

Učestalost infekcije HPV-om visokog rizika u premalignim lezijama vrata maternice

Mačukat, Dorjana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:865451>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Dorjana Mačukat

**Učestalost infekcije HPV-om visokog rizika u
premalignim lezijama vrata maternice**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Opća klinička biokemija 1, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na zavodu za Medicinsku biokemiju i hematologiju i Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Marije Grdić Rajković i doc. dr. sc. Dražana Butorca.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mariji Grdić Rajković i mentoru doc. dr. sc. Dražanu Butorcu na trudu, stručnim savjetima i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Veliko hvala roditeljima i sestri na pomoći tijekom studiranja te baki Boženi koja se najviše veselila mojim uspjesima.

Posebno se zahvaljujem mojem dečku Borni koji mi je bio najveća podrška tijekom studiranja, ali i u životu, a svojim savjetima je pomogao prilikom izrade rada. Također hvala mojim prijateljima, koji su mi uveselili studentske dane te dečkovim roditeljima na brizi i razumijevanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. POVIJESNI PREGLED	1
1.2. TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA HPV-a	3
1.3. STRUKTURA VIRUSNE ČESTICE I ORGANIZACIJA GENOMA	5
1.4. ŽIVOTNI CIKLUS HPV-A	7
1.4.1. HPV infekcija	7
1.4.2. Adsorpcija, internalizacija i razgradnja kapside	8
1.4.3. Replikacija, održavanje genoma i amplifikacija	9
1.4.4. Formiranje i otpuštanje viriona	11
1.5. MEHANIZAM KARCINOGENEZE	12
1.6. PRIRODNI TIJEK HPV INFEKCIJE I KOFAKTORI RIZIKA PERZISTENTNE INFEKCIJE VISOKORIZIČNIM TIPOM HPV-A	14
1.7. PREMALIGNNE LEZIJE VRATA MATERNICE (CIN)	16
1.7.1. Citološke i patohistološke karakteristike premalighnih lezija	16
1.7.1.1. CIN 1	17
1.7.1.2. CIN 2	18
1.7.1.3. CIN 3	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Ispitanice	20
3.2. Metoda određivanja tipa HPV-a	21
4. REZULTATI	22
5. RASPRAVA	31
5.1. PREVALENCIJA HPV INFEKCIJE U HRVATSKOJ I SVIJETU	31
5.1.1. Prevalencija HPV infekcije u žena s normalnom citologijom	31
5.1.2. Prevalencija tipova HPV-a u premalighnim lezijama (LSIL, HSIL) i karcinomu vrata maternice i potencijal progresije u karcinom	31
5.1.3. Geografska distribucija tipova HPV-a u karcinomu vrata maternice po kontinentima	34
5.1.4. Prevalencija tipova HPV u Hrvatskoj	35
5.2. USPOREDBA REZULTATA S PODACIMA DRUGOG ISTRAŽIVANJA U HRVATSKOJ	37
6. ZAKLJUČAK	41
7. LITERATURA	42
8. SAŽETAK/SUMMARY	49
8.1. Sažetak	49
8.2. Summary	51
9. PRILOZI	53
9.1. Popis kratica	53
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. POVIJESNI PREGLED

Zapis o kožnim i genitalnim lezijama uzrokovanim HPV-om (humanim papiloma virusom) potječe još iz doba antičke Grčke. U 4. stoljeću prije Krista Hipokrat je prvi opisao genitalne i kožne bradavice te cervikalnu neoplaziju (Mammas i sur., 2014). Za genitalne bradavice se koristio naziv kondilom (grč. okrugli tumor), a na kraju 19. stoljeća se uvriježio naziv *condyloma accuminatum* (lat. šiljasti kondilom) (Karamanou i sur., 2010; Syrjänen i sur., 2008). Rigoni-Stern je 1842. prvi uočio povezanost karcinoma vrata maternice i spolnog kontakta, proučavajući uzrok smrti žena u Veroni te otkrivši da je učestalost karcinoma znatno veća kod udanih žena i udovica nego kod časni i djevojaka koje nisu imale spolni odnos. O zaraznoj prirodi kožnih kondiloma je izvjestio Payne 1891., a desetak godina kasnije Heidingsfield je uočio zarazni način prijenosa i za genitalne kondilome (Syrjänen SM i Syrjänen KJ, 2008). Virusnu etiologiju kondiloma dokazao je 1907. Giuseppe Ciuffo na temelju pokusa kojim je uspješno inokulirao na kožu ekstrakt kondiloma, iz kojeg su filtracijom bili uklonjeni bakterije i gljivice, ali ne i virusi (Berkefeld filter) te tako uspio prenijeti zarazu (Karamanou i sur., 2010). Rous i suradnici su 30-ih godina prošlog stoljeća dokazali kancerogeni potencijal HPV-a, odnosno singerističko djelovanje papilomavirusa u divljeg kunića (CRPV - engl. *cottontail rabbit papillomavirus*) i kemijskih kancerogena u malignoj transformaciji kožnog kondiloma (Syrjänen SM i Syrjänen KJ, 2008).

Važnu povijesnu ulogu ima i Nicholas Papanicolaou koji je 1928. proučavao prekancerozne lezije u vaginalnim razmazima, što je dovelo do razvoja Papa testa koji je ubrzo postao standard u probiru karcinoma vrata maternice (Tan i Tatsumura, 2015). 1949. je elektronskim mikroskopom prvi put viđena virusna čestica HPV-a u kožnim bradavicama čovjeka (Strauss i sur., 1949), a do kraja 60-ih godina 20. stoljeća i u genitalnim bradavicama (Syrjänen SM i Syrjänen KJ, 2008). Na početku druge polovice 20. stoljeća Ayre opisuje morfologiju tzv. halo stanica otkrivenih Papa testom (skvamozne epitelne stanice čije su jezgre okružene svijetlom zonom) te ih naziva prekanceroznim staničnim kompleksom. Koss i Durfee promatrajući citološke razmaze potvrđuju Ayreovo otkriće te 1956. uvode pojam koilocitna atipija. Promijenjene skvamozne epitelne stanice s povećanim jezgrama i oštro označenom perinuklearnom zonom te perifernim pomicanjem zgusnute strome nazvali su

koilocitima (grč. šuplja stanica), a pronađeni su u obriscima vrata maternice žena oboljelih od displazije te invazivnog karcinoma (Hajdu, 2006; Koss i Dufree, 1956).

Tek 70-ih godina prošlog stoljeća povezanost HPV infekcije i karcinoma vrata maternice prvi put uočava H. zur Hausen, kojeg nazivaju „ocem HPV virologije“ (Mammas i sur., 2014). Zur Hausen 1975. objavljuje hipotezu o HPV-u kao jednom od etioloških čimbenika nastanka karcinoma vrata maternice, a početkom 80-ih godina prošlog stoljeća je sa suradnicima prvi put izolirao nove tipove HPV-a iz anogenitalne regije te došao do otkrića da HPV 6 i HPV 11 uzrokuju genitalne bradavice, a HPV 16 i HPV 18 imaju važnu ulogu u nastanku karcinoma vrata maternice. Upravo će to otkriće kasnije pridonijeti razvoju profilaktičkog cjepiva (Irabor i sur., 2018). Zur Hausen je uvelike pridonio razumijevanju tijeka HPV infekcije, jednako kao i mehanizma karcinogeneze posredovane HPV-om, stoga je 2008. godine dobio Nobelovu nagradu za medicinu zbog otkrića da je humani papiloma virus uzročnik karcinoma vrata maternice (Hadžisejdić i sur., 2010).

1985. istraživano je ugrađivanje genoma HPV-a u genom stanice domaćina, a krajem 80-ih godina prošlog stoljeća otkriveno je da interakcija produkta gena E6 s produktom tumor supresorskog gena p53 te produkta gena E7 s produktom tumor supresorskog gena Rb rezultira njihovim vezanjem i degradacijom. Upravo su te spoznaje bile važne za razumijevanje unutarstaničnih događaja koji vode do besmrtnosti stanica koje nose virusni genom. Transformacija stanica uzrokovana virusnim onkogenima (HPV tip 16) prvotno je prikazana u kulturi stanica glodavaca (NIH3T3), a ubrzo nakon toga i u kulturi stanica keratinocita i fibroblasta čovjeka. U usporedbi s kontrolama, transformirani fibroblasti pokazali su produženi životni vijek, a keratinociti neodređeni životni vijek (zur Hausen, 2009).

90-ih godina prošlog stoljeća dva važna područja istraživanja HPV-a bila su cijepljenje i serologija. Zahvaljujući Kirnbaueru, otkriće proizvodnje čestica nalik virusu (VLP, engl. *virus-like particles*) pomoću L1 proteina, koji je glavni sastojak kapside virusa, odmah je prepoznato kao potencijalna prilika za razvoj seroloških testova za mjerenje antitijela na konformacijske virionske epitope, ali i za razvoj cjepiva za prevenciju HPV-a (Syrjänen SM. i Syrjänen KJ., 2008).

2006. godine razvijeno je profilaktičko cjepivo protiv HPV tipova 6, 11, 16, i 18 (Gardasil®, Merck) te cjepivo protiv HPV tipa 16 i 18 (Cervarix®, GSK). Danas je na tržištu široko primjenjivan Gardasil 9 te sadrži tipove 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58, koji

pokrivanju gotovo sve važnije rakove izazvane ovom grupom virusa. Pripremaju se tehnologijom rekombinantne DNA (deoksiribonukleinska kiselina) iz visoko pročišćenih čestica proteina L1. Čestice nalik virusu ne sadrže virusnu DNA, ne mogu inficirati stanice, razmnožavati se niti uzrokovati bolesti (Matijević, 2007; www.hzjz.hr).

1.2. TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA HPV-a

Humani papiloma virusi (HPV) taksonomski pripadaju obitelji Papillomaviridae, rod Papillomavirus (lat. papilla = bradavica; grč. oma = tumor). Prema klasifikaciji iz 2010. godine, obitelj Papillomaviridae sadrži 29 rodova i 189 izolata humanih papilomavirusa, tj. 120 tipova i papilomaviruse izolirane iz sisavaca (64 tipa), ptica (3 tipa) i reptila (1 tip). Humani papilomavirusi klasificiraju se prema filogenetskom stablu u 5 rodova: Alfa-, Beta-, Gama-, Mu- i Nupapilomavirus (Doorbar i sur., 2012). Rod Alfapapilomavirus povezuje se s karcinomom vrata maternice i genitalnog područja te nastankom genitalnih bradavica, rod Betapapilomavirus s pojavom epidermodisplazije veruciformis, a rodovi Mu- i Nupapilomavirus odgovorni su za nastanak kožnih bradavica (Vince i Židovec-Lepej, 2010). Postoji više od 100 genotipova HPV-a, od kojih 40 vrsta inficira epitel sluznice anogenitalne regije (16 tipova smatra se onkogenima), dok drugi zahvaćaju epitel kože (Munoz i sur., 2004).

S obzirom na tkivo koje inficiraju, humani papilomavirusi dijele se na kožne (kutane), mukokutane i sluzničke (mukozne) tipove.

- Sluznički tipovi HPV-a pokazuju sklonost prema neoroženom mnogoslojnom pločastom epitelu te inficiraju anogenitalni i aerodigestivni trak. Najvažniji genotipovi iz te skupine su: 6, 11, 13, 16, 18, 30-35, 39, 40, 42-45 i 51-69.
- Kožni tipovi HPV-a pokazuju sklonost prema oroženom mnogoslojnom pločastom epitelu i većinom zahvaćaju epitel kože, stoga se rijetko mogu naći na anogenitalnim mjestima ili unutar oralne mukoze. Najvažniji genotipovi su: 4, 7, 10, 26-29, 37, 38, 41, 48 i 49 (Ljubojević i sur., 2007).

S obzirom na onkogeni potencijal, odnosno potencijal izazivanja zloćudne promjene, mukozni tip HPV-a se prije dijelio na tri skupine (niskog, srednjeg i visokog rizika), a danas ga dijelimo na dvije skupine: niskorizični (LR HPV, engl. *low risk*) i visokorizični (HR HPV, engl. *high risk*) (Tablica 1). No, ova podjela nije konačna te se stalno mijenja i nadopunjuje

kako se otkrivaju novi genotipovi (McGraw, 2014; Ljubojević i sur., 2007; Munoz i sur., 2003).

Tablica 1. Podjela HPV-a prema onkogenom potencijalu

HPV niskog rizika (LR HPV)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89
HPV visokog rizika (HR HPV)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

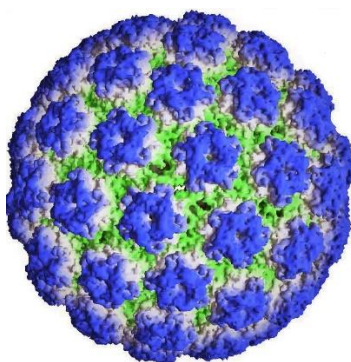
Najčešći niskorizični tipovi su HPV 6 i 11. Uzrokuju 95% benignih genitalnih bradavica (tj. šiljastih kondiloma) i laringealnih papiloma (Vince i Židovec-Lepej, 2010), a javljaju se i u skvamoznim intraepitelnim lezijama niskog stupnja (LSIL, engl. *low-grade squamous intraepithelial lesion*), odnosno CIN 1 (cervikalna intraepitelna neoplazija). Kod infekcije HPV tipovima niskoga rizika, DNA je prisutna u episomalnom obliku i ne ugrađuje se u genom domaćina te dolazi do potpune ekspresije virusa, stanične proliferacije, pojave koilocita i smrti stanica. Sposobnost izazivanja zloćudne promjene je niska, stoga ih se rijetko povezuje s invazivnim karcinomom vrata maternice (Vince i sur., 2010; Audy-Jurković i sur., 2003; Burd 2003).

