasnovan je na proceni citološke morfologije eksfoliranih ćelija grlića materice [90]. Efikasan i jednostavan citološki bris, kao skrining metoda, drastično je smanjio učestalost i mortalitet od

invazivnih oblika karcinoma grlića materice [91,92]. Postoji više nomenklatura na osnovu kojih se iskazuje rezultat citološkog brisa. U našoj zemlji zastupljene su Papanikolau i Betezda klasifikacija, sa tendencijom da se u potpunosti pređe na Betezda nomenklaturu koja standardizuje citološke i histološke izveštaje, omogućavajući bolju komunikaciju među kliničarima, patolozima i pacijentima [93]. Grupe Papanikolau klasifikacije ne odražavaju današnje shvatanje o etiopatogenezi karcinoma grlića materice i nemaju ekvivalent u patohistološkoj terminologiji. Uporedni prikaz ove dve klasifikacije prikazan je u tabeli 1.

Tabela br. 1. *Uporedni prikaz Papanikolau i Betezda klasifikacije citološkog brisa*

Papanikolau sistem	Betezda sistem
Neadekvatan uzorak	Nezadovoljavajuć nalaz
I Normalan nalaz	Normalan nalaz
II Prisutna inflamacija, benigne reaktivne I reparativne promene	NILM (negativan u smislu intraepitelijalne leije ili maligniteta) – prisutna inflamacija, reparativne i reaktivne promene ili druga benigna stanja
III a Atipične ćelije neodređenog značaja <ul style="list-style-type: none"> • skvamozne • glandularne 	Atipične skvamozne ćelije (ASC) <ul style="list-style-type: none"> • ASC - US neodređenog značaja • ASC - H ne može se isključiti lezija visokog stepena Atipične glandularne ćelije (AGC) <ul style="list-style-type: none"> • AGC-NOS koje nisu drugačije svrstane • AGC-FN verovatno neoplastične
III b <ul style="list-style-type: none"> Diskarioza lakog stepena Diskarioza srednjeg stepena 	L-SIL (CIN 1) H-SIL (CIN 2)
IV Diskarioza teškog stepena	H-SIL (CIN 3)
V Maligne ćelije	Skvamozni invazivni karcinom (SCC)

U cervikovaginalnoj citologiji koriste se dve vrste uzoraka: konvencionalna i tečna citologija (eng. *liquid based cytology*, LBC). Konvencionalna citologija (CC) se koristi decenijama, a nedostatak ove tehnike su dešavanja u preanalitičkoj fazi

(uzimanju i pripremanju uzorka za analizu) što može dovesti do lažno negativne, ali i lažno pozitivne interpretacije. Pokušaj da se unapredi senzitivnost citološkog brisa bilo je uvođenje LBC gde su uzorci ujednačeno fiksirani i omogućavaju testiranje prisustva HPV na istom uzorku. Međutim, studije koje upoređuju ove dve tehnike nisu dale dosledne podatke da je LBC superiornija metoda u odnosu na konvencionalni citološki bris, tako da se obe smatraju prihvatljivom [94,95,96,97].

Većina rezultata citološkog brisa je negativna (eng. Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM/Papa II), a svega 5-8% nalaza je atipična (abnormalna) i ukazuje na moguće prisustvo prekancerozne lezije [98].

Najčešći abnormalan citološki nalaz su atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (eng. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US/Papa IIIa), promene slične skvamoznoj intraepitelnoj leziji, ali im nedostaju kriterijumi za definitivnu interpretaciju. U studiji koja je tokom 2 godine pratila žene sa ASC-US nalazom, utvrđeno je u 26% slučajeva prisutnost SIL-a, i to 15% L-SIL i 11% H-SIL (5% CIN 2 i 6% CIN3) [99]. Ista studija utvrdila je kumulativnu incidenciju od 8-9% za CIN 3 promene kod žena sa ASC-US nalazom tokom 24 meseca [99]. Testiranje ovih pacijentkinja na HPV omogućava razvrstavanje u grupe sa manjim ili većim rizikom za prisutnost HSIL lezija kod kojih je potrebna kolposkopija [100,101].

Atipične skvamozne ćelije koje govore u prilog displaziji (engl. Atypical Squamous Cells – a High grade squamous intraepithelial lesion cannot be excluded, ASC-H/Pap IIIa) čine 5-10% svih ASC nalaza, promene podsećaju na HSIL, ali nedostaju kriterijumi za definitivnu interpretaciju. SIL se dijagnostikuje u 30-40% nalaza, a u 25-50% to bude HSIL [102].

Nalaz skvamozne intraepitelijalne lezija niskog stepena (engl. Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL/Papa IIIb) predstavlja posledicu prolazne HPV

infekcije, i u najvećem broju slučajeva će spontano regresirati. Nakon deset godina praćenja, kod žena sa LSIL citologijom, u 87.7% slučajeva nalaz je postao normalan, u 2.8% progredirao u CIN 3, a u svega 0.4% u invazivni karcinom [83]. Velika randomizirana studija zaključila je da je u preko 80% slučajeva HPV test pozitivan, te se ne preporučuje HPV testiranje kao trijažni test kod nalaza LSIL [103,104].

Pacijentkinje sa citološkim nalazom skvamozne intrapeitelne lezije visokog stepena (engl. High-grade Squamous Intraepithelial Lesion **HSIL/Papa IIIb, Papa IV**) u preko 50% slučajeva će imati nalaz CIN2 i teži, a u 2% invazivni karcinom [83].

Iako je u poslednjih 50 godina značajno smanjio incidencu karcinoma grlića materice, citološki bris ima i svojih ograničenja [91]. Sistematski pregled pokazao je da senzitivnost citološkog brisa ima širok raspon od 30% do 87%, a specifičnost od 86% do 100% [105]. Niska osetljivost jednog razmaza za otkrivanje prekursorskih lezija visokog stepena (50%–70%), zahteva često testiranje [106], a niska reproducibilnost citologije [107], dovodi do njene promenljive tačnosti [105]. Nedostatak citologije su i lažno pozitivni rezultati jer većina atipičnih nalaza nisu povezani sa CIN3 promenama ili karcinomom. Visok procenat lažno negativnih rezultata kod karcinoma grlića materice (24-32%) posledica je odmaklog procesa sa izraženom ćelijskom nekrozom [108,109].

1.5. HPV test

Razumevanje i objašnjenje uloge perzistentne HPV infekcije u etiologiji nastanka karcinoma grlića materice doveli su do razvijanja molekularnih testova u detekciji HPV virusa. Obzirom da se HPV razmnožava samo u terminalno diferenciranim epitelnim ćelijama, klasične metode za dokazivanja virusa uzgajanjem

u ćelijskoj kulturi nisu moguće. Infektivni ciklus HPV je intraepitelijalni, ne ulazi u krvotok, ne pravi viremiju i stvara vrlo kasnu reakciju produkcije antitela. Iz tog razloga serološki testovi ne koriste se u svakodnevnoj kliničkoj praksi, već su rezervisani za klinička ispitivanja efikasnosti imunološkog odgovora i imunizacije vakcinama za HPV. Za dijagnostiku HPV infekcije najčešće se koristi jedna od dve metode molekularne dijagnostike koje za analizu koristi materijal koji se uzorkuje lokalno iz cervikalnog brisa. Prva je *metoda hibridizacije* koja se bazira na sparivanju tj hibridizaciji malih označenih delova nukleinskih kiselina koji se zovu probe ili prajmeri sa ciljnom DNK. Druga metoda je *lančana reakcija polimeraze* (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) koja se zasniva na umnožavanju određenog, željenog dela DNK.

Za skrining i svakodnevnu praksu bitni su testovi koji detektuju samo visoko onkogene tipove HPV, jer detekcija ostalih tipova smanjuje specifičnost testa, nema značaja u evaluaciji žena sa abnormalnim citološkim nalazom i bitna je samo u naučnoistraživačke svrhe. Trenutno postoji mnogo komercijalnih HPV testova na tržištu, ali samo mali broj njih je klinički validan prema međunarodno dogovorenim kriterijumima [110]. Zasnovana na sveobuhvatnom pregledu literature i podržana od strane Evropske asocijacije ginekološke onkologije (eng. European Society of Gynaecological Oncology, ESGO) i Horizon 2020 (Program za istraživanje i inovacije Evropske komisije) objavljena je lista validnih HPV testova za primarni cervikalni skrining, koja između ostalih sadrži i *RealTime High Risk HPV Test* (Abbott GMBH, Nemačka), test koji smo koristili u našem istraživanju [111]. Abbott RealTime – HPV test razdvaja 12 visoko onkogenih HPV tipova od dva najznačajnija hrHPV tipa 16 i 18. U studiji na 998 uzoraka, senzitivnost za CIN2+ Abbott RealTime bila je 93.3%, specifičnost 27.3%, a pozitivna prediktivna vrednost (PPV) 38.2% [112].

HPV tipizacija je koristan marker u detekciji lažno negativnih citoloških nalaza, posebno ako se radi o infekcijama visokoonkogenim HPV tipovima 16 i 18. Ukupna senzitivnost HPV tipizacije u detekciji CIN 2 promena u odnosu na citologiju je veća (96.1% prema 53%), ali manje specifična (90.7% prema 96.3%) [106,113]. HPV test predstavlja visoko senzitivnu, nisko specifičnu metodu u detekciji prekanceroznih lezija, zbog toga što je većina HPV infekcija prolaznog karaktera i nestaje spontano u roku od dve godine.

1.6. Skrining

Rak grlića materice ispunjava sve preduslove za masovni skrining program jer je bolest dovoljno učestala, povezana je sa značajnom smrtnošću i dostupan je efikasan tretman za preinvazivnu ili ranu invazivnu bolest. Skrining grlića materice ima za cilj da identifikuje žene sa asimptomatskim oblikom bolesti kada je lečenje moguće procedurom niskog morbiditeta, čime se smanjuje rizik od razvoja invazivne bolesti. U zemljama sa efikasnim i dobro organizovanim populacionim skriningom, došlo je do dramatičnog smanjenja incidencije bolesti i mortaliteta od karcinoma grlića materice [6,114,115].

U našoj zemlji, prema Nacionalnom vodiču, u prve tri godine nakon početka seksualnih aktivnosti ili najkasnije u starosti od 21. godine, treba uraditi citološki bris. Nakon dva uzastopna normalna nalaza u razmaku od šest meseci, kod žena koje pripadaju grupi prosečnog rizika može se raditi u dužim vremenskim intervalima, na tri godine [83].

Saznanjem da rak grlića materice ima jaku uzročnu vezu sa perzistentnom infekcijom hrHPV [116], uvećale su se mogućnosti identifikovanja prekanceroznih

lezija grlića materice i razvili alternativni modaliteti skrininga u vidu testa za otkrivanje DNK HPV [117]. Najveća prednost uvođenja HPV testiranja kao skrining metode je njegova visoka negativna prediktivna vrednost od 99.5% [118]. Negativni HPV test praktično isključuje rizik od bolesti grlića materice, osigurava isti stepen zaštite više od pet godina, kao što je prihvaćen standard negativnog Papa testa da osigurava zaštitu više od dve godine [119,120]. Negativan HPV test ima visoku prediktivnu vrednost jer je 3-godišnji rizik od nastanka CIN3+ lezija manji u poređenju sa 3-godišnjim rizikom nakon citološkog negativnog rezultata (0.069% prema 0.19% $P < 0.0001$). Takođe, i 5-godišnji rizik od razvoja CIN 3 promena manji je u odnosu na negativno HPV/Papa kotestiranje (0.069% prema 0.11% $P < 0.0001$) [121]. Interval testiranja mogao bi biti i veći, čak 8-10 godina, s obzirom da je infekcija HPV, pa čak i ona hrHPV tipovima dugo godina asimptomatska [122]. hrHPV test detektuje 30% više CIN2+ i 20% više CIN3+ lezija u odnosu na citologiju kod žena starijih od 30 godina [123]. Primarni HPV skrining praćen trijažom Papa testom senzitivniji je u otkrivanju težih promena i isplativiji od kotesting-a (HPV + Papa test), a čak je i isplativiji od samog Papa skrininga jer se može povećati interval skrininga uz jednaku senzitivnost i sigurnost [124]. Uvođenjem HPV testiranja kao primarnog skrininga procenjuje se da bi se uštedelo 25% sredstava, obzirom da bi se smanjio broj ponavljanih citoloških nalaza i povećao interval testiranja na pet godina, umesto dosadašnje tri [125,126]. Dalja ušteda oglada se u potrebi za jednim laboratorijskim tehničarem koji obradi više uzoraka HPV u odnosu na nekoliko citoloških tehničara koji obrađuju isti broj citoloških uzoraka [127]. Takođe, obuka tehničara za obradu HPV testova znatno je brža od obuke za citologa za obradu Papa brisa, a osiguranje kvaliteta postupka HPV testiranja je znatno jednostavnije. Još jedna prednost HPV testa je objektivnost, jednostavnost uzimanja brisa, kao i mogućnost da žene same uzmu uzorak, što je od velike važnosti kod žena

koje ne odlaze na redovne preglede zbog geografske udaljenosti, uverenja ili pripadnosti nekim manjinama [128].

Danas su dostupni jasni dokazi i preporuke iz velikih kliničkih randomiziranih ispitivanja i studija izvodljivosti koji podržavaju uvođenje molekularnog testiranja HPV kao primarnu tehnologiju u skriningu raka grlića materice, praćen trijažnim Papa testom (tj. HPV primarni skrining) [113,129,130,131,132,133]. Ta su istraživanja pokazala da je HPV test znatno senzitivniji u otkrivanju teških lezija grlića materice, ali još uvek ima manju specifičnost od citologije [127]. Gubitak specifičnosti moguće je smanjiti izbegavanjem HPV testiranja kod žena mlađih od 30 god, jer je kod žena mlađe životne dobi infekcija učestala, ali uglavnom tranzitorne prirode i u samo manjem broju ostaje perzistentna [134]. Još jedan od razloga da se budući skrining programi temelje na HPV testiranju su činjenica da će sve više žena biti vakcinisano protiv HPV-a, a time će biti sve manji broj promenjenih Papa nalaza, što će još više smanjiti osetljivost citologije [135]. Citologija će opravdano biti primenljiva samo kod žena koje imaju povišen rizik, tj kod HPV pozitivnih žena. Mnoge zemlje su u različitim fazama usvajanja primarnog skrininga na HPV, dok druge nisu preduzele značajnije korake ka uvođenju ovog pristupa.

1.7. Kolposkopija

Kolposkopija je neinvazivna dijagnostička metoda koja podrazumeva vizuelnu inspekciju grlića materice, vagine i vulve pod uveličanjem. Princip sistema sočiva u kolposkopu omogućava sagledavanje i proučavanje sitnih detalja, veličine, lokacije i težine promena na posmatranoj površini.

Grlić materice prekriven je pločastoslojevitim epitelom bez orožavanja koji se oko spoljašnjeg materičnog ušća dodiruje sa cilindričnim epitelom endocervikalne sluznice. Linija razdvajanja ova dva epitela naziva se skvamokolumnarna granica (eng. Squamocolumnar junction, SCJ). SCJ je dinamična linija koja menja svoj položaj u pubertetu, trudnoći, tokom upotrebe oralnih sredstava za kontracepciju ili postmenopauzi i u direktnoj vezi je sa estrogenskim statusom žene. U reproduktivnom periodu žene često dolazi do everzije endocervikalne sluznice na ektocerviks. Prilikom izlaganja cilindričnog epitela niskom pH vagine, dolazi do umnožavanja i transformacije cilindričnog epitela u pločastoslojeviti epitel. Ovaj proces naziva se metaplazija. Zona koju zahvata proces metaplazije naziva se zona transformacije, posebno je osetljiva na onkogene, uključujući HPV infekciju i predstavlja mesto nastanka prekanceroznih promena i karcinoma [136,137]. Promene koje nastaju uočavaju se kao atipične kolposkopske slike (aceto-white (AW) epitel, mozaik, punktacije, izražen vaskularni crtež, znak unutrašnje granice, znak grebena) [138].

Kolposkopija je dijagnostička metoda koja se primenjuje u diferencijalnoj dijagnozi abnormalnog citološkog nalaza. Indikacije za primenu kolposkopije predstavlja abnormalni skrining test na grliću materice (uključujući citološki bris i/ili HPV test) ili procena žene sa sa klinički sumnjivim grličem materice [139,140]. Cilj kolposkopskog pregleda je da isključi invazivnu bolest, identifikuje atipičnu promenu, proceni težinu lezije i njenu rasprostranjenost, kao i da omogući izbor adekvatnog mesta za biopsiju.

Uprkos svom značaju i širokoj upotrebi, kolposkopija je subjektivna metoda, te postoje velike varijacije u nalazima u zavisnosti od iskustva kliničara [141]. Kolposkopičari su obično saglasni oko prisustva ili odsustva AW epitela, ali je podudarnost između ostalih elemenata kolposkopskih abnormalnosti loša [142]. Prema

nekim istraživanjima podudarnost između različitih ispitivača prisutna je u 52.5% u prvom i 51% slučajeva u drugom gledanju, a sa svojim sopstvenim prethodnim nalazom saglase se samo u 66.7% [143].

Istraživanja različitih autora daju drugačije rezultate kada je u pitanju osetljivost i specifičnost kolposkopije [144]. Senzitivnost kolposkopije je visoka, ali je specifičnost niska zbog precenjivanja acidobele površine u zoni transformacije (20-47%) [145]. Na osnovu velike meta analize senzitivnost kolposkopije iznosi 85% (32-92%), a specifičnost 69% (30-99%) [146].

U populaciji sa graničnim citološkim abnormalnostima koje su povezane sa malim, ranim lezijama blagog stepena, za otkrivanje prekanceroznih promena senzitivnost kolposkopije može biti vrlo niska, čak i do 50% [99], jer kod ovih pacijenata, kolposkopski nalazi povezani sa teškim promenama, kao što su grube vaskularne šare i gust AW epitel nisu prisutni [147].

Senzitivnost citologije u otkrivanju intraepitelijalnih lezija visokog stepena iznosi između 36 i 47%, kolposkopije između 62 i 72%, a kombinacija citologije i kolposkopije poboljšava dijagnostičku osetljivost za promene visokog stepena na 70-80%. Ovi podaci ukazuju da poznavanje rezultata citološkog brisa poboljšava identifikaciju grubih kolposkopskih slika (*major changes*) koje odgovaraju promenama HSIL, ali isto tako i da 20-30% cervikalnih intraepitelijalnih lezija visokog stepena ostaje neotkriveno [148,149,150]. To je potvrđeno i ALTS studijom gde je samo polovina finalno detektovanih CIN 3 lezija prepoznato kolposkopom [99,151].

Kolposkopsko razlikovanje između normalnog grlića i lezija niskog gradusa od promena visokog gradusa/karcinoma pokazali su senzitivnost od 61% i specifičnost od 94% [142]. Analizom Underwooda i saradnika, senzitivnost kolposkopski indikovane biopsije za CIN 1 promene iznosila je 91%, (specifičnost 25%), dok je za CIN 2

promene senzitivnost bila 80% (specifičnost 63%) [152]. Postoji povezanost između veličine lezije i stepena cervikalne promene, a tačnost kolposkopske dijagnoze HSIL povezana je sa veličinom promene [150]. Lezije visokog stepena su u većoj saglasnosti sa patohistološkim nalazima posle biopsije nego promene niskog stepena, a sprovedena istraživanja pokazuju nisku pozitivnu prediktivnu vrednost kolposkopije za CIN 1 i CIN 2 lezije (16%, 32%) i visoku za CIN 3 promene koja iznosi čak 86% [153].

Histologija predstavlja zlatni standard za detektovanje HSIL promena, pa se kolposkopski nalazi potvrđuju biopsijom [154]. Mnoge studije pokazale su da uzimanje jedne ciljane biopsije (*punch*) sa najteže lezije identifikovane tokom pregleda, može propustiti do jedne trećine prekanceroznih promena, te se preporučuju višestruke biopsije (najmanje 2 do 4) svih oblasti sa AW epitelom, metaplazijom ili većim abnormalnostima [155,156,157,158,159].

Promenama u primarnoj i sekundarnoj prevenciji karcinoma grlića materice, očekuje se da će se dodatno smanjiti senzitivnost i značaj kolposkopije [160]. Programi zasnovani na primarnom HPV skriningu dovešće do još izazovnije kolposkopije, jer su lezije povezane sa upornim HPV infekcijama bez citoloških abnormalnosti male i teže za otkrivanje. Takođe, usvojene su preporuke u smislu konzervativnijeg pristupa kod mlađih žena i smanjenju broja kolposkopskih pregleda u toj populaciji [161]. Očekuje se da će se većim obuhvatom vakcinacije protiv HPV, prevalencija HPV16 smanjiti među mladim ženama. Kako HPV16 lezije imaju tendenciju da budu najvidljivije kolposkopske lezije, kolposkopija kod žena sa preostalim tipovima HPV-a će biti teža [156,162].

1.8. Tretman SIL/CIN

Cilj lečenja prekanceroznih promena je da se spreči moguća progresija do karcinoma, uz izbegavanje prekomernog lečenja, jer se neke lezije mogu spontano povući, a lečenje ima određene posledice. U zemljama sa dobro organizovanim populacionim programom skrininga i mogućnošću kolposkopije, procenjuje se da se uradi najmanje 6 tretmana CIN-a da bi se sprečio 1 slučaj raka grlića materice [163].

Postoje dva pristupa:

- konzervativan (podrazumeva praćenje pomoću HPV testa, citologije i/ili kolposkopije)
- hirurški tretman transformacione zone grlića materice.

Hirurške metode koje se koriste u tretmanu cervikalnih intraepitelijalnih lezija dele se na ablativne i ekscizionne metode. Izbor lečenja zavisi od stepena i obima promene. Ekscizionne metode imaju prednost u odnosu na ablativne, zbog postojanja dela tkiva koji se šalje na obaveznu patohistološku (PH) verifikaciju, čime se potvrđuje dijagnoza, isključuje okultni malignitet i dobija informacija o potpunosti ekscizije [164]. Ablativne procedure sastoje se od krioterapije, elektrokoagulacione dijatermije ili laserske ablacije. Ekscizionne opcije uključuju proceduru elektrohirurške ekscizije promene ili zone transformacije omčicom (*loop*) (eng. loop electrosurgical excision procedure LEEP ili large loop excision of transformation zone LLETZ), konizaciju hladnim nožem (eng. cold knife conisation, CKC) i laser konizaciju, koje uklanjaju jedan do tri centimetra tkiva grlića materice.

1.8.1.Preporuke tretmana CIN

Rizik pacijenta od progresije u karcinom u velikoj meri povezan je sa starošću žene i stepenom CIN promene.

1.8.1.1. Tretman LSIL promena

Vodiči su saglasni da tretman LSIL (CIN 1) promena treba izbeći [83,140,161,165,166]. Pojedini autori idu korak dalje, te se preporuke zasnivaju na individualnom riziku od nastanka CIN3+ promena, uzimajući u obzir rezultate trenutnih i prethodnih skrining testova (ukoliko su poznati) i lične faktore pacijenta kao što su starost i eventualno postojanje imunosupresije [161]. Novonastala CIN 1 promena kojoj prethodi LSIL, ASCUS ili NILM citologija, a koja je pozitivna na HPV ima mali rizik za razvoj raka grlića materice, pa se preporučuje praćenje [161,165,166]. Otprilike 90% ovih lezija će ili regresirati u negativne ili će ostati CIN 1. U kohortnoj studiji na preko 100.000 pacijenata sa kolposkopskom biopsijom koje pokazuju CIN 1 i koje su praćene deceniju, rizik od razvoja CIN 3+ kada je prethodna citologija bio LSIL ili manje bio je: za LSIL, HPV-pozitivan – jednogodišnji i petogodišnji rizik 0.7 i 2.3%; za ASC-US, HPV-pozitivan – jednogodišnji i petogodišnji rizici 0.5 i 2.6%; za NILM, HPV-pozitivan – jednogodišnji i petogodišnji rizici 0.7 odnosno 2.8% [167]. S obzirom na nizak rizik od razvoja CIN 3+, preporučuje se praćenje HPV testom ili citologijom jednom godišnje.

Perzistentni CIN 1 (duže od dve godine) ima nizak rizik od progresije ka CIN 3+. U gore opisanoj kohortnoj studiji, nakon što su dve uzastopne kolposkopske biopsije pokazale CIN 1, 48% pacijenata je nastavilo da bude HPV pozitivno, a od toga

je preko 90% imalo naknadnu citologiju koja je bila LSIL ili manje [167]. U studiji na 126 pacijenata koji su bili podvrgnuti proceduri LEEP za perzistentni CIN 1, 87 % je imalo CIN 1 ili normalan nalaz na eksciznom uzorku u odnosu na 13% CIN 2+ [168]. Iz ovih razloga preporuka je praćenje perzistentnih CIN 1 promena, mada kod nekih pacijenata je prihvatljivo i lečenje ukoliko je dugotrajno praćenje otežano ili kod pacijentinja koje su završile reproduktivnu funkciju i nisu zabrinute zbog budućih akušerskih komplikacija.

Kada CIN 1 promeni prethodi citologija ASC-H ili HSIL rizici za razvoj CIN 3+ su: za ASC-H jednogodišnji i petogodišnji 1.4 i 5.6%; za HSIL jednogodišnji i petogodišnji 3.9 i 6.5% [167]. Kod CIN 1 promena kojoj je prethodila HSIL citologija preporuke za većinu pacijenata su lečenje umesto praćenja. Međutim, za pacijente koji su pouzdani za praćenje i planiraju buduće rađanje i više su zabrinuti zbog potencijalnih štetnih akušerskih ishoda (npr. prevremeni porođaj) nakon ekscizionih procedura nego zbog rizika od progresije do raka grlića materice, polugodišnje praćenje (kolposkopija i HPV test/citologija) do dve godine je razumna opcija. Ukoliko tokom praćenja perzistira citologija HSIL, ili su na biopsiji prisutne CIN2 ili CIN3 preporučuje se ekscizioni tretman.

1.8.1.2. Tretman HSIL promena

Histološki dijagnostikovane HSIL (CIN2 i CIN3) promene po ranijim preporukama zahtevale su promptno lečenje. Epidemiološkim studijama i saznanjem da će 50% slučajeva CIN 2 regredirati bez tretmana, kao i da lečenje ima određene posledice, otvorilo je mogućnost da se pacijentkinjama u reproduktivnom dobu ponudi

konzervativno lečenje CIN2 promena, ukoliko postoji bojazan za ishod buduće trudnoće [169]. Uslovi koji moraju da se ispune su sledeći:

- kolposkopski pregled je adekvatan i isključio je invazivnu bolest
- CIN 2 lezija ne zauzima više od 2 kvadranta grlića materice
- CIN 2 je dijagnostikovano histološki
- Pacijentkinja je adekvatno savetovana, potpisala je informisanu saglasnost i pouzdana je za praćenje [165].

Konzervativan pristup podrazumeva 6-mesečne kontrole (kolposkopija i citologija) i ponovne biopsije ukoliko je kolposkopski primećena progresija promene ili teža lezija. HPV16 tipizacija je koristan faktor za odlučivanje o kliničkom toku kod dijagnoze CIN 2 [170]. Manja je verovatnoća da će HPV16 pozitivan CIN 2 regresirati, zbog veće sklonosti da perzistira i većeg onkogenog potencijala da napreduje do prekanceroznih lezija u odnosu na druge hrHPV genotipove [171,172]. Ovaj nalaz se složio sa studijom gde je 2.4% HPV-16 pozitivnih lezija napredovalo u rak u roku od 10 godina, u poređenju sa 0.6% za HPV-negativne lezije [173]. HPV16 negativan CIN 2 kod mladih žena sa ASCUS ili LSIL citologijom dozvoljava manje agresivan tretman u smislu intenzivnijeg praćenja umesto trenutnog lečenja [169], dok je HPV16 pozitivan CIN2 najjače povezan sa CIN3 [81] i ima najmanju stopu regresije, te zahteva lečenje. Žene sa CIN2 dijagnostikovanim biopsijom, nakon HSIL citologije imaju veću verovatnoću da imaju osnovni CIN3 od onih sa manje ozbiljnom citologijom [174,175]. Osnovni zadatak svake strategije u trijaži žena sa CIN2 je blagovremeno otkrivanje teže promene CIN3 (pogrešno klasifikovano kao CIN2 [176]) ili progresija kancerogene HPV infekcije, ali ujedno i izbegavanje tretmana kod promena koje bi spontano regresirale [177]. Lečenje se mora ponuditi ako se CIN2 ne reši u toku od 24 meseca.

[161,165,166]. CIN3 promena kao direktni prekursor raka grlića materice zahteva tretman. [161,165,166].

1.8.2..Preporuke tretmana CIN kod mladih pacijentkinja

Konzervativnije i manje invazivne strategije lečenja kod ove populacije pacijenata su prihvatljive zbog veće stope regresije histološkog HSIL-a (posebno CIN 2) i manji rizik od progresije do invazivnog karcinoma [178,179,180,181]. U nacionalnom i američkom vodiču mlađe pacijentkinje se odnose na uzrast do 25 godina, dok evropski konsenzus precizira da se konzervativni pristup odnosi na pacijentkinje ≤30 godina starosti.

Kod histološke CIN1 promene sa prethodnom citologijom ASC-US, LSIL, ASC-H ili HSIL, preporučuje se praćenje pre nego tretman. Kod mladih pacijenata, prolazna HPV infekcija je uobičajena, a rizik od progresije u rak je nizak za ove lezije. Za ASC-US i LSIL, ponovljena citologija se radi jednom godišnje; za ASC-H citologija se ponavlja jednom godišnje u trajanju od dve godine; za HSIL praćenje obuhvata kolposkopiju i citologiju na godinu dana ukupno dve godine. Kod pacijenata sa histološkim HSIL klasifikovanog kao CIN2, konzervativno praćenje sa polugodišnjom citologijom i kolposkopijom do 2 godine je prihvatljivo. Ponovljena biopsija se preporučuje ako se kolposkopski izgled lezije pogorša ili ako HSIL na citologiji traje 1 godinu. Lečenje se indikuje ako je kolposkopija nezadovoljavajuća, ako se postavi dijagnoza HSIL/CIN 3 ili ako HSIL potvrđen biopsijom traje 2 godine. Nakon dva uzastopna negativna citološka i kolposkopska pregleda u intervalima od 6 meseci, mlada žena se može vratiti rutinskom skriningu [177]. Ovakav protokol je opravdan činjenicom da je karcinom grlića materice redak kod mladih pacijenata od 25 godina

uprkos visokoj prevalenci HPV infekcije i histoloških lezija visokog stepena (posebno CIN 2) [182,183].

Kod histološki potvrđenog CIN 3, kao direktnog prekursora cervikalnog raka, lečenje se preporučuje u svim uzrastima [161,165,166].

1.8.3. Posledice lečenja CIN

Utvrđeno je da je lečenje grlića materice povezano sa povećanim rizikom od prevremenih porođaja, preranog prskanja plodovih ovojaka, horioamnionitisa, niske porođajne težine deteta, prijema novorođenčadi na intenzivnu negu i perinatalne smrti [184,185,186,187,188]. Tretman podjednako utiče na ishode za prvoročke i višerote kao i na jednoplodne i višepodne trudnoće. Dugoročne posledice nakon tretmana veće su za radikalnije tehnike (kao što je konizacija hladnim nožem, zatim ekscizija transformacione zone velikom petljom i laserska ablacija), kao i za eksciziju u odnosu na ablaciju. Višestruke konizacije su četiri puta povećale rizik od prevremenog porođaja u poređenju sa nelečenim kontrolnim grupama. Analize podgrupa jasno su pokazale da je rizik od prevremenog porođaja direktno povezan sa dimenzijama konusa (dubina/zapremina) i progresivno raste sa povećanjem dubine konusa („efekat doze“) [189]. Rizik je bio povećan čak i za ekscizije manje od 10 mm dubine, a skoro dvostruko za ekscizije veće od 10 mm, trostruko za više od 15-17 mm i skoro pet puta za ekscizije veće od 20 mm [189].

Iako je razlika u riziku od prevremenog porođaja za male ekscizije ($\leq 10-12$ mm) u poređenju sa samo postojanjem CIN-a bez lečenja beznačajna, broj studija koje su procenjivale to poređenje je mali, i ne mogu se izvući čvrsti zaključci [190]. Iz ovih razloga, lekar ima odgovornost da pacijentkinje obavesti da lečenje povećava rizik od

prevremenog porođaja u poređenju sa konzervativnim tretmanom CIN-a, ali je apsolutno povećanje rizika kod malih ekscizija verovatno malo, ako ga i ima.

Saznanje da lokalni tretman prekanceroznih promena grlića materice, posebno ekscizioni, povećava rizik od prevremenog porođaja dovelo je do velikih promena u kliničkoj praksi. Waxman i saradnici još 2012. godine daju smernice za dijagnostiku i lečenje lezija grlića materice, sa posebnim osvrtom na mladu populaciju žena kojima je na biopsiji dijagnostikovano HSIL [191]. Konzervativno lečenje HSIL-a kod mladih žena ima određeni rizik od progresije tako da odluka između lečenja i praćenja zahteva individualni pristup i kliničku procenu, posebno u određivanju da li se pacijent smatra "mladom" ženom i da li naknadna kolposkopija ukazuje na progresiju lezije. Na kliničaru je da uravnoteži rizik gubitka pacijenta (nedolazak na kontrole) tokom praćenja sa posledicama prekomernog lečenja lezija koje su predodređene da se spontano povuku i potencijalnog perinatalnog morbiditeta kod žena koje žele u budućnosti trudnoću. U ovim slučajevima i konsultacije sa patologom mogu kliničaru dati više informacija za donošenje konačne odluke.

U odluci da se leče žene u reproduktivnom dobu, treba uložiti sve napore da se sprovede lokalni tretman koji će optimizovati šanse za zdravu trudnoću bez ugrožavanja kompletnosti lokalnog lečenja. Osiguranje kvaliteta u lečenju bolesti treba da uključi reviziju dimenzija ekscizionih uzoraka kako bi se osiguralo da se dubina tretmana održava na prihvatljivim parametrima (to jest, najmanje 8 mm da bi se uključile i kripte) i da onkološki ishodi nisu ugroženi [192]. Nepotpuna ekscizija prekanceroznih promena grlića materice povezana je sa rezidualnim ili rekurentnim CIN2 ili CIN3 promenama [193].

Stečena „mehaničku slabost“ koja je posledica gubitka tkiva grlića materice i stvaranje ožiljnog tkiva, promene sastava sluzi i vaginalnog mikrobioma jer je deo

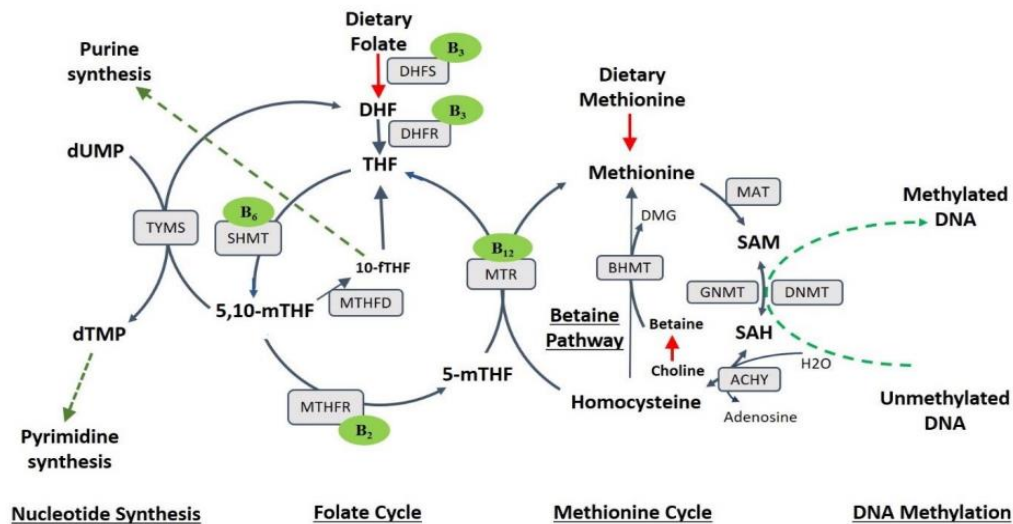
žlezda hirurški uklonjen, smatraju se uzročnicima akušerskih komplikacija [194,195,196,197]. Međutim, žene sa CIN-om imaju veći osnovni rizik od prevremenog porođaja nego žene iz opšte populacije [198,199]. Ovo potvrđuje da je CIN dinamički proces posebno kod mladih žena, a osnovni mehanizam je nejasan; jedna od hipoteza uključuje imunomodulaciju koja se odnosi na infekciju HPV koja utiče na porođajne puteve.

