

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ljiljana M. Božić

Utvrdjivanje povezanosti infekcija onkogenim  
virusima i HLA-G polimorfizama u etiologiji  
karcinoma glave i vrata

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Ljiljana M. Božić

The association of oncogenic viral infections and  
HLA-G polymorphisms in the etiology of head  
and neck carcinoma

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

## **MENTOR**

### **Prof. dr Aleksandra Knežević**

Redovni profesor, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, uža naučna oblast: medicinska mikrobiologija

---

## **KOMISIJA ZA ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:**

### **Prof. dr Tanja Jovanović**

Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, uža naučna oblast: medicinska mikrobiologija

### **Prof. dr Milovan Dimitrijević**

Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, uža naučna oblast: otorinolaringologija sa maksilofacijalnom hirurgijom

### **Prof. dr Branka Popović**

Vanredni profesor, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, uža naučna oblast: humana genetika

### **Doc. dr Ana Banko**

Docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, uža naučna oblast: medicinska mikrobiologija

### **Prof. dr Aleksandra Šmitran**

Vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjaluci, uža naučna oblast: medicinska mikrobiologija

## ZAHVALNICA

*Naučno-istraživački rad u okviru ove doktorske disertacije sproveden je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Aleksandri Knežević na nesebičnoj pomoći, ljudskoj podršci, znanju, angažovanju, strpljenju i razumijevanju u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Tanji Jovanović koja mi je omogućila istraživanje u laboratoriji za virusologiju, podršci, savjetima, te na ukazanom povjerenju.*

*Prof. dr Lazi Raninu i prof. dr Aleksandri Šmitran veliku zahvalnost dugujem na podstrijeku da istrajam na ovom zahtjevnom putu kao i na pruženom prijateljstvu.*

*Zahvalnost dugujem kolegicama Valentini Ćirković i Marini Šiljić, kolegi Mandić Milošu, te ostalim kolegama iz virusološke laboratorije Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu za pruženu pomoć i podršku u eksperimentalnim fazama izrade doktorske disertacije.*

*Za pomoć tokom izrade ove doktorske disertacije zahvalnost dugujem i kolegama sa Zavoda za patologiju i Kliniku za otorinolaringologiju Univerzitetsko-kliničkog centra Republike Srpske koji su učestvovali u prikupljanju bioloških materijala neophodnih za ovo istraživanje.*

*Takođe se zahvaljujem svojim radnim kolegama sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci koji su vjerovali u mene i prepoznali moj kvalitet.*

*Hvala mojim prijateljima na svakoj riječi podrške i ohrabrenja.*

*Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici. Hvala vam na razumijevanju i podršci koju ste mi pružili u toku mog školovanja i svim drugim životnim aspektima.*

*Posvećeno majci Jadranki*

# UTVRĐIVANJE POVEZANOSTI INFEKCIJA ONKOGENIM VIRUSIMA I HLA-G POLIMORFIZAMA U ETIOLOGIJI KARCINOMA GLAVE I VRATA

## Sažetak

**Uvod.** U etiologiji skvamocelularnih karcinoma glave i vrata (engl. Head and neck squamous cell carcinoma-HNSCC) ukazuje se na ulogu onkogenih virusa i to humanih papiloma virusa (HPV) Epštajn-Bar virusa (EBV) i BK i JC poliomavirusa, kao i značaju HLA-G polimorfizama.

**Cilj istraživanja.** Cilj studije je bio određivanje učestalosti infekcija i koinfekcija onkogenim virusima i HLA-G polimorfizama i njihova korelacija sa demografskim i bihevioralnim karakteristikama pacijenata i kliničkim statusom HNSCC.

**Materijal i metod.** Ispitivano je 100 uzoraka tkiva HNSCC. Single PCR, Nested PCR i Real-time PCR su rađeni za dokazivanje HPV i EBV, a seminested PCR za poliomaviruse. Genotipizacija HPV je rađena metodom sekvenciranja po Sangeru, a EBV genotipizacija Nested PCR metodom. Određivanje HLA-G tipova rađeno je metodom sekvenciranja po Sangeru.

**Rezultati.** Učestalost HPV je bila 27%, EBV 20%, BKV 3% i JCV 0%. Dokazano je 5 HPV genotipova sa značajnom učestalošću visoko onkogenih tipova (84%) i to tipa HPV 16 (57,1%). Utvrđena su oba EBV tipa sa dominacijom EBV-1 (93,75%). HPV i EBV su značajno češći kod muškaraca od 50 do 69 godina sa karcinomom larinksa patohistološkog gradusa 2. Pojedinačna infekcija je utvrđena kod 28% uzoraka, a HPV infekcija je značajno najčešća. Koinfekcije su potvrđene kod 11% uzoraka, HPV/EBV koinfekcija je najzastupljenija ali bez razlike u učestalosti vrste koinfekcija. Utvrđeno je 6 HLA-G tipova, gde je \*01:01:01 najučestaliji (56,66%), ali bez razlike u zastupljenosti HLA-G tipova i prisustva pojedinačnih infekcija i koinfekcija onkogenim virusima.

**Zaključak.** Pokazana je povezanost prisustva infekcije onkogenim virusima sa karcinomima glave i vrata, ali nije utvrđena korelacija HLA-G polimorfizama sa prisustvom infekcija i koinfekcija onkogenim virusima u HNSCC.

**Ključne riječi:** Humani papiloma virus (HPV), Epštajn-Bar virus (EBV), poliomavirusi, karcinomi glave i vrata, HLA-G polimorfizmi, onkogeni virusi, koinfekcije

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

**UDK broj:**

# THE ASSOCIATION OF ONCOGENIC VIRAL INFECTIONS AND HLA-G POLYMORPHISMS IN THE ETIOLOGY OF HEAD AND NECK CARCINOMA

## Abstract

**Introduction.** The oncogenic viruses, namely Human papillomaviruses (HPV), Epstein-Barr virus (EBV) and BK and JC polyomaviruses, as well as HLA-G polymorphisms may play significant role in the etiology of Head and Neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

**Aim.** Determination of the frequency of oncogenic virus infections and coinfections and HLA-G polymorphisms and their correlation with the demographic and behavioral characteristics of patients and clinical status of HNSCC.

**Material and method.** 100 HNSCC tissue samples were examined. Single, Nested and Real-time PCR were used to detect HPV and EBV, and seminested PCR for polyomaviruses. HPV and EBV genotyping were done by Sanger sequencing method, and Nested PCR, respectively. Determination of HLA-G types was done by Sanger sequencing method.

**Results.** The prevalence of HPV was 27%, EBV 20%, BKV 3% and JCV 0%. Five HPV genotypes were identified with a significant frequency of high-risk types (84%), namely HPV type 16 (57.1%). Both EBV types were detected with a predominance of EBV-1 (93.75%). HPV and EBV are significantly more common in men aged 50 to 69 with laryngeal cancer of pathohistological grade 2. Single infection was found in 28% of samples with a significant prevalence of HPV infection. Co-infections were confirmed in 11% of samples. HPV/EBV co-infection is the most common but without a difference in the frequency of co-infection type. Six HLA-G types were identified, where \*01:01:01 is the most common (56.66%), with no difference between HLA-G types and the presence of single infections and co-infections.

**Conclusion.** The association of the presence of oncogenic virus infection with HNSCC has been shown, but without the correlation between HLA-G polymorphisms and presence of oncogenic virus infections and coinfections in HNSCC.

**Key words:** Human papilloma viruses (HPV), Epstein-Barr virus (EBV), polyomaviruses, Head and Neck cancers, HLA-G polymorphisms, oncogenic viruses, co-infections

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Molecular medicine

**UDK No.:**

# Sadržaj

1	Uvod .....	1
1.1	Karcinomi glave i vrata .....	1
1.2	Epidemiologija karcinoma glave i vrata .....	2
1.3	Klinička slika i dijagnoza HNSCC.....	4
1.3.1	TNM klasifikacija.....	5
1.4	Etiologija karcinoma glave i vrata.....	7
1.5	Humani papiloma virus (HPV).....	8
1.5.1	Građa virusne čestice i HPV taksonomija .....	8
1.5.2	Životni ciklus HPV .....	11
1.5.3	HPV karcinogeneza .....	12
1.6	Epštajn-Bar virus (EBV) .....	14
1.6.1	Građa virusne čestice i EBV taksonomija.....	14
1.6.2	Životni ciklus EBV .....	15
1.6.3	EBV karcinogeneza .....	16
1.7	Humani poliomavirusi.....	16
1.7.1	Građa virusne čestice i taksonomija poliomavirusa .....	17
1.7.2	Životni ciklus poliomavirusa .....	17
1.7.3	Karcinogeneza poliomavirusa.....	18
1.8	Koinfekcije onkogenim virusima u HNSCC.....	19
1.9	Molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti.....	19
1.9.1	HLA-G.....	20
1.10	Radna hipoteza .....	24
2	Ciljevi istraživanja .....	25
3	Materijal i metode .....	26
3.1	Materijal .....	26
3.1.1	Pacijenti .....	26
3.1.2	Klinički uzorci .....	26
3.2	Metode .....	27
3.2.1	Izolacija DNK iz parafinskih listića tkiva i svježeg tkiva .....	27
3.2.2	Dokazivanje i genotipizacija HPV .....	31

3.2.3	Dokazivanje i genotipizacija EBV .....	35
3.2.4	Dokazivanje BKV DNK seminested PCR metodom .....	37
3.2.5	Dokazivanje JCV DNK seminested PCR metodom .....	37
3.2.6	Određivanje HLA G polimorfizama .....	38
3.3	Statistička obrada podataka .....	40
3.4	Grafička obrada priloga iz literature.....	40
4	Rezultati.....	41
4.1	Demografske i bihevioralne karakteristike pacijenata .....	41
4.2	Kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata .....	42
4.3	Kvantitet i kvalitet izolovane DNK .....	45
4.4	Učestalost HPV u tkivima karcinoma glave i vrata .....	46
4.4.1	Učestalost HPV klasičnom PCR metodom .....	46
4.4.2	Učestalost HPV Nested PCR metodom.....	47
4.4.3	Kvantitacija HPV DNK Real-time PCR metodom.....	49
4.4.4	Poređenje metoda za dokazivanje HPV.....	49
4.4.5	Prisustvo/odsustvo HPV u odnosu na demografske i bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC.....	50
4.4.6	Učestalost HPV genotipova u tkivima karcinoma glave i vrata .....	53
4.5	Učestalost EBV u tkivima karcinoma glave i vrata.....	56
4.5.1	Učestalost EBV i EBV genotipova.....	56
4.5.2	Kvantitacija EBV DNK u uzorcima karcinoma glave i vrata.....	56
4.5.3	Ukupna učestalost EBV infekcije u tkivima karcinoma glave i vrata .....	57
4.5.4	Poređenje metoda za dokazivanje EBV .....	57
4.5.5	Prisustvo/odsustvo EBV u odnosu na demografske i bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC.....	57
4.6	Učestalost humanih poliomavirusa u tkivima karcinoma glave i vrata.....	59
4.6.1	Učestalost BKV u tkivima karcinoma glave i vrata.....	59
4.6.2	Učestalost JCV u tkivima karcinoma glave i vrata .....	61
4.7	Pojedinačne infekcije i koinfekcije onkogenim virusima.....	61
4.8	Određivanje HLA-G polimorfizama u tkivima karcinoma glave i vrata.....	66
4.8.1	Učestalost HLA-G genotipova kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomima glave i vrata .....	66
4.8.2	Učestalost infekcije onkogenim virusima u odnosu na HLA-G genotipove.....	70
4.8.3	Učestalost HLA-G polimorfizama u odnosu na koinfekcije onkogenim virusima .....	73
5	Diskusija.....	75



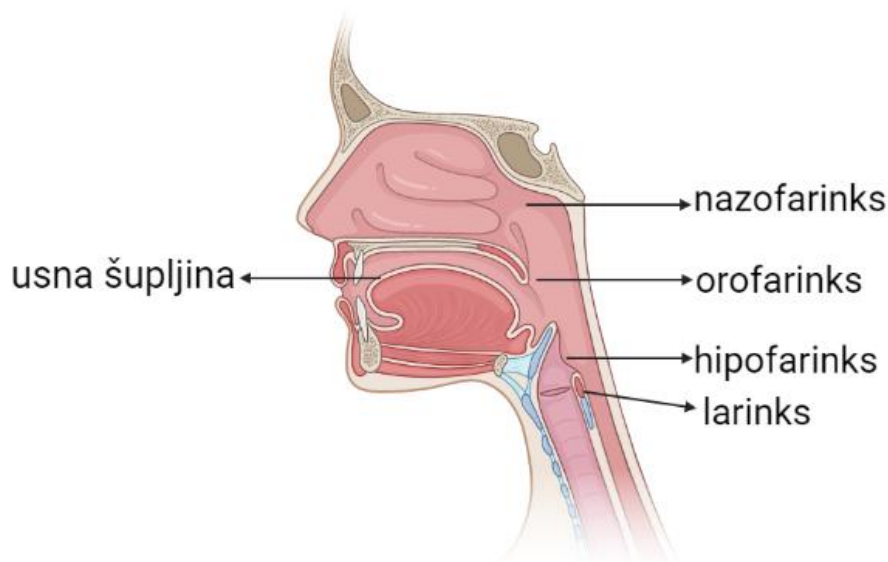
6	Zaključci .....	93
7	Literatura .....	95

# 1 Uvod

Posljednjih decenija, brojna istraživanja usmjerena su ka ispitivanju uloge mikroorganizama, posebno virusa u etiologiji karcinoma ljudi različitih lokalizacija, pa tako i karcinoma glave i vrata. Pored toga, studije ukazuju i na mogućnost postojanja povećane osjetljivosti ili predispozicije ljudi za razvoj karcinoma koja je uslovljena prije svega genima odgovornim za imunski odgovor.

## 1.1 Karcinomi glave i vrata

Karcinomi glave i vrata predstavljaju heterogenu grupu oboljenja koja mogu biti lokalizovana u usnoj duplji, orofarinksu, hipofarinksu, larinksu, nazofarinksu i sinusima (1, 2) (Slika 1).



**Slika 1.** Anatomaska lokalizacija karcinoma glave i vrata (3) - adaptirano primjenom web alata BioRender.com

U više od 90% slučajeva radi se o malignim tumorima porijeklom od pločasto-slojevitog epitela gornjeg aerodigestivnog trakta odnosno skvamocelularnim karcinomima glave i vrata (engl. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma-HNSCC*) (4).

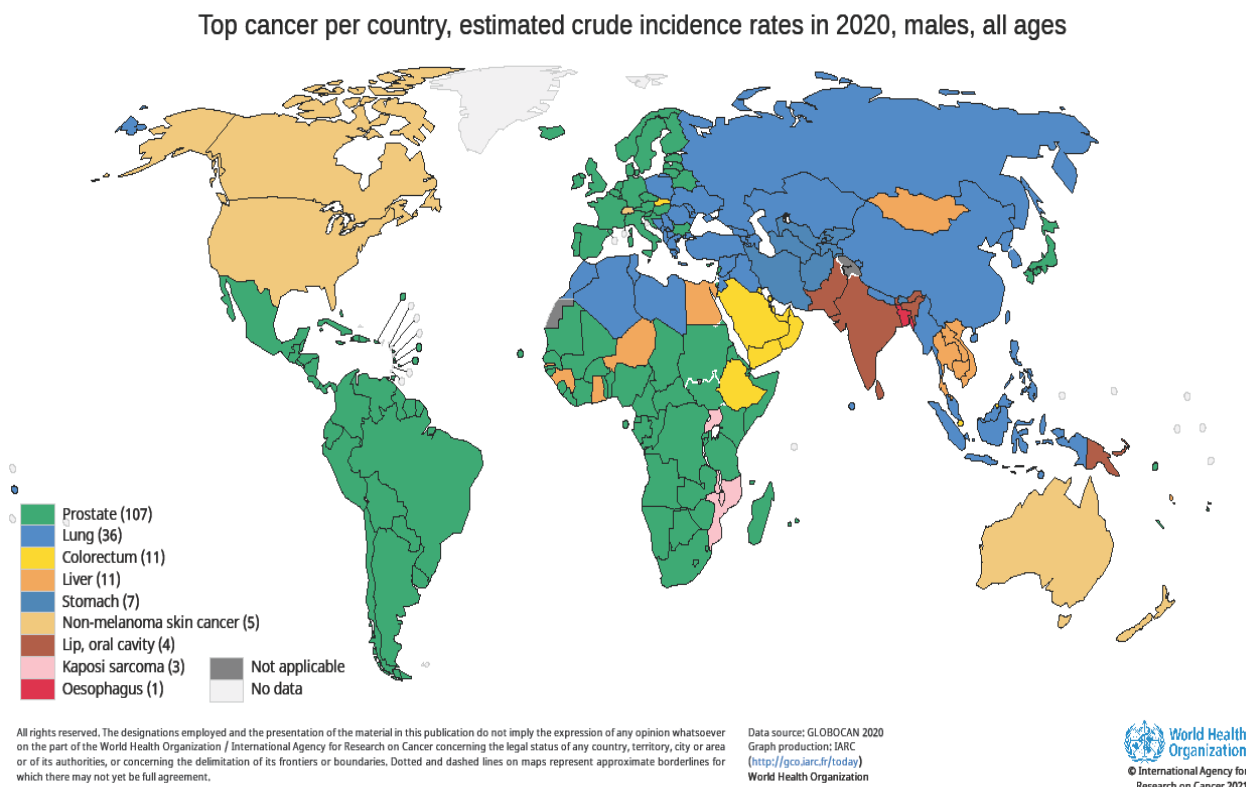
U odnosu na porijeklo tkiva od koga su nastali karcinomi glave i vrata se klasifikuju na karcinome žljezdanog tkiva (adenokarcinomi), tumore mekih tkiva, tumore tkiva koja stvaraju melanin, sarkome i limfome (3). Ukoliko se dijagnostikuju u ranoj fazi bolesti, petogodišnje preživljavanje pacijenata iznosi 75%. Međutim većina pacijenata u momentu postavljanja dijagnoze HNSCC ima metastatsku bolest što smanjuje petogodišnje preživljanje na 35% (5).

## 1.2 Epidemiologija karcinoma glave i vrata

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije, maligna oboljenja predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti kod ljudi, koji uključuje i karcinome glave i vrata (5). U 2019. godini, maligna oboljenja su predstavljala prvi ili drugi uzrok smrtnosti kod pacijenata mlađih od 70 godina života (6).

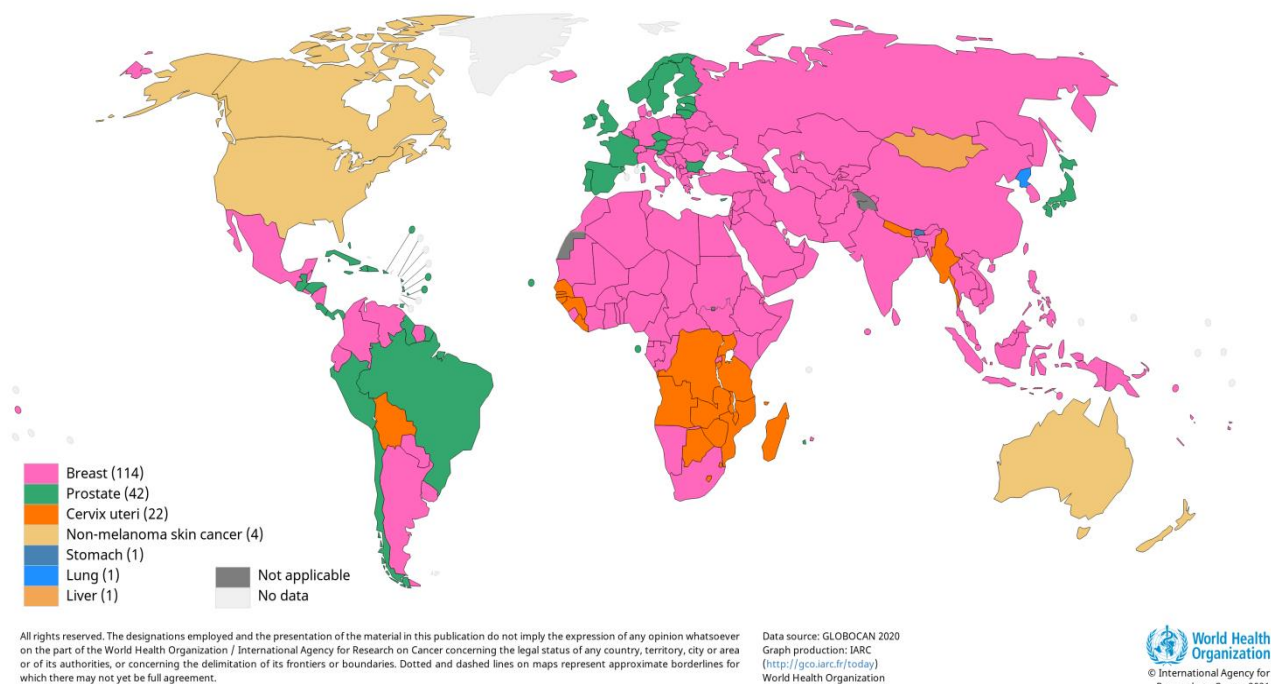
Podaci o učestalosti raka su pokazali da je najveća stopa oboljevanja od karcinoma u 2020. godini bila na Azijskom kontinentu (7). U odnosu na pol, u 2020. godini stopa incidencije svih karcinoma bila je veća kod muškaraca u odnosu na žene (222 i 186 na 100 000). Takođe, stopa smrtnosti je bila veća kod muškaraca nego kod žena (120,8 i 84,2 na 100 000) pri čemu je zapaženo da je najveća smrtnost bila među muškarcima istočne Evrope u odnosu na ostatak svijeta (6). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije i Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer-IARC*), prema oboljevanju i umiranju kod muške populacije najčešće lokalizacija je rak pluća, a kod ženske populacije rak dojke (Slika 2 i 3) (7).

Karcinomi glave i vrata su česta maligna oboljenja od kojih svake godine oboli oko 600 000 osoba širom svijeta (8). HNSCC je šesti najčešći karcinom kod ljudi, a karakterišu ga visok morbiditet i mortalitet (5). Zbog specifične lokalizacije, liječenje HNSCC zahtijeva multidisciplinarni pristup specijalista maksilofacijalne hirurgije i otorinolaringologije, radioterapije, onkologije te patologije.



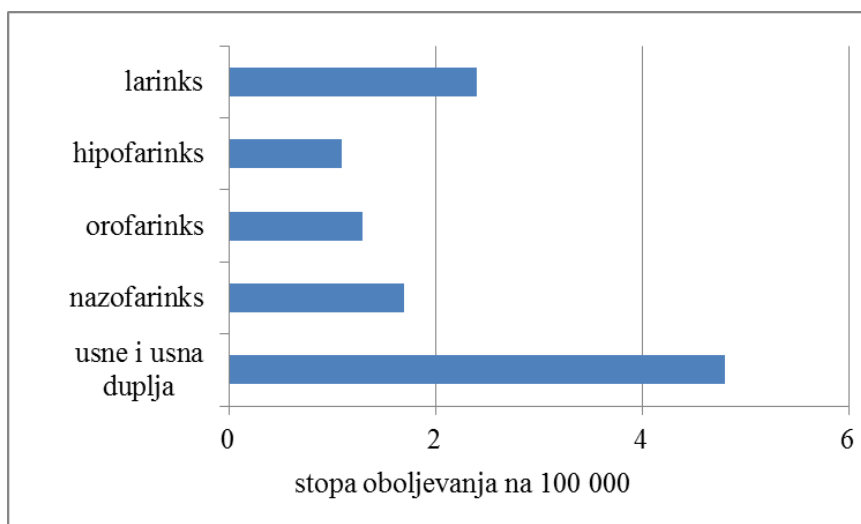
**Slika 2.** Stopa oboljevanja od malignih tumora kod muškaraca u 2020. godini (7)

Top cancer per country, estimated crude incidence rates in 2020, both sexes, all ages



**Slika 3.** Stopa oboljevanja od malignih tumora kod žena u 2020. godini (7)

Smatra se da će do 2030. godine karcinomi glave i vrata predstavljati veliki javno-zdravstveni problem i da će broj oboljelih da premaši broj od jedan milion (9). Od karcinoma glave i vrata češće oboljevaju muškarci nego žene, a najčešće se dijagnostikuje kod pacijenata između 50. i 70. godine života. U odnosu na anatomsku regiju karcinomi glave i vrata su najčešće lokalizovani unutar regije usne duplje (Grafikon 1) (7).



**Grafikon 1.** Stopa oboljevanja stanovništva od karcinoma usana i usne duplje, nazofarinksa, orofarinksa, hipofarinksa i larinksa u 2020. godini (7)

U 2020. godini prema epidemiološkim podacima uočava se porast oboljevanja muškaraca od karcinoma glave i vrata u odnosu na žene (6). Standardizovana stopa oboljevanja od karcinoma usne duplje i usana za muškarce je bila 6/100 000 a za žene 2,3/100 000, dok je standardizovana stopa smrtnosti za muškarce bila 2,8 a za žene 1. Ove registrovane stope su bile veće u odnosu na stope oboljevanja i mortaliteta za karcinome druge lokalizacije, tako da karcinomi usne duplje predstavljaju vodeću lokalizaciju oboljevanja i umiranja i kod muškaraca i kod žena. Standardizovana stopa oboljevanja i smrtnosti od karcinoma orofarinksa kod muškaraca bila je 1,8/100 000 odnosno 0,9/100 000, a kod žena 0,4/100 000 odnosno 0,2/100 000. Stopa oboljevanja i smrtnosti od karcinoma nazofarinksa kod muškaraca je bila 2,2/100 000 odnosno 1,0/100 000, dok je kod žena stopa oboljevanja i smrtnosti bila niža u odnosu na muškarce (0,8/100 000 odnosno 0,5/100 000). Zabilježen je i veći broj oboljelih i umrlih muškaraca od karcinoma hipofarinksa (1,6/100 000 odnosno 0,7/100 000) u odnosu na žene za koje su navedene stope bile 0,3/100 000 odnosno 0,1/100 000. Karcinom larinksa je takođe češće dijagnostikovano kod muškarca nego kod žena, od kog su muški pacijenti češće i umirali u odnosu na ženske pacijente. Standardizovana stopa oboljevanja za muškarce je bila 3,6/100 000 dok je stopa mortaliteta bila 1,9. Istovremeno, kod žena stopa oboljevanja je bila 0,5, a stopa smrtnosti 0,3 na 100 000 stanovnika.

U odnosu na geografsku distribuciju, karcinomi usne duplje su najčešći u Južnoj Centralnoj Aziji (Indija, Šri Lanka, Pakistan), zatim u Melaneziji (Papua, Nova Gvineja) sa visokom učestalošću oboljevanja kod oba pola. U drugim dijelovima svijeta, istočnoj i zapadnoj Evropi, Australiji i Novom Zelandu češći su karcinomi orofarinksa (6).

Među 40 zemalja Evrope, Bosna i Hercegovina se svrstava u grupu sa srednjim rizikom oboljevanja (nalazi se na 25. mjestu) od karcinoma usne duplje, orofarinksa, nazofarinksa, hipofarinksa i larinksa. U Bosni i Hercegovini je prema podacima Evropskog informacionog sistema za rak, najveća stopa oboljevanja u 2020. bila od karcinoma larinksa (Tabela 1) (7).

**Tabela 1.** Stopa oboljevanja od HNSCC u Bosni i Hercegovini u 2020. godini (7)

Anatomska lokalizacija karcinoma glave i vrata	Stopa oboljevanja na 100.000 stanovnika	
	muškarci	žene
Usne i usna duplja	8,8	3,4
Nazofarinks	0,75	0,48
Orofarinks	2,5	0,54
Hipofarinks	3,2	0,54
Larinks	14,6	2,4

### 1.3 Klinička slika i dijagnoza HNSCC

Simptomatologija kod HNSCC zavisi od lokalizacije i toga koliko se karcinom proširio. Karcinomi glave i vrata koji su lokalizovani u usnoj duplji, orofarinksu, hipofarinksu i larinksu manifestuju se pojavom bola u usnoj duplji, otežanim žvakanjem i gutanjem, kod pacijenata se javlja promuklost, gušobolja, zadah iz usta, bol u ušima, otežano disanje te kašalj. Često, pacijenti ove simptome ne smatraju značajnim, te HNSCC budu kasno otkriveni (10).

Tumori glave i vrata se dijagnostikuju na osnovu anamneze, kliničkog pregleda i patohistološke verifikacije. Pravilno uzeta anamneza i klinička slika su dovoljni za postavljanje sumnje na malignitet. Dijagnostički postupci koji omogućavaju postavljanje dijagnoze HNSCC su klinički pregled ljekara specijaliste otorinolaringologije i maksilofacijalne hirurgije koji utvrđuju lokalizaciju tumora, izgled, dijametar, zahvaćenost okolnih struktura te stiču utisak o vrsti tumora. Tumor meke konzistencije je uglavnom benignan, dok tumor čvrste konzistencije može biti benignan ili malignan. Obavezan dio pregleda je palpacija limfnih čvorova vrata od submentalnih preko submandibularnih, jugularnih limfnih čvorova (gornji, srednji i donji) te limfnih čvorova u zadnjem i prednjem trouglu vrata. Za dobijanje preciznih informacija o lokalnoj i regionalnoj proširenosti, te udaljenoj proširenosti primjenjuju se laringoskopija, panendoskopija, ezofagoskopija, fiber-direktoskopija te metode vizuelizacije (kompjuterizovana tomografija-CT, magnetna rezonanca-MR, pozitronska emisiona tomografija-PET-CT, ultrazvučni pregled) (3, 10).

Definitivna dijagnoza se potvrđuje patohistološkom analizom uzorka prije uvođenja terapije. Patohistološki izvještaj prikazuje podatke o: patohistološkom gradusu tumora, dijametru tumora, dubini tumorske invazije, takođe se navode i putevi širenja tumora (perineuralno, limfatično širenje, ekstrakapsularna invazija, vaskularno širenje), ekscizionim marginama (margina manja od 1mm se smatra pozitivnom), te da li su zahvaćeni limfni nodusi (broj i nivo zahvaćenih limfnih čvorova) (11). Maligne tumore karakteriše infiltrativan način rasta, tumorske ćelije brzo rastu, tumoru nedostaje kapsula, mitoze su brojne, jedro karakteriše polimorfan izgled, odnos citoplazma/jedro je promijenjen u prilog jedra. Klinički, maligne tumore karakteriše brz rast, česte su metastaze i recidivi, a u odnosu na dob pacijenta pretežno se razvijaju kod starijih pacijenata (3).

Za procjenu agresivnosti tumorske lezije određuje se patohistološka klasifikacija tumora, odnosno stepen diferentovanosti tumorskih ćelija. Prema izgledu i diferentovanosti ćelija, tumori se dijele na dobro, srednje i loše diferentovane tumore (gradus 1, 2 i 3). Za dobro diferentovan tumor (gradus 1) je karakterističan uglavnom neizmjenjen pločastoslojevit epitel koji ima više od 75% keratinizacije, dok ćelije srednje diferentovanog tumora (gradus 2) brže rastu, prisutan je jedarni polimorfizam, abnormalne mitoze i slabiji stepen keratinizacije između 25-50%. Ukoliko je tumor slabo diferentovan (gradus 3) ćelije su nezrele sa minimalnom keratinizacijom (manje od 25%) i atipičnim mitozama (12). Stepem diferentovanosti ćelija nije pokazatelj kliničkog ponašanja tumora, međutim za tumore koji su slabo diferentovani je karakteristično da imaju lošiju prognozu, a i veća je učestalost regionalnih metastaza kod ovog tipa tumora.

Uznapredovali tumori sa patohistološki verifikovanim nalazom liječe se kombinovanom terapijom, hirurgije i radioterapije, a ukoliko su prisutne cervikalne metastaze hirurško liječenje uključuje i disekciju vrata. Za izbor terapije važno je odrediti i stadijum bolesti. Određivanje stadijuma bolesti se vrši nakon kliničkog pregleda i nakon operativnog zahvata pri čemu se vrši i patohistološka verifikacija tumora. Na osnovu svih ovih analiza se utvrđuje koliko se tumor proširio te koji bi terapijski pristup (hirurgija, radioterapija, hemoterapija) dao najbolje rezultate i produžio preživljavanje pacijenta (13).

### 1.3.1 TNM klasifikacija

Da bi se procijenila proširenost tumora koristi se TNM klasifikacija (T-primarni tumor-veličina i lokalna raširenost; N-status regionalnih limfnih čvorova-broj zahvaćenih limfnih čvorova; M-prisustvo/odsustvo udaljenih metastaza), koja je prihvaćena od strane Međunarodne unije za borbu protiv raka (franc. *Union Internationale Contre le Cancer*-UICC) 1953. godine, a američki ljekari su ga usvojili 1959. godine i formirali AJCC sistem za određivanje stadija bolesti.

Trideset godina kasnije, UICC i AJCC su usaglasili zajednički sistem. Podjela veličine tumora (T) uslovljena je lokalizacijom tumora, dok je klasifikacija regionalnih metastaza u limfne čvorove vrata (N) i udaljenih metastaza (M) ista za skvamocelularne karcinome glave i vrata (Tabela 2) (14).

**Tabela 2.** Klasifikacija regionalnih metastaza u limfne čvorove vrata i udaljenih metastaza (14)

<b>T stadijum</b>	
TX	tumor se ne može ustanoviti
T0	nema znakova primarnog tumora
Tis	karcinom <i>in situ</i>
T1	tumor do 2 cm u najvećem promjeru ili manje i 5 mm ili manje dubina invazije
T2	tumor $\leq 2$ cm u najvećoj dimenziji i $> 5$ mm ali ne $> 10$ mm dubine invazije ili tumor $> 2$ cm ali ne više od 4 cm u najvećoj dimenziji i dubinom invazije ne više od 10 mm
T3	tumor veći od 4 cm u najvećoj dimenziji ili dubina invazije više od 10 mm
T4a	-tumor infiltrira kroz korteks mandibule ili maksilarni sinus ili kožu lica
T4b	-tumor infiltrira mastikatorni prostor, pterigoidne nastavke ili bazu lobanje ili obuhvata unutrašnju karotidnu arteriju
<b>N stadijum</b>	
Nx	status regionalnih limfnih čvorova nepoznat
N0	metastaze u regionalnim limfnim čvorovima vrata nisu prisutne
N1	prisutna metastaza u jednom ipsilateralnom čvoru manja od 3 cm
N2	N2a prisutna metastaza u jednom ipsilateralnom čvoru $> 3$ cm $< 6$ cm u najvećoj dimenziji bez ektranodalnog širenja N2b prisutne metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova $\leq 6$ cm u najvećoj dimenziji bez ektranodalnog širenja N2c metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima $\leq 6$ cm u najvećoj dimenziji bez ektranodalnog širenja
N3	N3a prisutne metastaze su veće od 6 cm u najvećoj dimenziji bez ektranodalnog širenja N3b metastaza u jednom ili multiplim limfnim čvorovima s kliničkim ektranodalnim širenjem
<b>M stadijum</b>	
MX	udaljene metastaze se ne mogu ustanoviti
M0	udaljene metastaze nisu prisutne
M1	udaljene metastaze su prisutne

Za TNM klasifikaciju se analiziraju klinički i patohistološki parametri što podrazumijeva klinički pregled, radiološka snimanja te patohistološki nalaz. Za utvrđivanje kliničkog stadijuma bolesti, tj. procjenu zahvaćenosti limfnih čvorova (N), radi se pregled pacijenta, rutinske metode snimanja, kao što su ultrazvuk, CT, MR te PET-CT. Na ovaj način se vrši i procjena prisustva udaljenih metastaza (M). Stadijum bolesti se utvrđuje na osnovu pojedinačnog T, N i M. U zavisnosti od kliničkog i patohistološkog nalaza bolest može biti grupisana u četiri stadija, te se na osnovu ovog nalaza procjenjuje odgovor pacijenta na terapiju i njegovo preživljavanje.

Stadijum bolesti kod karcinoma glave i vrata po UICC sistemu:

- Stadijum 0 – Tis N0 M0
- Stadijum I - T1 N0 M0
- Stadijum II - T2 N0 M0
- Stadijum III – T3 N0 ili T1-3 N1 M0
- Stadijum IV - T4 N0-2 M0; T1-4 N2-3 M0; T1-4 N0-3 M1
- Stadijum IVa - T4a N0-1 M0; T1-3, T4a N2 M0
- Stadijum IVb - bilo koji T N3 M0; T4b bilo koji N M0
- Stadijum IVc – bilo koji T bilo koji N M1 (14).

## 1.4 Etiologija karcinoma glave i vrata

Dosadašnja saznanja o uzrocima nastanka HNSCC ukazuju na složenu etiologiju bolesti. Pacijenti su prije postavljanja dijagnoze HNSCC izloženi brojnim faktorima rizika koji mogu uticati na malignu transformaciju ćelije. Smatra se da konzumacija alkohola i duvana, biološki agensi (virusi), ishrana siromašna vitaminima, loša oralna higijena, neadekvatni protetski radovi jesu najvažniji za nastanak karcinoma glave i vrata (15-19). Među faktore rizika se svrstava i profesionalna izloženost azbestu, prašini, pesticidima, aromatičnim ugljovodonicima, te rad u industriji (20). Kod pojedinih pacijenata bolest nastaje zbog povećane osjetljivosti na mutagene i karcinogene koji dovode do grešaka koje nastaju u toku replikacije DNK koje se ne mogu popraviti zbog oštećenja mehanizama popravke DNK što može biti odlika malignih tumora.

Smatra se da karcinomi glave i vrata u najvećem broju slučajeva nastaju zbog genskih poremećaja usljed dugotrajnog izlaganja hroničnim karcinogenima kao što su alkohol i pušenje duvana. Procijenjeno je da je rizik za pojavu HNSCC deset puta veći kod osoba koje koriste duvan (pušači) u odnosu na osobe koje nisu konzumenti duvana (nepušači) (21). Jedinjenja duvana koja su priznata kao kancerogena od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka su: benzo-a-piren, 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon; N-nitrozonornikotin (22).

Proizvodi duvana koji su u upotrebi su: cigarete, bidis, chutta, i kretek. Najčešće korišćen duvanski proizvod su cigarete. Kancerogena jedinjena duvana kao i njihovi metaboliti mogu formirati kovalentne veze sa DNK što rezultuje pojavom DNK adukata (segmenti DNK koji su vezani za hemijsko jedinjenje koje uzrokuje karcinom). Greške koje nastaju u kodiranju i nastale mutacije dovode do aktivacije ćelijskih onkogeno kao što je *K-ras*, a mogu i da izazovu deaktivaciju tumor supresorskih gena kao što je npr. p53. Zbog ovoga se mijenja mehanizam kojim se kontroliše normalan ćelijski rast što vodi nastanku karcinoma. Takođe, kancerogene duvanske supstance kada se vežu za ćelijske receptore mogu mijenjati protein-kinaza A signalni put što djeluje na kontrolne mehanizme ćelijskog rasta. U ovom slučaju apoptoza izostaje, izražene su angiogeneza i transformacija što je karakteristika tumorski izmijenjenih ćelija. Takođe, zbog djelovanja duvanskih kancerogenih jedinjenja pojačava se metilacija (mehanizam epigenetske regulacije koji treba da inhibira prepisivanje dijelova genoma koji mogu narušiti osobine ćelije) što inaktivira tumor supresorske gene, a to isto povećava mogućnost kancerogeneze (23).

Pored konzumacije duvana, i prekomjerno konzumiranje alkohola povećava rizik za razvoj HNSCC (24). Davne 1988. godine IARC je potvrdila da je alkohol faktor rizika za razvoj karcinoma usne duplje, orofarinksa, hipofarinksa i larinksa (25). Pokazano je da acetaldehid kao razgradni produkt oksidacije etanola ometa sintezu i reparaciju DNK molekule što za posljedicu ima sintezu nefunkcionalnih i izmijenjenih proteina (24). Enzimi koji su odgovorni za reparaciju DNK i metilaciju



su strukturno modifikovani. Acetaldehid sa DNK formira DNK adukte koji mogu da proizvode reaktivne oblike kiseonika (ROS). Pored ovoga mikroorganizmi u usnoj šupljini dovode do oksidacije etanola u acetaldehid te sprečavaju njegovo pretvaranje u acetat. Iz tog razloga njegova koncentracija u pljuvački je 10-100 puta veća u odnosu na njegovu količinu u krvi (26). Dakle, povišeni nivoi acetaldehida u salivi povećavaju rizik za HNSCC (24). Kao i kancerogena jedinjenja duvana, etanol i acetaldehid mijenjaju ekspresiju onkogenih i tumor supresorskih gena jer dovode do DNK hipometilacije (dovodi do aktivacije latentnih virusa ili onkogenih). Utvrđeno je takođe da etanol indukuje stvaranje toksičnih metabolita koji dovode do promjena ćelijskog ciklusa jer smanjuje nivo retinoične kiseline zbog povećanog metabolizma koji je posredovan sa citohromom P450 2E1. Konzumacija alkohola smanjuje apsorpciju folata što za posledicu ima inhibiciju stvaranja metionin sintaze (26). Sve ovo pokazuje da prekomjerna upotreba alkohola povećava rizik oboljevanja od karcinoma. Dakle, količina konzumiranog alkohola je značajniji faktor rizika nastanak nekog od karcinoma glave i vrata, a ne koncentracija etanola u alkoholnom napitku.

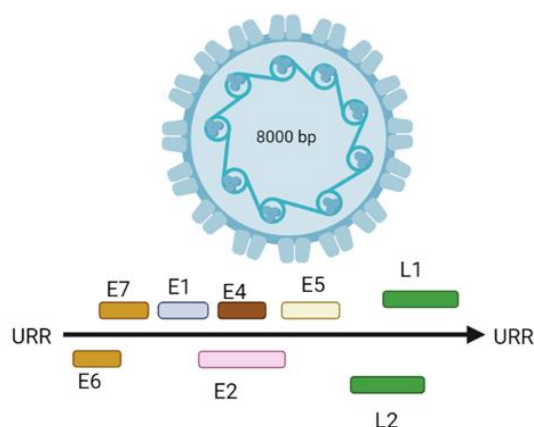
Kod osoba koje konzumiraju duvan i alkohol prisutno je sinergističko dejstvo ova dva faktora rizika, što znači da se njihovo djelovanje pojačava kod konzumenata, a samim tim i rizik za oboljevanje obzirom da etanol djeluje kao rastvarač za brojne druge kancerogene (1). Sinergijsko dejstvo alkohola i duvana se ispoljava na način da dolazi do povećanja acetaldehida u pljuvački (24) koji je genotoksičan i kancerogen (22). Nivoi acetaldehida u dimu cigareta obično se kreću od 500µg do 1000µg po cigareti. Alkoholno piće sadrži 10 do 15 g etanola, od čega se većina može metabolizovati u acetaldehid. Dakle, alkohol u kombinaciji sa duvanom značajno povećava rizik za pojavu bolesti. Nivoi adukta acetaldehida mogu odražavati uticaj duvana i alkohola kod pacijenata sa HNSCC (22). Treba napomenuti da alkohol mijenja molekularnu organizaciju lipidne barijere što dovodi do povećanja propustljivosti sluzokože i može djelovati kao rastvarač za duvanske proizvode povećavajući na taj način njegovo kancerogeno dejstvo.

Obzirom da trend pušenja opada, a raste broj oboljelih od karcinoma glave i vrata, posljednjih godina veliki značaj se daje i virusnim infekcijama (27, 28). Karcinomi infektivne etiologije su posljedica perzistentne infekcije onkogenim virusima koji različitim mehanizmima izbjegavaju imunski odgovor domaćina (29). Pored toga, onkogeni virusi remete tok ćelijskog ciklusa i inhibiraju popravak DNK, podstičući na takav način tumorogenezu (30). Kod infekcija onkogenim virusima prisutna je poremećena signalizacija koja djeluje na proliferaciju i diferencijaciju ćelija, nakupljanje genskih mutacija što zajedno dovodi do nastanka karcinoma. Podaci iz literature ukazuju na moguću kofaktorsku ulogu humanih papiloma virusa (HPV) i Epstein-Barr virusa (EBV) u nastanku HNSCC. Uloga ova dva onkogenih virusa se najbolje vidi iz podatka da se oni povezuju sa čak 38% svih karcinoma infektivne etiologije (31). Dakle, koinfekcija sa dva ili više onkogenih virusa može značajno uticati na nastanak HNSCC. Pored ova dva virusa, u novije vrijeme se navodi i uloga BK poliomavirusa (BKV) kao i JC poliomavirusa (JCV) u nastanku HNSCC (32, 33).

## **1.5 Humani papiloma virus (HPV)**

### **1.5.1 Građa virusne čestice i HPV taksonomija**

Humani papiloma virusi pripadaju porodici *Papillomaviridae*. Virusne čestice veličine 50-55 nm su građene iz ikozaedarnog kapsida koga čine 72 kapsomere u čiji sastav ulaze strukturni proteini. Genom čini dvolančana cirkularna DNK veličine 8 kbp koja sadrži gene koji kodiraju sintezu do 10 proteina. Ovi geni čine rani i kasni region genoma (Slika 4).



**Slika 4.** Šematski prikaz HPV čestice i organizacija genoma (34) - adaptirano primjenom web alata BioRender.com

U kasnom regionu se nalaze L1 i L2 geni (engl. *Late genes*) koji kodiraju sintezu strukturnih proteina virusnog kapsida. Geni ranog regiona, E geni (engl. *Early genes*) jesu odgovorni za replikaciju, regulaciju transkripcije i onkogeni potencijal virusa. Naime, dva regulatorna gena E1 i E2 kontrolišu transkripciju i replikaciju, E4 se eksprimira u produktivnoj infekciji, dok E5, E6 i E7 jesu onkogeni te regulišu procese transformacije ciljnih ćelija domaćina (Tabela 3).

Ovi geni su razdvojeni uzvodno regulatornim regionom (URR) koji sadrži cis aktivnu regulatornu sekvencu i post transkripcijski kontrolni region od 1000 bp koji utiču na ekspresiju gena, regulišu replikaciju genoma i morfogenezu (34). Protein E6 se sastoji iz 150 aminokiselina te sadrži dva cink vezujuća domena sa motivom Cys-X-X-Cys. Poznato je da je E6 jedan od glavnih onkogenih HPV koji interreaguje sa tumor supresorskim proteinom p53. Protein p53 reguliše ekspresiju proteina koji su uključeni u kontrolu ćelijskog ciklusa. Ukoliko se u toku replikacije ćelijskog genoma dese neka oštećenja DNK, p53 se aktivira i pojačava ekspresiju p21 pri čemu dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i nastupa apoptoza. Drugi značajan onkoprotein je E7 koji se sastoji od 100 aminokiselina. Kod visokorizičnih HPV tipova E7 sadrži tri konzervirana regiona preko kojih se E7 vezuje za Rb protein. Ti regioni E7 su: CR1 na N terminalnom djelu, CR2 koji sadrži motiv LXCXE i CR3 koji sadrži tri vezujuća cink motiva (35).

**Tabela 3.** Osnovne funkcije HPV gena (35)

protein HPV	funkcija proteina
E1	transkripcija i replikacija virusne DNK
E2	replikacija virusne DNK, suzbijanje funkcije E6/E7 gena, apoptoza
E4	virusna DNK replikacija, skupljanje i oslobađanje virusnih čestica
E5	interakcija sa epidermalnim faktorom rasta (aktivacija mitogenog puta), amplifikacija genoma, ćelijska proliferacija
E6	destrukcija p53 (skupljanje mutacija i inhibicija apoptoze)
E7	degradacija Rb proteina
L1	veliki kapsidni protein virusne čestice
L2	mali kapsidni protein virusne čestice

Poznato je da su HPV svrstani u pet glavnih rodova: alfa-, beta-, gama-, mu- i nu papilomavirus. Taksonomija HPV je bazirana na varijabilnosti nukleotidne sekvence L1 gena. Genotipovi koji pripadaju različitim rodovima imaju manje od 60% sličnosti unutar L1 gena, dok virusi istog roda imaju 60-70% sličnosti (36, 37). Virus se svrstavaju u nove genotipove ukoliko je razlika u L1 sekvenci prisutna u manje od 90%, a u nove varijante ukoliko je razlika manja od 2% (37). Do danas je otkriveno više od 200 HPV genotipova (30). Najveći broj HPV genotipova se svrstava u alfa, beta i gama rod, dok u sastav mu i nu roda ulaze samo 3 HPV genotipa (HPV1, HPV63 i HPV41) (38).

Ono što treba istaći je da pojedini rodovi ne kodiraju sintezu proteina E5 (39). Gen E5 kodira sintezu proteina dužine od 40 do 85 aminokiselina. Ovi proteini sadrže hidrofobne aminokiseline koje su sjedinjene u transmembranske domene, ne djeluju kao enzimi već kao modulatori ćelijskih proteina (40). Virus koji pripadaju alfa rodu, a izazivaju maligne promjene sadrže E5 gen. Međutim i 10 virusa koji izazivaju benigne promjene kod ljudi također mogu kodirati protein E5 (41). Otvoren okvir za čitanje (ORF) gena E5 je podijeljen na 4 regije, alfa, beta, gama i delta regije koji su u korelaciji sa kliničkim manifestacijama HPV infekcije kao i onkogenim potencijalom. Alfa E5 protein kodiraju visoko rizični HPV, dok gama E5 i delta E5 sadrže nisko rizični tipovi koji izazivaju genitalne promjene. Obzirom da ORF proteina E5 nije prisutan kod virusa koji pripadaju rodovima beta-, gama- i mu- pretpostavlja se da E5 nije značajan za životni ciklus virusa nego virusu daje mogućnost da dovede do maligne alteracije ćelije (40).

Virusi koji uzrokuju epitelne lezije na koži, urogenitalnog trakta, digestivnog i respiratornog trakta pripadaju rodu alfa papilomavirus, u rodu beta papilomavirus se nalaze virusi koji uzrokuju oboljenje *Epidermodysplasia verruciforme*, dok virusi gama roda najčešće izazivaju kožne promjene (37) (Tabela 4).