Najčešći visokorizični tipovi su HPV 16, 18, i 45, visokog su onkogenog potencijala i smatraju se uzrokom karcinoma vrata maternice te ih nalazimo skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog stupnja (HSIL, engl. *high-grade squamous intraepithelial lesion*), odnosno CIN 2 i CIN 3. HPV 16 ima najveći onkogeni potencijal i odgovoran je za otprilike polovinu svih slučajeva karcinoma vrata maternice, a HPV 16 i 18 zajedno uzrokuju više od 70% svih karcinoma vrata maternice širom svijeta (Braaten i Laufer, 2008; Ljubojević i sur., 2007). HPV 16 osim karcinoma vrata maternice uzrokuje i karcinom vagine, vulve, penisa, usne šupljine, orofarinksa i tonzila (IARC, 2012). Visokorizični tipovi se razlikuju od niskorizičnih po tome što se njihova DNA ugrađuje u genom zaraženih stanica (te se pojačava ekspresija virusnih onkogenih E6 i E7), vodi do transformacije stanica (bez kasnije produkcije virusa), proliferacije stanica i klonalne selekcije (Audy-Jurković i sur., 2003).

HPV 25, 53 i 66 za sada se smatraju genotipovima "vjerojatno visokog rizika", dok su tipovi virusa 34, 57 i 83 klasificirani kao oni neodređenog rizika (Ljubojević i sur., 2007).

1.3. STRUKTURA VIRUSNE ČESTICE I ORGANIZACIJA GENOMA

Humani papiloma virus je relativno mali DNA virus, bez ovojnice, promjera 50-60 nm. Virusne čestice sadrže dvolančanu DNA koja je povezana s histonima te uklopljena u ikozaedričnu kapsidu, koja je građena od proteina L1 (glavni protein kapside pošto čini 80% ukupne virusne čestice; mase 55kDa) i L2 (mali protein kapside; mase 70 kDa). Kapsida se sastoji od 72 kapsomere, a svaka kapsomera se sastoji od pentamera, koji odgovara glavnom proteinu kapside L1. Smatra se da pentameri L1 proteina formiraju mreže intra- i interpentamernih disulfidnih interakcija koje stabiliziraju kapsidu (Conway i sur., 2009; IARC 2007; Sapp i sur., 1995). Kapsida sadrži 360 kopija proteina L1 i vjerojatno 12 kopija proteina L2 (Doorbar, 2005).



Slika 1. Model HPV čestice (Preuzeto i modificirano sa:
<http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/hpv-gwb.jpg>)

Virusni genom HPV-a sastoji se od jedne molekule kružne, dvolančane DNA koja sadrži oko 8000 pb (parova baza), a molekularna masa iznosi $5,2 \times 10^6$ Da. Veličina genoma može neznajčajno varirati između različitih tipova HPV-a (Doorbar, 2006).

Genom HPV-a se može podijeliti u tri regije:

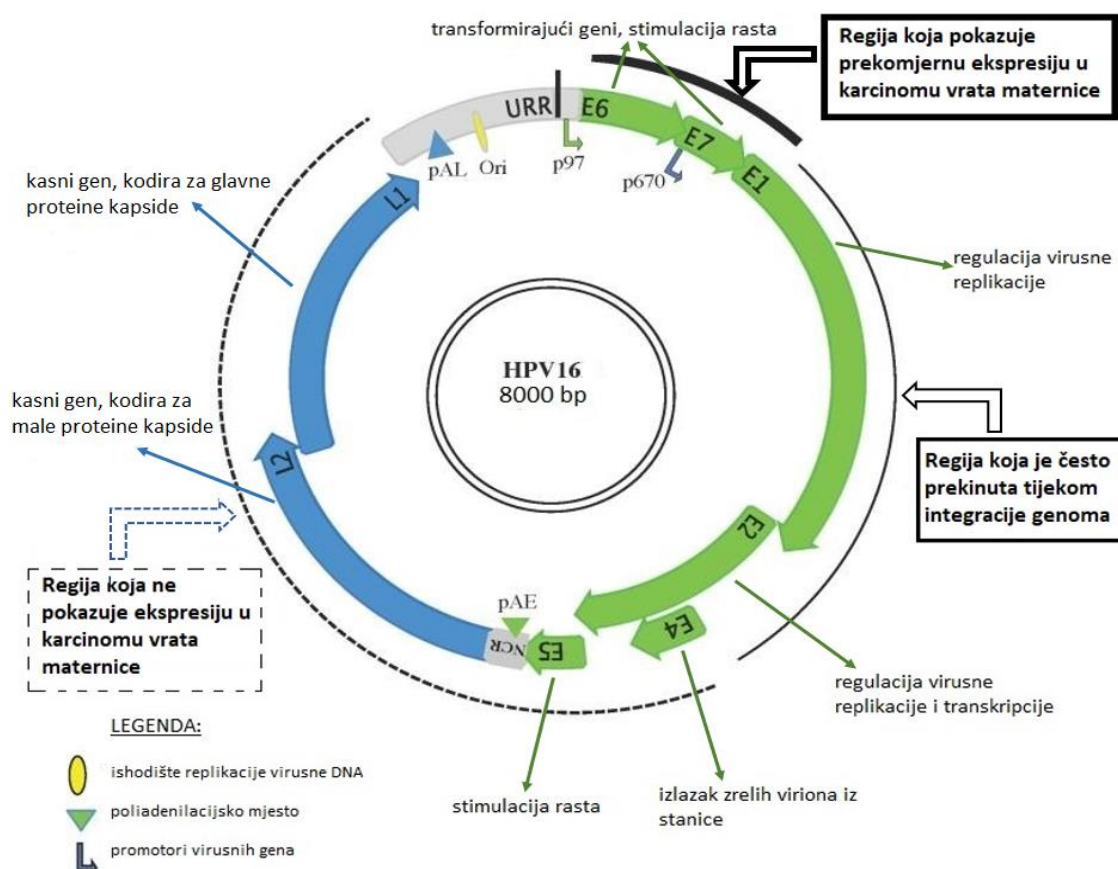
1. Rana regija (engl. *early*, E)
2. Kasna regija (engl. *late*, L)
3. Uzvodna regulatorna regija (engl. *Upstream regulatory region*), poznata kao i dugačka centralna regija (LCR, engl. *Long central region*)

LCR je nekodirajuća regija koja se nalazi između krajnjeg dijela ORF L1 i početnog dijela ORF E6 te sadrži cis elemente odgovorne za regulaciju replikacije i transkripcije nizvodnih sekvenca u ranoj regiji. Unutar LCR se nalazi virusno ishodište replikacije (ori), pojačivač

transkripcije, vezna mjesta za protein E2 te rani virusni promotor p97 (HPV 16). Rani promotor nalazi se uzvodno od E6 gena te potiče transkripciju gena rane regije. Još jedan od elemenata koje nalazimo unutar LCR regije je kasni poliadenilacijski signal (pAL, engl. *late polyadenylation*), dok se rani poliadenilacijski signal (pAE, engl. *early polyadenylation*) nalazi unutar nekodirajuće regije (NCR), smještene između E5 stop kodona i L2 start kodona. LCR ima oko 850 bp te čini 10% genoma (Zheng i Baker, 2006).

Rana regija sadrži šest otvorenih okvira za čitanje, ORF: E1, E2, E4, E5, E6, E7, odnosno sadrži gene koji kodiraju proteine potrebne za virusnu replikaciju i transkripciju, no neki imaju i onkogeno djelovanje (E5, E6, E7). Unutar rane regije, tj. ORF E7 nalazi se kasni promotor p670 (HPV 16) koji je odgovoran za ekspresiju kasnih gena. Za razliku od ranog promotora p97, aktivnost kasnog promotora može se inducirati samo u terminalno diferenciranim keratinocitima. Rana regija ima 4,5 kb te čini 50% virusnog genoma.

Kasna regija se sastoji od dva otvorena okvira čitanja ORF L1 i ORF L2, koji kodiraju za strukturne proteine kapside L1 i L2. Oni su potrebni za formiranje viriona. Kasna regija ima 2,5 kb te čini 40% ukupnog genoma (Zheng i Baker, 2006).



Slika 2. Genom HPV-a i uloga proteina (prema Harari i sur., 2014)

Rani proteini imaju raznolike uloge (Slika 2.). E1 ima helikaznu aktivnost i regulira replikaciju viralne DNA, E2 regulira replikaciju i transkripciju viralne DNA, usmjerava E1 da se veže na ishodište replikacije te je represor E6 i E7 gena, E4 je odgovoran za sastavljanje (pakiranje) i otpuštanje novih virusnih čestica, a E5 stupa u interakciju s EGF (epidermalni faktor rasta) i stimulira staničnu proliferaciju. E6 i E7 su onkoproteini koji zaustavljaju proces diferencijacije keratinocita i omogućuju kontinuiranu replikaciju virusa. E6 inaktivira i razgrađuje tumor supresorski protein p53 (posljedično vodi do inhibicije apoptoze i nakupljanja mutacija) te može aktivirati telomerazu, a E7 veže i inaktivira tumor supresorski protein pRb (retinoblastom) te vodi do progresije staničnog ciklusa. E6 i E7 omogućuju amplifikaciju viralnog genoma u gornjim epitelnim slojevima. Kasni proteini su L1 i L2. L1 je glavni protein kapside, a L2 je mali protein kapside virusne čestice (Doorbar, 2015).

1.4. ŽIVOTNI CIKLUS HPV-A

1.4.1. HPV infekcija

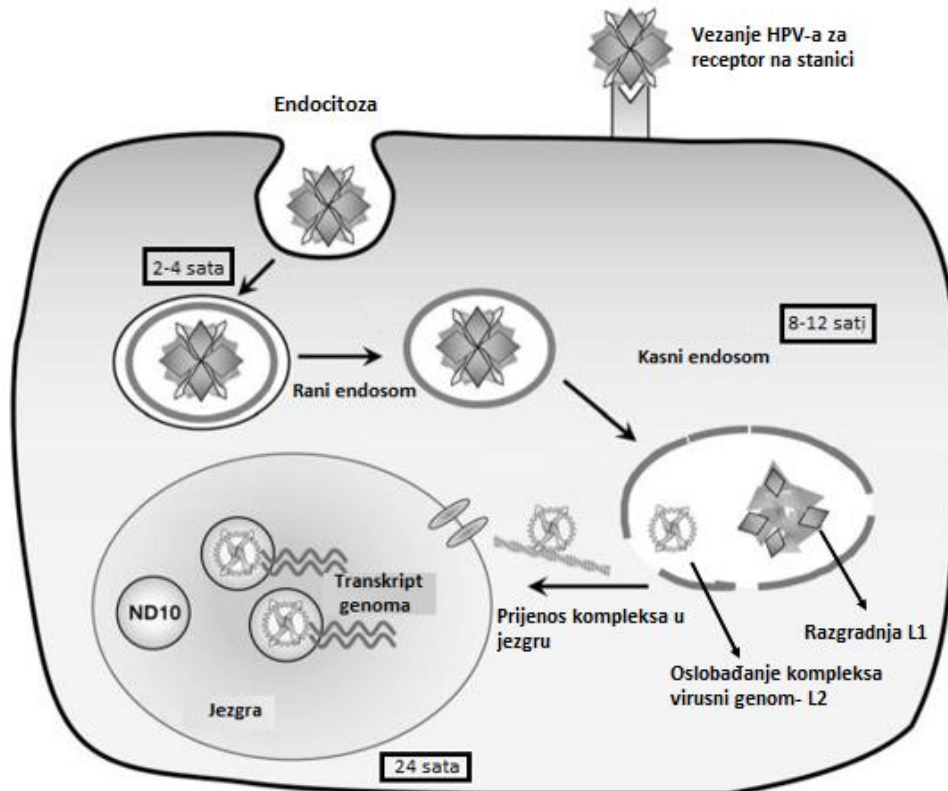
Životni ciklus HPV-a slijedi program diferencijacije epitelne stanice domaćina. Ciklus počinje u bazalnim stanicama, a završava terminalno diferenciranim pločastim stanicama. HPV prvo inficira nediferencirane bazalne epitelne stanice koje su jedine stanice u pločastom epitelu sposobne za dijeljenje, čime se omogućuje uspostavljanje perzistentne (trajne) infekcije, a potom se nove virusne čestice proizvode u diferenciranim stanicama kćeri u najvišim epitelnim slojevima. Međutim, bazalne epitelne stanice nisu lako dostupne s obzirom da su zaštićene s nekoliko slojeva diferenciranih stanica, stoga da bi došlo do infekcije HPV-om, čestice virusa moraju dobiti pristup bazalnom epitelnom sloju što se ostvaruje preko mikrotraume epitela. Dakle, virus ulazi preko mjesta ozlijede u bazalne stanice koje prolaze proces dijeljenja te se u tom sloju virus nalazi u malom broju kopija episoma. Stanice koje se nalaze u zoni transformacije vrata maternice i anusa su pristupačnije i stoga osjetljivije na infekciju HPV-om (Harden i Munger, 2016; Fehrman i Laimins, 2003).