1.9. Jednokarbonski metabolizam

Jednokarbonski (1C) metabolizam je univerzalni metabolički proces koji služi za aktiviranje i prenos 1C jedinica u obliku metilen, formil i metil grupe potrebne za fiziološke procese. Ova složena mreža zasniva se na biohemijskim reakcijama folnih jedinjenja i uključuje sintezu nukleinskih kiselina (purina i timidina), popravku DNK, remetilaciju homocisteina, metilaciju DNK, homeostazu aminokiselina (glicin, serin i metionin) i redoks reakcije [200]. Mikronutrijenti koji posreduju u jednokarbonskom metabolizmu kao kofaktori su, između ostalih, vitamini B grupe (B2, B3, B6, B9 i B12) [201,202,203].

Termin **folat**, poznat i kao **vitamin B9**, je generički naziv za grupu srodnih jedinjenja sličnih svojstava koji dele zajedničku strukturu jezgra koja uključuje tri hemijska dela: *pteridinski prsten* koji se može redukovati ili oksidovati, *para-aminobenzoevu kiselinu* (PABA) koja zajedno sa pteridinskim prstenom vezuje 1C jedinice i *poliglutamalni rep* promenljive dužine koji služi za lokalizaciju molekula unutar ćelije. To je esencijalni vitamin rastvorljiv u vodi, čiji je odličan izvor lisnato zeleno povrće, pasulj, grašak, sočivo, voće poput limuna, banane i dinja. Pteroilmonoglutaminska kiselina je sintetički oblik vitamina, poznata kao folna

kiselina. Koristi se kao suplement i dodatak prerađenim prehrambenim proizvodima, kao što su hleb i žitarice, jer je stabilnija u hrani nego prirodni folati i bolje se apsorbuje [204]. Smatra se da se nivoi u serumu odražavaju nedavni unos, dok koncentracija folata u eritrocitima predstavlja status folata tokom meseci [205].



Slika 2. Jednokarbonski metabolizam [200]

Na slici 2 šematski je prikazan jednokarbonski metabolizam. Biološki aktivan oblik folata je redukovana vrsta pteridina, **tetrahidrofolat (THF)**, koji se sekvencijalno redukuje prvo na dihidrofolat (DHF), a zatim na THF pre nego što uđe u folatni ciklus [200]. 1C jedinice su kovalentno vezane za atom azota na 5-pozicionom delu pteridinskog prstena i atom azota na 10-pozicionom na PABA ostatku THF-a. Jednom vezane za THF, 1C jedinice se mogu međusobno konvertovati između različitih oksidacionih stanja, pri čemu 5,10-metilen-THF, 5-metil-THF i 10-formil-THF podržavaju različite biosintetske funkcije. Najoksidiraniji oblik folatnog ugljenika, *10-formil-THF*, potreban je za *de novo* sintezu purina. Za svaku novosintetizovanu DNK ili RNK bazu, u proseku je potreban po jedan 10-formil-THF (Poređenja radi, 5,10-

metilen-THF je potreban samo za sintezu DNK, po stopi od samo jednog ekvivalenta na četiri baze).

Prilikom stvaranja pirimidina, timidilat sintaza (TIMS) prenosi 1C sa 5,10-*mTHF*, pretvarajući dUMP (deoksiuridin monofosfat) u timidin monofosfat (dTMP). Nedostatak folata može da promeni ravnotežu DNK prekursora, što dovodi do akumulacije dUMP-a i ugradnje uracila u DNK umesto timina. Bilo koji pogrešno ugrađen uracil u lanac DNK biće ekstrahovan DNK glikozilazom, DNK enzimom za popravku. Međutim, naknadno uklanjanje šećera bez baze pomoću enzima za popravku DNK može izazvati prolazni lom u molekulu DNK. U stanjima gde je folat kontinuirano ograničen, neprekidno dolazi do pogrešne inkorporacije uracila i naknadne popravke. Ovaj ponovljeni lom molekula DNK može na kraju dovesti do hromozomskog oštećenja i maligne transformacije [206,207]. Studije na kulturama ljudskih ćelija, pokazale su da je nedostatak folata doveo do smanjenja sinteze DNK i progresivno povećanu pogrešnu inkorporaciju uracila (2 do 3 puta) [208,209,210]. Saopšteno je da na stabilnost DNK u humanim epitelijalnim ćelijama kolona (HCEC) ćelijama utiče folatna dostupnost, pri čemu koncentracije uracila opadaju na početne nivoe nakon što se ćelije popune folatom u koncentracijama koje se normalno primećuju u ljudskoj krvi i tkivu debelog creva (10 ng/mL) [211].¹²

Enzim metilentetrahydrofolat reduktaza (MTHR) katalizuje konverziju 5,10-*mTHF* u 5-*metilTHF*, čime se završava ciklus folata, pošto se 1C donira za remetilaciju homocisteina u metionin, u ciklusu metionina. Ovu reakciju katalizuje enzim 5-metiltetrahydrofolat homocistein metiltransferaza (MTR) za koji je potreban **vitamin B12** (kobalamin) kao koenzim. Remetilacija **homocisteina** je od posebnog fiziološkog značaja jer je metionin supstrat za S-adenozilmetionin (SAM) sintetazu, reaktivni metil nosač i drugi najčešći enzimski kofaktor posle adenzin trifosfata (ATP) koji igra

glavnu ulogu u reakcijama metilacije i predstavlja najveći izvor S-adenozilhomocisteina (SAH) [211]. Promene u koncentracijama metionina utiču na reakcije DNK metilacije, najčešćeg mehanizma epigenetske modifikacije, ključnog za regulisanje transkripcije gena [212]. Da bi došlo do metilacije DNK, aktivira se enzim DNK metiltransferaza (DNMT) koji katalizuje prenos metil grupe sa SAM na 5. ugljenik citozinskog prstena (5mC) DNK za proizvodnju metilovane DNK [213]. Jednom kada se metil grupa prenese, SAM se konvertuje u SAH, koji se hidrolizuje nazad u homocistein i adozin i na tome se završava ciklus metionina.

Aberantna metilacija DNK otkrivena je kod brojnih karcinoma i podrazumeva dve glavne karakteristike; *globalnu DNK hipometilaciju* (koja može da aktivira onkogene i pokrene nestabilnost hromozoma) sa *lokalnom hipermetilacijom DNK*, posebno u promotorskim regionima gena supresora tumora, specifičnim citozin-fosfat-guanin (CpG) mestima [214,215]. Folat, metionin, holin i vitamini B modifikuju metilaciju DNK bilo globalno ili na specifičnim CpG mestima formiranjem metil donora, koji deluju kao koenzimi ili modifikuju enzimsku aktivnost DNMT [202,203].

U studiji na životinjama, dizajniranoj da ispita efekat folne kiseline u odsustvu i prisustvu nedostatak vitamina B12 na globalnim obrascima metilacije, prijavljeno je da nedostatak vitamina B12 izaziva globalnu hipometilaciju čak i kada se kombinuju sa ishranom bogatom folatima [216], što naglašava njegovu esencijalnost kao kofaktora u jednokarbonskom metabolizmu i metilaciji DNK. Vitamin B12 igra važnu ulogu u ponovnom metilovanju homocisteina u metionin. Deluje kao kofaktor za MTR enzim, gde je njegov nedostatak povezan sa visokim nivoom homocisteina [217,218], što sugeriše da nizak nivo vitamina B12 može dovesti do DNK hipometilacije. Promene u metilaciji DNK, pronađene su u ćelijama raka grlića materice i njegovim prekursorima [219,220]. Pored toga, utvrđeno je da je unos vitamina B12 efikasan u smanjenju

circulišućeg nivoa homocisteina [221,222] što ukazuje na reverzibilni mehanizam u tom smislu, koji bi potencijalno mogao da modifikuje rizik od bolesti. Koncentracija homocisteina u serumu je osetljivi indikator folatnog statusa organizma; nedostatak folata često je udružen sa hiperhomocisteinemijom, a unosom folata može se sniziti nivo homocisteina [223]. Studije navode da povišen nivo homocisteina u plazmi dovodi do karcinogeneze putem oksidativnog oštećenja DNK posredovanog metalima, čak i u odsustvu deficita folne kiseline i vitamina B12 [224]. Povišene vrednosti homocisteina nađene su kod karcinoma grlića materice [225].

Brojne kliničke, epidemiološke i molekularne studije pokazale su da perzistentna infekcija sa hrHPV genotipovima je neophodan, ali ne i dovoljan preduslov za razvoj raka grlića materice [9]. Ovo ukazuje da pokrenut proces karcinogeneze grlića materice hrHPV infekcijom zavisi od drugih faktora rizika koji stvaraju pogodno lokalno mikrokruženje za malignu transformaciju. Disregulacija u ekspresiji virusnog gena i gena domaćina usled integracije virusne DNK u genom ćelije, kao i epigenetske modifikacije ključni su događaji u kancerogenom procesu. Trenutna literatura ukazuje da metil donori igraju važnu ulogu u regulisanju ekspresije DNK i na taj način utiču na rizik od raka, uključujući i rak grlića materice. Niske koncentracije hranljivih materija metil donora mogu izazvati izmene u metilaciji DNK. Nedostatak folata i drugih B vitamina utiču na sintezu nukleotida. Poremećaj metilacije DNK i sinteza nukleotida može uticati na ekspresiju gena, smanjiti integritet DNK i povećati oštećenje DNK. Ove promene ne samo da mogu povećati rizik od raka, već utiču i na njegovu progresiju. Međutim, efekti i mehanizmi hranljivih materija metil donora u odnosu na patogenezu i progresiju raka grlića materice, još uvek nisu jasni. Postojanje perzistentne hrHPV infekcije kao glavnog faktora rizika za patogenezu raka grlića materice i genomske promene izazvane ovom infekcijom, dodatno komplikuju stvari. Ova studija ima za cilj

da istraži ulogu ključnih parametara jednokarbonskog metabolizma (vitB9, vitB12 i homocistein) u cervikalnim intraepitelijalnim neoplazijama koje prethode karcinomu grlića materice.

2. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Ciljevi našeg istraživanja bili su:

- I.** Proceniti stepen težine CIN-a na osnovu dobijenih vrednosti neinvazivnih dijagnostičkih testova (citologija, HPV test, kolposkopija, jednokarbonski metabolički parametri)
- II.** Utvrditi dijagnostički značaj pojedinačnog određivanja i kombinovane primene dijagnostičkih testova (citologije, HPV testa, kolposkopije, i jednokarbonskih metaboličkih parametara) u dijagnostici CIN-a i odabir optimalnih dijagnostičkih kriterijuma na osnovu kojih se statistički pouzdano može proceniti prisustvo prekanceroznih promena niskog stepena (CIN 1 i CIN 2 male površine) sklone regresiji koje ne zahtevaju primenu dopunskih invazivnih dijagnostičko-terapijskih postupaka

Radne hipoteze bile su:

- Kombinovanom primenom neinvazivnih dijagnostičkih testova (citologije, HPV tipizacije, kolposkopije, i određivanja jednokarbonskih metaboličkih parametara) moguće je precizno dijagnostikovati stepen težine promene na grliću materice
- Na osnovu dijagnostičkih kriterijuma dobijenih kombinovanjem neinvazivnih testova moguće je izdvojiti grupu pacijentkinja sa CIN 1 i CIN 2 promenama male površine koje ne zahtevaju primenu invazivnih dijagnostičkih postupaka (biopsije, kiretaže, lup ekscizije, konizacije) već samo kontrolu i dalje praćenje toka bolesti koji je sklon regresiji i povlačenju

3. Materijal i metode istraživanja

Istraživanje je sprovedeno u formi prospektivne, opservacione kohortne studije (01.11.2017.-01.12.2018.) u Polikliničkoj ginekološkoj službi UKC Vojvodine u Novom Sadu i na Operativnom odeljenju, Klinike za ginekologiju i akušerstvo UKC Vojvodine.

Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, kao i od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Vojvodine broj 00-15/343.

Od svake pacijentkinje dobijena je pismena informisana saglasnost na posebno koncipiranom formularu za pristanak, nakon detaljnog objašnjenja svrhe i toka samog istraživanja (Informisani pristanak – prilog 1). Nakon toga, ispitanice su popunile anketni upitnik vezan za seksualnu i reproduktivnu istoriju, uključujući starost pri prvom seksualnom odnosu, broj seksualnih partnera i metode kontracepcije, broj trudnoća, ishranu, status pušenja, sociodemografske karakteristike, obuhvatajući time poznate faktore rizika za infekciju HPV (Anketni upitnik –prilog 2).

Svakoj ispitanici uzet je citološki bris, HPV PCR test, urađen kolposkopski pregled, određeni jednokarbonski parametri iz krvi i uzet uzorak za patohistološku analizu.

3.1. Citološki (Papa) bris

Citološki bris pacijentkinje su donosile iz Doma zdravlja ili je uziman u toku polikliničkog pregleda u zgradi Poliklinike UKCV.

U istraživanju koristili smo konvencionalnu tehniku uzimanja citološkog brisa. Nakon vizuelizacije grlića materice korišćenjem spekuluma, sakupljanje ćelija sa transformacione zone podrazumevao je uzorak sa ektocerviksa uzet špatulom i uzorak iz endocerviksa uzet endocervikalnom četkicom. Prikupljeni materijal se nanosio na predmetno staklo, a potom odmah fiksirao 95% etanolom i transportovao u laboratoriju.

Citološki brisevi, opisani od strane obučениh citopatologa, tumačen su po Betezda [93] ili Papanikolau klasifikaciji. U Betezda sistemu brisevi se kategorišu kao negativni na intraepitelnu leziju ili malignitet (NILM); atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (ASC-US); atipične skvamozne ćelije, ne može se isključiti lezija visokog stepena (ASC-H); skvamozna intraepitelna lezija niskog stepena (LSIL); skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (HSIL); karcinom skvamoznih ćelija (SCC). Papanikolau klasifikacija obuhvata 5 kategorija, gde je Papa I normalan nalaz, Papa II benigna atipija, Papa III sumnjivo na malignitet, Papa IV i Papa V malignitet [227].

U nalazima gde je citologija prijavljena u drugim klasifikacijama, konvertovali smo rezultate u najbliži ekvivalent u sistemu Betezde. Prag koji nam je definisao abnormalan Papa test bio je ASCUS+.

3.2. HPV testiranje

3.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka

HPV testiranje vršilo se u toku ginekološkog pregleda, uzimanjem cervikalnog brisa nakon plasiranja spekuluma. Za uzimanje i čuvanje uzoraka brisa cervikalnih ćelija korišćeni su setovi *Abbot Real Time High Risk HPV Assay* za 40 uzoraka, sledeći

uputstva proizvođača (Abbott GMBH, Nemačka). Četkica za uzimanje uzorka plasirana je u sredinu cerviksa i blagim rotacionim pokretima četkice oko ose u trajanju od 10-15 sekundi uzet je materijal. Brisevi su odmah stavljeni u epruvetu sa inkubacionim medijumom. Epruvete sa medijumom čuvane su i transportovane na t frižidera (4-8 C) sve do detekcije HPV virusa, a najduže do 24 h.

3.2.2. Metoda određivanja

Cervikalni brisevi analizirani su na Odeljenju specijalizovane laboratorijske dijagnostike, u Odseku za virusološku dijagnostiku, Centra za laboratorijsku medicinu. Metoda određivanja hrHPV bila je kvalitativni multiplex PCR real-time test, korišćenjem setova Abbott Real Time High Risk HPV Test (Abbott GMBH, Nemačka) na aparatu Abbott m2000 Real Time System. Test je zasnovan na metodi targetirane amplifikacije i detekcionoj tehnologiji HPV u cervikalnim ćelijama. Test je vršio detekciju 12 hrHPV tipova (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) i posebno genotipizaciju dva najznačajnija tipa HPV16 i HPV18.

3.3. Kolposkopski pregled

Kod svih ispitanica izvršen je kolposkopski pregled od strane iskusnog kolposkopičara (lekar specijalista ginekologije i akušerstva sa radnim stažom dužim od 10 godina). Nakon nanošenja 3% sirćetne kiseline na grlić materice, posmatrane su promene u predelu transformacione zone, pod uveličanjem. Prilikom opisivanja ovih promena definisan je smeštaj (prema položaju kazaljke na satu), veličina u smislu broja kvadranta grlića materice koju lezija pokriva i postotak koji zauzima u odnosu na

površinu grlića [138]. Prema aktuelnoj kolposkopskoj klasifikaciji Međunarodne federacije za patologiju grlića materice i kolposkopiju (eng. International Federation of Colposcopy and Cervical Pathology, IFCPC) klasifikovali smo nalaze u tri grupe: normalan nalaz (bez atipičnih promena), abnormalne promene niskog i abnormalne promene visokog gradusa težine [138].

Promene *niskog gradusa (blagog stepena, G1)* kolposkopski se definišu kao glatke površine sa nepravilnom spoljašnjom ivicom, belo obojene po tipu AW epitela, nežan mozaik i/ili nežne punktacije koje se sporo pojavljuju i brzo nestaju nakon aplikacije 3% rastvora sirćetne kiseline.

Promene *visokog gradusa (teškog stepena, G2)* kolposkopski se prepoznaju kao grube AW površine visokog inteziteta beline, slike grubog mozaika i/ili grube punktacije, prominentni otvori žlezda, znak grebena, znak unutrašnje granice, glatke ili neravne površine koje su oštro ograničena, brzo nastaju, a sporo nestaju nakon aplikacije sirćetne kiseline.

3.4. Jednokarbonski parametri

3.4.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka

Određivanje jednokarbonskih metaboličkih parametara (folna kiselina, vitB12, homocistein) vršilo se punkcijom kubitalne vene u jutarnjim časovima nakon 12-časovnog gladovanja na Odeljenju kontrole kvaliteta, prijema i distribucije Centra za laboratorijsku medicinu laboratorijske dijagnostike ili Operativnom odeljenju Klinike za ginekologiju i akušerstvo UKCV. Korišćen je žut serumski vakutejner (10 ml;

Becton Dickinson) za serumske uzorke (folna kiselina i vitamin B 12) i zeleni heparinizirani vakutejner (10ml; Becton Dickinson) za uzorke plazme (homocistein), pod aseptičnim uslovima. Uzorci plazme za određivanje homocisteina odmah su stavljeni u posude sa ledom.

Priprema uzoraka plazme i seruma podrazumevala je centrifugiranje na 3000 obrtaja/min 10 minuta na 25C za serumski vakutejner i odvajanje seruma, kao i centrifugiranje na 3000 obrtaja/min 5 minuta na 4C (za homocistein) uz hlađenje epruvete i odvajanje heparinizirane plazme. Uzorci seruma i plazme bez znakova hemolize analizirani su u Centru za laboratorijsku medicinu, na Odeljenju za automatizovanu laboratorijsku dijagnostiku. Do određivanja parametara svi uzorci su čuvani na temperaturi -70 C.

3.4.2. Metode određivanja

Metoda određivanja biohemijskih parametara u serumu (vitamin B12 i folna kiselina) i plazmi (homocistein) bila je metoda CMIA (eng. Chemmyluminescent Microparticular Immuno Assay- hemiluminescentni mikropartikularni imunoesej) na analizatoru Alinity (Abbott Dg USA). Referentni intervali bili su definisani od strane proizvođača: folna kiselina: 7-45.3nmol/L; vitamin B12:138-625pmol/L; homocistein:5.0-12.0 μmol/l.

3.5. Patohistološki uzorci

Patohistološki uzorak sa površine grlića materice u lokalnoj ili opštoj anesteziji uzet je primenom jedne od invazivnih dijagnostičkih metoda. Biopsijski uzorci uzimani

su sa kolposkopski sumnjivih lezija. Endocervikalna kiretaža je rađena u slučajevima kada se cela zona transformacije ili se obim lezije nije na adekvatan način vizuelizovao. U skladu sa standardnom praksom, sve histološki potvrđene lezije visokog stepena sa dijagnozom CIN2 ili više (CIN2+) tretirane su LEEP-om ili konizacijom transformacione zone.

Analiza uzoraka obavljala se u laboratoriji za patohistološku dijagnostiku Centra za patologiju i histologiju, UKC Vojvodine. Patohistološku (PH) interpretaciju uzoraka sproveli su patolozi koristeći CIN terminologiju [77]. Prepostavili smo da je histološki pregled materijala, dobijen ciljanom biopsijom tokom kolposkopije, loop ekscizijom ili endocervikalnom kiretažom, dao potpunu procenu statusa bolesti.

U tabeli 2 je prikaz očekivanih dijagnostičkih kriterijuma ispitivanih grupa koje su podeljene na osnovu patohistološkog nalaza.

Tabela 2. Dijagnostički kriterijumi u neinvazivnoj proceni stepena težine CIN-a

DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK	PATOHIKSTOLOŠKI NALAZ NA GRLIČU MATERICE		
	Nema CIN promena (kontrolna grupa)	CIN 1 + CIN 2 male površine	CIN 2 veće površine + CIN 3
Citologija	PA II NILM	PA IIIa, PA IIIb ASC-US, ASC-H, L SIL, HSIL	PA IV H SIL
Kolposkopija	Odsustvo sumnjivih slika	Blago obojen <i>aceto-white</i> epitel, fina punktacija, fini mozaik, nepravilne ivice, promene na grliću male površine do 50% (do dva kvadrantna)	Oštre ivice, gust <i>aceto-white</i> epitel, gruba punktacija, nepravilan mozaik, znak grebena, unutrašnja demarkacija, promene na grliću velike površine >50% (više od dva kvadranta)
HPV test	Negativan	Pozitivan	Pozitivan
Jedno-karbonski metabolički parametri	↑↑konc. vitB9 i vit. B12 ↓↓konc. homocisteina	↑ konc. folata, vit. B12 ↓ konc. homocisteina	↓ konc. folata, vit. B12 ↑ konc. homocisteina

3.6. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje bili su:

- Sve pacijentkinje sa kolposkopski evidentnim “sumnjivim kolposkopskim slikama” na grlića materice: punktacije, mozaik, leukoplakija, atipični krvni sudovi, “aceto-white” epitel
- Sve pacijentkinje sa kolposkopskim benignim promenama na grliću materice: ektopija, erozija, cervicitis, polip, metaplazija
- Sumnjiv nalaz citološkog brisa (Papa IIIa, IIIb, IV ili Betezda klasifikacija ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL)
- Pozitivan nalaz HPV testa
- Prethodno patohistološki dokazan CIN nekom od invazivnih metoda
- Pacijentkinje starosti do 40 god.

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili:

- Prisustvo mikroinvazivnog ili invazivnog karcinoma grlića materice
- Patohistološki potvrđen karcinom endometrijuma
- Nerazjašnjeno krvarenje iz materice
- Prisustvo malignog tumora na drugim organima u karlici ili abdomen
- Sprovedena hemio i/ili zračna terapija u lečenju malignih tumora na drugim organima
- Pacijentkinja svojevoljno odustaje od invazivne dijagnostičke procedure (biopsija, endocervikalna kiretaža, loop ekscizija, konizacija)
- Pacijentkinje starije od 40 god.

3.6.1. Određivanje veličine uzorka

S obzirom na to da se glavna analiza ovog rada odnosi na modelovanje pomoću bivarijatne logističke regresije, veličina uzorka je određena spram ove analize, a uzimajući u obzir moć testa, statističku značajnost i veličinu koeficijenta korelacije. Prema Monte Karlo simulaciji, prikazanoj u radu Hsieha [227], za beleženje korelacije između 0.3 i 0.7, te odnosa šansi između 0 i 30, na nivou od $p=0.05$, dovoljan je uzorak od približno 200 ispitanika (od kojih je 100 dijagnostički identifikovanih slučajeva), kako bi se postigla snaga testa između 0.64 i 0.89.

3.6.2. Uzorak

Ispitivani uzorak obuhvatio je ukupno 183 ispitanice. Na osnovu patohistološkog nalaza sve ispitanice su podeljene u kontrolnu i ispitivane grupe.

- **Kontrolna grupa bez prisustva CIN promena** (cervicitisi, metaplazija, normalan nalaz) obuhvatala je 61 ispitanicu.
- **Ispitivana grupa, sa CIN promenama** potvrđene patohistološkim nalazom imala je 122 ispitanice. U okviru ispitivane grupe formirali smo 3 podgrupe na osnovu težine CIN promena:
 - Grupa **CIN 1** promene – 30 ispitanica
 - Grupa **CIN 2** promene – 47 ispitanica
 - Grupa **CIN 3** promene – 45 ispitanica

Nakon statističke obrade i formiranja predikcionog modela, ispitivanu grupu CIN 2 podelili smo na dve podgrupe, odnosno izdvojili ispitanice sa CIN 2 promenama po karakteristikama koje su sličnije CIN 1 grupi (11 ispitanica), i pacijentkinje sa CIN 2 sličniji CIN 3 koji je najverovatnije sklon progresiji i zahteva dalji invazivni tretman i lečenje (36 ispitanica).

3.7. Statističke metode

Podaci iz anketnog upitnika i istorije bolesti (citološki nalaz, rezultati HPV testa, kolposkopski nalaz, laboratorijski nalazi jednokarbonskih parametara, PH nalaz) unošeni su u specijalno kreiranu kompjutersku bazu podataka i dalje obrađivani na personalnom računaru korišćenjem MS Office paketa, kao i statističkog programa SPSS (verzija 25). Kao nivo značajnosti koristila se vrednost od $p < 0.05$ i $p < 0.01$.

Od statističkih metoda koristile su se metode deskriptivne i inferencijalne statistike.

- Deskriptivna statistika se koristila za tabelarno i grafičko predstavljanje frekvencija i procenata, za kategorijalni tip varijabli. Pored toga izračunate su i mere centralne tendencije i raspršenja za varijable kontinuiranog tipa: aritmetička sredina, medijana, standardna devijacija i percentili.
- Pomoću metoda za utvrđivanje dijagnostičke značajnosti neinvazivnih testova utvrđeni su senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost, te tačnost testa. Dodatno je urađena i ROC analiza (eng. *Receiver Operating Characteristic curve*), kojom se pomoću odnosa senzitivnosti i specifičnosti utvrđuje dijagnostička snaga testova.

- Od inferencijalnih statističkih metoda za utvrđivanje razlika i povezanosti između varijabli koristili su se:
 - *Parametarski testovi* za varijable koje su kontinuirane i normalno distribuirane i to Studentov t-test, jednosmerna ANOVA (*Analysis of variance*) i ANCOVA (*Analysis of covariance*)
 - *Neparametarski testovi* za kategorijalne varijable, i one koje ne prate normalnu raspodelu, odnosno χ^2 test, z-test za razlike između proporcija, Kruškal-Valisov test, Spirmanov koeficijent rang korelacije i binarna logistička regresija

Razlike između PH grupa u odnosu na kontinuirane varijable kao što su starost, indeks telesne mase, ili jednokarbonski metabolički parametri, testirane su pomoću ANOVE ili pomoću ANCOVE. ANOVA i ANCOVA pripadaju porodici generalnih linearnih modela (*GLM – general linear models*) [228] i zasnivaju se na poređenju razlika u varijansi između grupa, s tim da ANCOVA omogućava da se dodatno statistički kontrolišu varijable koje mogu da utiču na samu zavisnu varijablu koja se testira. Konkretno, ANCOVA se koristila za testiranje razlika u nivou jednokarbonskih parametara između PH grupa, pri čemu se statistički kontrolisala starost ispitanica. Značajnost međugrupnih razlika u varijansi iskazuje se pomoću *F* testa. Kako ANOVA testira razlike između više od dve grupe, te značajnost *F* test ne govori između kojih grupa su razlike značajne, da bi se ustanovile tačne razlike između pojedinih grupa koristili su se Post Hoc testovi po Danetu (Dunett; ovaj test koriguje nejednake varijanse), kao i Post Hoc test po Takiju (*Tukey*; koristi se ukoliko su varijanse grupa jednake).

Kao neparametarska zamena za ANOVU koristio se Kruškal-Valisov test, koji se koristi kada zavisna varijabla ne prati normalnu raspodelu, a postoji više od dve grupe između kojih se razlike testiraju.

Razlike između kategorija su testirane pomoću χ^2 testa, a povezanost između varijabli ordinalnog nivoa merenja testirana je putem Spirmanovog koeficijenta rang korelacije. Ovaj koeficijent ispituje vezu između varijabli koje ne prate normalnu raspodelu, a tumači se na isti način kao i Pirsonov test korelacije. Teorijski raspon koeficijenta kreće se od -1 do +1, pri čemu vrednosti bliže jedinici označavaju veću povezanost. Dodatno se koristio i z-test za testiranje razlika između dve proporcije, u analizi gde se određivala sličnost i razlika ispitanica sa CIN2 nalazom sa ostalim CIN grupama.

Tabela 3. Klasifikaciona tabela za računanje dijagnostičke značajnosti

		PH nalaz	
		Pozitivan (CIN2+)	Negativan (CIN2-)
Dijagnostički test	Pozitivan	Tačno pozitivni - TP	Lažno pozitivni - FP
	Negativan	Lažno negativni - FN	Tačno negativni - TN

Ispitivanje dijagnostičke značajnosti neinvazivnih metoda sprovedeno je pomoću klasifikacione tabele (tabela 3), u kojoj su razvrstani pozitivni i negativni patohistološki rezultati i u odnosu na njih rezultati pojedinih dijagnostičkih metoda. Ishod ovakve podele su četiri primarna klasifikaciona pokazatelja: tačno pozitivni, lažno pozitivni, tačno negativni i lažno negativni rezultati. Na osnovu frekvencija ovih pokazatelja računaju se senzitivnost, specifičnost, prediktivna pozitivna (PPV), negativna prediktivna vrednost (NPV), kao i opšta tačnost testa (tabela 4).

Tabela 4. Računanje dijagnostičkih pokazatelja i njihovo značenje

Dijagnostički pokazatelj	Formula	Značenje
Senzitivnost	$TP/(FN+TP)$	Potencijal testa da prepozna pacijente koji su bolesni
Specifičnost	$TN/(FP+TN)$	Potencijal testa da prepozna pacijente koji nisu bolesni
PPV	$TP/(TP+FP)$	Proporcija pacijenata koji su bolesni i sa pozitivnim rezultatom, među svim pacijentima koji imaju pozitivan rezultat (osetljiv na prevalenciju)
NPV	$TN/(TN+FN)$	Proporcija pacijenata koji nisu bolesni i imaju negativan rezultat, među svim pacijentima kojima je test bio negativan (osetljiv na prevalenciju)
Tačnost	$(TP+TN)/(TP+FP+TN+FN)$	Opšta tačnost testa – potencijal testa da tačno klasifikuje bolesne i zdrave

Da bi se utvrdila opšta tačnost testa, odnosno verovatnoća testa da ispravno klasifikuje, sprovedena je ROC analiza, koja grafički prikazuje odnos senzitivnosti i lažno pozitivnih nalaza (1-specifičnost), a sam odnos predstavlja *verovatnoću* ispravne klasifikacije na osnovu dijagnostičke metode [229] (eng. *Likelihood ratio (LR)*). Verovatnoća ispravne pozitivne klasifikacije se računa po formuli: $LR+ = \text{senzitivnost}/(1-\text{specifičnost})$ i označava koliko je verovatno da se pozitivan test nađe kod stvarno obolelih u odnosu na to da se nađe među neobolelima. Dobar dijagnostički test ima vrednost $LR \geq 10$, i takav test je pouzdan. Sa druge strane verovatnoća ispravne negativne klasifikacije se računa po formuli: $LR- = (1-\text{specifičnost})/\text{senzitivnost}$, i označava verovatnoću da se negativan test nađe među obolelima u odnosu na to da se isti test nađe među neobolelima. Ova vrednost može biti relevantna ako se koristi kada treba da se isključi bolest. Dobar dijagnostički test ima vrednost $LR \leq 0.1$. Što je niža vrednost to je veća verovatnoća da pacijent nema dijagnozu ukoliko se dobije negativan rezultat testa [229].

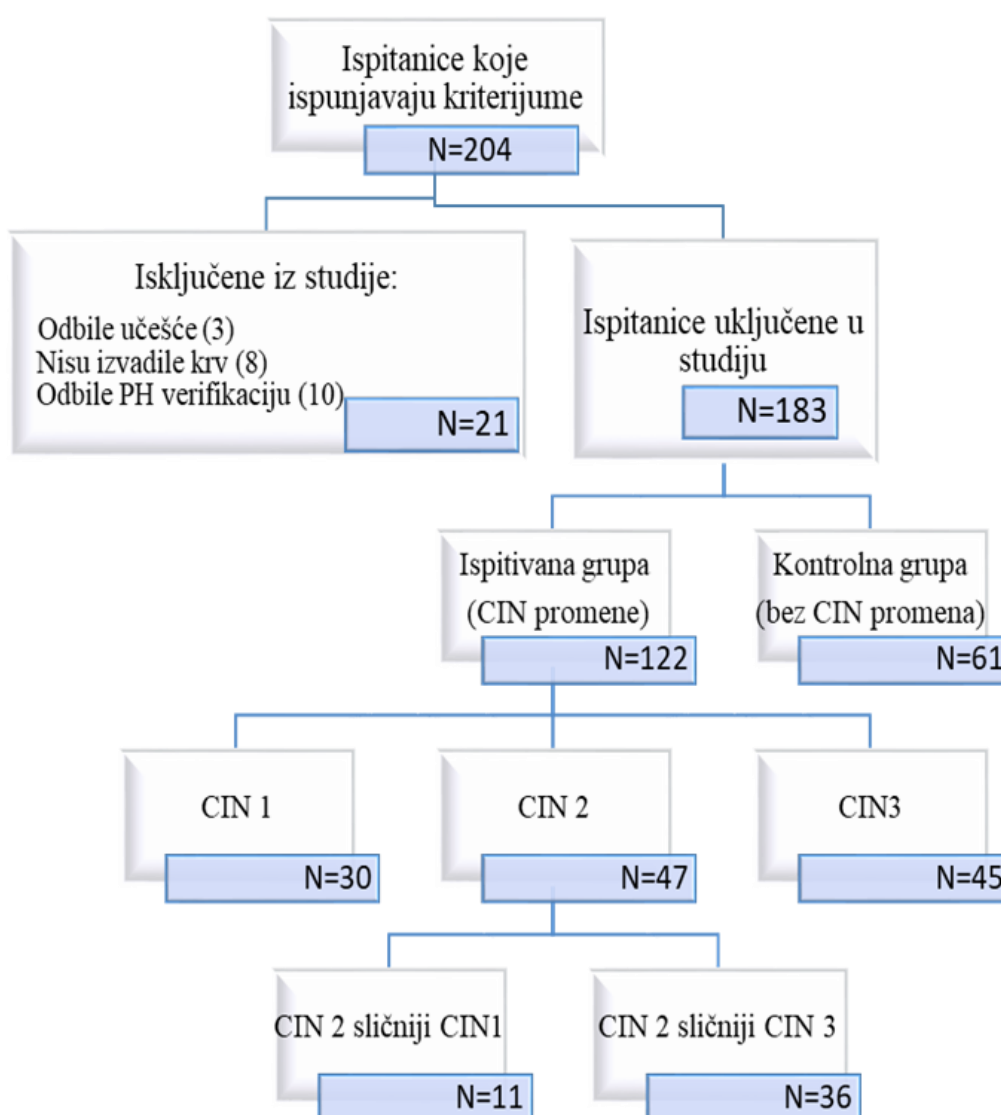
Diskriminativnost testa računala se putem ROC analize i odnosi se na vrednost AUC (eng. *A*rea *U*nder the *C*urve). Izračunava se na osnovu grafikona na kojem se na x osi nalaze vrednosti *1-specificnost* (odnosno vrednosti verovatnoća lažno pozitivnih rezultata), a na y osi se nalazi *senzitivnost* [229,230]. Sama AUC vrednost se teorijski kreće u rasponu od 0 do 1. Dijagonala na grafiku odgovara vrednosti AUC od 0.5. Statistički se potom testira da li vrednost AUC-a određenog dijagnostičkog testa značajno odstupa od vrednosti 0.5. Što je vrednost veća od 0.5 to test ima veću diskriminatornu moć u pogledu razdvajanja stvarno obolelih od neobolelih. Postoji pravilo za određivanje koliko je test diskriminativan a na osnovu vrednosti AUC-a [229]:

- AUC > 0.9 - odličan test
- AUC = 0.8-0.9 – veoma dobar test
- AUC = 0.7-0.8 – dobar test
- AUC = 0.6-0.7 – dovoljno dobar test
- AUC = 0.5-0.6 – loš test

Binarna logistička regresija koristila se za određivanje dijagnostičke efikasnosti testova, jer pored toga što prikazuje udruženu senzitivnost i specifičnost, prikazuje i odnos šansi (*odds ratio*) pojedinačnih prediktora, uzimajući u obzir doprinos svih prediktora u modelu (*adjusted odds ratio*). Najpre je napravljen model sa svim prediktorima pomoću *enter* metode (kada se unose svi prediktori, bez obzira na to koliko doprinose predviđanju), a onda su se pomoću *backward* metode po Waldu u modelu ostavili oni prediktori koji najviše doprinose klasifikaciji u rizičnu i nerizičnu grupu (CIN2- i CIN2+ grupu).