**Tabela 4.** HPV genotipovi udruženi sa različitim bolestima (37, 38, 42, 43)

rod	HPV genotip	Bolest
Alfa 1	HPV 32	izaziva promjene na sluznici (papilomi usne šupljine), fokalna epitelna hiperplazija
Alfa 8	HPV 7	povezan sa hiperplazijom epitela usne šupljine i sa intraepitelnom neoplazijom grlića materice, kožnim bradavicama
Alfa 10	HPV 6 HPV 11	uzrokuju benigne lezije-genitalne bradavice, rekurentnu respiratornu papilomatozu
Alfa 13	HPV 54	anogenitalne bradavice
Alfa 9	HPV 16 HPV 31	prekancerozne i kancerozne promjene
Alfa 7	HPV 18 HPV 45	
Alfa 5	HPV 51	
Alfa 6	HPV 56	
Alfa 11	HPV 34	
Alfa 3		promjene na sluznici niskog rizika
Alfa 14		
Alfa 2	HPV 3 HPV 10	uloga u nastanku <i>Epidermodisplasia verruciforme</i> veruke vulgaris
Alfa 4	HPV 2 HPV 57	kožne bradavice stopala papilomi usne šupljine

<b>Beta 1</b>	HPV 5 HPV 8	kožne promjene; povezani sa nastankom pitirijaze moguća uloga u nastanku karcinoma kože koja je izlagana suncu uloga u nastanku <i>Epidermodisplasia verruciforme</i>
<b>Beta 2</b>		
<b>Beta 3</b>		
<b>Beta 4</b>		
<b>Beta 5</b>		
<b>Gama 1</b>	HPV 4 HPV 65	kožne bradavice, infekcije su kod imunokompetentih osoba asimptomatske, vjerovatan kancerogen (HPV 65)
<b>Gama 4</b>		
<b>drugi Gama rodovi</b>		izazivaju kožne bradavice
<b>Mu 1</b>	HPV 1	izaziva kožne bradavice na dlanu i stopalima
<b>Mu 2</b>	HPV 63	
<b>Nu 1</b>	HPV 41	povezan sa kožnim bradavicama

Svjetska zdravstvena organizacija je HPV genotipove 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 66 svrstala u humane kancerogene obzirom na njihovu visoku učestalost u karcinoma grlića materice, dok HPV tipovi 6, 11, 40, 42, 3, 44 i 54 jesu nisko onkogeni virusi i dovode se u vezu sa genitalnim bradavicama (42). U humanoj populaciji nisko onkogeni HPV genotipovi izazivaju kožne bradavice, urogenitalne bradavice, rekurentnu respiratornu papilomatozu, a visoko onkogeni HPV genotipovi skvamozne intraepitelne lezije (SIL), anogenitalni karcinom i karcinom grlića materice (43). Uloga HPV u nastanku drugih skvamocelularnih karcinoma (karcinomi glave i vrata, karcinom kože, vulvovaginalni karcinom, ezofagealni karcinom, karcinomi konjunktive, paranazalnih sinusa i bronhija) nije još u potpunosti razjašnjena.

### 1.5.2 Životni ciklus HPV

Infekcija HPV nastaje ulaskom virusa u bazalne ćelije epitela usled prisustva mikrotrauma na koži odnosno sluznicama, a smatra se da za određene tipove ulazno mjesto virusa može biti i folikul dlake. Replikacija virusa započinje vezivanjem HPV za receptore (heparin sulfat proteoglikan i laminin, alfa-6 integrin) i ulaskom virusa endocitozom u ćelije bazalnog sloja skvamocelularnog epitela koje su mitotički aktivne. Od ovih ćelija nastaju kćerke ćelije od koji neke migriraju u suprabazalni sloj čime započinje njihova diferencijacija, dok druge ostaju u bazalnom sloju, dijele se i predstavljaju rezervoar za virusnu DNK koja se u njima može održati godinama (44).

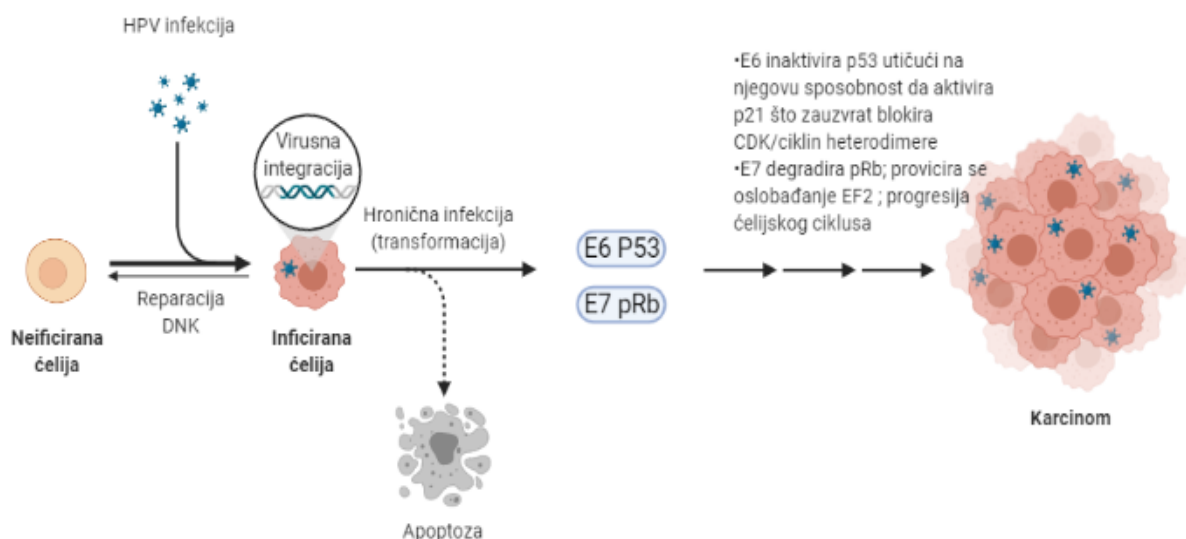
U jedru gdje se replikacija dešava, prvo dolazi do aktivacije ranih gena E1 i E2 zahvaljujući URR promotoru. To omogućava virusu da koristi biosintetski aparat ćelije domaćina za sopstvenu replikaciju. Glavni protein inicijacije replikacije je E1 koji zahvaljujući svom helikaznom domenu veže, a potom i odmotava mjesto gdje započinje replikacija u kombinaciji sa N-domenom proteina E2. Tako nastaje replikaciona viljuška od razdvojenih komplementarnih lanaca. Sledeći korak je sinteza novih lanaca koja se u 5'-3' pravcu odvija zahvaljujući DNK polimerazi, dok sinteza u drugom lancu pravca 3'-5' ide preko Okazakijevih fragmenata koji se nakon odvajanja od prajmera vezuju ligazama u novi lanac DNK molekule. Nakon stvaranja iRNK dolazi do prepisivanja i sinteze L1 i L2 proteina.

U ćelijama bazalnog sloja dolazi do ekspresije E6 i E7 gena zahvaljujući promotoru p97 što omogućava dalje razmnožavanje HPV uporedo sa diferencijacijom epitelnih ćelija. Kada se infekcija uspostavi, virusi se šire na površinu epitela te dolazi do oslobađanja virusnih čestica u okolinu. Ovo

se dešava jer dolazi do smanjenje ekspresije E6 i E7 pod dejstvom E2, dok E1 vezivanjem za URR omogućava virusu da dalje koristi ćelijske mehanizme za sopstveno razmnožavanje. Kada inficirani keratinociti dođu na površinu epitela sintetišu se E4, L1 i L2 proteini što ima za posledicu sklapanje nukleokapsida i nastali virioni se potom oslobađaju lizom inficirane ćelije. Za vrijeme životnog ciklusa stvara se veliki broj kopija virusnih DNK koje mogu biti u formi epizomalne ili integrisane DNK, odnosno HPV može da izazove akutne i perzistentne infekcije. U slučaju prisustva visoko onkogenih tipova u ćelijama može doći do integracije HPV DNK u genom ćelije domaćina i gomilanja E6 i E7 proteina što dovodi do transformacije ćelije (44).

### 1.5.3 HPV karcinogeneza

Kod infekcija visoko rizičnim tipovima indukuje se S faza ćelijskog ciklusa posredstvom E6 i E7 u suprabazalnom sloju ćelija. Glavni onkogeni HPV E6 i E7 ciljano djeluju na tumor supresorske proteine p53 i Rb tokom HPV infekcije (Slika 5).



**Slika 5.** Šematski prikaz HPV karcinogeneze (45, 46, 47) - adaptirano primjenom web alata BioRender.com

Naime, proliferacija HPV inficiranih ćelija je kontrolisana proteinima p105, p107 i p130 koji pripadaju porodici proteina Rb. Uloga Rb je da zaustavi ćelijski ciklus sve do trenutka kada ćelija postaje sposobna za dijeljenje. Fosforilacijom Rb postaje inaktivan, a to ćeliji omogućava ulazak u S fazu ćelijskog ciklusa. Onkoprotein E7 inaktivira Rb protein putem vezivanja za Rb, a što istovremeno oslobađa transkripcioni faktor E2F koji aktivira brojne gene za S fazu ćelijskog ciklusa. Onkogen E7 se vezuje i za ciklin A, p21 i p27. Ovo se dešava kod visoko rizičnih HPV infekcija, dok kod infekcija koje izazivaju nisko onkogeni HPV genotipovi onkogen E7 pokazuje slab afinitet za Rb proteine. Naime CR2 domen E7 kod nisko rizičnih genotipova sadrži aminokiseline koje nisu identične aminokiselinama CR2 domena E7 visoko rizičnih genotipova. Iz tog razloga Rb se vezuje slabijim afinitetom za E7 nisko rizičnih HPV genotipova (45, 46, 47).

Visoko rizični HPV E6 onkoprotein aktivira ubikvitin ligazu E6AP te tako dovodi do ubikvitinacije p53 i razgradnje u proteozomu 26S. Protein p53 kontrolira kontrolne tačke ćelijskog ciklusa G1/S i G2/M, te ako dođe do prekidanja te kontrole usljed degradacije posredovane sa HPV E6, dolazi do gomilanja hromozomskih abnormalnosti. Pored ovoga onkogen E6 povećava aktivnost telomeraze, vezuje se sa kalcijum vezujućim proteinom ERC-55, interferonskim faktorom IRF3 i integrin vezujućim proteinom, paksilinom. Sadejstvom visoko rizičnih onkoproteina E6 i E7 dolazi do remećenja kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa što dovodi do akumulacije mutacija koje ubrzavaju razvoj karcinoma (45, 46, 47).

Ovome se pridružuje i dejstvo visoko rizičnog onkoproteina E5 koji dovodi do hiperproliferacije ćelija domaćina, što takođe olakšava malignu progresiju. Protein E5 smanjuje ekspresiju molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex*-MHC) I klase vezujući se preko svojih domena sa teškim lancem MHC I klase (48). Protein E6 u saradnji sa proteinom E5 doprinosi kod genitalnih infekcija razvoju koilocita koji predstavljaju važan marker HPV infekcije (49). Kod visoko rizičnih genotipova E5 protein mijenja strukturu hromozoma, dovodi do morfoloških promjena na ćeliji te tako normalna ćelija prelazi u maligno izmijenjenu (40).

Analizama HPV karcinogeneze utvrđeno je takođe da je nakon ugradnje u genom ćelije, genom HPV prekinut na mjestu između E1 i E2. To je uzrok gubitka funkcije E2 čija je uloga represija transkripcije E6 i E7 proteina. Tako povećana ekspresija ovih glavnih onkogeno podržava malignu transformaciju epitelnih ćelija. U lezijama koje sadrže epizomalne forme HPV DNK, virusni E2 protein potiskuje ekspresiju ranih gena čime se remeti mogućnost da virus perzistira u ćelijama, te se nakon određenog vremena elimiše iz organizma (45-47).

U HPV karcinogenezi od velikog značaja je i uticaj virusa na imunski odgovor (40, 50-52). Naime, u odbrani organizma od virusa uključuju se mehanizmi urođene i stečene imunosti. Prvu liniju odbrane kod virusnih infekcija čini produkcija interferona (IFN) tip 1, a zatim se aktiviraju i druge komponente urođene imunosti-epitelne ćelije, fagociti, sistem komplementa, citokini i ćelije prirodne ubice (NK ćelije). Ukoliko se infekcija ne prevaziđe slijedi aktivacija humoralnog (produkcija imunoglobulina) i celularnog imuniteta (aktivacija pomoćničkih CD4+ i citotoksičnih CD8+ T limfocita). U okviru sistema HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*-HLA) postoje geni HLA I i HLA II klase koji kodiraju sintezu MHC I i MHC II klase, kroz koje se različiti antigeni uz pomoć antigen prezentujućih ćelija (APĆ) predstavljaju T ćelijama. Nakon obrade, antigeni se kroz molekul MHC I klase predstavljaju CD8+ T limfocitima, a kroz MHC II klase CD4+ T ćelijama. Unutarćelijski antigeni se nakon obrade u proteozomu prezentuju CD+8 T limfocitima, a egzogeni se nakon razgradnje u endozomu prikazuju CD4+ T limfocitima. Da bi došlo do aktivacije naivnih T limfocita potrebno je da ostvare i interakcije između odgovarajućih liganada i receptora da bi T ćelije započele svoje efektorske funkcije. Uloga APĆ je i da produkuje citokine kao odgovor na vezivanje sa patogenom te u zavisnosti od klase citokina naivni CD4+ T limfociti se diferencijuju u jednu od četiri subpopulacije Th ćelija. Kao što je već napomenuto, prvu liniju odbrane kod virusnih infekcija predstavlja produkcija IFN tipa 1 od strane ćelija koje su inficirane virusom. Međutim mnogi virusi posjeduju mehanizme kojima inhibiraju gene za interferone. Kod HPV tipa 16, E6 protein se vezuje za tirozin kinazu 2 te tako inhibira Jak-STAT signalni put, vezuje se sa interferon regulatornim faktorom 3 (IRF-3) što dovodi do blokade interferona  $\beta$ . Onkoprotein E7 inhibira takođe IFN-1 i tumor nekrotizirajući faktor (TNF) preko interferon regulatornog faktora 1 (IRF-1) te tako keratinociti postaju otporni na hipoksiju koju indukuje TNF. Pored ovoga i E5 protein može inhibirati ekspresiju MHC I klase na površini inficiranih ćelija bazalnog sloja te se tako spriječava prezentacija peptida T limfocitima. Ovo pogoduje daljoj diferencijaciji ćelija i proizvodnji virusnih čestica (40).

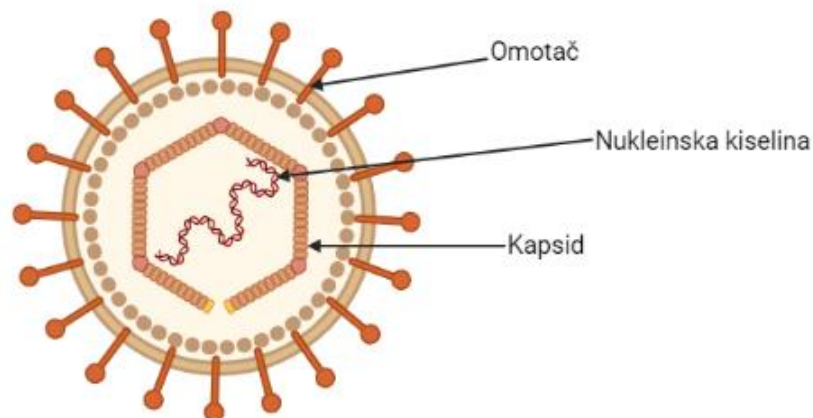
Obzirom da je virus u ćeliji, kao takav je nedostupan antitijelima i sistemu komplementa. Ako se infekcija ne prevaziđe, dolazi do diferencijacije i proliferacije Th1 limfocita koji produkuju proinflamatorne citokine IL-12 i TNF- $\alpha$  koji indukuju zapaljensku reakciju. Ekspresija virusnih gena

se održava na niskom nivou u donjim slojevima epitela, te nema sinteze virusnih proteina u APC. Kao što je već navedeno, HPV inficira matične ćelije bazalnog sloja skvamocelularnog epitela te od diferencijacije keratinocita zavisi i životni ciklus virusa. Obzirom da su keratinociti prirodno predodređeni za smrt, nema signala za stimulaciju imunskog odgovora. To sve pogoduje održavanju virusa u organizmu (40, 50-52). Kod određenog broja pacijenata virus iščezava iz organizma zajedno sa keratinocitima. Lezije se na mjestu infekcije mogu javiti i nekoliko mjeseci od početka infekcije što ide u prilog tome da virus uspješno izbjegava imunski odgovor domaćina. Upravo zbog toga HPV može izazvati perzistentne infekcije, jer izostaje zapaljenska reakcija, a to može da vodi ka malignoj transformaciji ćelije.

## 1.6 Epštajn-Bar virus (EBV)

### 1.6.1 Građa virusne čestice i EBV taksonomija

Epštajn-Bar virus (EBV) je dobio naziv prema naučnicima, *Epstein-u* i *Barr-u* koji su ga zajedno sa *Achong-om* prvi uočili u ćelijskoj kulturi dobijenoj od tkiva pacijenta koji je bolovao od Burkittovog limfoma (53). Ovaj virus pripada porodici *Herpesviridae*, podfamiliji *Gammaherpesvirinae*, rodu *Lymphocryptovirus*. Genom dužine 172 kbp građen je od preko 85 gena i sastoji se od niza ponavljajućih sekvenci koje genom dijele na duge i kratke kodirajuće domene (53-55). Nukleokapsid čini dvolančana linearna DNK i kapsid ikozaedarne simetrije koji je građen iz 162 kapsomere. Oko kapsida se nalazi dvostruka ovojnica, pri čemu se na spoljašnjem omotaču nalaze glikoproteinski izdanci, a između kapsida i omotača se nalazi proteinski tegument (56) (Slika 6).



**Slika 6.** Šematski prikaz EBV čestice (53-55) - adaptirano primjenom web alata BioRender.com

Antigeni koji su značajni za virusnu replikaciju u ćeliji, a koriste se i u dijagnostici EBV infekcije su virusni kapsidni antigen (engl. *Viral capsid antigen-VCA*), nuklearni antigen (engl. *EBV nuclear antigen-EBNA 1-6*), rani antigen (engl. *Early antigen-EA*), latentni membranski protein (engl. *Latent membrane antigen-LMP*), kasni membranski antigen (engl. *Late membrane antigen-LMA*) kao i rana EBV RNK (engl. *EBV-encoded small RNAs-EBER-1, EBER-2*). Na osnovu razlike u EBNA-2, -3A,

-3B i -3C genima izvršena je podjela virusa na EBV tip 1 i EBV tip 2 genotipove. Razlika u sekvenci EBNA-2 gena je veća između dva genotipa u poređenju sa sekvencom EBNA-3 gena (56).

### 1.6.2 Životni ciklus EBV

Po ulasku EBV u organizam, virus se prvo replikuje u epitelnim ćelijama orofarinksa u kojima izaziva litičku infekciju, a nakon toga dolazi i do replikacije u B limfocitima ždrijela u kojima uglavnom ne dolazi do kompletne replikacije virusa te je u njima prisutna latentna neproduktivna infekcija (54). Glavni receptor za koji se vezuje EBV svojim glikoproteinima gp350/220 na B limfocitima je CD21. Nakon vezivanja za receptor dolazi do aktivacije tirozin kinaze i mobilizacije kalcijuma, a nakon toga slijedi blastna transformacija, homotipska ćelijska adhezija, eksprimira se CD23 i produkuje interleukin 6 (IL-6). Veza se ostvaruje i posredstvom virusnih glikoproteina gH, gL i gp42 sa HLA II na površini B limfocita (56). Po izlasku virusa iz B limfocita, gp42 se gubi (ne eksprimira se) te to olakšava ponovni ulazak EBV u epitelne ćelije. Nakon toga slijedi izlazak virusa iz epitelne ćelije te mu se vraća tropizam za B limfocite jer se opet na površini virusa prikazuje gp42 (57). Ovo sve dovodi do limfoproliferacije koja može da traje. Proteini koji se prvi ekspimiraju za vrijeme infekcije su EBNA vodeći protein (engl. *EBNA leader protein* - EBNA-LP) i EBNA-2. Zatim slijedi i ekspresija EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C i EBNA-1 (54).

Kao i ostali herpes virusi i EBV kod ljudi izaziva latentnu infekciju u kojoj proteini LMP-1 i LMP-2 i EBNA 1-6 održavaju latenciju. Nuklearni antigen EBNA-1 omogućava da se virusna DNK održava u B limfocitima u vidu epizomalne DNK, dok EBNA-2 reguliše ekspresiju latentnih membranskih proteina LMP-1 i -2 (58, 59). Nuklearni antigen EBNA-3 reguliše ekspresiju ćelijskih gena, a EBNA-LP omogućava EBNA-2 da reguliše funkciju LMP-1 (60). U tom slučaju EBV ostaje prisutan u ćelijama doživotno u vidu epizomalne DNK zahvaljujući *cis*-aktivnom DNK segmentu (oriP) i *trans*-aktivujućem nuklearnom proteinu (61).

Zbog različite ekspresije svojih gena, EBV može izazvati širok spektar oboljenja, jer se može prilagoditi različitim uslovima u ćeliji (62). Postoje tri tipa latencije koje izaziva EBV. Tip I latencije je prisutan u Burkittovom limfomu, gdje dolazi do djelimične ekspresije EBNA-1, EBER i BART miRNK (mala nekodirajuća molekula RNK). Kod Hodžkinovog limfoma i nazofaringealnog karcinoma prisutna je latencija tip II koju pored transkripata koji su izraženi u latenciji tipa I, karakteriše i ekspresija LMP-1, LMP-2A i LMP-2B. Ekspresija EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, LMP-1 i LMP-2, EBERs, BamH miRNK je karakteristična za latenciju tip III koja se javlja u stanjima imunosupresije, kao što su post-transplantacijski limfom i limfom koji se dovodi u vezu sa HIV infekcijom (61).

Kao i ostali herpesvirusi EBV izaziva latentnu i produktivnu infekciju kod ljudi, a pored toga i transformaciju B limfocita. U većini slučajeva EBV izaziva infekcije koje nisu opasne po život, međutim ako se poremeti odnos virus-domaćin dolazi do razvoja različitih oboljenja. Nakon uspostavljanja latencije virus se može reaktivirati u B limfocitima te tako započinje ponovnu virusnu replikaciju. To dovodi potom do nove infekcije epitelne ćelije. Kod zdravih osoba reaktivacija najčešće prolazi bez simptoma zahvaljujući mehanizmima ćelijske imunosti, tj. T limfocitima. Međutim kod nekih pacijenata EBV reaktivacija uzrokuje nastanak oboljenja. Prema različitim studijama EBV infekcija se dovodi u vezu malignim oboljenjima epitelne i limfnog tkiva (63, 64). To mogu biti limfomi koji se mogu razviti kod pacijenata koji boluju od stečene imunodeficiencije-AIDS (engl. *Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*), limfoproliferativna bolest kod pacijenata nakon transplantacije organa te drugi karcinomi kod imunokompetentnih osoba (65).



### 1.6.3 EBV karcinogeneza

Glavni onkogen EBV je LMP-1 koji dovodi do transformacije B limfocita (66). Sadrži aminokiselinski citoplazmatski N-domen, šest transmembranskih domena i C-terminalni domen. Transmembranski domeni i C-terminalni domen LMP-1 aktiviraju faktor transkripcije nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B) što dovodi do inhibicije apoptoze (66-68). Naime, nazofaringealni karcinom koji se dovodi u vezu sa EBV infekcijom ima veliku sposobnost da metastazira, a to se upravo povezuje sa LMP-1 koji povećava potencijal migracije i invazije ćelija. LMP-1 olakšava invaziju zahvaljujući produkciji metaloproteaza koji razgrađuju ekstracelularni matriks što ćelije čini osjetljivijim na virusnu infekciju (69).

Pored LMP-1, značajni onkogeni EBV su EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3a i EBNA-3C. Upravo ovi virusni onkogeni koji podržavaju latenciju EBV u ćeliji, mogu indukovati ćelijske onkogene bcl-2, bcl-10, c-fgr, jun/fos pri čemu može doći do nekontrolisane ekspresije proteinskih produkata te tako normalna ćelija prelazi u maligno izmijenjenu (70).

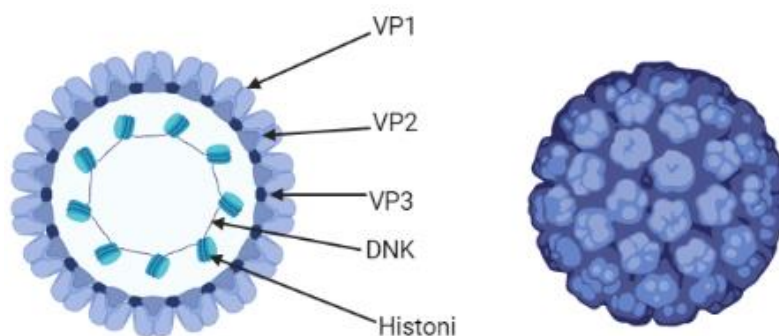
Karakteristika svih onkogenih DNK virusa je da izazivaju genetsku nestabilnost. U EBV inficiranim ćelijama povećana je ekspresija LMP-1 te je tako ometan popravak DNK što ćeliju čini osjetljivom na dejstvo faktora sredine (71). Pored LMP-1, i EBNA-2 je važan onkogen. Naime EBNA-2 reguliše ekspresiju LMP-1, te ova dva gena zajedno ili samostalno aktivacijom transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B mijenjaju aktivnost produkta gena p53 od čije količine u ćeliji zavisi hoće li doći do proliferacije ćelije ili njene apoptoze (72). Ćelije u kojima se virus replikuje i potom sklapa u virusnu česticu uspješno izbjegava apoptozu zahvaljujući inhibiciji kaspaza i aktivacijom antiapoptotskih gena. Još jedan značajan mehanizam kojim EBV doprinosi transformaciji ćelija je i sinteza proteina koji je sličan ćelijskom IL-10 koji je važan imunosupresiv. Taj virusni protein mijenja ekspresiju MHC molekula I i II klase, inhibira i IL-12 i druge kostimulatorne molekule koji su značajni za efektorske funkcije citotoksičnih T ćelija. Značajno je spomenuti i da EBV kodira sintezu mikro RNK koja ima ulogu supresora ćelijskih gena za vrijeme EBV latencije (73). Hoće li ili ne EBV izazvati tumor zavisi prije svega od sposobnosti imunskog sistema da se odupre svim ovim mehanizmima kojim virus izbjegava imunski odgovor. Pored već navedenih malignih bolesti koje se dovode u vezu sa EBV infekcijom, posljednjih decenija sve veći značaj EBV ima i u etiologiji karcinoma glave i vrata druge lokalizacije (74, 75).

## 1.7 Humani poliomavirusi

Humani poliomavirusi pripadaju porodici *Polyomaviridae*. Do danas je identifikovano 11 humanih poliomavirusa (76). Najznačajniji među njima su BK i JC virusi, koji su izolovani sedamdesetih godina i dobili su nazive prema inicijalima pacijenata u čijim uzorcima su dokazani (77, 78). Porodica *Polyomaviridae* obuhvata i viruse koji su otkriveni prethodnih decenija, a to su KI (*Karolinska Institute polyomavirus*) i WU (*Washington University polyomavirus*) poliomavirusi koji su dobili nazive prema institucijama u kojima su otkriveni (79, 80), zatim MC (engl. *Merkel cell*) poliomavirus izolovan u karcinomu Merkelovih ćelija (81). U rijetkoj kožnoj bolesti otkriven je i TS (*Trichodysplasia polyomavirus*) poliomavirus (82), šesti, sedmi i deveti poliomavirusi su identifikovani u koži, a MW (*Malawi polyomavirus*) poliomavirus je dobio ime prema geografskoj regiji gdje je pronađen i dokazan je u koži i stolici ljudi (83).

### 1.7.1 Građa virusne čestice i taksonomija poliomavirusa

Virusna čestica veličine 40-45 nm sadrži dvolančanu kružnu DNK od oko 5 kbp. Kapsid ikozaedarne simetrije je građen iz 72 kapsomere. Zrele virusne čestice su povezane sa ćelijskim histonima H2a, H2b, H3 i H4 u kompleksu koji je sličan hromatinu (Slika 7).



**Slika 7.** Šematski prikaz građe poliomavirusa (76) - adaptirano primjenom web alata BioRender.com

Genom poliomavirusa je podijeljen na rani kodirajući region, kasni kodirajući region i nekodirajući kontrolni region. Nekodirajuća kontrolna regija sadrži mjesto sa kog počinje replikacija virusa, početno mjesto transkripcije, promotore i pojačivače sa konsenzus sekvencama za proteine koji se vezuju za DNK i faktore transkripcije. Ovaj region kontroliše ekspresiju ranih i kasnih gena virusa. Ranom kodirajućem regionu pripadaju geni koji kodiraju sintezu velikog i malog tumorskog antigena (T Ag) koji potpomažu virusnu replikaciju i doprinose ćelijskoj transformaciji. Kapsid grade tri strukturalna proteina, glavni strukturalni protein (VP1) i dva manja proteina (VP2 i VP3) a geni ovih proteina pripadaju kasnom kodirajućem regionu (76, 83). Glavni strukturalni protein je VP1 i čini više od 70% strukturalnih proteina (76). Pored ovih proteina koji čine virusni kapsid, kasna kodirajuća regija je odgovorna i za sintezu onkoproteina koji posjeduju BKV, JCV i SV40 koji ima ulogu u replikaciji virusa i sastavljanju kapsida, ali ne predstavlja sastavni dio zrele virusne čestice (83). Na osnovu razlika u DNK sekvenci nekodirajućeg kontrolnog regiona postoje dva različita oblika BK virusa, virus arhetipa i virus preuređene varijante. Virus arhetipa je uglavnom prisutan kod zdrave populacije i može se izolovati iz urina, dok je drugi oblik virusa (preuređena varijanta) prisutan kod pacijenata koji boluju od neke bolesti koja se dovodi u vezu sa BKV infekcijom (84). Podjela na četiri (I, II, III i IV) genotipa BKV je izvršena zbog varijabilnosti VP1 regiona, a unutar svakog genotipa prisutne su subgrupe virusa (85).

Humani poliomavirusi su klasifikovani u tri roda: alfa-, beta- i delta poliomavirusi. U rodu *Betapolyomavirus* se nalaze BK i JC virusi, dok je MC poliomavirus klasifikovan u rod *Alphapolyomavirus* (76).

### 1.7.2 Životni ciklus poliomavirusa

Nakon vezivanja virusa za ćelijske receptore, glikane, poliomavirusi ulaze u ćeliju procesom endocitoze, a zatim slijedi oslobađanje virusne DNK u citoplazmu. Kroz jedarne pore, virusna DNK

ulazi u jedro gdje se virus i replikuje. Za vrijeme umnožavanja virusnog genoma dolazi do transkripcije i stvaranja iRNK koja je modifikovana uklanjanjem introna i spajanjem egzona što omogućava stvaranje ranih proteina, mali, srednji i veliki T antigeni. Informaciona RNK je odgovorna i za stvaranje drugih virusnih proteina. Veliki T Ag može imati aktivnost ATPaze i helikaze te zahvaljujući tome reguliše transkripciju ranih gena koji treba da poremete metabolizam ćelije domaćina. Zatim dolazi i do transkripcije kasnih gena koji kodiraju sintezu strukturnih proteina VP1 i VP2, dok sinteza VP3 započinje preko start kodona iRNK VP2. Kada se translacija završi, dolazi do sazrijevanja odnosno sklapanja virusnih čestica u citoplazmi, nakon čega virus napušta ćeliju egzocitozom (86).

### 1.7.3 Karcinogeneza poliomavirusa

Bez obzira na široku rasprostranjenost u populaciji, poliomavirusi rijetko izazivaju oboljenja kod ljudi. Od imunskog odgovora domaćina najviše zavisi hoće li se infekcija ispoljiti ili ne. Osobe koje su podložnije oboljenjima sa kojima se JCV dovodi u vezu su pacijenti koji imaju deficit ćelularne imunosti. Kod pacijenata koji boluju od AIDS usljed patoloških mehanizama koje pokreće JCV može da se javi progresivna multifokalna leukoencefalopatija (engl. *Progressive multifocal leukoencephalopathy*-PML). Drugi mehanizam kojim poliomavirusi izazivaju bolest je upalni sindrom imunorekonstitucije koji se može javiti usljed dugotrajnog i nekontrolisanog izlaganja antigenima poliomavirusa. Prototip infekcija za ovu vrstu patogenog uticaja su hemoragijski cistitis uzrokovan BKV kod pacijenata nakon alogene transplatacije matičnih ćelija, PML nakon primjene terapije za AIDS ili nakon uklanjanja lijekova plazmaferezom kod oboljelih od multiple skleroze (87-90). Nefropatija povezana sa poliomavirusom nastaje usljed izraženog imunskog odgovora sa infiltracijom granulocita i limfocita. Ovaj mehanizam predstavlja citopatogenu upalnu poliomavirusnu patologiju koje se aktivira zbog stalne izloženosti ćelije virusu (91). Prisustvo velikog T Ag u organizmu može takođe izazvati pretjeranu reakciju imunskog sistema pri čemu se mogu proizvoditi antitijela protiv histona i druga antinuklearna antitijela (92). Poznato je da i poliomavirusi imaju onkogeni potencijal za koji je odgovoran glavni onkoprotein poliomavirusa, veliki T Ag koji kao i HPV dovodi do deregulacije p53 i Rb proteina (93). Naime postoje dva ishoda infekcije poliomavirusom u zavisnosti od toga da li je riječ o permisivnim ili nepermisivnim ćelijama. U permisivnim ćelijama virus se u potpunosti replikuje što vodi litičkoj infekciji i daljem umnožavanju virusa. U nepermisivnim ćelijama replikativni ciklus virusa se ne završava do kraja te ove ćelije mogu maligno da se transformišu (94). Obzirom da ovi virusi koriste ćelijske proteine za sopstvenu replikaciju potrebno je da ćeliju uvedu u S fazu. Ovo se postiže dejstvom velikog i malog T Ag. Kao što je već navedeno, veliki T Ag djeluje na p53 i Rb protein koji predstavljaju važne regulatore ćelijskog ciklusa. Proteini Rb porodice nakon fosforilacije sa CDK4 i CDK6 dovode do oslobađanja faktora transkripcije E2F koji omogućava transkripciju gena S faze. Ovo omogućava ulazak ćelije u S fazu kad se dešava i replikacija DNK. U toku replikacije DNK su moguće spontane greške, a moguć je i uticaj faktora spoljne sredine. U tom slučaju replikacija treba da se zaustavi kako bi ćelija popravila nastalo oštećenje. Ako se oštećenje desilo prije ulaska ćelije u S fazu dolazi do povećane transkripcije gena za protein p53. Protein p53 ima ulogu u popravci oštećene DNK, kontroli ćelijskog ciklusa i apoptozi. Inače se u zdravim ćelijama održava na niskom nivou. Ukoliko dođe do inaktivacije p53, dolazi do nakupljanja genskih mutacija, ćelijski genom postaje nestabilan, ćelije se nekontrolisano dijele i proliferišu pri čemu se omogućava ćelijama sa mutacijama da prežive. Sve ovo dovodi do transformacije ćelije i ekspanzije malignog klona ćelija.

## 1.8 Koinfekcije onkogenim virusima u HNSCC

U novije vrijeme pojedina istraživanja su usmjerena ka ispitivanju uloge koinfekcije sa 2 ili više onkogenih virusa u nastanku HNSCC. Smatra se da prisustvo više onkogenih virusa može doprinijeti razvoju karcinoma, tako što djeluju sinergistički ili prisustvo jednog virusa doprinosi povećanom onkogenom potencijalu drugog onkogenog virusa. Pored toga, pokazana je i korelacija između koinfekcija i progresije bolesti (95). Smatra se da prisustvo EBV LMP-2A proteina usporava diferencijaciju epitelnih ćelija što doprinosi povećanoj ekspresiji HPV E6/E7 onkoproteina i razvoju karcinoma (96).

Prema nekim istraživanjima istovremena infekcija HPV i EBV više doprinosi razvoju orofaringealnog karcinoma nego pojedinačne infekcije (95, 97). Smatra se da koinfekcija HPV/EBV pojačava održavanje i replikaciju EBV u ćelijama, te da EBV ubrzava napredovanje HPV pozitivnih orofaringealnih skvamocelularnih karcinoma (95, 96).

Glavni antigen poliomavirusa je veliki T Ag koji kao i HPV E6 i E7 remete funkciju p53 i Rb. Ovo dovodi do nakupljanja mutacija za vrijeme razmnožavanja ćelija što za posljedicu ima razvoj karcinoma. Kao i EBV, i poliomavirusi takođe mogu povećati onkogeni potencijal HPV (95).

## 1.9 Molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti

Molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti-MHC su membranski proteini koji se nalaze na površini APC koji prezentuju peptidne antigene T limfocitima. Postoje konvencionalne i plazmocitoidne APC koje se razlikuju po svojoj lokalizaciji i vrsti odgovora. U tkivima i limfnim organima se većinom nalaze konvencionalne APC, dok se plazmocitoidne nalaze u krvi i tkivima. Plazmocitoidne ćelije su glavni izvor interferona tip I u urođenom imunskom odgovoru na virusne infekcije. Glavna uloga MHC molekula da antigen-specifičnim T limfocitima prezentuje peptide porijeklom od antigena mikroorganizama. Klonovi CD4+ i CD8+ T limfocita mogu da prepoznaju peptide samo ukoliko su oni prezentovni u kompleksu sa MHC molekulama. Geni koji čine MHC lokus se nalaze kod svih sisara i kodiraju MHC i druge proteine. Obzirom da se MHC molekule nalaze na leukocitima kao antigeni nazivaju se i humani leukocitni antigeni-HLA. Postoje dve grupe gena koje obuhvataju gene I i II klase HLA. Geni HLA lokusa su polimorfni što znači da različite jedinice u populaciji imaju mnogo različitih alela. Procjenjuje se da postoji više od 5000 alela što HLA gene čini najpolimorfnijim genima kod sisara. Grupa HLA alela koja se nalazi na svakom od hromozoma naziva se HLA haplotip. Osobe koje su heterozigoti imaju po dva haplotipa, po jedan na svakom hromozomu. Polimorfizam HLA gena je nastao evolucijom kako bi jednika bila spremna da odgovori na različite mikroorganizme (98).

Produkti prve klase HLA gena prezentuju peptidne antigene patogena koji izazivaju intracelularne infekcije kod ljudi, a produkti gena druge klase imaju ulogu da predstavljaju peptidne antigene mikroorganizama koji su uzročnici ekstracelularnih infekcija. Molekule HLA I klase su građene iz teškog lanca ( $\alpha$  lanac) i lakog lanca ( $\beta$ 2 mikroglobulin) koji su nekovalentno vezani, pri čemu je teški lanac građen iz tri domena ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3, transmembranskog i citoplazmatskog segmenta). Džep ili pukotinu za koju se vezuju peptidi dužine 8-11 aminokiselina grade polimorfne  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domene. Teški lanac ( $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domen) i laki lanac ( $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 domen) formiraju molekulu HLA II klase. Za razliku od molekula HLA I klase, za domene  $\alpha$ 1 i  $\beta$ 1 HLA II klase se vezuju peptidni antigeni koji su građeni 10-30 aminokiselina u toku imunskog odgovora. Glikoproteinske molekule HLA I klase se nalaze na površini svih ćelija jer sve ćelije u ljudskom organizmu mogu biti inficirane virusima. Na površini

APĆ, na B limfocitima, makrofagima i dendritskim ćelijama su smještene molekule HLA II klase. Pored toga, HLA molekule II klase se ekspimiraju i na epitelnim ćelijama timusa i endotelnim ćelijama, a ekspresiju na drugim ćelijama može da indukuje citokin interferon- $\gamma$  (98). Geni HLA se ekspimiraju kodominantno što znači da se aleli koji se nasljeđuju od oba roditelja podjednako ekspimiraju. Presentacija antigena u sklopu HLA molekula I klase podrazumijeva stvaranje antigena u citoplazmi ili jedru, zatim proteolitičko razlaganje u specijalnoj organeli, transport u endoplazmatski retikulum te vezivanje peptida za nosivne molekule I klase. Nastali antigeni u citoplazmi mogu biti porijeklom od virusa, fagocitovanih mikroorganizama kao i izmijenjenih proteina koji su karakteristika tumora. Molekule HLA kontrolišu prepoznavanja antigena te imaju važnu ulogu u razlikovanju vlastitog od stranog. Određivanje HLA polimorfizama se u većem ili manjem obimu danas radi kod transplantacije tkiva i organa (odbacivanje transplantata), transfuziji krvi, genetskim istraživanjima, dijagnostici autoimunskih bolesti, utvrđivanje relativnog rizika za pojavu malignih bolesti, a značajni su kao što je već napomenuto i imunološkom odgovoru na infektivni agens (98).

Najpolimorfiji geni HLA sistema na genskim regionima HLA I klase su HLA-A, -B, -C, dok su na genskom regionu HLA II klase to HLA-DR, -DP, -DQ (99). Geni koji pripadaju lokusu HLA I klase koji su manje polimorfni i kodiraju neklasične HLA molekule I klase su HLA-E, -F, i -G (100).

### 1.9.1 HLA-G

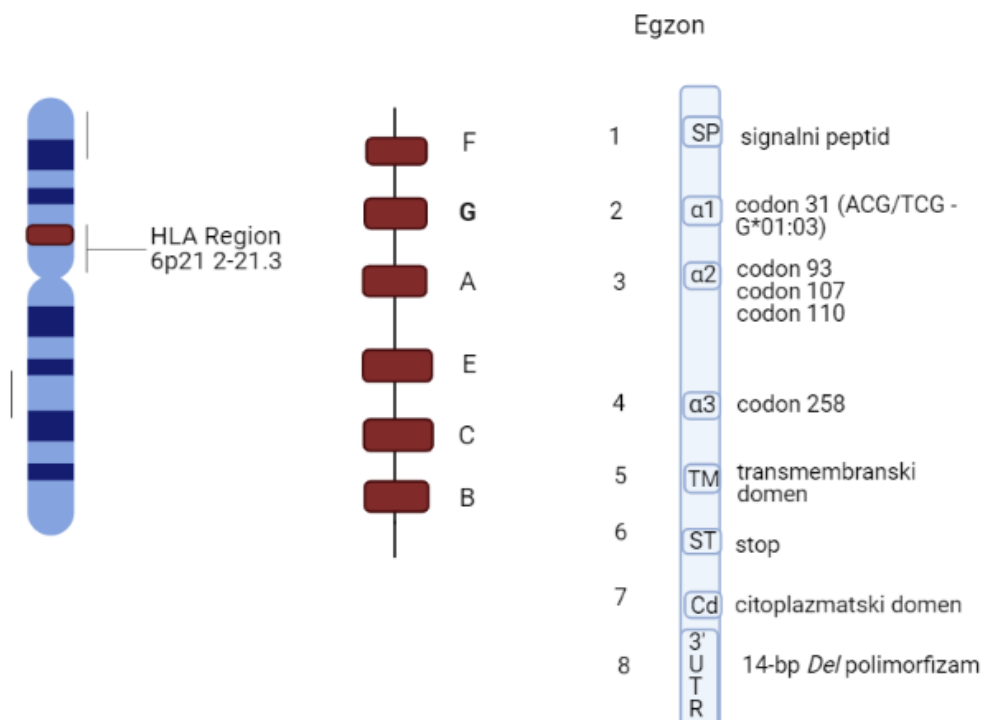
Geraghty i saradnici (101) su u svom radu 1987. godine prvi opisali HLA-G molekulu. HLA-G gen je sastavljen iz osam egzona i sedam introna, te obuhvata region od 4144 nukleotida između 29826979 i 29831122 na hromozomu 6p21.3. HLA-G gen je okružen polimorfnim genima: HLA-A (115 kb nizvodno), HLA-B (1526 kb nizvodno), HLA-C (1441 kb nizvodno), HLA-E (662 kb nizvodno), HLA-F (103 kb uzvodno). HLA-G segment DNK kodira iRNK pune dužine 1578 nukleotida, kao i manje alternativne. Uzimajući u obzir punu dužinu iRNK, 1017 nukleotida čini kodirajući region za protein pune dužine građen od 338 aminokiseline, zatim 178 nukleotida predstavlja 5'URR segment, 383 nukleotida predstavlja 3'UTR (engl. *Untranslated region*) segment (102).

Njegova sekvenca je skoro identična konsenzus sekvenci HLA -A, -B i -C gena (101). Egzon 1 je odgovaran za kodiranje peptida, egzon 2 kodira završni dio 5'URR koji sadrži početno mjesto translacije, a kodira i vodeći HLA-G protein (103). Egzoni 3, 4 i 5 kodiraju alfa-1, alfa-2 i alfa-3 domene, dok egzon 6 kodira transmembranski domen, a egzon 7 citoplazmatski rep.

HLA-G gen kodira najmanje 7 proteinskih izoformi nastalih alternativnim spajanjem primarnog transkripta. Četiri izoforme su vezane za membranu i predstavljaju transmembranski domen i citoplazmatski rep. HLA-G1 izoforma je vezana za membranu cijelom dužinom, a svojom strukturom je slična klasičnim molekulama HLA I klase. HLA-G2 nema alfa-2 domen, HLA-G3 nema alfa-2 i alfa-3 domene, a HLA-G4 nema alfa-3 domen. Tri izoforme su rastvorljive zbog nedostatka transmembranskog domena. HLA-G7 izoforma predstavlja samo alfa-1 domen povezan sa dve aminokiseline kodirane intronom 2 (102).

Ono po čemu se HLA-G molekule razlikuju od ostalih HLA molekula I klase su: ograničena varijabilnost proteina, prisustvo membranskih vezanih i topljivih izoformi nastalih alternativnim spajanjem primarnog transkripta, izmjena imunskog odgovora i ograničena ekspresija na tkivima, te jedinstvenoj molekularnoj strukturi koju čini smanjeni citoplazmatski rep (103). HLA gen sadrži 80 alela koji kodiraju različite proteine (ima ih 21) pune dužine i 4 nulta alela koji kodiraju sintezu proteina skraćenog oblika (104). Regije HLA-G genoma koje najviše pokazuju polimorfizam su

5'URR region koji je odgovoran za transkripciju HLA-G gena i 3'UTR regija koja je značajna za obradu iRNK (101). Nukleotidna varijabilnost kodirajućeg regiona HLA-G gena je raspoređena u egzonima 2, 3 i 4 (102) (Slika 8).



**Slika 8.** Šematski prikaz HLA-G gena i polimorfnih mjesta (102) - adaptirano primjenom web alata BioRender.com

Varijabilnost u kodirajućem regionu može dovesti do određenih konformacijskih promjena u molekulu što rezultuje izmjenom imunoloških mehanizama (103). Najčešće proučavan polimorfizam HLA-G gena je 14bp insercija/delecija smješten u 3' UTR. Prema podacima iz literature u 3' UTR identifikovano je 16 polimorfizama pojedinačnih nukleotida-jednonukleotidni polimorfizmi (engl. *Single-nucleotide polymorphism*-SNP) od kojih su pravi polimorfizmi +3003 C/G, +3010 G/C, +3027 C/A, +3035 C/T, +3142 C/G, +3187 A/G, +3196 C/G, and +3227 G/A (105). Kao što je naprijed navedeno, i u 5' URR i u kodirajućem regionu su prisutne određene varijabilnosti. Jednonukleotidni polimorfizmi-SNP u ovim regionima su u neravnoteži povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*). Analizom 35 SNP unutar 5' URR otkrivena su 64 različita haplotipa (nazvani PROMO), od koji samo 9 predstavlja 95% alela širom svijeta grupišući se u 4 grupe (PROMO 010101, 010102, 0103 i 010104) (105). U kodirajućem regionu otkrivena je 81 varijacija od kojih je većina smještena u intronima. Ove varijacije formiraju 93 različita haplotipa od koji 11 ima frekvenciju veću od 1% uključujući i nulti alel (G\*0105N) koji kodira nefunkcionalni protein (105).

Određene varijabilnosti HLA-G gena se ne smatraju pravim polimorfizmima, jer su prisutne samo kod jednog ili nekoliko pojedinaca. Po pravilu polimorfno mjesto mora imati frekvenciju veću od 1%. Od 13 SNP na egzonu 2, 12 na egzonu 3 i 8 na egzonu 4, samo 4 SNP (1 na egzonu 2, 2 na egzonu 3 i 1 na egzonu 4) imaju frekvenciju veću od 1% u svjetskoj populaciji (103). Kod većine ovih SNP radi se o sinonimnoj supstituciji, a jedna nesinonimna supstitucija u svakom od egzona 2-4 ima učestalost veću od 1% u svjetskoj populaciji (103). Nukleotidna varijabilnost u kodirajućem regionu može rezultovati konformacijskim promjenama molekule što može narušiti interakciju HLA-G molekule sa ćelijskim receptorima, izmjenu imunskog odgovora, polimerizacijskih karakteristika te sposobnost spajanja proteina (103).

Ime alela se sastoji iz 4, 6 ili 8 brojeva. Prva dva broja se odnose na porodicu alela, dok treći i četvrti broj određuju redoslijed prijavljivanja sekvenci. Alel koji se razlikuje u prva četiri broja vjerovatno ima bar jednu nesinonimnu supstituciju nukleotida (promjena sekvence aminokiseline modifikovanog proteina). Npr. HLA-G\* 0101 alel se razlikuje od HLA-G\*0103 nesinonimnom supstitucijom u egzonu 2, kodon 31 na poziciji 292, gdje ACG kodira treonin a TCG kodira serin. Ukoliko se aleli razlikuju u petom i šestom broju radi se o sinonimnoj nukleotidnoj supstituciji u kodirajućoj sekvenci što ne uzrokuje modifikaciju sekvence aminokiseline kodiranog proteina. Primjer za to su HLA-G\*010401 i G\*010404. Ovi aleli se razlikuju na položaju +1827 (kodon 267), gdje G\*010401 alel predstavlja CCG, a G\*010404 alel CCA. Oba kodiraju isti ostatak prolina. Različite nukleotidne sekvence u intronima ili u 3' ili 5' neprevedenim regijama razlikuju se dodavanjem sedmog ili osmog broja. Na primjer, aleli G\*01010104 i G\*01010105 kodiraju istu proteinsku sekvencu i predstavljaju istu kodirajuću sekvencu, osim nukleotidne izmjene u intronu 1 na položaju 99, u kojoj G\*01010104 predstavlja adenin, a G\*01010105 guanin. Odbor za nomenklaturu HLA je donio odluku da se od 2010. godine u obilježavanju alela koriste i dvotačka (:) (103).

Konzensus porodice alela je HLA-G\*01:01 u čijem kodirajućem regionu su četiri varijabilna mjesta povezana sa razmjenom aminokiseline koja je česta u svjetskoj populaciji. Ti polimorfizmi su: +292 A → T SNP na egzonu 2 (kodon 31), razmjena treonina za serin karakteristično za G\*01:03 alel; +755 C → A SNP na egzonu 3 (kodon 110), izmjena leucin/izoleucin, karakteristično za G\*01:04 grupu alela; ΔC delecija na egzonu 3, svojstveno za nulti alel G\*01:05 N alel; +1799 C → T SNP (kodon 258), promjena treonina za metionin, tipično za G\*01:06 alel (Tabela 5). Četiri različita HLA-G proteina koja kodiraju G\*01:01, G\*01:03, G\*01:04 i G\*01:06 porodice alela prisutna su u svjetskoj populaciji, i mogu uticati na funkciju HLA-G (103).