1.4.2. Adsorpcija, internalizacija i razgradnja kapside

Virusna čestica se preko proteina kapside L1 veže za receptore (adsorpcija) na površini izložene bazalne membrane (ili bazalnih stanica) (Fehrmann i Laimins, 2003). Eksperimenti su pokazali da je heparan sulfat proteoglikan (HSPG) veoma važan primarni receptor (Sapp i Bienkowska Haba, 2009; Fehrmann i Laimins, 2003) dok se $\alpha 6$ integrin (na bazalnim stanicama) navodi kao mogući sekundarni receptor koji je potreban za internalizaciju (Raff i sur., 2013).

Nakon vezanja virusne čestice, tj. L1 proteina kapside za HPSG na bazalnoj membrani epitelnih stanica, dolazi do konformacijske promjene kapside viriona koja omogućuje proteolitičko cijepanje izloženog N-terminalnog djela proteina L2 pomoću enzima furina, što rezultira daljnjom promjenom konformacije kapside. Time se na proteinu L1 otkriva vezno mjesto za stanični receptor koje postaje dostupnije, olakšava se daljnje vezanje virusa i ostvaruje ulazak u stanicu (Harden i sur., 2016; Pinidis i sur., 2016; Howley i sur., 2013). Dakle, proteolitičko cijepanje proteina L2 dovodi do gubitka afiniteta za primarni receptor te olakšava prijenos virusne čestice na sekundarni receptor, koji se nalazi na površini bazalne stanice te je nužan za internalizaciju i daljnji prijenos viralnog genoma u jezgru stanice (Doorbar i sur., 2012).

Unos viriona u bazalne stanice (internalizacija) odvija se procesom endocitoze posredovane klatrinom (za HPV 16) ili kaveolinom (za HPV 31). Nakon 4 sata čestica virusa se nalazi u ranom endosomu, a nakon 12 sati dolazi do razgradnje kapside u kasnom endosomu te oslobađanja viralnog genoma (u kompleksu s L2) koji zatim putuje kroz citoplazmu vjerojatno pomoću mikrotubula te se prenosi u jezgru bazalne stanice (Slika 3.). U jezgri se nalaze u neposrednoj blizini ND10 tijela (engl. *Nuclear Domain 10*), što omogućava početak transkripcije (Schiller i sur., 2010). Prema nekim autorima, endocitoza virusa se odvija procesom sličnim makropinocitozi, koji je neovisan o klatrinu, kaveolinu ili lipidnim splavima (Harden i Munger, 2016).



Slika 3. Shema internalizacije HPV-a i prijenosa viralnog genoma u jezgru (Preuzeto i modificirano od Schiller i sur., 2010)

1.4.3. Replikacija, održavanje genoma i amplifikacija

U ranom stadiju ciklusa, u bazalnim stanicama nalazimo mali stupanj viralne replikacije te se prepisuju samo rani geni, dok se kasni stadij odigrava u terminalno diferenciranim pločastim epitelnim stanicama i povezan je s ekspresijom kasnih gena (Ljubojević i sur., 2007). Nakon prijenosa viralne DNA u jezgru bazalnih stanica, ona se nalazi u episomalnom obliku i ne ugrađuje se u genom domaćina. Inicijalna replikacija (amplifikacija) genoma zbiva se odmah nakon infekcije bazalnih stanica te se stvara mali broj kopija episoma. Bazalne stanice s episomima predstavljaju latentnu (neproduktivnu) infekciju (Doorbar i sur., 2012; Hoffmann i sur. 2006). Za inicijalnu replikaciju DNA potrebni su rani virusni proteini E1 i E2 (Doorbar i sur., 2012). E2 protein nužan je za početak replikacije virusne DNA, pošto prepoznaje palindromski slijed (AACCg(N4)cGGTT) unutar LCR regije, u neposrednoj blizini ishodišta replikacije te se veže za njega. Vežanje proteina E2 je nužno kako bi se protein E1, koji ima aktivnost helikaze, vezao za ishodište replikacije (ori). Potom slijedi disocijacija E2, a E1 uz pomoć šaperona poprima konformaciju dvostrukog heksamernog

prstena koji odmotava lance DNA i omogućava pristup DNA polimerazi alfa i replikacijskom proteinu A.

Nakon brze inicijalne replikacije, slijedi održavanje viralnog episoma u niskom broju kopija u bazalnom sloju (Doorbar, 2006). Genom se stabilno održava na toj razini tijekom slijedećih dioba bazalne stanice što se naziva „održavajućom replikacijom“ (engl. *maintenance replication*). Virusni genom udvostručuje broj svojih kopija tijekom S faze staničnog ciklusa domaćina te se raspodjeljuje između dviju stanica-kćeri (Hoffmann i sur., 2006). U toj fazi se repliciranjem genoma održava stalan broj kopija, u sinkronizaciji sa staničnom DNA u stanicama koje se dijele (McBride, 2008). Održavanje viralnog episoma je osnovni zadatak rane, „održavajuće“ (engl. *maintenance*) faze životnog ciklusa virusa. E6, E7, E1 i E2 su nužni za kontinuirano održavanje episoma. E1 i E2 iniciraju virusnu DNA replikaciju, a E6 i E7 moduliraju regulatore staničnog ciklusa. Ekspresija virusnih proteina je niska u nediferenciranim stanicama, što doprinosi izbjegavanju imunog odgovora i perzistenciji infekcije (Bodily i Laimins, 2010).

Viralni genom migrira iz bazalnog u suprabazalni sloj kako se inficirane bazalne stanice dijele, s time da će jedna stanica-kćer migirati prema parabazalnom sloju, a druga će ostati u bazalnom sloju i stvarati rezervoar virusne DNA. Normalne stanice dijele se samo u bazalnom sloju, a u višim slojevima pločastog epitela se diferenciraju, za razliku od inficiranih stanica koje će se nastaviti dijeliti i u suprabazalnim slojevima, a diferencijacija će im biti odgođena (Doorbar, 2006).

Nakon diferencijacije stanice domaćina, virusna DNA (u diferenciranim stanicama) podliježe sekundarnoj amplifikacijskoj replikaciji i to u S fazi s obzirom da HPV stimulira ponovni ulazak u stanični ciklus u intermedijarnom sloju. Broj kopija DNA povećava na nekoliko stotina ili tisuća kopija, nakon čega slijedi pakiranje virusne DNA u virusne čestice (White i sur., 2012; Hoffmann i sur., 2006). Ta faza je produktivna, odnosno vegetativna. U nekim stanicama će produktivna infekcija biti prekinuta, prilikom čega se viralna DNA ugrađuje u genom stanice domaćina što može rezultirati ozbiljnim lezijama epitela koje mogu napredovati u karcinom vrata maternice te se smatra ključnim trenutkom u karcinogenezi uzrokovanoj HPV-om (Cid-Arregui, 2009; Doorbar, 2006; Munoz i sur., 2006).

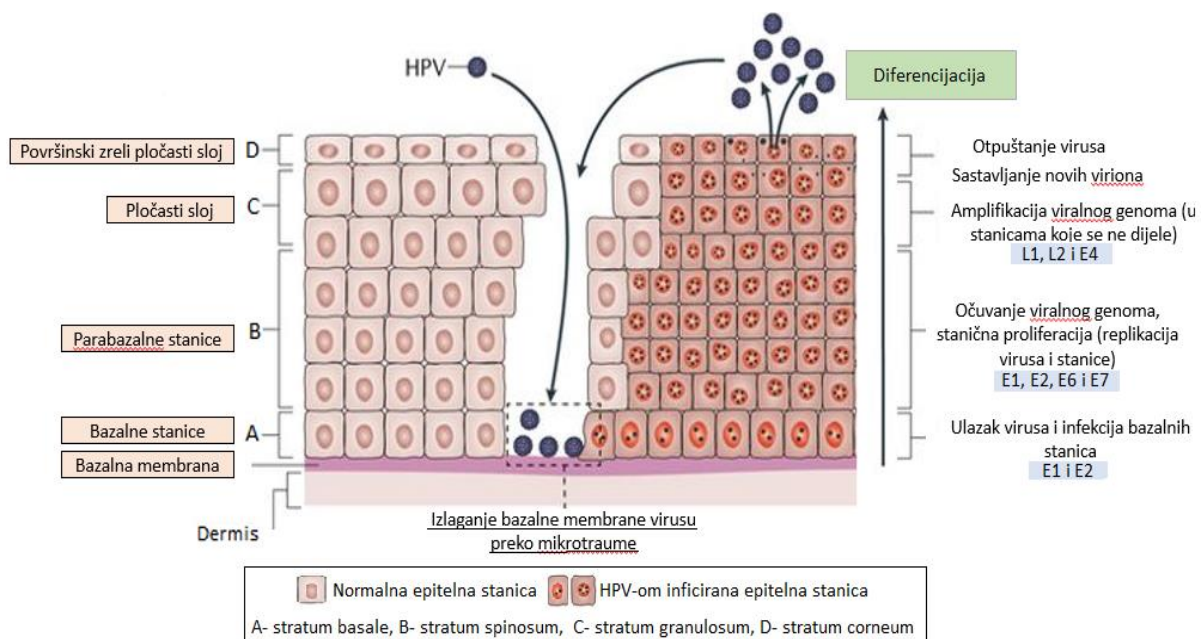
HPV ima sposobnost reaktivirati diobu i to u stanicama koje su izašle iz staničnog ciklusa i u kojima se normalno više ne bi odvijala replikacija DNA (diferencirane stanice) tako što će E6 i E7 inaktivirati p53 i pRb i posljedično omogućiti S fazu tj. DNA replikaciju, što je

veoma bitno pošto HPV ne kodira DNA polimerazu i potreban mu je replikacijski aparat stanice domaćina kako bi mogao replicirati svoj genom. Produktivna faza uključuje, osim amplifikacije viralnog genoma, ekspresiju E1-E4, kasnih gena L1 i L2, inkapsulaciju viralne DNA i oslobađanje infektivnih viriona, a javlja se u gornjim, terminalno diferenciranim stanicama epitela (Kajitani i sur., 2012).

U latentnoj fazi ciklusa genom perzistira u bazalnim stanicama godinama ili desetljećima, a da bi se desio prijelaz iz stabilne replikacije odnosno održavanja genoma (engl. *genome maintenance*) u vegetativnu replikaciju DNA, potreban je određeni okidač (Harden i Munger, 2016).

1.4.4. Formiranje i otpuštanje viriona

Amplifikacija virusnog genoma prestaje kako se stanice pomiču prema gornjem sloju epitela i prolaze kroz proces diferencijacije. Kad inficirani keratinociti dosegnu gornje slojeve epitela, počinju se ispoljavati proteini E4, L1 i L2 koji su potrebni za formiranje viriona (Hadžisejdić i sur., 2010). Strukturni proteini kapside (L1 i L2) formiraju s virusnom DNA nove virusne čestice. One napuštaju inficirane stanice i otpuštaju se u okolinu nakon ljuštenja (deskvamacije) odumrlih epitelih stanica (Slika 4.) (Doobar, 2005). Protein E4 omogućava lakše oslobađanje viriona iz stanica pomoću cijepanja intermedijarnih filamenata citoskeleta keratinocita (Doobar, 2006).



Slika 4. Životni ciklus HPV-a (Preuzeto i modificirano od Roden i Stern, 2018)

1.5. MEHANIZAM KARCINOGENEZE

Sama infekcija HPV-om nije dovoljna da bi dovela do malignih promjena, već su potrebni i drugi čimbenici (npr. genetičke karakteristike, utjecaj okoline). Ipak, oni nemaju nikakvog značaja ako nije prisutna infekcija HPV-om (Subramanya i Grivas, 2008). Ključni događaji u životnom ciklusu HPV-a u kontekstu nastanka karcinoma vrata maternice je integracija (ugradnja) virusa u genom domaćina i aktivacija transkripcije E6 i E7 gena, čiji proteinski produkti imaju onkogeni potencijal (Vince i Židovec-Lepej, 2010).

U nekim stanicama će produktivna infekcija biti prekinuta („abortivna infekcija“) prilikom čega se viralna DNA ugrađuje u genom stanice domaćina. Najčešće mjesto loma i linearizacije cirkularne virusne DNA je ORF E2, što će dovesti do prestanka sinteze proteina E2 i gubitka njegove represorske uloge za transkripciju onkogeno E6 i E7 uslijed čega dolazi do nekontrolirane ekspresije E6 i E7. Konstantna aktivnost tih proteina vodi do genske nestabilnosti, nakupljanja mutacija i progresije u karcinom, ali samo u slučaju E6 i E7 visokorizičnog HPV-a (Cid-Arregui, 2009; Doorbar, 2006; Munoz i sur., 2006).