4. Rezultati

U toku ispitivanog perioda, ukupno 204 ispitanica je ispunjavalo kriterijume za ulazak u studiju; od toga, 10 ispitanica je odbilo PH verifikaciju, njih 8 nije izvadilo krv za određivanje jednokarbonskih parametara, a 3 su odbile učešće u studiji. Nakon toga, ukupno 183 ispitanice je uključeno u istraživanje (slika 3).



Slika 3. Dijagram toka studije

4.1. Socio-demografski i klinički opis uzorka i testiranje razlika između patohistoloških grupa

Uzorak su činile 183 ispitanice uzrasta od 17 do 40 godina ($M=28.79\pm 5.35$). U tabeli 5 prikazana je raspodela uzorka u odnosu na socio-demografske pokazatelje i neke faktore rizika (indeks telesne mase, pušački status, obrazovanje, prisustvo hroničnih bolesti i maligniteta u porodičnoj anamnezi), a u odnosu na patohistološku grupu. Ako se gleda ukupan uzorak najveći broj ispitanica ima normalnu telesnu masu (87.3%), a samo je mali broj onih koje pripadaju kategoriji pothranjenih (5.5%) ili gojaznih (7.2%). Skoro polovina ispitanica (47%) su nepušači, 13.3% povremeno konzumiraju cigarete, i 39.8% su pušači. Kada su u pitanju hronične bolesti, 6.7% ispitanica je prijavilo prisustvo hroničnih bolesti, uključujući probleme sa tireoidnom žlezdom, prisustvo autoimunih bolesti, bolesti kardio-vaskularnog sistema ili nekih psihičkih poremećaja, poput depresije ili anksioznosti. Od ukupnog broja ispitanica, 31.1% njih je prijavilo prisustvo maligniteta u porodici.

Razlike između CIN grupa u odnosu na navedene ispitivane parametre prikazane u tabeli 5, testirane su ili pomoću ANOVE (kontinuirane varijable: starost u godinama i indeks telesne mase), ili pomoću χ^2 testa za nezavisne uzorke.

Ispitanice kojima su detektovane CIN3 promene su u proseku najstarije, dok su ispitanice sa CIN2 promenama najmlađe. Razlike između patohistoloških grupa su i statistički značajne ($p=0.001$).

Ako se pogleda indeks telesne mase, ispitanice iz CIN3 grupe imaju najvišu prosečnu vrednost ovog pokazatelja, zatim slede ispitanice sa CIN1 promenama, dok ispitanice kojima nisu detektovane CIN promene i sa CIN2 promenama imaju isti

prosečni nivo BMI. Iako su prosečne vrednosti BMI svih grupa približno iste, razlike su statistički značajne ($p=0.04$).

U odnosu na obrazovni status, u svakoj od PH grupa, najmanje je ispitanica sa osnovnim obrazovanjem, dok su podjednako zastupljene ispitanice koje imaju srednje i visoko obrazovanje. Hi kvadrat testom utvrđeno je da stepen obrazovanja u posmatranim grupama ujednačen i da nema statistički značajne razlike ($p=0.19$).

Razlike između PH grupa nisu detektovane ni u odnosu na prisustvo hroničnih bolesti ($p=0.51$), niti u odnosu na istoriju maligniteta u porodici ($p=0.45$).

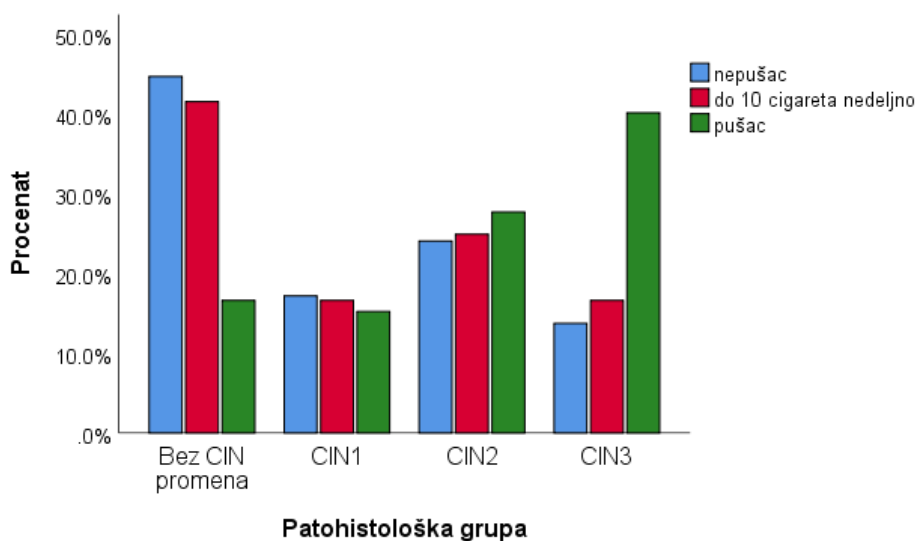
Tabela 5. Socio-demografske karakteristike i riziko faktori ispitanica u odnosu na CIN status

Varijabla ($N=183$)	Bez CIN promena ($N=61$)	CIN1 ($N=30$)	CIN2 ($N=47$)	CIN3 ($N=45$)	Statistik; p vrednost
Starost ($M\pm SD$)	27.93 \pm 4.8	29.10 \pm 4.0	26.66 \pm 5.5	31.96 \pm 5.3	$F(3,179)=9.4$ $p=0.001$
BMI ($M\pm SD$)	20.67 \pm 2.0	21.59 \pm 4.8	20.68 \pm 1.7	22.1 \pm 2.9	$F(3,179)=2.8$ $p=0.04$
BMI (%)					
BMI < 18.5	6.6%	10%	4.3%	2.2%	$\chi^2(9)=15.05$ $p=0.09$
18.5 \geq BMI < 25	90.3%	83.4%	93.6%	80%	
25 \geq BMI < 30	3.1%	3.3%	2.1%	15.6%	
BMI \geq 30	0%	3.3%	0%	2.2%	
Obrazovanje (%)					
Osnovna škola	6.6%	10%	2.1%	13.3%	$\chi^2(6)=8.75$ $p=0.19$
Srednja škola	39.3%	30%	55.3%	42.2%	
Visoka škola	54.1%	60%	42.6%	44.5%	
Pušački status (%)					
Nepušač	63.9%	50%	44.6%	26.7%	$\chi^2(6)=22.19$ $p=0.001$
<10 nedeljno	16.4%	13.3%	12.8%	8.9%	
Pušač	19.7%	36.7%	42.6%	64.4%	
Hronične bolesti (% pozitivnih)	4.9%	3.3%	6.4%	11.1%	$\chi^2(3)=2.30$ $p=0.51$
Malignitet u porodici (% pozitivnih)	26.2%	30%	27.7%	40%	$\chi^2(3)=2.62$ $p=0.45$

Napomena: N – broj žena u uzorku; M – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; procenti su računati u odnosu na broj žena u svakoj od CIN grupa

Utvdili smo postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa u vezi sa statusom pušenja. Najveći broj pušača (64.4%) zastupljen je u grupi sa CIN3 promenama u odnosu na ispitanice iz ostalih grupa ($p=0.001$).

Na grafikonu 2. prikazan je udeo ispitanica u odnosu na pušački status i PH grupu. U grupi bez CIN promena najveći udeo predstavljaju ispitanice nepušači (44.8%), kao i povremeni pušači (41.7%). Najveći broj pušača je prisutno u CIN3 grupi (40.3%), a zatim u CIN2 grupi (27.8%). Najmanji broj nepušača je zastupljen u CIN3 grupi (13.8%). CIN1 i CIN2 grupe imaju ravnomerno zastupljenje sve tri grupe, tako da je pušački status najdiskriminativniji za ekstremne grupe – CIN3 (najveći broj pušača i najmanji broj nepušača) i kontrolnu grupu (najveći broj nepušača i najmanji broj pušača).



Grafikon 2. Procenat zastupljenosti pušača i nepušača u odnosu na CIN status

Na osnovu podataka iz anketnog upitnika koji se odnose na ginekološke parametre i indikatore rizičnog seksualnog ponašanja, na celokupnom uzorku, ispitanice su menarhu dobile sa 12.63 ± 1.21 godina (najranije sa 9, a najkasnije sa 18

godina), a prvi koitus je većina imala između 16. i 21. godine (76%). Većina ispitanica (79.2%) je do momenta ispitivanja imala do pet seksualnih partnera (20.8% ih je imalo preko pet partnera). Skoro 40% ispitanih žena ne koristi nikakav vid kontracepcije, dok skoro polovina koristi kondom (49.9%), 8.8% koristi kontraceptivne pilule, a samo 1.7% ima spiralu (intrauterini uložak). Preko tri četvrtine (84.2%) žena ide na redovne ginekološke kontrole i 83.6% redovno radi Papa kontrolne briseve. Ispitanice su u proseku imale jednu trudnoću ($M=0.97\pm 1.23$), odnosno, polovina njih nije bilo trudno, 21.9% ispitanica je imalo jednu, 16.4% dve trudnoće, 7.1% ih je imalo tri trudnoće, 3.3% četiri i 1.6% pet trudnoća. Nešto iznad 60% ispitanica nije imala porođaj, 15.3% je imala jedan, 21.9% je imalo dva, a 2.7% je imalo tri porođaja. Abortus nije imalo 77% ispitanica, 21.3% ih je imalo namerni prekid trudnoće, a 1.6% je imala spontan pobačaje.

Ako posmatramo navedene parametre u odnosu na CIN status, statistički značajne razlike zabeležene su za broj seksualnih partnera, broj trudnoća, broj porođaja, redovnost ginekoloških kontrola i redovnost uzimanja Papa brisa (tabela 6).

Broj ispitanica sa CIN 2 i CIN 3 promenama koje su imale više od 5 seksualnih partnera statistički je mnogo veći u odnosu na ispitanice sa CIN 1 promenama i ispitanicama bez CIN promena ($\chi^2(3)=13.9$ $p=0.003$).

Utvdili smo da postoji statistički značajna razlika u broju trudnoća ($\chi^2(6)=18.83$ u $p=0.03$) između ispitanica bez CIN promena i sa CIN 3 promenama. 60.7% ispitanica bez CIN promena nije imalo trudnoću, za razliku od 28.9% ispitanica sa CIN3 promenama. Postoji statistički značajna razlika između ispitanica i u odnosu na porođaj. Kod ispitanica sa CIN3 promenom, njih 64.4% je rađalo, u odnosu na 29.5% u grupi bez CIN promena ($\chi^2(3)=16.06$ $p=0.001$).

Tabela 6. Ginekološki parametri i indikatori rizičnog seksualnog ponašanja ispitanica u odnosu na CIN status

Varijabla (N=183)	Bez CIN promena (N=61)	CIN1 (N=30)	CIN2 (N=47)	CIN3 (N=45)	Statistik; p vrednost
Menarha ($M \pm SD$)	12.4±0.8	12.9±1.6	12.8±1.4	12.7±1.1	$F(3,179)=1.82$ $p=0.15$
Prvi koitus (%)					
Pre 16. godine	14.8%	6.7%	29.8%	20%	$\chi^2(6)=11.11$
Između 16. i 21. godine	80.3%	93.3%	63.8%	71.1%	$p=0.09$
Posle 21. godine	4.9%	0%	6.4%	8.9%	
Br. seks. partnera (%)					
Manje od pet	86.9%	93.3%	76.6%	63.3%	$\chi^2(3)=13.91$
Više od 5	13.1%	6.7%	23.4%	37.8%	$p=0.003$
Kontracepcija (N=183)					
Kondom	47.5%	56.7%	42.6%	55.6%	$\chi^2(9)=8.33$
IUD	0%	3.3%	4.3%	0%	$p=0.50$
Pilule	13.1%	3.3%	8.5%	6.7%	
Ne koristi	39.3%	36.7%	44.7%	37.8%	
Broj trudnoća (%)					
Nije imala	60.7%	50%	55.3%	28.9%	$\chi^2(6)=18.83$
Manje od tri	34.4%	33.3%	34%	51.1%	$p=0.03$
Tri i više	4.9%	16.7%	10.6%	20%	
Porodaj (% Da)	29.5%	40%	29.8%	64.4%	$\chi^2(3)=16.06$ $p=0.001$
Abortus (%)					
Ne	85.3%	80%	70.2%	71.1%	$\chi^2(6)=8.22$
Namerni	13.1%	20%	29.8%	24.4%	$p=0.22$
Spontani	1.6%	0%	0%	4.4%	
Redovnost ginekoloških kontrola (% Da)	96.1%	90%	87.2%	62.2%	$\chi^2(3)=22.80$ $p=0.001$
Redovnost Papa briseva (%Da)	93.4%	90%	89.4%	60%	$\chi^2(3)=24.63$ $p=0.001$

Napomena: N – ukupan broj validnih podataka; M – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

Ispitanice koje nisu imale CIN promene (96.1%), kao i one sa CIN 1 promenom (90%) idu na redovne ginekološke kontrole i redovno im je uziman Papa bris (93.4% i

90%), za razliku od onih sa CIN3 promenama, među kojima samo 62.2% ide na redovne kontrole ginekologa i radi Papa bris (60%) ($\chi^2(3)=24.63$ $p=0.001$).

4.2. Distribucija citoloških, virusoloških, kolposkopskih i patohistoloških nalaza u ispitivanom uzorku

U tabeli 7. prikazani su citološki, kolposkopski, virusološki i patohistološki nalazi u odnosu na celokupan uzorak.

Tabela 7. Citološki, kolposkopski, virusološki i patohistološki nalaz u celokupnom uzorku

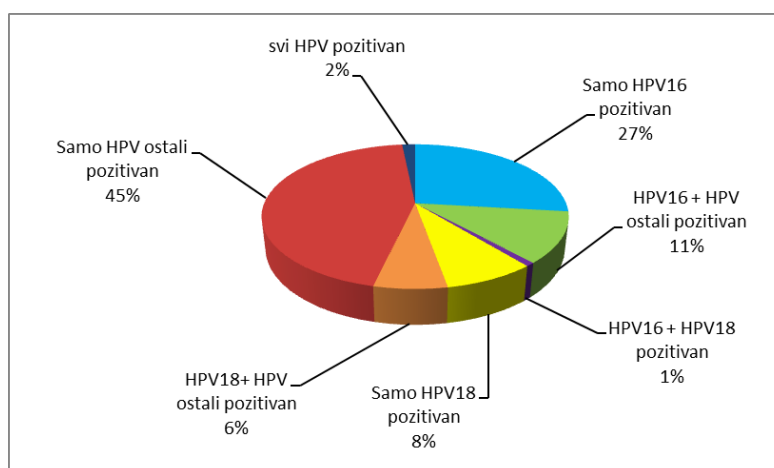
Varijabla	Frekvencija	Procenat
Citološki rezultati (N=183)		
NILM	64	35
ASCUS	26	14.2
ASC-H	26	14.2
L SIL	39	21.3
H SIL	28	15.3
Kolposkopski nalaz (N=183)		
Bez atipičnih promena	27	14.8
Nisko suspektan	115	62.8
Visoko suspektan	41	22.4
HPV (N=183)		
hrHPV pozitivan	123	67.2
hrHPV negativan	60	32.8
HPV16 pozitivan	50	27.3
HPV18 pozitivan	20	11.5
ostali hrHPV pozitivan	79	43.2
Patohistološki rezultati (N=183)		
Odsustvo CIN (cervicitis, metaplazija, normalan)	61	33.5
CIN1	30	16.5
CIN2	47	25.8
CIN3	45	24.2

Napomena: *N* – ukupan broj validnih podataka; *M* – aritmetička sredina; *SD* – standardna devijacija

Uredan Papa bris (II grupa, NILM) imalo je 35% ispitanica. ASCUS i LSIL zabeleženi su u 14.2% i 21.3% slučajeva. ASC-H (IIIa) je imalo 14.2% ispitanica, dok je HSIL (IIIb i IVgrupa) nalaz imalo 15.3%.

Kolposkopskim pregledom, normalan nalaz je utvrđen kod 14.8%, nisko suspektan nalaz kod 62.8% žena, a kod 22.4% je utvrđen visoko suspektan nalaz.

Prisustvo hrHPV virusa detektovano je kod 67.2% pacijentkinja (32.8% ih je hrHPV negativno). Od testiranih virusa, najprisutniji je tip HPV16 (ukupno 27.3%). HPV 18 je zastupljen u 11.5% uzorka, dok su ostali hrHPV tipovi (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) prisutni kod 43.2% pacijentkinja. Na grafikonu 3 prikazana je struktura uzorka u odnosu na samostalno ili udruženo prisustvo hrHPV tipova.



Grafikon 3. Utvrđeni hrHPV tipovi kod ispitanica

Kada su u pitanju patohistološke promene, 33.5% je klasifikovano kao odsustvo skvamoznih promena u epitelu (cervicitis/metaplazija/normalan) i predstavlja kontrolnu grupu. Ispitivane grupe: CIN1 promene su zabeležene kod 16.5% žena, CIN2 kod 25.8%, a CIN3 kod 24.2% ispitanih žena.

4.2.1. Zastupljenost citoloških, virusoloških i kolposkopskih nalaza po patohistološkim grupama

Na grafikonu 4 i u tabeli 8 prikazana je korelacija citoloških nalaza u odnosu na patohistološke grupe.

Tabela 8. Usklađenost citološkog brisa u odnosu na patohistološki nalaz

Citološki nalaz	Patohistološki nalaz				Ukupno
	Bez CIN	CIN 1	CIN 2	CIN 3	
NILM	43 (23.5%)	14 (7.7%)	7 (3.8%)	0 (0%)	64 (35%)
% od Betezda grupe	67.2%	21.9%	10.9%	0%	100%
% od PH grupe	70.5%	46.7%	14.9%	0%	
ASCUS	8 (4.4%)	7 (3.8%)	10 (5.5%)	1 (0.5%)	26 (14.2%)
% od Betezda grupe	30.8%	26.9%	38.5%	3.8%	100%
% od PH grupe	13.1%	23.3%	21.3%	2.2%	
ASC-H	1 (0.5%)	0 (0%)	8 (4.4%)	17 (9.3%)	26 (14.2%)
% od Betezda grupe	3.8%	0%	30.8%	65.4%	100%
% od PH grupe	1.6%	0%	17%	37.8%	
L SIL	9 (4.9%)	9 (4.9%)	18 (9.9%)	3 (1.6%)	39 (21.3%)
% od Betezda grupe	23.1%	23.1%	46.2%	7.6%	100%
% od PH grupe	14.8%	30%	38.3%	6.7%	
H SIL	0 (0%)	0 (0%)	4 (2.2%)	24 (13.1%)	28 (15.3%)
% od Betezda grupe	0%	0%	14.3%	85.7%	100%
% od PH grupe	0%	0%	8.5%	53.3%	
Ukupno (N)	61 (33.3%)	30 (16.4%)	47 (25.8%)	45 (24.5%)	183 (100%)

Napomena: Boje označavaju procenu neslaganja citološkog i PH nalaza **zelena** – slaganje; **žuta** – manja varijacija **plava** – manje neslaganje; **crvena** – veliko neslaganje

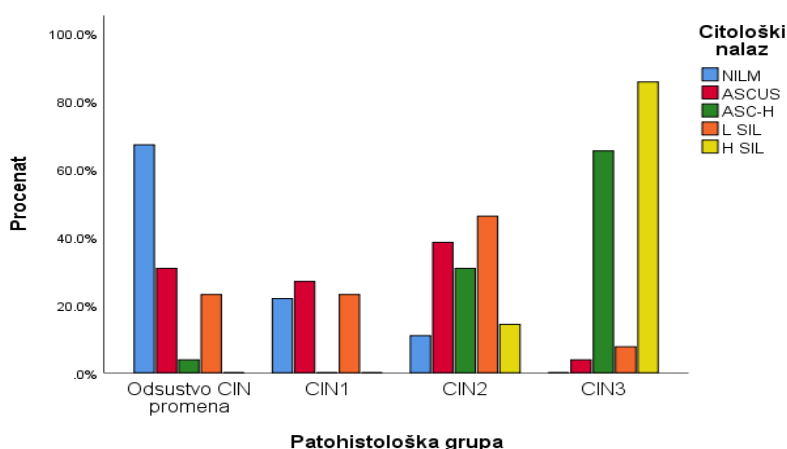
Kod ispitanica sa citološkim nalazom NILM u 67.2% slučajeva patohistološki je verifikovano odsustvo CIN promena, kod 14 pacijentkinja (21.9%) dijagnostikovano je CIN 1, a kod 7 pacijentkinja (10.9%) CIN 2 promena. Nijedna pacijentkinja sa citološkim nalazom NILM nije imala CIN 3 promenu.

Citološki nalaz ASCUS-a, bio je prisutan u relativno podjednakoj meri u kontrolnoj grupi (30.8%), kao i kod onih sa CIN1 (26.9%) i CIN2 (38.5%) promenama. Samo jedna pacijentkinja (3.8%) sa ASCUS citološkim nalazom, imala je CIN 3 promenu.

LSIL citološki nalaz zabeležen je u istom broju kod ispitanica bez CIN promena i onih sa CIN 1 promenama (po 23.1%), dok je najveća učestalost bila u CIN 2 grupi (46.2%). Kod tri pacijentkinje (7.6%) sa LSIL citološkim nalazom dijagnostikovane su CIN 3 promene.

U grupi sa CIN1 promenama, ASC-H citološki nalaz nije zabeležen, dok je samo jedna pacijentkinja iz kontrolne grupe imala ovakav nalaz (3.8%). ASC-H nalaz najviše je bio zastupljen među ispitanicama sa HSIL promenama (96.2%) (CIN2 (30.8%) i CIN3 promene (65.4%)). H SIL citološki nalaz registrovan je isključivo kod ispitanica kojima su detektovane CIN 2 (14.3%) i CIN 3 promene (85.7%).

Na grafikonu 4 i u tabeli 8 može se videti da nijedna pacijentkinja sa patohistološki verifikovanom CIN 3 promenom nije imala uredan citološki (NILM) nalaz. Takođe, nijedna ispitanica sa citološkim nalazom HSIL nije imala CIN 1 promenu, kao ni uredan PH nalaz.



Grafikon 4. Učestalost citoloških nalaza u odnosu na patohistološki nalaz

U tabeli 9 i grafikonu 5 prikazana je korelacija kolposkopskih nalaza i patohistoloških grupa. Kolposkopske nalaze klasifikovani smo u tri grupe – bez atipičnih promena, nisko suspektne i visoko suspektne promene po IFCPC [138].

Nalaz bez atipičnih promena je u najvećoj meri bio zastupljen kod ispitanica koje su imale normalan patohistološki nalaz (44.4%), dok nijedan od ovih nalaza nije bio prisutan u grupi sa CIN 3 promenom. Međutim, može se primetiti da je ovaj nalaz češće bio prisutan kod pacijentkinja sa kasnije utvrđenim CIN 2 promenama (33%), nego kod žena sa CIN 1 promenama (22%).

Tabela 9. Usklađenost kolposkopskih nalaza u odnosu na patohistološku grupu

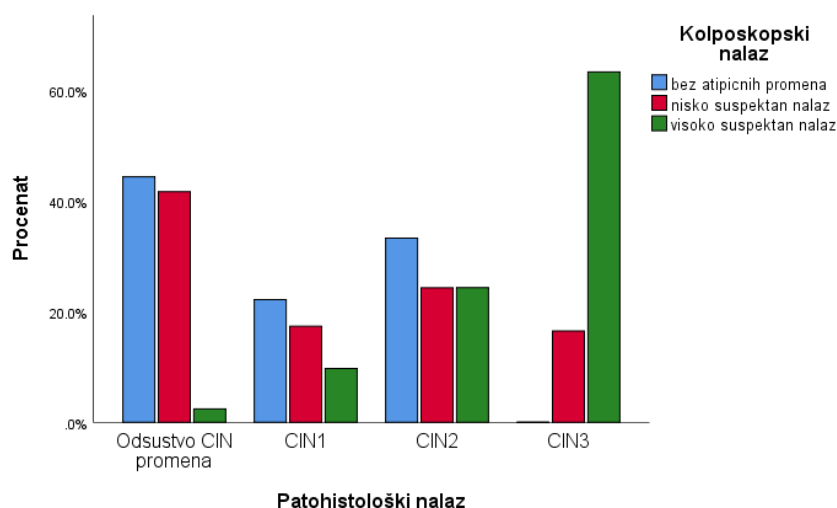
Kolposkopski nalaz	Patohistološki nalaz				Ukupno
	Bez CIN promena	CIN 1	CIN 2	CIN 3	
Bez atip. promena	12 (6.6%)	6 (3.3%)	9 (4.9%)	0 (0%)	27 (14.8%)
% od kolp. grupe	44.4%	22.3%	33.3%	0%	100%
% od PH grupe	19.7%	20%	19.1%	0%	
Nisko susp. prom.	48 (26.2%)	20 (10.9%)	28 (15.3%)	19 (10.4%)	115 (62.8%)
% od kolp. grupe	41.8%	17.4%	24.3%	16.5%	100%
% od PH grupe	78.7%	66.7%	59.6%	42.2%	
Visoko susp. prom.	1 (0.5%)	4 (2.2%)	10 (5.5%)	26 (14.2%)	41 (22.4%)
% od kolp. grupe	2.4%	9.8%	24.4%	63.4%	100%
% od PH grupe	1.6%	13.3%	21.3%	57.8%	
Ukupno (N)	61(33.5%)	30 (16.5%)	47 (25.8%)	45 (24.2%)	183 (100%)

Napomena: Boje označavaju procenu neslaganja kolposkopskog nalaza i PH nalaza: zelena – slaganje; žuta – manja varijacija; plava – manje neslaganje; crvena – veliko neslaganje

Kada su u pitanju nisko suspektne promene, one su takođe najviše bile zastupljene kod pacijentkinja sa normalnim patohistološkim nalazom (41.8%), a zatim kod pacijentkinja sa CIN2 promenama (24.3%). U manjoj meri bio je prisutan kod žena kod kojim su detektovane CIN 1 (17.4%) i CIN 3 promene (16.5%).

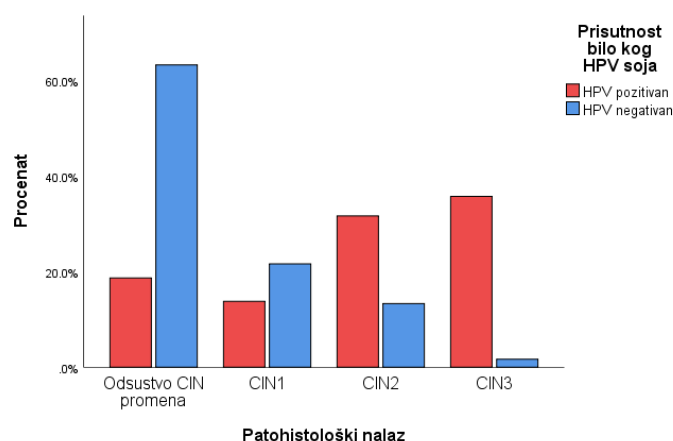
Visoko suspektne promene bile su prisutne najviše kod pacijentkinja sa CIN 3 promenama (63.4%), a zatim kod onih sa CIN 2 promenama (24.4%). Ovakve promene su mnogo ređe uočene kod pacijentkinja sa CIN 1 promenama (9.8%), a kod svega jedne ispitanice sa normalnim patohistološkim nalazom (2.4%).

Nijedna ispitanica sa CIN3 promenom nije imala normalan kolposkopski nalaz (bez atipičnih promena). Visoko suspektan kolposkopski nalaz opisan je kod približno 10% žena sa CIN1 promenama.



Grafikon 5. Procenat zastupljenosti kolposkopskih nalaza u odnosu na PH nalaz

Na grafikonu 6 i tabeli 10 prikazana je raspodela ispitanica u odnosu na hrHPV status i patohistološki nalaz. U kontrolnoj grupi, zabeležen je i najveći broj hrHPV negativnih nalaza (63.3%), u odnosu na grupu sa CIN 3 promenama gde je svega jedna ispitanica imala negativan hrHPV nalaz (1.7%). Zastupljenost HPV negativnog nalaza kod ispitanica sa CIN 1 i CIN 2 nalazom bila je 21.7% i 13.3%. Najmanje hrHPV pozitivnih ispitanica imali smo u grupi sa CIN 1 promenom (13.8%) i u grupi sa normalnim patohistološkim nalazom (18.7%), dok je zastupljenost u grupama CIN 2 i CIN 3 bila podjednaka (31.7% i 35.8%).



Grafikon 6. Učestalost pojedinih patohistoloških nalaza ispitanica u odnosu na HPV status

Pozitivni nalazi na HPV16, HPV18 i ostale hrHPV tipove virusa u odnosu na patohistološki nalaz prikazana je u tabeli 11. Najveći procenat žena koje su bile pozitivne na prisustvo HPV16 virus imale su CIN3 promene (60%). U ostalim PH grupama HPV16 bio je zastupljen sa 22% kod CIN2, 8% kod CIN1 i 10% u kontrolnoj grupi. HPV 18 bio je prisutan kod 45% ispitanica sa CIN2 nalazom i kod 30% sa CIN3 nalazom. Ostali hrHPV najviše su bili zastupljeni među ispitanicama koje su imale CIN2 promene (32.9%) i CIN 3 promene (31.7%), u manjoj meri kod žena koje su imale normalan patohistološki nalaz (21.5%), a najmanje kod žena sa CIN1 promenama (13.9%).

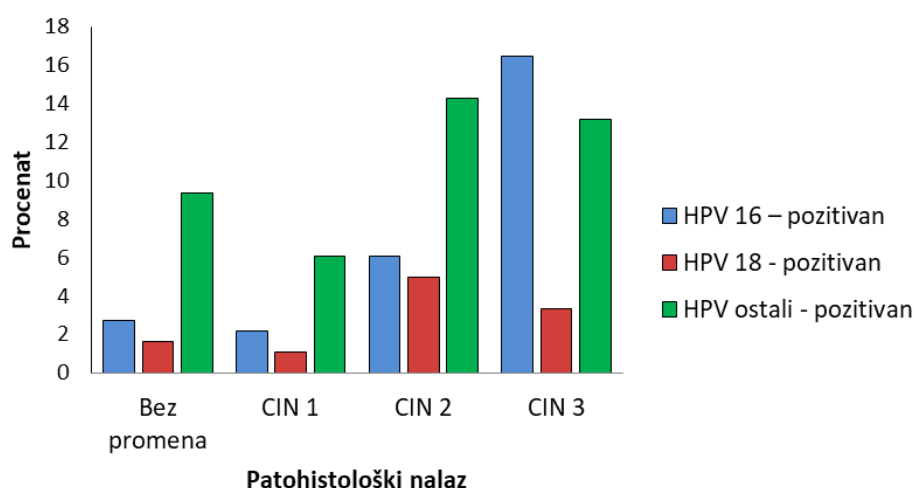
Tabela 10. Učestalost pojedinih patohistoloških nalaza ispitanica u odnosu na HPV status

Virusološki nalaz	Patohistološki nalaz			
	Bez CIN promena (N=61)	CIN 1 (N=30)	CIN 2 (N=47)	CIN 3 (N=45)
Prisustvo bilo kog hrHPV (N=123)	23 (12.6%)	17 (9.3%)	39 (21.3%)	44 (24%)
% od HPV grupe	18.7%	13.8%	31.7%	35.8%
% od PH grupe	37.7%	56.7%	83%	97.8%
HPV negativni (N=60)	38 (20.8%)	13 (7.1%)	8 (4.4%)	1 (0.5%)
% od HPV grupe	63.3%	21.7%	13.3%	1.7%
% od PH grupe	62.3%	43.3%	17%	2.2%

Tabela 11. Učestalost prisustva HPV16 i HPV18 virusa s obzirom na patohistološku grupu

Virusološki nalaz	Patohistološki nalaz			
	Bez CIN promena (N=61)	CIN 1 (N=30)	CIN 2 (N=47)	CIN 3 (N=45)
HPV 16 – pozitivan (N=50)	5 (2.7%)	4 (2.2%)	11 (6%)	30 (16.4%)
% od HPV grupe	10%	8%	22%	60%
% od PH grupe	8.2%	13.3%	23.4%	68.2%
HPV 18 – pozitivan (N=20)	3 (1.6%)	2 (1.1%)	9 (4.9%)	6 (3.27%)
% od HPV grupe	15%	10%	45%	30%
% od PH grupe	4.9%	6.7%	19.1%	13.6%
hrHPV ostali – pozitivan (N=79)	17 (9.3%)	11 (6%)	26 (14.2%)	25 (13.7%)
% od HPV grupe	21.5%	13.9%	32.9%	31.7%
% od PH grupe	27.9%	36.7%	55.3%	55.6%

Na grafikonu 7 prikazana je zastupljenost pozitivnih HPV nalaza u patohistološkim grupama, u odnosu na ukupan uzorak. U grupi koja je imala normalan patohistološki nalaz najprisutniji su ostali *hrHPV* virusi. Najviše se ističe grupa ispitanica sa CIN3 promenama, kod kojih je izrazito dominantno prisustvo HPV16 virusa.

**Grafikon 7.** Procenat zastupljenosti HPV tipova virusa u odnosu na patohistološki nalaz

Na osnovu prikazanih rezultata, može se videti da je HPV16 prisutan u preko 80% slučajeva kojima su detektovane CIN2 ili CIN3 promene. Sa druge strane, kod

žena koje imaju negativan HPV nalaz, samo 1 pacijentkinja je imala CIN3 promene, odnosno njih 8 je imalo CIN2 promene (ukupno u odnosu na ceo uzorak 4.9%).

4.3. Parametri jednokarbonskog metabolizma u ukupnom uzorku

Vrednosti homocisteina, folata i vit B12 kod ispitanica prikazane su u tabeli 12. Prosečan nivo folata iznosio je 15.18 ± 8.57 (Medijan=13.6), a kretao se od 5.20 do 82 nmol/l, dok je prosečan nivo vitamina B12 iznosio 226.58 ± 81.67 (Medijan=213.70), a raspon se kretao od 86.80 do 594.60 pmol/l. Vrednosti homocisteina kretale su se u rasponu od 4.90 do $14.70 \mu\text{mol/l}$ ($M=8.83 \pm 2.06$, Medijan=8.6).

Tabela 12. Vrednosti homocisteina, folata i vit B12 u ukupnom uzorku

Statistik	Homocistein (N=183)	B9 (N=183)	B12 (N=183)
Aritmetička sredina	8.83	15.18	226.58
Medijan	8.60	13.60	213.70
Mod	9.30	13.60	148.60
Standardna devijacija	2.06	8.57	81.67
Minimum – maksimum	4.90-14.70	5.20-82.00	86.80-594.60
Percentili			
25	7.50	9.30	166.20
50	8.60	13.60	213.70
75	9.80	17.60	265.80

4.3.1. Jednokarbonski parametri u odnosu na patohistološki nalaz

Prosečne vrednosti homocisteina u grupi ispitanica bez CIN promene bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti u grupi ispitanica sa CIN promenama $F(3, 178)=8.21, p<0.001, \eta^2=0.122^1$ (tabela 13).

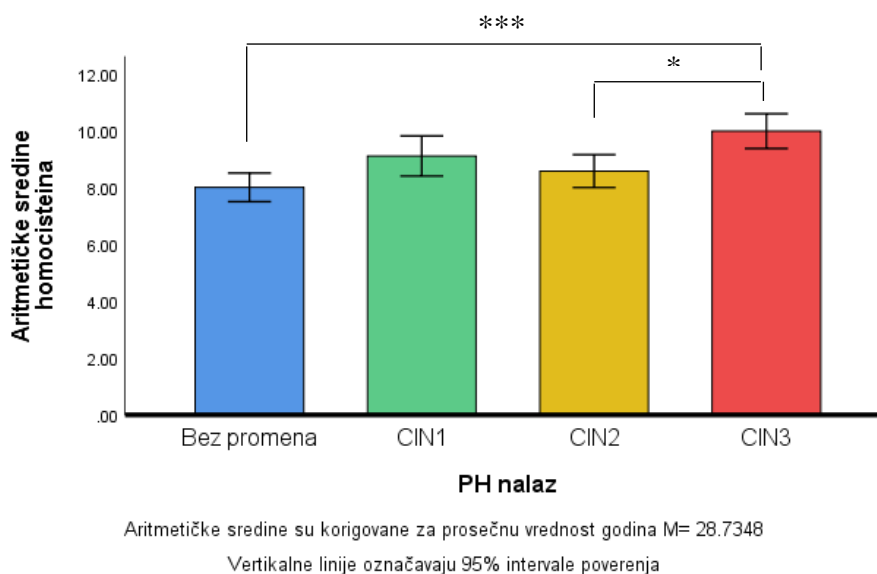
¹ η^2 – parcijalna kvadrirana eta, pokazatelj veličine efekta, vrednosti od 0.06 ukazuju na srednje efekte 0.14 i više, ukazuju na velike efekte [228].