Visokofrekventni HLA-G kodirajući aleli su G\*01:01:01:01, G\*01:01:01:04, G\*01:01:01:05 (nalazi se na hg19), G\*01:01:02:01, G\*01:01:03:01, G\*01:01:05 i G\*01:01:07. Nosioци su sinonimnih mutacija te kodiraju isti molekul HLA-G pune dužine poznat kao G\*01:01 (102). Čest je i HLA-G\*01:03:01:01 alel koga odlikuje nesinonimna mutacija na položaju 292, kodon 31, mijenjajući treonin za serin koji kodira HLA-G\*01:03 molekul pune dužine. Drugu grupu alela čine HLA-G\*01:04:01, -\*01:04:03 i -\*01:04:04 koji kodiraju HLA-G\*01:04 molekulu. Karakteriše ih nesinonimna mutacija na položaju 755, kodon 110, pri čemu se dešava izmjena leucina u izoleucin i druge sinonimne mutacije. Nulti alel, HLA-G\*01:05N je čest među afričkom populacijom, azijskim zemljama i drugim mješanim populacijama. Nulti alel je povezan sa skraćenom HLA-G molekulom zbog brisanja citozina oko kodona 130 koji mijenja okvir čitanja. HLA-G\*01:06 alel je takođe čest među svjetskom populacijom, a karakteriše ga nesinonimna mutacija na položaju 1799, kodon 258 pri čemu se treonin mijenja sa metioninom kodirajući istoimeni molekul. I drugi aleli su takođe prisutni kod ljudi širom svijeta, ali ove koji su navedeni karakteriše polimorfizam (102).

HLA-G molekula se vezuje za inhibitorne receptore ILT2/CD85j/LILRB1 (ILT2), koji su eksprimirani na monocitima, B limfocitima, T limfocitima i NK ćelijama. Zbog interakcije sa ovim receptorima HLA-G molekula inhibitorno djeluje na NK ćelije, T limfocite i antigen prezentujuće ćelije (107-109). Pored toga, HLA-G pokazuje afinitet za receptore ILT4/CD85d/LILRB2 (ILT4) koji su eksprimirani na monocitima i dendritskim ćelijama i KIR2DL4/CD158d (KIR2DL4) koji imaju ograničenu ekspresiju na CD56 NK ćelijama (110, 111).

U virusnim infekcijama HLA-G molekule se vezuju za inhibitorne receptore ILT2 i KIR2DL4 pri čemu ove molekule ne indukuju imunski odgovor nego inhibiraju aktivnost NK ćelija, T limfocita i antigen prezentujućih ćelija te se po tome razlikuju od ostalih molekula HLA sistema (112). Dakle, kod zdravih osoba prisutan je bazalni nivo transkripcije HLA-G gena, dok se kod nekih maligniteta i virusnih infekcija povećava ekspresija HLA-G. Kod ovih patoloških stanja aktivnost NK ćelija se znatno smanjuje usljed povećane ekspresije HLA-G. Pored ovoga, virusi izbjegavaju imunski

odgovor domaćina i tako što modifikuju ekspresiju MHC molekula I klase te na taj način sprečavaju prezentaciju virusnih peptida i efektorsku ulogu T ćelija. Ovo doprinosi izbjegavanju imunskog odgovora pri čemu se uspostavlja perzistentna infekcija (113). Kada je riječ o tkivnoj distribuciji, HLA-G se značajnije prikazuje na fetalnim placentalnim ćelijama, te na taj način štiti plod od NK ćelija porijeklom od majke (114). Pored toga, eksprimira se i na ćelijama crijeva, pankreasu i timusu (112).

**Tabela 5.** Nomenklatura HLA-G alela sa razlikama u nukleotidnoj i proteinskoj sekvenci egzona 2, 3 i 4 (106)

HLA-G	Egzon 2					Egzon 3									Egzon 4			
	13	27	31	34	54	57	93	100	104	105	110	159	169	171	178	185	219	258
*01:01	TCC Ser	TAC Tyr	ACG Thr	GTG Val	CAG Gln	CCG Pro	CAC His	GGC Gly	GGG Gly	TCC Ser	CTC Leu	TAC Tyr	CAC His	TAC Tyr	ATG Met	CCU Pro	CGG Arg	ACG Thr
*01:02					CGG Arg													
*01:03			TCG Ser															
*01:04											ATC Ile							
*01:05N						CCA Ser	CAT His											
*01:06																		ATG Met
*01:07	TTC Phe																	
*01:08																	TGG Trp	
*01:09												CAC His						
*01:10			ATG Met															
*01:11			ATG Met								ATC Ile							
*01:12		CAC His																
*01:13N					TAG TOP	CCA Ser	CAT His											
*01:14								GAC Asp										ATG Met
*01:15									GTG Val		ATC Ile							
*01:16										TGC Cys								ATG Met
*01:17													CGC Arg	CAC His				
*01:18																GCU Ala		
*01:19			CTG Val								ATC Ile							
*01:20						CCA Ser									ACG Thr			
*01:21N						CCA Ser					ATC Ile							
*01:22						CCA Ser	CAT His	GGT Gly										TGG Trp

Maligni tumori su klinička stanja u kojima se velika pažnja daje ulozi imunskog sistema. Imunski sistem je specijalizovan da kontroliše tumorske ćelije i eliminiše ih. Bez obzira na imunski nadzor, tumori se razvijaju i kod imunokompetentnih osoba. Pored toga što je važno definisati tumorske



antigene na koje reaguje imunski sistem, značaj se daje i genskim promjenama koje povećavaju osjetljivost domaćina na karcinome. Utvrđeno je da su određeni polimorfizmi prisutni u karcinomima različitih anatomskih lokalizacija. Rezultati studija čiji je cilj bio povezati HLA-G polimorfizme sa karcinomima različitih anatomskih lokalizacija su u suprotnosti (115, 116). Studija Rolfsena i saradnika je pokazala da varijabilnosti HLA-G gena nisu faktor rizika za karcinom dojke (115). Međutim, suprotne rezultate su dobili Ouni i saradnici (116) koji su u svom radu prikazali da polimorfizmi HLA-G gena mogu povećati osjetljivost na karcinom dojke, odnosno da HLA-G može inhibirati signal NK ćelija što doprinosi bjekstvu ćelija raka od imunskog sistema. Slične rezultate dobili su i Jeong i saradnici (117). Istraživanje Yang i saradnika (118) pokazalo je da kod ispitanika koji imaju C7C genotip i C alel HLA-G +3142 SNP su značajno osjetljiviji na nastanak skvamocelularnog karcinoma grlića materice. Takođe su došli do rezultata da pacijentice koje imaju +3142 i +1537 C/C genotip i C alel i HPV 16 infekciju su podložnije nastanku skvamocelularnog karcinoma grlića materice. Druga istraživanja su pokazala i da postoji povezanost polimorfizama HLA-G gena sa karcinomom pluća i kolorektalnim karcinomom (119, 120). U svojoj studiji Agnihotri i saradnici su primjetili da pored konzumacije duvana, postoji i značajna povezanost polimorfizama HLA-G gena i rizika od karcinoma glave i vrata kod stanovništva sjeverne Indije (121).

U nekoliko studija pokazano je da određene HLA-G varijante i povišena ekspresija HLA-G dovode u vezu sa napredovanjem karcinoma bešike (122), kožnim melanomom (123), retinoblastomom (124), karcinomom štitine žlijezde (125), karcinomom želudca (126), ezofagealnim karcinomom (127), glioblastomom (128), akutnom mijeloidnom leukemijom (129), hepatocelularnim karcinomom (130).

Pored toga, polimorfizmi HLA-G gena dovode u vezu sa i povećanom osjetljivošću na autoimunska oboljenja-sistemskim lupus eritematosusom, reumatoidnim artritismom, dijabetes melitusom tip 1, psorijazom, astmom, Gravesovom bolešću (131).

## **1.10 Radna hipoteza**

- Prisustvo pojedinačnih infekcija, kao i koinfekcija onkogenim virusima značajno doprinose razvoju HNSCC.
- Postoji korelacija HLA-G polimorfizama sa povećanom osjetljivošću za nastanak infekcija i koinfekcija onkogenim virusima i razvojem HNSCC.

## 2 Ciljevi istraživanja

Ovim istraživanjem definisani su sledeći ciljevi:

1. Utvrditi učestalost pojedinačnih infekcija i koinfekcija onkogenim virusima HPV, EBV i BKV u tkivima HNSCC, kao i korelaciju sa lokalizacijom, histopatološkim gradusom i TNM klasifikacijom tumora
2. Utvrditi prisutne HLA-G polimorfizme u tkivima HNSCC, kao i korelaciju sa lokalizacijom, histopatološkim gradusom i TNM klasifikacijom tumora
3. Utvrditi povezanost HLA-G polimorfizama sa prisutnim infekcijama onkogenim virusima i razvojem HNSCC

### 3 Materijal i metode

Istraživanje predviđeno temom ove doktorske teze je sprovedeno po tipu retrospektivno-prospektivne studije presjeka od jula 2015. do marta 2020. godine, a obavljeno je u:

- Univerzitetsko-kliničkom centru (UKC) u Banjaluci, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina i
- Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Srbija.

Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije UKC Republike Srpske (rješenje broj: 01 – 9 – 222. 2/15, dana 06.07.2015. godine i rješenje broj: 01 – 9 – 724. 2/16, dana 07.10.2016. godine) i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (rješenje broj: 1550/V – 4, dana 31.05.2019. godine).

#### 3.1 Materijal

##### 3.1.1 Pacijenti

Od ukupno 789 pacijenata koji su primarno liječeni na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju i Klinici za uho, grlo i nos UKC u Republici Srpskoj u periodu 2014-2018. godine, sa patohistološki potvrđenom dijagnozom skvamocelularnog karcinoma glave i vrata, odabrani su uzorci 100 pacijenata za analizu. Kriterijumi za odabir su bili: dostupnost uzorka (operativno resekciono tkivo karcinoma svježe ili ukalupljeno u parafin), količina tkiva (25mg), kvalitet uzorka tkiva (odsustvo ćelijskog detritusa, nekrotičnog tkiva itd.), kao i dostupnost anamnestičkih i kliničkih podataka o pacijentu.

Svi ispitanici od kojih su prikupljeni svježi uzorci tkiva karcinoma tokom operativnog zahvata su dali saglasnost za učešće u studiji putem informisanog pristanka nakon detaljnog upoznavanja sa karakteristikama i ciljevima istraživanja. Prikupljanje svježih uzoraka tkiva, kao i arhivskih parafinskih blokova pacijenata je odobreno odlukama Etičke komisije UKC Republike Srpske.

Podaci koji su obrađeni ovim istraživanjem (pol, godina rođenja pacijenta, konzumacija duvana i alkohola, lokalizacija tumora, histopatološki gradus, TNM klasifikacija) su dobijeni uvidom u onkološke kartone i bolesničke anamneze (kompjuterska baza podataka) na Zavodu za patologiju UKC Republike Srpske.

U odnosu na godine života pacijenti su podijeljeni u tri grupe: I grupu su činili ispitanici dobi <50 godina života, u II grupu su svrstani pacijenti između 50-69 godina života, a u III grupi su bili bolesnici starosne dobi  $\geq 70$  godina.

##### 3.1.2 Klinički uzorci

Ovim istraživanjem je analizirano 60 uzoraka tkiva karcinoma ukalupljenih u parafin i 40 svježih uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata.

Iz bolničke kompjuterske baze podataka na Zavodu za patologiju UKC Republike Srpske su prema brojevima nalaza za svakog pacijenta analizirani histopatološki preparati koji su bojeni hematoksilinom i eozinom (operativni resekcioni materijal, ne biopat). Na osnovu preparata koji su sadržavali najviše tumorske mase uz odsustvo ćelijskog detritusa i nekrotiziranog tkiva izdvajani su arhivski parafinski blokovi sa istim tumorskim materijalom. Sterilnom iglom je označen tumorski materijal na parafinskom bloku (engl. *Formalin fixed paraffin embedded* – FFPE) u cilju eliminacije parafina i zatim je mikrotomom isječeno po 5 parafinskih listića debljine 5-10 mikrona u dve tube zapremine od 1,5 ml. Noževi za mikrotom kojima su sječeni parafinski blokovi su čišćeni između svakog parafinskog bloka ksilolom i 75% etanolom kako bi se spriječila kontaminacija uzoraka. Uzorci su čuvani u sterilnim tubama na sobnoj temperaturi do molekularnih analiza.

Svježa tkiva su skupljana nakon operativnog zahvata od strane nadležnog hirurga uz nadzor patologa (hirurški je reseciran i odvajan tumorski materijal, ne nekrotično tkivo u toku operativnog zahvata). Tkiva zapremine do 25 mg su stavljana u sterilne bočice sa fiziološkim rastvorom i zamrznuta na -70°C do dalje obrade.

## 3.2 Metode

Molekularne analize su urađene u Laboratoriji za virusologiju na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog Univerziteta u Beogradu i obuhvatile su:

- izolaciju DNK iz parafinskih listića tkiva i svježeg tkiva HNSCC,
- spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupne DNK,
- umnožavanje humanog beta-aktina klasičnom reakcijom lančanog umnožavanja (engl. *Polymerase chain reaction*)-PCR metodom (kontrola izolacije DNK),
- umnožavanje HPV DNK klasičnom i nested PCR metodom, HPV DNK kvantitaciju PCR metodom u „realnom vremenu“ (engl. *Real-time* PCR), genotipizaciju HPV DNK metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru,
- umnožavanje i genotipizacija EBV DNK nested PCR metodom, EBV DNK kvantitaciju Real-time PCR metodom,
- umnožavanje BKV DNK seminested PCR metodom,
- umnožavanje JCV DNK seminested PCR metodom,
- umnožavanje egzona 2 i 3 HLA-G gena i određivanje HLA-G polimorfizama metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru.

### 3.2.1 Izolacija DNK iz parafinskih listića tkiva i svježeg tkiva

Za ekstrakciju DNK iz biološkog materijala su korištena dva komercijalna seta reagenasa QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Njemačka) i QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputstvu proizvođača.

#### 3.2.1.1 *Izolacija DNK iz parafinskih listića tkiva*

Prvi korak u ekstrakciji DNK iz FFPE uzoraka je bilo uklanjanje parafina ksilolom. Ovaj protokol za uklanjanje parafina je isti za oba seta reagenasa koja su korištena za izolaciju DNK iz FFPE uzoraka.

U tube u kojoj su bile sekcije tkiva ukalupljenog u parafin dodano je 1 ml ksilola nakon čega su tube zatvorene i vorteksovane 10 sekundi. Sledeći korak je bilo centrifugiranje na maksimalnoj brzini (20000xg) tokom 2 minute. Nakon ovoga pažljivo je odstranjen supernatant. Potom je dodano 1 ml etanola (96-100%) i tube su opet vorteksovane. Sadržaj tuba je zatim centrifugiran na maksimalnoj brzini (20000xg) 2 minute. Ova procedura je ponovljena još dva puta u cilju efikasnije eliminacije parafina. Poslednji korak deparafinizacije je bilo uklanjanje supernatanta, nakon čega su tube otvorene i čuvane u termostatu na 37°C do isparenja rezidualnog etanola.

Izolacija DNK iz parafinskih listića tkiva sa QIAamp DNA FFPE Tissue kitom nakon uklanjanja parafina je učinjena na sledeći način:

- U tube dodano je po 180 µl Buffer ATL i 20 µl proteinaze K te su tube vorteksovane i inkubirane preko noći na temperaturi od 56 °C u cilju liziranja tkiva. Nakon ove inkubacije tube su držane još 60 minuta na temperaturi od 90°C.
- Nakon što je u svaku tubu dodano 200 µl Buffer AL uslijedilo je vorteksovanje. Zatim je sipano 200 µl 96-100% etanola i opet su tube vorteksovane da bi se dobila homogena smjesa.
- Dobijeni lizirani sadržaji su sipani u QIAamp MinElute kolone, te su nakon toga tube centrifugirane na 6000xg 1 minutu.
- Nakon centrifugiranja QIAamp MinElute kolone su prenesene u nove kolekcione tube od 2 ml. Dodano je po 500 µl Buffer AW1u kolone u kolekcionim tubama, koje su zatim centrifugirane na 6000xg 1 minutu.
- Nakon ovoga QIAamp MinElute kolone su prenesene u čiste kolekcione tube od 2 ml. Dodano je u svaku kolonu po 500 µl Buffer AW2, koje su zatim centrifugirane na 6000xg 1 minutu.
- U narednom koraku QIAamp MinElute kolone su prenesene u čiste kolekcione tube iz seta i centrifugirane na maksimalnoj brzini (20 000xg) 3 minute kako bi se membrana u potpunosti osušila.
- Prije sipanja pufera za rastvaranje, kolone su stavljene u čiste tube od 1,5 ml u koje je pažljivo pipetirano po 30 µl Buffer ATE na centar membrane u kolonama. Uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minute. Na kraju su tube centrifugirane na maksimalnoj brzini (20000xg) 3 minute. Dobijeni DNK filtrat do je čuvan na -20°C do molekularnih analiza.

Izolacija DNK sa setom reagenasa QIAamp DNA Mini Kit je urađena po sledećem protokolu:

- Poslije uklanjanja parafina pelet u tubama je resuspendovan u 180 µl Buffer ATL, nakon čega je u svaku tubu dodano po 20 µl proteinaze K. Tube su vorteksovane i inkubirane na 56°C do liziranja tkiva.
- U sledećem koraku je dodano po 200 µl Buffer AL i tube su vorteksovane 15 sekundi. Potom je sadržaj tuba inkubiran na 70°C 10 minuta. Da bi se uklonio sadržaj sa unutrašnjosti poklopca tube su kratko centrifugirane. Dodano je po 200 µl 96-100% etanola i tube su vorteksovane 15 sekundi.
- Protokol za nastavak izolacije DNK je bio isti protokolu za izolaciju DNK sa QIAamp DNA FFPE Tissue setom reagenasa.

### 3.2.1.2 *Izolacija DNK iz svježeg tkiva*

Izolacija DNK iz uzoraka svježeg tkiva karcinoma sa setom QIAamp DNA Mini Kit je urađena po sledećem protokolu:

- Tkiva težine do 25 mg su isječena sterilnim skalpelom i nakon toga su pojedinačno snažno samljevena u sterilnom avanu u cilju homogenizacije tkiva. Ovako pripremljena tkiva su

- prebačena u tube zapremine 1,5 ml nakon čega je u svaku tubu dodadno 180  $\mu$ l Buffer ATL i 20  $\mu$ l proteinaze K. Tube su vorteksovane i inkubirane na 56°C do liziranja tkiva (2-4h).
- U narednom koraku je dodano po 200  $\mu$ l Buffer AL i tube su vorteksovane 15 sekundi. Sadržaj je potom inkubiran na 70°C 10 minuta, nakon čega je dodano po 200  $\mu$ l 96-100% etanola i urađeno vorteksovanje 15 sekundi.
  - Smjese su sipane u QIAamp Mini spin kolone te su nakon zatvaranja kolone centrifugirane na 6000xg 1 minutu.
  - QIAamp Mini spin kolone su nakon ovoga stavljenje u čiste kolekcione tube. Dodano je po 500  $\mu$ l Buffer AW1 u svaku kolonu nakon čega su centrifugirane na 6000xg 1 minutu.
  - Kolekcione tube sa filtratom su odstranjene a QIAamp Mini spin kolone su prenesene u čiste kolekcione tube. Zatim je dodano po 500  $\mu$ l Buffer AW2 i tube su centrifugirane na maksimalnoj brzini (20000xg) 3 minute.
  - QIAamp Mini spin kolone su stavljene u kolekcione tube i centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 minut kako bi se membrana spin kolone u potpunosti osušila.
  - U zadnjem koraku QIAamp Mini spin kolone su opet prenesene u čiste tube od 1,5 ml dok su kolekcione tube odstranjene. Nakon dodavanja po 30  $\mu$ l Buffer AE tube su inkubirane na sobnoj temperaturi 1 minutu a zatim i centrifugirane na 6000xg 1 minutu.
  - Dobijeni DNK filtrat se čuvao na -20°C do molekularnih analiza.

### 3.2.1.3 *Određivanje kvantiteta i kvaliteta izolovane DNK*

Količina i kvalitet izolovane ukupne DNK su testirane spektrofotometrijskom analizom (Pharmacia GeneQuant Pro Spectrophotometer, Hyland Scientific, USA; granica detekcije 5 ng/ $\mu$ l), a integritet DNK je provjeren amplifikacijom humanog gena beta-aktina pri čemu je umnožavan fragment dužine 360 bp.

Koncentracija DNK je ispitivana spektrofotometrijskim mjerenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 260 nm. Kvalitet DNK je određen mjerenjem odnosa A260/230 i A260/280. Ukoliko se izoluje DNK bez nečistoća (proteini, fenoli, soli i drugi spojevi), onda je optička gustina DNK A260/230 u opsegu 2-2,2, a očekivani odnos A260/280 je iznad 1,8. Vrijednost odnosa A260/230 ispod 2 govori u prilog tome da je DNK kontaminirana solima parafinskog porijekla. Ukoliko je DNK kontaminirana proteinima vrijednosti odnosa A260/280 je ispod 1,8. Kalibracija spektrofotometra izvedena je tako što je u aparat za analizu kvaliteta i količine DNK unesena kiveta u koju je sipano 10  $\mu$ l pufera za ispiranje DNK i 10  $\mu$ l izolovane DNK.

Integritet DNK je provjeren umnožavanjem humanog beta-aktina PCR metodom. Reakcija umnožavanja je izvedena u smjesi volumena 25  $\mu$ l u koju je dodano: 5  $\mu$ l izolovane DNK, 5,5  $\mu$ l dejonizovane vode, 12,5  $\mu$ l PCR master miksa (Taq PCR Master Mix Kit-250U, Qiagen, Hilden, Njemačka) i 1  $\mu$ l svakog prajmera za humani beta-aktin. Sekvence prajmera koji su korišteni za umnožavanje humanog beta-aktina su 5'-CATGTGCAAGGCCGGCTTCG-3' i 5'-GAAGGTGTGGTGCCAGATTT-3'.

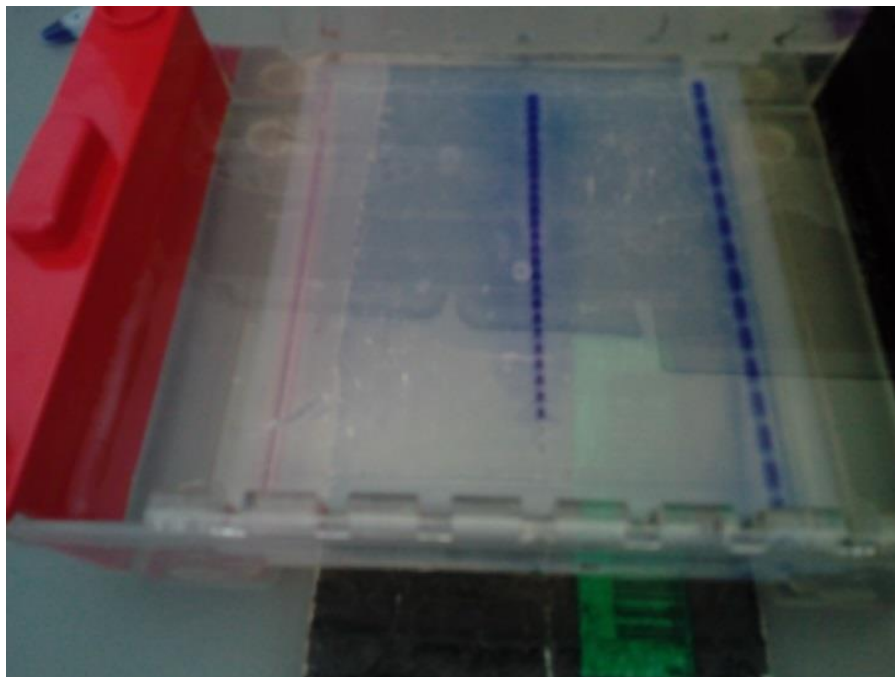
Umnožavanje je urađeno u thermocycler-u Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) prema sledećem protokolu: početna denaturacija u trajanju od 3 minute na 95°C, nakon čega slijedi 40 ciklusa od 94°C-30 sekundi, 55°C-1 minut, 72°C-90 sekundi i potom finalna ekstenzija 72°C- u trajanju od 10 minuta (132) (Slika 9).

Svi umnoženi produkti u ovom radu su vizuelizovani elektroforezom na 2% agaroznom gelu u aparatu sa ultraljubičastim svjetlom u UV transluminatoru (Benchtop UV Transilluminators, UVP, LLC, Upland, CA, USA). Za označavanje nukleinskih kiselina korišten je etidijum bromid (Ethidium Bromide Solution 1%, AppliChem GmbH, Heidelberg, Njemačka).

Gel koncentracije 2% je napravljen miješanjem 2 g agaroznog praha, 100 ml radnog rastvora Tris-acetate-EDTA (TAE) pufera koji omogućava pokretljivost jona za vrijeme elektroforeze i etidijum bromida. Za određivanje veličine umnoženih DNK fragmenata korištena je smjesa DNK standarda veličine 100-2000 bp (100 bp Ladder, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA). Prisustvo fragmenata dužine od 360 bp je smatrano pozitivnom reakcijom (Slika 10).



**Slika 9.** Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)



**Slika 10.** Elektroforeza u 2% agaroznom gelu

### 3.2.2 Dokazivanje i genotipizacija HPV

Za dokazivanje HPV u uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata korišćena je PCR metoda i to: klasičan PCR za umnožavanje HPV DNK L1 gena, klasičan PCR za umnožavanje HPV DNK E1 gena i nested PCR za umnožavanje HPV DNK L1 gena.

U Tabeli 6 prikazane su nukleotidne sekvence prajmera korištenih za umnožavanje HPV L1 i E1 gena u klasičnim odnosno Nested PCR reakcijama (133, 134, 135).

**Tabela 6.** Nukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje HPV L1 i E1 gena (133, 134, 135)

HPV DNK gen	Prajmer	Nukleotidna sekvenca 5'-3'	dužina umnoženog produkta (bp)
L1	MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG	450 bp
	MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG	
	G5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	150 bp
	G6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	
E1	GP1	TGGTACAATGGGCATATGAT	450 bp
	GP2	ATAATGGCTTTTGGAAATTACA	

Napomena: Varijabilni nukleotidi su označeni sa M, R, W, Y; M = A or C; R = a or G; W = A or T; Y = C or T

#### 4.2.1.1. Umnožavanje L1 gena klasičnom PCR metodom

Reakciona smješa za umnožavanje HPV DNK L1 gena klasičnim PCR metodom je bila zapremine od 25 µl i pripremana je prema sledećem protokolu:

- 12,5 µl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka),
- po 1,25 µl prajmera MY09/MY11 koncentracije 10 pmol,
- 5 µl dejonizovane vode,
- 5 µl DNK ekstrakta.

Temperatura i uslovi PCR u „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) su bili sledeći: inicijalna denturacija se izvodila na temperaturi 95°C-5 minuta, zatim je uslijedilo 40 ciklusa od 94 °C-30 sekundi, vezivanje prajmera na 58°C-30 sekundi, ekstenzija DNK na 72°C-1 minut i na kraju finalna ekstenzija DNK lanca na 72°C-20 minuta.

Prusustvo produkta od 450 bp na 2% agaraznom gelu se smatralo pozitivnim nalazom.

#### 3.2.2.1 Umnožavanje E1 gena klasičnom PCR metodom

Reakciona smješa za umnožavanje HPV DNK E1 gena klasičnim PCR metodom je bila zapremine od 25 µl i pripremana je prema sledećem protokolu:

- 12,5 µl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka),



- 1,25 µl prajmera GP1/G2 koncentracije koncentracije 10 pmol,
- 5 µl dejonizovane vode,
- i 5 µl DNK filtrata.

Temperaturni profil za dokazivanje HPV E1 gena u ispitivanim uzorcima je bio sledeći: inicijalna denaturacija na 85°C 5 minuta, potom 40 ciklusa na 94°C 1 minutu, 50°C 1 minutu, 72°C 90 sekundi, te finalna elongacija na 72°C 10 minuta. Za ovu reakciju upotrebljen je „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Prusustvo produkta od 450 bp na 2% agaraznom gelu se smatralo pozitivnim nalazom.

### 3.2.2.2 Umnožavanje HPV DNK L1 gena nested PCR metodom

Za amplifikaciju L1 gena nested PCR metoda se izvodila u 2 kruga u kojima su korištena dva para prajmera, MY09/MY11 u prvom krugu i G5+/G6+ u drugom krugu (133, 135) (Tabela 6). Za prvi krug PCR, protokol za pripremu PCR smjese i temperaturni profil za umnožavanje fragmenta 450 bp L1 gena je bio identičan protokolu za umnožavanje L1 gena klasičnom PCR metodom.

U drugom krugu, reakciona smjesa zapremine od 25 µl je sadržala:

- 12,5 µl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka),
- 1,25 µl prajmera G5+/G6+ koncentracije 2 pmol,
- 5 µl dejonizovane vode,
- i 5 µl umnoženog produkta prvog kruga.

Umnožavanje u oba kruga je izvođeno u PCR aparatu u „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) a temperaturni uslovi drugog kruga nested PCR metode su bili: inicijalna denaturacija 95°C-5 minuta, zatim 35 ciklusa 95°C 30 sekundi, 45°C-30 sekundi, 72°C-1 minuta i finalna ekstenzija 72°C-10 minuta.

Za vizuelizaciju umnoženih produkata nested PCR metode, pripremljen je 2% agarozni gel. Prusustvo produkta od 150bp se smatralo HPV pozitivnim nalazom.

### 3.2.2.3 Kvantitacija HPV DNK Real-time PCR metodom

U ovom istraživanju urađena je i detekcija i određivanje broja genskih kopija HPV DNK u uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata Real-time PCR metodom.

Korišten je komercijalni HPV Screening Kit (Sansure Biotech Inc., Kina) prema uputstvu proizvođača. Test je dizajniran za detekciju 15 HPV tipova (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) sa granicom detekcije od 1000 kopija/ml bez mogućnosti HPV genotipizacije. Za procjenu reakcije umnožavanja, praćenje prisustva inhibitora, te za procjenu efikasnosti izolacije nukleinske kiseline korištena je interna kontrola humanog beta-globina koja je uključena u komercijalni kit. Umnožavanje HPV DNK i interne kontrole odnosno ćelijske DNK je mjerena prema pragovnom ciklusu odnosno ciklusu početka amplifikacije ciljne nukleinske kiseline (engl. *Cycle Threshold-Ct*). Prema uputstvu proizvođača testa, pozitivan nalaz HPV DNK je prisutan ukoliko je  $Ct \leq 39$ , a za internu kontrolu, test je bio tumačen kao pozitivan ukoliko je  $Ct \leq 40$ .

Reakciona smjesa je prema uputstvu proizvođača ukupne zapremine 45 µl bila sastavljena od 36 µl PCR miksa, 4 µl enzima i 5 µl izolovane DNK.

Umnožavanje u realnom vremenu je obuhvatilo aktivaciju UNG enzima na 50°C u trajanju od 2 minute, nakon čega je slijedila inicijalna denaturacija DNK u vremenu od 5 minuta na 94°C, nakon čega je uslijedilo 45 ciklusa koji su obuhvatili dva koraka, prvi, denaturaciju DNK na temperaturi od 94°C 15 sekundi, te drugi, koji je obuhvatao vezivanje prajmera i proba, kao i ekstenziju ciljne nukleinske kiseline na 57°C u vremenu od 35 sekundi.

Amplifikacija u realnom vremenu, analiza rezultata i određivanja pragovnog ciklusa su izvedeni pomoću 7500 SDS programa verzija 2.0 na aparatu ABI 7500 Real-time System (Applied Biosystems, USA).

#### 3.2.2.4 HPV genotipizacija primjenom reakcije direktnog sekvenciranja po Sangeru

U svrhu utvrđivanja HPV genotipova, u ovom radu je korištena direktna metoda sekvenciranja po Sangeru. U ovoj metodi se koriste 2',3'- didezoksiribonukleotid trifosfat (ddNTP) obilježeni fluorescentnim bojama koji imaju vodonikov atom na 3' ugljenikovom atomu umjesto hidroksilne grupe. Kada se didezoksiribonukleotidi ugrade u lanac dolazi do prekida sinteze DNK lanca, jer je onemogućeno formiranje fosfodiesterne veze sa sledećim nukleotidom. Za svaku bazu G, T, C ili A postoji odgovarajući didezoksiribonukleotid.

U toku replikacije DNK u *in vitro* uslovima, DNK polimeraza ne pravi razliku između dezoksiribonukleotid trifosata (dNTP) i ddNTP. Zbog toga se ddNTP vezuje u DNK lanac preko svoje 5' trifosfatne grupe koja se vezuje za slobodnu 3' hidroksilnu grupu poslednjeg nukleotida u lancu. Razdvajanje jednolančanih DNK fragmenata različite veličine (razlika je u po jednom nukleotidu) se vrši elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, a očitavanje fluorescencije primjenom laserskog optičkog sistema.

Za određivanje HPV genotipova, korišćeni su HPV pozitivni produkti Nested PCR reakcije.

Metod direktnog sekvenciranja se sastojao iz:

- A. prečišćavanja PCR produkata,
- B. reakcije cikličnog sekvenciranja,
- C. prečišćavanja produkata reakcije cikličnog sekvenciranja i
- D. kapilarne elektroforeze i određivanja HPV genotipa.

#### A. Prečišćavanje PCR produkata

Prečišćavanje PCR produkata je urađeno primjenom komercijalnog testa MiniElute PCR purification (Qiagen, Njemačka) prema uputstvu proizvođača.

Postupak prečišćavanja se sastojao iz sledećih koraka:

- Prvo je u 15 µl PCR produkta sipano 75 µl PBI pufera koji ima ulogu da veže umnoženu DNK za membranu kolone. Dobijena smješa je stavljena u MiniElute kolonu koja je centrifugirana 1 minutu na 18000xg.
- Nakon toga je u kolonu dodano 750 µl PE pufera i vršeno je centrifugiranje 1 minutu.
- Nakon odbacivanja tečnosti koja je prošla kroz kolonu, kolona se postavljala nazad u 2 ml kolekcionu tubicu i zatim je centrifugirana još 1 minutu na 18000xg.
- U poslednjem koraku kolona je stavljena u novu tubicu od 1,5 ml i potom je sipano 10 µl EB pufera (pufer za eluciju) na centar membrane kolone. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minute vršeno je centrifugiranje 1 minutu na 18000xg.

Dobijeni prečišćeni filtrat se dalje koristio za reakciju cikličnog sekvenciranja.

## B. Reakcije cikličnog sekvenciranja

U reakciji cikličnog sekvenciranja je korišten set ABI BigDye Terminator v.3.1 kompleta (Applied Biosystem, Foster City, USA) te prajmeri G5+/G6+ za fragment HPV DNK L1 gena. Rađene su po dve reakcije cikličnog sekvenciranja za svaki od produkata obzirom da se u reakciji koristi jedan prajmer, za svaki od DNK lanaca.

Reakcionu smjesu od 10 µl su činili:

- 2 µl Big Dye Terminator Mix-a,
- 2 µl Big Dye Terminator pufera,
- po 1,25 µl G5+ ili GP6+ prajmera,
- 2,75 µl vode,
- 2 µl prečišćenog PCR produkta.

Protokol reakcije cikličnog sekvenciranja je bio sledeći: inicijalna denaturacija 95°C-5 minuta, zatim 35 ciklusa 95°C-30 sekundi, 45°C-30 sekundi, 72°C-1 minuta i finalna ekstenzija 72°C-10minuta.

## C. Prečišćavanje produkata reakcije cikličnog sekvenciranja

Nakon reakcije cikličnog sekvenciranja produkti su prečišćavani 75% izopropanolom. Produkti u koje je sipano 80 µl 75% izopropanola su inkubirani 15 minuta u mraku, nakon čega su centrifugirani 45 minuta na 2000xg. Supernatant je potom odliven i tubice su okrenute naopačke i ponovo centrifugirane 2 minute na 700xg. U zadnjem koraku su otvorene tubice sušene na vazduhu u mraku.

Poslije prečišćavanja izopropanolom izvršena je denaturacija. U tubice je sipano po 10µl formamida (Applied Biosystem, Foster City, USA) nakon čega su tubice unesene u „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u kome je urađena denaturacija po protokolu: 95°C-2 min i 4°C u trajanju od 2 minute.

## D. Kapilarna elektroforeza i određivanje HPV genotipa

Nakon prečišćavanja i denaturacije produkti reakcije su uneseni u automatski DNK sekvenator (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Foster City, USA), u kome se odvija elektroforeza uz očitavanje fluorescentnih signala didezoksinukleotida u DNK fragmentima različite veličine (Slika 11). Dobijeni rezultati su predstavljeni u vidu elektroferograma. Na osnovu dobijenog elektroferograma, sekvence su analizirane upotrebom softverskih paketa Sequence Analysis 5.1 i SeqScape 2.5 (Applied Biosystem, Foster City, USA).

Prvo su dobijene nukleotidne sekvence oba lanca međusobno poređene (engl. Aligment), a zatim su određivane tzv. konsenzus sekvence (složena sekvenca) za svaki od uzoraka.

Primjenom BLAST programa je određen HPV genotip svakog izolata poređenjem sa referentnim sekvencama u NCBI bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije SAD (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Na osnovu procenta slaganja dobijene sekvence više od 95% sa referentnom sekvencom iz genske baze podataka je određivan HPV genotip.



**Slika 11.** ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Foster City, USA

### 3.2.3 Dokazivanje i genotipizacija EBV

#### 3.2.3.1 *Umnožavanje i genotipizacija EBV DNK nested PCR metodom*

U ovom radu, EBV se u tkivima karcinoma glave i vrata dokazivao umnožavanjem EBNA-2 gena nested-PCR metodom kojom je istovremeno određivan i genotip virusa. Za amplifikaciju fragmenta EBNA-2 gena u prvom krugu PCR korišteni su spoljašnji prajmeri (*EBV-forward outer* i *reverse outer*) za fragment od 596 bp, dok su za drugi krug upotrebljena su 2 para unutrašnjih prajmera za genotipizaciju i to za fragment dužine od 497 bp za EBV-1 i fragment dužine od 165 bp za EBV-2 (136). U Tabeli 7 su prikazane nukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje i genotipizaciju EBV DNK.

**Tabela 7.** Nukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje i genotipizaciju EBV (136)

Prajmer	Nukleotidna sekvenca 5'-3'	Dužina umnoženog produkta
<b>EBV</b> <i>forward outer</i> <i>reverse outer</i>	<b>AGGGATGCCTGGACACAAGA</b> <b>TGGTGCTGCTGGTGGTGGCAA</b>	<b>596 bp</b>
<b>EBV-1</b> <i>forward inner</i> <i>reverse inner</i>	<b>TCTTGATAGGGATCCGCTAGGATA</b> <b>ACCGTGGTTCTGGACTATCTGGATC</b>	<b>497 bp</b>
<b>EBV-2</b> <i>forward inner</i> <i>reverse inner</i>	<b>CATGGTAGCCTTAGGACAT</b> <b>AGACTTAGTTGATGCTGCCCTAG</b>	<b>165 bp</b>

Reakciona smjesa od 25  $\mu$ l za prvi krug amplifikacije je bila sledećeg sastava:

- 12,5  $\mu$ l master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka),
- po 1,25  $\mu$ l OUTER prajmera
- 5  $\mu$ l dejonizovane vode,
- i 5  $\mu$ l DNK filtrata.

Protokol za PCR amplifikaciju u prvom krugu je bio sledeći: inicijalna denaturacija 95 °C 3 minute, zatim je uslijedilo 30 ciklusa 95°C 30 sekundi, 59°C 45 sekundi, 72°C 1 minutu, te finalna ekstenzija 72°C 5 minuta.

Za drugi krug je korišteno 3  $\mu$ l umnoženog produkta iz prvog kruga, s tim da su pripremane dvije 25  $\mu$ l smjese u cilju identifikacije EBV genotipa. U oba miksa je dodano po 12,5 $\mu$ l master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka), 7  $\mu$ l vode, po 1,25  $\mu$ l odgovarajućih INNER prajmera i po 3  $\mu$ l umnoženog produkta iz prvog kruga. Obe reakcije su umnožavane u istim temperaturnim uslovima: inicijalna denaturacija 95°C 3 minute, te 40 ciklusa na 95°C 30 sekundi, 57°C 30 sekundi, 72°C 90 sekundi i finalna ekstenzija na 72°C 7 minuta.

Za vizuelizaciju umnoženih produkata nested PCR metode, pripremljen je 2% agarozni gel. Prusustvo produkta od 497 bp se smatralo EBV-1 pozitivnim nalazom, a prisustvo fragmenta od 165 bp je ukazivalo na EBV-2 pozitivni nalaz.

### 3.2.3.2 Kvantitacija EBV DNK Real-time PCR metodom

U svrhu detekcije i određivanja broja kopija EBV DNK u tkivima karcinoma glave i vrata rađen je in-house real-time PCR pri čemu je umnožavan BamH-W region. Za ovu reakciju su korišteni prajmeri nukleotidnih sekvenci: FW 5'-ACG TAA GCC AGA CAG CAG CC-3' i REV 5'-TTT GTG TGG ACT CCT GGC G-3'. Nukleotidna sekvenca probe bila je FAM 5'-TCCTGCAGCTATTTCTGGTTCGCATCA-3' TAMRA (137).

Sastav Real-time PCR smjese za kvantitaciju EBV DNK je prikazan u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Sastav Real-time PCR smjese za kvantitaciju EBV DNK

Taqman PCR miks (Applied Biosystems, USA)	12,5 $\mu$ l
Prajmer ( <i>forward</i> )	2 $\mu$ l (10 $\mu$ M)
Prajmer ( <i>reverse</i> )	2 $\mu$ l (10 $\mu$ M)
dejonizovana voda (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)	2,5 $\mu$ l
Proba (R-FAM, Q-TAMRA)	1 $\mu$ l (10 $\mu$ M)
Uzorak ili Standardi EBV DNK BamH-W (Clonit, Italija)	5 $\mu$ l

Fragment BamH-W je umnožavan po sledećem protokolu na aparatu ABI 7500 sistemu (Applied Biosystems, USA): 50°C 2 minute, zatim 95°C 10 minuta, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa na 95°C u trajanju 15 sekundi i na temperaturi od 60°C 1 minutu. Nakon završetka amplifikacije urađena je analiza rezultata primjenom 7500 SDS softvera verzija 2.0 na aparatu ABI 7500 Real-time System (Applied Biosystems, USA).

Broj kopija EBV DNK u uzorcima je određivan na osnovu vrijednosti pragovnih ciklusa standarda sa poznatim koncentracijama EBV DNK. Limit detekcije je bio 200 kopija/μl. U reakciji su korišćena 4 standarda sa količinama od 10<sup>3</sup> -10<sup>6</sup> kopija EBV DNK. Primjenom navedenog softvera je na osnovu pragovnih ciklusa standarda konstruisana kalibraciona linija, a zatim je na osnovu nje određivan broj kopija EBV DNK u uzorcima.

### 3.2.4 Dokazivanje BKV DNK seminested PCR metodom

Za dokazivanje BK virusa u uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata korišćen je seminested PCR metod. Za amplifikaciju fragmenata unutar VP1 kodirajućeg regiona BK virusa primjenjeni su prajmeri koji su prikazani u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Nukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje BK virusa (138)

Prajmer	Nukleotidna sekvencija 5'-3'	Dužina umnoženog produkta
<b>forward outer</b> <b>reverse outer/inner</b>	<b>CGTGCAAGTGCCAAAACCTAC</b> <b>GACCCTGCATGAAGGTTAAG</b>	<b>335 bp</b>
<b>forward inner</b> <b>reverse outer/inner</b>	<b>GAAGTTAAAACCTGGGGTAGTA</b> <b>GACCCTGCATGAAGGTTAAG</b>	<b>290 bp</b>

Reakciona smješa u prvom krugu je bila zapremine 25 μl i činile su je: 12,5 μl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka), po 1 μl spoljašnjih prajmera, 5,5 μl vode i 5 μl uzorka. Reakcija je izvedena u „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Njemačka) i program za prvi krug se sastojao od sljedećih koraka: početna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 minuta, nakon čega slijedi 40 ciklusa 95°C-30 sekundi, 60°C-40 sekundi, 72°C-1 minutu i finalna ekstenzija na 72°C-10 minuta (138).

U drugom krugu pripremljena je PCR reakciona smjesa koja je bila sledećeg sastava: 12,5 μl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka), po 1 μl unutrašnjih prajmera, 8 μl vode i 2,5 μl umnoženog produkta prvog kruga.

Temperaturni uslovi za amplifikaciju u drugom krugu su bili identični uslovima amplifikacije prvog kruga s tim da je vezivanje prajmera bilo na 60°C u trajanju od 1 minute u drugom krugu umnožavanja.

Prusustvo produkta od 335 bp nakon prvog kruga odnosno 290 bp nakon drugog kruga seminested PCR metode na 2% agaraznom gelu se smatralo pozitivnim nalazom na BK virus.

### 3.2.5 Dokazivanje JCV DNK seminested PCR metodom

Za dokazivanje JC virusa u uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata korišćen je seminested PCR metod. Prajmeri za VP1 kodirajući region JC virusa koji su korišćeni u ovoj metodi prikazani su u Tabeli 10 (138).

**Tabela 10.** Nukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje JC virusa (138)

Prajmer	Nukleotidna sekvencija 5'-3'	Dužina umnoženog produkta
forward outer reverse outer/inner	TTCCACTACCCAATCTAAATGAGG GTTTGTAACATGCCACAGACATC	539 bp
forward inner reverse outer/inner	CTCATGTGGGAGGCTGTGACCT GTTTGTAACATGCCACAGACATC	495 bp

Sastav reakcione smjese u prvom krugu seminested PCR metode za dokazivanje JC virusa od 25 µl je bio sledeći:

- 12,5 µl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka),
- po 1 µl spoljašnjih prajmera,
- 5,5 µl vode,
- 5 µl uzorka.

Drugi krug se sastojao od smeše zapremine 25 µl koja je uključivala:

- 12,5 µl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka),
- po 1 µl unutrašnjih prajmera,
- 8 µl vode,
- 2,5 µl umnoženog produkta prvog kruga.

Uslovi amplifikacije obe reakcije su bili identični uslovima prvog kruga seminested PCR metode za dokazivanje BK virusa.

Prusustvo produkta od 539 bp nakon prvog kruga odnosno 495 bp nakon drugog kruga seminested PCR metode na 2% agaraznom gelu se smatralo pozitivnim nalazom na JC virus.

### 3.2.6 Određivanje HLA G polimorfizama

#### 3.2.6.1 *Umnožavanje egzona 2 i 3 HLA-G gena humane DNK*

Da bi se odredili polimorfizmi HLA-G, prvo su umnožena dva regiona HLA-G gena:

- egzon 2-između nukleotida 6077-6665 (analizirani su kodoni 31, 54, 57 i 69),
- egzon 3-između nukleotida 6453-6910 (analizirani su kodoni 93, 107, 110 i 131).

Za umnožavanje egzona 2 i 3 korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 11 (139).

Reakciona smjesa za amplifikaciju oba fragmenta je sadržala po: 12,5 µl master miksa (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Njemačka), 5,5 µl vode i odgovarajuće prajmere u količini od po 1 µl (za egzon 2 G25S i G23S, a za egzon 3 G35S i G33N) i 5 µl DNK filtrata.

Uslovi za umnožavanje egzona 2 u bili sledeći: inicijalna denaturacija 94°C-3 minute, zatim 40 ciklusa 94°C-1 minuta, 48°C-30 sekundi, 72°C-1 minuta, i finalna ekstenzija 72°C-10 minuta. Temperaturni parametri su bili identični i za umnožavanje drugog fragmenta odnosno egzona 3, s tim da je temperatura na kojoj su vezali prajmeri G35 i G33 iznosila 58°C u trajanju 30 sekundi.

**Tabela 11.** Nukleotidne sekvence prajmera za umnožavanje HLA-G gena (139)

<b>Prajmer</b>	<b>Nukleotidna sekvencija 5'-3'</b>	<b>Dužina umnoženog produkta</b>
<b>egzon 2</b>		
<b>G25S</b>	<b>TCCATGAGGTATTTTCAGCGC</b>	<b>588 bp</b>
<b>G23S</b>	<b>AGGTAATCCTTGCCATCGTA</b>	
<b>egzon 3</b>		
<b>G35S</b>	<b>CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA</b>	<b>457 bp</b>
<b>G33N</b>	<b>CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTGAG</b>	

Za vizuelizaciju umnoženih produkata PCR metode za HLA-G gen, pripremljen je 2% agarozni gel. Prusustvo produkta od 588 bp za egzon 2 i produkta od 457 bp za egzon 3 je ukazivalo na uspješnu amplifikaciju humane DNK za HLA-G gen.

### 3.2.6.2 *Određivanje HLA-G alelnih varijanti reakcijom direktnog sekvenciranja po Sangeru*

U cilju određivanja HLA-G polimorfizama rađena reakcija cikličnog sekvenciranja direktnom metodom po Sangeru. Protokol za reakciju cikličnog sekvenciranja za umnožene fragmente egzona 2 i egzona 3 obuhvatao je: prečišćavanje PCR produkata, reakciju cikličnog sekvenciranja, prečišćavanje produkata reakcije cikličnog sekvenciranja, kapilarnu elektroforezu i određivanje alelnih varijanti.

Protokol je obuhvatao sve korake koji su bili identični onima koji su navedeni za metod direktnog sekvenciranja po Sangeru za određivanje HPV genotipova, s tim da je protokol za reakciju cikličnog sekvenciranja bio prilagođen prajmerima za HLA-G.

Smjesu od 10 µl za reakciju cikličnog sekvenciranja su činili:

- 2 µl Big Dye Terminator Mix-a,
- 2 µl Big Dye Terminator pufera,
- po 1 µl prajmera G25S ili G23S, te po 1 µl prajmera G35S ili G33N,
- 3 µl vode,
- 2 µl prečišćenog PCR produkta.

Temperaturni uslovi reakcije cikličnog sekvenciranja u „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) su bili sljedeći: inicijalna denaturacija 94°C-3 minute, zatim 40 ciklusa 94°C-1 minuta, 48°C-30 sekundi, 72°C-1 minuta, i finalna ekstenzija 72°C-10 minuta. Temperaturni parametri su bili identični i za umnožavanje drugog fragmenta, s tim što je temperatura vezivanja prajmera G35 i G33 iznosila 58°C-30 sekundi.