U epitelnim stanicama sa značajnim stupnjem promjene (CIN 2, CIN 3, karcinom vrata maternice) genom HPV tipova visokog rizika (HR-HPV) je ugrađen u genom stanice domaćina, što će dovesti do zloćudne transformacije te upravo zato čini ključni događaj u onkogenezi uzrokovanj HPV-om. Za razliku od HR-HPV, HPV niskog rizika se ne ugrađuje u genom domaćina te se njegova DNA nalazi u episomalnom obliku, a prisutna je u kondilomima i stanicama CIN 1 (Ghittoni i sur., 2015; Bosch i sur., 1995).

Najčešće mjesto loma i linearizacije cirkularne virusne DNA je okvir čitanja E2 gena (ORF E2), što će dovesti do prestanka sinteze proteina E2 i gubitka kontrole nad transkripcijom i proliferacijom stanica, tj. gubi se supresijski učinak E2 proteina nad proizvodnjom onkoproteina E6 i E7. Posljedično se javlja pojačana ekspresija virusnih onkogeno E5, E6 i E7 te sinteza odgovarajućih proteina (Ghittoni i sur., 2015; Doorbar, 2006). Nekontrolirana, perzistentna ekspresija E6 i E7 u proliferirajućim bazalnim i parabazalnim epitelnim stanicama potiče nastanak displazije ili karcinoma vrata maternice. Najznačajniji mehanizam kojim visokorizični HPV inducira karcinogenezu, uz perzistentnu ekspresiju virusnih onkogeno E6 i E7, jest njihova interakcija s tumor-supresorskim proteinima p53 i pRb (protein retinoblastoma), koji imaju značajnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i apoptozi (programirana stanična smrt) (Ghittoni i sur., 2015). Gubitak

funkcije proteina p53 i pRb dovodi do stalne replikacije i proliferacije stanica, nakupljanja genetskih oštećenja, izbjegavanja apoptoze i onkogene promjene (Lešin i sur., 2010).

Onkoprotein E6 se prvo veže za E6AP (engl. *E6 associated protein*) koji djeluje kao ubikvintin protein ligaza te nastaje kompleks E6-E6AP. Kompleks se zatim veže za p53, koji se brzo ubikvintira i razgrađuje u proteasomu. Time se smanjuje količina p53 u stanici (Ghittoni i sur., 2015).

Naime, p53 je kao središnji regulator staničnog rasta i diobe odgovoran za očuvanje genoma od zloćudne preobrazbe, pa će se u uvjetima staničnog stresa (virusna infekcija, UV zračenje, hipoksija) povećati njegova ekspresija. To će rezultirati zastojem rasta u kontrolnoj točki popravka DNA (G1 faza ciklusa) što omogućava stanici popravak oštećene DNA, a ako je popravak nemoguć, indukciju apoptoze (na taj način normalna stanica zaustavlja neregularnu S fazu ciklusa) (Zekan i sur., 2009). U stanici zaraženoj visokorizičnim HPV-om smanjena je ekspresija p53 i on ne može adekvatno obavljati svoju ulogu, a to je regulacija ekspresije gena koji kontroliraju zastoj staničnog ciklusa u G1-fazi i apoptozu pa će takve stanice, osim kontinuirane proliferacije, imati i sposobnost zaobilazanja apoptoze. Ako se dopusti prolazak kroz stanični ciklus, stanica neće imati dovoljno vremena za popravak oštećene DNA te će doći do posljedičnog nakupljanja mutiranih gena, genomske nestabilnosti (ključni poremećaj u onkogenezi), gubitka kontrole staničnog rasta te transformacije stanica koje se citološki karakteriziraju kao cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) lakšeg i težeg stupnja te konačno kao karcinom vrata maternice (Vince i Židovec, 2010; Zekan i sur., 2009).

Dodatno, E6 potiče telomeraznu aktivnost, kao i aktivnost vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*), što dovodi do progresivnog širenja tumora - neoangiogeneze (Zekan i sur., 2009).

Onkoprotein E7 visokorizičnog HPV-a doprinosi zloćudnoj transformaciji tako što se veže na hipofosforilirani oblik pRb prilikom čega dolazi do odvajanja transkripcijskog faktora E2F od pRb, s posljedičnim povećanjem aktivnosti E2F – on potiče ekspresiju gena potrebnih za replikaciju DNA i ulazak stanice u S fazu. Na taj način se stimulira replikacija virusne DNA, kao i proliferacija stanica. E7 putem ubikvintin-proteasomnog sustava potiče degradaciju pRb koji više ne može vršiti svoju ulogu, tj. spriječiti diobu stanice s oštećenom DNA, stoga se javlja prijevremeni ulazak stanice u S fazu (Ghittoni i sur., 2015; Hadžisejdić i sur., 2010).

U normalnim stanicama pRb kontrolira stanični ciklus tako što veže E2F i kontrolira njegovu aktivnost, ne dopuštajući stanici da uđe u S fazu (DNA sinteza) prije nego što se

provede provjera genoma. Tek nakon uklanjanja oštećenja pRb će se fosforilirati te će doći do otpuštanja E2F i replikacije DNA u S fazi (Zekan i sur., 2009).

E2F je dakle transkripcijski faktor koji će poticati sintezu proteina potrebnih za S fazu ako je vezan za promotre gena S faze. Ako se na E2F veže hipofosforilirani pRb, inhibira se ekspresija gena i stanica ne napreduje u S fazu, već ostaje u G1 fazi. (Cobrinik, 2005; Dimova i Dyson, 2005).

Osim toga, stvaranje kompleksa E7-pRb dovodi i do prekomjerne ekspresije p16INK4A, inhibitora ciklin-ovisne kinaze koja usporava stanični ciklus. Neki autori navode da se p16INK4A može koristiti kao imunohistohemijski biomarker koji ukazuje na onkogenu aktivnost visokorizičnih HPV tipova (Darragh i sur., 2012). Protein E7 remeti kontrolu stanične proliferacije inaktivirajući ciklin ovisne inhibitore kinaze p21CIP-1 i p27KIP-1. Prilikom inaktiviranja p21CIP-1 i p27 KIP-1 dolazi do oslobađanja ciklin ovisnih kinaza (CDK) od njihovih staničnih regulatora te nekontrolirane proliferacije stanica (Pejković i sur., 2008).

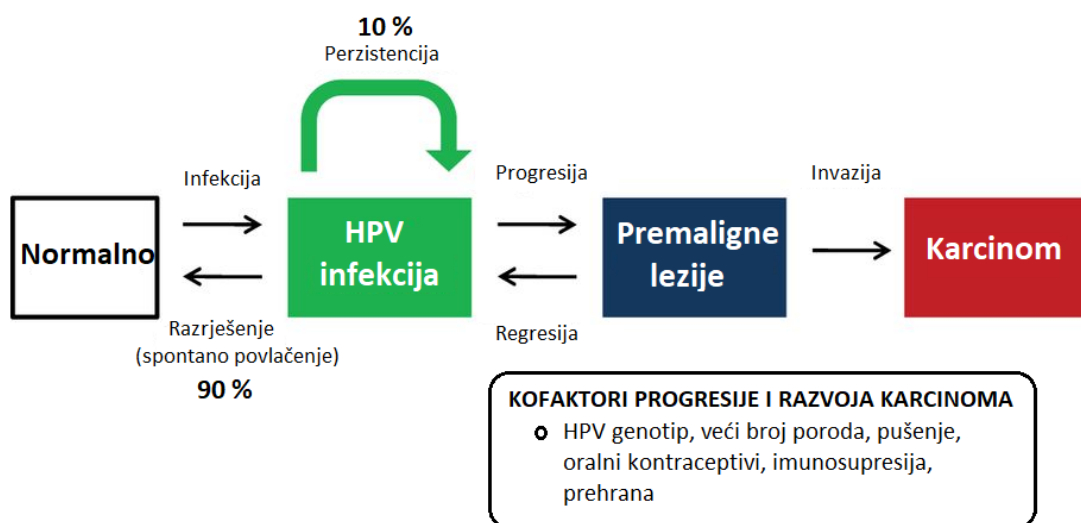
1.6. PRIRODNI TIJEK HPV INFEKCIJE I KOFAKTORI RIZIKA PERZISTENTNE INFEKCIJE VISOKORIZIČNIM TIPOM HPV-A

HPV se prenosi spolnim putem, direktnim kontaktom s kožom ili sluznicom zaražene osobe te vrlo rijetko s majke na dijete (vertikalni prijenos). Infekcija HPV-om je glavni čimbenik rizika za nastanak cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN), odnosno premalignih lezija koje mogu regredirati, perzistirati ili progredirati, s time da će samo mali postotak napredovati do karcinoma vrata maternice (Štemberger-Papić i sur., 2016; Babić i Macan, 2013). Infekcija HPV-om najčešće se javlja u spolno aktivnih žena mlađih od 25 godina, a rizik od infekcije tijekom života iznosi minimalno 50% (Čorušić i sur., 2011; Munoz i sur., 2003).

Više od 90% infekcija HPV-om prolazi spontano (razrješenje) bez posljedica unutar nekoliko mjeseci do dvije godine, zahvaljujući imunološkom odgovoru (Schiffman i sur., 2007) (Slika 5.). Dulje vremena je potrebno kako bi se povukla infekcija visokorizičnim tipom HPV-a (16 mjeseci za HPV 16) u odnosu na HPV niskoga rizika (4–5 mjeseci) (Babić i Macan, 2013). U manje od 10% žena koje imaju HPV infekciju će se uslijed neadekvatnog

imunološkog odgovora razviti perzistentna (trajna) infekcija (Parkin i Bray, 2006), a ako se radi o infekciji s visokorizičnim tipovima HPV-a postoji veća vjerojatnost progresije do CIN-a visokog stupnja i karcinoma vrata maternice, a taj proces može trajati 10 godina (Moscicki i sur., 2012; Cid-Arregui 2009; Stanley, 2006). Od 10% žena s perzistentnom infekcijom, samo će 1% razviti karcinom vrata maternice. U više od 99,7% slučajeva karcinoma prisutni su visokorizični tipovi HPV-a.

Nužan etiološki čimbenik za nastanak karcinoma vrata maternice je perzistentna infekcija visokorizičnim tipom HPV-a, no ona nije sama po sebi dovoljna za pokretanje karcinogeneze, već su potrebni i određeni kofaktori koji utječu na rizik perzistencije HPV-a i progresiju bolesti (Štemberger-Papić i sur., 2016; Deligeoroglou i sur., 2013; Hadžisejdić i sur., 2010; Smith i sur., 2007) - rana dob prvog spolnog odnosa, veći broj partnera, rana dob prve trudnoće i veći broj porođaja, prisutnost drugih spolno prenosivih infekcija (*Chlamydia trachomatis*, Herpes simplex virus tipa 2), pušenje cigareta, korištenje oralnih kontraceptiva dulje od 5 godina te imunosupresivna stanja (osobe zaražene HIV-om ili osobe s transplantatom) (Castellsague i sur., 2002). Kod žena koje puše, u sluznici vrata maternice pronađene su visoke koncentracije metabolita nikotina koji potiskuje imunosnu reakciju smanjujući broj Langerhansovih stanica. Dugotrajno korištenje oralnih kontraceptiva dovodi do hormonski potaknute ugradnje DNA HPV-a u genom domaćina te prekomjerne ekspresije E6 i E7 (Castellsague i Munoz, 2003; Franco i sur., 2001). Infekcija drugim mikroorganizmima dovodi do narušavanja integriteta i sposobnosti popravka epitela vrata maternice (Castle i sur., 2003).



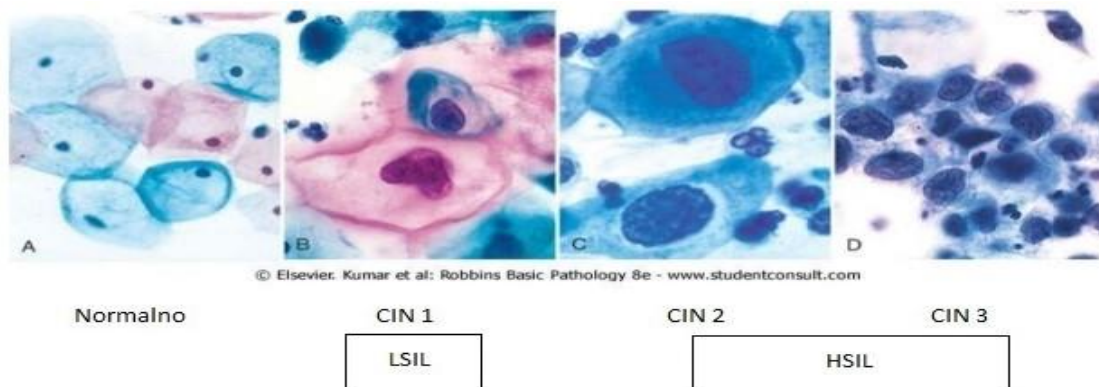
Slika 5. Prirodni tijek HPV infekcije (Slika modificirana prema Schiffman i Wentzensen, 2013).