Tabela 13. Aritmetičke sredine i medijan nivoa homocisteina u odnosu na PH grupu

Varijabla	N	M±SD	Median	F	p
Patohistološki nalaz					
Bez promena	61	8.06 ± 2.10	7.8	$F(3,178)= 8.21$	$p<0.001$
CIN1	30	9.12 ± 2.05	8.6		
CIN2	47	8.67 ± 1.89	8.2		
CIN3	45	9.87 ± 1.75	9.6		
Godine	183	28.79 ± 5.35	28	$F(1,178)= 1.68$	$P=0.197$

Napomena: N – broj ispitanica; M – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; F – F-test; p – nivo značajnosti

Ispitanice sa CIN3 patohistološkim nalazom imale su najviše vrednosti homocisteina u odnosu na sve ostale grupe, a statistički značajno veći nivo su imale u odnosu na grupu koja nije imala CIN promene ($p<0.001$) i grupu sa CIN2 ($p<0.05$) promenama (grafikon 8).



Grafikon 8. Prosečne vrednosti homocisteina u odnosu na patohistološki nalaz, korigovane za prosečnu starost (* - $p<0.01$; *** - $p<0.001$)

Nivoi vitamina B9 značajno se razlikuju po PH grupama: $F(3,178)=3.364$, $p<0.05$, $\eta^2=0.056$ (tabela 14). Ispitanice kod kojih su detektovane CIN3 promene imale su najniži nivo folata u odnosu na ostale tri grupe ($M=12.06\pm 5.43$, *Medijan*=10.8). Ispitanice sa CIN 1 promenama imale su u proseku najviši nivo vitamina B9

($M=18\pm 13.52$, $Medijan= 15.2$). Poređenjem parova grupa sa Bonferoni korekcijom utvrđeno je da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju ($P<0.05$). Međutim grupa bez CIN promena, grupa CIN2 i grupa CIN1 se međusobno ne razlikuju statistički značajno (grafikon 9). Na osnovu ove analize moglo bi se jedino sa većom sigurnošću tvrditi da nizak nivo vitamina B9 ($Medijan=11$) korespondira sa najtežim patohistološkim promenama – CIN3. Sa druge strane, visok nivo ovog vitamina nije nužno protektivni faktor patoloških promena, s obzirom na to grupa koja je bila bez patohistoloških promena nije imala i najveći nivo ovog vitamina.

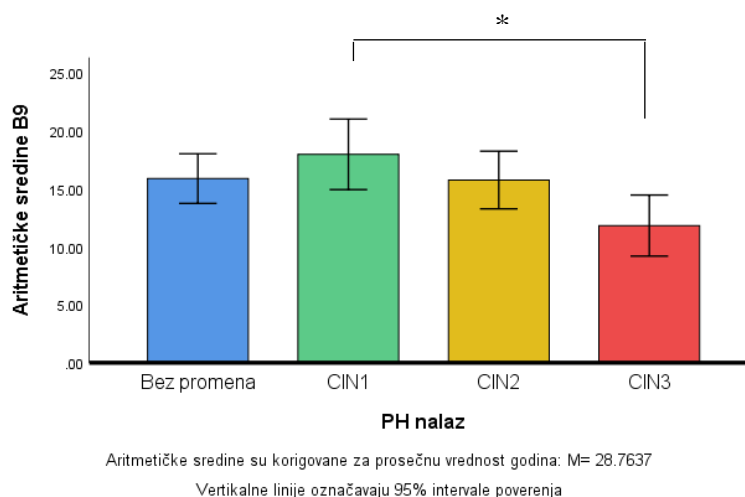
Tabela 14. Aritmetičke sredine i medijan nivoa B9 i B12 u odnosu na patohistološku grupu

Varijabla	N	$M\pm SD$	Median	F	P
B9					
Bez promena	61	15.80 ± 8.28	13.6	$F(3,178)= 3.53$	$p<0.05$
CIN1	30	18.00 ± 13.52	15.2	$F(3,179)= 3.33^*$	$p<0.05$
CIN2	47	15.55 ± 6.52	14.3		
CIN3	45	12.06 ± 5.43	10.8		
Godine	183	28.79 ± 5.35		$F(1,178)= 0.589$	$P=0.444$
B12					
Bez promena	61	244.90 ± 93.13	243.60	$F(3,178)= 4.26$	$p<0.01$
CIN1	30	202.42 ± 70.22	185.65	$F(3,179)= 3.26^*$	$p<0.05$
CIN2	47	237.88 ± 72.94	228.60		
CIN3	45	206.05 ± 74.28	203.40		
Godine	183	28.79 ± 5.35		$F(1,178)= 3.57$	$P=0.060$

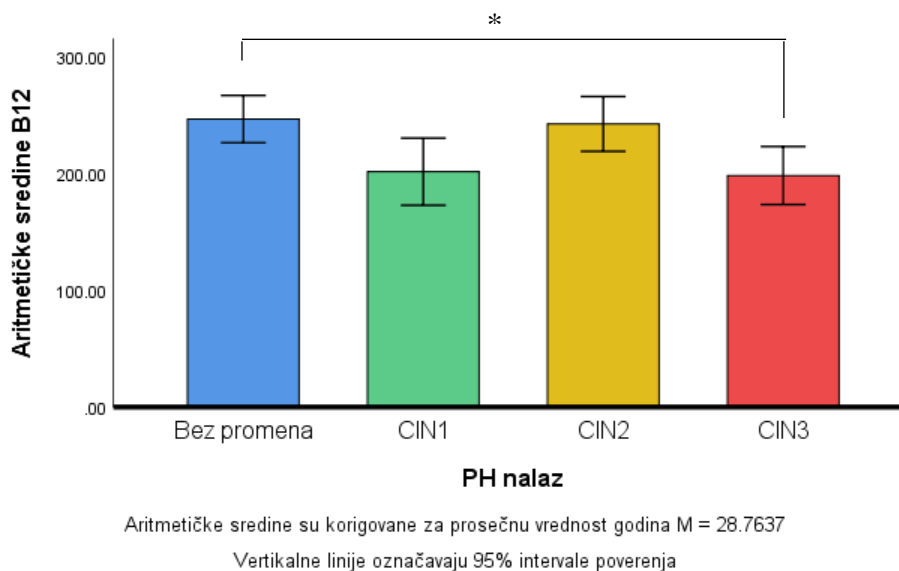
Napomena: N – broj ispitanica; M – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; F – F-test; p – nivo značajnosti; *- vrednost F testa kad se iz modela isključi starost

Analiza nivoa vitamina B12 u odnosu na patohistološki nalaz pokazala je da se PH grupe značajno razlikuju: $F(3, 178)=4.26$, $p<0.01$, $\eta^2=0.067$. Na osnovu prosečnih vrednosti nivoa vitamina B12 (tabela 14) u odnosu na PH nalaz može se videti da grupa sa CIN1 promenama ima najniži nivo ovog vitamina u odnosu na ostale grupe, a zatim grupa sa CIN3 promenama. Najviši prosečan nivo zabeležen je kod grupe kod koje nisu detektovane patohistološke promene ($M=244.90\pm 93.13$, $Median=243.6$), a najniži kod grupe sa CIN1 promenama ($M=202.42\pm 70.22$, $Median=185.65$). Međutim, kada se

aritmetičke sredine koriguju za godine, najniži nivo B12 je u grupi sa CIN3 promenama ($M_{korigovano}=198.9$), tako da se poređenjem grupa sa Bonferoni korekcijom beleže statistički značajne razlike između grupe sa CIN3 i grupe bez CIN promena (grafikon 10).



Grafikon 9. Prosečne vrednosti folata (B9) u odnosu na patohistološki nalaz, korigovane za prosečnu starost (* - $p<0.05$)



Grafikon 10. Prosečne vrednosti B12 u odnosu na patohistološki nalaz, korigovane za prosečnu starost (* - $p<0.05$; *** - $p<0.001$)

Na osnovu analize jednokarbonskih parametara – nivoa homocisteina, B9 i B12 i njihovim poređenjem u odnosu PH nalaz, moglo bi se reći da viši nivo homocisteina

u najvećoj meri korespondira sa visoko suspektnim PH promenama, dok niske vrednosti upućuju na najverovatnije odsustvo PH promena.

Kada su u pitanju nivoi vitamina B9 i B12, nivo vitB9 u nešto većoj meri diferencira nivo PH promena, u smislu da je nizak nivo folata karakterističan za grupu koja ima PH promene visokog gradusa (CIN3). Nivo vitamina B12 nije se pokazao kao parametar koji je relevantan za diferenciranje PH promena, s obzirom na to da nivoi vit B12 ne koreliraju sa težinom CIN promene. Najviše nivoe ovog vitamina imaju ispitanice bez CIN promena.

4.4. Interkorelacije ispitivanih dijagnostičkih parametara i patohistoloških nalaza

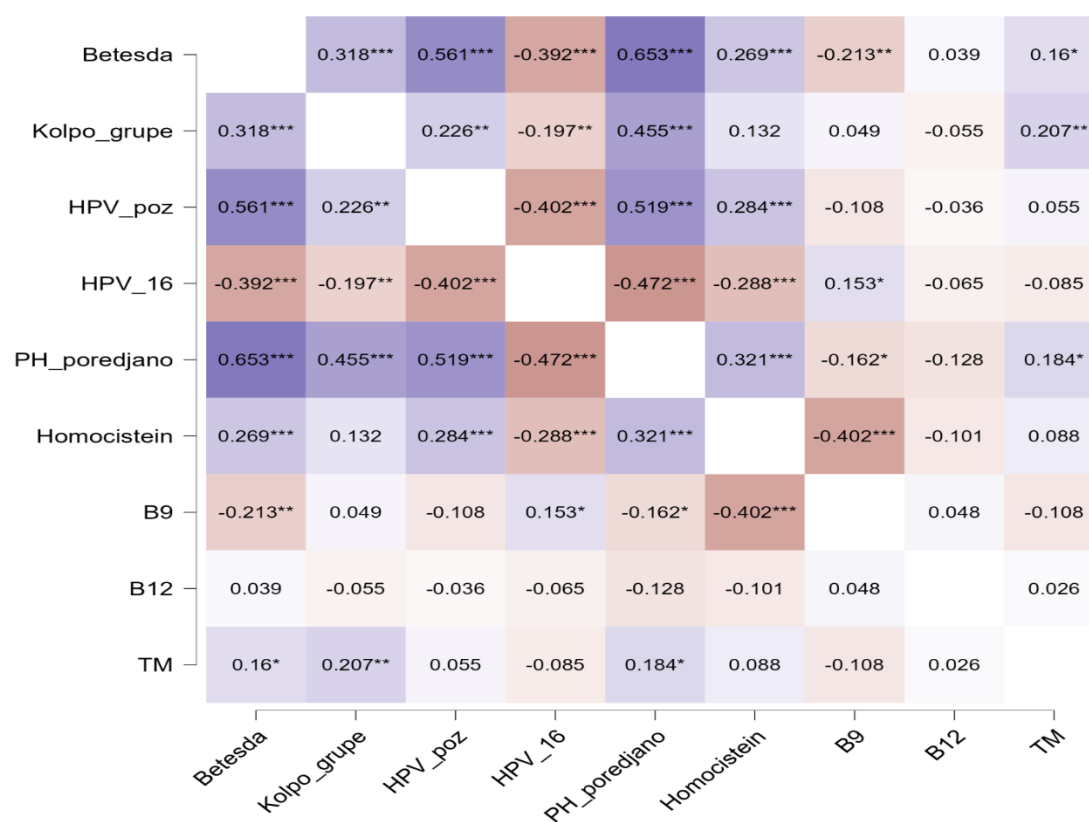
Korelacije patohistoloških nalaza i ispitivanih dijagnostičkih parametara u ovom istraživanju (Papa bris, HPV test, kolposkopija, jednokarbonski parametri) prikazane su na grafikonu 11.

Primenom Spirmanove korelacije, uočava se da je najjača pozitivna korelacija ($p < 0.001$) zabeležena između PH nalaza i Papa brisa, HPV testa i kolposkopskog nalaza, odnosno da nalazi ova tri dijagnostička parametra koreliraju sa težinom PH promena. U odnosu na Papa bris, zabeležene su značajne pozitivne korelacije ($p < 0.001$) sa HPV testom i kolposkopskim nalazom.

Ako pogledamo korelaciju nivoa PH promena i nivoa jednokarbonskih parametara u krvi, značajne korelacije zabeležene su za težinu PH promena i nivo homocisteina, pri čemu je korelacija pozitivna, odnosno viši nivo homocisteina korelira sa težom PH promenom ($p < 0.001$). Druga značajna korelacija zabeležena je između težine PH promena i nivoa vitamina B9, pri čemu je korelacija negativna, tako da viši nivo PH promene korelira sa nižim nivoom vitamina B9 ($p < 0.05$). Korelacija između

težine PH promene i nivoa vitamina B12 nije statistički značajna. Vrednosti homocisteina takođe su u pozitivnoj korelaciji sa Papa brisom i HPV testom ($p < 0.1$), a u negativnoj sa vrednostima vitB9 ($p < 0.001$). Postoji negativna korelacija između Papa brisa i vrednosti vit B9 ($p < 0.01$).

Grafikon 11. Toplotna mapa interkorelacija patohistoloških i dijagnostičkih pokazatelja (ljubičaste nijanse označavaju pozitivne, a crvene negativne korelacije; intenzivnija boja označava jaču povezanost)



Napomena: PH_poredjano – PH nalazi od kontrolne grupe do CIN3; Betesda – bris po Betesda klasifikaciji od NILM do HSIL; Kolpo_grupe – od bez promena do visoko rizičnih promena; HPV_poz – podela na hrHPV + i hrHPV -; HPV16 – podela uzorka na HPV16 pozitivne i negativne značajno na nivou * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

4.5. Vrednosti jednokarbonskih parametara u odnosu na CIN i HPV status

U tabeli 15, prikazane su srednje vrednosti homocisteina, B9 i B12 u odnosu na CIN grupe i HPV status (bilo koji hrHPV). Primećuje se da su vrednosti homocisteina

više u grupi koja ima HPV+ test, kao i kod grupe CIN2+. Međutim, razlike su jedino značajne u odnosu na HPV status. Tačnije, ANOVA test je pokazao da postoje značajne razlike u nivou homocisteina, u odnosu na prisustvo HPV virusa: $F(1,177)=8.03$, $p<0.01$, $\eta^2=.043$. Što se tiče ostalih pokazatelja – odnosno razlike u nivoima vitamina B9 i B12, razlike ispitane ANOVA testom nisu statistički značajne, mada se može videti da pacijentkinje sa HPV+ rezultatom imaju niži nivo i B9 i B12.

Tabela 15. Vrednosti homocisteina, B9 i B12, u odnosu na CIN grupe i HPV status

	Bez promena	CIN1	CIN2+
Homocistein			
HPV + (9.24±1.98)*	8.29±2.11 (N=23)	9.36±2.17 (N=17)	9.47±1.85*(N=83)
HPV – (8.00±1.99)	7.93±2.11 (N=38)	8.78±1.92 (N=13)	7.24±1.21 (N=9)
Total	8.06±2.10	9.11±2.10	9.25±1.95
B9			
HPV + (14.46±8.37)	14.74±5.46	19.22±17.46	13.40±5.56
HPV – (16.66±8.86)	16.44±9.61	16.42±5.52	17.92±10.20
Total	15.80±8.28	18.00±13.52	13.84±6.23
B12			
HPV + (220.86±71.18)	247.78±75.71	198.84±77.07	217.91±67.30
HPV – (238.31±99.45)	243.16±103.19	207.11±62.92	262.88±124.02
Total	244.90±93.13	202.42±70.22	222.31±74.92

Napomena: * - značajno viši nivo homocisteina kod HPV+ u odnosu na HPV. Za ostale pokazatelje razlike nisu značajne.

Za iste pokazatelje ponovljena je ANOVA analiza, s tim da se ovoga puta posmatrala razlika u odnosu na prisustvo HPV16 virusa i CIN statusa. Zabeležena je statistički značajna razlika između HPV16 pozitivnih i HPV16 negativnih žena: $F(1,177)=8.16$, $p<.01$, $\eta^2=.044$, pri čemu je grupa žena koje su bile HPV16+ imale viši nivo homocisteina u odnosu na HPV16 negativne, a prosečne vrednosti se mogu videti u tabeli 16. Takođe, statistički se razlikuju žene po nivou homocisteina spram prisustva CIN promena: $F(2,177)=4.19$, $p<.05$, $\eta^2=.045$, pri čemu, kontrolna grupa ima najniži nivo (8.06), a CIN2+ grupa najviši nivo homocisteina (8.83), što se takođe može videti u tabeli 16.

Kada su u pitanju promene u nivou vitamina B9, u odnosu na HPV16 status i CIN status, nisu zabeležene statistički značajne razlike niti između HPV16 pozitivnih i negativnih žena, niti između žena u odnosu na CIN status. Iz tabele 16 može se videti da ovaj vitamin ne pokazuje pravilnost kakvu pokazuje homocistein.

Na kraju, kada su u pitanju promene u nivou vitamina B12, u odnosu na HPV16 status i CIN status, jedina statistički značajna razlika zabeležena je u odnosu na CIN promene: $F(2,177)=3.35$, $p<.05$, $\eta^2=.036$, a u tabeli 16 su prosečne vrednosti B12 u odnosu na CIN grupe. Može se videti da ispitanice bez CIN promena imaju najviši nivo B12, dok grupa sa CIN1 promenama imaju najniži nivo ovog vitamina.

Tabela 16. Vrednosti homocisteina, B9 i B12 u odnosu na CIN grupu i HPV16 status

	Bez promena	CIN1	CIN2+
Homocistein			
HPV16 + (9.90±2.11)*	8.28±2.98 (N=5)	11.35±2.51 (N=4)	9.95±1.89 (N=41)
HPV16- (8.43±1.90)	8.04±2.04 (N=56)	8.76±1.79 (N=26)	8.69±1.75 (N=51)
Total	8.06±2.10	9.12±2.05	8.83±2.06*
B9			
HPV16 + (13.54±6.73)	19.40±8.79	13.25±8.70	12.85±6.10
HPV 16- (15.79±9.12)	15.48±8.24	18.74±14.10	14.64±6.29
Total	15.80±8.28	18.00±13.52	13.85±6.23
B12			
HPV16 + (228.01±68.73)	303.08±44.27	213.73±32.23	220.25±68.74
HPV16 -	239.71±94.78	200.68±74.65	223.96±80.18
Total	244.90±93.13*	202.42±70.22	222.31±74.92

4.6. Ispitivanje dijagnostičke značajnosti neinvazivnih metoda

Na osnovu pozitivnih i negativnih PH nalaza u odnosu na neinvazivne testove (tabela 17) izračunate su senzitivnost, specifičnost, PPV i NPV za tri neinvazivne dijagnostičke metode, koje su prikazane u tabeli 18. Utvrđeno je da Papa test ima najveću tačnost (0.78) u predviđanju pozitivnih i negativnih patohistoloških nalaza.

Nakon toga sledi rezultat virosološke analize na prisustvo bilo kog *hrHPV* virusa (0.73), pa virusološka analiza na prisustvo HPV 16 ili 18 virusa (0.72), a zatim kolposkopija (0.67). Papa test ima visoku senzitivnost (0.92), dok je kolposkopija najmanje senzitivna (0.39). Sa druge strane, kolposkopija ima visoku specifičnost (0.95), dok je specifičnost Papa testa dosta niža (0.63). I prisustvo HPV16 ili 18 virusa ima visoku specifičnost (0.86), a nižu senzitivnost (0.62). Prisustvo bilo kog visokorizičnog HPV ima višu senzitivnost (0.90), ali nisku specifičnost (0.56).

Tabela 17. Klasifikacija pozitivnih i negativnih slučajeva na osnovu PH nalaza i nalaza Papa testa, kolposkopije i prisustva *hrHPV*, HPV16 i HPV 18 virusa

Dijagnostički test	Rezultat testa	PH nalaz		Ukupno
		Pozitivan (CIN2+)	Negativan (CIN2-)	
PAPA test	Pozitivan (ASCUS+)	85 (TP)	34 (FP)	119
	Negativan (NILM)	7 (FN)	57 (TN)	64
Kolposkopija	Pozitivan	36 (TP)	5 (FP)	41
	Negativan	56 (FN)	86 (TN)	142
HPV 16 ili 18	Pozitivan	55 (TP)	13 (FP)	68
	Negativan	37 (FN)	78 (TN)	115
HPV svi tipovi	Pozitivan	83 (TP)	40 (FP)	123
	Negativan	9 (FN)	51 (TN)	60
	Ukupno	92	91	183

Što se tiče prediktivnih vrednosti ovih metoda, najvišu PPV ima kolposkopija (0.88), zatim virusološki test na HPV16 ili 18 (0.81), i na kraju Papa test (0.71). Nasuprot tome, Papa ima najvišu NPV (0.89), zatim virusološki test na prisustvo bilo kog *hrHPV* (0.85), a zatim prisustvo HPV16 ili 18 virusa (0.68) i na kraju kolposkopija (0.61). Drugim rečima, najviše može da se posumnja na najteže CIN3 promene ukoliko se zabeleže visoko suspektne promene pomoću kolposkopije, kao i ukoliko postoji prisustvo HPV16 ili HPV18 virusa. Sa druge strane, najveću tačnost ima negativan rezultat Papa testa.

Tabela 18. Dijagnostička značajnost neinvazivnih testova

Dijagnostički značaj testa	PAPA test (ASCUS+)	Kolposkopija (visoko suspektna)	HPV16 ili HPV18 pozitivan	hrHPV bilo koji pozitivan
Senzitivnost	0.92	0.39	0.62	0.90
Specifičnost	0.63	0.95	0.86	0.56
PPV	0.71	0.88	0.81	0.67
NPV	0.89	0.61	0.68	0.85
Tačnost	0.78	0.67	0.72	0.73

4.7. ROC analiza PAPA testa, kolposkopije i hrHPV/HPV 16 i 18 pozitivnih slučajeva

U tabeli 19 prikazane su LR+ i LR- vrednosti za Papa test, kolposkopiju i prisustvo hrHPV/HPV16 ili HPV18 virusa. Prema našim rezultatima, nijedan test nema izuzetne performanse. Međutim, kolposkopija, tačnije ukoliko se opaze visoko suspektne promene, one su veoma indikativne da postoje patohistološke promene CIN2+. Takođe, ukoliko se ne zabeleže visokosuspektne promene, vrlo verovatno da su u pitanju CIN2- promene. Ove vrednosti imaju prednost nad PPV i NPV pokazateljima, jer na njih ne utiče prevalencija.

Tabela 19. Vrednosti LR+ i LR- verovatnoća za neinvazivne dijagnostičke testove

Dijagnostički test	LR+	LR-
PAPA test (ASCUS+)	2.49	0.41
Kolposkopija (visoko suspektan nalaz)	7.8	0.13
Prisustvo HPV16 ili HPV18	4.21	0.24
Prisustvo bilo kog hrHPV	2.1	0.49

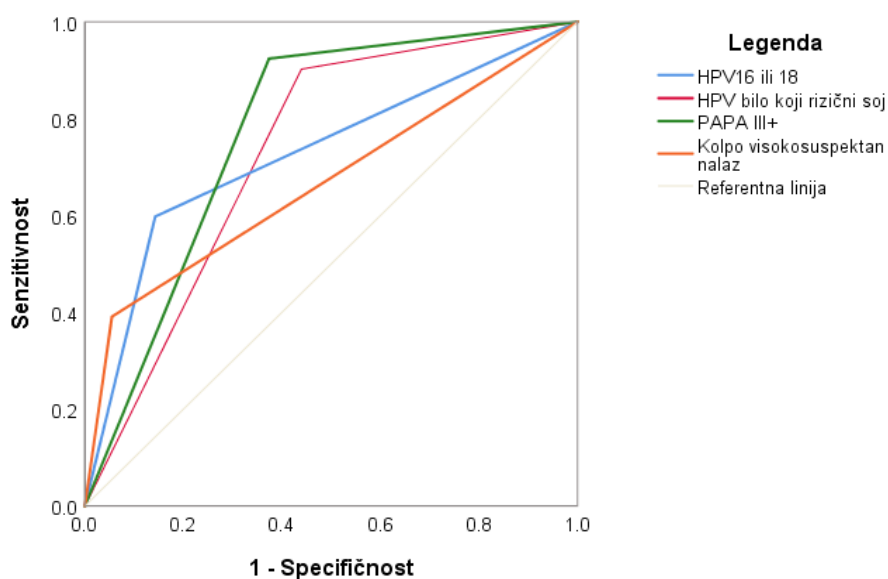
U tabeli 20 prikazane su vrednosti AUC-a kao i test značajnosti. Može se videti da za navedene *cut-off* kriterijume, PAPA ASCUS+ test ima AUC od 0.775, HPV16+

ili HPV18+ imaju AUC 0.727, dok kolposkopija, za visokosuspektan nalaz ima AUC 0.668. Sve tri vrednosti su statistički značajne, a PAPA ASCUS+ nalaz i HPV16/HPV18/hrHPV+ predstavljaju dobre dijagnostičke parametre, dok kolposkopija predstavlja dovoljno dobru dijagnostičku metodu.

Tabela 20. Vrednost AUC i statistička značajnost

Dijagnostički test	AUC	SG	Asimptotska značajnost	Asimptotski 95% intervali poverenja
Prisustvo HPV16 ili HPV18	.727	.038	$p < 0.001$	0.653 – 0.802
Prisustvo hrHPV	.731	.038	$p < 0.001$	0.657 – 0.806
PAPA ASCUS+	.775	.036	$p < 0.001$	0.705 – 0.845
Kolposkopija (visoko suspektan nalaz)	.668	.040	$p < 0.001$	0.589 – 0.747

Napomena: AUC – površina ispod krive; SG – standardna greška



Grafikon 12. ROC kriva za dijagnostičke testove- Papa test, kolposkopiju i prisustvo HPV16 HPV18 ili bilo kog hrHPV virusa

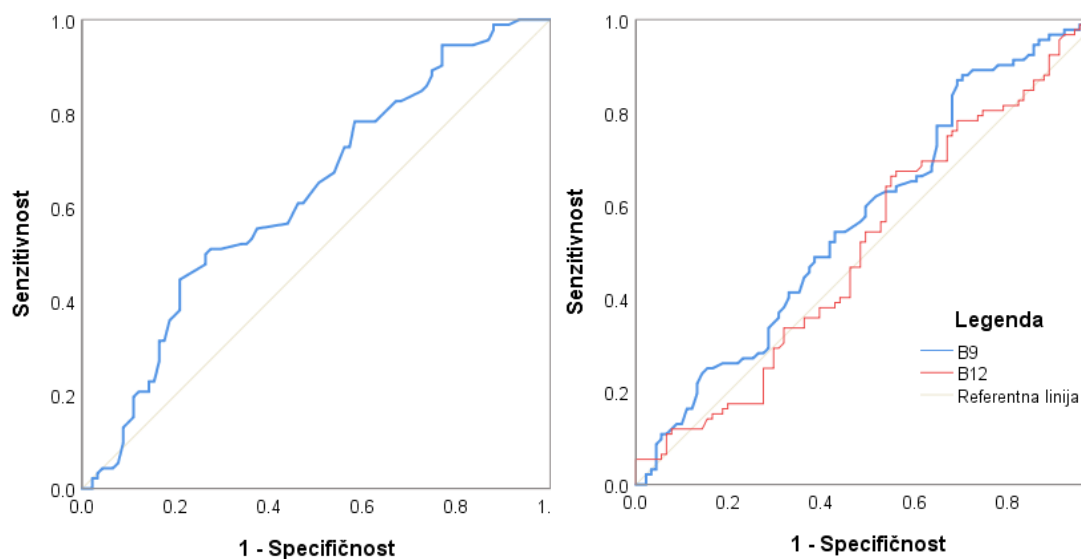
Na grafikonu 12 prikazana je ROC kriva za tri neinvazivne dijagnostičke metode. Prednost ROC analize je u tome što prikazuje odnos senzitivnosti i lažno

pozitivne verovatnoće. Vizuelnom inspekcijom se može izvesti zaključak o tome koliko kojem rezultatu se može „verovati“. Naime, ukoliko se dobije Papa pozitivan test, onda je vrlo verovatno da postoji CIN2+ promena, dok negativan HPV16 i 18 ili hrHPV ukazuje da najverovatnije promene nema, što važi i za kolposkopiju.

4.8. Određivanje cut-off vrednosti jednokarbonskih parametara na osnovu ROC analize

Da bi se utvrdilo empirijski da li postoje neke vrednosti jednokarbonskih parametara koje su dobre u diskriminaciji obolelih od zdravih, ponovo je urađena ROC analiza. Naime, pored toga što možemo da utvrdimo diskriminativnost testa, ROC analiza mapira vrednosti testa u odnosu na to kolika je senzitivnost i verovatnoća lažno pozitivna (1-specifičnost). Vrednosti parametara za koje je razlika senzitivnosti i verovatnoće lažno pozitivne najveća uzima se kao *cut-off* vrednost.

Sprovedene su dve ROC analize, jedna za vrednosti homocisteina i druga za određivanje *cut-off* vrednosti vitamina, B9 i B12. Analize su urađene odvojeno, jer je kod obolelih vrednost homocisteina veća, dok su vrednosti B9 i B12 manje. Na grafikonu 13 prikazane su ROC krive za sva tri jednokarbonska parametra. Može se videti da vrednosti homocisteina zauzimaju veću površinu iznad referentne linije, u odnosu na vrednosti B9 i B12. Ako se pogleda desni panel na grafikonu 13, može se primetiti da vrednosti B12 jako loše razlikuju obolele od zdravih, s obzirom na to da crvena linija skoro u potpunosti prati referentnu liniju.



Grafikon 13. ROC kriva za vrednosti jednokarbonskih parametara – levi panel predstavlja ROC krivu za vrednosti homocisteina, desni panel predstavlja ROC krivu za vrednosti B9 i B12

Možemo reći da vrednosti B12 nisu toliko značajne za predviđanje PH promena. U tabeli 21 su prikazane vrednosti AUC-a i statistička značajnost jednokarbonskih parametara. Vrednosti homocisteina bolje diskriminišu CIN2+ promene od CIN2- promena, od ostalih jednokarbonskih parametara, i u stvari, jedino AUC homocisteina statistički značajno odstupa od referentne linije ($p < 0.01$).

Tabela 21. Vrednost AUC i statistička značajnost za jednokarbonske parametre

Jednokarbonski parametar	AUC	SG	Asimptotska značajnost	Asimptotski 95% intervali poverenja
Homocistein	0.626	0.041	$p < 0.01$	0.545 – 0.707
B9	0.572	0.042	$p = 0.092$	0.489 – 0.655
B12	0.513	0.043	$p = 0.756$	0.429 – 0.598

Napomena: AUC – površina ispod krive; SG – standardna greška

U tabeli 22 je data *cut-off* vrednost homocisteina za koju je diskriminativnost najveća, odnosno za koju je razlika senzitivnosti i lažno pozitivne vrednosti najveća. Najviša zabeležena razlika između senzitivnosti i lažno pozitivne verovatnoće iznosila je 0.228 za vrednost od 9.35 (Prilog, tabela A). Na osnovu deskriptivne statistike za ovaj parametar, utvrđeno je da medijana iznosi 8.60, a da je 75. percentil na vrednosti

9.80. Dakle, na osnovu ROC krive, možemo videti da su vrednosti koje ova analiza predlaže vrednosti iznad medijane a ispod 75. percentila (8.6-9.8). U narednoj ROC analizi napravljena je klasifikacija CIN2+ slučajeva spram vrednosti *cut-off* skora kako bi se ustanovila dijagnostička preciznost, a vrednost AUC-a su prikazane u tabeli 23, na osnovu koje ova vrednost predstavlja dovoljno dobar dijagnostički pokazatelj (vrednosti od 0.6 do 0.7 se smatraju dovoljno dobrim za dijagnostički test [229]). Ova vrednost homocisteina je približna vrednost medijane homocisteina pacijentkinja sa CIN3 promenama (*Medijan*_{CIN3}=9.60; tabela 13) Proverom preciznosti ovih *cut-off* vrednosti pomoću LR+ i LR – vrednosti (tabela 22), može se videti da nijedna od odabranih graničnih vrednosti nema dobre performanse (nijedan test nema LR+ vrednosti veće od 10, niti vrednosti LR – manje od 0.1).

Tabela 22. Vrednosti *cut-off* skorova za homocistein i B9 određenih na osnovu ROC analize, i vrednosti senzitivnosti i 1-senzitivnosti, i njihova razlika

Granične vrednosti	Senzitivnost (A)	1-Specifičnost (B)	Specifičnost	A – B	LR+	LR -
Homocistein						
≥ 9.35	0.446	0.209	0.79	0.228	2.13	0.47
B9						
≤19.5	0.880	0.703	0.297	0.176	1.25	0.80
Homocistein i B9						
Hom≥9.35 & B9 ≤19.50	0.435	0.165	0.835	0.263	2.64	0.38

Iako ROC analiza nije pokazala značajnost nivoa B9 za predviđanje CIN2+ promena, na grafikonu 13, na desnom panelu, može se videti da postoji jedan deo krive koji se značajnije odvaja od referentne linije. To je vrednost 19.5 (tabela 22), za koju je specifičnost niska (0.30), ali senzitivnost visoka (0.88).

Na osnovu ovih *cut-off* vrednosti, ispitanice su podeljene u grupu onih koje imaju vrednost B9 ≤19.5, i vrednost homocisteina ≥9.35. Proverena je dijagnostička tačnost ovih udruženih graničnih vrednosti. U tabeli 23 je prikazana vrednost AUC-a za

slučajeve koji imaju visok homocistein i nizak B9. Može se videti da vrednost homocisteina ≥ 9.35 i vrednost B9 ≤ 19.5 , predstavlja bolji dijagnostički pokazatelj nego pojedinačne vrednosti ovih jednokarbonskih parametara, što se vidi i na osnovu LR+ i LR- vrednosti.

Tabela 23. Vrednost AUC i statistička značajnost za cut-off skorove homocisteina i B9, kao i udruženih visokih vrednosti homocisteina i niskih vrednosti B9

Granične vrednosti	AUC	SG	Asimptotska značajnost	Asimptotski 95% intervali poverenja
Homocistein				
≥ 9.35	0.618	0.042	$p < 0.01$	0.537 – 0.700
B9				
≤ 19.50	0.589	0.042	$p < 0.05$	0.506 – 0.671
Homocistein i B9				
Hom ≥ 9.35 & B9 ≤ 19.50	0.635	0.041	$p < 0.01$	0.554 – 0.716

4.9. Verovatnoća HPV infekcije u odnosu na vrednosti jednokarbonskih parametara i Papa nalaza

Da bismo predvideli verovatnoću HPV infekcije u odnosu vrednosti jednokarbonskih parametara i Papa nalaza, koristili smo logističku regresiju. HPV status je korišćen kao zavisna varijabla (model 1), a zatim smo dodali i pozitivan Papa rezultat kao prediktor, kako bi se videlo koliko vrednosti homocisteina, vitB9 i B12 mogu da predvide HPV infekciju, kada se kontroliše i Papa nalaz (model2).

Tabela 24. Vrednosti hi kvadrata nultog i modela sa prediktorima, te vrednost pseudo R²

Model	X ²	df	p	Nagelkerke R ²
Model1	31.16	1	< .001	.218
Model2	38.65	4	< .001	.265

U tabeli 24 prikazana je statistika modela, odnosno Hi kvadrat test modela 1 i 2, a u tabeli 25 prikazana je vrednost pojedinačnih regresionih koeficijenata modela 2, odnosno modela koji sadrži sve prediktore, sa statističkom značajnošću i vrednostima odnosa šansi (OR). Može se videti da Papa pozitivan rezultat (ASCUS+) u najvećoj meri predviđa HPV pozitivan rezultat. Na osnovu vrednosti odnosa šansi (OR=5.25, $p<.001$), može se reći da pacijentkinje koje imaju pozitivan Papa test imaju 5 puta više šanse da imaju HPV pozitivan rezultat u odnosu na pacijentkinje koje imaju Papa NILM grupu. Drugi prediktor koji je je značajan jeste vrednost homocisteina (OR=0.80, $p<.05$), i govori o tome da držeći ostale vrednosti fiksirane, povećanje vrednosti homocisteina za jedan, povećava verovatnoću da pacijentkinja ima HPV pozitivan rezultat za 20% ($1-OR*100$). Vrednosti vitamina B9 i B12 nisu prediktivni pokazatelji HPV infekcije.

Tabela 25. Vrednosti koeficijenata logističke regresije i odnosa šansi prediktora HPV infekcije

	B	SG	Wald	df	P vrednost	OR	95% intervali poverenja za OR	
							Donji	Gornji
PAPA_poz(1)	1.659	.361	21.087	1	.000	5.253	2.588	10.662
Homocistein	-.223	.099	5.044	1	.025	.800	.659	.972
B9	.003	.020	.026	1	.872	1.003	.965	1.043
B12	.002	.002	1.035	1	.309	1.002	.998	1.006
Constant	-.028	1.145	.001	1	.981	.973		

Napomena: B – koeficijent logističke regresije; Wald – Valdov statistic; df – broj stepeni slobode; SG – standardna greška; OR – odds ratios, odnosno odnos šansi.