Nakon prečišćanja produkata reakcije cikličnog sekvenciranja i kapilarne elektroforeze u automatskom DNK sekvencatoru (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Foster City, USA), određivane su konsenzus nukleotidne sekvence HLA-G gena.



HLA-G polimorfizmi su određeni poređenjem sa referentnim sekvencama u IMGT/HLA bazi podataka (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). Na osnovu procenta slaganja dobijene sekvence više od 95% sa referentnom sekvencom iz genske baze podataka je određivana HLA-G alelna varijanta.

### 3.3 Statistička obrada podataka

Statistička analiza prikupljenih podataka urađena je u statističkom softverskom paketu EZR za Windows XP (Version 2.3-0).

Deskriptivna statistika je korištena za sređivanje i opisivanje podataka i podrazumijevala je izračunavanje učestalosti, mjera centralne tendencije, mjera varijabiliteta i grafičkog prikazivanja izračunatih vrijednosti.

Hi-kvadrat ( $\chi^2$ , *Chi-square Test*) i Fišerov test tačne vjerovatnoće (*Fisher's exact Test*) su upotrebljeni za poređenje učestalosti pojavljivanja analiziranih kategorijalnih obilježja posmatranja jednog ili više nezavisnih uzoraka. Za testiranje razlike učestalosti razlike proporcija dva ili više vezanih uzoraka korišten je Kohrejn Q test (*Cochran Q Test*).

Za analizu numeričkih podataka izbor testa je zavisio od raspodjele podataka. Za određivanje normalnosti raspodjele korišten je koeficijent varijacije ( $CV \leq 30\%$  - podaci homogeni, raspodjela normalna), vrijednosti skjunita (od -3 do +3 – normalna raspodjela) i kurtozisa (od -1 do +1 – normalna raspodjela). Kod odstupanja od normalne raspodjele korišten je Kraskal-Volisov test (*Kruskal-Wallis Test*), kao i Man Vitnjev U test (*Mann Whitney U Test*) za međugrupnu analizu.

Svi rezultati su smatrani statistički značajnim ako je  $p < 0,05$  i visoko statistički značajnim ako je  $p < 0,001$ . U primjerima gdje su dobijeni visoko statistički značajni rezultati, pisan je nivo statističke značajnosti ( $< 0,001$ ).

### 3.4 Grafička obrada priloga iz literature

Grafički prikazi (slike i šeme) u ovoj doktorskoj disertaciji su preuzete iz dostupne literature, a zatim adaptirane i kreirane upotrebom besplatnog web alata BioRender.com (dostupno na <https://app.biorender.com/biorender-templates>).

Primjena navedene aplikacije je dozvoljena za izradu doktorskih disertacija (dostupno na <https://help.biorender.com/en/articles/4939733-publishing-a-thesis>).

## 4 Rezultati

U ovom istraživanju ispitivana je učestalost prisustva, broja genskih kopija i genotipova onkogenih virusa HPV, EBV, kao i prisustva poliomavirusa (BKV i JCV) u uzorcima svježih tkiva i tkiva koja su ukalupljena u parafin (FFPE) pacijenata kojima su dijagnostikovani karcinomi glave i vrata (HNSCC). Analizirano je prisustvo pojedinačnih infekcija i koinfekcija, kao i određenih genotipova onkogenih virusa u tkivima karcinoma glave i vrata. Dobijeni rezultati su upoređeni sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama karcinoma.

Tokom ove doktorske disertacije je utvrđivano i koje metode su efikasnije za izolaciju DNK i umnožavanje HPV DNK i EBV DNK u FFPE uzorcima HNSCC.

Određivanje HLA-G polimorfizama je imalo za cilj utvrđivanje koje su alelne varijante prisutne kod pacijenata sa dijagnozom HNSCC (skvamocelularni karcinom larinksa i hipofarinksa), te da li postoji korelacija određenih alelnih varijanti sa pojedinačnim infekcijama ili koinfekcijama koje uzrokuju onkogeni virusi koji su ispitivani u ovoj studiji. Pored toga, analizirano je i postojanje korelacije između HLA-G tipova sa patohistološkim gradusom i TNM stadijumom HNSCC. Takođe, utvrđivano je i da li određene HLA-G varijante mogu predstavljati biomarker povećane osjetljivosti za nastanak infekcija i koinfekcija ispitivanim onkogenim virusima, kao i povećane osjetljivosti za razvoj HNSCC.

### 4.1 Demografske i bihevioralne karakteristike pacijenata

U ovom istraživanju analizirani su uzorci tkiva skvamocelularnih karcinoma glave i vrata 100 pacijenata koji su liječeni u UKC Republike Srpske u periodu 2014-2018. godine.

Distribucija muškog pola bila je 83% a ženskog pola 17%. Uočeno je da je učestalost muških ispitanika u studiji bila statistički visoko značajno veća (Test proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $\chi^2=42,25$ ,  $df=1$ ,  $p<0,001$ ).

U odnosu na godine starosti, ispitivani pacijenti su imali od 42 do 82 godina života (srednja vrijednost 63,84 godina, standardna devijacija  $\pm 9,05$ ). Pacijenti su bili podijeljeni u tri grupe prema godinama života, pri čemu su I grupu činili pacijenti starosti do 50. godine života, u II grupu su bili svrstani ispitanici koji su imali između 50 i 69 godina, dok su III grupu činili pacijenti koji su imali preko 70 godina života. U Tabeli 12 je prikazana učestalost prema dobnoj starosti pacijenata.

**Tabela 12.** Učestalost prema dobnoj starosti pacijenata

Grupe pacijenata po godinama života		
I starosna grupa (<50)	II starosna grupa 50-69	III starosna grupa >70
6 (6%)	70 (70%)	24 (24%)

Utvrđeno je da HNSCC statistički značajno bio najčešći u II starosnoj grupi (70%) (Test proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p<0,001$ ).

U ovoj studiji je bilo približno isto pušača i nepušača (Tabela 13), te nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti. Nakon uvida u anamneze pacijenata evidentirano je da je bilo statistički visoko značajno više ispitanika koji su naveli da ne konzumiraju alkohol (Tabela 13).

**Tabela 13.** Broj pacijenata u odnosu na pušenje i konzumaciju alkohola

Pušenje n (%)		Konzumacija alkohola n (%)	
pušači	nepušači	konzumenti	neKonzumenti
45 (44,55%)	55 (54,46%)	14 (13,86%)	86 (85,15%)
$\chi^2=0,81, df=1, p=0,368$		$\chi^2=50,41, df = 1, p<0,001^{**}$	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Testa proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;

\*\* visoko statistički značajno

## 4.2 Kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

U ispitivanom uzorku od 100 HNSCC tkiva, 18 (18%) lezija prema lokalizaciji je bilo svrstano u karcinom usne šupljine, a 14 (14%) lezija u orofaringealni karcinom. Dijagnoza karcinoma hipofarinksa je postavljena kod 5 (5%) pacijenata, dok je kod najvećeg broja pacijenata dijagnostikovani karcinom larinksa 63 (63%). Uočena je statistički visoko značajna razlika u odnosu na lokalizaciju HNSCC (Test proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p<0,001$ ).

Analizom patohistoloških karakteristika utvrđeno je da je kod 24 (24%) pacijenta dijagnostikovani dobro diferentovani tumor (gradus 1-G1), kod 67 (67%) pacijenata umjereno diferentovani tumor (gradus 2-G2), dok je kod 9 (9%) ispitanika utvrđen slabo diferentovani tumor (gradusa 3-G3). Statistički visoko značajno je najviše bilo uzoraka sa G2 (Test proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $\chi^2=19,385, df=1, p<0,001$ ).

Uvidom u bolesničke kartone na Zavodu za patologiju 100 pacijenata uključenih u ovu studiju, utvrđeno je da je statistički značajno bilo najviše ispitanika sa IV stadijumom bolesti prema AJCC klasifikaciji (Test proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p<0,001$ ) (Tabela 14). Kod 15/100 pacijenata uključenih u istraživanje nije bilo moguće odrediti stadijum bolesti prema TNM klasifikaciji AJCC sistema, jer nije bilo kliničkih podataka (veličina i lokalna raširenost, status regionalnih limfnih čvorova ili prisustvo/odsustvo udaljenih metastaza).

**Tabela 14.** Učestalost prema stadijumu bolesti

Stadijum bolesti	Ukupan broj=100 n (%)
In situ	2 (2%)
Stadijum I (T1 N0 M0)	14 (14%)
Stadijum II (T2 N0 M0)	12 (12%)
Stadijum III (T1-2 N1 M0; T3 N0-1 M0)	22 (22%)
Stadijum IV (T4 N0-2 M0 T1-4 N2-3 M0 T1-4 N0-3 M1)	35 (35%)
Bez podataka	15 (15%)

U odnosu na lokalizaciju karcinoma, karcinom larinksa bio najčešći kod pacijenata dobi od 50 do 69 godina života sa statistički značajnom razlikom između različitih starosnih grupa (Tabela 15). U odnosu na pol nije pokazana statistički značajna razlika u odnosu na lokalizaciju HNSCC. Takođe, nije pokazana statistički značajna razlika između polova i različitih starosnih grupa u odnosu na kliničke karakteristike HNSCC odnosno patohistološki gradus i stadijum bolesti (Tabela 15).

**Tabela 15.** Kliničke i demografske karakteristike pacijenata

Kliničke karakteristike karcinoma	Demografske karakteristike				
	Pol		Starost pacijenata		
	Muški (n=83)	Ženski (n=17)	<50 (n=6)	50-69 (n=70)	>70 (n=24)
<b>Lokalizacija</b>					
usna duplja	13 (15,7%)	5 (29,4%)	0 (0%)	13 (18,57%)	5 (20,83%)
orofarinks	13 (15,7%)	1 (5,9%)	1 (16,66%)	12 (17,4%)	1 (4,16%)
hipofarinks	4 (4,8%)	1 (5,9%)	0 (0%)	4 (5,7%)	1 (4,16%)
larinks	53 (63,9%)	10 (58,8%)	5 (83,33%)	41 (58,57%)	17 (70,83%)
<i>p</i> vrijednost	0,44		0,01*		
<b>Patohistološki gradus</b>					
G1	18 (21,7%)	6 (35,3%)	1 (16,7%)	15 (21,4%)	8 (33,3%)
G2	57 (68,7%)	10 (58,8%)	4 (66,7%)	51 (72,9%)	12 (50%)
G3	8 (9,6%)	1 (5,9%)	1 (16,7%)	4 (5,7%)	4 (16,7%)
<i>p</i> vrijednost	0,574		0,152		
<b>Stadijum bolesti</b>					
In situ	2 (2,4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,86%)	0 (0%)
I	13 (15,6%)	1 (5,88%)	2 (33,33%)	5 (7,14%)	7 (10%)
II	10 (12,05%)	2 (23,5%)	0 (0%)	10 (14,29%)	2 (2,86%)
III	18 (21,69%)	4 (41,2%)	1 (16,66%)	15 (21,43%)	6 (8,57%)
IV	28 (33,73%)	7 (17,6%)	2 (33,33%)	26 (31,32%)	7 (10%)
nije određen	12 (14,46%)	3 (61%)	1 (16,66%)	12 (17,14%)	2 (2,86%)
<i>p</i> vrijednost	0,925		0,297		

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće; \*statistička značajnost

U odnosu na lokalizaciju lezija, nije uočena statistički značajna razlika između pušača i nepušača, kao ni između pacijenata koji konzumiraju i koji ne konzumiraju alkohol (Tabela 16).

**Tabela 16.** Bihevioralne karakteristike u odnosu na lokalizaciju karcinoma

Bihevioralne karakteristike pacijenata	Lokalizacija HNSCC n (%)				p vrijednost
	usna duplja	orofarinks	hipofarinks	larinks	
<b>Pušenje</b>					0,575
da	8 (17,8%)	5 (11,1%)	1 (2,2%)	31 (68,9%)	
ne	10 (18,2%)	9 (16,4%)	4 (7,3%)	32 (58,2%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>					0,312
da	5 (35,7%)	2 (14,3%)	0 (0%)	7 (50%)	
ne	13 (15,1%)	12 (14%)	5 (5,8%)	56 (65,1%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

U odnosu na patohistološki gradus, nije uočena statistički značajna razlika između pušača i nepušača, kao ni između pacijenata koji konzumiraju i koji ne konzumiraju alkohol (Tabela 17).

**Tabela 17.** Bihevioralne karakteristike u odnosu na patohistološki gradus karcinoma

Bihevioralne karakteristike pacijenata	Patohistološki gradus n (%)			p vrijednost
	G1	G2	G3	
<b>Pušenje</b>				0,533
da	13 (28,9%)	29 (64,4%)	3 (6,7%)	
ne	11 (20%)	38 (69,1%)	6 (10,9%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>				0,544
da	5 (35,7%)	8 (57,1%)	1 (7,1%)	
ne	19 (22,1%)	59 (68,6%)	8 (9,3%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

U odnosu na stadijum bolesti, takođe, nije uočena statistički značajna razlika između pušača i nepušača, kao ni između pacijenata koji konzumiraju i koji ne konzumiraju alkohol (Tabela 18).

**Tabela 18.** Bihevioralne karakteristike u odnosu na stadijum bolesti

Bihevioralne karakteristike pacijenata	Stadijum bolesti n (%)						p vrijednost
	In situ	I	II	III	IV	Nije određeno	
<b>Pušenje</b>							0,973
da	1 (2,2%)	5 (11,1%)	5 (11,1%)	11 (24,4%)	16 (35,5%)	7 (15,5%)	
ne	1 (1,8%)	9 (16,4%)	7 (12,7%)	11 (20%)	19 (34,5%)	8 (14,5%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>							0,257
da	0 (0%)	3 (21,4%)	1 (7,1%)	0 (0%)	7 (50%)	3 (21,4%)	
ne	2 (2,3%)	11 (12,8%)	11 (12,8%)	22 (25,6%)	28 (32,6%)	12 (13,9%)	

p vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

### 4.3 Kvantitet i kvalitet izolovane DNK

Rezultati spektrofotometrijske analize nakon ekstrakcije DNK iz 50 FFPE uzoraka su pokazali prisustvo DNK u svih 50 FFPE ekstrakata kod kojih je ekstrakcija urađena sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-om i kod 48 FFPE ekstrakata kod kojih je DNK izolovana sa QIAamp DNA Mini Kit-om.

Koncentracija DNK u uzorcima u kojima je DNK ekstrahovana sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit bila je visoko statistički značajno viša od koncentracije DNK nakon izolacije upotrebom QIAamp DNA Mini Kit-a (Tabela 19).

**Tabela 19.** Poređenje količine i kvaliteta izolovane DNK nakon ekstrakcije sa dva kita

		QIAamp FFPE Tissue Kit	QIAamp DNA Mini Kit	p vrijednost
<b>Koncentracija DNK (ng/μL)</b>	srednja vrijednost	479,42	81,08	<0,001**
	medijana	537	28,5	
	opseg	65-1270	0-410	
<b>260/230 odnos</b>	srednja vrijednost	0,95	0,588	0,004*
	medijana	0,8	0,525	
	opseg	0,09-2,2	0-1,3	
<b>260/280 odnos</b>	srednja vrijednost	2,02	2,03	0,966
	medijana	1,9	1,9	
	opseg	0,3-3,4	0-3,4	

p vrijednost je dobijena upotrebom Man-Vitnijevoog testa; \*\* statistički visoka značajnost

Odnos 260/230 je bio manji od 2 u većini uzoraka nakon izolacije sa oba kita što ukazuje na moguću kontaminaciju solima. Međutim, poređenjem dva kita sa ekstrakciju DNK, niži odnos 260/230 je utvrđen kod uzoraka nakon ekstrakcije DNK QIAamp DNA Mini Kit-om sa statistički značajnom razlikom. Primenom oba kita, odnos 260/280 je bio veći od 1,8 i nije pokazano postojanje statistički značajne razlike (Tabela 19).

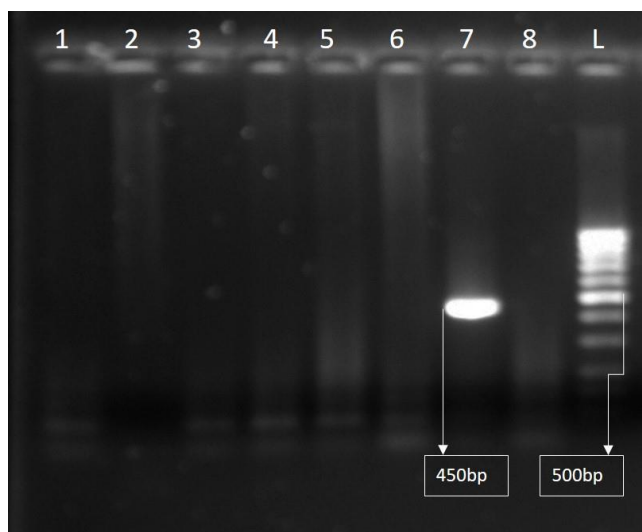
Od 50 analiziranih FFPE uzoraka 12 je bilo iz 2014. godine, 21 uzorak iz 2015. godine i 17 uzoraka iz 2016. godine. Nije utvrđena statistički značajna razlika između količine i kvaliteta izolovane DNK i starosti FFPE uzoraka (Kruskal-Voliz test,  $\chi^2=3,078$ ,  $df=1$   $p=0,07$ ).

Nakon amplifikacije fragmenta humanog beta-aktin gena dužine 360 bp, uočena je niska stopa umnožavanja. Kod 4 od 50 uzoraka (8%) kod kojih je amplifikovan fragment humanog beta-aktin gena, DNK izolacija je urađena QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-om. Sva 4 pozitivna uzorka su bila iz 2015. godine. Fragment humanog beta-aktina nije umnožen niti u jednom uzorku nakon ekstrakcije DNK sa QIAamp DNA Mini Kit-om.

## 4.4 Učestalost HPV u tkivima karcinoma glave i vrata

### 4.4.1 Učestalost HPV klasičnom PCR metodom

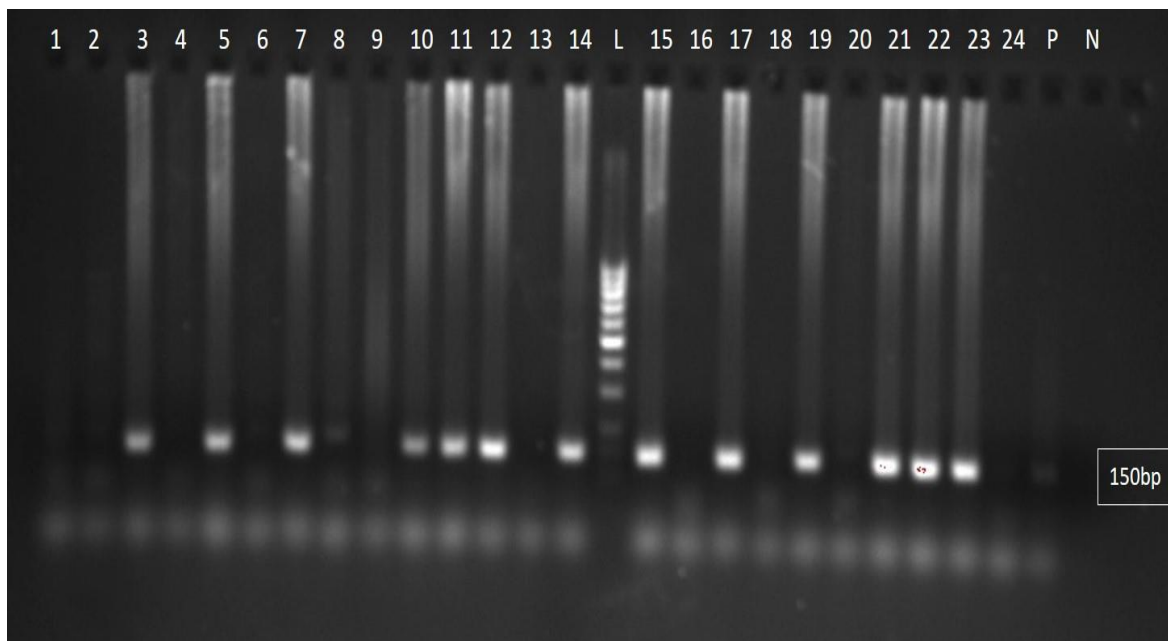
Nukleinska kiselina HPV nije dokazana primenom klasične PCR metode upotrebom dva različita para prajmera, MY09/MY11 za detekciju HPV DNK L1 gena (Slika 12) i GP1/GP2 za amplifikaciju HPV DNK E1 gena.



**Slika 12.** Detekcija HPV klasičnom PCR metodom za amplifikaciju HPV DNK L1 gena: 1-6 uzorci; 7 – pozitivna kontrola; 8 – negativna kontrola; L – DNK standard 100bp

#### 4.4.2 Učestalost HPV Nested PCR metodom

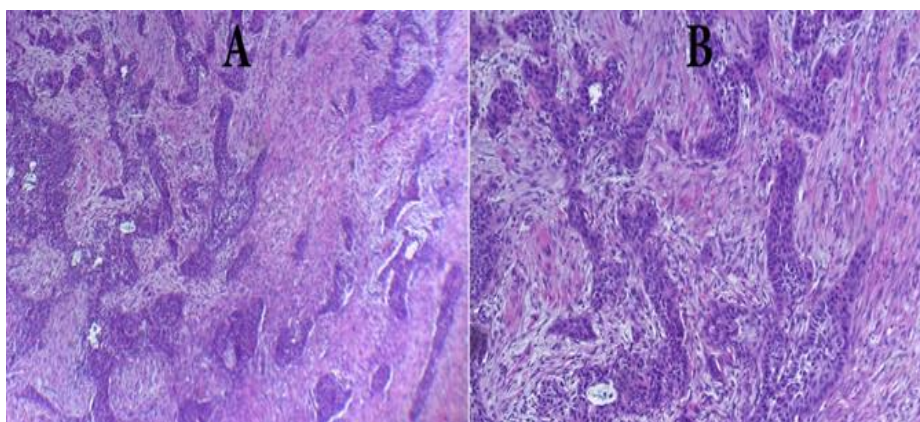
Rezultati Nested PCR metode za dokazivanje HPV DNK su pokazali da je od 100 ispitivanih uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata, kod 27 (27%) uzoraka utvrđeno prisustvo virusa i to kod 15 FFPE uzoraka i 12 svježih uzoraka tkiva (Slika 13).



**Slika 13.** Detekcija HPV Nested PCR metodom:

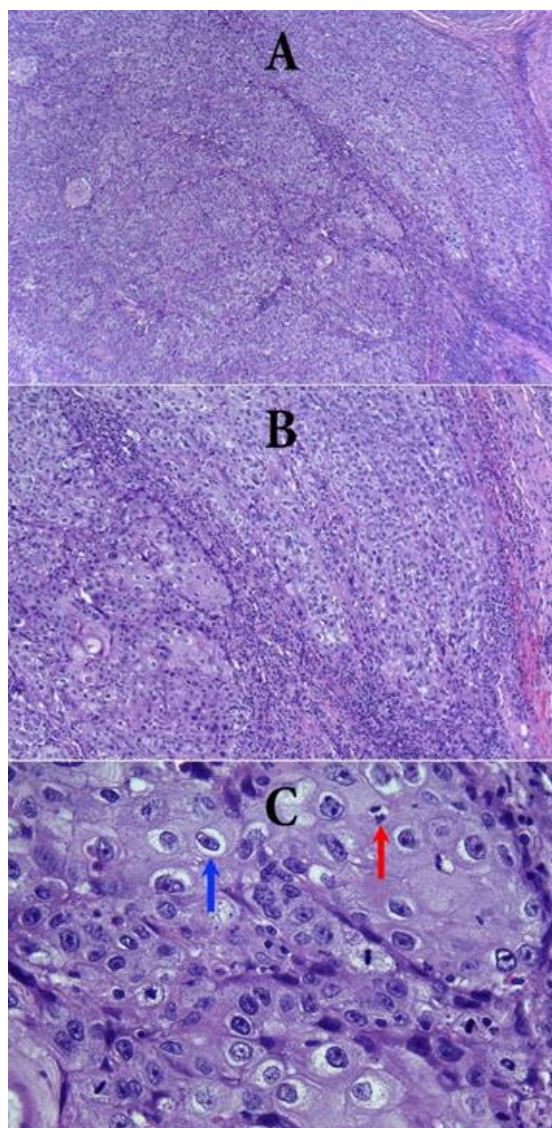
L – DNK standard 100bp; 1-24 uzorci; P – pozitivna kontrola; N – negativna kontrola

Dat je primjer izabranog patohistološkog preparata pacijenta bez HPV infekcije i patohistološki preparat pacijenta u čijem uzorku je dokazan HPV u cilju prikaza morfoloških promjena na epitelnim ćelijama usled prisustva HPV infekcije (Slika 14 i Slika 15).



**Slika 14.** Patohistološki nalaz HPV negativnog karcinoma larinksa. (A) Područja tumorskih ćelija (H&E X40). (B) Isti fokus na većem uvećanju, prikazana tumorska područja sa bazaloidnim ćelijama sa hipohromatskim jedrom (H&E X100).





**Slika 15.** Patohistološki nalaz HPV pozitivnog karcinoma larinksa. (A) Područje tumorskih ćelija okruženo gustim upalnim infiltratom (H&E X40). (B) Isti fokus na većem uvećanju (H&E X100). (C) Koilociti povezani sa HPV infekcijom (plava strelica) i ćelijska mitozna (crvena strelica) (H&E X400).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u detekciji HPV između FFPE i svježih uzorka tkiva karcinoma (Test proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p=0,701$ ).

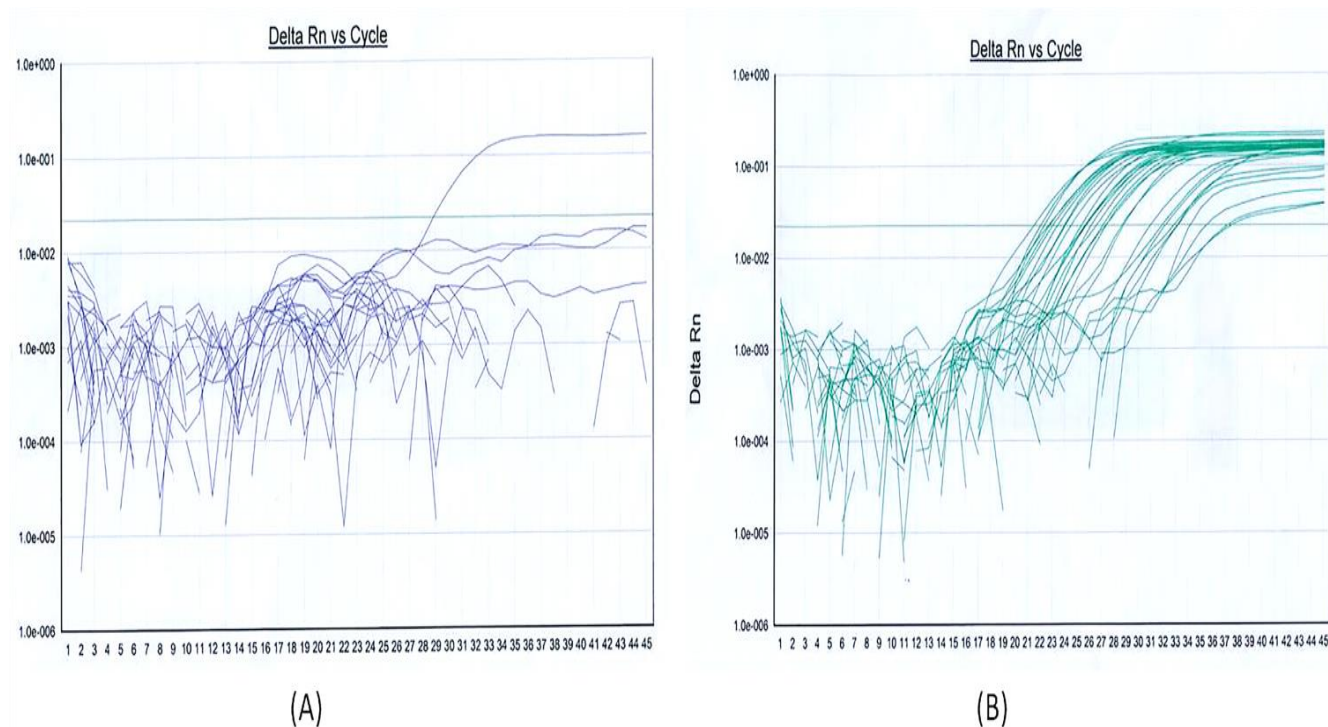
Uporedna analiza dokazivanja HPV DNK kod 50 FFPE uzoraka nakon izolacije DNK sa dva različita kita, pokazala je da je kod uzoraka kod kojih je DNK izolovana sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, HPV DNK utvrđena kod 11/50 (22%) FFPE uzoraka, dok je HPV dokazan kod 10 (20,8%) uzoraka kod kojih je DNK ekstrahovana sa QIAamp DNA Mini Kit-om bez statistički značajne razlike (Fišerov test tačne vjerovatnoće,  $p=1$ ). U uzorku kod kog je dokazana najniža koncentracija ukupne DNK (12ng/ $\mu$ l), a utvrđeno prisustvo virusa, DNK je izolovana sa QIAamp DNA Mini Kit-om.

Prema godini uzorkovanja 50 FFPE uzoraka, HPV DNK je dokazana kod 1 od 12 FFPE uzoraka iz 2014. godine, kod 5 od 21 uzorka iz 2015. godine, te kod 5 od 17 HNSCC uzoraka iz 2016. godine. Nije bilo statističke značajne razlike između HPV pozitivnosti i dužine skladištenja uzoraka (Krankal-Volis test,  $\chi^2=3,078$ ,  $df=1$ ,  $p=0,08$ ).

U odnosu na anatomsku lokalizaciju, HPV je dokazan primjenom nested PCR metode u 1 (9,09%) uzorku karcinoma usne šupljine, kod 3 (27,2%) uzorka orofaringealnog karcinoma, kod 2 (18,18%) uzorka karcinoma hipofarinksa, i kod 5 (45,45%) uzoraka karcinoma larinksa. Nije uočena statistički značajna razlika između učestalosti detekcije HPV i anatomske lokalizacije (Fišerov test tačne vjerovatnoće,  $p=0,096$ ).

#### 4.4.3 Kvantitacija HPV DNK Real-time PCR metodom

Rezultati Real-time PCR metode primjenom komercijalnog testa za dokazivanje i kvantitaciju HPV DNK, nisu pokazali prisustvo HPV DNK niti u jednom FFPE uzorku, kao ni u svježim uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata (Slika 16). Interna kontrola testa za prisustvo humanog beta-globina u uzorcima je dokazana kod svih FFPE ispitanih uzoraka nakon ekstrakcije DNK sa QIAamp DNA FFPE tissue Kit-om, i kod FFPE i svježih uzoraka nakon DNK izolacije sa QIAamp DNA Mini Kit-om.



**Slika 16.** Rezultat Real-time PCR metode za detekciju HPV. (A) Grafikon HPV amplifikacije: HPV-amplifikaciona kriva za HPV pozitivnu kontrolu, svi testirani uzorci HPV negativni; (B) Grafikon amplifikacije interne kontrole: amplifikacione krive interne kontrole za sve testirane uzorke

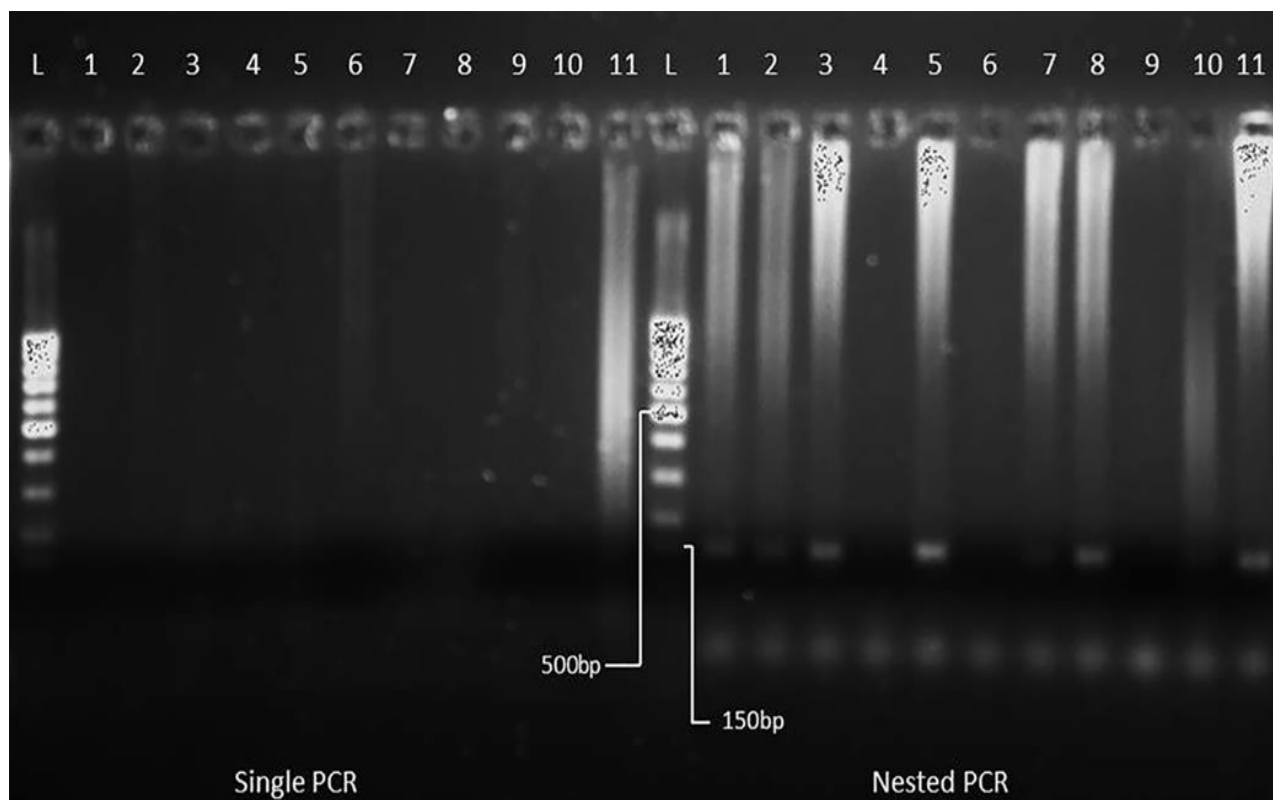
#### 4.4.4 Poređenje metoda za dokazivanje HPV

Rezultati su pokazali da je HPV DNK u svježim i FFPE uzorcima tkiva HNSCC jedino dokazan nested PCR metodom, sa statistički visoko značajnom razlikom u odnosu na klasičnu PCR i Real-time PCR metodu (Tabela 20). Na Slici 17 je prikazano poređenje klasične i Nested PCR metode.

**Tabela 20.** Poređenje metoda za dokazivanje HPV u tkivima karcinoma glave i vrata

Klasični PCR MY09/MY11 ili GP5+/GP6+	Nested PCR MY09/MY11 + GP5+/GP6+	Real-time PCR	<i>p</i> vrijednost
0/100 (0%)	27/100 (27%)	0/100 (0%)	<i>p</i> <0,001**

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Cochran's Q test; \*\*statistički visoka značajnost



**Slika 17.** Poređenje stope detekcije HPV primjenom klasične i nested PCR metode.

L – DNK standard 100bp; Single (klasični) PCR: 1-11 uzorci; Nested PCR: 1-11 uzorci

#### 4.4.5 Prisustvo/odsustvo HPV u odnosu na demografske i bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC

Analizom HPV pozitivnih i HPV negativnih uzoraka u odnosu na demografske, bihevioralne i kliničke karakteristike pacijenata utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol i starosnu dob pacijenata, kao ni u odnosu na pušenje i konzumiranje alkohola (Tabela 21).

U odnosu na kliničke karakteristike pacijenta, nije pokazana statistički značajna razlika u odnosu na patohistološki gradus. Međutim, statistički značajna razlika je utvrđena u odnosu na lokalizaciju karcinoma glave i vrata i stadijum bolesti između HPV negativnih i HPV pozitivnih HNSCC uzoraka (Tabela 21).

**Tabela 21.** Demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC sa i bez HPV infekcije

	<b>HPV pozitivni uzorci n=27</b>	<b>HPV negativni uzorci n=73</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>			
muški	23 (85,2%)	60 (82,2%)	<i>1</i>
ženski	4 (14,8%)	13 (17,8%)	
<b>Starost pacijenata</b>			
<50	2 (7,4%)	4 (5,5%)	<i>0,863</i>
50-69	19 (70,4%)	51 (69,9%)	
>70	6 (22,2%)	18 (24,7%)	
<b>Pušenje</b>			
Da	13 (48,1%)	32 (43,8%)	<i>0,822</i>
Ne	14 (51,9%)	41 (56,2%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>			
Da	6 (22,2%)	8 (10,9%)	<i>0,194</i>
Ne	21 (77,7%)	65 (89%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>			
usna duplja	1 (3,7%)	17 (23,3%)	<i>0,02*</i>
orofarinks	3 (11,1%)	11 (15,1%)	
hipofarinks	2 (7,4%)	3 (4,1%)	
larinks	21 (77,8%)	42 (57,5%)	
<b>Patohistološki gradus</b>			
G1	5 (18,5%)	19 (26%)	<i>0,725</i>
G2	20 (74%)	47 (64,4%)	
G3	2 (7,4%)	7 (9,6%)	
<b>Stadijum bolesti</b>			
In situ	1 (3,7%)	1 (1,4%)	<i>0,043*</i>
I	3 (11,1%)	11 (15,1%)	
II	6 (22,2%)	6 (8,2%)	
III	7 (25,9%)	15 (20,5%)	
IV	10 (37%)	25 (34,2%)	
nije određen	0 (0%)	15 (20,5%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerov testa tačne vjerovatnoće i Hi kvadrat testa; \*statistička značajnost

Analiza demografskih, bihevioralnih i kliničkih karakteristika pacijenata sa HPV pozitivnim uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata je pokazala da je HPV pozitivnost češća kod muškog pola i u starosnoj dobi od 50 do 69 godina sa visokom statističkom značajnosti (Tabela 22). Pokazano je HPV

infekcija češća kod pacijenata koji ne konzumiraju alkohol sa visokom statističkom značajnosti, ali da nema razlike u odnosu na pušenje (Tabela 22).

U odnosu na lokalizaciju HNSCC, utvrđeno je da je HPV infekcija visoko statistički značajno najčešća u larinksu. Od ukupnog broja pacijenata sa dijagnozom skvamocelularnog karcinoma larinksa prisustvo HPV je utvrđeno kod 21 pacijenta (33,4%). U odnosu na patohistološki gradus, HPV pozitivnost je češća u lezijama gradusa 2 sa visokom statističkom značajnosti. Takođe, visoko statistički značajna razlika je utvrđena i između prisustva HPV DNK i stadijuma bolesti, gde je HPV pozitivnost bila najčešća u III-IV stadijumu bolesti (Tabela 22).

**Tabela 22.** HPV pozitivnost u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	HPV pozitivni uzorci n=27	p vrijednost
<b>Pol</b>		
muški	23 (85,2%)	<0,001**
ženski	4 (14,8%)	
<b>Starost pacijenata</b>		
<50	2 (7,4%)	<0,001**
50-69	19 (70,4%)	
>70	6 (22,2%)	
<b>Pušenje</b>		
da	13 (48,1%)	1
ne	14 (51,9%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>		
da	6 (22,2%)	<0,001**
ne	21 (77,7%)	
<b>Lokalizacija</b>		
usna duplja	1 (3,7%)	<0,001**
orofarinks	3 (11,1%)	
hipofarinks	2 (7,4%)	
larinks	21 (77,8%)	
<b>Patohistološki gradus</b>		
G1	5 (18,5%)	<0,001**
G2	20 (74%)	
G3	2 (7,4%)	
<b>Stadijum bolesti</b>		
In situ	1 (3,7%)	0,0215*
I-II	9 (33,3%)	
III-IV	17 (62,9%)	

p vrijednost je dobijena na osnovu Testa proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;

\*statistička značajnost; \*\*statistički visoko značajno

U odnosu na veličinu tumora (T), HPV infekcija je bila najčešća kod pacijenata sa tumorima veličine T2 (>2 cm ≤ 4 cm) ali bez statističke značajnosti. Statistička značajnost je utvrđena u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova (N), pri čemu je HPV infekcija bila najčešća kod pacijenata kod kojih nije došlo do širenja bolesti u regionalne limfne žlijezde. Kod većine pacijenata sa HPV infekcijom nisu utvrđene udaljene metastaze (M) što je bilo visoko statistički značajno (Tabela 23).

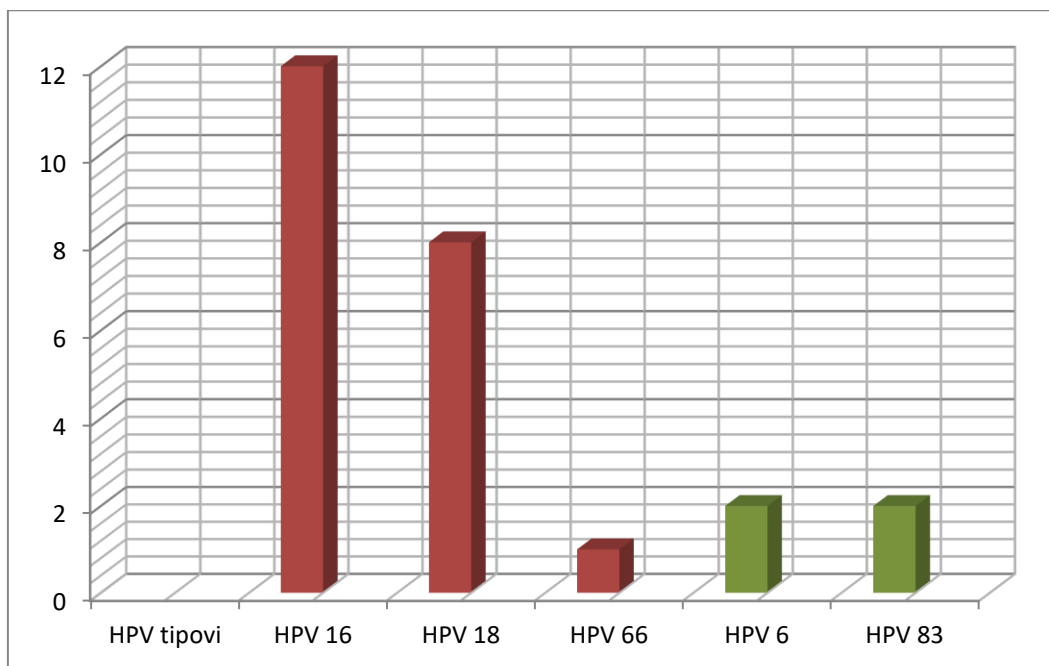
**Tabela 23.** HPV pozitivnost u odnosu na veličinu tumora (T stadijum), zahvaćenost limfnih čvorova (N stadijum) i prisustvo udaljenih metastaza (M stadijum)

	HPV pozitivni uzorci n=27	p vrijednost
<b>T stadijum</b>		
In situ	1 (3,7%)	0,424
T1	4 (14,8%)	
T2	9 (33,3%)	
T3	8 (29,6%)	
T4	5 (18,5%)	
<b>N stadijum</b>		
N0	17 (62,9%)	0,0167*
N1	3 (11,1%)	
N2	5 (18,5%)	
N3	1 (3,7%)	
Bez podataka	1 (3,7%)	
<b>M stadijum</b>		
M0	23 (85,2%)	<0,001**
M1	2 (7,4%)	
Bez podataka	2 (7,4%)	

p vrijednost je dobijena na osnovu Testa proporcija za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;  
\*statistička značajnost; \*\*statistički visoko značajno

#### 4.4.6 Učestalost HPV genotipova u tkivima karcinoma glave i vrata

Od 27 HPV pozitivnih uzoraka dokazanih u ovoj studiji, genotipizacija je uspješno urađena kod 25 uzoraka. Dokazano je ukupno pet genotipova i to HPV 6, HPV 83, HPV 16, HPV 18 i HPV 66. Visoko onkogeni HPV genotipovi su dokazani kod 21 uzoraka (84%) i to HPV 16, HPV 18 i HPV 66, a nisko onkogeni genotipovi su dokazani u 4 uzorka (16%) i to HPV 6 i HPV 83 (Grafikon 2). Kod 2/27 uzorka nije bilo moguće odrediti genotip.



**Grafikon 2.** Učestalost HPV genotipova u HNSCC

Dobijene nukleotidne sekvence HPV pozitivnih uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata su prikazane u Prilogu 1.

Analizirajući dobijene sekvence, utvrđeno je da su najzastupljeniji HPV genotipovi bili visoko rizični tipovi 16 i 18 sa ukupnom učestalosti od 95,2%. Utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti između nisko onkogenih i visoko onkogenih genotipova u tkivima karcinoma glave i vrata (Tabela 24).

**Tabela 24.** Učestalost HPV genotipova u HNSCC

Visoko onkogeni HPV tipovi n=21			Nisko onkogeni HPV tipovi n=4		<i>p</i> vrijednost
HPV 16	HPV 18	HPV 66	HPV 6	HPV 83	<b>0,0129*</b>
12 (57,1%)	8 (38,1%)	1 (4,8%)	2 (50%)	2 (50%)	

*p* vrijednost dobijena na osnovu Testa proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta; \*statistička značajnost

Poredeći uzorke u kojima su dokazani nisko onkogeni HPV genotipovi sa uzorcima u kojima su utvrđeni visoko onkogeni genotipovi pokazano je da nema statistički značajne razlike među poređenim grupama u odnosu na pol, starost pacijenata, pušenje i konzumaciju alkohola, kao ni prema kliničkim karakteristikama HNSCC (Tabela 25).

**Tabela 25.** Razlike između demografskih, bihevioralnih karakteristika pacijenata i kliničkih karakteristika HNSCC u odnosu na prisustvu visoko onkogenih i nisko onkogenih HPV genotipova

	<b>Nisko onkogeni genotipovi (HPV 6 i 83)</b>	<b>Visoko onkogeni genotipovi (HPV 16, 18 i 66)</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>			
muški	4 (100%)	18 (85,7%)	<i>1</i>
ženski	0 (0%)	3 (14,3%)	
<b>Starost pacijenta</b>			
<50	1 (25%)	1 (4,8%)	<i>0,328</i>
50-69	2 (50%)	15 (71,4%)	
>70	1 (25%)	5 (23,8%)	
<b>Pušenje</b>			
da	1 (25%)	10 (47,6%)	<i>0,604</i>
ne	3 (75%)	11 (52,4%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>			
da	0 (0%)	5 (23,8%)	<i>0,549</i>
ne	4 (100%)	16 (76,2%)	
<b>Lokalizacija</b>			
usna duplja	0 (0%)	1 (4,8%)	<i>0,694</i>
orofarinks	1 (25%)	2 (9,5%)	
hipofarinks	0 (0%)	2 (9,5%)	
larinks	3 (75%)	16 (76,2%)	
<b>Patohistološki gradus</b>			
G1	1 (25%)	3 (14,3%)	<i>1</i>
G2	3 (75%)	16 (76,2%)	
G3	0 (0%)	2 (9,5%)	
<b>Stadijum bolesti</b>			
In situ	0 (0%)	1 (4,8%)	<i>0,116</i>
I-II	3 (75%)	6 (28,6%)	
III-IV	1 (25%)	14 (66,6%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće



## 4.5 Učestalost EBV u tkivima karcinoma glave i vrata

### 4.5.1 Učestalost EBV i EBV genotipova

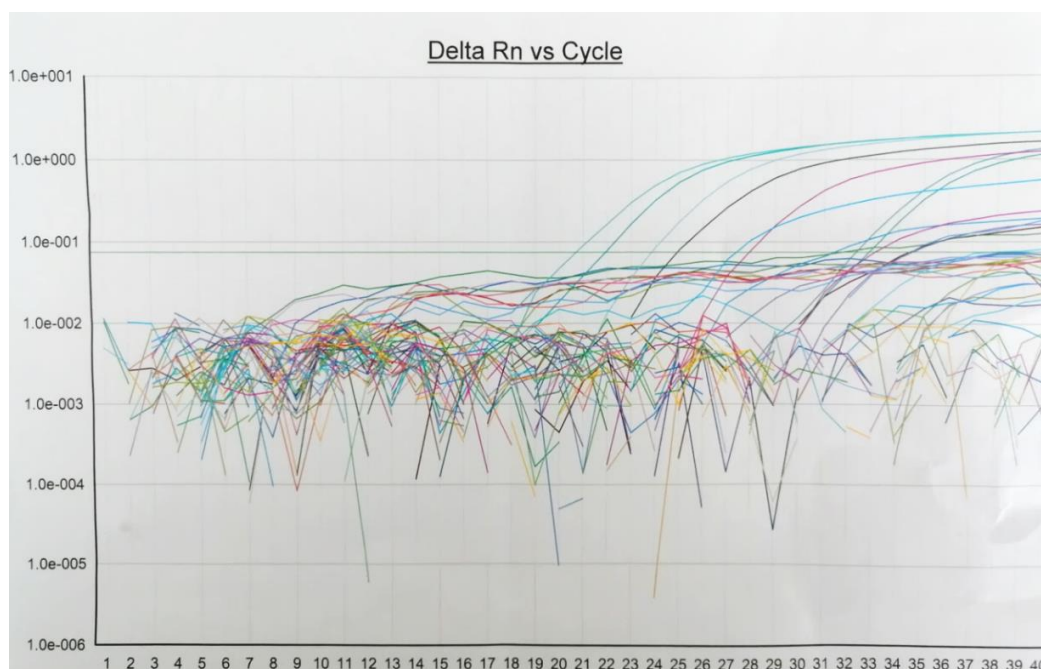
Nested PCR metodom EBV DNK je utvrđena kod 16 (16%) HNSCC uzoraka ispitivanih tokom ovog istraživanja. EBV DNK je detektovana u 3/16 (18,75%) FFPE uzoraka i u 13/16 (81,2%) svježih tkiva. Statistička analiza dobijenog rezultata je pokazala da je EBV DNK statistički značajno češća u svježim tkivima u odnosu na FFPE tkiva (Test proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p=0,02$ ).

Rezultati EBV genotipizacije su pokazali prisustvo EBV-1 genotipa kod 15/16 (93,75%) uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata, dok je u 1/16 (6,25%) utvrđen EBV-2. Pokazano je da je u ispitanom uzorku češće dokazivan EBV-1 sa visokom statističkom značajnosti (Test proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p<0,001$ ).