1.7. PREMALIGNNE LEZIJE VRATA MATERNICE (CIN)

1.7.1. Citološke i patohistološke karakteristike premalighnih lezija

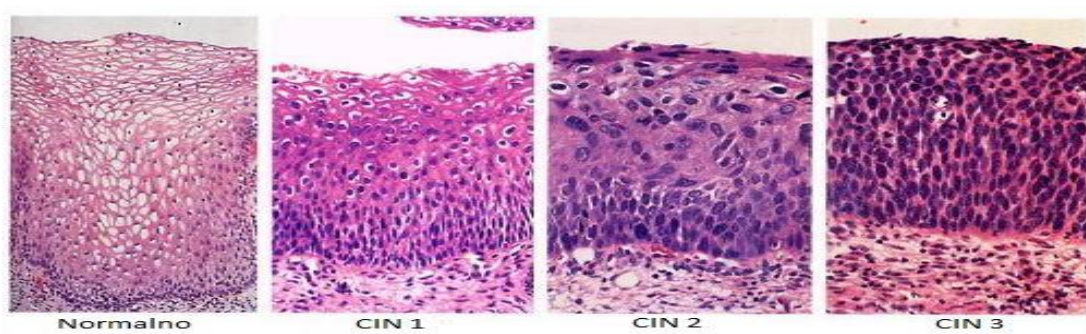
Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) naziv je za premaligne stanične promjene pločastog epitela koje mogu prethoditi karcinomu vrata maternice, a povezane su s HPV infekcijom (Lešin i sur., 2010). Citomorfološke osobine abnormalnih, patološki promijenjenih pločastih stanica otkrivenih Papa testom temelj su citološke klasifikacije lezija vrata maternice. Težina lezije se citološki procjenjuje na temelju nalaza diskariotičnih stanica čija jezgra ima karakteristike malignih stanica, ali im je citoplazma diferencirana. Citomorfološke promjene uključuju povećanje jezgre s povećanjem omjera jezgra/citoplazma, polimorfije, binukleacije i multinukleacije te promjene u strukturi kromatina (hiperkromazija, tj. pojačan intenzitet bojanja, grudičast kromatin) (Štemberger-Papić i sur, 2016) (Slika 6.).

Koilocitoza je također povezana s djelovanjem HPV-a, a predstavlja sliku citopatskog učinka HPV-a na pločastu stanicu koji nastaje zbog aktivnog umnažanja virusa koje dovodi do postupnog propadanja inficiranih stanica. Koilociti su displastične uvećane stanice s različitim atipijama jezgre koja je okružena s oštro ograničenom svijetlom zonom (perinuklearni halo) (Štemberger-Papić i sur., 2016; Audy-Jurković i sur., 2003).



Slika 6. Citološko stupnjevanje cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) (Preuzeto i modificirano sa: <https://www.slideserve.com/sheila/pathology-of-the-lower-female-genital-tract>)

Za histološko tumačenje intraepitelne lezije važni su slijedeći kriteriji: diferencijacija tj. sazrijevanje i stratifikacija stanica (ima je ili je nema; koliki je dio epitela koji pokazuje promjene), zatim nuklearne abnormalnosti (povećana jezgra, promjena omjera veličine jezgre i citoplazme, promjena količine kromatina - hiperkromazija, broj jezgri) i mitotička aktivnost (broj mitoza, dio epitela u kojemu se nalaze mitoze, prisutnost patoloških mitoza) (Babić i sur., 2013; Sellors i sur., 2007; Cosette 2007). Mjereći od bazalne membrane, promjene zahvaćaju trećinu debljine epitela u slučaju blaže intraepitelne lezije (CIN 1), dok kod težeg stupnja abnormalnosti (CIN 3, CIS) promjene zahvaćaju više od dvije trećine epitela odnosno cijelu debljinu epitela (Slika 7.) (Muntean i sur., 2010).



Slika 7. Histološko stupnjevanje cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) (Preuzeto i modificirano sa: <https://www.cancerquest.org/patients/cancer-type/cervical-cancer>)

1.7.1.1. CIN 1

CIN 1 (istovjetno LSIL) je najblaži oblik cervikalne intraepitelne neoplazije, odnosno poremećaja pločastog epitela vrata maternice. Promjene su ograničene na bazalni i parabazalni sloj, odnosno mjereći od bazalne membrane promjene ne zahvaćaju više od jedne trećine debljine epitela. U bazalnome sloju prisutan je mali broj mitoza. U gornje dvije trećine debljine epitela (intermedijarni i superficijalni sloj) zadržana je diferencijacija (dozrijevanje) uz blage nuklearne atipije sve do površine. Citomorfološki, javlja se diskarioza superficijalnih (površinskih) stanica, jezgra je nepravilna, blago povećana, s hiperkromazijom ili grudastim kromatinom, a citoplazma je intaktna i diferencirana (Babić i sur., 2013; Kurman i sur., 2011; Selloros i sur., 2003; www.pathologyoutlines.com).

1.7.1.2. CIN 2

CIN 2 (istovjetno HSIL) je srednje teški poremećaj u kojem su stanične promjene, tj. nuklearne abnormalnosti nešto izraženije nego u CIN 1 te su ograničene na donje 2/3 debljine epitela sluznice (mjereći od bazalne membrane). U tom području je vidljiv poremećaj rasporeda i sazrijevanja stanica te nalazimo nezrele stanice s povećanim sadržajem kromatina. Proširen je sloj bazalnih stanica i u njemu je prisutan veći broj mitozata i atipičnih stanica. U gornjoj trećini debljine epitela očuvano je sazrijevanje stanica, s blažim nuklearnim atipijama sve do površine. Citomorfološki, vidljiva je diskarioza superficijalnih i intermedijarnih stanica (Babić i sur., 2013; Kurman i sur., 2011; Selloros i sur., 2003; [www. pathologyoutlines.com](http://www.pathologyoutlines.com)).

1.7.1.3. CIN 3

CIN 3 (istovjetno HSIL) označava skupinu promjena karakteriziranu kao najteži oblik displazije i karcinom in situ (CIS). Promjene zauzimaju više od 2/3 debljine epitela ili cijelu debljinu epitela te je prisutan značajan broj mitozata i stanica s izrazitim nuklearnim promjenama. Sazrijevanje i stratifikacija su ograničeni na manje od gornje trećine debljine epitela ili ih nema. Veći je broj nediferenciranih stanica bazalnog tipa. Citomorfološki, diskariotične stanice nalazimo kroz cijeli epitel, tj. u slojevima površinskih, intermedijarnih i parabazalnih stanica. Ove promjene vidljive su i kod CIS-a, ali su citomorfološki i histološki znakovi atipije maksimalno izraženi. CIS se razlikuje od invazivnog karcinoma pošto kod karcinoma dolazi do prodora malignih, atipičnih stanica kroz bazalnu membranu, dok kod CIS-a nema prodora kroz bazalnu membranu već je ona intaktna te je promjena ograničena na epitelni sloj. Bazalna membrana je membrana koja razdvaja epitel od subepitelnog vezivnoga tkiva u kojemu se nalaze limfne i krvne žile (Babić i sur., 2013; Kurman i sur., 2011; Selloros i sur., 2003; [www. pathologyoutlines.com](http://www.pathologyoutlines.com)).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Perzistentna infekcija onkogenim tipom HPV-a je najvažniji etiološki čimbenik razvoja premalignih i malignih lezija vrata maternice, a od perzistentne infekcije do razvoja karcinoma treba proći najčešće desetak godina. S obzirom da se lezije koje prethode karcinomu vrata maternice razvijaju godinama te se mogu lako otkriti jednostavnim pregledom (Papa testom) i uspješno izliječiti, karcinom vrata maternice je bolest koja se lako može kontrolirati i prevenirati redovitim provođenjem probira i cijepljenjem. Ako se otkrije u kasnijim stadijima, značajno narušava kvalitetu života i dovodi do teških posljedica.

Cilj ovog rada bio je odrediti učestalost infekcije visokorizičnim HPV-om u žena koje su na temelju patohistološkog nalaza (PHD) svrstane u skupinu ispitanica bez lezija na vratu maternice i u skupine ispitanica kojima su utvrđene skvamozna intraepitelna lezija niskog (LSIL) ili visokog (HSIL) stupnja. Također, određena je učestalost infekcije HPV-om 16, HPV-om 18 te istovremena infekcija HPV-om 16 i 18 u ispitivanim skupinama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanice

Istraživanje je uključivalo 169 ispitanica, koje su bile podvrgnute citološkom probiru, odnosno Papa testu koji se izvodio Ayreovom špatulom i „Cervical Brush četkicama“. Pomoću Ayreove špatule uzet je obrisak sa stražnjeg svoda vagine i cerviksa maternice, dok je s „Cervical Brush četkicama“ uzet obrisak iz kanala vrata maternice (endocervikalni uzorak). Dobiveni stanični uzorci su zatim preneseni na predmetno stakalce i fiksirani 96%-tnim etanolom te su u citološkom laboratoriju bojani pomoću automatskog aparata metodom po Papanicolaou. Citološki nalaz (Papa testa) je klasificiran prema citološkom obrascu „Zagreb 2002.“ koji je međunarodno priznat te predstavlja modifikaciju Bethesda klasifikacije. Na daljnju obradu, odnosno kolposkopski pregled i biopsiju bile su upućene pacijentice koje su imale abnormalan citološki nalaz, klasificiran kao CIN. Kolposkopski pregled vrata maternice je izveden kolposkopom marke Leisegang (model 3MLW) s uvećanjem od 7,5/15/30 puta. Kako bi se uklonila sluz, rodnica i vrat maternice premazani su 5%-tnom octenom kiselinom, te zatim Lugolovom otopinom koja sadržava 126,5 mg/L joda (1- 5%-tna jodna tinktura). Uočene morfološke promjene vrata maternice su klasificirane prema kolposkopskom obrascu „Rio de Janeiro|Zagreb 2011.“, koji je napravljen prema kolposkopskoj klasifikaciji „Rio de Janeiro 2011.“ (Grubišić, 2012). Biopsija je učinjena kliještima za biopsiju po Tischler Morganu s područja najveće morfološke promjene, a dobiveni uzorak tkiva vrata maternice se fiksira u otopini formalina te se potom izvodi standardna patohistološka analiza (PhD), koja se smatra „zlatnim standardom“ u dijagnostici intraepitelnih novotvorina (Babić i Macan, 2013). Patohistološka analiza podrazumijeva fiksaciju tkiva u 10%-tnom puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje tkiva (5 µm debljine), deparafiniranje i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE). Korištena je „Bethesda klasifikacija“ u kojoj se za promjene vrata maternice koristi naziv SIL (skvamozna intraepitelna lezija, engl. *squamous intraepithelial lesion*). SIL se dijeli na lezije niskog rizika (LSIL, engl. *low-grade squamous intraepithelial lesion*), koje su histološkom klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) svrstane u grupu CIN 1, te na lezije visokog rizika (HSIL, engl. *high-grade squamous intraepithelial lesion*), koje su WHO histološkom klasifikacijom svrstane u CIN2, CIN3 i karcinom in situ (CIS) (Solomon i sur., 2002).

Od 169 ispitanica uključenih u ovo istraživanje, 44 su imale uredan patohistološki nalaz, 32 su imale LSIL, a 93 HSIL lezije.

3.2. Metoda određivanja tipa HPV-a

U ovoj studiji je za detekciju DNA HPV-a korištena PCR metoda, odnosno *cobas*® HPV test (Roche). *Cobas*® HPV test je automatizirani kvalitativni *in vitro* test koji se temelji na real time PCR-u (PCR u stvarnom vremenu) te u jednoj reakciji može otkriti 14 visokorizičnih tipova HPV-a. Ovim testom se HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ne određuju zasebno već kao skupina visokorizičnog HPV dok se HPV 16 i HPV 18 određuju individualno (www.diagnostics.roche.com).

Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) temelji se na amplifikaciji (umnažanju) ciljne sekvence DNA zahvaljujući specifičnom paru oligonukleotidnih početnica (engl. *primer*) koji omeđuju umnoženi fragment DNA, a reakcija je katalizirana pomoću enzima DNA polimeraze (Hadžisejdić i sur., 2010; www.hzjz.hr). *Cobas*® HPV test koristi početnice koje umnažaju sekvencu od približno 200 pb unutar L1 regije DNA HPV-a.

Nakon amplifikacije ciljne sekvence DNA, slijedi specifična detekcija PCR produkta pomoću hibridizacijskih sonda koje su obilježene fluorescentnom bojom (služi kao reporter) i prigušivačem koji u intaktnoj sondi prigušuje fluorescenciju koju emitira reporter (nakon ekscitacije). Sonde su specifične za određenu sekvencu na koju se vežu zahvaljujući komplementarnosti, a djelovanjem 5'-3' nukleazne aktivnosti DNA polimeraze dolazi do njihovog izrezivanja i odvajanja reportera (boje) od prigušivača, što dovodi do emisije fluorescencije valne duljine karakteristične za pojedinačnu fluorescentnu boju. Amplificirani signal koji potječe od 12 visokorizičnih tipova HPV-a (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) otkriva se korištenjem iste fluorescentne boje, dok se za detekciju HPV 16, HPV 18 i β globina (kontrola) koristi različita fluorescentna boja (za svaki zasebna). Amplifikacijom, tj. cikličkim umnažanjem istog fragmenta (u prosječno 35 ciklusa) postiže se visoka razina molekularne osjetljivosti, dok se specifičnost osigurava izborom početnica (Heideman i sur., 2011; Hadžisejdić i sur., 2010; www.diagnostics.roche.com).