Urađen je i model gde su prediktori HPV16 ili 18+ nalaz, Papa+, kao i homocistein sa graničnom vrednošću od 9.35 dobijena ROC analizom. Ukoliko je vrednost homocisteina 9.35 i više, onda postoji 2 puta više šanse HPV16 ili 18 pozitivnog rezultata. (tabela 26)

Tabela 26. Vrednosti koeficijena logističke regresije i odnosa šansi prediktora HPV16 ili 18 infekcije

	B	SG	Wald	df	P vrednost	OR	95% intervali poverenja za OR	
							Donji	Gornji
PAPA_poz(1)	2.339	.513	20.767	1	.000	10.368	3.792	28.349
Homocistein 9.35+	.768	.361	4.513	1	.034	2.155	1.061	4.375
Konstanta	-.542	.276	3.866	1	.049	.581		

Napomena: B – koeficijent logističke regresije; Wald – Waldov statistic; df – broj stepeni slobode; SG – standardna greška; OR – odds ratios, odnosno odnos šansi.

4.10. Verovatnoća CIN2+ promena u odnosu na vrednosti jednokarbonskih parametara i HPV infekcije

Da bismo utvrdili verovatnoću CIN2+ promena u odnosu na vrednosti jednokarbonskih parametara i HPV statusa, podelili smo ispitanice u četiri grupe na osnovu izračunatih medijana u kontrolnoj grupi.

U tabeli 27 date su vrednosti OR za vrednosti homocisteina ispod i iznad medijalne (7.80), a koje su ukrštene sa HPV pozitivnim i negativnim nalazima, a zatim su se na osnovu tih vrednosti predviđale CIN1 odnosno CIN2+ promene. Kao što se može videti, vrednosti homocisteina zajedno sa pozitivnim HPV testom nisu prediktivne za CIN1 promene, odnosno model nije statistički značajan. Sa druge strane, može se videti da interakcija vrednosti homocisteina i HPV statusa jeste prediktivna za CIN2+ promene. Tačnije, pacijentkinje koje imaju vrednosti homocisteina iznad 7.80, i HPV negativan nalaz imaju 4 puta više šanse da imaju CIN2+ promene u odnosu na pacijentkinje koje imaju vrednosti ispod 7.80 i negativan HPV nalaz, dok pacijentkinje koje pored vrednosti homocisteina iznad 7.80 imaju i HPV pozitivan nalaz imaju 9 puta

vise šansi da imaju CIN2+ promene, u odnosu na pacijentkinje koje imaju vrednosti ispod 7.80 i negativan HPV.

Tabela 27. Odnosi šansi za CIN1 i CIN2+ promene u odnosu na kontrolnu grupu, a za vrednosti homocisteina podeljenih u odnosu na medijan iz kontrolne grupe (7.80)

Homocis	HPV	CIN1			CIN2+		
		N	OR (95%IP)	P vrednost	N	OR(95%IP)	P vrednost
<7.80	-	9	Referentna		9	Referentna	
<7.80	+	10	1.33 (.20-8.71)	X ² =3.30 p=.347	38	0.32 (.11-.87)	X ² =51.6 P<.01
≥7.80	-	42	3.89 (.13-2.97)		38	4.17 (1.28-13.56)	
≥7.80	+	30	3.33 (.32-7.30)		68	9.4 (2.93-30.20)	

Napomena: Homocis – vrednosti homocisteina; HPV – HPV status; OR – odds ratios, odnos šansi, N – broj ispitanica; 95%IP – 95% intervali poverenja

U tabeli 28 date su vrednosti ispod i iznad medijane za B9 (13.60), ukrštene sa HPV statusom. Modeli su statistički značajni, gde je došlo do izražaja prediktivnost HPV-a, dok vrednosti B9 nisu prediktivne, jer se ispitanice sa niskim B9 uopšte ne razlikuju. Jedino se izdvaja verovatnoća da ispitanice sa niskim B9 zajedno sa HPV+ rezultatom imaju 5 puta više šansi da imaju CIN2+ promene u odnosu na pacijentkinje koje imaju vrednosti B9 iznad medijane i HPV negativan rezultat.

Tabela 28. Odnosi šansi za CIN1 i CIN2+ promene u odnosu na kontrolnu grupu, a za vrednosti B9 podeljenih u odnosu na medijan iz kontrolne grupe (13.60)

B9	HPV	CIN1			CIN2+		
		N	OR (95%IP)	P vrednost	N	OR(95%IP)	P vrednost
≥13.60	-	36	Referentna		36	Referentna	
≥13.60	+	26	4.08 (1.36-12.28)	X ² =7.85 P<.05	77	18.96 (6.97-51.45)	X ² = 55.8 P<.01
<13.60	-	15	1.75 (.46-6.62)		11	.35 (.039-3.16)	
<13.60	+	14	.96 (.21-4.27)		29	5.73 (1.93-16.97)	

Napomena: HPV – HPV status; OR – odds ratios, odnos šansi, N – broj ispitanica; LSIL – CIN1 promene; HSIL – CIN2+ promene; 95%IP – 95% intervali poverenja

S obzirom da se ROC analizom došlo do zaključka da se vrednosti B12 ne razlikuju značajno u odnosu na ispitivane grupe, logistička regresija i verovatnoća CIN2+ promena nisu rađene u odnosu na vrednosti ovog parametara.

4.11. Modeliranje dijagnostičkih parametara pomoću logističke regresije

Nakon određivanju *cut-off* vrednosti jednokarbonskih parametara, sprovedena je binarna logistička regresija sa ciljem da se utvrdi da li postoji neka kombinacija dijagnostičkih parametara koja sa većom sigurnošću može da odredi visokorizičnu patohistološku promenu (CIN2+). Logistička regresija je dobra za određivanje dijagnostičke efikasnosti, jer pored toga što prikazuje udruženu senzitivnost i specifičnost, prikazuje i odnos šansi (*odds ratio*) pojedinačnih prediktora, uzimajući u obzir doprinos svih prediktora u modelu (*adjusted odds ratio*).

Kao kriterijumska varijabla koristio se CIN2+ rezultat koji je označavao obolele i CIN2- promene kao neznačajne (zdrave).

Prediktori i njihove kategorije prikazani u tabeli 29, kao i vrednosti sirovih odnosa šansi za svaki od kategorijalnih prediktora (*odds ratio*). Može se videti da pušenje i koitus pre 16. godine nosi 2.5x veći rizik, a broj seksualnih partnera više od 5 3.5x veći rizik od CIN2+ promena. Neredovne ginekološke kontrole imaju 4.7x veći rizik za CIN 2+. U tabeli su prikazani i sirovi odnosi šansi za dijagnostičke testove koji su ispitivani u ovom radu: Papa ASCUS+ nosi 20x veći rizik, dok visoko suspektan kolposkopski nalaz i *hrHPV+* test imaju 11x veći rizik za CIN2+ promene. Vrednostima homocisteina ≥ 9.35 i vrednost B9 ≤ 19.5 pokazuju skoro 4x veći rizik za CIN2+.

Tabela 29. Spisak prediktora i način kodiranja kategorijalnih prediktora, kao i sirov odnos šansi za svaki od prediktora

Kodiranje kategorijalnih varijabli					
		Frekvencija	Kodiranje parametara		
			OR	95%IP	
Kontracepcija	Ne koristi	73	1	1.13	0.62-2.04
	Koristi	110	0		
Pušenje	Pušač i povremeni pušač	96	1	2.61	1.44-4.74
	Nepušač	87	0		
Koitus	Pre 16. godine	34	1	2.42	1.1 – 5.33
	Posle 16. godine	149	0		
Trudnoće	Da	92	1	1.18	1.01-3.26
	Ne	91	0		
Prekidi trudnoća	Ima	42	1	2.11	1.03-4.29
	Nema	141	0		
Porodaj	Nije imala porodaj	109	1	1.78	0.98-3.25
	Imala porodaj	71	0		
Broj seksualnih partnera	Više od 5	38	1	3.54	1.60-7.83
	Manje od 5	145	0		
Hronične bolesti	Da	12	1	2.07	0.60-7.14
	Ne	171	0		
Malignitet u porodici	Da	56	1	1.34	0.71-2.52
	Ne	127	0		
Redovne ginekološke kontrole	Ne	154	1	4.72	1.82-12.25
	Da	29	0		
Starost u godinama	Kontinuirana varijabla				
BMI	Body mass index	Kontinuirana varijabla			
Kodiranje dijagnostičkih testova					
Papa (Betzda)	PAPA ASCUS+ (1)	119	1	20.36	8.44-49.08
	PAPA NILM- (2)	64	0		
Kolposkopija	Visoko suspektna + (1)	41	1	11.06	4.09-29.88
	Nisko suspektna – (2)	142	0		
HPV 16, 18 ili hrHPV	hrHPV+ (1)	123	1	11.76	5.27-26.24
	hrHPV- (2)	60	0		
Homocistein i B9	Hcs \geq 9.35 i B9 \leq 19.5 + (1)	55	1	3.90	1.95-7.77
	Hcs \geq 9.35 i B9 \leq 19.5 – (2)	128	0		

Napomena: OR – odds ratio, tj. Odnos šansi za CIN2+ nalaz ukoliko je rezultat pozitivan; za boldovane prediktora OR je statistički značajan

4.11.1. Predikcioni modeli

Da bismo odgovorili na radne hipoteze našeg istraživanja, formirali smo dva predikciona modela. Modelovanje se obavilo kroz nekoliko koraka. Na osnovu testiranja značajnosti prediktora, koje je urađeno u prvom poglavlju analize, u kojoj su se gledale razlike između patohistoloških grupa po pojedinačnim faktorima rizika, u logističku regresiju su uneti oni prediktori koji su značajno razlikovali pacijentkinje sa različitim stepenom CIN promena, ali i oni prediktori koji nisu bili značajni (usled malog uzorka pozitivnih rezultata, kao što su na primer prisustvo hroničnih bolesti). Najpre je napravljen model sa svim prediktorima pomoću *enter* metode (kada se unose svi prediktori, bez obzira na to koliko doprinose predviđanju), a onda su se pomoću *backward* metode po Waldu u modelu ostavili oni prediktori koji najviše doprinose klasifikaciji u rizičnu i nerizičnu grupu (CIN2- i CIN2+ grupu).

4.11.1.1. Model 1: Enter metoda binarna logistička regresija

U prvom modelu su uneti svi dijagnostički pokazatelji kao prediktori, a na osnovu testiranja važnosti u prvom poglavlju pomoću hi kvadrat testa ili ANOVE, i to su svi prediktori prikazani u tabeli 30.

Tabela 30. Tačnost predviđanja CIN2+ na osnovu modela Enter metodom binarne logističke regresije

	Rezultat testa	PH nalaz		Procenat tačnosti
		Pozitivan (CIN2+)	Negativan (CIN2-)	
Model	Pozitivan (CIN2+)	78	14	84.8% (PPV)
	Negativan (CIN2-)	24	67	73.6% (NPV)
	Ukupna tačnost			79.2%

Model je u celini statistički značajan: $\chi^2(16)=108.48$, $p<0.001$, pri čemu Nagelgerkeov pseudo R^2 iznosi 0.596, što znači da je ovim modelom objašnjeno približno 60% varijanse kriterijuma. Tabela 30 demonstrira uspešnost klasifikacije CIN2+ pozitivnih i negativnih nalaza na osnovu datog modela. Može se videti da model ima bolju pozitivnu prediktivnu vrednost, odnosno uspešan je u klasifikovanju obolelih u skoro 85% slučajeva, dok je manje uspešan u klasifikovanju onih bez CIN2+ promena (~74%). Ukupna tačnost modela je 79.2%.

Tabela 31. Regresioni koeficijenti, odnos šansi i statistička značajnost prediktora iz modela 1

Prediktor	B	SG	p- vrednost	OR	95% interval poverenja	
Papa ASCUS+	2.23	.57	.000	9.26	3.01	28.53
Kolposkopija (HSIL)	2.55	.69	.000	12.83	3.34	49.26
hrHPV pozitivan	1.63	.56	.004	5.11	1.71	15.28
Homocistein ≥ 9.35 i B9 ≤ 19.50	.25	.50	.619	1.28	.48	3.43
Uzrast	.08	.06	.149	1.09	.97	1.22
BMI	-.03	.07	.688	.97	.85	1.12
Više od 5 partnera (da)	-.86	.61	.157	.43	.13	1.39
Redovne ginekološke kontrole (ne)	.44	.75	.560	1.55	.35	6.81
Porodaj (da)	1.23	1.04	.236	3.41	.45	25.98
Hronične bolesti (da)	1.76	1.20	.142	5.81	.56	60.64
Malignitet u porodici (da)	-.26	.52	.620	.77	.28	2.13
Pušač (da)	-.14	.47	.760	.87	.35	2.17
Koitus pre 16. Godine	1.01	.63	.110	2.76	.80	9.55
Kontracepcija (ne)	.08	.47	.861	1.09	.43	2.74
Trudnoća (da)	-1.33	1.06	.212	.27	.03	2.13
Prekid trudnoće (da)	.40	.75	.594	1.49	.34	6.47

Napomena: B – koeficijent logističke regresije; OR – Odds ratio, tj. Odnos šansi ($\exp(B)$); SG – standardna greška

U tabeli 31 dat je prikaz odnosa šansi, kao i testovi značajnosti za svaki od prediktora. Kao značajni prediktori izdvaja se Papa ASCUS+, visoko suspektan kolposkopski nalaz i pozitivan virusološki test na neki od hrHPV. Ispitanice sa Papa ASCUS+ pozitivnim ima 9 puta više šansi da ima CIN2+ u odnosu na ispitanice sa Papa

NILM rezultatom: OR=9.26 (95%IP: 3.01-28.53), $p<0.001$. Visokosuspektan kolposkopski nalaz ukazuje na to da žena ima 12 puta više šansi da ima CIN2+ promene nego žene koje nemaju taj nalaz: OR=12.83 (95%IP: 3.34-49.26), $p<0.001$, dok pozitivan HPV nalaz na neki od rizičnih tipova daje pet puta veću šansu da će patohistološki nalaz biti pozitivan (CIN2+): OR= 5.11 (95%IP: 1.71-15.28), $p<0.01$.

4.11.1.2. Model 2: Backward metoda binarna logistička regresija

Kako bi se proverilo da li još neki od prediktora doprinosi značajno predviđanju CIN2+ promena, ponovo je urađena binarna logistička regresija, s tim da se koristio *backward* metod (a na osnovu Wald-ovog pokazatelja), u kojem se polazi od modela sa svim prediktorima, a zatim se u svakom narednom koraku pravi model u kojem se isključuju oni prediktori koji ne poboljšavaju prediktivnost modela. Tabela 32 prikazuje rezultate dobijene ovim modelom. Iako se ukupna tačnost predviđanja neznatno povećala (79.8%), može se videti da se PPV povećala za približno 5% i iznosi 90.2%, dok se NPV vrednost umanjila za oko 5% u odnosu na model 1. Međutim, metodološki gledano, drugi model sadrži značajno manji broj prediktora i jednostavniji je u odnosu na model 1 koji sadrži sve prediktore. Kao i prethodni, i ovaj model je u celini statistički značajan: $\chi^2(3)=97.73$, $p<0.001$, a pseudo $R^2=0.552$.

Tabela 32. Tačnost predviđanja CIN2 nalaza na osnovu modela Backward metodom binarna logistička regresija

	Rezultat testa	PH nalaz		Procenat tačnosti
		Pozitivan (CIN2+)	Negativan (CIN2-)	
Model	Pozitivan (CIN2+)	83	9	90.2% (PPV)
	Negativan (CIN2-)	28	63	69.2% (NPV)
	Ukupna tačnost			79.8%

U tabeli 33 prikazani su regresioni koeficijenti, odnos šansi i značajnost modela koji je dobijen na osnovu *backward* metode. Može se videti da je pored Papa ASCUS+ nalaza, te visoko suspektnog kolposkopskog nalaza i prisustva nekog od *hrHPV* tipova, prediktivan i anamnestički podatak koji se odnosi na vreme prvog koitusa. Naime, osobe koje su imale koitus pre 16. godine su pod 3 puta većim rizikom da imaju u kasnijoj dobi CIN2+ promene: OR=3.28 (95% IP: 1.14-9.45), $p < 0.05$. Što se tiče ostalih pokazatelja, prema ovom modelu, u kombinaciji sa ostalim pokazateljima Papa ASCUS+ rezultat nosi 9 puta veći rizik od CIN2+ promena u odnosu na PAPA NILM rezultat. Detektovan visoko suspektni kolposkopski nalaz nosi 8 puta veći rizik za detekcijom CIN2+ promena u odnosu na nisko suspektni kolposkopski nalaz, dok osobe koje su pozitivne na neki od *hrHPV* virusa imaju četiri puta veći rizik za detekciju CIN2+ promena od osoba koje nisu *hrHPV* pozitivne.

Tabela 33. Regresioni koeficijenti, odnos šansi i statistička značajnost prediktora iz modela 2

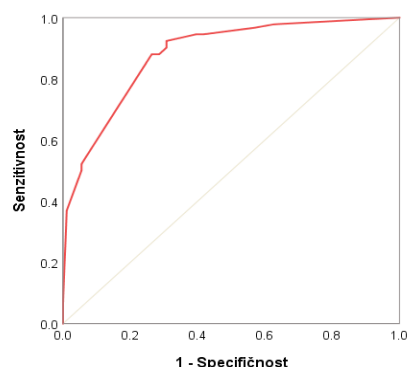
Prediktor	B	SG	p- vrednost	OR	95% interval poverenja	
<i>Intercept</i>	-3.77	.79	.000	.023		
Papa ASCUS+	2.20	.51	.000	9.05	3.37	24.34
Kolposkopija (HSIL)	2.09	.60	.001	8.05	2.48	26.09
<i>hrHPV</i> pozitivan	1.49	.50	.003	4.44	1.67	11.83
Koitus pre 16. godine	1.19	.54	.028	3.28	1.14	9.45

Napomena: B – koeficijent logističke regresije; OR – Odds ratio, tj. Odnos šansi ($\exp(B)$); SG – standardna greška

4.11.1.3. Predviđanje pripadnosti patohistološkoj grupi na osnovu klasifikacionog skora

Na osnovu regresionih koeficijenata (B) iz tabele 33, izračunati su predviđeni skorovi za svaku ispitanicu, prema formuli (pri čemu je vrednost testa 1 ako je pozitivan, a 2 ako je negativan):

$$SKOR = \log(-3.77 + 2.20 * Papa ASCUS+) + 2.09 * Kolpo HSIL + 1.49 * hrHPV + 1.19 * Koitus)$$



Grafikon 14. ROC kriva klasifikacionih skorova i tačnost predviđanja CIN2+ nalaza

Ovi skorovi su potom korišćeni kao zavisna varijabla u ROC analizi, kako bi se odredila dijagnostička valjanost izabranih prediktora i izabranog modela. Na grafikonu 14 prikazana je ROC kriva, a u tabeli 36 je prikazan AUC, kao i statistička značajnost. U tabeli C u prilogu dati su cutt of skorovi za navedeni test. Na osnovu vrednosti verovatnoće ispravno pozitivne klasifikacije i verovatnoće lažno pozitivnih rezultata, odnosno na osnovu razlike ova dva pokazatelja, odabran je *cut-off* klasifikacioni skor 0.39 (*Medijan*=0.38; *Q1*=0.16; *Q3*=0.85), a uspešnost razdvajanja u određenu patohistološku grupu prikazana je u klasifikacionoj tabeli 34.

Tabela 34. Vrednost AUC i statistička značajnost za klasifikacioni skor iz modela 2 logističke regresije

	AUC	SG	Asimptotska značajnost	Asimptotski 95% intervali poverenja
Klasifikacioni skor	0.880	0.025	$p < 0.001$	0.831 – 0.929

Napomena: AUC – površina ispod krive; SG – standardna greška

Na osnovu rezultata koji su prikazani u tabeli 35, vrednost klasifikacionog skora manjeg od 0.39 uspešno klasifikuje CIN3 pozitivne pacijentkinje u 100% slučajeva i CIN2 pozitivne u 76.6% slučajeva. Sa druge strane, skor viši od 0.39 u 80% slučajeva

dobro predviđa odsustvo CIN promena, i u 60% slučajeva prisustvo CIN1 promena. Drugim rečima, određivanjem klasifikacionog skora, poznavajući rezultate Papa test, kolposkopije, te virusoloških nalaza i vreme prvog koitusa, može da se uradi brzi skrining test, pri čemu se u većom meri može osloniti na skorove koji su niži od 0.39, jer sa većom sigurnošću ukazuju na visokorizične patohistološke promene. Međutim, i viši skorovi relativno dobro predviđaju odsustvo CIN promena.

Tabela 35. *Uspešnost klasifikacije patohistoloških rezultata na osnovu cut-off vrednosti klasifikacionog skora dobijenih logističkom regresijom u modelu 2*

Vrednost klasifikacionog skora	Patohistološki nalaz			
	Bez CIN promena (N=61)	CIN 1 (N=30)	CIN 2 (N=47)	CIN 3 (N=45)
Skor>=0.39 (N=78)	49	18	11	0
% od PH grupe	80.2%	60%	23.4%	0%
Skor<0.39 (N=105)	12	12	36	45
% od PH grupe	19.7%	40%	76.6%	100%

4.11.1.4. Utvrđivanje razlike između patohistoloških grupa na osnovu klasifikacionog skora

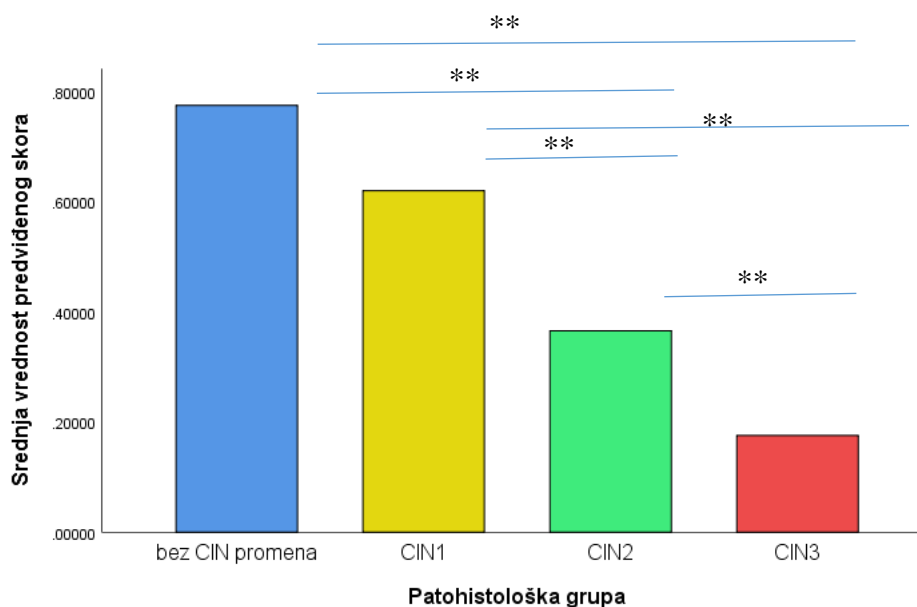
Predviđeni skorovi dobijeni na osnovu regresionih koeficijenata u modelu 2 su zatim korišćeni u analizi varijanse, kako bi se odredilo da li se patohistološke grupe međusobno razlikuju u odnosu na klasifikacioni skor. Cilj je bio da se proveriti da li je CIN 2 grupa sličnija kontrolnoj grupi, ili patološkim CIN2+ grupama.

Tabela 36. *Aritmetičke sredine klasifikacionog skora modela 2 u odnosu na CIN status*

Grupa	N	M	SD	SG	95% interval poverenja	F test	P vrednost
bez CIN promena	61	.78	.26	.03	.71 .84	63.26	<0.001
CIN1	30	.62	.27	.05	.52 .72		
CIN2	47	.37	.26	.04	.29 .44		
CIN3	45	.18	.14	.02	.13 .22		

U tabeli 36 i grafikonu 15 date su aritmetičke sredine klasifikacionog skora, u odnosu na PH grupu i vrednost F testa. Patohistološke grupe se međusobno značajno razlikuju u odnosu na klasifikacioni skor iz modela 2: $F(3, 179)=63.26$, $p<0.001$. Kontrolna grupa ima najviše klasifikacione skorove ($M=.78$; $Medijan=0.88$), zatim grupa sa CIN1 ($M=0.62$; $Medijan=0.73$) promenama, a najmanje skorove imaju ispitanice sa CIN2 ($M=0.37$; $Medijan= 0.38$) i CIN3 promenama ($M=0.18$; $Medijan= 0.07$).

Grafikon 15. Aritmetičke sredine klasifikacionog skora modela 2 iz logističke regresije, u odnosu na patohistološku grupu sa Post Hoc testom značajnosti



Napomena: vodoravne linije i ** označavaju značajne Post Hoc razlike testirane pomoću Dunnett-ovog testa za nejednake varijanse

Post Hoc testom po Dunetu za nejednake varijanse, uporedile su se pojedinačne PH grupe. Razlike između svih grupa su statistički značajne, izuzev između kontrolne grupe i grupe sa CIN1 promenama. Međutim, ako se gleda Post Hoc analiza po Takiju (Tuckey), onda su i ove razlike značajne. S obzirom na to da se već i na osnovu vrednosti aritmetičkih sredina i medijana može videti da distribucije klasifikacionih skorova odstupaju od normalne, urađena je i neparametarska zamena za ANOVU,

odnosno Kruškal-Valisov test, koji je takođe bio statistički značajan: $KW(3)=94.15$, $p<0.001$.

4.12. Da li je opravdano pratiti CIN2 promene?

Da bi se pokušalo odrediti da li je opravdano pratiti CIN 2 promene na osnovu klasifikacionog skora, iz uzorka su izdvojene ispitanice koje su u CIN 2 grupi, ali su prema klasifikacionom skor u grupisane kao „zdrave“, a zatim su se ispitalle karakteristike ovih ispitanica, odnosno, težilo se proveriti da li su karakteristike ovih ispitanica zaista slične onima iz kontrolne grupe ili su sličnije onim ispitanicama sa CIN3 promenama. Značajnost razlika između pojedinih grupa proverena je pomoću z -testa poređenjem razlika u proporcijama između svake od grupa, uz Bonferoni korekciju za višestruka poređenja.

Tabela 37. Poređenje patohistoloških grupa u odnosu na klasifikacioni skor i Papa nalaz

Papa		Bez CIN promena i CIN1		CIN 2		CIN3
		KS>0.39	KS>0.39	KS>0.39	KS<0.39	KS<0.39
pozitivan	frekvencija	10a	24b	4a	36b	45b
	% unutar Papa grupe	8.4%	20.2%	3.4%	30.3%	37.8%
	% unutar CIN grupe	14.9%	100.0%	36.4%	100.0%	100.0%
negativan	frekvencija	57	0	7	0	0
	% unutar Papa grupe	89.1%	0.0%	10.9%	0.0%	0.0%
	% unutar CIN grupe	85.1%	0.0%	63.6%	0.0%	0.0%

Napomena: KS – klasifikacioni skor (ukoliko je manji od 0.39 model je te slučajeve razvrstao kao obolele, a ukoliko je veći od 0.39 model ih je razvrstao kao zdrave); kolone koje su iste boje se statistički ne razlikuju, a kolone različitih boja se statistički razlikuju na nivou $p<0.05$.

Rezultati poređenja prikazani su u tabelama 37, 38 i 39. Tabela 37 prikazuje razlike unutar CIN2 grupe, koja je podeljena dodatno u odnosu na klasifikacioni skor, na CIN-ove koji su imali skor niži od 0.39 (prema modelu 2 klasifikovani kao pozitivni) i CIN-ove koji su imali skor viši od 0.39 (prema modelu 2 klasifikovani kao negativni), a u odnosu na Papa nalaz. Može se videti da je CIN2 grupa ispitanica, koja je imala skorove iznad 0.39 statistički ista kao i kontrolna grupa ispitanica (ispitanice bez CIN promena i sa CIN1 promenama), dok se značajno razlikuje i od CIN2 grupe koja je imala niži skor od 0.39, ali i od CIN3 grupe.

Tabela 38 prikazuje takođe poređenja između CIN2 grupe, koja je dodatno podeljena u odnosu na klasifikacioni skor, u odnosu na prisustvo *hrHPV* virusa. Kao i u prethodnoj analizi, i ovde se zabeležilo da je CIN2 grupa koja je imala skorove više od 0.39 sličnija kontrolnoj grupi (nema značajnih razlika), odnosno da se značajno razlikuje od grupe CIN2 koja ima $KS < 0.39$ i od CIN3 grupe.

Tabela 38. Poređenje patohistoloških grupa u odnosu na klasifikacioni skor i u odnosu na *hrHPV*

<i>hrHPV</i>		Bez CIN promena i CIN1		CIN 2		CIN3
		KS>0.39	KS>0.39	KS>0.39	KS<0.39	KS<0.39
pozitivan	frekvencija	16a	24b	4a	35b	44b
	% unutar <i>hrHPV</i> grupe	13.0%	19.5%	3.3%	28.5%	35.8%
	% unutar CIN grupe	23.9%	100.0%	36.4%	97.2%	97.8%
negativan	frekvencija	51	0	7	1	1
	% unutar <i>hrHPV</i> grupe	85.0%	0.0%	11.7%	1.7%	1.7%
	% unutar CIN grupe	76.1%	0.0%	63.6%	2.8%	2.2%

Napomena: KS – klasifikacioni skor (ukoliko je manji od 0.39 model je te slučajeve razvrstao kao obolele, a ukoliko je veći od 0.39 model ih je razvrstao kao zdrave); kolone koje su iste boje se statistički ne razlikuju, a kolone različitih boja se statistički razlikuju na nivou $p < 0.05$.

Tabela 39 prikazuje raspodelu kolposkopskih nalaza u odnosu na CIN grupe i klasifikacioni skor. Za razliku od prethodne analize, ovde rezultati nisu toliko jednoznačni. Može se videti da je CIN2 grupa sa višim skorom sličnija, ali se statistički ne razlikuje od grupe bez CIN promena i CIN 1 promena, kao ni od CIN2 grupe sa nižim KS skorom. Sa druge strane, CIN2 grupa sa višim skorom se statistički značajno razlikuje od grupe žena sa CIN3 promenama.

Tabela 39. Poređenje patohistoloških grupa u odnosu na klasifikacioni skor i kolposkopski nalaz

kolposkopija		Bez CIN promena i CIN1		CIN 2		CIN3
		KS>0.39	KS>0.39	KS>0.39	KS<0.39	KS<0.39
pozitivan	frekvencija	4a	1a,b	0a,b	10b,c	26c
	% unutar kolposkopije	9.8%	2.4%	0.0%	24.4%	63.4%
	% unutar CIN grupe	6.0%	4.2%	0.0%	27.8%	57.8%
negativan	frekvencija	63	23	11	26	19
	% unutar kolposkopije	44.4%	16.2%	7.7%	18.3%	13.4%
	% unutar CIN grupe	94.0%	95.8%	100.0%	72.2%	42.2%

Napomena: KS – klasifikacioni skor (ukoliko je manji od 0.39 model je te slučajeve razvrstao kao obolele, a ukoliko je veći od 0.39 model ih je razvrstao kao zdrave); ćelije koje imaju ista slova pored frekvencija, označavaju grupe koje se statistički ne razlikuju, a ćelije sa različitim slovima se statistički razlikuju na nivou $p<0.05$.

4.13. Zaključak o dobijenom dijagnostičkom modelu

Na osnovu logističke regresije urađena su dva modela, jedan koji je uključio sve značajne prediktore, i drugi, koji se sastojao samo od prediktora koji značajno doprinose predikciji CIN2+ rezultata. Na osnovu regresionih koeficijenata drugog modela izračunati su klasifikacioni skorovi, a zatim je urađeno testiranje dijagnostičke značajnosti izabranih prediktora. Može se zaključiti da za brzi skrining, mogu da se

koriste rezultati standardna tri ginekološka dijagnostička testa (Papa nalaz, HPV nalaz i kolposkopski nalaz), a od riziko faktora, prediktivan je anamnestički podatak o vremenu prvog koitusa. Na osnovu koeficijenata, i vrednosti rezultata testova može se izračunati klasifikacioni skor. Na osnovu rezultata ove studije kao dijagnostički značajan određen je *cut-off* pomoću ROC analize od 0.39, pri čemu, što je skor niži to je izvesnije da će žena imati CIN2+ nalaz, dok skorovi veći od 0.39 predviđaju manje patološke CIN promene ili njihovo odsustvo. Testiranjem razlika između patohistoloških grupa na osnovu ANOVE, utvrđeno je da se grupe međusobno značajno razlikuju na osnovu vrednosti klasifikacionih skorova, te bi se oni pouzdano mogli koristiti za brzi dijagnostički skrining.

Na osnovu poslednje analize kojom su se poredile pojedinačne CIN grupe u odnosu na klasifikacioni skor i u odnosu na tri glavna neinvazivna dijagnostička testa, može se zaključiti da bi bilo opravdano ispitanice koje imaju skor viši od 0.39 pratiti, s obzirom na to da da samo one ispitanice koje su imale niže skorove od 0.39 su jednoznačno imale najteži oblik CIN promena.

Ipak, da bi se moglo nedvosmisleno tvrditi, potrebno bi bilo sprovesti studiju praćenja.

5. Diskusija

Uprkos napretku u istraživanjima, primarnim i sekundarnim merama prevencije, HPV i dalje ostaje globalno opterećenje i opasnost po zdravlje žena. Nijedna specifična postojeća terapija ne iskorenjuje virus niti se suprotstavlja ili sprečava njegovu perzistenciju, što se smatra evolutivnim uspehom virusa. Poznavanje faktora rizika i uslova perzistencije HPV-a je od suštinskog značaja za razumevanje epidemiologije i prirodne evolucije bolesti kako bi se razvile buduće efikasne intervencije koje imaju za cilj smanjenje incidencije bolesti povezanih sa HPV-om [21].

5.1. Faktori rizika za HPV infekciju

Analizirajući podatke iz anketnih upitnika vezanih za seksualno ponašanje i pojedine ginekološke parametre potvrdili smo poznate faktore rizika vezane za HPV infekciju, njenu perzistenciju i razvoj cervikalnih intraepitelijalnih promena.

Žene koje su imale prvi seksualni odnos u mlađem dobu izložene su većem riziku od dobijanja i perzistiranja hrHPV infekcije zbog postojanja velike površine nezrelog epitela u zoni transformacije [46]. Studije su prijavile dvostruko veći rizik od CIN visokog stepena i raka grlića materice kod žena koje su imale prvi seksualni odnos u ranom dobu u odnosu na one koje su kasnije započele polnu aktivnost [231,232]. U našoj studiji ispitanice koje su dale podatak o prvom koitusu pre 16. godine, imale su 2.5 puta veću šansu da imaju CIN2+ promenu. Kod žena koje su imale seksualni odnos sa 3-5 partnera postoji 8 puta veći rizik od nastanka promena visokog gradusa u odnosu na žene sa jednim partnerom [233]. U našem istraživanju procenat ispitanica sa više od

5 seksualnih partnera bio je daleko veći u grupi sa CIN2 i CIN 3 promenama ($p=0.003$; tabela 6). Logističkom regresijom dobijeno je da postoji 3.5 puta (OR 3.54 95%IP:1.60-7.83; tabela 29) veća šansa za CIN2+promene kod tih ispitanica. Veći broj seksualnih partnera takođe može povećati rizik od inficiranja sa jednim ili više tipova HPV-a tokom vremena [234]. Ispitanice sa najtežim CIN promenama su i najstarije, obzirom da je protok vremena i perzistiranje hrHPV infekcije potreban za razvoj intraepitelijalnih promena, a razlike između patohistoloških grupa su i statistički značajne ($p=0.001$; tabela 5).

Najvažniji faktori identifikovani kao kofaktori karcinogeneze grlića materice kod žena pozitivnih na hrHPV su pušenje, dugotrajna upotreba OC, visoki paritet, imunosupresija, redovnost ginekoloških kontrola [36,39,235,236,237].

Bez obzira na intezitet [65], aktivni pušači imaju veće šanse da budu pozitivni na hrHPV, kao i veću incidencu hrHPV-a i HSIL promena u poređenju sa nepušačima [238,239]. Naša studija potvrdila je ove navode, jer najveći broj pušača upravo je bio najzastupljeniji u grupi sa HSIL promenama (42.6% u CIN 2 grupi i čak 64.4% u CIN 3 grupi) i ove razlike su statistički značajne $p=0.001$. Verovatnoća da ispitanica ima CIN2+ promenu je 2.61 puta veća (OR 2.61; 95%IP:1.44-4.74) ukoliko je aktivan pušač.