### 4.5.2 Kvantitacija EBV DNK u uzorcima karcinoma glave i vrata

Primjenom real-time PCR metode urađena je detekcija i kvantitacija EBV DNK u HNSCC uzorcima. Analizirani su uzorci od 71 pacijenta (30 svježih uzoraka i 41 FFPE uzoraka). Broj detektovanih kopija EBV DNK je varirao u opsegu 1,82-27093,72/mikrolitru ekstrakta (srednja vrijednost 3788,167; standardna devijacija  $\pm 8441,021$ ). Ovom metodom EBV DNK je utvrđena kod ukupno 10 uzoraka (14,08%). Primjenom ove metode je dokazano prisustvo virusne DNK u još 4 uzorka u kojima EBV nije prethodno dokazan nested PCR metodom.

Genom virusa je detektovan kod 8 svježih HNSCC uzoraka i 2 FFPE uzorka, bez statistički značajne razlike u dokazivanju EBV DNK između svježih i FFPE uzoraka (Test proporcije za jedan uzorak,  $p=0,109$ ). Upotrebom Man-Vitnjevog testa nije utvrđena statistički značajna razlika u količini virusne DNK u analiziranim uzorcima ( $p=1$ ).



**Slika 18.** Grafikon EBV amplifikacije primenom Real-time PCR metode

#### 4.5.3 Ukupna učestalost EBV infekcije u tkivima karcinoma glave i vrata

Primjenom Nested PCR i Real-time PCR metoda, EBV DNK je utvrđena kod ukupno 20 HNSCC uzoraka (kod 16 uzoraka Nested PCR i kod 4 uzorka Real-time PCR metodom). U odnosu na vrstu uzorka, EBV DNK je dokazana kod 15 od 20 svježih uzoraka i 5 od 20 FFPE uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata. Statistička analiza dobijenog rezultata je pokazala da je EBV DNK statistički značajno češće dokazivana u svježim tkivima u odnosu na FFPE tkiva (Test proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p=0,041$ ).

#### 4.5.4 Poređenje metoda za dokazivanje EBV

Rezultati su pokazali da je EBV DNK u svježim i FFPE uzorcima tkiva HNSCC češće dokazivana nested PCR metodom sa statistički značajnom razlikom u odnosu na Real-time PCR (Tabela 26).

**Tabela 26.** Poređenje metoda za detekciju EBV

<b>Nested PCR</b>	<b>Real-time PCR</b>	<b><i>p</i> vrijednost</b>
16/100 (16%)	4/71 (5,63%)	<b>0,002*</b>

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Mek Nemarovog testa; \*statistička značajnost

#### 4.5.5 Prisustvo/odsustvo EBV u odnosu na demografske i bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC

Analizom prisustva/odsustva EBV u odnosu na demografske i bihevioralne osobine pacijenata i kliničkih karakteristika HNSCC nije nađeno postojanje razlika u odnosu na pol, starosnu dob, pušenje, konzumaciju alkohola, kao ni u odnosu lokalizaciju karcinoma, patohistološki gradus i stadijum bolesti (Tabela 27).

Analizom HNSCC uzoraka u kojima je dokazan EBV, utvrđeno je da je EBV češće prisutan kod muškog pola, pacijenata starosti 50-69 godina života te pacijenata koji ne konzumiraju alkohol sa visokom statističkom značajnošću. Nije pokazana statistički značajna razlika između pušača i nepušača u odnosu na EBV pozitivnost. U odnosu na kliničke karakteristike karcinoma, utvrđeno je da je EBV infekcija češća u karcinomima larinksa, kao i u tkivima karcinoma patohistološkog gradusa 2 sa statističkom značajnošću. Nije utvrđena povezanost između EBV pozitivnosti i stadijuma bolesti (Tabela 28).

**Tabela 27.** Demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC sa i bez EBV infekcije

	<b>EBV pozitivni uzorci n=20</b>	<b>EBV negativni uzorci n=80</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>			
muški	18 (90%)	65 (81,3%)	0,512
ženski	2 (10%)	15 (18,7%)	
<b>Starost pacijenata</b>			
<50	0 (0%)	6 (7,5%)	0,693
50-69	15 (75%)	55 (68,8%)	
>70	5 (25%)	19 (23,8%)	
<b>Pušenje</b>			
da	9 (45%)	36 (45%)	1
ne	11 (55 %)	44 (55%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>			
da	2 (10%)	12 (15%)	0,73
ne	18 (90%)	68 (85%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>			
usna duplja	2 (10%)	16 (20%)	0,217
orofarinks	1 (5%)	13 (16,3%)	
hipofarinks	0 (0%)	5 (6,3%)	
larinks	17 (85%)	46 (57,5%)	
<b>Patohistološki gradus</b>			
G1	3 (15%)	21 (26,3%)	0,615
G2	15 (75%)	52 (65%)	
G3	2 (10%)	7 (8,75%)	
<b>Stadijum bolesti</b>			
In situ	0 (0%)	2 (2,5%)	0,36
I	2 (10%)	12 (15%)	
II	3 (15%)	9 (11,25%)	
III	3 (15%)	19 (23,8%)	
IV	11 (55%)	24 (30%)	
nije određen	1 (5%)	14 (17,5%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće i Hi kvadrat testa

**Tabela 28.** EBV pozitivnost u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	<b>EBV pozitivni uzorci n=20</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>		
muški	18 (90%)	<b>&lt;0,001**</b>
ženski	2 (10%)	
<b>Starost pacijenata</b>		
<50	0 (0%)	<b>0,0118*</b>
50-69	15 (75%)	
>70	5 (25%)	
<b>Pušenje</b>		
da	9 (45%)	<b>0,824</b>
ne	11 (55%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>		
da	2 (10%)	<b>&lt;0,001**</b>
ne	18 (90%)	
<b>Lokalizacija</b>		
usna duplja	2 (10%)	<b>&lt;0,001**</b>
orofarinks	1 (5%)	
hipofarinks	0 (0%)	
larinks	17 (85%)	
<b>Patohistološki gradus</b>		
G1	3 (15%)	<b>0,00754*</b>
G2	15 (75%)	
G3	2 (10%)	
<b>Stadijum bolesti</b>		
In situ	0 (0%)	<b>0,219</b>
I-II	5 (25%)	
III-IV	14 (70%)	
nije određen	1 (5%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Testa proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;  
\*statistička značajnost; \*\*statistički visoka značajnost

## 4.6 Učestalost humanih poliomavirusa u tkivima karcinoma glave i vrata

Tokom ovoga istraživanja, u uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata ispitivano je prisustvo dva poliomavirusa i to BKV i JCV.

### 4.6.1 Učestalost BKV u tkivima karcinoma glave i vrata

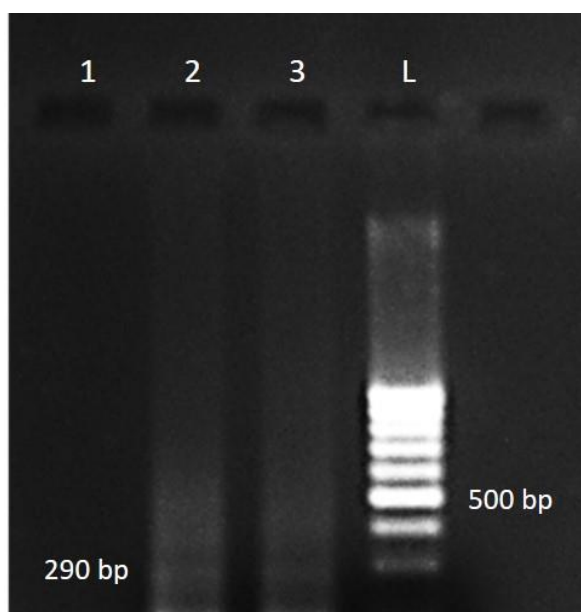
Ispitivanjem prisustva BKV DNK u tkivima karcinoma glave i vrata, BKV dokazan u 3 (3%) HNSCC uzorka (Slika 19).

Statističkom analizom nije utvrđeno postojanje razlike između uzoraka sa i bez BKV infekcije u odnosu na pol i starost pacijenta, pušenje i konzumiranje alkohola, kao ni u odnosu na kliničke karakteristike karcinoma (lokalizaciju, patohistološki gradus i stadijum bolesti) (Tabela 29).

**Tabela 29.** BKV pozitivnost u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	<b>BKV pozitivni uzorci n=3</b>	<b>BKV negativni uzorci n=97</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>			
muški	3 (100%)	80 (82,5%)	<i>1</i>
ženski	0 (0%)	17 (17,5%)	
<b>Starost pacijenata</b>			
<50	0 (0%)	6 (6,2%)	<i>1</i>
50-69	2 (66,7%)	68 (70,1%)	
>70	1 (33,3%)	23 (23,7%)	
<b>Pušenje</b>			
da	2 (66,7%)	43 (44,3%)	<i>0,587</i>
ne	1 (33,3%)	54 (55,7%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>			
da	0 (0%)	14 (14,4%)	<i>1</i>
ne	3 (100%)	83 (85,6%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>			
usna duplja	0 (0%)	18 (18,6%)	<i>0,27</i>
orofarinks	0 (0%)	14 (14,4%)	
hipofarinks	1 (33,3%)	4 (4,1%)	
larinks	2 (66,4%)	61 (62,9%)	
<b>Patohistološki gradus</b>			
G1	0 (0%)	24 (24,7%)	<i>0,672</i>
G2	3 (100%)	64 (65,9%)	
G3	0 (0%)	9 (9,3%)	
<b>Stadijum bolesti</b>			
In situ	0 (0%)	2 (2,1%)	<i>0,539</i>
I	0 (0%)	14 (14,4%)	
II	1 (33,3%)	11 (11,3%)	
III	0 (0%)	22 (22,7%)	
IV	2 (66,4%)	33 (34%)	
nije određen	0 (0%)	15 (15,5%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće



**Slika 19.** Detekcija BKV seminested PCR metodom: 1-3 uzorci; L – DNK standard 100bp;

#### 4.6.2 Učestalost JCV u tkivima karcinoma glave i vrata

Nakon što je urađena seminested PCR metoda za umnožavanje fragmenata JCV DNK, nije dokazano prisustvo ovog poliomavirusa niti u jednom od 100 uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata.

### 4.7 **Pojedinačne infekcije i koinfekcije onkogenim virusima**

Kod 39 uzoraka tkiva karcinoma glave i vrata molekularnim metodama je dokazano prisustvo onkogenih virusa. HPV je detektovan u 27 uzoraka, EBV u 20 i BKV u 3 od 100 HNSCC uzoraka ispitivanih u ovoj studiji.

Infekcija samo sa jednim virusom je dokazana u 28 uzoraka tkiva HNSCC. U 16 uzoraka (57,15%) je utvrđena HPV pojedinačna infekcija, zatim kod 11 uzoraka (39,28%) je dokazano prisustvo EBV, dok je BKV pojedinačna infekcija dokazana samo kod 1 pacijenta (3,57%) sa dijagnozom HNSCC. Statistički je značajno bila najčešća HPV pojedinačna infekcija kod pacijenata sa HNSCC (Test proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p=0,00635$ ).

Infekcije sa pojedinim onkogenim virusima su češće kod pacijenata muškog pola sa visokom statistički značajnom razlikom u odnosu na ženski pol. Nije pokazana statistički značajna razlika u prisustvu pojedinačnih virusnih infekcija u odnosu na starost pacijenata, kao ni u odnosu na pušenje. Kod pacijenata koji ne konzumiraju alkohol češće su pojedinačne infekcije onkogenih virusa sa visokom statističkom značajnošću (Tabela 30).

U odnosu na kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata, pojedinačne virusne infekcije su visoko statistički značajno bile češće kod pacijenata sa karcinomom larinksa, kod karcinoma sa patohistološkim gradusom G2, kao i kod pacijenata u III i IV stadijumu bolesti (Tabela 30).

**Tabela 30.** Pojedinačne infekcije onkogenih virusa u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	Pojedinačne infekcije n=28	p vrijednost
<b>Pol</b>		
muški	24 (86,2%)	<i>&lt;0,001**</i>
ženski	4 (13,8%)	
<b>Starost pacijenata</b>		
<50	2 (7,1%)	<i>0,109</i>
50-69	18 (64,3%)	
>70	8 (28,6%)	
<b>Pušenje</b>		
da	12 (42,9%)	<i>0,572</i>
ne	16 (57,1%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>		
Da	4 (14,3%)	<i>&lt;0,001**</i>
Ne	24 (85,7%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>		
usna duplja	3 (10,7%)	<i>&lt;0,001**</i>
orofarinks	4 (14,3%)	
hipofarinks	1 (3,6%)	
larinks	20 (71,4%)	
<b>Patohistološki gradus</b>		
G1	6 (21,4%)	<i>0,00936*</i>
G2	20 (71,4%)	
G3	2 (7,1%)	
<b>Stadijum bolesti</b>		
In situ	1 (3,4%)	<i>0,0215*</i>
I-II	9 (31,1%)	
III-IV	17 (62,1%)	
Nije određen	1 (3,4%)	

p vrijednost je dobijena na osnovu Testa proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;  
\*statistička značajnost; \*\*statistički visoka značajnost

Statistička analiza je pokazala da nema razlike između učestalosti HPV pojedinačne infekcije, EBV pojedinačne infekcije i BKV pojedinačne infekcije u odnosu na pol, starost pacijenata, pušenje i konzumaciju alkohola, kao ni u odnosu na patohistološke i kliničke karakteristike HNSCC (Tabela 31).

**Tabela 31.** Učestalost pojedinačnih infekcija u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	<b>HPV pojedinačna infekcija n=16</b>	<b>EBV pojedinačna infekcija n=11</b>	<b>BKV pojedinačna infekcija n=1</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>				
muškarci	13 (81,25%)	10 (90,90%)	1 (100%)	0,678
žene	3 (18,75%)	1 (9,09%)	0 (0%)	
<b>Starost pacijenata</b>				
<50	2 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0,414
50-69	10 (62,5%)	8 (72,73%)	0 (0%)	
>70	4 (25%)	3 (27,27%)	1 (100%)	
<b>Pušenje</b>				
da	7 (43,75%)	4 (36,36%)	1 (100%)	0,687
ne	9 (56,25%)	7 (63,64%)	0 (0%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>				
da	4 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0,248
ne	12 (75%)	11 (100%)	1 (100%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>				
usna duplja	1 (6,25%)	2 (18,18%)	0 (0%)	0,865
orofarinks	3 (18,75%)	1 (9,09%)	0 (0%)	
hipofarinks	1 (6,25%)	0 (0%)	0 (0%)	
larinks	11 (68,75%)	8 (72,73%)	1 (100%)	
<b>Patohistološki gradus</b>				
G1	4 (25%)	2 (18,18%)	0 (0%)	1
G2	11 (68,75%)	8 (72,73%)	1 (100%)	
G3	1 (6,25%)	1 (9,09%)	0 (0%)	
<b>Stadijum bolesti</b>				
In situ	1 (6,25%)	0 (0%)	0 (0%)	0,742
I-II	6 (37,5%)	3 (27,27%)	0 (0%)	
III-IV	9 (56,25%)	7 (63,64%)	1 (100%)	
Nije određen	0 (0%)	1 (9,09%)	0 (0%)	

*p* vrijednost je dobijena upotrebom Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

Koinfekcija je dokazana kod 11 HNSCC uzoraka. Istovremene infekcije sa više onkogenih virusa su bile statistički značajno češće kod muških ispitanika u odnosu na ženske ispitanike (Tabela 32). Nije pokazano postojanje statistički značajne razlike prisustva koinfekcija u odnosu na starost pacijenata, kao ni u odnosu na bihevioralne karakteristike pacijenata. U odnosu na lokalizaciju, koinfekcije su bile statistički značajno češće kod karcinoma larinksa, kao i kod karcinoma sa patohistološkim gradusom G2. Nije pokazano postojanje statistički značajne razlike prisustva istovremene infekcije sa više onkogenih virusa u odnosu na stadijum bolesti (Tabela 32).



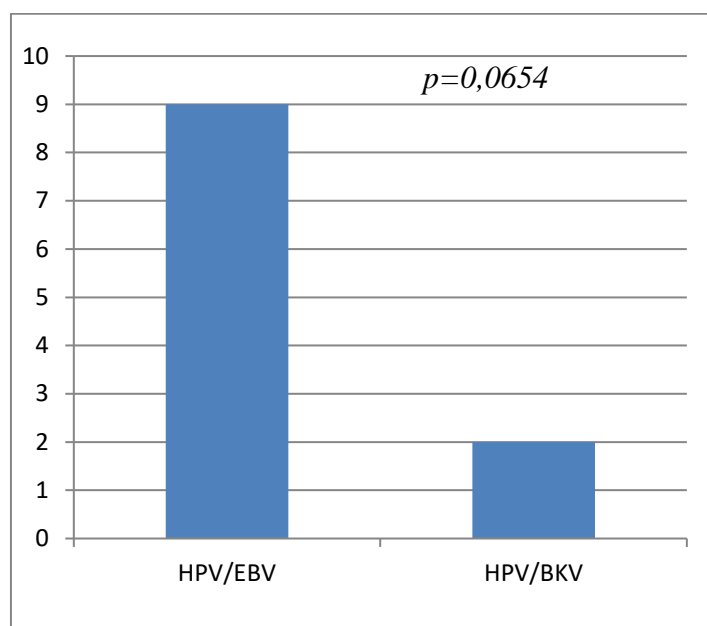
**Tabela 32.** Prisustvo koinfekcija onkogenih virusa u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	<b>Koinfekcije n=11</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>Pol</b>		
muški	10 (90,91%)	<b>0,0117*</b>
ženski	1 (9,09%)	
<b>Starost pacijenata</b>		
<50	0 (0%)	<b>0,0654</b>
50-69	9 (81,82%)	
>70	2 (18,18%)	
<b>Pušenje</b>		
da	6 (54,55%)	<b>1</b>
ne	5 (45,45%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>		
Da	2 (18,18%)	<b>0,0654</b>
Ne	9 (81,82%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>		
usna duplja	0 (0%)	<b>0,0117*</b>
orofarinks	0 (0%)	
hipofarinks	1 (9,09%)	
larinks	10 (90,91%)	
<b>Patohistološki gradus</b>		
G1	1 (9,09%)	<b>0,0215*</b>
G2	9 (81,82%)	
G3	1 (9,09%)	
<b>Stadijum bolesti</b>		
In situ	0 (0%)	<b>0,227</b>
I-II	3 (27,3%)	
III-IV	8 (72,7%)	

*p* vrijednost dobijena primjenom Testa proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;

\*statistička značajnost

Kod 9 uzoraka je utvrđena istovremena infekcija sa HPV/EBV, te kod 2 uzorka HPV/BKV koinfekcija. Nije dokazano prisustvo EBV/BKV koinfekcije u ispitivanim uzorcima. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti vrste koinfekcija u tkivima karcinoma glave i vrata (Test proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta;  $p > 0,05$ ) (Grafikon 3).



**Grafikon 3.** Učestalost koinfekcija u uzorcima tkiva karcinoma glave i vrata

U odnosu na lokalizaciju karcinoma, HPV/EBV koinfekcija je dokazana 9 uzoraka karcinoma larinksa, dok je HPV/BKV koinfekcija utvrđena u 1 uzorku karcinoma hipofarinksa, te u 1 uzorku karcinoma larinksa.

Analizirajući učestalost HPV genotipova u mješovitim infekcijama, iako je HPV 16 bio udružen sa EBV u 3 uzorka, a HPV 18 udružen sa EBV u 2 uzorka, nije utvrđena češća zastupljenost pojedinih HPV genotipova u koinfekcijama (Tabela 33). U svim mešovitim infekcijama je bio zastupljen EBV-1 genotip izuzev jednog uzorka gdje je EBV-2 bio udružen sa HPV16. Kod 2 uzorka gdje je dokazana HPV/EBV koinfekcija nije bilo moguće utvrditi HPV genotip.

**Tabela 33.** Učestalost HPV i EBV genotipova u koinfekcijama

HPV6/EBV1	HPV16/EBV1	HPV16/EBV2	HPV18/EBV1	HPV66/EBV1	HPV16/BKV	HPV18/BKV
1 (11,1%)	2 ( 22,2%)	1 (11,1 %)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)

Poređenjem pacijenata sa pojedinačnim infekcijama uzrokovanih jednim onkogenim virusom i onih sa koinfekcijama u odnosu na demografske i bihevioralne karakteristike, nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike. Takođe, statistički značajna razlika nije pokazana i u odnosu kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata, između prisustva pojedinačnih infekcija i koinfekcija (Tabela 34).

**Tabela 34.** Prisustvo pojedinačnih virusnih infekcija i koinfekcija u odnosu na demografske, bihevioralne osobine pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata

	Pojedinačne infekcije n=28	Koinfekcije n=11	<i>p</i> vrijednost
<b>Pol</b>			
Muškarci	24 (86,2%)	10 (90,91%)	1
Žene	4 (13,8%)	1 (9,09%)	
<b>Starost pacijenata</b>			
<50	2 (7,1%)	0 (0%)	0,714
50-69	18 (64,3%)	9 (81,82%)	
>70	8 (28,6%)	2 (18,18%)	
<b>Pušenje</b>			
da	12 (42,9%)	6 (54,55%)	0,723
ne	16 (57,1%)	5 (45,45%)	
<b>Konsumacija alkohola</b>			
da	4 (14,3%)	2 (18,18%)	1
ne	24 (85,7%)	9 (81,82%)	
<b>Lokalizacija HNSCC</b>			
usna duplja	3 (10,7%)	0 (0%)	0,327
orofarinks	4 (14,3%)	0 (0%)	
hipofarinks	1 (3,6%)	1 (9,09%)	
larinks	20 (71,4%)	10 (90,91%)	
<b>Patohistološki gradus</b>			
G1	6 (21,4%)	1 (9,09%)	0,839
G2	20 (71,4%)	9 (81,82%)	
G3	2 (7,1%)	1 (9,09%)	
<b>Stadijum bolesti</b>			
In situ	1 (3,4%)	0 (0%)	1
I-II	9 (31,1%)	3 (27,3%)	
III-IV	17 (62,1%)	8 (72,7%)	
Nije određen	1 (3,4%)	0 (0%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu upotrebom Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

## 4.8 Određivanje HLA-G polimorfizama u tkivima karcinoma glave i vrata

### 4.8.1 Učestalost HLA-G genotipova kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomima glave i vrata

Određivanje HLA-G polimorfizama primenom metode direktnog sekvenciranja po Sangeru je urađena u 30 svježih tkiva HNSCC (29 karcinoma larinksa i jednog uzorka karcinoma hipofarinksa).

Nakon analize dobijenih sekvenci egzona 2 i 3 HLA-G gena i njihovog poređenja sa referentnim sekvencama u IMGT/HLA i NCBI genskoj bazi podataka utvrđeno je postojanje 6 HLA-G genotipova. Dobijene nukleotidne sekvence za utvrđene HLA-G genotipove u uzorcima obrađenim u ovom istraživanju su prikazane u Prilogu 2.

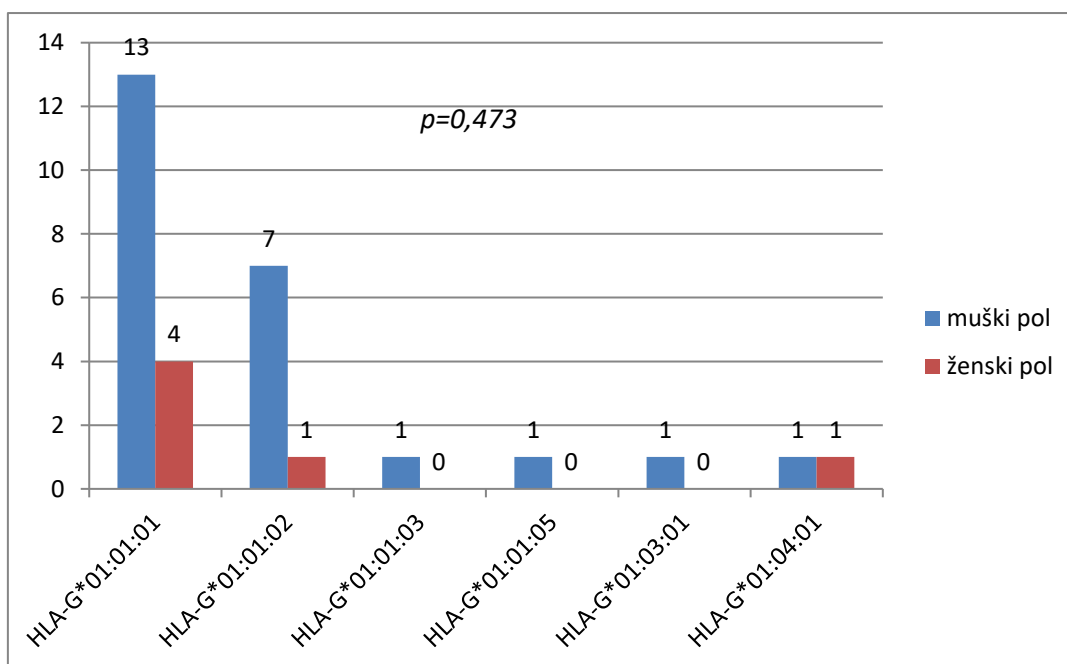
Utvrđena je visoko statistički značajna razlika u učestalosti genotipova kod pacijenata sa HNSCC pri čemu je najčešći bio HLA-G\*01:01:01 genotip (Tabela 35). Dakle, učestalost alelnih varijanti, HLA-G\*01:03:01 i HLA-G\*01:04:01 koje karakteriše nesinonimna supstitucija nije bila značajna u odnosu na zastupljenost alelnih varijanti koje karakteriše sinonimna supstitucija.

**Tabela 35.** Zastupljenost HLA-G tipova u HNSCC tkivima

HLA-G *01:01:01	HLA-G *01:01:02	HLA-G *01:01:03	HLA-G *01:01:05	HLA-G *01:03:01	HLA-G *01:04:01	<i>p</i> vrijednost
17 (56,66%)	8 (26,66%)	1 (0,99%)	1 (0,99%)	1 (0,99%)	2 (1,98%)	<b>p&lt;0,001**</b>

*p* vrijednost dobijena na osnovu Testa proporcije za jedan uzorak; \*\*statistički visoka značajnost

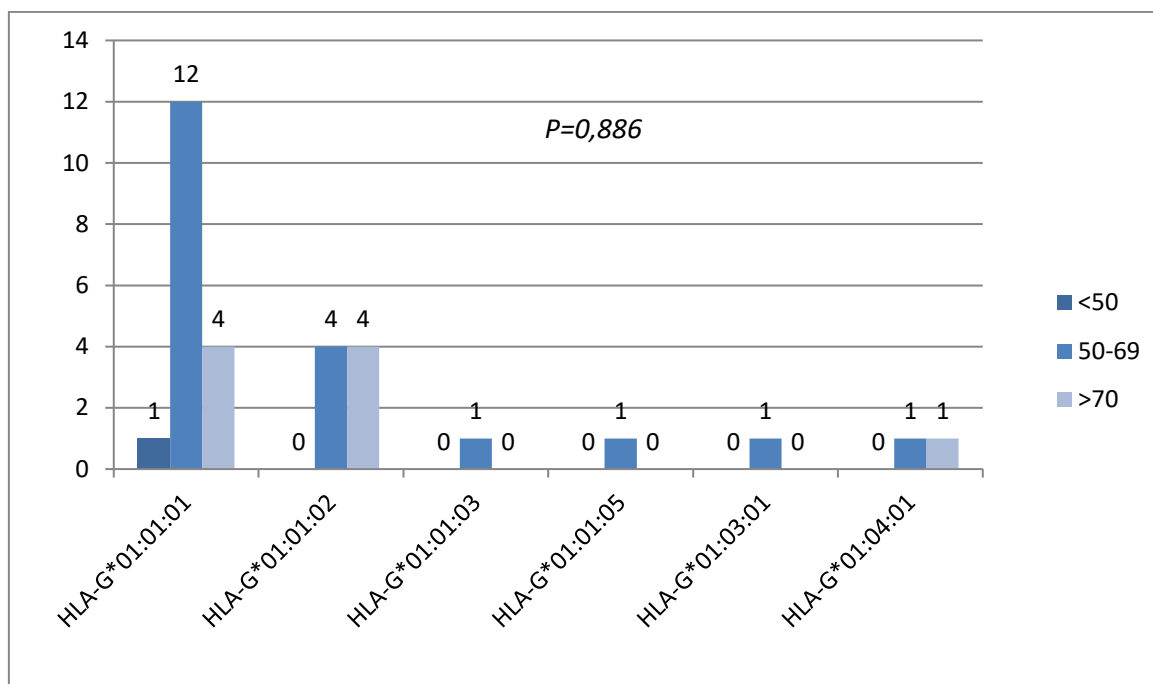
U odnosu na pol, HLA-G\*01:01:01 genotip je bio najčešći kod ispitanika oba pola, te nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na pol (Grafikon 4).



**Grafikon 4.** Distribucija HLA-G genotipova prema polu pacijenata (*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće)

U odnosu na starost pacijenata, najčešći genotip kod pacijenata uzrasta 50-69 godina starosti bio je HLA-G\*01:01:01. Kod ispitanika starosne grupe >70 godina, najčešći su bili genotipovi HLA-

G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02, a kod 1 pacijenta dokazan je HLA-G\*01:04:01. Pacijent starosti <50 godina života je imao genotip HLA-G\*01:01:01. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji HLA-G genotipova u odnosu na starost pacijenata (Grafikon 5).



**Grafikon 5.** Učestalost HLA-G genotipova prema starosti pacijenata ( $p$  vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće)

U odnosu na bihevioralne karakteristike pacijenata nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti HLA-G genotipova (Tabela 36).

**Tabela 36.** Učestalost HLA-G genotipova u odnosu na pušenje i konzumiranje alkohola

	HLA-G *01:01:01	HLA-G *01:01:02	HLA-G *01:01:03	HLA-G *01:01:05	HLA-G *01:03:01	HLA-G *01:04:01	$p$ vrijednost
<b>Pušenje</b>							
da	8 (47%)	3 (37,5%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (50%)	0,906
ne	9 (53%)	5 (62,5%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	
<b>Konzumacija alkohola</b>							
da	3 (17,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,732
ne	14 (82,4%)	8 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	

$p$  vrijednost dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

Analizirani su dobijeni rezultati učestalosti HLA-G genotipova u odnosu na kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata. Ispitana je povezanost pojedinačnih HLA-G tipova sa patohistološkim gradusom HNSCC. Analizom rezultata nađena je statistički značajna razlika u distribuciji HLA-G\*01:01:01 između lezija patohistoloških gradusa 1, 2 i 3 (Tabela 37).

**Tabela 37.** Učestalost HLA-G genotipova u odnosu na patohistološki gradus HNSCC

	Lezija gradusa 1	Lezija gradusa 2	Lezija gradusa 3	<i>p</i> vrijednost
<b>G*01:01:01</b> n=17	2 (11,76%)	11 (64,71%)	4 (23,53%)	<b>0,0225*</b>
<b>G*01:01:02</b> n=8	0 (0%)	6 (75%)	2 (25%)	0,289
<b>G*01:01:03</b> n=1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	-
<b>G*01:01:05</b> n=1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	-
<b>G*01:03:01</b> n=1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	-
<b>G*01:04:01</b> n=2	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	1

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Testa proporcije za jedan uzorak; \*statistička značajnost

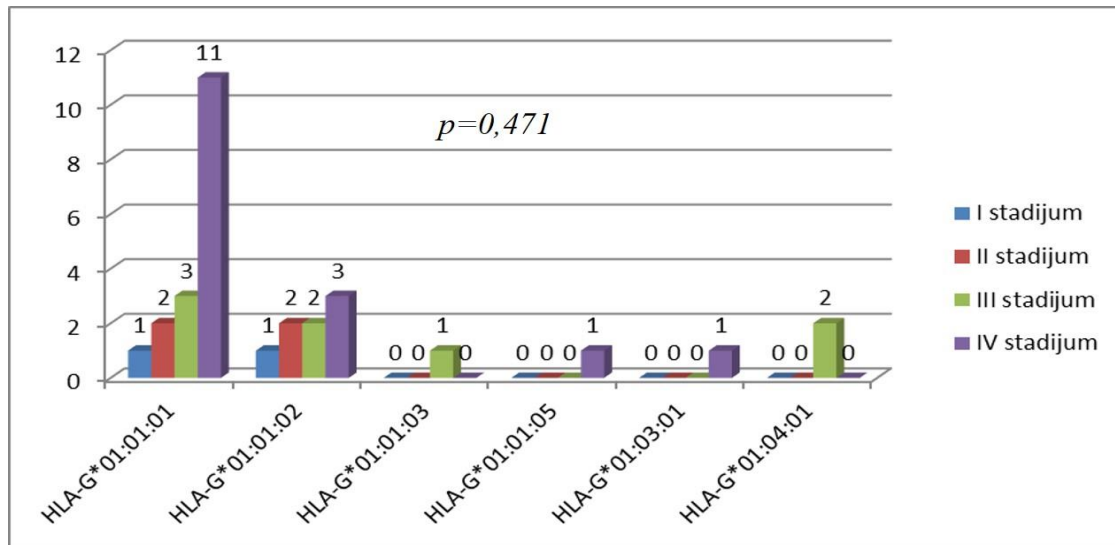
Obzirom da su HLA-G\*01:01:01 i HL-G\*01:01:02 bili najzastupljeniji kod lezija patohistološkog gradusa 2 urađena je univarijantna logistička regresiona analiza. U univarijantnom regresionom modelu nije nađena povezanost patohistološkog gradusa 2 (G2) sa prisustvom HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 genotipova (Tabela 38). Pokazano je da HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 nisu prediktori za patohistološki gradus 2.

**Tabela 38.** Univarijantni logistički regresioni modeli sa patohistološkim gradusom 2 kao zavisnom varijablom

Nezavisna varijabla	OR	95%CI	<i>p</i> vrijednost
<b>G*01:01:01</b>	1.23	0.263-5.73	0.795
<b>G*01:01:02</b>	0.583	0.0944-3.6	0.562

*p* vrijednost je dobijena na osnovu univarijantne logističke regresije

Analiza učestalosti HLA-G genotipova u odnosu na stadijum bolesti nije pokazala postojanje statistički značajne razlike u učestalosti HLA-G genotipova u odnosu na stadijum bolesti (Fišerov test tačne vjerovatnoće) (Grafikon 6).



**Grafikon 6.** Učestalost HLA-G tipova u odnosu na stadijum bolesti

S obzirom da je najveći broj pacijenata sa HLA-G\*01:01:01 genotipom bio u IV stadijumu bolesti, utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u odnosu na druge stadijume bolesti (Test proporcije za jedan uzorak,  $p=0,022$ ). Takođe, najveći broj pacijenata sa HLA-G\*01:01:02 genotipom je bio u IV stadijumu bolesti, ali nije pokazano postojanje statistički značajne razlike u odnosu na druge stadijume bolesti (Test proporcionalnosti za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p=1$ ).

#### 4.8.2 Učestalost infekcije onkogenim virusima u odnosu na HLA-G genotipove

##### 4.8.2.1 Učestalost HPV infekcije u odnosu na HLA-G genotipove

U uzorcima u kojima je dokazano prisustvo HPV DNK, utvrđeno je prisustvo samo HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 genotipova, ali nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između prisustva HPV i distribuciji HLA-G genotipova (Tabela 39).

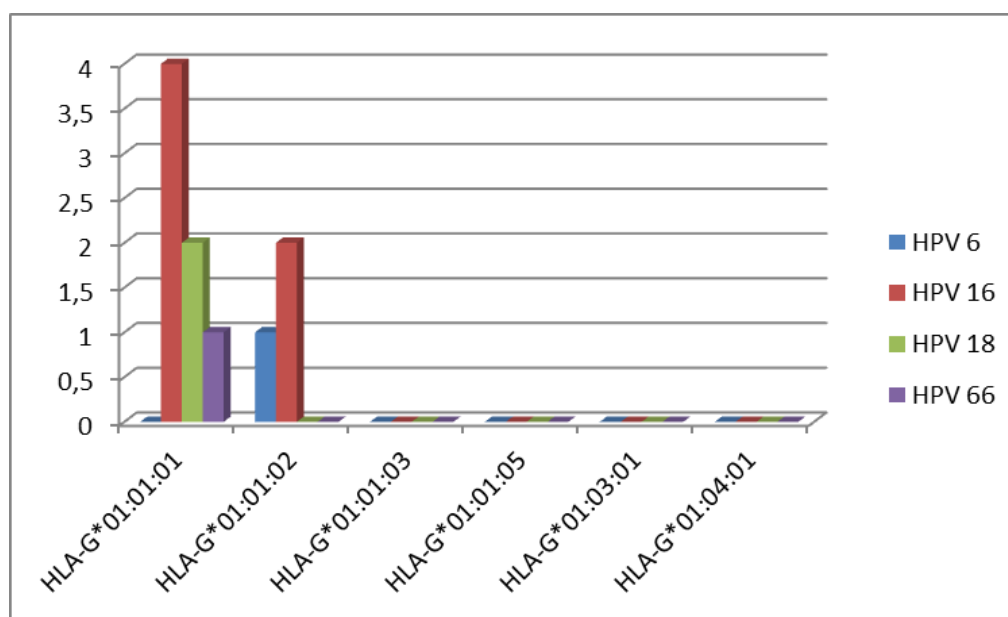
**Tabela 39.** Prisustvo/odsustvo HPV infekcije u odnosu na HLA-G genotipove

	HLA-G *01:01:01	HLA-G *01:01:02	HLA-G *01:01:03	HLA-G *01:01:05	HLA-G *01:03:01	HLA-G *01:04:01	<i>p</i> vrijednost
HPV +	9 (53%)	3 (37,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,718
HPV -	8 (47%)	5 (62,5%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

Kod uzoraka kod kojih je utvrđeno prisustvo HPV DNK, genotipizacijom je dokazano prisustvo jednog niskorizičnog tipa i 3 visokorizična HPV genotipa i to 16, 18 i 66. Kod pacijenata sa HLA-G\*01:01:01 tipom, dokazan je HPV 16 kod 4 pacijenta, HPV 18 kod 2 pacijenta i HPV 66 kod 1 pacijenta. Kod pacijenata sa HLA-G\*01:01:02 genotipom, utvrđeno je prisustvo HPV 16 kod 2 pacijenta i niskorizični HPV 6 kod jednog pacijenta (Grafikon 7). Kod dva uzorka nije bilo moguće utvrditi HPV genotip.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između HLA-G genotipova i prisustva dokazanih HPV genotipova (Fišerov test tačne vjerovatnoće,  $p=0,661$ ).



**Grafikon 7.** Učestalost HLA-G genotipova u odnosu na prisustvo različitih HPV genotipova

#### 4.8.2.2 Učestalost EBV infekcije u odnosu na HLA-G genotipove

Analiza prisustva HLA-G genotipova u odnosu na prisustvo/odsustvo EBV infekcije je pokazala da je kod EBV pozitivnih dokazano prisustvo HLA-G\*01:01:01, HLA-G\*01:01:02 i HLA-G\*01:01:05, pri čemu je najučestaliji bio HLA-G\*01:01:01 genotip (Tabela 40). Nije uočena statistički značajna razlika između zastupljenosti određenih HLA-G genotipova i prisustva/odsustva EBV DNK.

**Tabela 40.** Prisustvo/odusustvo EBV infekcije u odnosu HLA-G genotipove

	HLA-G *01:01:01	HLA-G *01:01:02	HLA-G *01:01:03	HLA-G *01:01:05	HLA-G *01:03:01	HLA-G *01:04:01	<i>p</i> vrijednost
<b>EBV +</b>	5 (29,4%)	3 (37,5%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0,786
<b>EBV -</b>	12 (70,6%)	5 (62,5%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	2 (100%)	

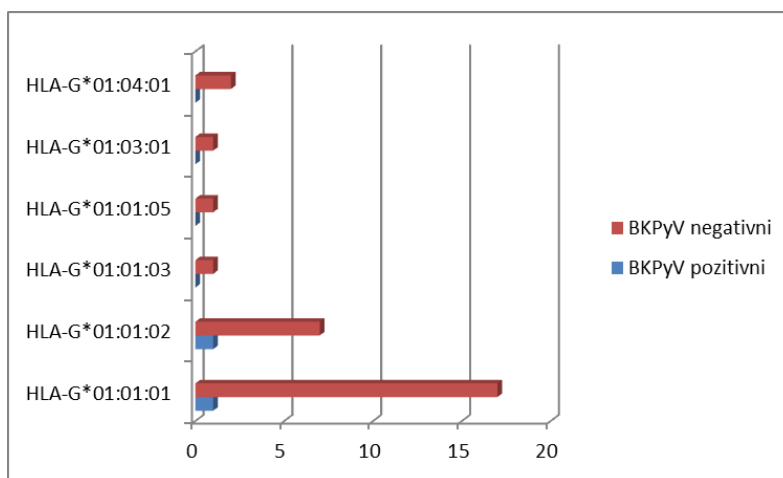
*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće



Analiza prisustva EBV genotipova u odnosu na HLA-G genotipove, pokazala da je EBV-1 dokazan kod 5 pacijenata sa HLA-G\*01:01:01, 2 pacijenta sa HLA-G\*01:01:02 i jednom pacijentu sa HLA-G\*01:01:05 genotipom. Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji EBV-1 u odnosu na tri HLA-G genotipa u kojim je detektovan EBV-1 (Test proporcije za jedan uzorak sa korekcijom kontinuiteta,  $p=0,453$ ). Kod 1 pacijenta u čijem HNSCC uzorku je dokazan EBV-2 utvrđen je HLA-G\*01:01:02 genotip.

#### 4.8.2.3 Učestalost BKV poliomavirusne infekcije u odnosu na HLA-G genotipove

Analiza učestalosti BKV infekcije u odnosu na HLA-G genotipove pokazala je da je kod dva BKV pozitivna karcinoma larinksa utvrđeno je prisustvo HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 (Grafikon 8).



**Grafikon 8.** Učestalost HLA-G genotipova u odnosu na BKV poliomavirusnu infekciju

#### 4.8.2.4 Učestalost HLA-G polimorfizama u odnosu na prisustvo pojedinačnih infekcija onkogenim virusima

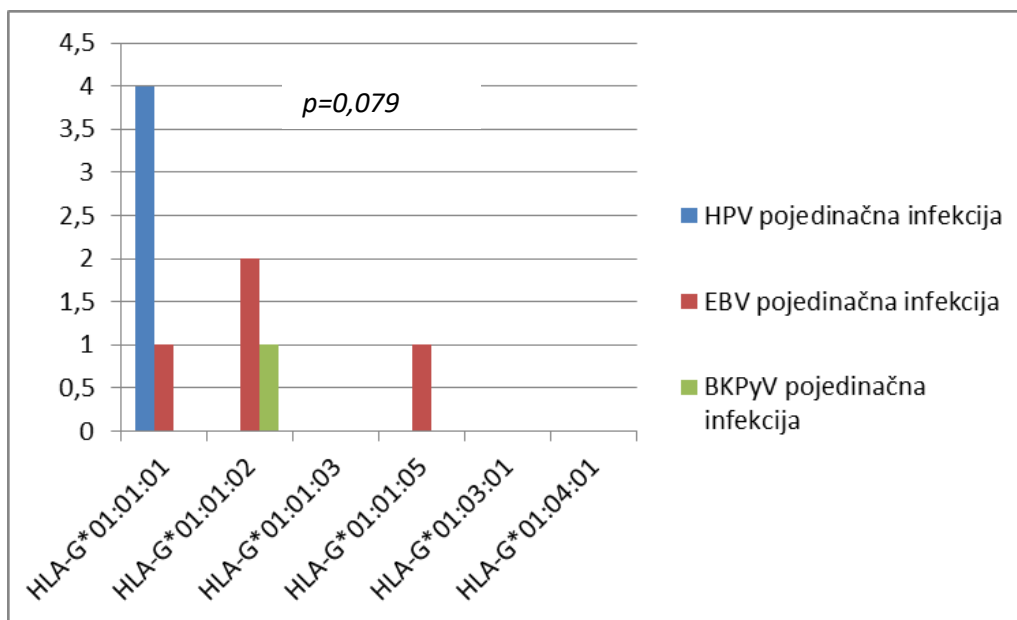
Od 30 svježih uzoraka HNSCC u kojima je utvrđen HLA-G genotip, pojedinačne infekcije onkogenih virusa su dokazane kod 9 uzoraka. Kod pacijenata kod kojih je dokazano prisustvo infekcije sa pojedinim onkogenim virusima, najčešći je bio HLA-G\*01:01:01 genotip, ali nije pokazano postojanje statistički značajne razlike između zastupljenosti HLA-G genotipova i prisustva pojedinačne infekcije sa onkogenim virusima (Tabela 41).

**Tabela 41.** Učestalost pojedinačnih infekcija onkogenih virusa u odnosu na HLA-G genotipove

Pojedinačna infekcija	HLA-G *01:01:01	HLA-G *01:01:02	HLA-G *01:01:03	HLA-G *01:01:05	HLA-G *01:03:01	HLA-G *01:04:01	<i>p</i> vrijednost
da	5 (29,4%)	3 (37,5%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0,786
ne	12 (70,6%)	5 (62,5%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	2 (100%)	

*p* vrijednost je dobijena na Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

Od 9 uzoraka u kojima je dokazano prisustvo infekcije sa pojedinačnim onkogenim virusima, u 4 uzorka HNSCC utvrđeno je prisustvo HPV DNK, u 4 dokazana je EBV DNK, dok je BK poliomavirus dokazan u 1 uzorku (Grafikon 9). Prisustvo HPV je dokazano kod pacijenata samo sa HLA-G\*01:01:01 genotipom, EBV je dokazan kod pacijenata sa HLA-G\*01:01:01, HLA-G\*01:01:02 i HLA-G\*01:01:05 genotipom, dok je BK poliomavirus dokazan kod pacijenta sa HLA-G\*01:01:02 genotipom (Grafikon 9). Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti različitih pojedinačnih infekcija u odnosu na HLA-G genotipove (Fišerov test tačne vjerovatnoće,  $p=0,079$ ).



**Grafikon 9.** Učestalost HLA-G genotipova u odnosu na prisustvo pojedinačnih infekcija

#### 4.8.3 Učestalost HLA-G polimorfizama u odnosu na koinfekcije onkogenim virusima

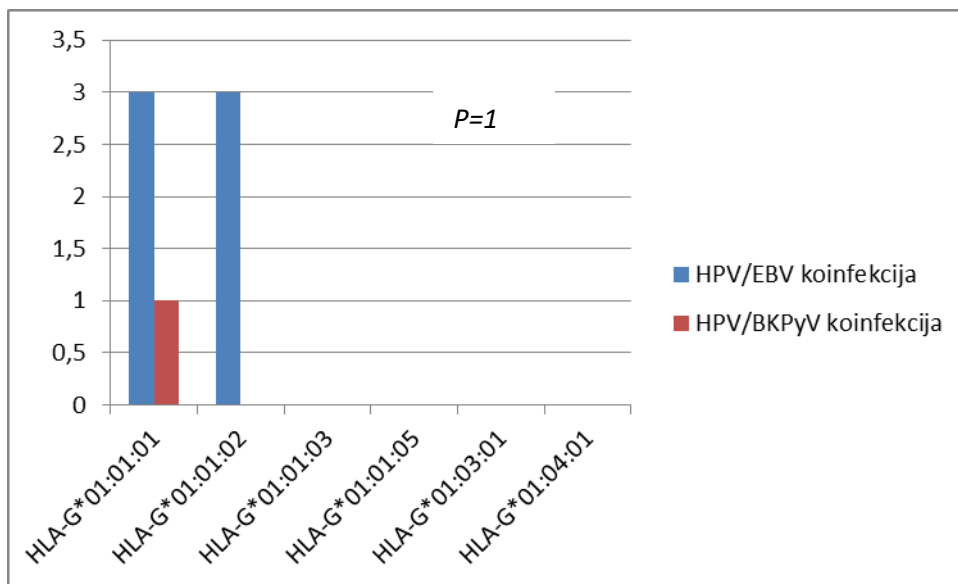
Koinfekcija onkogenim virusima dokazana je kod 7/30 uzoraka kojima je utvrđen HLA-G genotip. Prisustvo koinfekcija je dokazane kod pacijenata sa dva HLA-G genotipa, HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 sa približno istom učestalosti. Nije pokazano postojanje statistički značajne razlike između učestalosti koinfekcija onkogenim tipovima i HLA-G genotipova (Tabela 42).

**Tabela 42.** Učestalost koinfekcija sa onkogenim virusima u odnosu na HLA-G genotipove

Koinfekcija	HLA-G *01:01:01	HLA-G *01:01:02	HLA-G *01:01:03	HLA-G *01:01:05	HLA-G *01:03:01	HLA-G *01:04:01	<i>p</i> vrijednost
da	4 (23,5%)	3 (37,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,915
ne	13 (76,5%)	5 (62,5%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	

*p* vrijednost je dobijena na osnovu Fišerovog testa tačne vjerovatnoće

Od ukupno 7 uzoraka sa dokazanim koinfekcijama, kod 6 uzoraka utvrđena je koinfekcija HPV/EBV, a kod 1 je dokazana HPV/BKV koinfekcija (Grafikon 10). Koinfekcija HPV/EBV je dokazana kod pacijenata sa HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 genotipovima, dok je koinfekcija HPV/BKV dokazana kod pacijenta sa HLA-G\*01:01:01 genotipom (Grafikon 10). Nije pokazano postojanje statistički značajne razlike između učestalosti različitih koinfekcija sa onkogenim tipovima i HLA-G genotipova (Fišerov test tačne vjerovatnoće,  $p=1$ ).



**Grafikon 10.** Učestalost HLA-G genotipova u odnosu na prisustvo koinfekcija

## 5 Diskusija

Danas smo svjedoci epidemijskog javljanja malignih bolesti. Etiologija ovih oboljenja je multifaktorijalna, a do danas za većinu karcinoma nije do kraja razjašnjeno koji faktori rizika su tačan uzrok i okidač u njihovom nastanku. Brojne studije ukazuju da u etiologiji malignih bolesti značajnu ulogu imaju faktori rizika domaćina, spoljašnje sredine i infektivni agensi (140).

Faktori rizika domaćina odnosno čovjeka su genetska predispozicija i bihevioralni faktori, kao što su konzumacija alkoholnih pića i pušenje odnosno upotreba duvana (140). Genetska predispozicija jedne individue podrazumijeva povećanu osjetljivost organizma za malignu transformaciju ćelija (141). Do transformacije ćelije dolazi zbog nakupljanja genetskih i epigenetskih promjena koje nastaju zbog hromozomskih i molekularnih aberacija. Nastala genetska nestabilnost vodi ka malignoj alteraciji ćelija (142). Poznato je da određeni sindromi koji su uzrokovani mutacijama gena, jesu predispozicija za razvoj karcinoma (143). Takođe, genske mutacije su prisutne u prekanceroznim stanjima koja evoluiraju u maligna stanja (144).