4. REZULTATI

Tablica 2. Broj (N) i postotak (%) ispitanica bez dokazane premaligne lezije vrata maternice i ispitanica s LSIL i HSIL lezijama (LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL - skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja, PhD – patohistološka dijagnoza)

	N (N _{ukupno} = 169)	%
PhD negativne	44	26.04
LSIL	32	18.93
HSIL	93	55.03

Ukupan broj (N_{ukupno}) ispitanica koje su uključene u ovu studiju je 169. Kod 44 ispitanica (26.04%) patohistološkom analizom nije potvrđena prisutnost premalignih lezija vrata maternice, dok je kod 125 ispitanica (73.96%) dokazana premaligna lezija vrata maternice. Od 125 ispitanica s potvrđenim CIN-om, 32 ispitanice (18.93%) imale su LSIL leziju, a 93 ispitanice (55.03%) HSIL leziju (Tablica 2.). Broj žena koje imaju HSIL je gotovo tri puta veći nego broj žena koje imaju LSIL te 2,1 puta veći od broja žena bez dokazanih premalignih lezija.

Tablica 3. Broj (N) i postotak (%) ispitanica s negativnim i pozitivnim visokorizičnim HPV-om

	N (N _{ukupno} = 169)	%
HPV negativne	20	11.84
Visokorizični HPV pozitivne*	149	88.16

*Visokorizični HPV pozitivne: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

U svih 169 ispitanica određivana je prisutnost infekcije HPV-om visokog rizika. Od ukupnog broja ispitanica (N_{ukupno}= 169), kod 20 žena (11.84%) nije dokazana prisutnost visokorizičnog HPV-a, dok je kod 149 ispitanica (88.16%) dokazan HPV visokog rizika (Tablica 3.). Ispitanica s dokazanim HPV-om visokog rizika ima 7,5 puta više nego ispitanica kod kojih nije dokazana prisutnost HPV-a.

Tablica 4. Broj (N) i postotak (%) ispitanica pozitivnih na HPV 16 i 18 u skupini s pozitivnim visokorizičnim HPV

	N (N _{ukupno} = 149)	%
HPV 16 pozitivne	56	37.58
HPV 18 pozitivne	5	3.36
HPV 16 + 18 pozitivne	9	6.04

U Tablici 4. prikazano je koliko ispitanica unutar skupine visokorizičnog HPV-a ima dokazano prisustvo visokorizičnih HPV 16 i HPV 18. Ukupan broj ispitanica kojima je dokazan HPV visokog rizika je 149, od čega je u 56 ispitanica (37.58%) dokazano prisustvo HPV 16, a u 5 ispitanica (3.36%) HPV 18. Kod 9 žena (6,04%) nađeni su i HPV16 i HPV 18.

Tablica 5. Broj (N) i postotak (%) ispitanica s negativnim i pozitivnim visokorizičnim HPV-om u skupini bez dokazanih premalignih lezija vrata maternice (PhD – patohistološka dijagnoza)

PhD negativne	N (N _{ukupno} = 44)	%
Visokorizični HPV pozitivne*	33	75
HPV negativne	11	25

*Visokorizični HPV pozitivne: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

U Tablici 5. prikazano je koliko ispitanica unutar skupine žena koje nemaju dokazanu premalignu leziju vrata maternice (N= 44 ispitanice) imaju potvrđenu prisutnost visokorizičnog HPV-a, odnosno koliko ih nema potvrđenu prisutnost visokorizičnog HPV-a. Od ukupno 44 ispitanice bez premalignih lezija vrata maternice, u njih 33 (75%) je dokazan visokorizični HPV, dok kod 11 ispitanica (25%) nije dokazan, što je 3 puta manje u odnosu na broj pozitivnih nalaza.

Tablica 6. Broj (N) i postotak (%) ispitanica pozitivnih na HPV 16 i HPV 18 u skupini bez dokazanih premalignih lezija vrata maternice

PhD negativne	N (N _{ukupno} = 33)	%
HPV 16 pozitivne	18	54.54
HPV 18 pozitivne	1	3.03
HPV 16 + 18 pozitivne	5	15.15

Od ukupno 33 ispitanice bez dokazanih premalignih lezija vrata maternice s dokazanom HPV infekcijom visokog rizika, u njih 18 (54.54%) je dokazan HPV 16, a u samo jedne ispitanice HPV 18 (3.03%). 5 žena (15.15%) bilo je pozitivno na HPV 18 te ujedno i na HPV 16 (Tablica 6.).

Tablica 7. Broj (N) i postotak (%) ispitanica s negativnim i pozitivnim visokorizičnim HPV-om u skupini s LSIL lezijama (LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja)

LSIL	N (N _{ukupno} = 32)	%
Visokorizični HPV pozitivne*	24	75
HPV negativne	8	25

*Visokorizični HPV pozitivne: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

Unutar skupine ispitanica koje imaju LSIL leziju, određen je broj ispitanica kojima je dokazano prisustvo visokorizičnog HPV-a, kao i broj ispitanica kod kojih nije dokazan visokorizični HPV (Tablica 7.). Ukupan broj ispitanica koje imaju LSIL iznosi 32, od čega je kod 24 ispitanica (75%) dokazan visokorizični HPV, dok kod 8 ispitanica (25%) nije dokazano prisustvo visokorizičnog HPV-a. Na temelju prikazanih podataka vidljivo je da je 3 puta veći broj žena koje imaju LSIL i koje su pozitivne na visokorizični HPV, nego broj žena koje imaju LSIL, ali su HPV negativne.

Tablica 8. Broj (N) i postotak (%) ispitanica pozitivnih na HPV 16 i HPV 18 u skupini s LSIL lezijama (LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja)

LSIL	N (N _{ukupno} = 24)	%
HPV 16 pozitivne	6	25
HPV 18 pozitivne	1	4.17
HPV 16 i 18 pozitivne	2	8.33

U Tablici 8. prikazan je broj ispitanica unutar skupine s LSIL lezijama koje imaju dokazano prisustvo visokorizičnih HPV 16 i HPV 18. Od ukupnog broja ispitanica s LSIL lezijama kod kojih je dokazana prisutnost HPV visokog rizika (N=24), kod njih 6 (25%) dokazano je prisustvo HPV 16, dok je prisutnost HPV 18 dokazana samo kod jedne ispitanice (4.17%). Dvije ispitanice imale su dokazanu infekciju s oba tipa HPV-a (8.33%).

Tablica 9. Broj (N) i postotak (%) ispitanica s negativnim i pozitivnim visokorizičnim HPV-om u skupini s HSIL lezijama (HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja)

HSIL	N (N _{ukupno} = 93)	%
Visokorizični HPV pozitivne*	92	98.92
HPV negativne	1	1.08

*Visokorizični HPV pozitivne: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

Tablica 9. prikazuje kod koliko je ispitanica unutar skupine s HSIL lezijama dokazano prisustvo, odnosno odsustvo visokorizičnog HPV-a. Ukupan broj žena koje imaju HSIL je 93, od kojih je zaista visok postotak (98.92%, tj. 92 žena) pozitivan na visokorizični HPV, dok kod samo jedne žene (što odgovara 1.08%) nije dokazano prisustvo visokorizičnog HPV-a. Broj ispitanica koje imaju HSIL te infekciju visokorizičnim HPV-om je značajno veći u usporedbi s brojem ispitanica koje imaju HSIL ali su HPV negativne.

Tablica 10. Broj (N) i postotak (%) ispitanica pozitivnih na HPV 16 i HPV 18 u skupini s HSIL lezijama (HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja)

HSIL	N (N _{ukupno} = 92)	%
HPV 16 pozitivne	39	42.39
HPV 18 pozitivne	4	4.35
HPV 16 i 18 pozitivne	4	4.35

Iz podataka u Tablici 10. može se vidjeti koliki broj ispitanica s HSIL lezijama ima dokazano prisustvo HPV 16 te HPV 18. Od ukupnog broja ispitanica koje imaju HSIL leziju i dokazanu HPV infekciju visokog rizika (N= 92), prisustvo HPV 16 dokazao je u 39 ispitanica (42.39%) dok je prisutnost HPV 18 dokazano u svega 4 ispitanice (4.35%). Također, samo 4 ispitanice (4.35%) imaju pozitivan i HPV 16 i HPV 18.

5. RASPRAVA

5.1. PREVALENCIJA HPV INFEKCIJE U HRVATSKOJ I SVIJETU

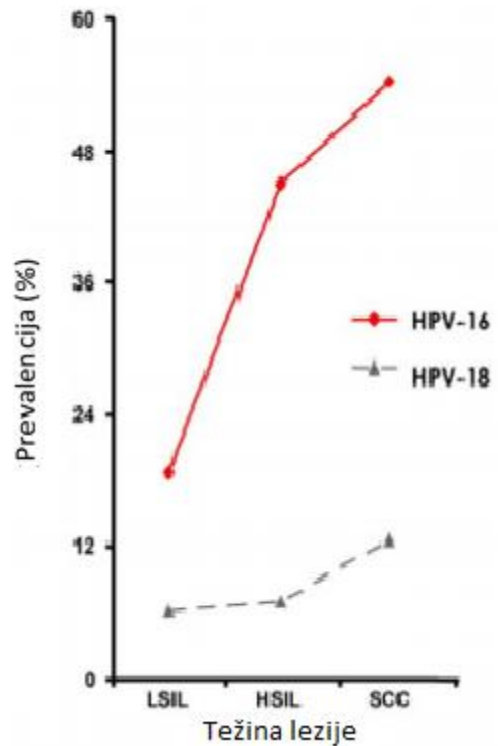
5.1.1. Prevalencija HPV infekcije u žena s normalnom citologijom

10.4% žena s normalnim citološkim nalazima bilo je pozitivno na HPV DNA, s time da su veću prevalenciju imale slabije razvijene države nego razvijene države. Istočna Afrika ima najveću prevalenciju (31,6%) a najmanju Južnoistočna Azija (6,2%) (Bosch i sur., 2008). Regije s visokom prevalencijom HPV-a su ujedno i regije s najvišom incidencijom karcinoma vrata maternice te vrijedi i obratno. Međutim, 2 regije su izuzetak - Južna Azija ima relativno visoku incidenciju karcinoma, ali nisku HPV prevalenciju te obratno vrijedi za Istočnu Europu. Prevalencija HPV-a je najviša za žene mlađe od 35 godina, a smanjuje se s povećanjem životne dobi (de Sanjosé i sur., 2007).

5.1.2. Prevalencija tipova HPV-a u premalignim lezijama (LSIL, HSIL) i karcinomu vrata maternice i potencijal progresije u karcinom

Na temelju podataka meta analize, najčešći tipovi HPV-a prisutni u LSIL su redom: HPV 16 (26,3%), HPV 31, - 51, -53, -56, - 52, -18, -66 i - 58. U LSIL su prisutni još i HPV 6, HPV 39 te HPV 59 (Clifford i sur., 2005). Uspoređujemo li žene iz Afrike i Europe kojima je dijagnosticiran LSIL pozitivan na HPV, žene iz Afrike imaju dva puta manju vjerojatnost na prisustvo HPV 16, dok će žene u Sjevernoj Americi vjerojatnije biti inficirane HPV-om 18 u usporedbi sa ženama u Europi ili Južnoj Americi (Clifford i sur., 2006). Najučestaliji tip u HSIL je HPV 16 (45,3%) te ga slijede HPV 31, -33, -58, -18, -52 (Bosch i sur., 2008). HPV 16 ima najveću prevalenciju u HSIL u svim regijama svijeta, ali varira od 34% u Aziji do 52% u Europi, dok je HPV 18 bio na trećem ili četvrtom mjestu u svim regijama, od 6% u Europi do 10% u Sjevernoj Americi (Clifford i sur., 2006).

Tablica 11. daje sažeti prikaz najčešćih tipova HPV-a u svijetu koji su prisutni u žena s normalnom citologijom, premalignim lezijama (LSIL i HSIL) i u karcinomu vrata maternice. Neovisno o dijagnozi, HPV 16 je najučestaliji tip HPV-a globalno. Kako se povećava težina lezije, tako se povećava i njegova učestalost (Slika 8.).



Slika 8. Pomak u distribuciji HPV 16 i 18 s povećanjem težine lezije na vratu maternice (LSIL - skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL - skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja, SCC - karcinom pločastih stanica) (Preuzeto i modificirano prema: Clifford i sur., 2006)

Dakle, samo je 2,6% HPV 16 prisutno u žena s normalnom citologijom, zatim slijedi porast na 26,3% u žena s LSIL i na 45,3% u HSIL, te konačno na 55,2% u žena s karcinomom pločastih stanica (SCC). HPV 18 je drugi po učestalosti u lezijama vrata maternice, ali ga značajno više pronalazimo u adenokarcinomu (ADC) nego u SCC. Prisutnost HPV 45 nije učestala u žena s normalnom citologijom, no pokazuje prevalenciju od 2,3% u HSIL te se postotak udvostručava na 4,6% u karcinomu (SCC). Za razliku od HPV 45, HPV 58 je relativno učestali tip u žena s normalnom citologijom i HSIL lezijom, ali manje prisutan u žena s invazivnim karcinomom vrata maternice.