Podaci o oralnoj kontracepciji kao faktoru rizika su nekonzistentni, neke studije dokazale su takvu tvrdnju, dok ostale nisu potvrdile. Analizirajući naše podatke vezane za metode kontracepcije, nismo dobili statističke značajne rezultate među grupama. Ono što smo uočili je da se u svim grupama kontracepcija u podjednakom procentu ne koristi (blizu 40%), kao i da je najčešći oblik kontracepcije prezervativ, a učešće oralnih kontraceptivnih pilula ne dostiže 5% procenata ni u jednoj grupi, što odražava stavove o kontracepciji u našoj zemlji [240].

Smatra se da su veći broj trudnoća i porođaja faktor rizika za HPV infekciju i njenu perzistenciju, jer zbog povišenih vrednosti hormona, zona transformacije na egzocerviksu održava se znatno duže, te je i verovatnoća zaražavanja HPV virusom i perzistencije veća [56,58]. U našoj studiji ispitanice u CIN3 grupi u odnosu na druge, imale su značajno veći broj trudnoća ($p=0.03$) i broj porođaja ($p=0.001$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Imunosupresija indukuje karcinogenezu HPV virusa, slabeći imunitet, međutim naše ispitanice su u reproduktivnim godinama, bez značajnijih komorbiditeta, te se ovaj faktor rizika nije pokazao kao značajan.

Perzistentna infekcija hrHPV je preduslov za rak grlića materice i njegove prekursorske lezije [241]. Među svim tipovima hr-HPV, HPV16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 su odgovorni za 91% karcinoma grlića materice, pri čemu se 70% svih slučajeva pripisuje HPV-16 ili 18 [242]. Prospektivne studije su otkrile da prevalenca HPV-a uključuje mešavinu incidentnih i perzistentnih infekcija koje su se akumulirale tokom vremena zbog njihovog neuklanjanja [243]. Prisustvo hrHPV virusa kod naših ispitanica detektovano je kod 67.2% pacijentkinje, od čega je najčešći nalaz bio infekcija sa ostalim hrHPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) u 43.2%, a najprisutniji i ujedno i najonkogeniji HPV 16 registrovan je kod 27.3% ispitanica, dok je HPV 18 detektovan u 11.5%. Ono što je značajno jeste da je HPV 16 registrovan u preko 80% slučajeva sa CIN2+ promenama. Ovo je u korelaciji sa nedavnim istraživanjem o prevalenciji HPV tipova na teritoriji Vojvodine, gde je najčešće izolovan genotip HPV-a, HPV16 i to u 38.3% uzorka, potom HPV 31 (17%), HPV33 i HPV51 su bili zastupljeni u istom procentu od 8.8%, dok je HPV 18 detektovan u 3.6% slučajeva [245].

5.2 Papa bris

Adekvatno uspostavljeni populacioni skrining programi doveli su do značajnog smanjenja incidencije i smrtnosti od raka grlića materice [6,114]. U našoj zemlji, skrining raka grlića materice sprovodi se pomoću Papa brisa. U upitniku koje su ispitanice popunjavale, pitanje redovnosti odlazaka kod ginekologa, smatrali smo kao proveru skrininga jer se on u našoj zemlji još uvek zasniva na oportunitetu. Očekivano, ispitanice sa najtežim promenama, imale su i najmanji procenat ginekoloških kontrola i uzimanje Papa testa odnosno skrininga, svega 60% ($p=0.001$). Podaci naše studije pokazuju čak 4.7x veću šansu da pacijentkinje ima CIN2 promenu ukoliko ne kontrolišu Papa bris.

Smatra se da je jedan od nedostataka citološkog skrininga grlića materice relativno niska osetljivost jednog Papa testa, iako je longitudinalna osetljivost ponovljene citologije veća. U analizi 10 studija senzitivnost ponovljene citologije iznosila je 82%, a specifičnost 58% [129]. U literaturi, osetljivost i specifičnost Papa testa pokazuje široku distribuciju. Smatra se da je ovo povezano sa grupom pacijenata u populaciji koja se ispituje, brojem slučajeva, različitim karakteristikama ili nedostacima koji se pojavljuju kod svake faze citološkog pregleda. U sistematskom pregledu sa preko 60.000 učesnica iz 16 studija, procenjena je konvencionalna citologija za otkrivanje CIN 2+. Osetljivost se kretala od 43% do 96% (ukupno 65.9% (95% CI 54.9-75.3)) za ishod CIN 2+, a specifičnost od 86% do 98% (ukupno 96.3% (95% CI 94.7-97.4)) za CIN 2+ [120]. U našoj studiji Papa bris pokazao je izuzetno visoku senzitivnost od čak 92%, dok je specifičnost iznosila 63% u detekciji CIN2+ promena (tabela 18). Razlozi ovako visoke senzitivnosti verovatno su zbog samog ispitivanog uzorka i koncepta studije, jer je veća šansa detekcija CIN lezija visokog

stepena u tercijarnim referentnim ustanovama, a ispitanice su upućivane u našu ustanovu sa već ponovljenim Papa brisevima, čija je osetljivost po pravilu veća. Takođe, svaka pločica Papa brisa u našoj studiji je višestruko pregledana, prvo od strane specijalizanata koji su bili na obuci, te su nakon toga revidirane od patologa sa više od pet godina iskustva. Od svih ispitivanih dijagnostičkih testova, Papa bris (ASCUS+) pokazao je najveću tačnost u otkrivanju CIN2+ promena (78%), što je vizuelno pokazano i ROC krivom gde je AUC 0.775 (95%CI:0.75-0.845; $p<0.000$; tabela 20). Papa bris kao dijagnostički test imao je najveću NPV(0.89), obzirom da nijedna ispitanica sa CIN3 promenama nije imala uredan (NILM) citološki nalaz. I u analizi logističke regresije Papa bris se pokazao kao najjači prediktor. Ispitanice sa Papa ASCUS+ imale su 9 puta više šansi da imaju CIN2+ u odnosu na ispitanice sa Papa NILM rezultatom: OR=9.26 (95%IP: 3.01-28.53, $p<0.001$;tabela 30). Rezultati studije velike meta-analize pokazali su da je stopa pozitivnosti na hrHPV 43% za žene sa ASCUS-om i 76% kod žena sa LSIL-om [104]. I naši podaci su uočili statistički značajnu ($p<0.001$) pozitivnu korelaciju (0.561) između Papa brisa i HPV nalaza (grafikon 11). Naime, ukoliko je pozitivan Papa bris (ASCUS+), postoji 5x veća šansa (OR=5.25; 95%IP:2.589-10.66; $p<.001$; tabela 25) da je i HPV test pozitivan.

5.3. hrHPV PCR test

HPV testiranje ima veću osetljivost u otkrivanju histoloških CIN2+ promena nego citološko [246,247], a primarni skrining grlića materice putem HPV testiranja se preporučuje u Evropi [130,248,249,250]. Visoka osetljivost PCR testiranja HPV je veoma važna jer smanjuje lažno negativne rezultate, dok njegova niža specifičnost može uticati na troškove zbog upućivanja velikog broja žena sa lažno pozitivnim

rezultatima na kolposkopiju [251] i nepotrebnom psihološkom morbiditetu [252]. Broj upućivanja na kolposkopiju može se smanjiti citološkom trijažom HPV-pozitivnih rezultata ili refleksnim testiranjem na HPV16 ili 18 [253,254,255,256,257]. Analizom naših podataka senzitivnost HPV testa kod nalaza ASCUS bila je 90% za predviđanje CIN2+ promena, dok je specifičnost iznosila 56%. Ovo je u skladu sa podacima iz 39 studija gde je ukupna senzitivnost HPV testa kod nalaza ASCUS bila 90.4% (95% CI:88.1-92.4%), a specifičnost 58.3% (95% CI:53.6-62.9%) za detekciju CIN 2+ [129]. U Kokranovom sistematskom pregledu bilo je šest studija koje su procenjivale PCR za 13 hrHPV za otkrivanje CIN 2+ sa ukupno 16.343 učesnika. Osetljivost testova se kretala od 75% do 100%, specifičnosti od 85% do 97% [120]. Tri studije su upoređivale konvencionalnu citologiju (ASCUS+) sa PCR-om za detekciju CIN 2+, gde je relativna osetljivost PCR (više od 12 tipova) u odnosu na konvencionalnu citologiju za CIN 2+ bila 1.37 (95% CI:0.58-3.21), a relativna specifičnost 0.95 (95%CI:0.76-1.19). Korejska studija u tercijarnoj ustanovi koja je analizirala Papa bris i HPV test publikovala je podatke slične našim. Senzitivnost i specifičnost Papa brisa iznosila je 97.14% i 85.58%, dok je za HPV test iznosila 88.32% i 54.92% [258].

Razlog niske specifičnosti HPV testa u našoj studiji verovatno je starost naših ispitanica, jer je većina bila mlađa od 30 godina ($M=28.79\pm 5.35$). Genotipizacijom HPV16 i HPV18 specifičnost se povećala na 86% (tabela 18). Visoku NPV pokazao je hrHPV test (0.85), jer je svega jedna ispitanica sa negativnim hrHPV nalazom imala CIN3 promenu. ROC analizom, dobijene su AUC vrednosti za hrHPV i HPV16/18 koje su statistički značajne ($p<0.001$), te HPV test predstavlja dobar dijagnostički parametar. Ispitanice pozitivne na neki od hrHPV virusa imale su četiri puta veći rizik za detekciju CIN2+ promena (OR:4.44; 95%IP:1.67-11.18; $p=0.003$; tabela 33).

5.4 Kolposkopija

Iako zbog niske specifičnosti i visoke cene nije skrining metoda, kolposkopija se u našoj zemlji koristi kao bazična metoda u ranoj dijagnostici raka grlića materice, jer je veliki broj ginekologa u toku specijalizacije obučeni da kvalitetno uradi kolposkopiju [83]. Tačnost kolposkopije u dijagnostici patologije grlića materice ima široke varijacije među kolposkopičarima u zavisnosti od iskustva, grupe pacijenata i kliničkih uslova, a utvrđeno je da su starost žena, menopauzalni status i zona transformacije tip 3 povezane sa dijagnostičkim propustima kolposkopski usmerenih biopsija [141,144,152,259].

Kolposkopija se pokazala kao dobar dijagnostički test i ukoliko se ne vizualizuju visoko suspektne kolposkopske promene na grliću, vrlo verovatno je da ne postoje HSIL promene. Na osnovu naših podataka, senzitivnost kolposkopije bila je niska i iznosila svega 39%, dok je specifičnost visoka 95% (tabela 18). Objašnjenje za nižu osetljivost za dijagnozu histoloških lezija CIN 2+ može biti zbog nedostatka kursa za osveženje znanja ili opadanje veštine kolposkopičara tokom godina. Verovatnije je da je u pitanju pristrasnost, jer je lekar znao rezultate Papa brisa pre kolposkopskog pregleda. U sistematskom pregledu i meta analizi trideset i dva rada koji obuhvataju 7873 uparenih nalaza biopsije/definitivne histologije, objedinjena osetljivost kolposkopski usmerene biopsije za dijagnozu CIN 2+ bila je 91.3% (95% CI:85.3–94.9%), a specifičnost 24.6% (95% CI:16.0–35.9%) [152]. Autori su zaključili da visoka osetljivost i niska specifičnost mogu biti rezultat pristrasnosti verifikacije, a visoka osetljivost je verovatno lažni nalaz jer je većina studija ograničena na eksciziju uglavnom na žene sa pozitivnom biopsijom. Sa najvećom PPV od 0.88, od sva tri dijagnostička testa, ukoliko se opaze visoko suspektne kolposkopske promene na

grliču, postoji 8x veći rizik za CIN2+ promene OR:8.05 (95%IP:2.48-26.09; p=0.001, tabela 33).

5.5. Jednokarbonski parametri

Zbog ograničenih nehirurških opcija za eradikaciju utvrđene HPV infekcije u cervikalnom tkivu, identifikacija bilo kog reverzibilnog kofaktora (kao što je nutritivni nedostatak) koji može modulirati ekspresiju HPV-a vredan je proučavanja [260]. Smanjene vrednosti folata i vitamina B12 mogu biti kofaktor za HPV-indukovane prekancerozne promene i karcinome [261] zbog njihove ključne uloge u sintezi, popravci i metilaciji DNK. Folati učestvuju u sintezi nukleotida, i kada su nivoi ovog mikronutrijenta niski, integritet genetskog materijala je kompromitovan, što dovodi do nestabilnosti DNK i oštećenja hromozoma, uglavnom zbog promena u pulu nukleotida i inkorporacije uracila. Molekularni efekti iscrpljivanja folata dovode do povećanog oštećenja DNK bez popravke što doprinosi poremećenom rastu ćelija, i razvoju tumora [262,263]. Nizak nivo folata i vitamina B12 u telu dovodi do povećavanja vrednosti homocisteina, te onemogućavanje DNK procesa metilacije i narušavanja normalne transkripcije i ekspresije DNK, što utiče na progresiju CIN, a rizik od karcinoma se povećava [264].

5.5.1. Folati i hrHPV

U kontekstu statusa folata i raka grlića materice izazvanog hrHPV, dokazi sugerišu da uloga folata u metilaciji DNK može biti važna za ekspresiju HPV gena kod domaćina ćelije. Mesto hromozoma osetljivo na nedostatak folata poklapa se sa mestom

integracije HPV-16 kod primarnih karcinoma grlića materice [265,266,267] i tri od četiri mesta na kojima HPV-18 integriše svoju DNK u domaćina [268], što ukazuje na verodostojan mehanizam kroz koji bi suboptimalni nivoi folata mogli da povećaju verovatnoću integracije ovih HPV genotipova [269]. Životinjski modeli potvrđuju da nedostatak folata u ishrani može duboko uticati i modulirati događaje koji dovode do HPV16-indukovane karcinogeneze i olakšavaju integraciju hrHPV genetskog materijala u DNK domaćina [270]. Veće koncentracije folata u cirkulaciji povezane su sa manjom verovatnoćom inficiranja hrHPV, perzistiranja hrHPV ukoliko dođe do infekcije, kao i veće verovatnoće uklanjanja hrHPV infekcije [266,271]. 2004. godine sprovedena je studija na kohorti od 345 žena koje su bile u riziku od progresije CIN-a, da bi se istražila povezanost između statusa folata i infekcije hrHPV [271]. Posle 24 meseca, i merenja statusa folata i najmanje tri uzastopna rezultata HPV testa, otkrili su da žene sa visokim statusom folata pokazuju negativan rezultat za hrHPV test (OR=2.50, 95% CI=1.18-5.30, p=0.02). Zatim, da bi saznali da li vrednosti cirkulišućeg folata utiču na rizik od CIN2+ među ženama sa hrHPV, sprovedeno je još jedno istraživanje na istoj populaciji. Žene sa nižim nivoom folata i HPV 16+ imale su 9 puta veću verovatnoću da imaju CIN 2+, što snažno ukazuje na specifičan efekat folata na HPV 16, najučestaliji i najkancerogeniji tip HPV-a [271]. U našoj studiji ispitanice sa niskim vrednostima folata i hrHPV+ rezultatom imale su 5 puta veću šansu da imaju CIN2+ promene. Bitno je napomenuti, da u ovom predikcionom modelu, koji iako je statistički značajan (p<0.01, tabela 28), do izražaja je došla prediktivnost hrHPV pozitivnog nalaza u odnosu na vrednosti folata. Na uzorcima biopsije normalnog grlića materice, CIN promena i karcinoma grlića materice pronađeno je da nizak status folata modulira rizik od HPV infekcije i raka grlića materice [262]. Pored toga, još jedna studija takođe je pokazala da je status folata bio značajno niži kod žena sa hrHPV

infekcijama od onih bez infekcije [266]. Iako su vrednosti folata evidentno bile niže kod ispitanica sa HPV infekcijom, analizom naših podataka nije dobijena statistički značajna razlika, te smo zaključili smo da vrednosti vitB9 nisu prediktivan pokazatelj hrHPV infekcije. Moguće da je ovaj pokazatelj osetljiv na veličinu uzorka jer se u ostalim istraživanjima, uglavnom pominju veći uzorci.

5.5.2.Folati i CIN

U velikoj populacionoj studiji, utvrđena je inverzna linearna relacija između povećanih koncentracija folata u serumu i rizik od CIN2+ [272]. Najveći rizik za CIN2+ pronađen je među ženama sa hrHPV infekcijom i ženama sa najnižom koncentracijom serumskih folata, dok značajna interakcija nije pronađena za CIN1. Ovi rezultati sugerišu da su vrednosti serumskog folata obrnuto povezani sa rizikom od CIN-a višeg stepena bilo sa ili bez hrHPV. U našim rezultatima značajna negativna korelacija zabeležena je između težine PH promena i nivoa vitamina B9, tako da viši nivo PH promene korelira sa nižim nivoom vitamina B9 ($p < 0.05$, grafikon 11). Uloga folata u karcinogenezi grlića materice ostaje nerazjašnjena, ali dokazi iz epidemioloških studija ukazuje na zaštitni efekat folata [273]. Nekoliko *case-control* studija [274,275] pokazale su da su žene sa nedostatkom mikronutrijenata, uključujući i folat, imaju značajno povećan rizik od lezija grlića materice. S druge strane, postoje studije koje ne povezuju vrednosti folata i rak grlića materice [276,277]. U studiji prikupljeni su uzorci seruma u 330 slučajeva u različitim fazama CIN i raka grlića materice, kao i 555 kontrolnih sa normalnom citologijom grlića materice i primećeno je da nema razlike u koncentraciji folata između grupa, što ukazuje da koncentracije folata i stadijumi neoplazije grlića materice nisu u korelaciji [278]. Slično, u *nested-case* kontrolnoj

studiji, status folata u serumu nije povezan sa incidencijom raka grlića materice [225]. Interesantno, naša studija nije pokazala da su visoke vrednosti folata nužno protektivni faktor za patohistološke promene, obzirom da kontrolna grupa koja je bila bez CIN promena nije imala i najviše vrednosti ovog vitamina. Dosledno sa prethodnim studijama koje su utvrdile da su povišeni nivoi folata obrnuto povezani sa rizikom od CIN-a ili raka grlića materice [279,280], naša studija je takođe pokazala da nizak nivo vit B9 korespondira sa najtežim, CIN3 promenama ($p < 0.05$; tabela 14).

5.5.3. Folati i Papa bris

Nizak nivo folata primećen je među ženama sa abnormalnom citologijom visokog stepena ili rakom grlića materice u SAD, Turskoj, Indiji i Kini [281,282,283] i dve meta-analize potkrepljuju ove rezultate [284,285]. I u našim rezultatima postoji statistički značajna korelacija ($p < 0.01$; grafikon 11) između citološkog nalaza i vrednosti folata. Naime, obzirom da je u pitanju negativna korelacija, veći stepen citološke abnormalnosti korelira sa najnižim vrednostima vit B9. Nasuprot našim rezultatima, povišeni nivoi folata primećeni su kod žena sa citopatološkim abnormalnostima u studiji sprovedenoj u Brazilu [286].

5.5.4. Folati i hipometilacija

Značajna povezanost između folatnog statusa i hipometilacija DNK prijavljeni su kod 376 žena sa dijagnozom CIN [287]. Međutim, u opservacionim studijama koje su izvestile o globalnoj hipometilaciji DNK i povećanom riziku raka grlića materice [288], povezanost sa niskim unosom folata ili koncentracijom u krvi nije bila evidentna.

Razlog ovakvih rezultata može biti što studije o unosu folata često ne prave razliku između prirodnih folata i folne kiseline i mogu biti podložne drugim “zbunjujućim” faktorima. Neki od suprotstavljenih rezultata mogu biti posledica netačne procena nedostatka folata. Veza između folata i rizika od CIN-a ili raka grlića materice takođe može biti modulirana drugim faktorima ishrane, kao i genetskim polimorfizmom, što mnoge studije ne uzimaju u obzir [289]. Iako je nivo folata u serumu optimalan biomarker za procenu nivoa folata kod ljudi u telu, možda ne predstavlja najtačnije i nivo folata u ćelijama grlića materice [290]. Takođe, koncentracija folata u serumu ukazuje na nedavni unos ishranom. Nivo folata u eritrocitima može biti bolji marker jer odražava duži vremenski period, ali verovatno ne obezbeđuje najtačnije informacije o statusu folata u ćelijama grlića materice [291]. Spoljni faktori kao što su starost, genetska i epigenetska pozadina, unos alkohola, korišćenje određenih lekova i komorbiditeti mogu uticati na vrednosti folata [292,293]. Studije su pokazale da polimorfizam gena koji kodira enzim MTHFR, proizvodi enzim sa nižim kapacitetom obrade folate, te se kod tih osoba registruju niže vrednosti folata i sledstveno dolazi do povećanja vrednosti homocisteina. Međutim, objedinjeni podaci sistematskog pregleda i meta analize, ukazuju da polimorfizam MTHFR, gde dolazi do supstitucije baze citozina u timin (C677T), nije značajno povezan sa povećanim rizikom od raka grlića materice [294,295].

5.5.5 Vitamin B12 u karcinogenezi

Niski nivoi vitamina B12, kao važnog kofaktora u reakcijama metilacije, mogu dovesti do globalne hipometilacije DNK, što dovodi do aktivacije protoonkogena i do utišavanja gena supresora tumora, događaja koji se dešavaju u neoplastičnim

ćelijama grlića materice. Vitamin B12 je blisko povezan sa metabolizmom folata, a kada je nivo vitamina B12 nizak, folat je akumuliran kao 5-metilTHF, što rezultira funkcionalnim nedostatkom drugih neophodnih ćelijskih oblika folata [296]. I folat i vitamin B12, održavajući genomsku stabilnost, mogu sprečiti integraciju HPV-a u genom ćelija grlića materice [297]. Ovo je rani događaj u karcinogenezi povezanoj sa HPV-om i ključni korak ka malignoj progresiji, koji doprinosi narušavanju postojeće ravnoteže u interakciji domaćin-virus tokom latencije [298]. Deficit folne kiseline i vitamina B12 predisponira fragmentaciju genoma [209] i indukuje lomove unutar osetljivih mesta, koja su ista mesta za integraciju HPV16 [299].

Smanjena imunokompetencija povezana sa nedostatkom folata i vitamina B12 [300,301,302] povećava rizik od infekcije i perzistenciju više tipova ili omogućava veće virusno opterećenje hrHPV-a. Pokazalo se da je natprosečan unos folata i vitamina B12 povezan sa smanjenom stopom oštećenja genoma [303]. Smanjeno oštećenje DNK povezano sa višim statusom folata i vitamina B12 najverovatnije smanjuje integraciju HPV-a u ljudski genom, omogućavajući HPV-u da ostanu kao epizomalni. hrHPV pozitivne žene koje imaju visoke koncentracije folata ili vitamina B12 u serumu retko imaju dijagnozu CIN2 [304]. Nivoi vitamina B12 i folata u serumu kod ASCUS HPV+ pacijenata su značajno niži nego kod ASCUS HPV- pacijenata [305]. Štaviše, viši nivoi folata i vitamina B12 su u obrnutoj korelaciji sa pozitivnim nalazom hrHPV. Pacijentkinje sa višim vrednostima folata i vitamina B12 imaju 73% manje šanse da postanu pozitivni na hrHPV tipove i veća je verovatnoća da će biti negativni [306]. Naši podaci pokazuju da su ispitanice sa pozitivnim hrHPV testom imale niže vrednosti vitB12, ali te razlike nisu statistički značajne (tabela 15). Studije su primetile niže nivoe serumskog vitamina B12 kod žena sa abnormalnim citologijom [279,281,282,307,308], ali naši rezultati nisu pokazali značajnu korelaciju između vrednosti vitB12 i Papa brisa

(grafikon 11). U meta-analizi na 10.073 žena, autori su zaključili da se povišen unos ili nivo seruma vitamin B12 smatra zaštitnim faktorom za preneoplastične lezije grlića materice [285]. Ovo je u skladu i sa našom studijom, jer su najviše vrednosti vitamina B12 upravo i zabeležene u kontrolnoj grupi, kod ispitanica bez CIN promena. Iako postoji statistički značajna razlika između grupe sa CIN 3 promenama i kontrolne grupe ($p < 0.05$, grafikon 10), u odnosu na druge ispitivane grupe, nivo vitB12 nije nam se pokazao kao relevantan parameter za diferenciranje PH promena, jer njegove vrednosti ne koreliraju pravilno sa težinom promena. Brazilska studija na 950 žena, koja je procenjivala vezu između vitB12 i raka grlića materice, nije uočila značajne razlike među kontrolnim i ispitivanim grupama [286]. Studije sprovedene u SAD takođe nisu otkrile povezanost između vitamina B12 i raka grlića materice [271,277]. ROC analizom potvrdili smo da vrednosti vitB12 loše razlikuju obolele od zdravih, obzirom da skoro u potpunosti prate referentnu liniju (AUC:0.513 $p=0.756$; 95%IP:0.429-0.598; grafikon 13).

5.5.6. Homocistein i HPV infekcija

Žene sa CIN promenama imaju više vrednosti homocisteina u serumu od kontrolne grupe, i što je cervikalna displazija ozbiljnija, to se povećava nivo homocisteina u serumu, posebno u prisustvu HPV-a [281,309]. Naši podaci doveli su do istog zaključka, postoje statistički značajne razlike u nivou homocisteina u odnosu na HPV status ukoliko se porede kontrolna, CIN1(LSIL) i CIN2+(HSIL) grupa ($p < 0.01$; tabela 15). Takođe, ispitanice koje su bile HPV16+ imale su statistički značajno viši nivo homocisteina u odnosu na HPV16- negativne ($p < 0.01$; tabela 16), a značajna razlika zabeležena je i u nivou homocisteina spram prisustva CIN promena.

Ukoliko su vrednosti homocisteina $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ (cut-off vrednost u našoj studiji), postoji 2x veća šansa HPV16 ili HPV18 pozitivnog rezultata. U studiji *Kwasniewska i saradnika* uočeno je da su vrednosti homocisteina značajno veće kod HPV pozitivnih pacijenata sa CIN3 promenama [310]. Na osnovu podataka iz naše studije, izračunali smo da ispitanice sa vrednostima homocisteina iznad $7.80 \mu\text{mol/l}$ (vrednosti medijane u kontrolnoj grupi) i negativnim HPV nalazom imaju 4 puta veće šanse (OR:4.17;95%IP:1.28-13.56; tabela 27) da imaju CIN2+ promene, dok sa HPV pozitivnim testom ta šansa je čak 9 puta veća (OR:9.4; 95%IP:2.93-30.20; tabela 27).

5.5.7. Homocistein i CIN promene

Kliničko-epidemiološke studije u različitim zemljama pokazale su značajnu povezanost između povišenih vrednosti homocisteina sa prekanceroznim promenama i karcinomom grlića materice [273,310,311,312,313,314,315]. Thomson i saradnici čak predlažu vrednost homocisteina kao faktor rizika za displaziju grlića materice [314]. Utvrđen je pozitivan trend povećanja odnosa šansi za prekancerozu grlića materice sa povećanjem vrednosti homocisteina [314]. U našoj studiji, statistički značajno viši nivo vrednosti homocisteina imale su upravo ispitanice sa CIN 3 promenama u odnosu na grupu koja nije imala CIN promene ($p < 0.001$; grafikon 8), što pokazuje da su visoke vrednosti homocisteina indikativne za visoko stepen patoloških promena na grliću materice. Takođe, zabeležena je značajna pozitivna korelacija (0.321; $p < 0.001$) između težine PH promena i nivoa homocisteina (grafikon 11). Prosečne vrednosti homocisteina u grupi ispitanica bez CIN promena bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti u grupi ispitanica sa CIN promenama ($p < 0.001$; tabela 13). U odnosu na vitB9 i vitB12, vrednosti homocisteina najbolje diskriminišu CIN2+

promene (AUC 0.626; $p < 0.01$; grafikon 13). Na osnovu ROC analize, predložena cut off vrednost homocisteina iznosi 9.35 $\mu\text{mol/l}$ i predstavlja dovoljno dobar dijagnostički pokazatelj (AUC:0.618; $p < 0.01$) u detekciji CIN2+promena. Studija *Sedjo i saradnika* nije podržala ulogu homocisteina u prekanceroznim promenama grlića materice, ali veličina uzorka bila je mala što ograničava snagu studije [277].

Iako potvrđeno studijama, među kojima je i naša, da se povišene vrednosti homocisteina mogu koristiti kao marker preinvazivnih promena visokog stepena, homocistein nije specifičan za promene na grliću materice. Visoke vrednosti homocisteina takođe se javljaju kod karcinoma drugih organa, predstavljaju faktor rizika za aterosklerozu, kardiovaskularne bolesti, moždani udar, dijabetes, osteoporozu, demenciju, Alchajmerovu bolest [316].

5.5.8. Homocistein i ostali ispitivani dijagnostički parametri

Postoji visoko značajna pozitivna korelacija između Papa brisa i vrednosti homocisteina (0.269; $p < .001$, grafikon 11), što ukazuje da sa većim stepenom citoloških abnormalnosti, možemo očekivati i veće vrednosti homocisteina. Prediktivni model, gde smo pored pozitivnog Papa nalaza uključili i homocistein, pokazao je da povećanje vrednosti homocisteina za jedan, povećava verovatnoću da pacijentkinja ima HPV pozitivan rezultat za 20% ($1-OR * 100$).

Folat deluje kao kofaktor za metionin sintazu, te su nivoi homocisteina u obrnutoj korelaciji sa vrednostima vitamina B9 i B12. Homocistein, koji se proizvodi tokom metabolizma metionina, povezan je sa povećanim rizikom od raka grlića materice kao marker niskog nivoa folata i B12 i predstavlja prilično osetljiv pokazatelj folatnog metaboličkog statusa [316]. U našoj studiji postoji značajna negativna

korelacija između vrednosti homocisteina i folata (-0.402; $p < 0.001$), dok za vrednosti vitB12 i homocisteina nije uočena statistički značajna korelacija. Istraživanja su pokazala da niži serumski folat i viši nivoi homocisteina mogu povećati osetljivost na rak grlića materice kod žena [310,315,317]. Na osnovu cut-off vrednosti iz naše studije, udružene vrednosti homocisteina $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ i vrednosti vit B9 $\leq 19.5 \text{nmol/L}$ imaju skoro četiri puta veći rizik za CIN2+ promene. (OR:3.90; 95%IP:1.95-7.77; tabela 29).

5.5.9. Fortifikacija/Suplementacija

Nalazi studije preseka u Sjedinjenim Državama ukazuju da u populacijama izloženim većim koncentracijama folata kao rezultat programa fortifikacije hrane, žene sa adekvatnim statusom vitamina B12 imaju najviše koristi od višeg folatnog statusa u poređenju sa ženama sa nižim/nedovoljnim koncentracijama oba mikronutrijenta u cirkulaciji [307]. Studija je pokazala da su veće vrednosti cirkulišućeg folata u eri postfortifikacije povezane sa smanjenim rizikom od CIN-a [307]. Ova povezanost je održana i nakon kontrole drugih mikronutrijenata i drugih poznatih faktora rizika za cervikalni karcinom, što sugeriše pozitivnu ulogu folata i vitamina B12 u ranoj karcinogenezi grlića materice. I druge studije su pokazale smanjen rizik od preneoplastičnih lezija grlića materice kod žena sa visokim serumskim vrednostima folatom ili unosom folata u ishrani [317,318,319,320]. Povećan unos hrane ili suplemenata koji sadrže vitamin B grupe mogu značajno smanjiti nivo homocisteina [321,322]. Vitamini B9 i B12 igraju ključnu ulogu u smanjenju vrednosti homocisteina, recikliranjem homocisteina u metionin. U studiji Butterworth i saradnika, kod žena koje su imale CIN promene davani su suplementi folne kiseline ili placebo dnevno tokom 3 meseca [280]. Otkrili su da je cervikalna citologija žena koje su uzimale folnu kiselinu

bolja od placebo grupe ($p < 0.05$); i naknadno zaključili da je težina CIN-a smanjena sa unosom folata. Sve ove studije preporučuju suplementaciju folata pacijentkinjama sa prekanceroznim promenama uzrokovane HPV infekcijom [271,323]. Nasuprot ovome, postoje studije koje nisu potvrdile regresiju HSIL promena suplementacije folatima [317,320,324,325].

S obzirom na to da HPV infekcija korelira sa niskim nivoima vitamina B12 i folata u serumu i visokim vrednostima homocisteina, praćenje njihovog nivoa kod pacijenata sa lezijama grlića materice moglo bi pomoći da se identifikuje perzistentna HPV infekcija. Iako analizirajući naše podatke nismo uspeli da dobijemo diskriminativnu cut off vrednost vit B12 u predikciji HPV infekcije i CIN promena, ono što je značajno u našoj studiji su da su najviše vrednosti ovog vitamina zabeležene upravo u kontrolnoj grupi ($p < 0.05$; grafikon 10). Sa druge strane, na osnovu ROC analize naših podataka izdvojile su se vrednosti $\text{vitB9} \leq 19.50 \text{ nmol/L}$ i $\text{homocisteina} \geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ koje ukoliko se detektuju zajedno povećavaju šansu za CIN2+ promene skoro 4 puta. Na ovim pretpostavkama i dobijenim cut off vrednostima jednokarbonskih parametara, suplementacija vitaminom B12 i folnom kiselinom mogla bi biti validna strategija za suzbijanje integracije HPV u genoma i, posledično, perzistencije HPV infekcije kod naših pacijentkinja.

5.6. Predikcioni model

Kao pojedinačni prediktor pokazali su statističku značajnost, međutom cut off vrednosti jednokarbonskih parametara ($\text{Hom} \geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ & $\text{vitB9} \leq 19.50 \text{ nmol/L}$), nakon analize binarne logističke regresije nisu ušle u predikcioni model predviđanja CIN2+ promena. Razlog ovome je što analiza uključuje samo prediktore koji značajno

poboljšavaju prediktivnost modela, a na osnovu rezultata našeg istraživanja to su neinvazivni dijagnostički testovi (Papa bris, HPV test i kolposkopija) i anamnestički podatak koitusa pre 16 godine. Ovako formiran predikcioni model sa svega četiri prediktora je jednostavan i može nam poslužiti kao brz dijagnostički skrining obzirom da je u celini statistički značajan ($p < 0.001$) i ima procenat tačnosti od 90% u predviđanju CIN2+ promena (tabela 32). Prema ovom modelu, ispitanica koja je imala koitus pre 16 godine, ima tri puta veći rizik da u kasnijoj dobi razvije CIN2+ (OR=3.28 (95%IP: 1.14-9.45), $p < 0.05$), Papa ASCUS+ rezultat nosi 9 puta veći rizik od CIN2+ promena, visoko suspektne kolposkopski 8 puta veći rizik, dok ispitanice koje su pozitivne na neki od *hr*HPV virusa imaju četiri puta veći rizik za detekciju CIN2+ promena. Jednom rečju, ovaj model nam na osnovu rezultata neinvazivnih testova i izračunavanjem klasifikacionog skora, može dati informaciju o verovatnoći CIN2 promena, te olakšati odluku o daljem kliničkom postupku. Na osnovu *z*-testa i poređenjem međusobno svake grupe u odnosu na vrednost klasifikacionog skora, zaključili smo da bi bilo opravdano pratiti ispitanice koje imaju klasifikacioni skor > 0.39 , obzirom da su jedino ispitanice sa skorom manjim od 0.39 imale i najteži oblik CIN3 promena (tabela 35). Ispitanice sa nižim klasifikacionom skorom zahtevaju neodložnu dopunsku invazivnu dijagnostiku i hirurško lečenje.

5.7. Praćenje CIN2 promena?

Trenutne preporuke skrining programa zasnivaju se na sve većoj individualizaciji u pristupu pacijenata i prilagođavanju lečenja. Teži se ka proceni individualnog rizika od nastanka prekanceroznih promena grlića materice ili

invazivnog karcinoma uključujući i lične faktore pacijenata, kao što su starost, želja za rađanjem, imunosupresija i rezultati prethodnih i tekućih skrining testova [161].