Alkohol je prema IARC-u svrstan u prvu grupu karcinogena (145). Rezultati meta-analize studija kontrole slučajeva su pokazali povezanost prije svega prekomjerne konzumacije alkohola, a neke studije i umjerene konzumacije alkohola sa nastankom karcinoma. Konzumacija alkohola povećava rizik za nastanak karcinoma usne duplje, grla, grkljana, jednjaka, jetre i dojke (142, 146). Upotreba duvana širom svijeta jeste vodeći faktor smrtnosti uzrokovane karcinomom. Svi proizvodi duvana koji se koriste za pušenje, žvakanje ili udisanje su izvori karcinogenih i toksičnih materija (142). Pušenje duvana je najštetniji oblik upotrebe duvana, tako da je IARC, pušenje duvana klasifikovala kao uzrok hematopoetskih tumora, karcinoma larinksa, karcinoma usne duplje, karcinoma nazofarinksa, karcinoma farinksa i sinusa, zatim karcinoma jednjaka, pankreasa, mokraćne bešike, pluća, jetre i grlića materice (142). Pasivno pušenje, tj. udisanje duvanskog dima u zadimljenoj prostoriji je četiri puta štetnije od dima koji udiše pušač. Smatra se da nepušač u zadimljenoj prostoriji udiše tri puta više ugljen-dioksida, preko 10 puta više nitrozamina, 15 puta više benzena i do 70 puta više amonijaka nego aktivni pušači cigareta (142).

Štetan uticaj spoljašnje sredine podrazumijeva izloženost karcinogenim supstancama. Razvojem civilizacije povećala se izloženost štetnim materijama iz spoljašnje sredine koje su uzrok mutacija gena. Izduvni gasovi, industrijski otpad, pesticidi, hemijske supstance koje se koriste u poljoprivredi mogu povećati rizik za nastanak malignih oboljenja (142). U hrani takođe mogu biti prisutne mutagene i karcinogene supstance koje nastaju kao rezultat neadekvatnog skladištenja i čuvanja hrane. Genotoksini iz hrane se vezuju za DNK molekulu čime dovode do sinteze proteina izmjenjene aminokiselinske sekvence (142). Mikotoksini, prisutni u određenim namirnicama se dovode u vezu sa nastankom karcinoma dojke, jetre, jednjaka i prostate (142).

U posljednjih nekoliko decenija uočen je značaj i bioloških agenasa (virusi, bakterije, paraziti) u nastanku karcinoma. Epidemiološke studije pokazuju da je prisustvo *Helicobacter pylori* značajan faktor rizika za nastanak karcinoma želuca, a infekcija sa *Chlamydia trachomatis* može biti predisponirajući faktor za karcinom grlića materice. Takođe, *Borrelia burgdorferi* koja izaziva lajmsku bolest se povezuje sa limfomom (142). Infekcije parazitima se povezuju sa karcinomima želuca, mokraćne bešike, te hepatocelularnim karcinomom (142). Poseban značaj ima uloga virusa u nastanku karcinoma ljudi. Brojne studije su pokazale da virusi posjeduju onkogene koji indukuju promjene na nivou fenotipa, rasta i razmnožavanja ćelija odnosno dovode do transformacije ćelija. Danas je poznato da su HPV, EBV, humani herpes virus tip 8 (HHV-8), poliomavirusi te retrovirusi udruženi sa nastankom malignih tumora (142). Zbog povećane izloženosti infektivnim agensima smatra se da će u budućnosti sve više karcinoma biti posljedica infekcija biološkim agensima (142).

U svijetu, učestalost karcinoma glave i vrata se povećala za 36,5% u posljednjih deset godina (147). Skvamocelularni karcinom glave i vrata je šesti najčešći karcinom kod ljudi širom svijeta (5). Razlike u učestalosti se odnose na geografsku regiju, pol, te lokalizaciju karcinoma. U Evropi, najveća učestalost HNSCC je zabilježena u Francuskoj, Mađarskoj, Slovačkoj i Sloveniji (148). Među 40 zemalja Evrope, Bosna i Hercegovina se nalazi u grupi sa srednjim rizikom oboljevanja (nalazi se na 25. mjestu) od karcinoma usne duplje, orofarinksa, nazofarinksa, hipofarinksa i larinksa (7).

Podaci iz velikog broja zemalja svijeta ukazuju da se HNSCC javlja sa većom učestalošću kod muškaraca u odnosu na žene. U Francuskoj, Hong Kongu, Indiji, centralnoj i istočnoj Evropi, Španiji, Italiji i Brazilu veća stopa incidencije HNSCC je karakteristična za muški pol i kreće se oko 20 na 100 000 ljudi (149). U skladu sa navedenim su i rezultati ovoga istraživanja koji su pokazali statistički značajno veću zastupljenost HNSCC kod muškarca u odnosu na žene (83% vs. 17%).

Poznato je da maligne bolesti češće pogađaju starije osobe. Prema podacima iz literature učestalost karcinoma glave i vrata se povećava sa godinama života i najčešće pogađa osobe životne dobi od 50 do 70 godina starosti (150). Najveći broj pacijenata sa HNSCC u ovoj studiji su upravo bili starosti od 50 do 70 godina. Takođe najveći broj epidemioloških studija pokazuju da se karcinomi glave i vrata češće dokazuju kod muškaraca preko 50. godine života (151, 152). Ovo je potvrđeno i rezultatima našeg istraživanja gdje je većina HNSCC pacijenata bila muškog pola dobne starosti od 50 do 70 godina života.

U oko 75% slučajeva HNSCC je udružen sa konzumacijom duvana i alkohola, koji se smatraju nezavisnim faktorima za razvoj ovih karcinoma (153). Anamnestički podaci ispitanika u ovoj studiji su pokazali približno isto pušača i nepušača, bez statistički značajne razlike u učestalosti. U odnosu na konzumiranje alkohola, evidentirano je statistički visoko značajno više ispitanika koji su naveli da ne konzumiraju alkohol.

Anatomske lokalizacije koje HNSCC najčešće zahvata su usna duplja, farinks, hipofarinks i larinks, pri čemu je u svijetu najčešća lokalizacija unutar regije usne duplje (6, 154). Karcinom usne šupljine je 15. najčešći karcinom u svijetu sa većom učestalošću javljanja u južnoj i jugoistočnoj Aziji, u tropskom dijelu Južne Amerike i subsaharskoj Africi (154). U posljednjoj deceniji učestalost karcinoma usne duplje je porasla za 36,5%. Sledeća najčešća lokalizacija karcinoma glave i vrata je larinks čija je incidenca u zadnjih deset godina porasla za oko 23%. Učestalost javljanja karcinoma orofarinksa je nešto manja u odnosu na karcinom usne duplje i karcinom larinksa (154). U istočnim i sjevernoevropskim zemljama kao što su Češka, Slovačka, Danska, Estonija i Finska gdje trend pušenja cigareta nije opao, povećala se stopa karcinoma usne šupljine kako kod muškog tako i kod ženskog pola (155). U Francuskoj i Italiji stopa karcinoma usne šupljine je opala među muškarcima, a porasla kod žena. Podaci iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) i Kanade govore u prilog tome da je kod populacije ovih zemalja došlo do pada incidence oralnog karcinoma kod oba pola. Stope orofaringealnog karcinoma su takođe porasle i kod muškaraca i kod žena u mnogim evropskim zemljama (Bjelorusija, Češka, Danska, Finska, Island, Letonija, Norveška, Velika Britanija) dok je opala u azijskim zemljama (155). Što se tiče karcinoma larinksa, globalno muškarci imaju preko pet puta veću incidencu, prevalencu i mortalitet (156). Međutim zanimljivo je spomenuti da se jaz između muškaraca i žena u pogledu učestalosti i smrti od karcinoma larinksa posljednjih decenija smanjivao (156). Najveća incidenca karcinoma larinksa je u Evropi, Americi, zatim zapadnom Pacifiku, jugoistočnoj Aziji i istočnom Mediteranu. Najmanja incidenca je zabilježena u Africi (156).

Najčešća lokalizacija karcinoma glave i vrata kod ispitanika našeg istraživanja je bio larinks sa statistički visoko značajnom razlikom u odnosu na lokalizaciju HNSCC. U Bosni i Hercegovini je prema podacima Evropskog informacionog sistema za rak, najveća stopa oboljevanja u 2020. bila od karcinoma larinksa (6). Prema poslednjim podacima Instituta za javno zdravlje Republike Srpske u periodu 2014-2017. godine, novooboljelih od karcinoma larinksa je bilo znatno više u odnosu na

novooboljele od drugih anatomskih lokalizacija karcinoma glave i vrata. U našem istraživanju, statistički značajno je bilo više muških ispitanika sa karcinomima larinksa dobi 50-69 godina. Navedeni podaci su u skladu sa podacima iz Republike Srbije, gdje je u odnosu na HNSCC lokalizaciju, takođe najčešći karcinom larinksa i slično našim podacima češći je kod muških ispitanika (157). Dobijeni rezultati se djelimično poklapaju i sa rezultatima Al-Thawadi i saradnika (158) koji su u svojoj studiji analizirajući 98 uzoraka HNSCC pacijenata iz Bosne i Hercegovine utvrdili takođe veću učestalost muškog pola, a srednja starost pacijenata je bila 62,8 (raspon 24-91). Međutim, u pogledu lokalizacije, najveći udio je imao karcinom usne duplje što studiju Al-Thawadi i saradnika (158) razlikuje od naše, što je najverovatnije posljedica selekcije uzoraka obrađivanih u studiji.

U odnosu na ostale kliničke karakteristike HNSCC lezija u ovoj studiji, pokazano je da je više od polovine pacijenata imalo srednje diferentovan karcinom, patohistološkog gradusa 2. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima patohistološkog gradusa karcinoma glave i vrata pacijenata iz Bosne i Hercegovine (158), kao i rezultatima Akhtera i saradnika (159) koji takođe pokazuju veću učestalost srednjeg diferentovanog HNSCC. Prema Akhter-u i saradnicima (159) patohistološki gradus karcinoma može korelirati sa kliničkim parametrima bolesti, kao što su stadijum bolesti, recidiv i prognoza bolesti. Kod većine pacijenata bolest se dijagnostikuje u naprednoj fazi (preko 75% slučajeva se otkrije u III i IV stadijumu bolesti), kada terapija ima manji uticaj na prognozu bolesti (160). U odnosu na TNM stadijum bolesti, najveći broj pacijenata ove studije bio je u odmakloj fazi bolesti, odnosno u IV stadijumu. Pored toga, nije pokazana statistički značajna razlika između polova i različitih starosnih grupa u odnosu na patohistološki gradus i stadijum bolesti.

Alkohol i duvan su nezavisni faktori za razvoj HNSCC, pri čemu se konzumacija jednog od ova dva faktora rizika može posebno vezati za različite podtipove HNSCC (161). Prema analizama podataka iz Sjeverne i Južne Amerike, te Evrope, konzumacija duvana se dovodi u vezu sa 33% slučajeva karcinoma glave i vrata (155). U Velikoj Britaniji se povećala stopa karcinoma usne šupljine i orofarinksa među populacijom lošijeg socioekonomskog statusa kod kojih je povećana učestalost konzumacije duvana (155). Za razliku od evropskih zemalja, u azijskim zemljama razlog učestalije pojave karcinoma usne šupljine je široka upotreba betel oraha (155). Osazuwa-Peters i saradnici (162) su u svojoj studiji analizirajući povezanost HNSCC i konzumacije duvana utvrdili da je najveći broj pušača imao karcinom larinksa. Ovo su objasnili time da se mijenja respiratorni tok na prelazu usne šupljine i larinksa. U usnoj šupljini respiratorni tok je laminarnog pravca i mijenja se u turbulentni tok u larinksu. To povećava izloženost larinksa dimu i udisanom zraku (162). Za razliku od prethodno navedenih autora, u studiji Dhull i saradnika (160) veći je broj pušača i konzumenata alkohola bio sa dijagnozom karcinoma orofarinksa. U ovom istraživanju, najveći broj pušača je utvrđen kod pacijenata sa karcinomom larinksa, ali nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između pušenja i lokalizacije HNSCC.

Alkohol konzumira 43% svjetske populacije, pri čemu je ova navika dominantnija kod muškaraca sa povećanjem trenda konzumacije alkohola kod mlađih osoba (163). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije stanovnici evropskih zemalja u prosjeku više konzumiraju alkohol od stanovnika regiona istočnog Mediterana (163). Najviše alkohola po glavi stanovnika konzumiraju stanovnici Rusije, Bugarske, Poljske i Rumunije (163). Rezultati holandske kohortne studije (161) su pokazali da je karcinom usne duplje povezan sa konzumacijom alkohola dok se ova povezanost ne odnosi na karcinom larinksa (161).

Krishn i saradnici (164) su u studiji imali veći broj pacijenata sa I stadijumom bolesti koji su konzumirali duvan ili alkohol. U ovom istraživanju nisu potvrđeni rezultati navedene studije jer je većina pušača i konzumenata alkohola bila u III ili IV stadijum bolesti, a lezije su bile patohistološkog gradusa 2. Nije nađena značajna povezanost konzumacije alkohola i duvana i HNSCC, u odnosu na patohistološki gradus i stadijum bolesti.

Iako su brojne studije pokazale da konzumacija duvana i alkohola predstavlja značajni faktor rizika za nastanak karcinoma glave i vrata (162, 164, 165, 166), rezultati ove studije nisu pokazali značajnu povezanost ovih faktora rizika sa lokalizacijom, patohistološkim gradusom i stadijumom HNSCC što se može objasniti pre svega manjim brojem ispitivanih pacijenata.

Poslednjih decenija, ukazuje se na značaj infekcije sa onkogenim virusima u razvoju HNSCC. Brojne studije su pokazale etiološki značaj humanih papiloma virusa u razvoju karcinoma grlića materice i drugih anogenitalnih karcinoma. S obzirom na histološke sličnosti sluznice gonjeg respiratornog trakta i anogenitalne regije smatra se da ovi virusi mogu imati i ulogu u nastanku karcinoma glave i vrata (140). Epštajn-Bar virus (EBV) je drugi virus koji se zbog svog poznatog onkogenog potencijala, takođe smatra da može uticati na nastanak HNSCC. Uloga ova dva onkogeno virusa se najbolje vidi iz podatka da se oni povezuju sa čak 38% svih karcinoma infektivne etiologije (31). U novije vrijeme se navodi i uloga BK poliomavirusa (BKV) i JC poliomavirusa (JCV) u nastanku HNSCC (32, 33).

Pored navedenog, sve češće se ispituje značaj koinfekcija odnosno istovremeno prisustvo više onkogenih virusa u razvoju karcinoma. Pretpostavka je da istovremeno prisustvo više onkogenih virusa može doprinijeti razvoju karcinoma, tako što djeluju sinergistički ili prisustvo jednog virusa doprinosi povećanom onkogenom potencijalu drugog onkogenog virusa (95, 96, 97).

Za utvrđivanje prisustva onkogenih virusa u HNSCC lezijama analiziraju se FFPE i svježa tkiva. Tkiva fiksirana u formalinu, a potom ukalupljena u parafin predstavljaju dostupan materijal, te se često koriste u retrospektivnim molekularnim studijama u kojima se analizira uloga onkogenih virusa u nastanku karcinoma glave i vrata. Međutim, prisustvo parafina, fragmentacija DNK, umrežavanje DNK i proteina uzrokovano izloženošću formaldehidima, mogu smanjiti prinos DNK i efikasnost amplifikacije PCR metodom (167). Uklanjanje parafina iz FFPE uzoraka je važan korak prije izolacije DNK. Ovaj postupak povećava rizik od kontaminacije te doprinosi niskom prinosu DNK. Podrazumijeva primjenu organskih rastvarača (ksilen, heksan i etanol) koja se koriste za ispiranje. U cilju povećanja efikasnosti deparafinizacije, pojedini protokoli uključuju zagrijavanje, primjenu mineralnih ulja za deparafinizaciju kao i upotrebu komercijalno dostupnih rastvora za uklanjanje parafina. Najčešće, istraživači koriste protokol sa ksilolom i etanolom, što je primijenjeno i u ovom istraživanju (168,169,170,171).

Kako bi se željeni segment DNK umnožio reakcijom lančanog umnožavanja i u cilju sekvenciranja, potrebno je izolovati nukleinske kiseline bez soli, proteina i drugih primjesa (172). Od 1869. godine kada je DNK prvi put izolovana (173) razvile su se različite metode ekstrakcije DNK. Za uklanjanje nečistoća DNK mora biti eluirana u visokim koncentracijama soli, a potom i prečišćena u etanolu. Koraci koji obuhvataju DNK izolaciju su liza ćelija, odvajanje DNK od ostalih struktura ćelije, rastvaranje, enzimsko ili hemijsko odvajanje DNK od nečistoća, proteina, RNK i drugih supstanci. Postoji širok spektar metoda za izolovanje i prečišćavanje DNK, koje podrazumevaju primjenu organskih rastvarača (fenol/hloroform), zatim membrana na bazi silicijum-dioksida i mikroporoznog stakla, kao i magnetnih čestica (172, 174).

Nekoliko studija je pokazalo različite rezultate u pogledu kvaliteta i količine DNK iz FFPE uzoraka koristeći različite metode za izolaciju. Većina ovih studija je pokazala da se primjenom fenol/hloroform ili izoamil/hloroform metode dobiju veće koncentracije DNK, ali slabiji kvalitet DNK u poređenju sa DNK izolovanom komercijalnim reagensima primjenom siliko-membrana (167, 171, 175). Prema podacima iz literature, za ekstrakciju DNK iz FFPE uzoraka najčešće se i koriste kompleti na bazi siliko-membrana (171,176).

U našoj studiji smo poredili količinu i kvalitet ekstrahovane DNK pomoću dva komercijalna kita na bazi siliko-membrana sa istim protokolom deparafinizacije. Koncentracija DNK je bila statistički značajno veća nakon izolacije sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-om u poređenju sa koncentracijom

DNK nakon ekstrakcije sa QIAamp DNA Mini Kit-om. Rezultati drugih studija su pokazale da je prinos DNK pri upotrebi QIAamp DNA FFPE Tissue Kit promjenjiv u poređenju sa drugim metodama ekstrakcije. Alvarez-Aldana i autori (167) su poredeći više metoda za ekstrakciju DNK, između ostalog poredeći i izolaciju sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit i QIAamp DNA mini Kit dobili manje količine DNK nakon izolacije sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit poredeći sa QIAamp DNA mini Kit. Slične rezultate dobili su i drugi istraživači poredeći QIAamp DNA FFPE Tissue Kit sa drugim komercijalnim kitovima i metodama pri čemu su dobili manji prinos DNK nakon izolacije sa QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-om (171,175).

U pogledu kvaliteta izdvojene DNK, statistički značajno manja kontaminacija solima na bazi parafina utvrđena je korišćenjem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-a, dok kontaminacija sa proteinima nije pokazana bez obzira na primenjen test za DNK ekstrakciju. Slični rezultati su dobijeni i u drugim studijama koje su upoređivale QIAamp DNA FFPE Tissue Kit sa drugim metodama ekstrakcije i pokazale da se primjenom ovog seta reagenasa dobije DNK boljeg kvaliteta (167, 175, 177).

Najčešće korištena metoda za provjeru integriteta i očuvanosti izolovane DNK je umnožavanje humanog beta-aktin gena (168). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je fragment beta-aktin gena dužine 360 bp umnožen kod malog broja uzoraka kod kojih je DNK izolovana QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-om. Nam i saradnici (178) su integritet izolovane DNK kod 30 uzoraka ispitivali umnožavanjem GAPDH (engl. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) gena (veličina produkta 60 bp), beta-aktin gena (148 bp) i hGH (engl. *human growth hormone*) (434 bp) koji su amplifikovani PCR metodom. Svi uzorci DNK su bili pozitivni na GAPDH (60 bp) i beta-aktin gen (148 bp), dok je hGH (434 bp) umnožen kod samo 7 uzoraka (178). Guyard i saradnici (179) su takođe u svom radu došli do rezultata da je stopa amplifikacije DNK veća ukoliko se umnožavaju kraći fragmenti (fragment veličine 75 bp u odnosu na fragmente veličine 150 ili 300 bp). Vitošević i saradnici (180) su analizirali DNK izolovanu iz FFPE tkiva koja su bila stara 30 godina. Umnožavali su fragmente veličina 407 bp, 262 bp i 150 bp. Amplikone od 407 bp nisu mogli umnožiti niti u jednom uzorku, a fragmenti veličina 262 bp i 150 bp su bili umnoženi kod uzoraka starih do 11 godina. Fragment veličine 150 bp je bio umnožen i kod uzoraka skladištenih 30 godina. Dokazano je da se stopa umnožavanja povećava nakon amplifikacije fragmenata humanog beta aktina dužine manje od 270 bp. Podaci iz literature pokazuju da je fragmentacija DNK razlog niske stope amplifikacije. Unakrsne veze (engl. cross-links) između proteina, te između proteina i nukleinske kiseline kao i hemijske modifikacije mogu dovesti do degradacije DNK (22, 168). Niska stopa uzoraka sa amplifikovanim humanim beta-aktinom u našoj studiji je vjerovatno posljedica veličine umnožavanog fragmenta (360 bp). Kvalitetna DNK važna je u molekularnoj dijagnostici, posebno za uzorke karcinoma. Obzirom da se nukleinske kiseline oštećuju u toku pripreme, može se javiti neuspjeh u toku rada i dobiti različiti rezultati. Da bi se izbjegli ovi nedostaci ukazano je da bi trebalo standardizovati metod fiksacije i skladištenja tkiva kako bi se poboljšao kvalitet molekularne dijagnostike (178). Neki autori preporučuju da se FFPE tkiva čuvaju na temperaturi +4°C ili da se koriste vakuumi za čuvanje ove vrste uzoraka u cilju dobijanja korisnih rezultata nakon molekularnih analiza (181, 182).

Uloga HPV u nastanku anogenitalnih karcinoma je utvrđena kroz brojne studije, međutim, uloga ovoga virusa u nastanku HNSCC nije još u potpunosti razjašnjena (183). Molekularne metode predstavljaju zlatni standard za dokazivanje HPV DNK u humanim uzorcima. Danas su u primjeni različite tehnike koje se koriste za utvrđivanje prisustva HPV, kao što su PCR metode (klasični, nested, Real-time PCR), in situ hibridizacija, imunohistohemijske metode sa anti-E6 i anti-E7 antitijelima i DNK/RNK mikroerej testovi (engl. Microarray) (184, 185). U najvećem broju istraživanja koriste se PCR metode za dokazivanje HPV DNK. Karakteristike PCR metoda su visoka senzitivnost, dostupnost i radi se o metodama koje su lako izvodljive. Prednost PCR je i to što se teorijski jedna kopija HPV DNK može detektovati u FFPE i svježim uzorcima (184). Međutim, klasični PCR ima svoje nedostatke: niska specifičnost, nemogućnost razlikovanja epizomalne od



integrisane DNK, te nemogućnost otkrivanja transkripcijske aktivnosti virusa (184). Real-time PCR ima visoku senzitivnost i specifičnost, ali kao i PCR ne daje podatak o tome da li je virusna DNK integrisana, a mogući su i lažno pozitivni i lažno negativni rezultati (184).

Učestalost HPV u HNSCC tkivima varira od 0% do 70% (186-190). Ovakva varijabilnost u detekciji može da se objasni anatomskom lokalizacijom uzoraka u kojima se detektuje HPV, vrstom uzoraka (FFPE uzorci, svježa tkiva, brisevi, i dr.), ali i različitim metodama koje se koriste za detekciju HPV (PCR, Real-time PCR, *in situ* hibridizacija, microarray, i dr.) (2, 191, 192). Pored toga, nekoliko studija je pokazalo da geografsko podneblje takođe utiče na varijabilnost u detekciji HPV (1, 186, 188-190). Do sada u Republici Srpskoj nije ispitivana učestalost HPV kod pacijenata kojima su dijagnostikovani karcinomi glave i vrata.

U ovom istraživanju za detekciju HPV u FFPE uzorcima korištene su klasična (engl. single) PCR metoda, PCR u dva kruga (engl. nested) i Real-time PCR metoda. HPV DNK nije umnožena niti u jednom uzorku nakon klasične PCR metode primjenom dva različita kompleta prajmera, MY09/MY11 i GP5+/GP6+ kojim su umnožavani fragmenti dužina 450bp i 150bp HPV L1 gena. Dobijeni rezultati su slični rezultatima drugih autora. Pa tako, Daigrepoint i saradnici (193) nisu detektovali HPV DNK u FFPE uzorcima primjenom MY09/MY11 kompleta prajmera. Rivero i autori (194) takođe nisu detektovali HPV DNK u FFPE tkivima umnožavanjem L1 gena korištenjem klasične PCR metode uz primenu GP5+/GP6+ para prajmera. Smatra se da je osnovni problem u detekciji HPV u FFPE uzorcima dužina fragmenata koji se umnožavaju tokom PCR metode usled fragmentacije DNK molekula, kao i prisustva formalinskih unakrsnih veza (168, 193, 195). Kocjan i saradnici (168) preporučuju produženu inkubaciju u toku DNK izolacije kako bi se uklonile formalinske unakrsne veze i tako povećala mogućnost amplifikacije fragmenata dužih od 250 bp. Takođe, autori sugerišu da umnožavanje fragmenata kraćih od 270 bp HPV genoma povećava osjetljivost PCR metode, kao i da je to dužina fragmenata koja je najpoželjnija za FFPE tkiva (168). Steinau i saradnici (195) smatraju da dužina amplifikovanog fragmenta 450 bp predstavlja granicu amplifikacije DNK iz FFPE uzoraka.

Da bi povećali osjetljivost HPV detekcije u FFPE uzorcima karcinoma glave i vrata, urađena je nested PCR metoda sa MY09/11 prajmerima za prvi krug umnožavanja, te GP5 + / GP6 + prajmera za drugi krug reakcije. Primjenom ove metode dokazano je prisustvo HPV sa učestalosti od 22% (11/50 FFPE tkiva). Ovakva učestalost HPV u FFPE uzorcima je slična rezultatima drugih studija koje su istraživale zastupljenost HPV u FFPE tkivima HNSCC (135, 196, 197). Jalouli i saradnici (135) su svojoj studiji koristili dve PCR metode, klasični i nested PCR i za amplifikaciju HPV DNK za dva kruga su koristili iste setove prajmera koje smo koristili u našoj studiji. Učestalost HPV DNK u ovoj studiji je bila 32% primjenom nested PCR metode. Veća učestalost HPV DNK u odnosu na naše rezultate se može objasniti anatomskom lokalizacijom jer su Jalouli i saradnici (135) ispitivali karcinome samo orofaringealne regije. S druge strane, Erhart i saradnici (196) takođe nisu dokazali HPV DNK korišćenjem klasičnog PCR sa MY09/11 parom prajmera, ali su dokazali učestalost od 17% primjenom nested PCR metode uz korišćenje drugačijeg seta prajmera (PGMY09/11 i GP5 + / GP6 + set prajmera).

Pokazano je da je PCR u realnom vremenu, metod sa većom osjetljivošću od klasičnog PCR u dokazivanju i genotipizaciji HPV, jer je potvrđeno da se može otkriti virusna DNK i pri niskom prinosu HPV DNK od 10ng (198, 199). Nekoliko studija je pokazalo da je ova metoda veoma korisna u detekciji HPV-a u FFPE uzorcima tkiva HNSCC. Autori ovih studija sugerišu da je veća efikasnost PCR-a u realnom vremenu u detekciji HPV-a u uzorcima FFPE tkiva zasnovana na amplifikaciji kratkih fragmenata DNK (175, 198).

U ovoj studiji nismo otkrili prisustvo HPV DNK u FFPE i svježim uzorcima karcinoma glave i vrata koristeći PCR metod u realnom vremenu. Međutim, svi uzorci sa ekstrahovanom DNK bili su

pozitivni na internu kontrolu (gen za humani beta-globin). Ovo zapažanje isključuje mogućnost inhibicije PCR-a i odsustva ekstrahovane DNK. Odsustvo amplifikacije HPV DNK metodom PCR u realnom vremenu u našoj studiji može se objasniti time da je granica detekcije u korištenom komercijalnom testu 1 000 kopija/ml.

Prema nalazima nekih istraživača kod FFPE blokova koji se duže vremena čuvaju dolazi do fragmentacije nukleinske kiseline što utiče i na efikasnost molekularnih tehnika (168). Iako je pokazano da starost FFPE uzoraka utiče na detekciju DNK, analizirajući FFPE uzorke koji su uključeni u ovu doktorsku disertaciju pokazano je da je HPV DNK dokazan u 1 uzorku iz 2014. godine i u ukupno 10 uzoraka iz 2015. i 2016. godine što se nije pokazalo statistički značajnim.

Poređenjem uspješnosti dokazivanja HPV DNK u FFPE i svježim HNSCC uzorcima različitih molekularnih tehnika koje su korišćene u ovoj studiji, dobijena je visoko statistički značajna razlika primjene nested PCR metode u odnosu na klasičnu PCR i Real-time PCR metodu. Ovi rezultati su u skladu sa drugim studijama koje su poredile primjenu različitih PCR metoda u detekciji HPV DNK (133, 196, 197). Autori ovih studija ukazuju da je nested PCR najpogodnija metoda za dokazivanje HPV DNK u HNSCC uzorcima, posebno FFPE uzorcima u okviru retrospektivnih studija. Pojedini istraživači kao što su Tawe i saradnici (200) predlažu da se u cilju povećane osjetljivosti koristi dvostruka-nested PCR metoda. Naime, u svom radu su pokazali značajni porast detekcije HPV DNK primjenom ove metode u odnosu na klasični i nested PCR, gde je HPV stopa pozitivnosti u biopstatima karcinoma grlića materice bila 3% ako se koristi klasični PCR, 55,2% korišćenjem nested PCR metode i 96,3% korišćenjem dvostruke-nested PCR. Za smanjenje rizika od kontaminacije, autori preporučuju da se priprema uzoraka i smjese za reakciju umnožavanja radi u posebnim odjeljcima (200).

Za evropske zemlje je procijenjeno da je prevalenca HPV u karcinomima glave i vrata približno 41% (191). Istraživanje ove doktorske disertacije je pokazalo prisustvo HPV u 27% HNSCC FFPE i svježih uzoraka tkiva. Napomenuto je da varijabilnost u detekciji HPV u biološkom materijalu HNSCC zavisi od vrste uzoraka (bris, FFPE, svježe tkivo, ispirak usne šupljine) i dužine čuvanja uzoraka, metoda koja se koristi za dokazivanje DNK virusa u uzorku pacijenta, geografskog područja i lokalizacije karcinoma. U okviru ove studije, nije uočena značajna razlika u detekciji HPV u dvije vrste uzoraka (FFPE uzorci i svježa tkiva), kao i dužini čuvanja FFPE uzoraka. Iako je kvantitet i kvalitet DNK u svježim tkivima bio bolji u odnosu na FFPE uzorke zbog fiksiranja i arhiviranja istih, FFPE uzorci imaju i svoje prednosti. Naime, kod FFPE uzoraka očuvana je ćelijska morfologija, ova tkiva su lako dostupna i mogu se čuvati na sobnoj temperaturi, te su često pogodna za retrospektivne studije (201).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je HPV infekcija češća kod muških ispitanika sa HNSCC (23 muških ispitanika na prema 4 ženska ispitanika) sa visokom statističkom značajnošću. Naši rezultati su u skladu sa podacima iz literature (202, 203, 204, 205). Demografske karakteristike pacijenata, kao i promjene u seksualnim navikama povećavaju rizik od HPV infekcije u gornjim partijama respiratornog sistema (202). Iako je prevalenca HPV infekcije u regiji glave i vrata niža od prevalencije HPV infekcije u genitalnog traktu smatra se da je rizik za prenos obe povezan sa seksualnim navikama populacije (203). Opisano je da su muškarci 2 do 3 puta pod većim rizikom da dobiju oralnu HPV infekciju (204, 205).

Iako je poznato da se HNSCC češće dijagnostikuje kod muškaraca, treba napomenuti da se prema podacima iz literature u novije vreme povećava učestalost HPV u karcinomima glave i vrata kod žena (206, 207). Castellsagué i saradnici (207) su u svom radu utvrdili veću učestalost HPV kod žena sa orofaringealnom karcinomom u Evropi, te kod žena sa laringealnim karcinomom u Centralnoj i Južnoj Americi.

Učestalost HPV u HNSCC varira i u odnosu na geografsko područje. Karcinomi usne duplje koji su HPV pozitivni su najučestaliji u Aziji, HPV pozitivni orofaringealni karcinomi u Sjevernoj Americi, dok su karcinomi larinksa sa HPV infekcijom najučestaliji u Centralnoj/Južnoj Americi. Ove razlike su vjerovatno rezultat različitih društveno-ekonomskih aktivnosti kod ljudi u različitim dijelovima svijeta (2).

Podaci o učestalosti HPV pozitivnih HNSCC u odnosu na starost pacijenata su veoma varijabilni. Rezultati pojedinih studija pokazuju veću učestalost HPV kod mlađih pacijenata (208, 209). Kod 70% pacijenata ove studije čiji su uzorci HNSCC bili HPV pozitivni pripadali su starosnoj grupi 50-69 godina života. Takve rezultate dobili su i Lindel i saradnici (210) koji su takođe pokazali da se HPV pozitivni karcinomi češće javljaju kod starijih pacijenata. Hosseini i saradnici (211) su u svom istraživanju ispitujući učestalost HPV dokazali pozitivnost u 28% slučajeva (14/50), pri čemu je virus bio češći kod muškaraca koji su imali preko 50 godina života što je u skladu i sa našim rezultatima. Smatra se da prevalenca HPV infekcije u HNSCC ima bimodalnu distribuciju sa najvećim pikom kod muškaraca i žena u dobi 55-64 godine života, dok drugi manji pik pokazuje kod mlađih osoba dobi 30-34 godine (204, 205).

Veći broj studija je pokazao da pušenje cigareta povećava rizik od oralne HPV infekcije (212, 213). Međutim, noviji podaci iz literature navode da se broj HNSCC koji se dovode u vezu sa konzumacijom alkohola i duvana opada zbog opadanja trenda upotreba ovih faktora rizika (28). Iako je približno polovina pacijenata ove studije čiji su tumori bili HPV pozitivni u anamnezi naveli da koriste duvan, nije postojala statistički značajna razlike u detekciji HPV između pacijenata koji puše i onih koji ne puše duvan. Ovakvi rezultati su u skladu sa epidemiološkim podacima studije Sturgis i saradnika (28).

Postoji nekoliko studija koje povezuju konzumaciju alkohola i postojanje HPV infekcije (214, 215). Istraživanje Oh i saradnika (216) je pokazalo da konzumacija alkohola, kao i učestalost konzumacije značajno doprinosi trajanju infekcije visoko onkogenim HPV tipovima. Schabath i saradnici (217) su takođe pokazali da je visok unos alkohola povezan sa prezistentnom HPV infekcijom. Naime, konzumacija alkohola je snažan imunomodulator koji dovodi do imunološkog nedostatka i povećanje osjetljivosti na razne hronične i zarazne bolesti (217). Kumar i saradnici (218) su analizirajući pacijente sa karcinomom glave i vrata uočili značajnu povezanost infekcije sa visokorizičnim HPV tipovima i konzumacije alkohola. Rezultati ove studije nisu pokazali ovu povezanost, jer je kod ispitanika kojima je potvrđena HPV infekcija bilo više onih koji su anamnestički negirali konzumaciju alkohola sa statistički značajnom razlikom u odnosu na one koji su konzumirali alkohol. Ovakvi rezultati se mogu objasniti manjim brojem ispitanika, kao i mogućnosti da dolazi do opadanja trenda upotrebe alkohola u našoj populaciji.

Pokazano je da anatomska lokalizacija karcinoma glave i vrata značajno utiče na učestalost dokazivanja HPV infekcije. Pa tako, podaci iz literature pokazuju da je HPV najzastupljeniji u karcinomima orofarinksa (36%), zatim u karcinomima usne duplje (23,5-33,7%), dok je u laringealnim karcinomima prevalenca HPV oko 24% (219, 220). Prema podacima koji su dobijeni uvidom u pregledni članak Saulle i saradnika (221), najveća povezanost je pronađena između HPV i karcinoma tonzila i farinksa. Smatra se da se HPV lakše vezuje za kriptu orofaringealnog limfnog tkiva (222), te se zbog pojačane ekspresije transmembranskog proteina označenog kao ligand programirane smrti 1 (enlg. *Programmed death-ligand 1* - PD-L1) u kriptama tonzila javlja smanjeni odgovor citotoksičnih T limfocita što doprinosi održavanju virusa u ćeliji (223).

U okviru ovoga istraživanja, najveća učestalost HPV DNK je dokazana u karcinomima larinksa (77,8%) sa visoko statistički značajnom razlikom u odnosu na druge lokalizacije karcinoma glave i vrata. Ovako visoki procenat HPV pozitivnosti u karcinomima larinksa je pre svega posljedica toga, da je u našoj studiji ukupno bilo najviše pacijenata sa karcinomima larinksa. U našoj studiji

zabilježena HPV učestalost od 33,4% kod pacijenata kojima je dijagnostikovano karcinom larinksa. Rezultate slične ovoj studiji su pokazali Polz-Gruszka i autori (224) koji su u svojoj studiji analizirali 50 uzoraka pacijenata sa dijagnozom karcinoma larinksa i 30 uzoraka pacijenata sa dijagnozom karcinoma farinksa, HPV DNK su češće dokazali kod ispitanika sa dijagnozom karcinoma larinksa u odnosu na karcinom farinksa (36% na prema 26,6%).

Karcinomi larinksa čine ukupno 30-40% maligniteta glave i vrata (225). Poznato je da nisko onkogeni HPV tipovi uzrokuju rekurentnu laringealnu papilomatozu. Saznanja o ulozi HPV u nastanku karcinoma larinksa još uvijek su nejasna. Iako postoji potreba za dodatnim studijama, rezultati nekih istraživača ukazuju (226, 227) na značaj visoko onkogenih HPV tipova (prvenstveno HPV 16) u laringealnoj karcinogenezi. Takođe treba napomenuti da su Orita i saradnici (228) u svojoj studiji pokazali da postoji povezanost između HPV infekcije i laringealnog karcinoma i to kod pacijenata mlađih od 60 godina. Prevalenca HPV u karcinomima larinksa prema podacima nekoliko studija je u opsegu 3-85% (229, 230, 231, 232, 233). Meta-analiza koja je obuhvatila 179 studija od 1964. do 2015. godine je pokazala da je učestalost HPV (uglavnom HPV 16) u karcinomu larinksa 25% pri čemu su uočene razlike u učestalosti HPV u odnosu na geografsku regiju (229). Slične rezultate su dobili Li i saradnici (230) koji su u svojoj meta analizi prikazali da je učestalost HPV u skvamocelularnom karcinomu larinksa 28%. Zhang i saradnici (231) su objavili da je učestalost HPV u laringealnim karcinomima veća kod Kineza u odnosu na stanovništvo evropskih zemalja i Sjeverne Amerike. S druge strane, Celebi i saradnici (234) u svojoj studiji na uzorku od 82 karcinoma larinksa nisu utvrdili HPV infekciju. Za detekciju HPV koristili su metodu hromogene *in situ* hibridizacije. Ove razlike u nalazima mogu biti posljedica geografske rasprostranjenosti ispitivane populacije, kvaliteta testiranih uzoraka, te specifičnosti i osjetljivosti primjenjene metode. Takođe, različiti rezultati mogu biti posljedica nejasnog mehanizma karcinoma larinksa uzrokovanog HPV infekcijom.

U našem istraživanju većina HNSCC lezija pozitivnih na HPV je bila srednje diferentovana (G2). Ovakav rezultat je zapažen i u radu Polz-Gruszka i autora (32), a slične rezultate objavili su i Hosseini i saradnici (211). Pojedine studije ukazuju da HPV infekcija može uticati i na kliničke manifestacije karcinoma glave i vrata. Smatra se da HPV pozitivni tumori jesu manjih dimenzija (T), ali ih karakteriše veći broj zahvaćenih limfnih čvorova i prisustvo udaljenih metastaza. Istraživanja su pokazala da prisustvo uvećanih limfnih čvorova na vratu koji su vezani za okultne primarne tumore ukazuje na karcinome koji su HPV pozitivni. Smatra se da jedna četvrtina tumora sa ovakvom kliničkom manifestacijom pripada karcinomima orofarinksa (235). Prema navodima iz literature u većini slučajeva HPV posredovani HNSCC (karcinomi orofarinksa) se dijagnostikuju kada je više metastaza prisutno u ipsilateralnom limfnom čvoru, a koje su veće od 3cm a manje od 6 cm (N2b) i IV stadijumu bolesti (236). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je najveći broj HPV pozitivnih karcinoma bio prisutan kod pacijenata bez širenja bolesti u regionalne limfne čvorove i udaljene organe. Rezultati meta analize (220) pokazuju veću zastupljenost HPV infekcije kod pacijenata koji su u III i IV stadijumu bolesti. Međutim, Campisi i saradnici (237) su analizirajući učestalost HPV infekcije u uzorcima oralnog skvamocelularnog karcinoma pokazali veću učestalost HPV kod pacijenata koji su bili u II stadijumu bolest, pri čemu su našli povezanost veličine tumora-T2 sa HPV infekcijom. S druge strane, pilot studija Vanshika i saradnika (238) je pokazala da nema povezanosti prisustva HPV infekcije i stadijuma bolesti.

Visoko onkogeni HPV tipovi koji se najčešće dovode u vezu sa nastankom HNSCC su HPV 16 i 18, i to prvenstveno tip 16 (239). Pored toga, pokazano je da se u tkivima karcinoma glave i vrata dokazuju i nisko rizični HPV genotipovi, ali značajno rijede u odnosu na visoko rizične tipove (240). To je pokazano i u našem istraživanju gde je kod većine HNSCC HPV pozitivnih uzoraka dokazano prisustvo visoko onkogenih HPV tipova, dok je kod manjeg broja pacijenata dokazano prisustvo nisko onkogenih HPV tipova (84% vs. 16%).

Sveobuhvatnom PCR analizom koja je rađena u sklopu ove disertacije, utvrđena je veća učestalost visoko onkogenih HPV tipova, pri čemu je najčešći bio HPV 16, a zatim tip 18. Prema objavama IARC-a, HPV 16 je važan faktor u nastanku karcinoma usne duplje i orofarinksa, dok još uvijek postoje oprečna mišljenja u ulozi HPV 16 u razvoju karcinoma larinksa (145). Genotipizacija HPV u tkivima karcinoma orofarinksa odnosno larinksa u Sloveniji je takođe pokazala najveću učestalost tipa 16 (241, 242). S druge strane, Al-Thawadi i saradnici (158) su u svojoj studiji ispitivali prisustvo HPV u uzorcima bosanskih pacijenata kojima je dijagnostikovano HNSCC. Od 123 uzorka (karcinomi usne duplje, orofarinksa i larinksa), HPV je identifikovan kod 49 uzoraka, pri čemu je najčešći bio HPV 18. U drugim studijama, pored HPV 16 i 18 u tkivima karcinoma glave i vrata dokazivani su i drugi visoko rizični tipovi, kao što su genotipovi 30, 31, 33, 35, 45, 56, 58, 59, 66 (16, 158, 241, 242, 243). U okviru ovoga istraživanja, je pored tipova 16 i 18, dokazan i tip 66. U najvećem broju studija najveću učestalost ima tip 16, ipak u pojedinim studijama su dokazani drugi HPV genotipovi sa najvećom učestalošću. Pa tako, Gupta i saradnici (243) su analizirali uzorke karcinoma glave i vrata i pokazali prisustvo većeg broja visoko rizičnih tipova, pri čemu je najčešći bio HPV tip 33, a Vazquez-Guillen i saradnici (233) su dokazali najveću učestalost tipa 52. Epidemiološki podaci su potvrdili prisustvo i nisko rizičnih tipova u HNSCC, pre svega HPV 6 i HPV 11 (193). U skladu sa ovim podacima i u našoj studiji je dokazano prisustvo nisko onkogenih tipova u malom procentu, sa podjednakom učestalošću HPV tipova 6 i 83.

U našem istraživanju nismo uočili statistički značajnu razliku u učestalošću visoko onkogenih i nisko onkogenih HPV genotipova u odnosu na pol, starost pacijenata i bihevioralne karakteristike pacijenata (pušenje i konzumacija alkohola). Smatra se da uzrast i intenzivna konzumacija cigareta predstavljaju prediktor oralne infekcije visoko rizičnim HPV genotipovima (244). Orosco i autori (245) su u svom radu utvrdili da je veća vjerovatnoća infekcije sa visoko rizičnim genotipovima kod muškaraca.

Iako su visoko onkogeni HPV genotipovi bili češći kod pacijenata sa lezijama patohistološkog gradusa 2, te kod pacijenata koji su bili u III odnosno IV stadijumom bolesti, nije pokazana statistički značajna razlika u odnosu na nisko onkogene tipove. Al-Thawadi i saradnici (158) su pokazali da je prisustvo visoko rizičnog HPV povezana sa slabo diferentovanim karcinomom te sa stadijumom tumora. Razlika u odnosu na rezultate ove studije se može objasniti malim brojem pacijenata kojima je određen HPV genotip.

U okviru ove doktorske disertacije utvrdili smo prisustvo infekcije sa pojedinačnim HPV genotipovima uzorcima HNSCC, ali ne i istovremene infekcije sa više različitih HPV genotipova. Tong i saradnici su u svom istraživanju kod pacijenata sa laringealnim karcinomom u uzorcima utvrdili prisustvo mješane HPV infekcije. Naime prema nalazu ovih autora pacijenti sa pojedinačnim HPV infekcijama imaju bolju prognozu u odnosu na pacijente sa mješanim HPV infekcijama (246). Treba napomenuti da su analize pokazale da HPV u skvamocelularnom karcinomu larinksa, odnosno u HNSCC povećava osjetljivost tumora na radioterapiju te je i prognoza za preživljavanje kod tih pacijenata bolja (246).

Posljednjih godina, incidenca HNSCC se povećava te se smatra da će učestalost HPV pozitivnih HNSCC nadmašiti učestalost HPV pozitivnih karcinoma grlića materice (247). Zbog ove pretpostavke treba razmotriti mogućnost uvođenja HPV testiranja kliničkih uzoraka kod pacijenata kojima je dijagnostikovano HNSCC, obzirom da HPV DNK predstavlja značajan biomarker koji može ukazati na izbor terapije i ishod liječenja a time i na preživljavanje pacijenata. Grupa američkih patologa je predložila da HPV testiranje bude uvršteno u standardnu proceduru patohistološke analize orofaringealnih karcinoma (248).

Infekcija EBV je česta među stanovništvom, te se smatra da je prevalenca ove infekcije u svijetu oko 90%. Obzirom na način prenosa EBV u opštoj populaciji, infekcija se najčešće stiče u dječijem

uzrastu. Poznato je da herpesvirusi uzrokuju latentne infekcije kod ljudi, te da ostaju doživotno u organizmu domaćina. Nakon akutne infekcije, EBV se doživotno i stabilno održava u ćelijama domaćina (249). Nekoliko studija je otkrilo prisustvo EBV u tumorima pločastih epitelnih ćelija glave i vrata što ukazuje na njegovu moguću ulogu u razvoju HNSCC (250-252). Došlo se do otkrića da rani proteini virusa EBNA-1 i LMP-1 mogu pojačati invaziju tumorskih ćelija indukujući prelazak epitela u mezenhim (243).

Rezultati istraživanja udruženosti EBV i karcinoma glave i vrata su pokazali EBV pozitivnost čak do 92% slučajeva ovih karcinoma, sa značajnim razlikama među državama, što se objašnjava etničkim razlikama kao i razlikama u anatomskoj lokalizaciji tumora i metodologiji detekcije (253). Pored toga, Jalouli i saradnici (18) su u svom radu pokazali da i stepen razvijenosti zemlje može uticati na učestalost EBV infekcije u karcinomima glave i vrata. Naime, pomenuti autori su pokazali veću zastupljenost EBV infekcije u industrijskim zemljama u poređenju sa zemljama koje su u razvoju.

Veći broj studija je pokazao da je EBV infekcija znatno češća u zemljama Azije. Naime, poznato je da EBV infekcija doprinosi razvoju nazofaringealnog karcinoma kod ljudi. Najveća incidenca ovog karcinoma je u južnoj Kini i jugoistočnoj Aziji, sjevernoj Africi i Mediteranskoj regiji, dok je stopa oboljevanja stanovništva u zapadnim zemljama niža od stope oboljevanja u endemskim zemljama (254, 255). Pa tako, istraživanje Deng i saradnika (253) je pokazalo da je EBV infekcija kod Japanaca skoro 70%. Relativno visoka učestalost EBV infekcije prikazana je i u radu Gupta i saradnika koji su detektovali EBV kod 51,2% sirijskih pacijenata (243). Visoka učestalost nazofaringealnog karcinoma povezanog sa EBV infekcijom kod azijske populacije sugerise da je imunološki odgovor na EBV infekciju genetski determinisan (256).

U našem istraživanju učestalost EBV u HNSCC je bila 20%. Za razliku od HPV infekcije, EBV je statistički značajno više detektovan u svježim tkivima HNSCC u odnosu na FFPE uzorke, što se može objasniti pre svega količinom virusne nukleinske kiseline koja perzistira u inficiranim ćelijama koja je najčešće u epizomalnom obliku, za razliku od HPV DNK koja je najčešće u ćelijama karcinoma integrisana u genom inficirane ćelije. Naši rezultati učestalosti EBV u HNSCC su slični rezultatima koje su dobili Karbalaie Niya i saradnici koji su umnožavanjem EBNA-3C gena u FFPE uzorcima karcinoma glave i vrata utvrdili učestalost EBV od 12,8% kod iranskih pacijenata (257). Carpén i autori (258) su analizirajući uzorke finskih pacijenata sa karcinomom orofarinksa, EBV detektovali u 20,3% uzoraka. Autori iz regiona, Banko i saradnici (259) su prikazali visoku učestalost EBV u nazofaringealnom karcinomu kod ispitanika u Republici Srbiji (93,75%). Razlika u EBV učestalosti naših rezultata u odnosu na navedene rezultate se može objasniti različitim anatomskim lokalizacijama karcinoma, broju ispitivanih uzoraka, kao i primijenjenoj metodologiji za dokazivanje EBV DNK.

Na osnovu nukleotidne sekvence EBV genoma, utvrđeno je postojanje dva genotipa ovog virusa, EBV-1 i EBV-2. Molekularno-genetičke studije su pokazale da je u svetu značajno češći EBV-1, pri čemu je najzastupljeniji u Evropi i Aziji, dok je EBV-2 dominantan u Africi. Analiza zastupljenosti EBV genotipova u karcinomima glave i vrata je utvrdila da je EBV-1 dominantniji (253). Podatak o tome da je EBV-1 zastupljeniji u svijetu kao i to da je češći u HNSCC je u skladu i sa dobijenim rezultatima naše studije u kojoj je EBV-1 dokazan u 93,75%, dok je EBV 2 prisutan u 6,25% EBV pozitivnih HNSCC uzoraka.