Tablica 11. Prevalencija (%) tipova HPV-a u žena s urednim citološkim nalazom i kod lezija vrata maternice povezane s HPV-om (Podaci prema meta analizi Bosch i sur., 2008; *Clifford i sur., 2005)

Tip HPV-a	Normalna citologija	LSIL*	HSIL	SCC	ADC
16	2,6%	26,3%	45,3%	55,2%	48,4%
18	0,9%	8,6%	6,9%	12,8%	36,3%
31	0,6%	11,5%	8,6%	3,8%	0,7%
45	0,4%	4,9%	2,3%	4,6%	5,8%
33	0,5%	7,4%	7,3%	3,7%	2%
52	0,9%	9%	5,1%	2,9%	0%
58	0,9%	8,4%	7%	2,8%	0,7%
Ostali	6,8%	-	23,9%	7,6%	7,7%

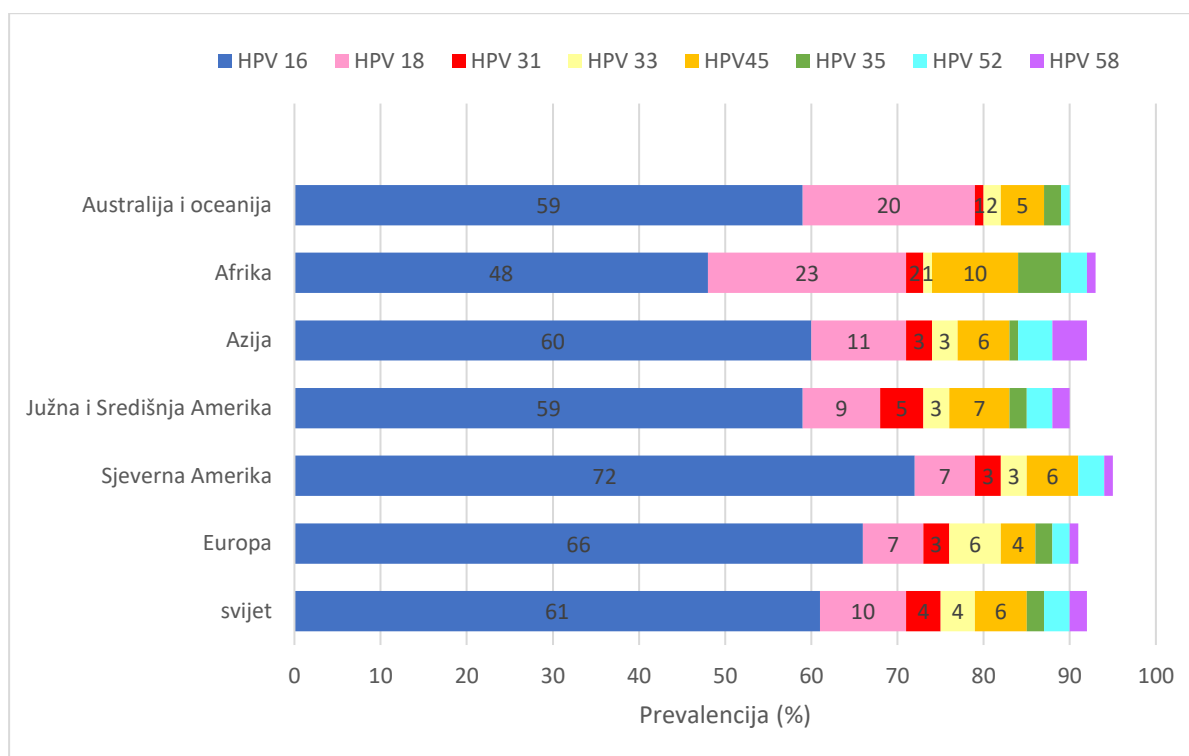
Što se tiče vjerojatnosti progresije u karcinom vrata maternice, veću vjerojatnost pokazuju lezije niskog stupnja rizika (LSIL) koje su pozitivne na HPV 16 i HPV 18, nego LSIL u kojima su potvrđeni ostali tipovi HPV-a, a isto vrijedi i za lezije visokog stupnja (HSIL). Zajedno, HPV 16 i HPV 18 prisutni su u preko 70% karcinoma vrata maternice diljem svijeta te 50% lezija visokog stupnja (HSIL) i približno 35% lezija niskog stupnja (LSIL) (Clifford i sur., 2005).

Oko 40% LSIL pozitivno je na sljedeće najčešće tipove u karcinomu pločastih stanica (SCC): HPV 31, -33, -45, -52 i -58. Oni pokazuju umjeren potencijal progresije u karcinom i odgovorni su za otprilike 15% slučajeva karcinoma vrata maternice u svijetu, dok drugi visokorizični tipovi poput HPV -35, -39, -51, -56 i -59 (također pozitivni u 40% LSIL) imaju manji potencijal progresije naspram ostalih visokorizičnih tipova te ih nalazimo u 3% slučajeva karcinoma vrata maternice (Clifford i sur., 2005)

Za 3% karcinoma vrata maternice odgovorno je i osam tipova HPV-a koje se svrstava u skupinu „vjerojatno visoko rizičnih tipova“ (HPV 26, -53, -66, -67, -68, -70, -73 i -82), za koje autori prema istraživanju iz 2014. navode da pogađaju iste stanične puteve kao i već priznati visokorizični tipovi te su pružili molekularan dokaz njihove karcinogenosti (Halec i sur., 2014). Može se dodatno spomenuti da se niskorizični HPV 6 i 11 nalaze u 10% LSIL te 90% genitalnih bradavica i ne predstavljaju dodatan rizik za razvoj karcinoma (IARC, 2005).

5.1.3. Geografska distribucija tipova HPV-a u karcinomu vrata maternice po kontinentima

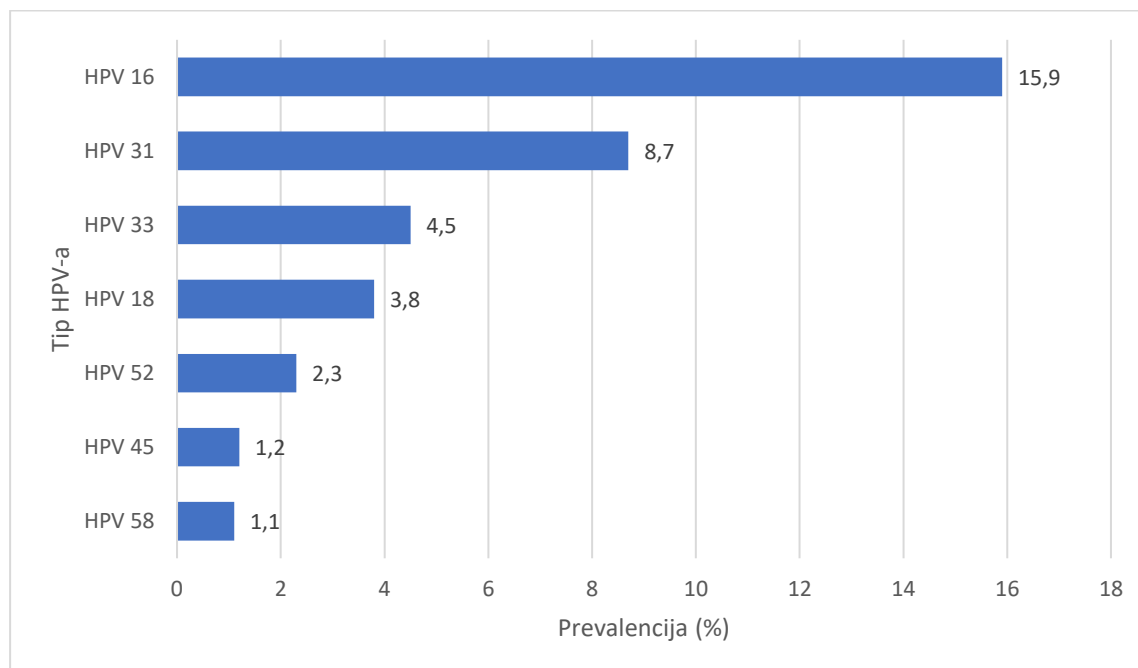
Na svim kontinentima HPV 16 zauzima prvo mjesto po učestalosti u karcinomu vrata maternice, a zatim ga slijedi HPV 18. Zajedno uzrokuju 71% slučajeva karcinoma vrata maternice, pri čemu najveći doprinos daje Sjeverna Amerika te Australija i Oceanija (oboje 79%) (Slika 9.). HPV 45 je treći najčešći tip na svim kontinentima, osim u Europi gdje se nalazi na četvrtom mjestu, a umjesto njega na trećem mjestu je HPV 33 te iza slijede HPV 31 te HPV 35 i HPV 52. U Aziji su na četvrtom mjestu HPV 52 i HPV 58 (koji u Europi imaju manju incidenciju, a HPV 58 i u ostatku svijeta), a iza su HPV 31 i HPV 33. U Sjevernoj i Južnoj Americi iza HPV 45 slijede HPV 31, HPV 33 i HPV 52 te HPV 58, a u Africi HPV 35, HPV 52, HPV 51 i HPV 31. U Australiji i oceaniji nađeni su HPV 68 ili 73 u malo većoj prevalenciji nego u drugim regijama (nije naznačeno na Slici 9.) (de Sanjose i sur., 2010).



Slika 9. Prevalencija tipova HPV-a u invazivnom karcinomu vrata maternice koji su pozitivni na HPV (po kontinentima), podaci prema de Sanjose i sur., 2010.

5.1.4. Prevalencija tipova HPV u Hrvatskoj

Istraživanje provedeno u Hrvatskoj uključivalo je većinom žene s abnormalnim PAPA nalazima, a 58,8% je bilo pozitivno na HPV. Najveću prevalenciju (uključujući jednostruke i višestruke infekcije HPV-om) je imao HPV 16 (15,9%), a zatim HPV 31, -6/11, -33, -18, -52, -45 i -58 (Slika 10.) (Milutin-Gašperov i sur., 2007).



Slika 10. Prevalencija visokorizičnih tipova HPV-a u u Hrvatskoj populaciji (uključujući jednostruke i višestruke infekcije) Podaci prema Milutin-Gašperov i sur., 2007.

Prevalencija HPV infekcije uvelike se smanjuje s 69% (dobna skupina od 12-24 godine) na 39% (dobna skupina od 45-55 godina), ali opet raste na 57% u žena starijih od 55 godina. Značajan porast učestalosti u HSIL naspram LSIL uočen je za visokorizične (VR) tipove HPV-a, odnosno -16, -18, -31 i -33, ali ne i za -45, -52 i -58 (Milutin-Gašperov i sur., 2007).

Uspoređujemo li podatke s podacima meta analize prema Boschu, naići ćemo na sličnosti ali i razlike. Ako promatramo rezultate za HSIL, HPV 16 očekivano ima najveću prevalenciju u žena s HSIL u oba istraživanja, no ona je u Hrvatskoj gotovo dva puta niža u usporedbi prema Boshu (45,3%) i iznosi 23% (Tablica 12). HPV 31 se u oba istraživanja nalazi na 2. mjestu po učestalosti (u Hrvatskoj 12% naspram 8,6% prema Boschu), a zatim ga slijedi HPV 33. Manje razlike su vidljive i u incidenciji HPV 18 koji iznosi 5% prema istraživanju u

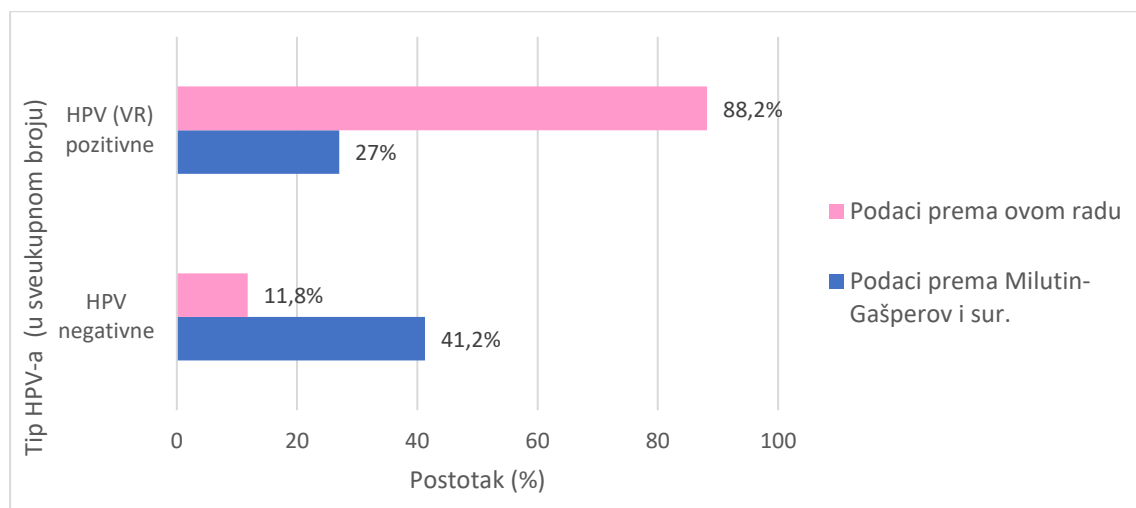
Hrvatskoj, a prema Boschu 6,9%. Najveća razlika se odnosi na HPV 58, koji je relativno učestali tip prema Boschu, a u ispitivanih žena u Hrvatskoj incidencija je 6,3 puta manja te iznosi 1.1%. Možemo spomenuti i neočekivano nisku prevalenciju HPV 52 (2.3%) i HPV 45 (0.9%) u usporedbi s meta analizom prema Boschu. Razlike bismo mogli objasniti niskim brojem analiziranih uzorka, odabirom seta početnica za umnožavanje specifičnog tipa HPV-a, ili je ovo zaista stvarna slika prevalencije HPV-a u Hrvatskoj.