Histološka dijagnoza \geq CIN2 na uzorku biopsije smatra se graničnom tačkom za hirurško lečenje. Prosečna starost majki koje rađaju svoje prvo dete u Republici Srbiji je 29 godina. Incidenca CIN-a koji zahteva lečenje dostiže vrhunac u dobi oko 30-te godine i zato su efekti lečenja na buduće rađanje dece i rizik od prevremenog porođaja od posebne važnosti. U sistematskim pregledima literature i meta analizama autori su procenili da su rizici za prevremeni porođaj, malu porođajnu težinu, prevremenu rupturu ovojaka, kao i za porođaj carskim rezom značajno veći kod žena koje su lečene ekscizionim metodama u odnosu na nelečene žene [184,326,327]. Iz ovih razloga neophodno je lečiti samo promene koje imaju pravi potencijal progresije [328]. Postoji sve veća svest da neće svi CIN3, a posebno ne svi CIN2, napredovati u rak, i da će se veliki broj lezija CIN2 povući bez lečenja, što je dovelo do preporuka da se CIN2 ne leči odmah, posebno kod mladih žena [85]. CIN3 ima visok rizik progresije do raka, dok CIN2 pokazuje značajno niži profil rizika [329,330]. Lezije CIN2 su histološki heterogene, pri čemu su neki slučajevi uporedivi sa CIN3, a drugi veoma slični CIN1. Ovo potvrđuje i naš dijagnostički model, gde smo unutar grupe sa CIN2 promenama uspeli da na osnovu izračunatog klasifikacionog skora ($KS=0.39$) izdvojimo grupu ispitanica koja je po karakteristikama statistički sličnija kontrolnoj i grupi sa CIN1 promenama koje se ne leče, a statistički se razlikuje od grupe sa CIN3 promenama i CIN2 grupe sa nižim klasifikacionim skorom (tabele 37,38,39). Prirodan tok CIN2 nije jasan, delimično zato što studije koje su ispitivale regresiju histološki potvrđenih lezija visokog stepena nisu napravile razliku između dijagnoze CIN2 i CIN3, nisu imale veliki uzorak i nisu koristile rigorozni pregled patologa kako bi se isključila pogrešna klasifikacija CIN1 i CIN2 [331]. Pored toga, ne možemo pouzdano predvideti koja bi

lezija na kraju postala invazivna, ako se ne leči. Potencijalna šteta od razvoja invazivne bolesti, ako se ove lezije ne leče, treba da bude uravnotežena sa odlukom za konzervativno lečenje CIN2 [332]. Takođe, postoji neistražena mogućnost da nakon očigledne spontane regresije, žene sa konzervativno lečenim CIN2 mogu biti izložene povećanom riziku od ponavljajućih abnormalnosti visokog stepena. Ovo ukazuje na smanjenu efikasnost konzervativnog lečenja (lečenje koje se odlaže, a ne sprečava) i ukazuje na potrebu za pomnim praćenjem tih žena nakon dve godine, kako bi se osigurala bezbednost [333]. Do danas, nikakvi testovi i biomarkeri ne omogućavaju predviđanje progresivnog potencijala CIN2 promena. Rezultati studija o ulozi p16 su konfliktni [334,335], a longitudinalne studije o HPV metilaciji i mikrobiološkim markerima se još čekaju [68,336,337]. Trenutno je u fazi izrade i Kokranov sistematski pregled literature čiji je cilj da preporukama pomogne kliničarima u lečenju žena sa CIN2 promenama, kako bi se dugoročno smanjili rizici povezani sa prekomernim lečenjem prekanceroznih lezija grlića materice [338]. Na našoj Klinici, u planu je sprovođenje studije praćenja i konzervativnog lečenja pacijentkinja sa CIN2 promenama koje ispunjavaju kriterijume i imaju klasifikacioni skor >0.39 , kako bismo potvrdili ili opovrgnuli dijagnostičku vrednost našeg predikcionog modela.

Prednosti studije

- ✚ Ovo je prvi rad na ovim prostorima koji objedinjuje i analizira dijagnostičku značajnost i tačnost neinvazivnih testova (Papa bris, HPV test, kolposkopija) i parametara jednokarbonskog metabolizma u otkrivanju CIN promena.
- ✚ Veličina uzorka ove studije osigurava da je dovoljno moćna da se otkrije statistička značajnost.
- ✚ Postigli smo objektivnu procenu neinvazivnih dijagnostičkih testova jer je prisustvo ili odsustvo bolesti potvrđeno patohistologijom kod svih žena, što je smanjilo potencijalnu pristrasnost verifikacije.
- ✚ Dodatna snaga ove studije je to što smo procenili prirodu odnosa vrednosti folata, vit B12 i homocisteina sa kombinovanim rizikom od CIN2+ promena uzimajući u obzir HPV infekciju.
- ✚ Izračunali smo verovatnoću CIN2+ promene nakon određenog dijagnostičkog testa, pružajući kliničaru i pacijentima mogućnost da se informišu o riziku.
- ✚ Na osnovu predikcionog modela formirali smo klasifikacioni skor koji nam može služiti u kliničkoj praksi za brzi skrining pacijentkinja koje ne zahtevaju dopunsku invazivnu dijagnostiku i hirurško lečenje, već nadzor i praćenje

Ograničenja studije

- ✚ Glavno ograničenje ove studije je što je u pitanju opservaciona prospektivna kohortna studija, te se uzročnost između vrednosti parametara jednokarbonskog metabolizma i rizika za CIN2+ promene ne može sa sigurnošću utvrditi
- ✚ Za potvrdu dobijenog prognostičkog modela CIN2+ lezija koje neće progredirati potrebna je longitudinalna studija praćenja
- ✚ Nedostatak informacija o navikama u ishrani učesnika, količini unesenih mikronutrijenata, kao i statusu drugih nutritivnih faktora su ograničenja ove studije i mogu objasniti velike varijacije u koncentracije mikronutrijenata u serumu primećene u maloj populaciji.
- ✚ Nismo kontrolisali MTHR homozigote kod ispitanica, kod kojih vrednosti folata u serumu mogu biti niže

8. Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata iz naše studije došli smo do sledećih zaključaka:

1. Faktore rizika za HPV infekciju i CIN promene kao što su prvi koitus u ranom dobu, veći broj seksualnih partnera, pušenje, veći broj trudnoća i porođaja, redovnost ginekoloških kontrola i uzimanja Papa brisa potvrdili smo i našom studijom.
2. Papa bris i hrHPV test, pokazali su podjednaku senzitivnost i specifičnost u detekciji CIN2+ promena, te se ravnopravno mogu koristiti kao dijagnostički testovi u detekciji preinvazivnih promena na grliću materice.
3. Kolposkopija ima najveću PPV, te ukoliko se registruju visoko suspektne promene može da se posumnja na najteže CIN3 promene.
4. Najniže vrednosti vitamina B9 zabeležene su u grupi sa promenama visokog gradusa (CIN3).
5. Nivo vitamina B12 nije se pokazao kao parametar koji je relevantan za diferenciranje PH promena, s obzirom na to da vrednosti ne koreliraju sa težinom CIN promene. Najviše vrednosti ovog vitamina zabeležene su u kontrolnoj grupi, što može ukazivati na njegov zaštitni efekat.
6. Vrednosti homocisteina su u pozitivnoj korelaciji sa PH promenama. Više vrednosti korespondiraju sa visoko suspektnim PH promenama, dok niske vrednosti najverovatnije upućuju na odsustvo promena.
7. Cut-off vrednosti vitamina B9 $\leq 19.5 \text{ nmol/L}$ i homocisteina $\geq 9.35 \mu\text{mol/l}$ pokazuju 4x veću šansu za CIN2+ promene. Ove vrednosti mogu poslužiti kao parametri u odlučivanju eventualne suplementacije folatima i vit B12 u kliničkoj praksi.

8. Dobijeni prediktivni model koji uključuje nalaz papa i hpv brisa, kolposkopije i anamnestički podatak prvog koitusa može biti od pomoći kliničarima prilikom donošenja individualizovane odluke o tretmanu CIN promena, posebno kod mladih pacijentkinja koje još nisu ostvarile potomstvo.
9. Za potvrdu tačnosti klasifikacionog skora, kao pokazatelja koje pacijentkinje bi bilo opravdano pratiti potrebno je sprovesti studiju praćenja.

7. Prilog

7.1. Prilog 1: Informisani pristanak

ТЕКСТ ИНФОРМИСАНОГ ПРИСТАНКА ПАЦИЈЕНТКИЊЕ

Поштована,

Позвани сте да учествујете у научном истраживању које обухвата испитивање дијагностичких тестова који се спроводе ради откривања преканцерозних промена на грлићу материце. Истраживање се спроводи на Клиници за гинекологију и акушерство Клиничког Центра Војводине и одобрено је од стране Етичког одбора Клиничког центра Војводине. Учествовање у овом испитивању је добровољно. Пре него што одлучите, потребно је да разумете чему ово истраживање служи, каква је сврха Вашег учествовања и шта то значи за Вас. Овај информисани пристанак описује студију. Прочитајте га пажљиво.

Карцином грлића материце се развија кроз дуг преинвазиван период (3-17 година) током ког настају преканцерозне промена које се на време могу уочити и лечити. Узрок ових промена је веома распрострањена ХПВ инфекција. Преинвазивне промене на грлићу материце у великом броју могу спонтано и да нестану након годину или две, уколико се наш локални имунитет адекватно избори са инфекцијом. Циљ нашег истраживања је да откријемо који тест или која комбинација тестова би могла да нам укаже које промене ће спонтано проћи, а које захтевају хируршко лечење.

Надамо се да ћете нам помоћи у овоме.

Учествовање у овој студији неће имати никаквог утицаја на Ваше лечење које ће бити у складу са добром клиничком праксом.

Планом истраживања предвиђено је да потпишете сагласност за учествовање у студији и попуните анкетни упитник. У току Вашег лечења на Клиници обавиће се уобичајен и обавезан гинеколошки и колпоскопски преглед грлића материце, узимање ХПВ бриса, као и одговарајућа инвазивна дијагностика (биопсија, ендоцервикална киретажа, луп ексцизија, конизација). Додатне анализе које су укључене у ово истраживање, а којима бисте се подвргли, подразумева вађење крви за анализу одређених параметара. Сви подаци су анонимни и чување Ваше приватности и података је загарантовано. Добијени подаци користе се искључиво у научно-истраживачке сврхе. У сваком тренутку можете да повучете своју сагласност, не наводећи разлог. На Ваше лечење ни на који начин неће утицати Ваше повлачење.

Прочитала сам текст о сврси и плану истраживања које се спроводи на Клиници за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Војводине и након детаљног разговора са доктором који води студију сматрам да сам добила све податке који ме занимају и могу да потврдим следеће:

- Речено ми је да је моје учешће у испитивању добровољно и да уколико одлучим да учествујем у истраживању то неће имати никакав утицај на однос лекара према мени, нити ће утицати на моје лечење
- Речено ми је да не очекујем никакву материјалну, нити другу корист, осим евентуално здравствене
- Речено ми је да ће сви моји подаци бити анонимни и да мој идентитет неће бити откривен
- Речено ми је да из испитивања могу добровољно да иступим у сваком тренутку без икаквих последица по моје даље лечење

У потпуности сам разумела предочене податке и сагласна сам да учествујем у истраживању.

Потпис пацијенткиње _____

Адреса _____

Број телефона _____

Потврђујем да сам пацијенткињи дала све податке о истраживању

Др Бранислава Батуран

Датум _____

7.2. Prilog 2: Anketni upitnik**Општи анкетни упитник**

Име и презиме пацијеткиње _____

Годиште _____

Контакт телефон _____

1. **Образовање (заокружити слово):**
а. Основна школа б. Средња школа в. Висока школа
2. **Колико сте високи _____ цм тешки _____ кг?**
3. **Да ли сте пушач (заокружити слово):**
а. Не б. Да (Колико цигарета дневно _____)
4. **У којој години сте добили прву менструацију? _____**
5. **Са колико година сте имали први сексуални однос:**
а. Мање од 16 година б. 16-20 година в. Више од 20 год
6. **Да ли користите неки вид заштите у сексуалним односима?**
(заокружити слово)
а. Не
б. Да
(Који? _____ (контрацептивне пилуле, кондом, спирала)
7. **Број сексуалних партнера (заокружи слово):**
а. Мање од 5 б. Више од 5

8. Да ли редовно идете код гинеколога (једанпут годишње)? _____
9. Да ли редовно контролишете ПАПА брис (једанпут годишње)? _____
10. Да ли сте имали неке гинеколошке проблеме или интервенције?
-

11. Колико пута сте били трудни? _____
12. Да ли сте имали прекиде трудноће? _____
13. Број порођаја: _____
14. Да ли сте вегетаријанац? _____

15. Да ли болујете од неких хроничних болести и да ли користите неке лекове (проблеме са штитастом жлездом, бубрезима, малокрвношћу....)
-
-

16. Да ли постоје малигне болести у породици везане за женску страну (мајка, тетка, сестра)?
-
-

7.3. Prilog 3: Tabela A: Senzitivnosti i verovatnoća falš pozitiva za vrednosti homocisteina

Pozitivan ako je jednak ili veći od date vrednosti	Senzitivnost (A)	1 - Specifičnost (B)	A – B
3.9000	1.000	1.000	0.000
4.9500	1.000	0.989	0.011
5.1000	1.000	0.978	0.022
5.2500	1.000	0.956	0.044
5.3500	1.000	0.933	0.067
5.4500	0.989	0.911	0.078
5.6500	0.989	0.900	0.089
5.9500	0.989	0.878	0.111
6.1500	0.978	0.878	0.100
6.2500	0.956	0.867	0.089
6.3500	0.945	0.833	0.112
6.4500	0.945	0.800	0.145
6.5500	0.945	0.778	0.167
6.6500	0.945	0.767	0.178
6.7500	0.901	0.767	0.134
6.8500	0.890	0.744	0.146
7.0000	0.879	0.744	0.135
7.1500	0.857	0.733	0.124
7.2500	0.846	0.722	0.124
7.3500	0.835	0.700	0.135
7.4500	0.824	0.678	0.146
7.5500	0.824	0.667	0.158
7.6500	0.791	0.633	0.158
7.7500	0.780	0.622	0.158
7.8500	0.780	0.578	0.202
7.9500	0.725	0.567	0.159
8.0500	0.725	0.556	0.170
8.1500	0.670	0.533	0.137
8.2500	0.648	0.500	0.148
8.3500	0.604	0.467	0.138
8.4500	0.604	0.456	0.149
8.5500	0.560	0.433	0.127
8.6500	0.549	0.367	0.183
8.7500	0.527	0.356	0.172

8.8500	0.516	0.344	0.172
8.9500	0.505	0.300	0.205
9.0500	0.505	0.278	0.228
9.1500	0.495	0.267	0.228
9.2500	0.473	0.267	0.206
9.3500	0.440	0.211	0.228
9.4500	0.396	0.211	0.184
9.5500	0.374	0.211	0.163
9.6500	0.374	0.200	0.174
9.7500	0.363	0.189	0.174
9.9000	0.319	0.178	0.141
10.1000	0.319	0.167	0.152
10.2500	0.308	0.167	0.141
10.3500	0.297	0.167	0.130
10.5000	0.275	0.167	0.108
10.6500	0.231	0.156	0.075
10.7500	0.231	0.144	0.086
10.9500	0.209	0.144	0.064
11.1500	0.209	0.133	0.075
11.2500	0.209	0.122	0.087
11.3500	0.198	0.111	0.087
11.5000	0.176	0.111	0.065
11.6500	0.165	0.111	0.054
11.7500	0.154	0.111	0.043
11.8500	0.132	0.089	0.043
12.0000	0.110	0.089	0.021
12.2000	0.099	0.089	0.010
12.3500	0.055	0.078	-0.023
12.5000	0.044	0.067	-0.023
12.7000	0.044	0.044	0.000
12.8500	0.033	0.033	0.000
13.0500	0.022	0.033	-0.011
13.3000	0.022	0.022	0.000
13.4500	0.000	0.022	-0.022
14.1000	0.000	0.011	-0.011
15.7000	0.000	0.000	0.000

7.4. Prilog 4: Tabela B. Senzitivnosti i verovatnoća falš pozitivna za vrednosti B9

Pozitivan ako je manji ili jednak sa:	Senzitivnost (A)	1 – Specifičnost (B)	A-B
4.2000	0.000	0.000	0.000
5.2500	0.000	0.011	-0.011
5.7000	0.000	0.022	-0.022
6.2000	0.022	0.022	0.000
6.3500	0.022	0.033	-0.011
6.4500	0.033	0.033	0.000
6.6500	0.033	0.044	-0.011
6.9500	0.055	0.044	0.011
7.1500	0.066	0.044	0.022
7.3500	0.077	0.044	0.033
7.5500	0.088	0.044	0.044
7.7000	0.099	0.055	0.044
7.9000	0.110	0.055	0.055
8.0500	0.110	0.066	0.044
8.1500	0.132	0.088	0.044
8.2500	0.132	0.099	0.033
8.3500	0.165	0.110	0.055
8.5000	0.165	0.121	0.044
8.6500	0.198	0.132	0.066
8.7500	0.220	0.132	0.088
8.8500	0.242	0.143	0.099
8.9500	0.242	0.154	0.088
9.0500	0.242	0.165	0.077
9.1500	0.253	0.187	0.066
9.2500	0.253	0.220	0.033
9.3500	0.264	0.231	0.033
9.4500	0.264	0.242	0.022
9.5500	0.264	0.253	0.011
9.6500	0.275	0.264	0.011
9.8000	0.275	0.275	0.000
10.0000	0.286	0.286	0.000
10.1500	0.330	0.286	0.044
10.5000	0.341	0.297	0.044
10.9000	0.352	0.308	0.044
11.1000	0.363	0.308	0.055
11.2500	0.374	0.319	0.055
11.3500	0.396	0.330	0.066
11.4500	0.407	0.330	0.077

11.5500	0.407	0.352	0.055
11.7000	0.440	0.363	0.077
11.8500	0.451	0.374	0.077
12.1000	0.462	0.374	0.088
12.3500	0.473	0.385	0.088
12.4500	0.484	0.385	0.099
12.5500	0.484	0.396	0.088
12.7000	0.484	0.418	0.066
12.8500	0.516	0.418	0.099
13.0500	0.516	0.429	0.088
13.2500	0.527	0.429	0.099
13.4000	0.538	0.429	0.110
13.5500	0.538	0.451	0.088
13.7000	0.560	0.484	0.077
13.9000	0.571	0.495	0.077
14.0500	0.593	0.495	0.099
14.1500	0.604	0.505	0.099
14.2500	0.615	0.516	0.099
14.4000	0.626	0.538	0.088
14.6000	0.626	0.560	0.066
14.7500	0.637	0.560	0.077
14.8500	0.648	0.593	0.055
14.9500	0.648	0.604	0.044
15.0500	0.659	0.604	0.055
15.1500	0.659	0.615	0.044
15.3000	0.670	0.637	0.033
15.5000	0.681	0.637	0.044
15.9000	0.725	0.648	0.077
16.2500	0.736	0.648	0.088
16.3500	0.747	0.648	0.099
16.4500	0.769	0.648	0.121
16.9000	0.769	0.659	0.110
17.3500	0.769	0.681	0.088
17.4500	0.791	0.681	0.110
17.5500	0.802	0.681	0.121
17.9500	0.824	0.681	0.143
18.4500	0.835	0.681	0.154
18.9000	0.857	0.692	0.165
19.2500	0.868	0.692	0.176
19.3500	0.868	0.703	0.165
19.5000	0.879	0.703	0.176
20.4500	0.879	0.714	0.165
21.4500	0.890	0.725	0.165
21.7000	0.890	0.736	0.154
22.0500	0.890	0.747	0.143

22.3500	0.890	0.769	0.121
22.4500	0.901	0.780	0.121
22.6000	0.901	0.791	0.110
22.7500	0.901	0.802	0.099
22.9500	0.901	0.813	0.088
23.1500	0.912	0.813	0.099
23.2500	0.912	0.824	0.088
23.4500	0.912	0.835	0.077
23.7000	0.923	0.846	0.077
23.8500	0.923	0.857	0.066
24.2000	0.934	0.857	0.077
24.7000	0.945	0.857	0.088
25.0500	0.945	0.868	0.077
25.2500	0.956	0.868	0.088
25.4000	0.956	0.890	0.066
25.7000	0.967	0.890	0.077
26.1000	0.967	0.901	0.066
26.3500	0.967	0.912	0.055
26.8000	0.967	0.923	0.044
27.2500	0.978	0.923	0.055
28.2500	0.978	0.934	0.044
31.4000	0.978	0.945	0.033
33.9500	0.978	0.956	0.022
35.8000	0.989	0.956	0.033
37.8500	0.989	0.967	0.022
39.4500	0.989	0.978	0.011
41.7000	0.989	0.989	0.000
62.4500	1.000	0.989	0.011
83.0000	1.000	1.000	0.000

**7.5. Prilog 5. Tabela C. Senzitivnosti i verovatnoća falš pozitivna za vrednosti
klasifikacionih skorova modela 2 logističke regresije**

Pozitivan ako je jednak ili veći od:	Senzitivnost	1 – Specifičnost	LR+; LR-
.0000000	.000	.000	
.0465021	.065	.000	
.1136211	.370	.011	
.2042297	.500	.055	
.3152305	.522	.055	
.3928064	.880	.264	3.33; 0.3
.4295005	.880	.286	
.5397838	.902	.308	2.92; 0.34
.6787932	.924	.308	
.7414666	.946	.396	
.7996682	.946	.418	
.8643017	.967	.571	
.9213795	.978	.626	
1.0000000	1.000	1.000	

8. Skraćenice

ANCOVA	analiza kovarijanse (analysis of covariance)
ANOVA	analiza varijanse (analysis of variance)
ASCH	Atipične skvamozne ćelije koje govore u prilog displaziji (<i>Atypical Squamous Cells – High grade squamous intraepithelial lesion cannot be excluded</i>)
ASCUS	atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja (<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>)
ATP	adenozin trifosfat
AUC	površina ispod krive (<i>Area Under the Curve</i>)
AW	aceto-white epitel
CC	Konvencionalna citologija
CIN	cervikalna intraepitelijalna neoplazija (<i>cervical intraepithelial lesion</i>)
CKC	konizaciju hladnim nožem (<i>cold knife conisation</i>)
CMIA	hemiluminescentni mikropartikularni imunoesej (<i>Chemmyluminescent Microparticulate Immuno Assay</i>)
CpG	citozin-fosfat-guanin
DHF	dihidrofolat
DNMT	DNK metiltransferaza
dTMP	timidin monofosfat
dUMP	deoksiuridin monofosfat
ESGO	Evropsko udruženje ginekološke onkologije (<i>European Society of Gynaecological Oncology</i>)
GLM	opšti linealni modeli (<i>general linear models</i>)
Globocan	Globalna opservatorija za rak (<i>Global Cancer Observatory</i>)
HCEC	humane epitelijalne ćelije kolona (<i>human colon epithelial cell</i>)
HPV	humani papiloma virus
hrHPV	visokorizični (<i>high-risk</i>) HPV
HSIL	skvamozna lezija visokog stepena (<i>high grade squamous intraepithelial lesion</i>)

IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (<i>International Agency for Research Cancer</i>)
IFCPC	Međunarodna federacija za patologiju grlića materice i kolposkopiju (<i>International Federation of Colposcopy and Cervical Pathology</i>)
LAST projekt	Projekat terminologije donjeg anogenitalnog trakta (<i>Lower Anogenital Squamous Terminology Project</i>)
LBC	tečna citologija (<i>liquid based cytology</i>)
LEEP	elektrohirurška ekscizija promene omčicom (<i>loop electrosurgical excision procedure</i>)
LLETZ	velika elektrohirurške ekscizije zone transformacije omčicom (<i>large loop excision of transformation zone</i>)
LR	odnos šansi (<i>Likelihood ratio</i>)
lrHPV	niskorizični HPV (<i>low-risk</i>)
LSIL	skvamozne intraepitelijalne lezija niskog stepena (<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)
MTHR	metilentetrahidrofolat reduktaza
MTR	metiltransferaza
NILM	negativno na intraepitelijalnu leziju ili malignitet (<i>Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy</i>)
NPV	negativna prediktivna vrednost
OK	oralni kontraceptivi
PABA	para-aminobenzoeva kiselina
PCR	lančana reakcija polimeraze (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PH	patohistološki
PPV	pozitivna prediktivna vrednost
ROC analiza	analiza odnosa senzitivnosti i specifičnosti testova (<i>Receiver Operating Characteristic curve</i>)
RR	relativni rizik
SAH	S-adenozilhomocistein
SAM	S-adenozilmetionin
SCC	karcinom skvamoznih ćelija (<i>squamous cancer cell</i>)
SCJ	skvamokolumnarna granica (<i>Squamocolumnar junction</i>)
SIL	skvamozna intraepitelijalna lezija (<i>squamous intraepithelial lesion</i>)

SZO	Svetska zdravstvena organizacija
THF	tetrahidrofolat
TIMS	timidilat sintaza

9. Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*2021;71(3):209-249.
2. World Health Organization. Cervical cancer. 2022. Retrieved 14.10.2022. from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
3. J Ferlay, M Ervik, F Lam, et al, eds. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer; 2020. Accessed November 25, 2021. gco.iarc.fr/today
4. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado J, Gómez D, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases Report in World [Internet]. Barcelona: ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre); 2021 [cited 2021 Dec 20]. Available from: www.hpvcentre.com.
5. Miljus D, Zivkovic Perisic S, Božić Z, urednici. Maligni tumori u Republici Srbiji. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”;2020.
6. Landy R, Sasieni PD, Mathews C, Wiggins CL, Robertson M, McDonald YJ, et al; New Mexico HPV Pap Registry Steering Committee. Impact of screening on cervical cancer incidence: A population-based case-control study in the United States. *Int J Cancer.* 2020;147(3):887-896.
7. EPF. Cervical Cancer Prevention Policy Atlas. HPV Awareness. 2020. Accessed November 23, 2022. Available from : <https://www.epfweb.org/cervical-cancer-prevention-atlas>.
8. World Health Organization. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva; 2020:1–52.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12–9.
10. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.*2009;384(2):260-265.
11. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.*2020;40(5):602-608.
12. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology.*2003;445(1-2) :232-243.

13. Galloway DA, Laimins LA. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Curr Opin Virol.* 2015;14:87-92.
14. Bouvard V, Baan R, Straif K. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet oncology.* 2009;10(4):321-322.
15. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16086.
16. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2014; 26:13-21.
17. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer *Gynecol Oncol.* 2008;110(3/2):S4-S7.
18. Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, Madeleine MM, McKnight B, Galloway DA, et al. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol.* 2001;19(7):1906-1915.
19. Yang SH, Kong SK, Lee SH, et al. Human papillomavirus 18 as a poor prognostic factor in stage I-IIA cervical cancer following primary surgical treatment. *Obstet Gynecol Sci.* 2014;57(6):492-500.
20. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(1):11-22.
21. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:2-13.
22. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(7):384.
23. J. Doorbar. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(1):7-15.
24. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):e1006211.
25. Travé G, Zanier K. HPV-Mediated Inactivation of Tumor Suppressor P53. *Cell Cycle.* 2016;15: 2231–2232.
26. Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 Oncoproteins with Tumour Suppressor Gene Products. *Cancer Surv.* 1992;12:197–217.
27. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, et al. Genome-Wide Analysis of HPV Integration in Human Cancers Reveals Recurrent, Focal Genomic Instability. *Genome Res.* 2014;24:185–199.

28. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex. Transm. Dis.* 2014;41:660–664.
29. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010;202:1789–1799.
30. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005;191:1808–1816.
31. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet.* 2012;364:1678-1683.
32. Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijkert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:862-874.
33. Hammer A, de Koning MN, Blaakaer J, Steiniche T, Doorbar J, Griffin H, et al. Whole tissue cervical mapping of HPV infection: Molecular evidence for focal latent HPV infection in humans. *Papillomavirus Res.* 2019;7:82–87.
34. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med.* 2018;7:5217-5236.
35. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Epidemiol.* 2008;168:123–137.
36. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890–907.
37. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol.* 2005;58(9):946.
38. Chen HC, Schiffman M, Lin CY, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection and increased long-term risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Ins.* 2011;103(18): 1387-1396.
39. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and metaanalysis. *Int J Cancer.* 2013; 133(6):1271-1285.
40. Muñoz N, Hernandez-Suarez G, Méndez F, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer.* 2009;100(7):1184-1190.

41. Radley D, Saah A, Stanley M. Persistent Infection with Human Papillomavirus 16 or 18 Is Strongly Linked with High-Grade Cervical Disease. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016;12:768–772.
42. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of Host Immune Defenses by Human Papillomavirus. *Virus Res.* 2017; 231:21–33.
43. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):215-22.
44. Malagón T, Burchell A, El-Zein M, et al. Assortativity and mixing by sexual behaviors and sociodemographic characteristics in young adult heterosexual dating partnerships. *Sex Transm Dis.* 2017;44:329–337.
45. El-Zein M, Ramanakumar AV, Naud, P, et al. Determinants of acquisition and clearance of human papillomavirus infection in previously unexposed young women. *Sex Transm Dis.* 2019;46(10):663.
46. Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC, et al. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res.* 2006;66:1218–24.
47. Imonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21:1654–63.
48. Winer RL, Feng Q, Hughes JP, et al. Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. *J Infect Dis* 2008;197:279–282.
49. Kjaer SK, Chackerian B, Van Den Brule AJ, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:101–106.
50. Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet.*2003;361:1159-1167.
51. Anastasiou E, McCarthy KJ, Gollub EL, Ralph L, van de Wijgert JHHM., Jones HE. The relationship between hormonal contraception and cervical dysplasia/cancer controlling for human papillomavirus infection: A systematic review. *Contraception.* 2022;107:1-9
52. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet.*2007;370(9599):1609-1621.

53. Peng Y, Wang X, Feng H, Yan G. Is oral contraceptive use associated with an increased risk of cervical cancer? An evidence-based meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(5):913-922. h
54. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. 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(5):1108-1124.
55. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147029.
56. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS.(2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2012;359(9312):1093- 1101.
57. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer.* 2013;108(1):234-239.
58. Appleby P, Beral V, Berrington De González A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int. J. Cancer.* 2006;118(6):1481-1495.
59. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States) *Cancer Causes Control.* 2002;13(9):839-846.
60. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* IARC Press;2004:84. Accessed December 3, 2022. <https://ezproxy.nb.rs:2162/books/NBK316407/>
61. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, Schiffman M. Relationship between Cigarette Smoking and Human Papilloma Virus Types 16 and 18 DNA Load. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2009;18(12): 3490–3496
62. Wiley DJ, Wiesmeier E, Masongsong E, et al. Smokers at higher risk for undetected antibody for oncogenic human papillomavirus type 16 infection *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2006;15(5):915-920.

63. Simen-Kapeu A, Kataja V, Yliskoski M, et al. Smoking impairs human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 capsids antibody response following natural HPV infection *Scand. J. Infect. Dis.* 2008;40(9):745-751.
64. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):372-377.
65. Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Vryzas D, Chatzaki E, et al. Cigarette Smoking Promotes Infection of Cervical Cells by High-Risk Human Papillomaviruses, but not Subsequent E7 Oncoprotein Expression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):422.
66. Su B, Qin W, Xue F, Wei X, et al. The relation of passive smoking with cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(46):e13061.
67. Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Transl. Res.* 2017;179:168–182.
68. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 2015;5:16865.
69. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect. Dis. Obstetr. Gynecol.* 2011;2011:319460.
70. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical microbiota associated with higher grade cervical intraepithelial neoplasia in women infected with high-risk human papillomaviruses. *Cancer Prev. Res.* 2016;9:357–366.
71. Oh H, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015;21(7):674.e1-9.
72. Lin D, Kouzy R, Abi Jaoude J, Noticewala SS, Delgado Medrano AY, Klopp AH, et al. Microbiome factors in HPV-driven carcinogenesis and cancers. *PLoS pathogens.* 2020;16(6): e1008524.
73. Kesić V. Faktori rizika i skrining za karcinom grlića materice, u Đurđević S, Kesić V, urednici. *Ginekološka onkologija.* Novi Sad: Udruženje za ginekološku onkologiju. Medicinski fakultet; 2009.
74. Nyirjesy I, Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(16):1420–1.
75. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1969;105:386-393.

76. Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous Lesions of the cervix. In: Kurman RJ, Blaustein, editors. *Pathology of the Female Genital Tract*. 5th ed. New York: Springer; 2002. p. 253-324.
77. Kurman RJ, Carcangiu ML, Young RH, editors. *WHO Classification of Tumors of female Genital Tract*. 4th ed. IARC: WHO Press; 2014.
78. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT. 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.
79. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO et al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018; 360:k499.
80. Macdonald M, Smith JH, Tidy JA, Palmer JE. Conservative management of CIN2: National Audit of British Society for colposcopy and cervical pathology members' opinion. *J Obstet Gynaecol*. 2018;38(3):388-94.
81. Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(5):800-15.
82. Darragh TM. The Last Project and the diagnostic bottom line. *Cytopathology* 2015;26(6):343-5.
83. Kesić V, urednik. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka grlića materice. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd: Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse; 2012:1–88.
84. Fuchs K, Weitzen S, Wu L, Phipps MG, Boardman LA. Management of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescent and young women. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2007;20(5):269-74.
85. McAllum B, Sykes PHH, Sadler L, Macnab H, Simcock BJ, Mekhail AK. Is the treatment of CIN2 always necessary in women under 25 years old? *Am J Obstet Gynecol*. 2011;478:1-7.
86. Benard VB, Castle PE, Jenison SA, et al. Population-Based Incidence Rates of Cervical Intraepithelial Neoplasia in the Human Papillomavirus Vaccine Era. *JAMA Oncol*. 2017;3(6):833–837.
87. Falcaro M, Castañon A, Ndlela B et al. The effects of the national HPV vaccination programme in England, UK, on cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia incidence: a register-based observational study. *Lancet*. 2021;398(10316):2084-2092.

88. Loopik DL, Bentley HA, Eijgenraam MN, et al. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia grades 1, 2, and 3: A systematic review and meta-analysis. *J Low Genit Tract Dis.* 2021;25(3):221-231.
89. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, et al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2018;360:k499.
90. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstetr Gynecol.* 1941;42:193-206.
91. Arbyn M, Raifu A.O, Weiderpass E, et al. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer.* 2009 (45): 2640–2648.
92. IARC. Cancer screening in the European Union. In: Report on the implementation of the Council Recommendation on cancer screening. Second Report. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 201:17–18.
93. Nayar R, Wilbur CD. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytol.* 2015;59:121–132.
94. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan FS, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet.* 2006;367(9505):122–132.
95. Siebers GA, Klinkhamer JJMP, Grefte JMM, Massuger FAGL, Vedder EMJ, Beijers-Broos A, et al. Comparison of liquid-based cytology with conventional cytology for detection of cervical cancer precursors: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2009;302(16):1757–1764.
96. Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol Oncol.* 2009;112(3):572-6.
97. Froberg M, Norman I, Johansson B, Hjerpe A, Weiderpass E, Andersson S. Liquid-based cytology with HPV triage of low-grade cytological abnormalities versus conventional cytology in cervical cancer screening. *Curr Pharm Des.* 2013;19:1406–1411.
98. Kesić V, urednik. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka grlića materice. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Beograd: Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse; 2012:1–88.

99. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(6):1383-92.
100. Solomon D, Schiffman M, Tarone R; ALTS Study Group. Comparison of Three Management Strategies for Patients With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2001;92(12):293-299.
101. Arbyn M, Roelens J, Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PP, et al. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;3:CD008054.
102. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BKS, Howell L. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: A meta-analysis. *Obst Gynecol.* 1998;92:727-735.
103. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytological evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:397-402.
104. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, et al. Triage of women with equivocal or lowgrade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J Cell Mol Med.* 2009 Apr;13(4):648-59.
105. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000;132(10):810-9.
106. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 2006;119:1095-1101.
107. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver Reproducibility of Cervical Cytologic and Histologic Interpretations: Realistic Estimates From the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA.* 2001; 285(11):1500-1505.
108. Strander B, Andersson-Ellström A, Milsom I, Rådberg T, Ryd W. Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program: A prospective randomized study. *Cancer.* 2007;111:285–91.
109. Haghghi F, Ghanbarzadeh N, Ataee M, Sharifzadeh G, Mojarrad JS, Najafi-Semnani F. A comparison of liquid-based cytology with conventional Papanicolaou smears in cervical dysplasia diagnosis. *Adv Biomed Res.* 2016;5:162.

110. Meijer CJLM, Castle PE, Hesselink AT, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009;124(3):516-20.
111. Arbyn M, Simon M, Peeters E, et al. 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(8):1083-1095.
112. Szarewski A, Mesher D, Cadman L, et al. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):1867-1873.
113. Tota JE, Bentley J, Blake J, Coutlée F, Duggan MA, Ferenczy A et al. Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: acting on evidence to change the current paradigm. *Prev Med.* 2017;(98):5-14.
114. Arbyn M. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer.* 1990;45(15):2640–8.
115. Arbyn M, Rebolj M, de Kok IM, Becker N, O'Reilly M, Andrae B. The challenges of organising cervical screening programmes in the 15 old member states of the European Union. *Eur J Cancer* 2009;45:2671–8.
116. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papilloma viruses. Lyon, France: IARC Press, 2007: 90.
117. Bulkman NWJ, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MCG, Van Kemenade FJ, Rozendaal L. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer.* 2007;96(9): 1419-1424.
118. Koutsky LA. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. *J Natl Cancer Ins.* 2000;92(5):397-402.
119. Bulkman NW, Rozendaal L, Snijders PJ, et al. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. *Int J Cancer.* 2004;110(1):94-101.
120. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;10;8:CD008587.
121. Gage JC, Schiffman M, Katki HA, et al. Reassurance against future risk of precancer and cancer conferred by a negative human papillomavirus test. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014;106(8):dju153.

122. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: Joint European cohort study. *Bmj*. 2008;337:a1754.
123. Dijkstra MG, Snijders PJ, Arbyn M, Rijkaart DC, Berkhof J, Meijer CJ. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Ann Oncol*. 2014;25(5):927-35.
124. Dijkstra MG, van Zummeren M, Rozendaal L, et al. Safety of extending screening intervals beyond five years in cervical screening programmes with testing for high risk human papillomavirus: 14 year follow-up of population based randomised cohort in the Netherlands. *BMJ*. 2016;355:i4924.
125. Cuzick J. Role of HPV testing in clinical practice. *Virus Res*. 2002. 89(2):263-269.
126. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro, et al. New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet oncol*. 2010;11(3):249-257.
127. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res*. 2015;1:22-31.
128. Grce M, Davies P. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(5):599-605.
129. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*. 2012;30(5): F88-F99.
130. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014; 383(9916):524-32.
131. Wright T, Huang J, Baker E, et al. The budget impact of cervical cancer screening using HPV primary screening. *Am. J. Manag. Care*. 2016;(22):95–105.
132. Rebolj M, Rimmer J, Denton K, et al. Primary cervical screening with high risk human papillomavirus testing: observational study. *BMJ*. 2019;364:l240.

133. Melnikow J, Henderson JT, Burda BU, et al. Screening for Cervical Cancer With High-Risk Human Papillomavirus Testing: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2018 Aug. Report No.: 17-05231-EF-1. PMID:30256575.
134. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis.* 2009;9(1):1-26.
135. Grce M. Primary and secondary prevention of cervical cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(8):851-857.
136. Bermudez A, Bhatla N, Leung E. Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015;131(2): S88-95.
137. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations *J Adolesc Health.* 2005;37(6):S3-9.
138. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, et al. 2011 Colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2012;120(1):166–72.
139. Wentzensen N, Massad LS, Mayeaux EJ, *et al.* Evidence-based consensus recommendations for colposcopy practice for cervical cancer prevention in the United States *J. Low. Genit. Tract. Dis.* 2017;21(4):216-222
140. Redman CWE, Kesic V, Cruickshank ME, et al. European consensus statement on essential colposcopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021;256:57-62.
141. Wei B, Zhang B, Xue P, Seery S, Wang J, Li Q, et al. Improving colposcopic accuracy for cervical precancer detection : a retrospective multicenter study in China. *BMC Cancer.* 2022;22(1):388
142. Massad LS, Jeronimo J, Schiffman M. National Institutes of Health/American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (NIH/ASCCP) research group. Interobserver agreement in the assessment of components of colposcopic grading. *Obstet. Gynecol.* 2008;111(6):1279-1284.
143. Kesić V. Greške u kolposkopiji. Seminar Primenjena kolposkopija. Udruženje za kolposkopiju i cervikalnu patologiju Srbije, Beograd 2016:24-29.
144. Barut MU, Kale A, Kuyumcuoğlu U, Bozkurt M, Ağaçayak E, Özekinci S, et al. Analysis of sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of smear and colposcopy in diagnosis of premalignant and malignant cervical lesions. *Med Sci Monit.* 2015;21:3860–7.

145. Baasland I, Hagen B, Vogt C, et al. Colposcopy and additive diagnostic value of biopsies from colposcopy-negative areas to detect cervical dysplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2016; 95:1258–1263.
146. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, et al. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;91:626–31.
147. Ferris DG, Litaker MS. ALTS Group. Prediction of cervical histologic results using an abbreviated Reid Colposcopic Index during ALTS. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:704–10.
148. Kierkegaard O, Byrjalsen CV, Frandsen, KH, et al. Diagnostic accuracy of cytology and colposcopy in cervical squamous intraepithelial lesions. *Acta Obstet Gynecol Scand*.1994;73(8):648-651.
149. Etherington IJ, Luesley DM, Shafi MI et al. Observer variability among colposcopists from the West Midlands region. *BJOG*. 1997;104:1380–1384.
150. Pretorius RG, Belinson JL, Zhang WH et al. The colposcopic impression. Is it influenced by the colposcopist's knowledge of the findings on the referral Papanicolaou smear? *J Reprod Med*. 2001; 46(8):724–728.
151. Jeronimo J, Schiffman M. Colposcopy at a crossroads. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:349–53.
152. Underwood M, et al. Accuracy of colposcopy-directed punch biopsies: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2012;119(11):1293-1301.
153. Hopman EH, Kenemans P, Helmerhorst TJ. Positive predictive rate of colposcopic examination of the cervix uteri: an overview of the literature. *Obstet Gynecol Surv*.1998;53(2):97-106.
154. Wentzensen N, Schiffman M, Silver MI, et al. ASCCP colposcopy standards: risk-based colposcopy practice. *J Low Genit Tract Dis*. 2017;21(4):230-234.
155. Gage JC, Hanson VW, Abbey K, et al. Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy. *Obstet Gynecol*. 2006;108:264–72.
156. Chen Q, Du H, Pretorius RG, et al. High-grade cervical intraepithelial neoplasia detected by colposcopy-directed or random biopsy relative to age, cytology, human papillomavirus 16, and lesion size. *J Low Genit Tract Dis*. 2016;20:207–12.
157. Wentzensen N, Walker JL, Gold MA, et al. Multiple biopsies and detection of cervical cancer precursors at colposcopy. *J Clin Oncol*. 2015;33:83–9.

158. van der Marel J, van Baars R, Rodriguez A, et al. The increased detection of cervical intraepithelial neoplasia when using a second biopsy at colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2014;135:201–7.
159. NHSCSP. Colposcopy and programme management. Guidelines. Publication No 20; Third Edition March 2016.
160. Schiffman M, Wentzensen N. A suggested approach to simplify and improve cervical screening in the United States. *J Low Genit Tract Dis.* 2016;20:1–7.
161. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis* 2020;24(2):102-131.
162. Jeronimo J, Massad LS, Schiffman M, et al. Visual appearance of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection and type. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(1):47.e1-8.
163. Barken SS, Rebolj M, Andersen ES, et al. Frequency of cervical intraepithelial neoplasia treatment in a well-screened population. *Int J Cancer.* 2012;130:2438-44.
164. Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(6):CD001318.
165. BSCCP. Cervical Screening Programme and Colposcopy Management Guidance released by Public Health England. Available: <https://www.gov.uk/government/publications/cervical-screening-programme-and-colposcopy-management>
166. Cancer Council Australia Cervical Cancer screening Guidelines Working part. National Cervical Screening program: Guidelines for the management of screen-detected abnormalities, screening in specific populations and investigation of abnormal vaginal bleeding. Sydney: Cancer Council Australia. wiki.cancer.org.au/australia/guidelines:cervical_cancer/screening2020.
167. Egemen D, Cheung LC, Chen X, et al. Risk Estimates Supporting the 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines. *J Low Genit Tract Dis.* 2020;24:132-143.
168. Lueng SOA, Vitonis A, Feldman S. Yield of loop electrosurgical excision procedure (LEEP) among patients with and without known high-grade cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 2021;159(1):194

169. Dempster-Riverett K, Innes CR, Simcock BJ, Harker D, Williman JA, Van der Griend RA, et al. Evaluation of guidelines for observational management of cervical intraepithelial neoplasia 2 in young women. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;223(3):408.e1-408.e11.
170. Castle PE, Sideri M, Jeronimo J, Solomon D, Schiffman M. Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(4):356.e1-6.
171. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Cecilia RA, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005;337(1):76–84.
172. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol.* 2009;113(1):18-25.
173. Vink MA, Bogaards JA, Van Kemenade FJ, de Melker HE, Meijer CJL, Berkhot J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. *Am J Epidemiol.* 2013;178(7):1161-9.
174. Wilkinson TM, Sykes PHH, Simcock B, Petrich S. Recurrence of high-grade cervical abnormalities following conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;212:1-7.
175. Bleecker E, Koehler E, Smith J, Budwit D, Rahangdale L. Outcomes after management of young women with cervical intraepithelial neoplasia 2 with a 6 month observation protocol. *J Low Gen Tract Dis.* 2014;18:46-9.
176. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol.* 2009 Jan;113(1):18-25.
177. Wright TCJr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(4):340–345.
178. Wentzensen N, Wilson LE, Wheeler CM, et al. Hierarchical clustering of human papillomavirus genotype patterns in the ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Res.* 2010;70:8578–86.
179. Silver MI, Gage JC, Schiffman M, et al. Clinical outcomes after conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN2) in women ages 21-39 years. *Cancer Prev Res (Phila).* 2018;11: 165–70.
180. Loopik DL, Doucette S, Bekkers RLM, et al. Regression and progression predictors of CIN2 in women younger than 25 years. *J Low Genit Tract Dis.* 2016;20:213–7.

181. Lee MH, Finlayson SJ, Gukova K, et al. Outcomes of conservative management of high grade squamous intraepithelial lesions in young women. *J Low Genit Tract Dis*. 2018;22:212–8.
182. Aro K, Nieminen P, Louvanto K, et al. Age-specific HPV type distribution in high-grade cervical disease in screened and unvaccinated women. *Gynecol Oncol*. 2019;154:354–9.
183. Benard VB, Watson M, Castle PE, et al. Cervical carcinoma rates among young females in the United States. *Obstet Gynecol*. 2012;120:1117–23.
184. Kyrgiou M, Athanasiou A, Kalliala IEJ, et al. Obstetric outcomes after conservative treatment for cervical intraepithelial lesions and early invasive disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;11(11):CD012847.
185. Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaidi M, et al. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016;354:i3633.
186. Maina G, Ribaldone R, Danese S, Lombardo V, Cavagnetto C, Plazzotta C, Surico D. Obstetric outcomes in patients who have undergone excisional treatment for high-grade cervical squamous intra-epithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;236:210–213.
187. Wittmaack A, Dudley D, Boyle. Maternal history of cervical surgery and preterm delivery: a retrospective cohort study. *J Womens Health*. 2019;28(11):1538–1542.
188. Wiik J, Nilsson S, Kärrberg C, Strander B, Jacobsson B, Sengpiel V. Associations of treated and untreated human papillomavirus infection with preterm delivery and neonatal mortality: A Swedish population-based study. *PLoS Med*. 2021;18(5):e1003641.
189. Liverani CA, Di Giuseppe J, Clemente N. et al. Length but not transverse diameter of the excision specimen for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2–3) is a predictor of pregnancy outcome. *Eur J Cancer Prev*. 2019;25(5):416–422
190. Wiik J, Kärrberg C, Nilsson S, Strander B, Jacobsson B, Sengpiel V. Associations between cervical intraepithelial neoplasia during pregnancy, previous excisional treatment, cone-length and preterm delivery: a register-based study from western Sweden. *BMC Med*. 2022;20(1):61.
191. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM et al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol*. 2012;120(6):1465-1471.

192. NHSCSP. Colposcopy and programme management. Guidelines. Colposcopic diagnosis, treatment and follow up. Available on: <https://www.gov.uk/government/publications/cervical-screening-programme-and-colposcopy-management/3-colposcopic-diagnosis-treatment-and-follow-up>
193. Arbyn M, Redman CWE, Verdoodt F, et al. Incomplete excision of cervical precancer as a predictor of treatment failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2017;18:1665-1679.
194. Kyrgiou M, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Paraskeva E. Increased risk of preterm birth after treatment for CIN. *BMJ* 2012;345:e5847.
195. Phadnis SV, Atilade A, Bowring J, et al. Regeneration of cervix after excisional treatment for cervical intraepithelial neoplasia: a study of collagen distribution. *BJOG.* 2011;118:1585-91.
196. Wiik J, Sengpiel V, Kyrgiou M, Nilsson S, Mitra A, Tanbo T, et al. Cervical microbiota in women with cervical intra-epithelial neoplasia, prior to and after local excisional treatment, a Norwegian cohort study. *BMC Womens Health* 2019;19(1):1–9.
197. Zhang H, Lu J, Lu Y, Cai Q, Liu H, Xu C. Cervical microbiome is altered in cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure in china. *Sci Rep.* 2018;8(1):4923.
198. He W, Sparén P, Fang F, Sengpiel V, Strander B, Czene K. (2022). Pregnancy Outcomes in Women With a Prior Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 Diagnosis: A Nationwide Population-Based Cohort Study With Sibling Comparison Design. *Ann Intern Med.* 2022;175(2):210-218.
199. Loopik DL, van Drongelen J, Bekkers RLM, Voorham QJM, Melchers WJG, Massuger LFAG, et al. Cervical intraepithelial neoplasia and the risk of spontaneous preterm birth: A Dutch population-based cohort study with 45,259 pregnancy outcomes. *PLoS Med.* 2021;18(6):e1003665.
200. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab.* 2017;25(1):27-42.
201. Clare CE, Brassington AH, Kwong WY, Sinclair KD. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu Rev Anim Biosci.* 2019;7(1):263-287.
202. Mahmoud AM, Ali MM. Methyl donor micronutrients that modify DNA methylation and cancer outcome. *Nutrients.* 2019;11(3):608.
203. Ghazi T, Arumugam T, Foolchand A, Chuturgoon AA. The impact of natural dietary compounds and food-borne mycotoxins on dna methylation and cancer. *Cells.* 2020;9(9):2004.

204. Donnelly JG. Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2001;38(3):183-223.
205. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2): S238-244.
206. Catala GN, Bestwick CS, Russell WR, Tortora K, Giovannelli L, Moyer MP. Folate, genomic stability and colon cancer: the use of single cell gel electrophoresis in assessing the impact of folate in vitro, in vivo and in human biomonitoring. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2019;843:73-80.
207. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(7):3290-3295.
208. Duthie SJ, Hawdon A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J.* 1998; 12(14):1491-1497.
209. Duthie SJ, Mavrommatis Y, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Moyer MP et al. The response of human colonocytes to folate deficiency in vitro: functional and proteomic analyses. *J Proteome Res.* 2008;7(8):3254-3266.
210. Duthie SJ, Narayanan S, Blum S, Pirie L, Brand GM. (2000). Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr Cancer.* 2000;37(2):245-251.
211. Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, Vance DE, Jacobs RL. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr.* 2006;83(1):5-10.
212. Mentch SJ, Mehrmohamadi M, Huang L, Liu X, Gupta D, et al. Histone methylation dynamics and gene regulation occur through the sensing of one-carbon metabolism. *Cell Metab.* 2015;22:861-873.
213. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(2):89-97.
214. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; 128(4):683-692.
215. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012;81(4):303- 311.
216. Kulkarni A, Dangat K, Kale A, Sable P, Chavan-Gautam P, Joshi S. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One.* 2011;6(3):e17706.

217. Ray JG, Cole DE, Boss SC. An Ontario-wide study of vitamin B12, serum folate, and red cell folate levels in relation to plasma homocysteine: is a preventable public health issue on the rise? *Clin Biochem.* 2000;33(5):337-343.
218. Robertson J, Iemolo F, Stabler SP, Allen RH, Spence JD. Vitamin B12, homocysteine and carotid plaque in the era of folic acid fortification of enriched cereal grain products. *CMAJ.* 2005; 172(12):1569-1573.
219. Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer.* 2005;4:38.
220. Szalmas A, Konya J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009; 19(3):144-152.
221. Gonin JM, Nguyen H, Gonin R, Sarna A, Michels A, Masri-Imad F, et al. Controlled trials of very high dose folic acid, vitamins B12 and B6, intravenous folinic acid and serine for treatment of hyperhomocysteinemia in ESRD. *J Nephrol.* 2003;16(4):522-534.
222. Azadibakhsh N, Hosseini RS, Atabak S, Nateghiyan N, Golestan B, Rad AH. Efficacy of folate and vitamin B12 in lowering homocysteine concentrations in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009;20(5):779-788.
223. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270(22):2693-8.
224. Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implication for carcinogenesis. *Oncogene.* 2003;22(23):3530-8.
225. Alberg AJ, Selhub J, Shah KV, Viscidi RP, Comstock GW, Helzlsouer KJ. The risk of cervical cancer in relation to serum concentration of folate, vitamin B12 and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(7):761-4.
226. Papanicolaou GN. Atlas of exfoliative cytology. Cambridge, Mass: The Commonwealth Fund, 1954.
227. Hsieh FY. Sample size tables for logistic regression. *Stat Med.* 1989;8(7):795-802.
228. Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol.* 2013;4:863.
229. Šimundić AM. (2009). Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC*, 2009;19(4):203-211.

230. Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol.* 2022;75(1):25-36.
231. Flores YN, Bishai DM, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Lörincz A, Hernández M, et al. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2008;50:49–58.
232. Ribeiro AA, Costa MC, Alves RRF, *et al.* HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer.* 2015;10:16.
233. Parazzini F, LaVecchia C, Negri E. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1992;19:259-263.
234. Lenselink CH, Melchers WJG, Quint WGV, Hoebbers AMJ, Hendriks JCM, Massuger LFAG, et al. Sexual behaviour and HPV infections in 18 to 29 year old women in the pre-vaccine era in the Netherlands. *PLoS One.* 2008;3:e3743.
235. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002;89:191–199.
236. Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:469–476.
237. Vesco KK, Whitlock EP, Eder M, Burda BU, Senger CA, Lutz K. Risk factors and other epidemiologic considerations for cervical cancer screening: a narrative review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2011;155(10):698–705.
238. Feng RM, Hu SY, Zhao FH, et al. Role of active and passive smoking in high-risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *J. Gynecol. Oncol.* 2017;28(5):e47.
239. Muñoz JP, Carrillo-Beltrán D, Aedo-Aguilera V, et al. Tobacco exposure enhances human papillomavirus 16 oncogene expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun signaling pathway in cervical cancer cells *Front. Microbiol.* 2018;9:1-12.
240. Maricic M, Stojanovic G, Pazun V, Stepović M, Djordjevic O, Macuzic et al. Relationship between socio-demographic characteristics, reproductive health behaviors, and health literacy of women in Serbia. *Front Public Health.* 2021;9:629051.
241. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst. Monographs* 2003;(31):3–13.

242. Saraiya M, Unger ER, Thompson TD, et al. US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(6):1-12.
243. Gravitt PE, Winer RL. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses.* 2017;9(10):267.
244. Nikolic N, Basica B, Mandic A, Surla N, Gusman V, Medic D, et al. E6/E7 mRNA Expression of the Most Prevalent High-Risk HPV Genotypes in Cervical Samples from Serbian Women. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(5):917.
246. Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1589–97.
247. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1579–88.
248. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening – second edition. 2015. http://www.gisci.it/documenti/news/EW0115451ENN_002.pdf. Accessed 13 Jan 2021.
249. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin. Microbiol. Infec.* 2020;26(5):579-583.
250. Castle PE, Kinney WK, Xue X, et al. Effect of several negative rounds of human papillomavirus and cytology Co-testing on safety against cervical cancer: an observational cohort study *Ann. Intern. Med.* 2018;168(1):20-29.
251. Mandelblatt JS, Lawrence WF, Womack SM, Jacobson D, Yi B, Hwang YT, et al. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. *JAMA.* 2002;287:2372-81.
252. McCaffery K, Waller J, Forrest S, Cadman L, Szarewski A, Wardle J. Testing positive for human papillomavirus in routine cervical screening: examination of psychosocial impact. *BJOG.* 2004;111:1437-43.
253. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol.* 2011;12:880-90.
254. Cuzick J, Swarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet.* 2003;362:1871-6.

255. Dijkstra MG, Van Niekerk D, Rijkaart DC, Van Kemenade FJ, Heideman DA, Snijders PJ, et al. Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: how to manage screen-positive women? A POBASCAM trial substudy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(1):55-63.
256. Rijkaart DC, Berkhof J, Van Kemenade FJ, Coupe VM, Hesselink AT, Rozendaal L, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer.* 2012;130:602-10.
257. Kyrgiou M, Kalliala IE, Mitra A, Fotopoulou C, Ghaem-Maghani S, Martin-Hirsch PP, et al. Immediate referral to colposcopy versus cytological surveillance for minor cervical cytological abnormalities in the absence of HPV test. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;26;1(1):CD009836.
258. Kang M, Ha SY, Cho HY, Chung DH, Kim NR, An J, et al. Comparison of papanicolaou smear and human papillomavirus (HPV) test as cervical screening tools: can we rely on HPV test alone as a screening method? An 11-year retrospective experience at a single institution. *J Pathol Transl Med.* 2020;54(1):112-118.
259. Ren H, Jia M, Zhao S, Li H, Fan S. Factors correlated with the accuracy of colposcopy-directed Biopsy : a systematic review and Meta-analysis. *J Investig Surg.* 2022;35(2):284-292.
260. Laganà AS, Chiantera V, Gerli S, Proietti S, Lepore E, Unfer V, et al. Preventing Persistence of HPV Infection with Natural Molecules. *Pathogens.* 2023;12(3):416.
261. Butterworth CE, Hatch KD, Macaluso M, et al. Folate Deficiency and Cervical Dysplasia. *JAMA.* 1992;267:528–533.
- Kwanbunjan K, Saengkar P, Cheeramakara C, et al. Low Folate Status as a Risk Factor for Cervical Dysplasia in Thai Women. *Nutr. Res.* 2005;25:641–654.
262. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000;130(2):129-32.
- Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull.* 1999;55(3):578-92.
263. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):101-9.
264. Lu MH, Hu LY, Du XX, Yang M, Zhang WY, Huang K, Li LA, Jiang SF, Li YL. An special epithelial staining agents: folic acid receptormediated diagnosis (FRD) effectively and conveniently screen patients with cervical cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(5):7830–6.

265. Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI, Glover TW. FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum Mol Genet.* 1996;5(2):187-195.
266. Flatley JE, McNeir K, Balasubramani L, Tidy J, Stuart EL, Young TA, et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(10):2782-9.
267. Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Kamemoto L, Goodman MT. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. *Cancer Causes Control.* 2003;14(9):859-70.
268. Popescu NC, DiPaolo JA, Amsbaugh SC. Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1987;44:58–62.
269. Butterworth CE. Effect of folate on cervical cancer: Synergism among risk factors. *Ann NY Acad Sci.* 1992;669:293–299.
270. Xiao S, Tang YS, Kusumanchi P, Stabler SP, Zhang Y, Antony AC. Folate Deficiency Facilitates Genomic Integration of Human Papillomavirus Type 16 DNA In Vivo in a Novel Mouse Model for Rapid Oncogenic Transformation of Human Keratinocytes. *J. Nutr.* 2018;148:389–400.
271. Piyathilake CJ, Henao OL, Macaluso M, Cornwell PE, Meleth M, Heimburger DC, et al. Folate is Associated with the Natural History of High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Res.* 2004;64:8788–8793.
272. Yang J, Yang A, Wang Z, Wang W, Wang Z, Wang Y, et al. Interactions between serum folate and human papillomavirus with cervical intraepithelial neoplasia risk in a Chinese population-based study. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(5):1034-1042.
273. Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer.* 2005;117(4):629–37.
274. Yeo AS, Schiff MA, Montoya G, Masuk M, van Asselt-King L, Becker TM. Serum micronutrients and cervical dysplasia in Southwestern American Indian women. *Nutr Cancer.* 2000;38(2):141–50.
275. Wideroff L, Potischman N, Glass AG, Greer CE, Manos MM, Scott DR et al. A nested case-control study of dietary factors and the risk of incident cytological abnormalities of the cervix. *Nutr Cancer.* 1998;30(2):130–6.

276. Weinstein SJ, Ziegler RG, Frongillo Jr EA, Colman N, Sauberlich HE, Brinton LA, et al. Low serum and red blood cell folate are moderately, but nonsignificantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in US women. *J Nutr.* 2001;131(7):2040–8.
277. Sedjo RL, Fowler BM, Schneider A, Henning SM, Hatch K, Giuliano AR. Folate, vitamin B12, and homocysteine status: Findings of no relation between human papillomavirus persistence and cervical dysplasia. *Nutrition.* 2003;19(6):497–502.
278. Potischman N, Brinton LA, Laiming VA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, et al. A case-control study of serum folate levels and invasive cervical cancer. *Cancer Res.* 1991;51(18):4785-4789.
279. Tong SY, Kim MK, Lee JK, Lee JM, Choi SW, Friso S, et al. Common polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in women with low serum folate and vitamin B12. *Cancer Causes Control.* 2011;22(1):63–72.
280. Butterworth CE Jr, Hatch KD, Gore H, Mueller H, Krumdieck CL. Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users of oral contraceptives. *Am J Clin Nutr.* 1982;35(1):73–82.
281. Abike F, Engin AB, Dunder I, Tapisiz OL, Aslan C, Kutluay L. Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284(1):209-14.
282. Pathak S, Bajpai D, Banerjee A, Bhatla N, Jain SK, Jayaram HN, et al. Serum one-carbon metabolites and risk of cervical cancer. *Nutr Cancer.* 2014;66(5):818-24.
283. Gong JM, Shen Y, Shan WW, He YX. The association between MTHFR polymorphism and cervical cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):7244.
284. Zhou X, Meng Y. Association between serum folate level and cervical cancer: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(4):871-7.
285. Myung SK, Ju W, Kim SC, Kim H; Korean Meta-analysis (KORMA) Study Group. Vitamin or antioxidant intake (or serum level) and risk of cervical neoplasm: a meta-analysis. *BJOG.* 2011;118(11):1285-91.
286. Tomita LY, D'Almeida V, Villa LL, Franco EL, Cardoso MA, Group BS. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism modify the association of dietary and circulating folate and vitamin B-6 with cervical neoplasia. *J Nutr.* 2013;143(12):2007-14.

287. Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Chen M, Badiga S, Siddiqui NR, et al. A higher degree of LINE-1 methylation in peripheral blood mononuclear cells, a one-carbon nutrient related epigenetic alteration, is associated with a lower risk of developing cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*. 2011;27(5):513-519.
288. Piyathilake CJ, Azrad M, Jhala D, Macaluso M, Kabagambe EK, Brill I, et al. Mandatory fortification with folic acid in the United States is not associated with changes in the degree or the pattern of global DNA methylation in cells involved in cervical carcinogenesis. *Cancer Biomark*. 2006;2(6):259-266.
289. Eichholzer M, Luthy J, Moser U, Fowler B. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med Wkly*. 2001;131(37-38):539-49.
290. Cummings D, Dowling KF, Silverstein NJ, Tanner AS, Eryilmaz H, Smoller JW, et al. A cross-sectional study of dietary and genetic predictors of blood folate levels in healthy young adults. *Nutrients*. 2017;9(9):994.
291. Intakes IoMSCotSEoDR. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington (DC): National Academies Press, 1998.
292. Guo S, Jiang X, Chen X, Chen L, Li X, Jia Y. The protective effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism against prostate cancer risk: evidence from 23 case-control studies. *Gene* 2015;565(1):90-95.
293. Yi K, Yang L, Lan Z, Xi M. The association between MTHFR polymorphisms and cervical cancer risk: a system review and meta analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;294(3):579-88
294. Karimi-Zarchi M, Moghimi M, Abbasi H, Hadadan A, Salimi E, Morovati-Sharifabad M, et al. Association of MTHFR 677C>T Polymorphism with Susceptibility to Ovarian and Cervical Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(9):2569-2577.
295. Silva NNT, Sabino Ad, Tafuri A. et al. Lack of association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia in Brazilian women. *BMC Med Genet*. 2019;20(1):100.
296. Bailey LB, Gregory JF. Folate Metabolism and Requirements. *J. Nutr*. 1999;129:779-782.
297. Herbert, V. The Role of Vitamin B12 and Folate in Carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1986;206:293-311.

298. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of Human Fibroblasts and Keratinocytes with Human Papillomavirus Type 16 DNA. *J. Virol.* 1987;61:1061–1066.
299. Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, et al. Human Papillomavirus Type 16 Integrations in Cervical Tumors Frequently Occur in Common Fragile Sites. *Cancer Res.* 2000;60:5916–5921.
300. Chandra S, Chandra RK. Nutrition, immune response, and outcome. *Prog Food Nutr Sci.* 1986;10:1–65.
301. Dhur A, Galan P, Hercberg S. Folate status and the immune system. *Prog Food Nutr Sci.* 1991;15:43–60.
302. Maggini S, Wintergerst ES, Beveridge S, Hornig DH. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr.* 2007;98(1):S29–S35.
303. Fenech M. Nutrition and genome health. *Forum Nutr.* 2007;60:49–65.
304. Piyathilake CJ, Macaluso M, Chambers MM, Badiga S, Siddiqui NR, Bell WC, et al. Folate and Vitamin B12 May Play a Critical Role in Lowering the HPV 16 Methylation-Associated Risk of Developing Higher Grades of CIN. *Cancer Prev. Res.* 2014;7:1128–1137.
305. Yenigul NN, Yazıcı Yılmaz F, Ayhan I. Can Serum Vitamin B12 and Folate Levels Predict HPV Penetration in Patients with ASCUS? *Nutr. Cancer.* 2021;73:602–608.
306. Piyathilake CJ, Badiga S, Paul P, Vijayaraghavan K, Vedantham H, Sudula M et al. Indian Women with Higher Serum Concentrations of Folate and Vitamin B12 Are Significantly Less Likely to Be Infected with Carcinogenic or High-Risk (HR) Types of Human Papillomaviruses (HPVs). *Int. J. Women's Health.* 2010;2:7–12.
307. Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Bell WC, Heimbürger DC, Partridge EE. Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009;2(7):658–64.
308. Silva NNT, Silva Santos AC, Carneiro CM, Lima AA. Association of serum folate and vitamin B12 with pre-neoplastic cervical lesions. *Clin Nutr ESPEN.* 2020;38:223–228.
309. Abike F, Engin AB, Dunder I, Tapisiz OL, Aslan C, Kutluay L. Human Papilloma Virus Persistence and Neopterin, Folate and Homocysteine Levels in Cervical Dysplasias. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284:209–214.

310. Kwaśniewska A, Tukendorf A, Goździcka-Józefiak A, Semczuk-Sikora A, Korobowicz E. Content of Folic Acid and Free Homocysteine in Blood Serum of Human Papillomavirus-Infected Women with Cervical Dysplasia. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002;23:311–316.
311. Ziegler RG, Weinstein SJ, Fears TR. Nutritional and genetic inefficiencies in one-carbon metabolism and cervical cancer risk. *J Nutr.* 2002;132:23455-95.
312. Kohaar I, Kumar J, Thakur N, Hussain S, Niyaz MK, Das BC. Homocysteine levels are associated with cervical cancer independent of methylene tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms in Indian population. *Biomarkers.* 2010;15(1):61-68.
313. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Selhub J. Case–control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B12, and cysteine as markers of cervical dysplasia. *Cancer (Phila)* 2000;89:376-82.
314. Thomson SW, Heimburger DC, Cornwell PE, Turner ME, Sauberlich HE, Fox LM, et al. Effect of total plasma homocysteine on cervical dysplasia risk. *Nutr Cancer.* 2000;37(2):128-33.
315. Weinstein SJ, Ziegler RG, Selhub J, Fears TR, Strickler HD, Brinton LA, et al. Elevated serum homocysteine levels and increased risk of invasive cervical cancer in US women. *Cancer Causes Control* 2001;12:317-24.
316. Hasan T, Arora R, Bansal AK, et al. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp Mol Med.* 2019;51:1–13.
317. Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Kamemoto L, Goodman MT. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. *Cancer Causes Control.* 2003;14(9):859-70.
318. Bai LX, Wang JT, Ding L, Jiang SW, Kang HJ, Gao CF, et al. Folate deficiency and FHIT hypermethylation and HPV 16 infection promote cervical cancerization. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(21):9313-7.
319. Li Q, Ding L, Jing N, Liu C, Yang Z, Chen F, et al. Folate deficiency and aberrant DNA methylation and expression of FHIT gene were associated with cervical pathogenesis. *Oncol Lett.* 2018;15(2):1963-72.
320. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Bertram CC, Killeen J, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(12):1275-80.
321. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised. *BMJ.* 1998;316:894–8.

322. Koklesova L, Mazurakova A, Samec M. et al. Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *EPMA Journal*. 2021;12:477–505.
323. Schroecksnadel K, Frick B, Fiegl M, Winkler C, Denz HA, Fuchs D. Hyperhomocysteinaemia and immune activation in patients with cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(1):47–53.
324. Sabihi S, Vahedpoor Z, Saraf-Bank S, et al. Effects of folate supplementation on recurrence and metabolic status of cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 in overweight and obese women: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2022;76:666–670.
325. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*. 2000;82:1332-1338.
326. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, Raifu AO, Koliopoulos G, Martin-Hirsh P, et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ*. 2008;337:1-11.
327. Kyrgiou M, Mitra A, Arbyn M, Paraskevaidi M, Athanasiou A, Martin-Hirsch PPL, et al. Fertility and early pregnancy outcomes after conservative treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015;9:CD008478.
328. Basu P, Taghavi K, Mogri S, Joshi S. Management of cervical premalignant lesions. *Curr Probl Cancer*. 2018;42(2):129–136.
329. McCredie MRE, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Mdney G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9:425-34.
330. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and risks for regression of CIN2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*. 2010;116(6):1373-80.
331. Loopik DL, Inthout J, Ebisch RMF, Melchers WJG, Massuger LFAG, Siebers AG, et al. The risk of cervical cancer after cervical intraepithelial neoplasia grade 3: a population-based cohort study with 80,442 women. *Gynecol Oncol*. 2020;157(1):195-201.

332. Tainio K, Athanasiou A, Tikkinen KAO, Aaltonen R, Hernandez JC, Glazer-Livson S, et al. Clinical course of untreated cervical intraepithelial neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;360:1-10.
333. Guedes AC, Zeferino LC, Syrjanen KJ, Brenna SMF. Short-term outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2; considerations for management strategies and reproducibility of diagnosis. *Anticancer Res*. 2010;30:2319-24.
334. Guedes AC, Brenna SM, Coelho SA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Zeferino LC. p16(INK4a) Expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17:1099-103.
335. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoreexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol*. 2007;128:208-17.
336. Kottaridi C, Kyrgiou M, Pouliakis A, et al. Quantitative Measurement of L1 Human Papillomavirus Type 16 Methylation for the Prediction of Preinvasive and Invasive Cervical Disease. *J Infect Dis*. 2017;215:764-71.
337. Kremer, Wieke W, et al. Role of FAM19A4/miR124-2 methylation analysis in predicting regression or non-regression of CIN2/3 lesions: a protocol of an observational longitudinal cohort study. *BMJ open* 2019;9(7):e029017.
338. Rizzuto I, Sampson V, Liou NS, Evans H. Early surgical treatment versus observational management for cervical intraepithelial neoplasia 2 (CIN2). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020;12:CD013807.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Дијагностички значај цитологије, колпоскопије, ХПВ теста и једно-карбонских метаболичких параметара у неинвазивној дијагностици цервикалних интраепителијалних неоплазија
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Поликлиничка гинеколошка служба УКЦ Војводине Нови Сад б) Одељење оперативне гинекологије Клинике за гинекологију и акушерство УКЦ Војводине в) Центар за лабораторијску медицину, УКЦ Војводине
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије, клиничка медицина, Медицински факултет Нови Сад
1. Опис података
1.1 Врста студије Истраживање је спроведено у форми проспективне опсервационе кохортне студије и обухватило је 183 испитаница са абнормалним налазом цитолошког бриса и/или сумњивом колопоскопском сликом. Након попуњавања анкетног упитника везаног за факторе ризика за ХПВ инфекцију, свакој испитаници је узет цервикални брис за цитолошко и ХПВ тестирање, извршен колпоскопски преглед и узет патохистолошки узорак. Одређивање једнокарбонских метаболичких параметара (вит Б9, вит Б12, хомоцистеин) вршено је из узорака крви.
1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене (колпоскопија), медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: ХПВ генотипизација г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: цервикални брисеви, узорци крви и патохистолошки узорак грлића материце

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту _____

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) **Excel** фајл, датотека _____

б) **SPSS** фајл, датотека _____

в) **PDF** фајл, датотека _____

г) **Текст** фајл, датотека _____

д) **JPG** фајл, датотека _____

е) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: велики број варијабли

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) 183 испитанице

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је _____

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

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

Напомене: _____

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

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип _____

б) корелационо истраживање, навести тип **корелација неинвазивних дијагностичких метода између контроле и испитиваних група**

ц) анализа текста, навести тип **анализом доступне литературе**

д) остало, навести шта _____

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

real time PCR апарат

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

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

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

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

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

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет добијених резултата је сматран валидним уколико су резултати тестирања били задовољавајући према упутству произвођача комерцијалних комплета намењених за

одређену врсту анализе. Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и валидацијом добијених података

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

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

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

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

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

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- a) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

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

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

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

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

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

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

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

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

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

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

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

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

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

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

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

Етички одбор Универзитетског Клиничког центра Војводине број 00-15/343 од 21. априла 2017. године.

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

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

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) **Подаци су анонимизирани**

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

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

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

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

Ауторство – некомерцијално - делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

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

Бранислава Батуран, branislava.baturan@mf.uns.ac.rs

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

Бранислава Батуран, branislava.baturan@mf.uns.ac.rs

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

Бранислава Батуран, branislava.baturan@mf.uns.ac.rs