U odnosu na pol, EBV infekcija je bila statistički značajno više zastupljena u tkivima karcinoma glave i vrata muških ispitanika naše studije, što je slično rezultatima drugih studija (19, 224, 253). Ovo se objašnjava prije svega većom učestalosti karcinoma ove regije kod muškaraca. Pored toga, kod pacijenata našeg istraživanja, EBV infekcija je u većini slučajeva utvrđena kod pacijenata dobi 50-69 godina života. Naš rezultat je u skladu sa rezultatom Polz-Gruszka i saradnika (260) koji su takođe u

većini slučajeva EBV detektovali kod pacijenata starosne grupe 50-69 godina, kao i u skladu sa rezultatima drugih autora (19, 224, 253).

Autori nekoliko studija ukazali su na povezanost duvana i EBV infekcije kroz epidemiološka istraživanja, te smatraju da duvan može igrati ulogu u karcinogenezi HNSCC (karcinom nazofarinksa) izazivajući reaktivaciju EBV (261-264). U kineskoj studiji (261) *in vitro* se pokazalo da ekstrakt dima cigareta podstiče replikaciju EBV u ćelijama te pojačava ekspresiju transkripcijskih faktora ovoga virusa. Ukazuje se da duvan može indukovati česte reaktivacije EBV što dovodi do nestabilnosti genoma i omogućava razvoj karcinoma glave i vrata (262). U najvećem broju studija, iako se EBV pozitivnost češće dokazuje kod pušača nije pokazana statistički značajna razlika u EBV pozitivnosti između pušača i nepušača (28, 253, 263, 264). U našem istraživanju, broj pušača i nepušača je bio približno isti i nije utvrđena povezanost EBV infekcije i konzumacije duvana u ispitivanoj populaciji.

U pojedinim studijama, pokazano je da se EBV pozitivnost češće javlja kod HNSCC pacijenata koji konzumiraju alkohol, ali bez statistički značajne razlike (28, 265). Ovo je u skladu sa rezultatima ove studije, gde nije uočena statistički značajna razlika između EBV pozitivnih i EBV negativnih uzoraka u odnosu na konzumaciju alkohola, sa razlikom u tome što je kod naših ispitanika EBV infekcija je bila statistički značajno češća kod pacijenata koji su anamnestički negirali konzumaciju alkohola.

U odnosu na anatomsku lokalizaciju HNSCC, stopa detekcije EBV infekcije je veoma varijabilna. Pa tako, Drop i saradnici (266) su ispitujući prisustvo infekcija onkogenim virusima u HNSCC u svom radu utvrdili da je EBV infekcija bila najčešća u karcinomima orofarinksa. Broccolo i saradnici (267) su u svojoj studiji ispitivali prisustvo EBV u karcinomima usne duplje i orofarinksa i utvrdili veću zastupljenost EBV u karcinomima usne duplje poredeći sa karcinomima orofarinksa. Polz-Gruszka i saradnici (224) su pokazali veću zastupljenost EBV infekcije u karcinomima larinksa u odnosu na karcinome orofaringealne regije, što je u skladu sa rezultatima ove studije gde je EBV infekcija statistički značajno više bila zastupljena u lezijama karcinoma larinksa.

Analizom dobijenih podataka u ovoj studiji, pokazano je da je EBV značajno više dokazan u tkivima HNSCC koji su srednje diferentovani. Postoje razlike u studijama koje su ispitivale korelaciju EBV pozitivnosti i patohistološkog gradusa HNSCC. Rezultati naše studije su u skladu sa rezultatima istraživanja Gupta i saradnika (243) koji su prikazali da je EBV infekcija češća kod pacijenata kojima je patohistološkom analizom utvrđen srednje diferentivani karcinom. Takođe, Polz-Gruszka i saradnici (32) su ispitujući prisustvo EBV u orofaringealnom karcinomu utvrdili da je EBV infekcija bila najčešća u lezijama koje su bile srednje diferentovane. Slične rezultate su pokazali Gonzales-Moles i saradnici koji su u svojoj studiji našli pozitivnu korelaciju između određenih patohistoloških gradusa sa EBV infekcijom, gdje se postotak EBV pozitivnosti povećava sa dobro diferentovanog ka slabo diferentovanom HNSCC (268). S druge strane, Al-Thawadi i saradnici (158) su u svojoj studiji ispitivali prisustvo EBV u uzorcima bosanskih pacijenata kojima je dijagnostikovano HNSCC i nisu našli povezanost EBV pozitivnosti sa patohistološkim gradusom tumora i stadijumom bolesti. U odnosu na stadijum bolesti, u našoj studiji slično prethodno navedenim autorima nije utvrđena povezanost EBV infekcije sa stadijumom bolesti. U skladu sa navedenim su i rezultati studije Vanshika i saradnika (238) u kojoj takođe nije nađena povezanost između EBV infekcije i stadijuma bolesti.

Podaci iz literature o kvantitaciji EBV u tkivima karcinoma glave i vrata su veoma oskudni. Studija Mahalingam i saradnika (269) je pokazala da je količina EBV značajno veća u premalignim lezijama usne duplje, kao i u karcinomima usne duplje u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika, ali bez razlike u količini virusa između premalignih i malignih lezija. Autori ove studije smatraju da je nalaz velike količine EBV u lezijama potvrđuje udruženost ovog virusa sa nastankom oralnih karcinoma.

Broj kopija EBV genoma u oralnim karcinomima je bio u rasponu od 2,8 do  $4,3 \times 10^4$ , a srednja vrijednost je bila 15573 kopija. U okviru ovoga istraživanja, broj detektovanih kopija EBV DNK je varirao u opsegu 1,82-27093,72 sa srednjom vrijednosti 3788,167 kopija. Ovako široki raspon broja kopija EBV genoma u našoj studiji se može objasniti različitim anatomskim lokacijama u poređenju sa navedenom studijom koja je ispitivala samo oralne karcinome.

Slično metodama koje se koriste za dokazivanje HPV DNK, i za dokazivanje EBV infekcije se u različitim studijama koriste metode kao što su *in situ* hibridizacija, PCR, nested PCR, Real-time PCR, pa i mikroerej. U najvećem broju studija korišćen je nested PCR, koji je korišćen i u ovoj studiji. (270). Goldenberg i autori (252) su poredili primenu Real-time PCR metode u odnosu na *in situ* hibridizaciju i pokazali da Real-time ima visoku senzitivnost. U okviru ove studije, primenom Real-time metode je u nekoliko uzoraka potvrđeno prisustvo EBV DNK u kojima ona nije utvrđena nested PCR metodom. Međutim, daleko veća EBV pozitivnost je pokazana primenom nested PCR metodom u odnosu na Real-time PCR, sa visokom statističkom značajnošću.

Infekcija BK i JC poliomavirusima se dešava već u ranom djetinjstvu jer se virusi najčešće šire respiratornim putem (271). Nakon primarne infekcije, BKV se održava u stanju latencije u ćelijama bubrega i gornjim dijelovima urinarnog trakta, dok JC poliomavirus može biti prisutan u B limfocitima i monocitima. Kod 0,5-20% zdravih osoba može doći do reaktivacije poliomavirusa (272). Prema navodima iz literature, BKV je detektovan i u tkivima tumora mozga, neuroblastoma, tumora urinarnog trakta, karcinomima grlića materice, vulve, jezika kao i u Kapoši sarkomu (273). Poznato je da i poliomavirusi imaju onkogeni potencijal za koji je odgovoran glavni onkoprotein poliomavirusa, veliki tumorski antigen (engl. Large T Ag), koji dovodi do deregulacije p53 i Rb proteina (249).

U studiji Polz i autora (274) BKV je dokazan u 18,5% HNSCC, prvenstveno u karcinomima usne duplje. Poluschkin i saradnici (33) su takođe ispitivali učestalost poliomavirusa u karcinomima glave i vrata (karcinomi usne, usne duplje, orofarinksa, nazofarinksa, hipofarinksa i larinksa) i pokazali pokazali nisku zastupljenost BKV u uzorcima HNSCC (1,22%), pri čemu je karcinom usne duplje bio pozitivan na BKV. Rezultati ove studije su pokazali takođe nisku učestalost BKV u karcinomima glave i vrata od 3%, sa razlikom što je BK pozitivnost dokazana u jednom uzorku karcinoma hipofarinksa i 2 uzorka karcinoma larinksa.

Značajno je zapaziti da dosadašnja istraživanja pokazuju da se u karcinomima usne duplje češće dokazuje BKV u odnosu na HNSCC drugih lokalizacija. U studiji Burger-Calderon i saradnika (275) je pokazano da BKV ima sposobnost vezivanja za ćelije pljuvačnih žlijezda. Ovo govori u prilog tome da se BKV kod inficiranih osoba izlučuje pljuvačkom, da je konstantno prisutan u usnoj šupljini te da vremenom može i da dovede do malignih promjena u epitelnim ćelijama oralne sluznice zahvaljujući svom onkogenom potencijalu. Obzirom da BKV može biti prisutan i u pljuvačnim žlijezdama (nalazi se u salivi), pretpostavlja se da pokazuje i tropizam za ćelije pločasto-slojevitog epitela. Takva izloženost ćelija BKV vjerovatno može dovesti do maligne transformacije inficirane ćelije i doprinijeti razvoju karcinoma.

Naše istraživanje je pokazalo da su pacijenti kojima je dokazano prisustvo BKV bili starije životne dobi, te je kod svih patohistološki potvrđen srednje diferentovani karcinom, pri čemu su dva pacijenta bila u IV stadijumu bolesti a jedan pacijent je bio u II stadijumu. Ovakvi rezultati u odnosu na BKV pozitivnost i demografske karakteristike pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma glave i vrata su u skladu i sa rezultatima Polz i autora (274).

Prisustvo JCV poliomavirusa u karcinomima glave i vrata u najvećem broju studija nije dokazano (276, 277), što je u skladu i sa rezultatima ovoga ispitivanja, jer JCV nije dokazan niti u jednom uzorku HNSCC. S druge strane, Poluschkin i autori (33) su otkrili genom JCV u HNSCC, i to kod 17 pacijenata sa karcinomom usne duplje, kod 2 pacijenta sa karcinomima nazofarinksa, 3 pacijenta sa



karcinomom hipofarinksa, i kod 4 pacijenta sa karcinomom larinksa. U radu Hämetoja i saradnika (278) se navodi da je u adenoidnom cističnom karcinomu pljuvačne žlijezde detektovan mali broj kopija JCV. Smatra se da je mehanizam onkogeneze JCV tzv. "hit and run" hipoteza, odnosno da nakon transformacije ćelija delovanjem virusa, proliferacija tumorskih ćelija se nastavlja bez aktivnosti virusa (279).

Značaj koinfekcija još uvek nije razjašnjen. Ukazuje se i na to da istovremeno prisustvo više onkogenih virusa može biti i posledica superinfekcije, odnosno da perzistencija jednog onkogenog virusa, a zatim superinfekcija sa drugim onkogenim virusom podstiče maligni potencijal prvog virusa (260). Pretpostavka je da kod određenog broja pacijenata nakon dugotrajne hronične infekcije onkogeni virusi u sadejstvu mogu dovesti do maligne alteracije ćelija domaćina. Smatra se da se vjerovatnoća pojave malignog tumora povećava nakon dugotrajnog izlaganja organizma većem broju onkogenih virusa (dva ili više) (280).

Prema podacima iz literature evidentno je da istovremeno prisustvo HPV i EBV jeste povezano sa pojačanom invazivnošću ćelija karcinoma zbog interakcije virusnih onkoproteina. Smatra se da HPV onkoproteini E5, E6/E7 i EBV onkoproteini LMP-1 i EBNA-1 saraduju u pokretanju ili progresiji nekoliko vrsta karcinoma kod ljudi. Naime, onkoproteini visokorizičnih HPV tipova, E5 i E6/7 mogu pojačati invaziju ćelija i napredovanje karcinoma indukujući prelazak epitelnih u mezenhimalne ćelije. Drugo, i EBV onkoproteini LMP-1, LMP-2A, EBNA-3C i EBNA-1 mogu dovesti do napredovanja bolesti modulacijom epitela u mezenhim (243).

Studija McCloskey i saradnika (281) je pokazala da HPV onkoproteini E6/E7 stupaju u interakciju sa nukleofosminom, proteinom za povećanje proliferacije i inhibicije diferencijacije ćelija koje eksprimiraju E6/E7. Smatra se da infekcija samo jednom vrstom visoko rizičnog HPV nije dovoljna da pokrene malignu transformaciju. Ćelije zaražene visoko onkogenim HPV ili moraju podnijeti genetsku transformaciju i/ili koinfekciju s drugim onkovirusima za potpunu ćelijsku transformaciju što rezultuje nastankom i razvojem tumora (282). Prema Al Moustafa i saradnicima (97), E6/E7 proteini HPV tipa 16 u sadejstvu sa receptorom tipa 1-tirozin kinaza ErbB-2 izaziva neoplastičnu transformaciju ćelija. Isto tako hipoteza kojom se vode ovi autori jeste da geni EBV (EBER, EBNA1, LMP1, LMP2A, BARF0 i BARF1) sa genima HPV (E6 i E7) dovode do promjena koje vode pojavi karcinoma.

Smatra se i da se produkti gena EBV mogu lučiti u egzosome i da u tom slučaju susjedne ćelije koje su EBV inficirane (engl. *bystander*) mogu uticati na razvoj karcinoma i imunološki odgovor na HPV. Za karcinom grlića materice je pokazano da prisustvo EBV sa HPV 16 povećava vjerovatnoću integracije HPV u genom ćelije domaćina. Ovo pokazuje da prisustvo EBV pojačava nestabilnost HPV inficiranih epitelnih ćelija grlića materice. Kada se govori u ulozi EBV u nastanku HNSCC pokazano je da je u tumorskim ćelijama izražena ekspresija LMP1, a smanjena EBER gena. To govori u prilog tome da EBV ima svoju ulogu u ranoj fazi tumorogeneze (96). Pored toga, Makielski i saradnici (283) u svom radu su u *in vitro* uslovima, na kulturi ćelija otkrili da HPV 18 omogućava održavanje EBV DNK u jednoslojnoj kulturi ćelija, kao i da pospješuje litičku reaktivaciju EBV sa za sada nepoznatim mehanizmom.

Poznato je da BKV posjeduje T antigen koji inaktivira p53 i Rb, te da ima sposobnost da izaziva hromozomske aberacije u humanim ćelijama. Uz HPV infekciju stalna ekspresija T antigena u latentno inficiranim humanim ćelijama svakako može biti razlog hromozomskim oštećenjima koje mogu inicirati ili pospješiti napredovanje malignog procesa kod ljudi. Mali broj virusnih kopija u tumorima kod ljudi može biti posljedica „hit and run“ hipoteze (272). Hromozomske aberacije uzorkovane BKV vode transformaciji i promjeni fenotipa a virusna infekcija može doprinijeti održavanju ovakvog stanja ćelije (272). Određena istraživanja su pokazala da postoji povezanost prisustva BKV i HPV u cervikalnim intraepitelnim (CIN) lezijama visokog gradusa, odnosno da je

veći broj kopija BKV posljedica prisustva HPV (271). Postoje i pretpostavke da orofarinks predstavlja primarno mjesto BKV infekcije (271).

Obzirom da nema mnogo podataka u literaturi koji se odnose na interakciju virusa i njihovu zajedničku ulogu u nastanku HNSCC, u našem istraživanju je ispitivana i učestalost koinfekcije onkogenim virusima. Najznačajniji onkogeni virus koji se dovodi u vezu sa skvamocelularnim karcinomima kod ljudi je HPV (224). U našoj studiji je najčešći bio HPV, zatim EBV dok je BKV utvrđen kod samo 3 uzorka HNSCC. Pojedinačna infekcija nekim od ova tri onkogeni virusa dokazana je kod 26% HNSCC.

Najčešća pojedinačna infekcija kod HNSCC uzoraka koji su analizirani u ovom istraživanju bila je HPV pojedinačna infekcija. Naš rezultat se razlikuje od rezultata Drop i saradnika (266) koji su analizirajući uzorke karcinoma glave i vrata češće detektovali EBV pojedinačnu infekciju u svojoj studiji. Kod naših ispitanika pojedinačna HPV infekcija je bila statistički značajno češća u karcinomima larinksa. Takođe, i EBV pojedinačna infekcija je bila više zastupljena u lezijama karcinoma larinksa ali bez statističke značajnosti. Polz-Gruszka i saradnici (224) su analizirajući prisustvo onkogenih virusa u karcinomima larinksa i orofarinksa takođe češće detektovali HPV i EBV u karcinomima larinksa ali bez statističke značajnosti. U istoj studiji je navedeno da učestalost EBV u oralnim karcinomima zavisi od geografskog područja sa najvećom učestalošću zabilježenom u jugoistočnoj Aziji. Za razliku od našeg rezultata, Drop i autori (266) su utvrdili statistički značajnu razliku u učestalosti pojedinačnih infekcija onkogenim virusima (HPV, EBV, BKV) u odnosu na lokalizaciju. Autori ove studije su utvrdili da je HPV pojedinačna infekcija bila najviše zastupljena u karcinomima usne duplje, EBV pojedinačna infekcija u karcinomima orofarinksa (266). Pojedinačna BKV infekcija je utvrđena kod 1 ispitanika naše studije. U odnosu na HPV i EBV pojedinačnu infekciju, pojedinačna BKV infekcija je statistički značajno imala najmanju učestalost u našoj studiji.

Podaci iz literature koja se odnose na ulogu koinfekcije onkogenim virusim u nastanku karcinoma glave i vrata su veoma oskudni. Učestalost koinfekcija kod naših ispitanika je bila 11% što je manje u odnosu na rezultate koji su dobili Drop i saradnici (266) koji su detektovali kod pacijenata iz Poljske sa oralnim, orofaringealnim karcinomom i karcinomom larinksa koinfekciju onkogenim virusima (HPV, EBV, BKV) u 56,2% slučajeva. Razlog ovome može biti manji broj ispitivanih uzoraka u našem ispitivanju, kao i tip uzoraka, obzirom da su pomenuti autori ispitivali prisustvo onkogenih virusa u svježim uzorcima, dok su u našoj studiji analizirana i svježja tkiva i u većini FFPE uzorci. Koinfekcija HPV/EBV je bila najčešća u našem istraživanju, EBV/BKV koinfekcija nije dokazana niti u jednom uzorku, dok je HPV/BKV dokazana u uzorcima kod 2 pacijenta. Rezultati drugih istraživanja takođe pokazuju da je najčešća koinfekcija onkogenim virusima ona koju izazivaju HPV i EBV (224, 266). Deng i autori (253) su ispitujući prisustvo HPV i EBV u karcinomima glave i vrata utvrdili zastupljenost HPV/EBV koinfekcije kod 21,5% pacijenata.

Jiang i autori (95) su našli da postoji povezanost prisustva koinfekcije HPV/EBV u orofaringealnom karcinomu (tonzile i baza jezika). U radu Drop i saradnika (266), HPV/EBV koinfekcija je bila najčešća u karcinomima usne duplje, dok je HPV/BKV koinfekcija bila češća u karcinomima orofarinksa. Koinfekcije u našoj studiji su bile najčešće u karcinomima larinksa, ali bez statističke značajnosti učestalosti koinfekcija u odnosu na lokalizaciju karcinoma glave i vrata.

Drop i autori (266) u svom radu našli da je HPV/EBV koinfekcija bila češća u karcinomima koji su bili slabo diferentovani kao i u III odnosno IV stadijumu bolesti, te ukazuju na mogućnost da HPV/EBV koinfekcija može da doprinese slaboj diferentovanosti tumorskih ćelija koje rastu i ponašaju se agresivno što vodi lošijoj prognozi bolesti. Rezultati ove doktorske disertacije su delimično u skladu sa navedenim istraživanjem jer je pokazano da je HPV/EBV koinfekcija bila zastupljenija kod srednje diferentovanih karcinoma kod pacijenata sa uznapredovalim stadijumom bolesti.

Smatra se da je stadijum bolesti najznačajniji prognostički faktor kod pacijenata sa HNSCC u momentu postavljanja dijagnoze (284). Pacijenti koji imaju zahvaćene limfne čvorove imaju 50% manju vjerovatnoću petogodišnjeg preživljavanja u odnosu na pacijente sa tumorom koji je primarno ograničen (285). Histološka diferentovanost nije značajan prognostički faktor, ali slabo diferentovani karcinomi češće daju metastaze u limfne čvorove (286). Karcinomi glave i vrata koji su HPV pozitivni klinički su manjeg dijametra (T status) ali imaju veću mogućnost da metastaziraju u limfne čvorove. Pored toga podaci iz literature pokazuju da HPV pozitivni HNSCC imaju bolju prognozu (287) iako se zna da HNSCC koji su HPV pozitivni su često uznapredovali, sa diseminacijom bolesti (96). Na primjeru nazofaringealnog karcinoma takođe je pokazan sinergizam HPV i EBV gdje karcinomi koji su pozitivni na viruse imaju bolju prognozu što je utvrđeno i kod HPV pozitivnih HNSCC drugih anatomskih lokalizacija (96).

Drop i autori (266) su utvrdili prisutvo HPV/BKV koinfekcije kod 22% ispitanih uzoraka, a EBV/BKV koinfekcija je dokazana kod 23,2% HNSCC uzoraka. U našoj studiji prisustvo HPV/BKV koinfekcije je utvrđeno kod malog broja pacijenata, dok EBV/BKV koinfekcija nije dokazana kod pacijenata, što je pre svega posledica manjeg broja ispitivanih pacijenata i tipa uzoraka koji su ispitivani.

Poznato je da su geni HLA sistema polimorfni što podrazumijeva da različite jedinice posjeduju mnogo različitih alela. Zbog izraženog polimorfizma postoji mala vjerovatnoća da osobe koje nisu u srodstvu imaju iste HLA gene i molekule. Polimorfizam HLA gena je značajan jer omogućava da se kod različitih jedinki pokrene efektivan imunski odgovor na različite mikroorganizme (98).

U virusnim infekcijama HLA-G molekul ne pokreće imunitet nego indukuje inhibiciju NK ćelija, T limfocita i antigen prezentujućih ćelija i po tome se razlikuje od ostalih molekula HLA sistema. Kod zdravih individua održava se bazalni nivo transkripcije HLA-G gena, međutim kod nekih oboljenja kao što su maligniteti i virusne infekcije ekspresija HLA-G se povećava. Kod ovih patoloških stanja aktivnost NK ćelija se znatno smanjuje usljed povećane ekspresije HLA-G. Pored ovoga, virusi izbjegavaju imunski odgovor domaćina tako što modifikuju ekspresiju MHC molekula I klase te na taj način sprečavaju prezentaciju virusnih peptida i efektorsku ulogu T ćelija. Ovo doprinosi izbjegavanju imunskog odgovora što je značajno za uspostavljanje perzistentnih virusnih infekcija (113).

Varijabilnosti koje su uočene kod gena HLA sistema imaju zaštitne ili štetne efekte na ljude odnosno mogu ih činiti manje otpornim na infekcije koje izazivaju bakterije, virusi i paraziti (288). Određivanjem HLA genotipova se može bolje razumijeti kako pojedinac reaguje na različite patogene. Varijabilnost HLA-G gena se pojavljuje u vidu izmena pojedinačnih nukleotida odnosno supstitucija koje su označeni kao SNP. Supstitucije mogu biti po tipu sinonimnih ili nesinonimnih zamena, pri čemu su daleko češće sinonimne (103). Polimorfizmi HLA-G gena u kodirajućem regionu dovode do konformacionih promjena u molekulu, mijenjaju interakciju sa ćelijskim receptorima, mijenjaju proizvodnju izoformi te dovode do izmjene imunskog odgovora.

Nukleotidna varijabilnost kodirajućeg regiona HLA-G gena je raspoređena u egzonima 2, 3 i 4 (102, 103). Pored toga, SNP mogu obuhvatiti 5'URR i 3'UTR egzona 8 HLA-G gena. Jednonukleotidni polimorfizmi mijenjaju afinitet ciljnih sekvenci gena za transkripcijske i post-transkripcijske faktore. Promjene koje podrazumijevaju zamjenu jedne baze drugom mogu dovesti do izmjenjene ekspresije gena, utiču na stabilnost iRNK te na translaciju (289). Većina jednonukleotidnih polimorfizama se smatra funkcionalno neutralnim, međutim neki od SNP mijenjaju ekspresiju gena i povećavaju rizik od malignih oboljenja. Varijabilnost sekvence SNP je uslov za različitosti među individuama, a takođe i za veću osjetljivost na karcinom (290).

Prema podacima projekta 1000Genomes, u kodirajućem regionu otkrivena je 81 varijacija od kojih je većina smještena u intronima. Ove varijacije formiraju 93 različita haplotipa od koji 11 ima

frekvenciju veću od 1% uključujući i nulti alel (G\*0105N) koji kodira nefunkcionalni protein (105). Tih 11 haplotipova odgovara HLA-G proteinima: G\*01:01, G\*01:04, G\*01:05N, G\*01:06 i G\*01:03 (102). Najčešći je G\*01:01:01:01 koji je prvi opisan (101) i javlja sa učestalosti od 25.3% u svijetu, zatim G\*01:01:02:01 sa učestalosti od 14.5% (291) i G\*01:04:01 sa učestalosti od 13.3% (292). Pokazano je da učestalost HLA-G genotipova ima različitu geografsku distribuciju (293). Pa tako, u Evropskim zemljama najveću učestalost ima G\*01:01, dok je G\*01:06 prisutan prvenstveno na Srednjem i Bliskom istoku, a G\*01:04 je posebno učestao u Aziji i Okeaniji, posebno u Japanu (293).

Poslednje desetljeće rađena su istraživanja čiji je cilj bio da se utvrdi uloga polimorfizama HLA-G gena u nastanku karcinoma grlića materice, te da li ovi polimorfizmi povećavaju osjetljivost za HPV infekciju. Naime, Simões i saradnici (112) su pokazali da u HPV infekcijama postoji povezanost alela G\*01:03 i G\*01:04 sa skvamoznim intraepitelnim lezijama (SIL), a da je genotip G\*01:01/G\*01:04 povezan sa skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog stepena. Ferguson i saradnici (294) su pokazali da postoji veći rizik od HPV 16 infekcije kod pacijentica sa HLA-G\*01:01:02 i HLA-G\*01:01:08 alelima, odnosno da postoji veća osjetljivost za nastanak HPV tip 16 infekcije kao i za uspostavljanje virusne perzistencije. Isti autori su u drugoj studiji ispitujući uticaj HLA-G polimorfizama na razvoj skvamocelularnog karcinoma grlića materice žena kanadske populacije utvrdili da divlji tip HLA-G\*01:01:01 ima zaštitnu ulogu, dok HLA-G\*01:01:02 i HLA-G\*01:06 povećavaju rizik za nastanak skvamocelularnog karcinoma (295). Inače, za HLA-G\*01:01:02 je karakteristična sinonimna supstitucija (prolin) na kodonu 57. Pretpostavlja se da ova mutacija utiče na celularni imunski odgovor u toku HPV infekcije (295).

Mali broj studija je ispitivao povezanost HLA-G polimorfizma i karcinoma glave i vrata. U nekoliko studija, autori su se bavili utvrđivanjem ekspresije HLA-G u uzorcima bolesnika sa skvamocelularnim karcinomima regije glave i vrata (113, 296). Sarmah i saradnici (296) su pokazali da u HPV pozitivnim tumorima postoji visoka ekspresija HLA-G izoformi, posebno HLA-G7 izoforme sa visokom ekspresijom INF- $\gamma$ . Ovakvi rezultati idu u prilog značaju HLA-G molekula u regulaciji imunskog odgovora u toku virusne infekcije i uticaja na razvoj karcinoma.

Jaakola i saradnici (297) u studiji u kojoj su ispitivali HLA-G polimorfizme genitalne i oralne HPV infekcije nisu utvrdili povezanost HLA-G genotipova i genitalne HPV infekcije. Međutim, za HLA-G\*01:01:03 i HLA-G\*01:01:01:01:01:03 su utvrdili da povećavaju rizik za višestruke oralne HPV infekcije. Za HLA-G\*01:01:01:01:04:01 i HLA-G\*01:04 smatraju da imaju zaštitni efekat u nastanku oralne infekcije bilo kog HPV tipa. Takođe, autori smatraju da genotip HLA-G\*01:01:01:01:01:01 može biti predisponirajući faktor za HPV infekciju kod žena. Međutim, ovaj genotip divljeg tipa nije uticao na perzistenciju HPV infekcije koja dovodi do razvoja premaligne lezije izazvanu HPV (297).

Prema dostupnim podacima iz literature, ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje čiji cilj je bio da se utvrdi učestalost HLA-G genotipova kod pacijenata sa dijagnozom HNSCC (skvamocelularni karcinom larinksa i hipofarinksa) koji su bili hospitalizovani na UKC Republike Srpske. Analiza je urađena za 30 uzoraka-svježih tkiva (29 uzoraka karcinoma larinksa i jednog uzorka karcinoma hipofarinksa) koji su prikupljeni u toku dvogodišnjeg perioda.

Evaluacijom dobijenih rezultata utvrdili smo da je statistički značajno najzastupljeniji HLA-G genotip kod ispitanika naše studije bio HLA-G\*01:01:01. Za HLA-G\*01:01:01 je karakteristična sinonimna supstitucija pri čemu se jedan par baza mijenja sa drugim u egzonu gena koji kodira protein što ne dovodi do promjene aminokiselinske sekvence, a samim tim i do produkcije neizmjenjenog proteina. Takođe, otkriveni su i HLA-G\*01:01:02, HLA-G\*01:01:03, HLA-G\*01:01:05, HLA-G\*01:03:01 i HLA-G\*01:04:01, s tim da učestalost alelnih varijanti HLA-G\*01:03:01 i HLA-G\*01:04:01 koje karakteriše nesinonimna supstitucija nije bila značajna u odnosu na zastupljenost alelnih varijanti koje karakteriše sinonimna supstitucija.

Na osnovu dobijenih rezultata nije uočena statistički značajna povezanost HLA-G genotipova sa demografskim i bihevioralne karakteristike pacijenata, kao ni povezanost HLA-G genotipova sa kliničkim karakteristikama HNSCC.

U našem istraživanju uporedili smo učestalost dobijenih HLA-G varijanti kod pacijenata sa i bez pojedinačne infekcije i koinfekcije onkogenim virusima. Iako nije utvrđena statistički značajna povezanost između HLA-G\*01:01:01 i HLA-G\*01:01:02 i ukupnog broja pacijenata sa infekcijom visoko onkogenim HPV genotipovima, u uzorcima pacijenata sa HLA-G\*01:01:01 su dokazani isključivo visoko rizični genotipovi (HPV 16, -18, -66), pri čemu je najčešći bio HPV 16. U studiji Smith i saradnika (298) je pokazano da aleli HLA-G\*01:01:03 i HLA-G\*01:01:05 predstavljaju prediktore za razvoj kumulativnih HPV koinfekcija.

Prema dostupnim podacima iz literature, do sada nije ispitivana povezanosti prisustva EBV i BKV u karcinomima glave i vrata i HLA-G polimorfizama. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da nije nađena povezanost EBV infekcije i HLA-G varijanti utvrđenih u našem istraživanju. McAulay i saradnici (299) su u svom radu utvrdili da su polimorfizmi gena HLA I klase u vezi sa razvojem i težinom kliničke slike kod pacijenata sa infektivnom mononukleozom. Smatra se da je povezanost EBV infekcije i polimorfizama gena HLA I klase pre svega značajna zbog genetske varijabilnosti T ćelija koji kontrolišu tok EBV infekcije, viremiju, EBV reaktivaciju i onkogeni potencijal EBV (300). U dostupnoj literaturi je nađeno da su utvrđivane povezanosti HLA-A, -B, -C polimorfizama sa EBV infekcijama. Do sada nema dostupnih podataka o tome da li polimorfizmi HLA-G gena povećavaju odnosno smanjuju rizik za EBV infekciju (301). Poznato je da u određenim dijelovima svijeta ljudi češće oboljevaju od bolesti koje su povezane sa EBV infekcijom. Ispitivanjem povezanosti EBV infekcije i HLA polimorfizama, utvrđeno je da se HLA-A varijante dovode u vezu sa povećanim rizikom od nastanka EBV pozitivnih Hodžkin limfoma, kao i sa nazofaringealnim karcinomom. Pored toga, HLA-B i HLA-C su takođe povezani sa većim rizikom od nazofaringealnog karcinoma (301, 302).

Interesantno je napomenuti da kod pacijenata koji su bili uključeni u naše istraživanje kod kojih su utvrđene nesinonimne supstitucije, odnosno varijante HLA-G\*01:03:01 i HLA-G\*01:04:01 nije utvrđeno prisustvo infekcija onkogenim virusima. Uz HLA-G\*01:01:01 koji je i najčešći alel u do sada proučavanim populacijama, čest je i HLA-G\*01:03:01:01 alel kog karakteriše nesinonimna supstitucija na poziciji 292 kodona 31, pri čemu dolazi do zamjene treonina serinom, kodirajući molekul pune dužine HLA-G\*01:03. Za HLA-G\*01:04:01 je takođe karakteristična nesinonimna supstitucija koja zahvata poziciju 755, kodon 110, pri čemu se leucin zamjenjuje izoleucinom.

Studije koje su do sada rađene i čiji je cilj bio da se ispita uloga HLA-G polimorfizama u nastanku karcinoma su dale oprečne rezultate što ukazuje na potrebu da se rade studije koje bi obuhvatile veći uzorak ispitanika, kao i populaciju različitih etničkih grupa.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da HLA-G polimorfizmi svakako mogu biti faktori rizika za nastanak karcinoma, te se mogu koristiti i kao genski markeri za neke vrste karcinoma. Ako se uzmu u obzir do sad identifikovani polimorfizmi HLA-G gena u nekim vrstama karcinoma, HLA-G bi mogao biti i dijagnostički marker za identifikaciju i praćenje stadijuma bolesti. Takođe, tumorske ćelije pokazuju veći nivo ekspresije HLA-G molekule što bi moglo biti značajno i za razvoj terapije u borbi protiv karcinoma.

## 6 Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj studiji, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Prisustvo HPV DNK je dokazano kod 27% uzoraka HNSCC i to značajno češće kod muškaraca starosti od 50 do 69 godina sa karcinomom larinksa patohistološkog gradusa 2 u odmaklim stadijumima bolesti (III i IV stadijum bolesti). HPV infekcija je bila značajno češća kod pacijenata kod kojih nije došlo do širenja bolesti u regionalne limfne čvorove.
2. U tkivima HNSCC je identifikovano 5 HPV genotipova sa značajno većom učestalošću visoko onkogenih HPV tipova u odnosu na nisko onkogene (84% vs. 16%). Najveća učestalost od visoko rizičnih genotipova je pokazana za HPV 16 (57,1%). Nije utvrđena razlika između pacijenata kod kojih su identifikovani nisko onkogeni HPV tipovi i pacijenata sa visoko onkogenim tipovima u odnosu na demografske i bihevioralne karakteristike pacijenata i kliničke karakteristike HNSCC.
3. Prisustvo EBV DNK je dokazano kod 20% HNSCC uzoraka, značajno češće kod muškaraca starosti od 50 do 69 godina sa karcinomima larinksa patohistološkog gradusa 2. Učestalost detekcije bila je veća kod svježih tkiva u odnosu na FFPE uzorke. Identifikovana su oba EBV genotipa, pri čemu je EBV-1 dokazan u 93,75% uzoraka tkiva HNSCC.
4. Prisustvo BKV je dokazano u 3% uzoraka karcinoma glave i vrata, dok JCV nije identifikovan u tkivima HNSCC analiziranih u ovoj studiji. Nije utvrđeno postojanje razlike između uzoraka sa i bez BKV infekcije u odnosu na demografske i bihevioralne karakteristike pacijenata i kliničke karakteristike karcinoma.
5. Ukupno, pojedinačne infekcije sa onkogenim virusima utvrđene su kod 28% pacijenata, statistički značajno češće kod pacijenata muškog pola sa karcinomom larinksa patohistološkog gradusa 2 u III ili IV stadijumu bolesti. HPV infekcija je bila značajno zastupljenija u odnosu na EBV i BKV infekciju (57,15% vs 39,28% vs 3,57%), ali bez razlike u odnosu na demografske i bihevioralne karakteristike pacijenata, kao i na kliničke karakteristike karcinoma.
6. Koinfekcije sa više onkogenih virusa su dokazane kod 11% ispitanih uzoraka i to HPV/EBV i HPV/BKV koinfekcije, dok EBV/BKV koinfekcija nije dokazana. Iako je HPV/EBV koinfekcija bila najzastupljenija, nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti vrste koinfekcija u tkivima karcinoma glave i vrata. Koinfekcije su bile značajno češće kod muških ispitanika sa karcinomom larinksa i lezijama patohistološkog gradusa 2.
7. Dobijeni rezultati ispitivanja razlika između pacijenata sa pojedinačnim infekcijama i koinfekcijama sa onkogenim virusima u odnosu na demografske, bihevioralne i kliničke karakteristike karcinoma nisu pokazale statističku značajnost.

8. Primjena dva testa za izdvajanje DNK iz parafinskih uzoraka je pokazala da je QIAamp DNA FFPE Tissue Kit je efikasniji u odnosu na kvantitet, ali ne i u odnosu na kvalitet izolovane DNK u poređenju sa QIAamp DNA Mini Kit-om.
9. Usporedna analiza tri vrste metoda molekularne biologije za dokazivanje HPV i EBV DNK u ispitivanim uzorcima je pokazala da je Nested PCR metoda najefikasnija za dokazivanje navedenih virusa sa statistički visoko značajnom razlikom u odnosu na klasičnu PCR i Real-time PCR metodu.
10. Analiza HLA-G polimorfizama u tkivima karcinoma larinksa je pokazala prisustvo 6 HLA-G tipova i to HLA-G\*01:01:01, HLA-G\*01:01:02, HLA-G\*01:01:03, HLA-G\*01:01:05, HLA-G\*01:03:01, HLA-G\*01:04:01. Najzastupljeniji je bio genotip HLA-G\*01:01:01 (56,66%) sa visokom statistički značajnom razlikom u odnosu na učestalost drugih genotipova i značajno češće u IV stadijumu bolesti, ali bez razlike u odnosu na demografske i bihevioralne karakteristike pacijenata i lokalizaciju i patohistološki gradus karcinoma.
11. Nije utvrđena povezanost između identifikovanih HLA-G tipova sa HPV infekcijom i identifikovanim HPV genotipovima, kao ni sa prisustvom EBV i BKV infekcije. Takođe, nije pokazano postojanje razlike između zastupljenosti HLA-G tipova i prisustva pojedinačne infekcije odnosno koinfekcije sa onkogenim virusima u uzorcima karcinoma glave i vrata.

Prema postavkama radne hipoteze, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali povezanost prisustva infekcije onkogenim virusima sa karcinomima glave i vrata, ali nije utvrđeno da postoji korelacija HLA-G polimorfizama sa prisustvom infekcija i koinfekcija onkogenim virusima u HNSCC.

## 7 Literatura

1. Chai RC, Lambie D, Verma M, Punyadeera C. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Med.* 2015;4(4):596-607.
2. Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses.* 2019;11(10):922.
3. Gavrić M. Tumori maksilofacijalne regije. U: Gavrić M, urednik. Maksilofacijalna hirurgija. Drugo izdanje. Beograd: Draganić; 2001. p. 306-307.
4. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-9.
5. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J et al. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2005;113(5):789-97.
6. 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.
7. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020; 2020 [citirano 10. maja 2021.]. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/>
8. Vohra P, Strobbia P, Ngo HT, Lee WT, Vo-Dinh T. Rapid Nanophotonics Assay for Head and Neck Cancer Diagnosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):11410.
9. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology.* 2016;91(1):13-23.
10. McIlwain WR, Sood AJ, Nguyen SA, Day TA. Initial symptoms in patients with HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(5):441-7.
11. Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. *Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach.* 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins; 2009.
12. Piccirillo JF, Feinstein AR. Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer. *Cancer.* 1996;77(5):834-42.
13. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.
14. Dimitrijević M. Maksilofacijalna hirurgija. Prvo izdanje. Beograd: Medicinski fakultet Beograd; 2020.
15. Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses.* 2019;11(10):922.
16. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol.* 2004;57(5):449-55.
17. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J et al. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2620-3.
18. Jalouli J, Jalouli MM, Sapkota D, Ibrahim SO, Larsson PA, Sand L. Human papilloma virus, herpes simplex virus and epstein barr virus in oral squamous cell carcinoma from eight different countries. *Anticancer Res.* 2012;32(2):571-80.
19. Chen Y, Williams V, Filippova M, Filippov V, Duerksen-Hughes P. Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration. *Cancers (Basel).* 2014;6(4):2155-86.
20. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(5):401-21.
21. Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Kowalski LP. Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Epidemiology.* 1999;10(4):412-8.



22. Khariwala SS, Hatsukami D, Hecht SS. Tobacco carcinogen metabolites and DNA adducts as biomarkers in head and neck cancer: potential screening tools and prognostic indicators. *Head Neck*. 2012;34(3):441-7.
23. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):411-423.
24. Tsai ST, Wong TY, Ou CY, Fang SY, Chen KC, Hsiao JR et al. The interplay between alcohol consumption, oral hygiene, ALDH2 and ADH1B in the risk of head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2424-36.
25. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Drinking [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1988 [citirano 5. avgusta 2021.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531661/>.
26. Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):425-434.
27. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4550-9.
28. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
29. zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(32):5798-808.
30. Alibek K, Kakpenova A, Baiken Y. Role of infectious agents in the carcinogenesis of brain and head and neck cancers. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):7.
31. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):266-82.
32. Polz-Gruszka D, Morshed K, Jarzyński A, Polz-Dacewicz M. Prevalence of Polyoma BK Virus (BKPv), Epstein-Barr Virus (EBV) and Human Papilloma Virus (HPV) in Oropharyngeal Cancer. *Pol J Microbiol*. 2015;64(4):323-8.
33. Poluschkin L, Rautava J, Turunen A, Wang Y, Hedman K, Syrjänen K et al. Polyomaviruses detectable in head and neck carcinomas. *Oncotarget*. 2018;9(32):22642-22652.
34. Lowy DR, Howley PM. Fields virology. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Papillomaviruses*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 2231–64.
35. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-72.
36. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9.
37. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
38. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-344.
39. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
40. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. 2011;10:140.
41. Nath R, Mant CA, Kell B, Cason J, Bible JM. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int*. 2006;6:19.

42. Betiol J, Villa LL, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(3):217-26.
43. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F et al. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321-2.
44. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
45. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63(6):1129-36.
46. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(6):379-86.
47. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009;19(2):97-113.
48. Cortese MS, Ashrafi GH, Campo MS. All 4 di-leucine motifs in the first hydrophobic domain of the E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 are essential for surface MHC class I downregulation activity and E5 endomembrane localization. *Int J Cancer.* 2010;126(7):1675-82.
49. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J et al. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol.* 2008;173(3):682-8.
50. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 1:S16-22.
51. Pang CL, Thierry F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microb Pathog.* 2013;58:55-65.
52. Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R et al. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene.* 2001;20(28):3629-40.
53. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet.* 1964;1(7335):702-3.
54. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):803-21.
55. Santpere G, Darre F, Blanco S, Alcamí A, Villoslada P, Mar Albà M et al. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol.* 2014;6(4):846-60.
56. Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol.* 1990;64(9):4084-92.
57. Hutt-Fletcher L. EBV entry and epithelial infection. In: Robertson ES, editor. Epstein-Barr virus. Casister: Academic Press; 2005. p. 359-78.
58. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(12):3806-10.
59. Johannsen E, Koh E, Mosialos G, Tong X, Kieff E, Grossman SR. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol.* 1995;69(1):253-62.
60. Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol.* 1990;64(5):2309-18.

61. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol.* 2018;8:211.
62. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):757-68.
63. Henle G, Henle W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol.* 1966;91(3):1248-56.
64. Henle W, Henle G, Ho HC, Burtin P, Cachin Y, Clifford P et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. *J Natl Cancer Inst.* 1970;44(1):225-31.
65. Longnecker R, Neipel F. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis [Internet]. 1st ed. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al, editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [citirano 21. januara 2022]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47397/>
66. Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene.* 1995;10(3):549-60.
67. Mitchell T, Sugden B. Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol.* 1995;69(5):2968-76.
68. Izumi KM, Kieff ED. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12592-7.
69. Fernandes Q, Merhi M, Raza A, Inchakalody VP, Abdelouahab N, Zar Gul AR et al. Role of Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers and Its Potential as an Immunotherapeutic Target. *Front Oncol.* 2018;8:257.
70. Goldenberg D, Golz A, Netzer A, Rosenblatt E, Rachmiel A, Goldenberg RF et al. Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck. *Am J Otolaryngol.* 2001;22(3):197-205.
71. Liu MT, Chen YR, Chen SC, Hu CY, Lin CS, Chang YT et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. *Oncogene.* 2004;23(14):2531-9.
72. Chen W, Cooper NR. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of NF-kappaB activity. *J Virol.* 1996;70(7):4849-53.
73. Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2007;247(2):182-96.
74. Prabhu SR, Wilson DF. Evidence of Epstein-Barr virus association with head and neck cancers: a review. *J Can Dent Assoc.* 2016;82(g2):1488-2159.
75. Fołtyn S, Strycharz-Dudziak M, Drop B, Boguszevska A, Polz-Dacewicz M. Serum EBV antibodies and LMP-1 in Polish patients with oropharyngeal and laryngeal cancer. *Infect Agent Cancer.* 2017;12:31.
76. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ et al. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* 2011;156(9):1627-34.
77. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971;1(7712):1253-7.
78. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971;1(7712):1257-60.

79. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007;81(8):4130-6.
80. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e64.
81. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319(5866):1096-100.
82. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1001024.
83. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology.* 2013;437(2):63-72.
84. Doerries K. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:102-16.
85. Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol.* 1993;41(1):11-7.
86. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(6):1159-1160.
87. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis.* 2005;41(3):354-60.
88. Binet I, Nিকেleit V, Hirsch HH. Polyomavirus infections in transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2000;5:210-216.
89. Safdar A, Rubocki RJ, Horvath JA, Narayan KK, Waldron RL. Fatal immune restoration disease in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: impact of antiretroviral therapy-associated immune reconstitution. *Clin Infect Dis.* 2002;35(10):1250-7.
90. Kappos L, Bates D, Hartung HP, Havrdova E, Miller D, Polman CH et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol.* 2007;6(5):431-41.
91. Mortensen ES, Fenton KA, Rekvig OP. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. *Am J Pathol.* 2008;172(2):275-83.
92. Bredholt G, Olaussen E, Moens U, Rekvig OP. Linked production of antibodies to mammalian DNA and to human polyomavirus large T antigen: footprints of a common molecular and cellular process? *Arthritis Rheum.* 1999;42(12):2583-92.
93. Moens U, Van Ghelue M, Ehlers B. Are human polyomaviruses co-factors for cancers induced by other oncoviruses? *Rev Med Virol.* 2014;24(5):343-60.
94. White MK, Khalili K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology.* 2004;324(1):1-16.
95. Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Rong X, Nathan S, Gu X et al. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(1):28-36.
96. Guidry JT, Scott RS. The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus Res.* 2017;231:139-147.
97. Al Moustafa AE, Chen D, Ghabreau L, Akil N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med Hypotheses.* 2009;73(2):184-6.
98. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Osnovna imunologija: Funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema.* Četvrto izdanje. Beograd: DataStatus; 2013.
99. Wiczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Alvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2017;8:292.

100. Williams TM. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn.* 2001;3(3):98-104.
101. Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9145-9.
102. Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol.* 2014;5:476.
103. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):369-95.
104. IPD-IMGT/HLA Database [Internet]. Anthony Nolan Research Institute; 2020 [citirano 3. 11. 2020.]. Pristupljeno 3.11.2020. Dostupno na <http://hla.alleles.org/alleles/index.html>.
105. Amodio G, Gregori S. HLA-G Genotype/Expression/Disease Association Studies: Success, Hurdles, and Perspectives. *Front Immunol.* 2020;11:1178.
106. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D423-31.
107. Kamishikiryo J, Maenaka K. HLA-G molecule. *Curr Pharm Des.* 2009;15(28):3318-24.
108. Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11520-5.
109. Horuzsko A, Lenfant F, Munn DH, Mellor AL. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int Immunol.* 2001;13(3):385-94.
110. Shiroishi M, Kuroki K, Ose T, Rasubala L, Shiratori I, Arase H et al. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10439-47.
111. Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med.* 1999;189(7):1093-100.
112. Simões RT, Gonçalves MA, Castelli EC, Júnior CM, Bettini JS, Discorde ML et al. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1075-82.
113. Silva TG, Crispim JC, Miranda FA, Hassumi MK, de Mello JM, Simões RT et al. Expression of the nonclassical HLA-G and HLA-E molecules in laryngeal lesions as biomarkers of tumor invasiveness. *Histol Histopathol.* 2011;26(12):1487-97.
114. Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2002;60(2):122-32.
115. Rolfsen GB, Castelli EC, Donadi EA, Duarte RA, Soares CP. HLA-G polymorphism and breast cancer. *Int J Immunogenet.* 2014;41(2):143-8.
116. Ouni N, Chaaben AB, Kablouti G, Ayari F, Douik H, Abaza H et al. The Impact of HLA-G 3'UTR Polymorphisms in Breast Cancer in a Tunisian Population. *Immunol Invest.* 2019;48(5):521-532.
117. Jeong S, Park S, Park BW, Park Y, Kwon OJ, Kim HS. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(5):e98284.
118. Yang YC, Chang TY, Chen TC, Lin WS, Chang SC, Lee YJ. Human leukocyte antigen-G polymorphisms are associated with cervical squamous cell carcinoma risk in Taiwanese women. *Eur J Cancer.* 2014;50(2):469-74.
119. Garziera M, Catamo E, Crovella S, Montico M, Cecchin E, Lonardi S et al. Association of the HLA-G 3'UTR polymorphisms with colorectal cancer in Italy: a first insight. *Int J Immunogenet.* 2016;43(1):32-9.

120. Wiśniewski A, Kowal A, Wyrodek E, Nowak I, Majorczyk E, Wagner M et al. Genetic polymorphisms and expression of HLA-G and its receptors, KIR2DL4 and LILRB1, in non-small cell lung cancer. *Tissue Antigens*. 2015;85(6):466-75.
121. Agnihotri V, Gupta A, Kumar R, Upadhyay AD, Dwivedi S, Kumar L et al. Promising link of HLA-G polymorphism, tobacco consumption and risk of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in North Indian population. *Hum Immunol*. 2017;78(2):172-178.
122. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Viana de Camargo JL, Donadi EA. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. *Tissue Antigens*. 2008;72(2):149-57.
123. Melsted WN, Johansen LL, Lock-Andersen J, Behrendt N, Eriksen JO, Bzorek M et al. HLA class Ia and Ib molecules and FOXP3+ TILs in relation to the prognosis of malignant melanoma patients. *Clin Immunol*. 2017;183:191-197.
124. Adithi M, Kandalam M, Ramkumar HL, Subramanian A, Venkatesan N, Krishnakumar S. Retinoblastoma: expression of HLA-G. *Ocul Immunol Inflamm*. 2006;14(4):207-13.
125. Nunes LM, Ayres FM, Francescantonio IC, Saddi VA, Avelino MA, Alencar Rde C et al. Association between the HLA-G molecule and lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Hum Immunol*. 2013;74(4):447-51.
126. Murdaca G, Calamaro P, Lantieri F, Pigozzi S, Mastracci L, Grillo F et al. HLA-G expression in gastric carcinoma: clinicopathological correlations and prognostic impact. *Virchows Arch*. 2018;473(4):425-433.
127. Zheng J, Xu C, Chu D, Zhang X, Li J, Ji G et al. Human leukocyte antigen G is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. *Immunol Lett*. 2014;161(1):13-9.
128. Wastowski IJ, Simões RT, Yaghi L, Donadi EA, Pancoto JT, Poras I et al. Human leukocyte antigen-G is frequently expressed in glioblastoma and may be induced in vitro by combined 5-aza-2'-deoxycytidine and interferon- $\gamma$  treatments: results from a multicentric study. *Am J Pathol*. 2013;182(2):540-52.
129. Locafaro G, Amodio G, Tomasoni D, Tresoldi C, Ciceri F, Gregori S. HLA-G expression on blasts and tolerogenic cells in patients affected by acute myeloid leukemia. *J Immunol Res*. 2014;2014:636292.
130. Teixeira AC, Mendes-Junior CT, Souza FF, Marano LA, Deghaide NH, Ferreira SC et al. The 14bp-deletion allele in the HLA-G gene confers susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population. *Tissue Antigens*. 2013;81(6):408-13.
131. Arnaiz-Villena A, Juarez I, Suarez-Trujillo F, López-Nares A, Vaquero C, Palacio-Gruber J et al. HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *Int J Immunogenet*. 2021;48(2):172-192.
132. Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(3):1687-96.
133. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.
134. Azzimonti B, Hertel L, Aluffi P, Pia F, Monga G, Zocchi M et al. Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol*. 1999;59(1):110-6.
135. Jalouli M, Jalouli J, Ibrahim SO, Hirsch JM, Sand L. Comparison between single PCR and nested PCR in detection of human papilloma viruses in paraffin-embedded OSCC and fresh oral mucosa. *In Vivo*. 2015;29(1):65-70.
136. Jakovljevic A, Andric M, Knezevic A, Soldatovic I, Nikolic N, Karalic D et al. Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Genotypes in Apical Periodontitis Lesions. *J Endod*. 2015;41(11):1847-51.

137. Hill CE, Harris SB, Culler EE, Zimring JC, Nolte FS, Caliendo AM. Performance characteristics of two real-time PCR assays for the quantification of Epstein-Barr virus DNA. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(5):665-71.
138. Karalić D, Lazarević I, Čupić M, Jevtović Đ, Jovanović T. Prevalence of JC and BK polyomavirus excretion in the urine of HIV-infected patients from Serbia. *Arch Biol Sci.* 2014;66:609–614
139. Pirri A, Contieri FC, Benvenuti R, Bicalho Mda G. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. *Transpl Immunol.* 2009;20(3):143-9.
140. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(3):379-96.
141. Feurstein S, Drazer MW, Godley LA. Genetic predisposition to leukemia and other hematologic malignancies. *Semin Oncol.* 2016;43(5):598-608.
142. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med.* 2019;26(1):1-7.
143. Perrino M, Cooke-Barber J, Dasgupta R, Geller JI. Genetic predisposition to cancer: Surveillance and intervention. *Semin Pediatr Surg.* 2019;28(6):150858.
144. Ganesh D, Sreenivasan P, Öhman J, Wallström M, Braz-Silva PH, Giglio D et al. Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. *Anticancer Res.* 2018;38(6):3223-3229.
145. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. IARC Monographs Evaluat Carcinogen Risks Humans. 2012 [citirano 10 januara 2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304391/>
146. Myung SK. Erroneous conclusions about the association between light alcohol drinking and the risk of cancer: comments on Bagnardi et al.'s meta-analysis. *Ann Oncol.* 2016;27(11):2138.
147. Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer.* 2020;122(3):306-314.
148. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2014;26(2):123-41.
149. McDermott JD, Bowles DW. Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(5):43.
150. Mahmood R, Butterworth C, Lowe D, Rogers SN. Characteristics and referral of head and neck cancer patients who report chewing and dental issues on the Patient Concerns Inventory. *Br Dent J.* 2014;216(11):E25.
151. Peller M, Katalinic A, Wollenberg B, Teudt IU, Meyer JE. Epidemiology of laryngeal carcinoma in Germany, 1998-2011. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273(6):1481-7.
152. Brandstorp-Boesen J, Falk RS, Boysen M, Brøndbo K. Long-term trends in gender, T-stage, subsite and treatment for laryngeal cancer at a single center. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(12):3233-9.
153. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48(11):3282-7.
154. McDermott JD, Bowles DW. Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(5):43.
155. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014;50(5):387-403.
156. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res.* 2020;32(1):18-25.

157. Miljuš D, Živković-Perišić S, Božić Z, urednici. Maligni tumori u Republici Srbiji [Internet]. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; 2019. [citirano 29. Decembar 2021.]. Dostupno na: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/maligniTumoriURepubliciSrbiji2019.pdf>
158. Al-Thawadi H, Gupta I, Jabeen A, Skenderi F, Aboukassim T, Yasmeen A et al. Co-presence of human papillomaviruses and Epstein-Barr virus is linked with advanced tumor stage: a tissue microarray study in head and neck cancer patients. *Cancer Cell Int.* 2020;20:361.
159. Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15(2):168-76.
160. Dhull AK, Atri R, Dhankhar R, Chauhan AK, Kaushal V. Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences. *World J Oncol.* 2018;9(3):80-84.
161. Maasland DH, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RA, Schouten LJ. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer.* 2014;14:187.
162. Osazuwa-Peters N, Adjei Boakye E, Chen BY, Tobo BB, Varvares MA. Association Between Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival, Smoking at Diagnosis, and Marital Status. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;144(1):43-50.
163. Ilhan MN, Yapar D. Alcohol consumption and alcohol policy. *Turk J Med Sci.* 2020;50(5):1197-1202.
164. Krishna A, Singh RK, Singh S, Verma P, Pal US, Tiwari S. Demographic risk factors, affected anatomical sites and clinicopathological profile for oral squamous cell carcinoma in a north Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(16):6755-60.
165. Ahmed HG, Mustafa SA, Warille E. Human papilloma virus attributable head and neck cancer in the sudan assessed by p16INK4A immunostaining. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(12):6083-6.
166. Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Rimmelink M, Sirtaine N et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol.* 2011;39(1):51-9.
167. Alvarez-Aldana A, Martínez JW, Sepúlveda-Arias JC. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. *Pathol Res Pract.* 2015;211(2):150-5.
168. Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. *J Clin Virol.* 2016;76 Suppl 1:S88-S97.
169. Kalantari N, Bayani M, Ghaffari T. Deparaffinization of formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks using hot water instead of xylene. *Anal Biochem.* 2016;507:71-3.
170. Jelassi R, Ben-Abdallah R, Chelbi H, Ben-Alaya N, Haouet S, Bouratbine A et al. Comparison of two deparaffinization techniques and three DNA extraction methods from paraffin-embedded biopsies. *J Inf Mol Biol* 2017;4:44-8.
171. Sengüven B, Baris E, Oygur T, Berktaş M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci.* 2014;11(5):494-9.
172. Kalendar R, Boronnikova S, Seppänen M. Isolation and Purification of DNA from Complicated Biological Samples. *Methods Mol Biol.* 2021;2222:57-67.
173. Mullegama SV, Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V et al. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:359-383.
174. Dhaliwal A. DNA extraction and purification. *Mater Methods.* 2013;3:191.
175. Biesaga B, Janecka A, Mucha-Małecka A, Adamczyk A, Szostek S, Słonina D et al. HPV16 detection by qPCR method in relation to quantity and quality of DNA extracted from archival



- formalin fixed and paraffin embedded head and neck cancer tissues by three commercially available kits. *J Virol Methods*. 2016;236:157-163.
176. Rodrigo JP, Hermsen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, García-Velasco F, Snijders PJ et al. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(1):37-41.
  177. Sarnecka AK, Nawrat D, Piwowar M, Ligęza J, Swadźba J, Wójcik P. DNA extraction from FFPE tissue samples - a comparison of three procedures. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2019;23(1):52-58.
  178. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN et al. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation. *Korean J Pathol*. 2014;48(1):36-42.
  179. Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, Tran Van Nhieu J, Allory Y et al. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch*. 2017;471(4):491-500.
  180. Vitošević K, Todorović M, Slović Ž, Varljen T, Matić S, Todorović D. DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded healthy tissue after 30 years of storage can be used for forensic studies. *Forensic Sci Med Pathol*. 2021;17(1):47-57.
  181. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(4):356-65.
  182. Grillo F, Pigozzi S, Ceriolo P, Calamaro P, Fiocca R, Mastracci L. Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochem Cell Biol*. 2015;144(1):93-9.
  183. Kleinsorge F, Schmidmayr M. Humane Papillomavirusinfektion bei Frauen : Diagnostik, Therapie und Bedeutung der Impfung [HPV infection in women : Diagnostics, treatment and the relevance of vaccination]. *Urologe A*. 2018;57(12):1445-1451.
  184. Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1(Suppl 1):S63-74.
  185. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):308-12.
  186. Dalakoti P, Ramaswamy B, Bhandarkar AM, Nayak DR, Sabeena S, Arunkumar G. Prevalence of HPV in Oral Squamous Cell Carcinoma in South West India. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;71(Suppl 1):657-664.
  187. Popović B, Jekić B, Novaković I, Luković L, Konstantinović V, Babić M et al. Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(9):909-15.
  188. Buexm LA, Soares-Lima SC, Brennan P, Fernandes PV, de Souza Almeida Lopes M, Nascimento de Carvalho F et al. Hpv impact on oropharyngeal cancer patients treated at the largest cancer center from Brazil. *Cancer Lett*. 2020;477:70-75.
  189. Kozomara R, Jović N, Magić Z, Branković-Magić M, Minić V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg*. 2005;33(5):342-8.
  190. Panneerselvam K, Rameshkumar A, Rajkumar K, Ramadoss R. Detection of human papillomavirus 16 and 18 in patients with oral squamous cell carcinoma and potentially malignant oral disorders in South Indian population: A pilot study. *J Cancer Res Ther*. 2019;15(3):571-575.
  191. Abogunrin S, Di Tanna GL, Keeping S, Carroll S, Iheanacho I. Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancers in European populations: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:968.

192. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med*. 2018;7(9):241.
193. Daigrepoint J, Cameron JE, Wright KL, Cordell KG, Rosebush MS. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded squamous papillomas of the oral cavity. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(10):e979-e983.
194. Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res*. 2006;20(1):21-4.
195. Steinau M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2011;13(4):377-81.
196. Erhart SM, Rivero ER, Bazzo ML, Onofre AS. Comparative evaluation of the GP5+/6+, MY09/11 and PGMY09/11 primer sets for HPV detection by PCR in oral squamous cell carcinomas. *Exp Mol Pathol*. 2016;100(1):13-6.
197. Miyahara GI, Simonato LE, Mattar NJ, Camilo DJ Jr, Biasoli ER. Correlation between koilocytes and human papillomavirus detection by PCR in oral and oropharynx squamous cell carcinoma biopsies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(2):166-9.
198. Harlé A, Guillet J, Thomas J, Sastre-Garau X, Rouyer M, Ramacci C et al. Evaluation and validation of HPV real-time PCR assay for the detection of HPV DNA in oral cytobrush and FFPE samples. *Sci Rep*. 2018;8(1):11313.
199. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. *Expert Rev Mol Med*. 2017;19:e1.
200. Tawe L, Grover S, Narasimhamurthy M, Moyo S, Gaseitsiwe S, Kasvosve I et al. Molecular detection of human papillomavirus (HPV) in highly fragmented DNA from cervical cancer biopsies using double-nested PCR. *MethodsX*. 2018;5:569-578.
201. Normanno N, Rachiglio AM, Roma C, Fenizia F, Esposito C, Pasquale R et al. Molecular diagnostics and personalized medicine in oncology: challenges and opportunities. *J Cell Biochem*. 2013;114(3):514-24.
202. Dahlstrom KR, Burchell AN, Ramanakumar AV, Rodrigues A, Tellier PP, Hanley J et al. Sexual transmission of oral human papillomavirus infection among men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(12):2959-64.
203. Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(4):761-70.
204. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7):693-703.
205. Sanders AE, Slade GD, Patton LL. National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Dis*. 2012;18(5):430-41.
206. D'Souza G, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Wentz A, Kluz N et al. Differences in the Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Head and Neck Squamous Cell Cancers by Sex, Race, Anatomic Tumor Site, and HPV Detection Method. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):169-177.
207. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S et al. ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):djv403.
208. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004;108(5):766-72.
209. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ et al. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol*. 2003;192(3):129-32.

210. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001;92(4):805-13.
211. Hosseini SZ, Makvandi M, Samarbafzade A, Timori A, Ranjbar N, Saki N et al. Frequency of Human Papillomavirus (HPV) 16 and 18 Detection in Paraffin- Embedded Laryngeal Carcinoma Tissue. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(4):889-893.
212. D'Souza G, McNeel TS, Fakhry C. Understanding personal risk of oropharyngeal cancer: risk-groups for oncogenic oral HPV infection and oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(12):3065-3069.
213. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24-35.
214. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338(7):423-8.
215. Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Thompson PJ et al. Prevalence, acquisition, and clearance of cervical human papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawaii Human Papillomavirus Cohort Study. *Cancer Res*. 2008;68(21):8813-24.
216. Oh HY, Kim MK, Seo S, Lee DO, Chung YK, Lim MC et al. Alcohol consumption and persistent infection of high-risk human papillomavirus. *Epidemiol Infect*. 2015;143(7):1442-50.
217. Schabath MB, Thompson ZJ, Egan KM, Torres BN, Nguyen A, Papenfuss MR et al. Alcohol consumption and prevalence of human papillomavirus (HPV) infection among US men in the HPV in Men (HIM) study. *Sex Transm Infect*. 2015;91(1):61-7.
218. Kumar R, Rai AK, Das D, Das R, Kumar RS, Sarma A et al. Alcohol and Tobacco Increases Risk of High Risk HPV Infection in Head and Neck Cancer Patients: Study from North-East Region of India. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140700.
219. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*. 2011;17 Suppl 1:58-72.
220. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010;2:15.
221. Saulle R, Semyonov L, Mannocci A, Careri A, Saburri F, Ottolenghi L et al. Human papillomavirus and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2015;21(4):417-31.
222. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR et al. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer*. 2007;120(7):1418-25.
223. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(6):1733-41.
224. Polz-Gruszka D, Stec A, Dworzański J, Polz-Dacewicz M. EBV, HSV, CMV and HPV in laryngeal and oropharyngeal carcinoma in Polish patients. *Anticancer Res*. 2015;35(3):1657-61.
225. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001;344(15):1125-31.
226. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck*. 2011;33(4):581-6.

227. Lie ES, Engh V, Boysen M, Clausen OP, Kvernfold H, Stenersen TC et al. Squamous cell carcinoma of the respiratory tract following laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol.* 1994;114(2):209-12.
228. Orita Y, Gion Y, Tachibana T, Ikegami K, Marunaka H, Makihara S et al. Laryngeal squamous cell papilloma is highly associated with human papillomavirus. *Jpn J Clin Oncol.* 2018;48(4):350-355.
229. Gama RR, Carvalho AL, Longatto Filho A, Scorsato AP, López RV, Rautava J et al. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope.* 2016;126(4):885-93.
230. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F et al. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2013;207(3):479-88.
231. Zhang C, Deng Z, Chen Y, Suzuki M, Xie M. Is there a higher prevalence of human papillomavirus infection in Chinese laryngeal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273(2):295-303.
232. Wang H, Wei J, Wang B, Meng L, Xin Y, Dong L et al. Role of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: A meta-analysis of cohort study. *Cancer Med.* 2020;9(1):204-214.
233. Vazquez-Guillen JM, Palacios-Saucedo GC, Rivera-Morales LG, Alonzo-Morado MV, Burciaga-Bernal SB, Montufar-Martinez M et al. Infection and coinfection by human papillomavirus, Epstein-Barr virus and Merkel cell polyomavirus in patients with squamous cell carcinoma of the larynx: a retrospective study. *PeerJ.* 2018;6:e5834.
234. Onerci Celebi O, Sener E, Hosal S, Cengiz M, Gullu I, Guler Tezel G. Human papillomavirus infection in patients with laryngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1005.
235. Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, Lupato V, Baboci L, Almadori G et al. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2013;33(2):77-87.
236. Mizumachi T, Homma A, Sakashita T, Kano S, Hatakeyama H, Fukuda S. Confirmation of the eighth edition of the AJCC/UICC TNM staging system for HPV-mediated oropharyngeal cancer in Japan. *Int J Clin Oncol.* 2017;22(4):682-689.
237. Campisi G, Giovannelli L, Calvino F, Matranga D, Colella G, Di Liberto C et al. HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. *Oral Oncol.* 2006;42(6):638-45.
238. Vanshika S, Preeti A, Sumaira Q, Vijay K, Shikha T, Shivanjali R et al. Incidence OF HPV and EBV in oral cancer and their clinico-pathological correlation- a pilot study of 108 cases. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2021;11(2):180-184.
239. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.
240. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):92.
241. Kansky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virol.* 2003;47(1):11-6.
242. Poljak M, Gale N, Kambic V. Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1997;527:66-9.
243. Gupta I, Ghabreau L, Al-Thawadi H, Yasmeen A, Vranic S, Al Moustafa AE et al. Coincidence of Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus Is Associated With High to Intermediate Tumor Grade in Human Head and Neck Cancer in Syria. *Front Oncol.* 2020;10:1016.

244. Chaturvedi AK, Graubard BI, Pickard RK, Xiao W, Gillison ML. High-risk oral human papillomavirus load in the US population, National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010. *J Infect Dis.* 2014;210(3):441-7.
245. Orosco RK, Kedarisetty S, Hecht AS, Chang DC, Coffey CS, Weissbrod PA. Predictors of high-risk and low-risk oral HPV infection in the United States. *Laryngoscope.* 2016;126(6):1365-72.
246. Tong F, Geng J, Yan B, Lou H, Chen X, Duan C et al. Prevalence and Prognostic Significance of HPV in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma in Northeast China. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(1):206-216.
247. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294-301.
248. [http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer\\_protocols/2013/Pharynx\\_13protocol\\_3300.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/Pharynx_13protocol_3300.pdf)
249. Thorley-Lawson DA. EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;390(Pt 1):151-209.
250. Al Moustafa AE, Al-Awadhi R, Missaoui N, Adam I, Durusoy R, Ghabreau L et al. Human papillomaviruses-related cancers. Presence and prevention strategies in the Middle east and north African regions. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(7):1812-21.
251. Gonzalez-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2002;112(3):482-7.
252. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM et al. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 2004;114(6):1027-31.
253. Deng Z, Uehara T, Maeda H, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A et al. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and genotype distribution in head and neck cancers. *PLoS One.* 2014;9(11):e113702.
254. Mulder FJ, Klufah F, Janssen FME, Farshadpour F, Willems SM, de Bree R et al. Presence of Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus, but Absence of Merkel Cell Polyomavirus, in Head and Neck Cancer of Non-Smokers and Non-Drinkers. *Front Oncol.* 2021;10:560434.
255. Chen YP, Chan ATC, Le QT, Blanchard P, Sun Y, Ma J. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet.* 2019;394(10192):64-80.
256. Hjalgrim H, Friborg J, Melbye M. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis [Internet]. 1st ed. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al, editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [citirano 15 januara 2022]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47424/>
257. Karbalaie Niya MH, Safarnezhad Tameshkel F, Keyvani H, Esghaei M, Panahi M, Zamani F et al. Epstein-Barr virus molecular epidemiology and variants identification in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Prev.* 2020;29(6):523-530.
258. Carpén T, Syrjänen S, Jouhi L, Randen-Brady R, Haglund C, Mäkitie A et al. Epstein-Barr virus (EBV) and polyomaviruses are detectable in oropharyngeal cancer and EBV may have prognostic impact. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(8):1615-1626.
259. Banko AV, Lazarevic IB, Folic MM, Djukic VB, Cirkovic AM, Karalic DZ et al. Characterization of the Variability of Epstein-Barr Virus Genes in Nasopharyngeal Biopsies: Potential Predictors for Carcinoma Progression. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153498.
260. Polz-Gruszka D, Morshed K, Stec A, Polz-Dacewicz M. Prevalence of Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in south-eastern Poland. *Infect Agent Cancer.* 2015;10:37.

261. Xu FH, Xiong D, Xu YF, Cao SM, Xue WQ, Qin HD et al. An epidemiological and molecular study of the relationship between smoking, risk of nasopharyngeal carcinoma, and Epstein-Barr virus activation. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(18):1396-410.
262. Fang CY, Lee CH, Wu CC, Chang YT, Yu SL, Chou SP et al. Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2009;124(9):2016-25.
263. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, Iwamasa T, Arasaki A et al. Epstein-Barr virus (EBV)-related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in southern Japan--simultaneously infected with human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol.* 2003;39(4):405-14.
264. Nasher AT, Al-Hebshi NN, Al-Moayad EE, Suleiman AM. Viral infection and oral habits as risk factors for oral squamous cell carcinoma in Yemen: a case-control study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(5):566-572.e1.
265. Acharya S, Ekalaksananan T, Vatanasapt P, Loyha K, Phusingha P, Promthet S et al. Association of Epstein-Barr virus infection with oral squamous cell carcinoma in a case-control study. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(4):252-7.
266. Drop B, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Polz-Dacewicz M. Coinfection with Epstein-Barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPyV) in Laryngeal, Oropharyngeal and Oral Cavity Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2752.
267. Broccolo F, Ciccarese G, Rossi A, Anselmi L, Drago F, Toniolo A. Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in keratinizing versus non-keratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Infect Agent Cancer.* 2018;13:32.
268. González-Moles M, Gutiérrez J, Ruiz I, Fernández JA, Rodríguez M, Aneiros J. Epstein-Barr virus and oral squamous cell carcinoma in patients without HIV infection: viral detection by polymerase chain reaction. *Microbios.* 1998;96(383):23-31.
269. Mahalingam KK, Sankar LS, Masthan KM, Mahalakshmi K, Kumar VN. Epstein-Barr viral load in exfoliated cells of oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders-A cross-sectional study. *Journal of Clinical Virology Plus.* 2021;1(4):100051.
270. Kikuchi K, Inoue H, Miyazaki Y, Ide F, Kojima M, Kusama K. Epstein-Barr virus (EBV)-associated epithelial and non-epithelial lesions of the oral cavity. *Jpn Dent Sci Rev.* 2017;53(3):95-109.
271. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol.* 1982;10(2):91-9.
272. Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(7-8):865-76.
273. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene.* 2003;22(33):5192-200.
274. Polz D, Morshed K, Stec A, Podsiadło Ł, Polz-Dacewicz M. Do polyomavirus hominis strains BK and JC play a role in oral squamous cell carcinoma? *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(1):106-9.
275. Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nিকেleit V, Webster-Cyriaque J. Replication of oral BK virus in human salivary gland cells. *J Virol.* 2014;88(1):559-73.
276. Muñoz JP, Blanco R, Osorio JC, Oliva C, Diaz MJ, Carrillo-Beltrán D et al. Merkel cell polyomavirus detected in head and neck carcinomas from Chile. *Infect Agent Cancer.* 2020;15:4.
277. Herberhold S, Hellmich M, Panning M, Bartok E, Silling S, Akgül B et al. Human polyomavirus and human papillomavirus prevalence and viral load in non-malignant tonsillar tissue and tonsillar carcinoma. *Med Microbiol Immunol.* 2017;206(2):93-103.

278. Hämetoja H, Hagström J, Haglund C, Bäck L, Mäkitie A, Syrjänen S. Polyomavirus JCPyV infrequently detectable in adenoid cystic carcinoma of the oral cavity and the airways. *Virchows Arch.* 2019;475(5):609-616.
279. Stevenson PG, May JS, Connor V, Efstathiou S. Vaccination against a hit-and-run viral cancer. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 9):2176-85.
280. Shi Y, Peng SL, Yang LF, Chen X, Tao YG, Cao Y. Co-infection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in human tumorigenesis. *Chin J Cancer.* 2016;35:16.
281. McCloskey R, Menges C, Friedman A, Patel D, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation. *J Virol.* 2010;84(10):5131-9.
282. Gupta I, Jabeen A, Al-Sarraf R, Farghaly H, Vranic S, Sultan AA et al. The co-presence of high-risk human papillomaviruses and Epstein-Barr virus is linked with tumor grade and stage in Qatari women with breast cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2021;17(4):982-989.
283. Makielski KR, Lee D, Lorenz LD, Nawandar DM, Chiu YF, Kenney SC et al. Human papillomavirus promotes Epstein-Barr virus maintenance and lytic reactivation in immortalized oral keratinocytes. *Virology.* 2016;495:52-62.
284. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A et al. Committee for Neck Dissection Classification, American Head and Neck Society. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134(5):536-8.
285. Eric KH, Rii M. Handbook of Evidence-based radiation [Internet]. 2nd ed. Portland, Oregon, USA Springer; 2010 [citirano 10 avgusta 2021]. Dostupno na: [http://203.157.203.2/archivesImages/2557/138errand/55116\\_51\\_o.pdf](http://203.157.203.2/archivesImages/2557/138errand/55116_51_o.pdf)
286. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics, Head and Neck Tumours. Lyon, France: IARC press; 2005 [citirano 15 januara 2022.]. Dostupno na: <https://screening.iarc.fr/doc/BB9.pdf>
287. Nagel R, Martens-de Kemp SR, Buijze M, Jacobs G, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol.* 2013;49(6):560-6.
288. Klebanov N. Genetic Predisposition to Infectious Disease. *Cureus.* 2018;10(8):e3210.
289. Gimenes F, Teixeira JJ, de Abreu AL, Souza RP, Pereira MW, da Silva VR et al. Human leukocyte antigen (HLA)-G and cervical cancer immunoediting: a candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(2):576-89.
290. Laytragoon-Lewin N, Cederblad L, Andersson BÅ, Olin M, Nilsson M, Rutqvist LE et al. Single-Nucleotide Polymorphisms and Cancer Risk, Tumor Recurrence, or Survival of Head and Neck Cancer Patients. *Oncology.* 2017;92(3):161-169.
291. Morales P, Corell A, Martínez-Laso J, Martín-Villa JM, Varela P, Paz-Artal E et al. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. *Immunogenetics.* 1993;38(5):323-31.
292. Yamashita T, Fujii T, Watanabe Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T et al. HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics.* 1996;44(3):186-91.
293. Castelli EC, de Almeida BS, Muniz YCN, Silva NSB, Passos MRS, Souza AS et al. HLA-G genetic diversity and evolutive aspects in worldwide populations. *Sci Rep.* 2021;11(1):23070.
294. Ferguson R, Ramanakumar AV, Richardson H, Tellier PP, Coullée F, Franco EL et al. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence. *Hum Immunol.* 2011;72(4):337-41.

295. Ferguson R, Ramanakumar AV, Koushik A, Coutlée F, Franco E, Roger M; Biomarkers of Cervical Cancer Risk Study Team. Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. *Int J Cancer*. 2012;131(3):E312-9.
296. Sarmah N, Baruah MN, Baruah S. Immune Modulation in HLA-G Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Relation to Human Papilloma Virus Positivity: A Study From Northeast India. *Front Oncol*. 2019;9:58.
297. Jaakola A, Roger M, Faucher MC, Syrjänen K, Grénman S, Syrjänen S et al. HLA-G polymorphism impacts the outcome of oral HPV infections in women. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):419.
298. Smith MA, Tellier PP, Roger M, Coutlée F, Franco EL, Richardson H. Determinants of human papillomavirus coinfections among Montreal university students: the influence of behavioral and biologic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(5):812-22.
299. McAulay KA, Higgins CD, Macsween KF, Lake A, Jarrett RF, Robertson FL et al. HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J Clin Invest*. 2007;117(10):3042-8.
300. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:587-617.
301. Li Q, Cohen JI. Epstein-Barr Virus and the Human Leukocyte Antigen Complex. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2019;6(3):175-181.
302. Niens M, Jarrett RF, Hepkema B, Nolte IM, Diepstra A, Platteel M et al. HLA-A\*02 is associated with a reduced risk and HLA-A\*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2007;110(9):3310-5.



# Prilog 1

Dobijene nukleotidne sekvence HPV pozitivnih izolata

Broj protokola	Nukleotidne sekvence	HPV tip
12847 (FFPE)	TTTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGC TGCCATATCTACTTCAGAACCTACATATAAAAATACTAACTTTAAAGAGTA CCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAA	16
11227 (FFPE)	TTTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCT TCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAATTTAAGCAGT ATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCA	18
4833 (FFPE)	TTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTT CTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCGATATGATGCTACCAATTTAAGCAGT ATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC	18
6002 (FFPE)	TTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTT CTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAATTTAAGCAGT ATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCA	18
4823 (FFPE)	TTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTG CCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACC TACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAA	16
2980 (FFPE)	TTTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCT GCCATATCTACTTCAGAACCTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTAC CTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC	16
1997 (FFPE)	TTTTGTTTGTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACCAACATGACATTATG TGCATCCGTAACCTACATCTTCCACATACACCAATTCTGATTATAAAGAGTAC ATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAA	6
7022 (FFPE)	GTGTTTGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAG TACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATAT GATGCTACCAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGT	18
9980 (FFPE)	TTTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCT TCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAATTTAAGCAGT ATAGCAGACATGTGAGGAATATGATTTACAGTTTATT	18
3386 (FFPE)	TTTGTTACAGTTGTTACAGTTGTAGATACTACCCGAGTACCAATATTACTA TTTCAGCTGCTACACAGGTAATGAATACACAGCCTCTAACTTTAAGG AATACCTCCGCCACACAGAGGAATATGACTTACAG	83
3060 (FFPE)	TTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTG CCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACC TACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC	16
11363 (FFPE)	ATATTCCTTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTAT GTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGG AGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAA	16
11637 (FFPE)	TTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTG CCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACC TACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCA	16
9984 (FFPE)	GTGTTTGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAG TACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATAT GATGCTACCAAATT	18
15199 (svježi uzorak)	TGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCC ATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTA CGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTT	16
8712 (svježi uzorak)	TTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTT CTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAATTTAAGCAGT ATAGCAGACATGTTGAAGAATATGATTTGCAGTTTATTTTTTC	18
12322 (svježi uzorak)	TTTTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCT GCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTAC CTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAA	16

<b>2564209</b> (svježi uzorak)	TTGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGC CATATCTACTTCAGGAACCTACAGTATGAAAAATACTAACTTTAAAGAGTA CCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTC	<b>16</b>
<b>17339</b> (svježi uzorak)	TTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTTCTG CCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAAGAGTACC TACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTC	<b>16</b>
<b>4336</b> (svježi uzorak)	TTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCTTTATGTGCTGCCATATCTACTTC AGAAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGA GGAATATGATTTACAGTTTATTTTTC	<b>16</b>
<b>14825</b> (svježi uzorak)	TTGTTACTGTGGTAGATACTACCCGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGC CATATCTACTTCAGAAACTACTTATAAAAAATACTAACTTTGAGGAGTACCTA CGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTC	<b>16</b>
<b>4411</b> (svježi uzorak)	TTTTGTTACTGTGGTAGATACTACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCT TCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAATTTAAGCAGT ATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTC	<b>18</b>
<b>14657</b> (svježi uzorak)	GTATTTGTTACTGTTGTGGATACTACCAGAAGTACCAACATGACTATTAATG CAGCTAAAAGCACATTAATAAATATGATGCACGTGAAATCAATCAATACC TTCGCCATGTGGAGGAATATGAACTACAGTTTGTGTTTC	<b>66</b>
<b>4179</b> (svježi uzorak)	TTTTGTTTTTGTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACCAACATGACATTA TGTGCATCCGTAACCTACATCTTCCACATACACCAATTCTGATTATAAAGAGT ACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAAT	<b>6</b>

## Prilog 2

Dobijene nukleotidne sekvence HLA-G tipova u uzorcima tkiva karcinoma larinksa

Broj protokola	HLA-G*01:01:01
17339	TTCAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGT GGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGG GCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAG GCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCG AGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGG ACGCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCCC AGACCCTCTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGG CGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTC CAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTA TGCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGG ACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCATTGTGGCTGAACAAAGGAG AGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAG ATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTACCAGGGGCAGTGG GGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGGCCTAGCACAAG
Broj protokola	HLA-G*01:01:02
4179	TATTCAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTA CGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCG GGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCA AGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAG CGAGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCAC GGACGCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCG CCAGACCCTCTACCTGGGAGAACCCAGGCGCCTTTACCAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGG GCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCATAACCT CCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGT ATGCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCG GACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGA GAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA GATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCT CAGCCTGGCCT
Broj protokola	HLA-G*01:01:03
868	CAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGG ACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCG CCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCC ACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGC CAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGC CCCGGCTACTCCCGAGTCTCCGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGAC CCTCTACCTGGGAGAACCCAGGCGCCTTTACCAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAGG GCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTG GATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGTTCGCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCT ACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACT GCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCT ACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCT GCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCT GGCCTAGCACAAGGAGAGAG
Broj protokola	HLA-G*01:01:05
3713	CGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGG GTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCACGCA CAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGGGTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGTGA GTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGGCCGGG TACTCCCGAGTCTCCGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACCCTCTA CCTGGGAGAACCCAGGCGCCTTTACCAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGGCGAG GCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGGATGAT TGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTACGATG GCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGCGGCT CAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTACCTGG AGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCG CGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGGCC

<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:04:01</b>
200	TTTCAGCGCCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACG TGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGG GCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAG GCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCG AGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGG ACGCCCGGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCC AGACCTCTACCTGGGAGAACCCAGGGCGCTTTACCAAAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGG GAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCC AGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGCGGACGCCTCATCCGCGGGTATGAACAGTAT GCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGA CACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGA GCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGA TGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCCA GCCTGGCCTAGCACAAGGAGAG
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
2678	TCAGCGCCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTG GACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGG GCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGC CCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAG GCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACG CCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAG CCCTTACCTGGGAGAACCCAGGGCGCTTTACCAAAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAG GGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCATACCCTCCAGTG GATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGCGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCT ACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACT GCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCT ACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCT GCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCT
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
3572	TCCATGAGGTATTTTCAGCGCCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGC CATGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGA TGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACG GAACACCAAGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTAC AACCAGAGCGAGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCC ATGCCCCACGGACGCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCG GGGACCCGCCAGACCCTTACCTGGGAGAACCCAGGGCGCCTTTACCAAAAATCCCTGCGGG TGGGTCCGGGCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTT TCATACCCTCCAGTGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGCGCCTCCTCCGCGGGT ATGAACAGTATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGG ACCGCAGCGGACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGA ACAAAGGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAAC GGGAAGGAGATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGT AGACCTCCAGCCTGGCCTAGCACAAGGAGAG
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
4336	TCCATGAGGTATTTTCAGCGCCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGC CATGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGA TGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACG GAACACCAAGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTAC AACCAGAGCGAGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCC ATGCCCCACGGACGCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCG GGGACCCGCCAGACCCTTACCTGGGAGAACCCAGGGCGCCTTTACCAAAAATCCCTGCGGG TGGGTCCGGGCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTT TCATACCCTCCAGTGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGCGCCTCCTCCGCGGGT ATGAACAGTATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGG ACCGCAGCGGACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGA ACAAAGGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAAC GGGAAGGAGATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGT AGACCTCCAGCCTGGCCTAGCACAAGGAGAG

<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
4411	<p> GCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGAC  GACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC  GTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCA  CGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC  AGTGAGTAACTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGGCC  CGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACCC  TCTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG  CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG  ATGATTGGTGCACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA  CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG  CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA  CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG  CAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTG  GCCTAGCACAAGGAGAG </p>
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
4259	<p> TCAGCGCCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTG  GACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGG  GCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGC  CCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAG  GCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACG  CCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAG  CCCTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACAAAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAG  GGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCATACCCTCCAGTG  GATGATTGGTGCACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGTATGCCT  ACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACT  GCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCT  ACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCT  GCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCCCAGCCT  GGCTAGCACAAGGAGAG </p>
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
15199	<p> GCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGAC  GACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC  GTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCA  CGCACAGACTGACAGAATTGACCTGCAGACCCTGGGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC  AGTGAGTAGCCCCGGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCC  CCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACC  CTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACAAAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG  CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCATACCCTCCAGTGG  TGATTGGTGCACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTAC  GATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGC  GGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTAC  CTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGC  AGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGG  CCTAGCACAA </p>
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:03:01</b>
5763	<p> CGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACG  ACTCGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC  TGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCAC  GCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCA  GTGAGTAAACCCCTGCCAGGGCGCAGATCACGACACCCACCTCCATGCCCCACGGACGGCC  GGTACTCCTGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACCCT  CTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACAAAAATCCCTGCGGGTGTGTCCGGGCGAGGGC  GAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGGAT  GATTGGTGCACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTACG  ATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGCG  GCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTACCT  GGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAG  CGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCCCAGCCTGGCC  TAGCACAAGGAGAG </p>

<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>8712</b>	CGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACG ACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCG TGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCAC GCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCA GTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCCC CGGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACCC TCTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG ATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG CAGCGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTG GCCTAGC
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>9099</b>	CGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACG ACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCG TGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCAC GCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCA GTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCCC CGGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACCC TCTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG ATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG CAGCGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTG GCCTAG
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>13022</b>	CGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACG ACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCG TGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCAC GCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCA GTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCCC CGGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACCC TCTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG ATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG CAGCGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTG GCCTAGCACA
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>12322</b>	ATTCAGCGCCGCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTAC GTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCG GGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAA GGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGC GAGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACG GACGCCCCGGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCC CAGACCCTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGG GCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCT CCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGT ATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCG GACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGA GAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA GATGCTGACGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCT CAGCCTGGCC

<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>7458</b>	TCAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTG GACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGG GCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGC CCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAG GCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGAC GCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAG ACCCTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCG AGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGTGACCGAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCA GTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATG CCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGAC ACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAG CCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGAT GCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAG CCTGGCCTAGCACAAG
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:04:01</b>
<b>15579</b>	GCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGAC GACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC GTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCA CGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC AGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCC CCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACC CTCTACCTGGGAGAACCCCGGCCCTTTACCAAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG ATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCATCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG CAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTG GCC
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>17784</b>	TTCAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGT GGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGG GCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAG GCCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCG AGGCCAGTGAGTAACCTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGA CGCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCCA GACCCTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGC GAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCC AGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTAT GCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGA CACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGA GCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGA TGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCA GCCTGGCCTAGCACAAGG
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
<b>4699</b>	GGTATTTTCAGCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGC TACGTGGACGACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCC GCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACAC CAAGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAG AGCGAGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCC ACGGACGCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCC GCCCAGACCCTTACCTGGGAGAACCCAGGCGCCTTTACCAAAATCCCTGCGGGTGGGTCC GGGCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCATAAC CTCCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACA GTATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAG CGGACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAG GAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAG GAGATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCT CTCAGCCTGG

<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>3937</b>	TCAGCGCCCGCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTG GACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGG GCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGC CCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAG GCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGAC GCCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAG ACCCTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCG AGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCA GTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATG CCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGAC ACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAG CCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGAT GCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAG CCTGGCCTAGC
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>5007</b>	GCGCCGCGCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGAC GACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC GTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCA CGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC AGTGAGTAACTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGGCC CGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACCC TCTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG ATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG CAGCGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTG GCCTAGCACA
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>14126</b>	CCGCCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACGAC ACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTG GGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCACGC ACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGT GAGTAACTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGGCCCCG GTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACCCTCT ACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGGCG AGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGGATG ATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTACGA TGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGCGG CTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTACCTG GAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGC GCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGGCCT AGCACA
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
<b>17035</b>	AGCGCCCGCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGA CGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGC CGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCC ACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGC CAGTGAGTAACTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGGC CCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCGCGGGACCCGCCAGACC CTTACCTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGG GCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTG GATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCT ACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACT GCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCT ACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCT GCAGCGCGGGTACCAGGGGCAGTGGGGCGCCTCCTGATCTCCTG



<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:02</b>
5937	GCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGAC GACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC GTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCAGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCA CGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC AGTGAGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCC CCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACC CTCTACCTGGGAGAACCCAGGGCCTTTACAAAAATCCCTGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTCCAGTGG ATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTA CGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGGCCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTG CGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTA CCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTG CAGCGCGGGTACCAGGGCAGTGGGGCGCC
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
16023	GCGCCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGAC GACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCC GTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCA CGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC AGTGAGTAACCCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGGCC CGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACC TCTACTGGGAGAACCCCAAGGCGCTTTACAAAAATCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGG CGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACCCCCTCCAGTGG TGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTAC GATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGC GGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTAC CTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGC AGCGCGGGTACCAGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGG CCTAGCACAAGGAGAG
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
14657	AGGTATTTACGCGCCCGCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGG CTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGC CGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACA CCAAGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCA GAGCGAGGCCAGTGAAGTAACTCCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCC ACGGACGGCCCGGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCCGAGGCCGCGGGACCC GCCAGACCCTTACTGGGAGAACCCCAAGGCGCTTTACAAAAATCCCGCGGGTGGGTCT CGGGCAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACAC CCTCCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAAC AGTATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCA GCGGACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGCCAATGTGGCTGAACAAA GGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAA GGAGATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACC TCTCAGCCTGGCCTAGCACAAGGA
<b>Broj protokola</b>	<b>HLA-G*01:01:01</b>
14825	TATTTACGCGCCCGCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTA CGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGC GGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCA AGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAG CGAGGCCAGTGAGTAACTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACG GACGGCCCGGTACTCCCGAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCC CAGACCCTTACTGGGAGAACCCCAAGGCGCCTTTACAAAAATCCCGCGGGTGGGTCCCG GCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACCCCCT CCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCCGCGGGTATGAACAGT ATGCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGC GACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAACAAAGGA GAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA GATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGCAGTGGGGCGCCTCCCTGA

Broj protokola	HLA-G*01:01:01
375	CGCCGTGTCCC GGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACGACA CGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGG GTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCACGCA CAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGTG AGTAACCCCGGCCAGGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGGACGCCCCGG GTA CTCCCAGTCTCCGGGTCTGGGATCCACCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACCCTCT ACCTGGGAGAACCCEAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGGCGAGGGCG AGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTACCCCTCCAGTGGATG ATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTATGCCTACGA TGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGGACACTGCGG CTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGCCAATGTGGCTGAACAAAGGAGAGCCTACCTG GAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGC GCGCGGTACCAGGGGAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGGCCT AGCACAAGGAGAGGA
Broj protokola	HLA-G*01:01:01
2564209	GTATTTACAGCGCCCGTGTCCC GGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCT ACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCG CGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACC AAGGCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGA GCGAGGCCAGTGAGTAACTCCGGCCAGGGAGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCAC GGACGGCCCGGGTACTCCCAGTCTCCGGTCTGGGATCCACCCGAGGGCGGGACCCCG CCAGACCCTTACCTGGGAGAACCCEAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCG GGCGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCT CCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGT ATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCG GACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCAATGTGGCTGAACAAAGGA GAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA GATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCT CAGCCTGGCCTAGCACAAGGAGAG
Broj protokola	HLA-G*01:01:01
17339	TTCAGCGCCCGTGTCCC GGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGT GGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGG GCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAG GCCCACGCACAGACTGACAGAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCG AGGCCAGTGAGTAACCCCGGCCAGGGCGCAGATCACGACCCCCACCTCCATGCCCCACGG ACGCCCCGGGTACTCCCAGTCTCCGGTCTGGGATCCACCCGAGGGCGGGACCCGCC AGACCCTTACCTGGGAGAACCCEAAGGCGCCTTTACCAAAAATCCCCGCGGGTGGGTCCGGG CGAGGGCGAGGCTCGGTGGGCGGGGCTGACCGAGGGGGTGGGGCCAGGTTCTCACACCCTC CAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTA TGCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCAGCGG ACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGCAAGTGTGAGGCGGCCATTGTGGCTGAACAAAGGAG AGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAG ATGCTGCAGCGCGGGTACCAGGGGAGTGGGGCGCCTCCCTGATCTACCAGGGGAGTGG GGCGCCTCCCTGATCTCCTGTAGACCTCTCAGCCTGGCCTAGCACAAG

## Spisak skraćenica korištenih u tekstu

AIDS - engl. Acquired immunodeficiency syndrome

AJCC - engl. American Joint Committee on Cancer

APĆ - antigen prezentujuće ćelije

BKV - BK poliomavirus

CD4+ T - pomoćnički T limfociti

CD8+ T - citoskični T limfociti

Ct - engl. Cycle Threshold

CT – kompjuterizovana tomografija

ddNTP - didezoksiribonukleotid trifosfat

dNTP - dezoksiribonukleotid trifosfat

E gen - engl. early gen

EA - engl. Early antigen

EBER - engl. EBV-encoded small RNAs

EBNA - engl. EBV nuclear antigen

EBV - Epštajn-Bar virus

EF2 – faktor elongacije translacije

FFPE - engl. Formalin fixed paraffin embedded

GAPDH - engl. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

gp - glikoprotein

H - histon

hGH - engl. human growth hormone

HHV-8 - humani herpes virus tip 8

HLA - engl. Human Leukocyte Antigen

HNSCC - engl. Head and neck squamous cell carcinoma

HPV - humani papiloma virus

IARC – engl. International Agency for Research on Cancer; Međunarodna agencija za istraživanje raka

IFN - interferon

IL – interleukin

IRF-1 - interferon regulatornog faktora 1

JCV - JC poliomavirus

KI poliomavirus - Karolinska Institute polyomavirus

L gen – engl. Late gene

LMA - engl. Late membrane antigen

LMP - engl. Latent membrane antigen

MC - engl. Merkel cell

MHC - engl. major histocompatibility complex

miRNA - mala nekodirajuća molekula RNK

MR - magnetna rezonanca

MW poliomavirus - Malawi polyomavirus

NF-κB - nuklearni faktor kapa B

NK ćelije - ćelije prirodne ubice

ORF – otvoren okvir za čitanje

PCR - engl. Polymerase chain reaction

PET-CT – pozitronska emisiona tomografija

PML - engl. Progressive multifocal leukoencephalopathy

ROS – reaktivni oblici kiseonika

SIL - skvamozne intraepitelne lezije

SNP - jednonukleotidni polimorfizam, engl. Single nucleotide polymorphism

T Ag - tumorski antigen

TNF - tumor nekrotizirajući faktor

TNM - klasifikacija prema Američkom udruženju za karcinome (AJCC): T, primarni tumor; N, zahvaćenost limfnih nodusa; M, metastaze

TS poliomavirus - Trichodysplasia polyomavirus

UICC - Union Internationale Contre le Cancer

UKC - Univerzitetsko-klinički centar

URR - uzvodno regulatorni region

UTR - engl. untranslated region

VCA - engl. Viral capsid antigen

VP - virusni strukturni protein

**Spisak skraćenica naziva aminokiselina**

Aminokiselina	Skraćenica
Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginska kiselina	Asp
Cistein	Cys
Glutaminska kiselina	Glu
Glutamin	Gln
Glicin	Gly
Histidin	His
Izoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lizin	Lys
Metionin	Met
Fenilalanin	Phe
Orilin	Pro
Serin	Ser
Treonin	Thr
Triptofan	Trp
Tirozin	Tyr
Valin	Val

## **Biografija**

Ljiljana Božić rođena je u Banjaluci 21. maja 1986. godine od majke Jadranke i oca Momira. Osnovnu školu „Branko Radičević“ i Medicinsku školu završila je u Banjaluci. Kao najbolji učenik i u osnovnoj i u srednjoj školi dobija nagradu „Sveti Sava“.

Medicinski fakultet (studijski smjer stomatologija) Univerziteta u Banjaluci kao redovan student upisala je akademske 2005/06. godine, a diplomirala je u martu 2012. godine sa prosječnom ocjenom 9,14. U periodu 2012-2013. godine volontira u privatnoj stomatološkoj ambulanti i Javnoj-zdravstvenoj ustanovi „Dom zdravlja“ Laktaši kao doktor stomatologije.

Od oktobra 2013. do februara 2014. godine zaposlena je kao nastavnik stručne grupe predmeta u Medicinskoj školi u Banjaluci. Od februara 2014. godine je zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju u zvanju asistenta, te od jula 2017. godine u zvanju višeg asistenta.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2014/2015. akademske godine, modul Molekularna medicina.

U periodu 2020-2021. učestvuje na projektu „Nanokompoziti na bazi pirofilita: kinetički aspekti otpuštanja bioaktivnih molekula“ (finansijer Ministarstvo za naučnotehnološki razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske, br. 1259042). Tokom pandemije virusa SARS Covid-19 učestvuje u serološkom testiranju –Studija seroprevalencije infekcije korona virusom u Republici Srpskoj koju sufinansiraju Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske i Državna kancelarija Svjetske zdravstvene organizacije za Bosnu i Hercegovinu (br. 202604001).

Autor i koautor je ukupno 17 naučnih i stručnih radova.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Љиљана Божић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ MM-09/14 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**„Утврђивање повезаности инфекција онкогеним вирусима и ХЛА-Г полиморфизама у етиологији карцинома главе и врата“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25. 3. 2022.

Љиљана Божић

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Љиљана Божић

Број индекса ММ-09/14

Студијски програм Докторске академске студије, модул: Молекуларна медицина

Наслов рада „Утврђивање повезаности инфекција онкогеним вирусима и ХЛА-Г полиморфизама у етиологији карцинома главе и врата“

Ментор проф др. Александра Кнежевић

Потписани/а Љиљана Божић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 25. 3. 2022.

Потпис докторанда

*Љиљана Божић*

\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Утврђивање повезаности инфекција онкогеним вирусима и ХЛА-Г полиморфизама у етиологији карцинома главе и врата“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

*Јована Божич*

У Београду, 25. 3. 2022.

---

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.