Tablica 12. Prevalencija tipova HPV-a u žena s HSIL u Hrvatskoj, uključujući jednostruke i višestruke infekcije (Podaci prema Milutin-Gašperov i sur, 2007) (HSIL - skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja)

TIP HPV-A	HSIL
16	23%
31	12%
33	6,1%
18	5%
52	2,3%
58	1,1%
45	0,9%

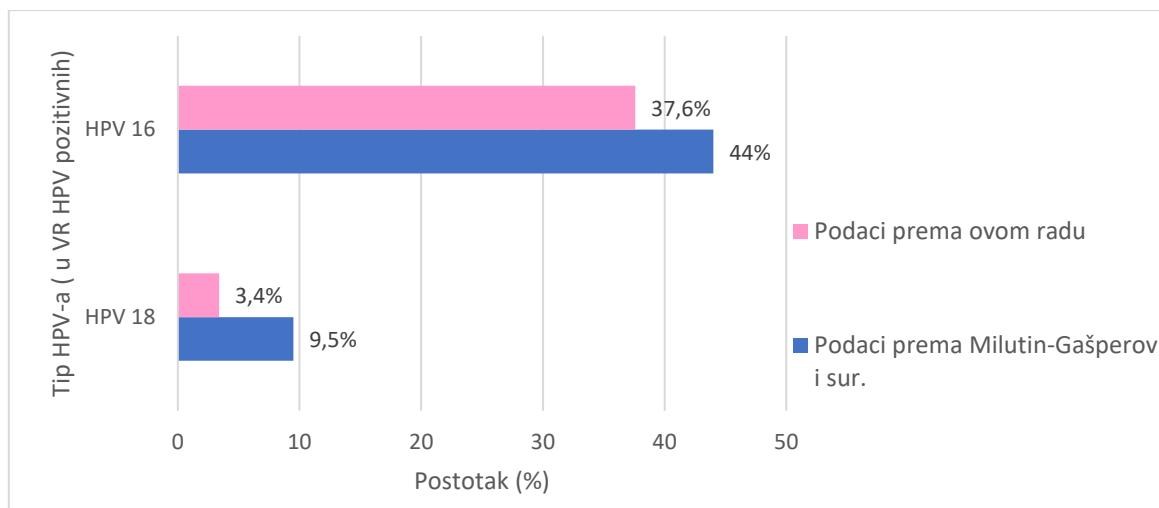
5.2. USPOREDBA REZULTATA S PODACIMA DRUGOG ISTRAŽIVANJA U HRVATSKOJ

Prema istraživanju Milutin-Gašperov, od svih ispitivanih žena 0,7% čine ispitanice s urednim citološkim nalazom, a 24,8% je imalo atipične skvamozne stanice neodređenog značenja (ASCUS, engl. *Atypical squamous cells of undetermined significance*). U provedenom istraživanju je značajno veći udio žena bez dokazanih lezija na vratu maternice (26.1%). Isto tako je u ovoj studiji i manji broj ispitanica koje su imale LSIL leziju (18.9%) u usporedbi s podacima Milutin-Gašperov (28.8%), no veći postotak žena je imalo dijagnozu HSIL (55% naspram 40.9%). Treba spomenuti da je sveukupan broj ispitivanih žena u ovom radu manji (169 ispitanica) nego u istraživanju Milutin-Gašperov (2136 ispitanica). Nadalje, treba napomenuti da su ispitanice u istraživanju Milutin-Gašperov razvrstane u podskupine na temelju citološkog nalaza, dok se u ovom istraživanju podjela u podskupine vršila na temelju patohistološke promjene. Kolposkopija pokazuje veću osjetljivost za dijagnozu cervikalnih intraepitelnih lezija u usporedbi s citologijom (70.9% naspram 51%) (Karimi-Zarchi i sur., 2013).



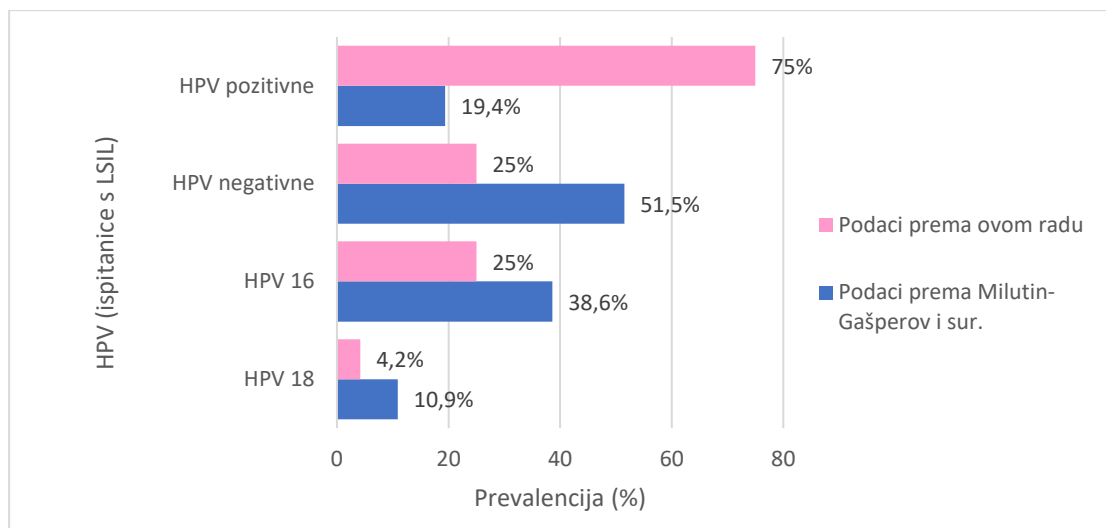
Slika 11. Postotak (%) ispitanica s negativnim i pozitivnim HPV (visokorizičnim) – usporedba podataka ovog rada i podataka drugog istraživanja u Hrvatskoj (Prema Milutin-Gašperov i sur., 2007.)

Od sveukupnog broja ispitanica u ovom radu, 88.2% žena ima dokazanu infekciju visokorizičnim HPV-om, dok u 11.8% žena nije otkrivena infekcija HPV-om (Slika 11.). U istraživanju Milutin-Gašperov i sur., 41.2% (881/2136) nema dokazanu infekciju HPV-om, a 27% (577/2136) ima dokazanu infekciju visokorizičnim tipom HPV-a.



Slika 12. Postotak (%) ispitanica koje su pozitivne na HPV 16 i 18 u skupini ispitanica s visokorizičnim HPV - usporedba podataka ovog rada i podataka drugog istraživanja u Hrvatskoj (Prema Milutin-Gašperov i sur., 2007.)

Od ukupnog broja ispitanica s dokazanom infekcijom visokorizičnim HPV-om, 37.6% ima otkriveno prisustvo HPV 16, naspram 44% (254/577) prema istraživanju Milutin-Gašperov; dok je prisustvo HPV 18 dokazano kod 3.4% žena, naspram 9.5% (55/577) (Slika 12.).

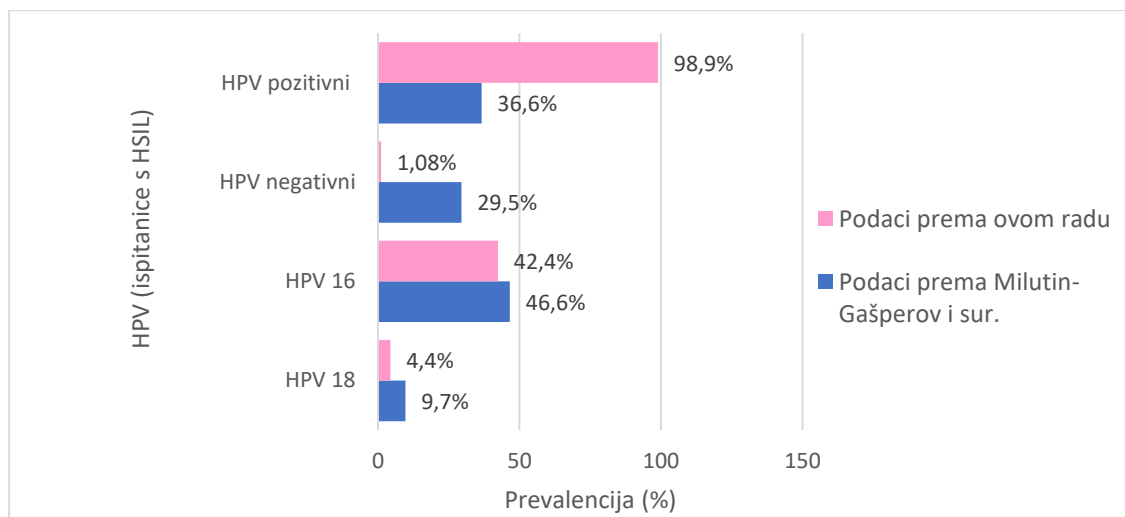


Slika 13. Postotak (%) ispitanica unutar skupine LSIL koje imaju, odnosno nemaju dokazanu infekciju visokorizičnim HPV-om te prevalencija (%) HPV 16 i HPV 18 u žena s LSIL lezijom koje imaju dokazanu infekciju visokorizičnim HPV-om – usporedba podataka ovog rada i podataka drugog istraživanja u Hrvatskoj (Prema Milutin-Gašperov i sur., 2007.)

Na temelju Slike 13. može se vidjeti usporedba podataka ovog rada s podacima istraživanja Milutin-Gašperov. Unutar skupine ispitanica s LSIL lezijama, u ovom istraživanju je u 75% žena (24/32) dokazano prisustvo visokorizičnog HPV-a, naspram 19.4% (119/615).

Od ukupnog broja ispitanica s LSIL lezijom kod kojih je dokazana infekcija visokorizičnim tipom HPV-a, 25% žena (6/24) je pozitivno na HPV 16, naspram 38.6% (46/119), što čini razliku od 13.6%.

Na nešto manju razliku nailazimo ako uspoređujemo vrijednosti za HPV 18. Od ukupnog broja ispitanica s LSIL lezijom koje imaju dokazano prisustvo visokorizičnog HPV-a, u 4.2% žena (1/24) je otkriven HPV 18, naspram 10.9% žena (13/119), što je za 6.7% manje u usporedbi s istraživanjem Milutin-Gašperov.



Slika 14. Postotak (%) ispitanica unutar skupine HSIL koje imaju, odnosno nemaju dokazanu infekciju visokorizičnim HPV-om te prevalencija (%) HPV 16 i HPV 18 u žena s HSIL lezijom koje imaju dokazanu infekciju visokorizičnim HPV-om – usporedba podataka ovog rada i podataka drugog istraživanja u Hrvatskoj (prema Milutin-Gašperov i sur., 2007.)

Iz Slike 14. također možemo vidjeti sličnosti i razlike između oba istraživanja što se tiče prevalencije HPV 16 i HPV 18.

Unutar skupine ispitanica s HSIL lezijom, u 98.9% žena (92/93) je dokazana infekcija visokorizičnim HPV-om, naspram 36.6% (320/874) prema istraživanju Milutin-Gašperov.

Od ukupnog broja ispitanica koje imaju HSIL leziju i dokazano prisustvo visokorizičnog HPV-a, HPV 16 je nađen u 42.4% žena (39/92), što je slično rezultatima istraživanja Milutin-Gašperov prema kojem je HPV 16 bio pozitivan u 46.6% žena (149/320), dok je HPV 18 otkriven u 4.4% žena (4/92) naspram 9.7% (31/320).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu, može se zaključiti sljedeće:

- Značajno je više ispitanica s dokazanom infekcijom HPV-a visokog rizika (88,2%) u usporedbi s onima kod kojih nije dokazana prisutnost HPV-a (11,8%)
- U skupini ispitanica s potvrđenom infekcijom visokorizičnim HPV-om, 37,6% imalo je infekciju HPV-om 16, dok se istovremena infekcija HPV-om 16 i 18 javlja u manjem postotku (6,0%), no ipak većem nego u slučaju jednostruke infekcije HPV-om 18 (3,4%)
- U skupini ispitanica bez dokazanih premalignih lezija, čak 75% ih je bilo pozitivno na HPV visokog rizika. 54,5% ispitanica koje su imale potvrđenu infekciju visokorizičnim HPV-om imalo je infekciju HPV-om 16, 3% HPV-om 18, a 15,2% istovremenu infekciju HPV-om 16 i 18
- U skupini s LSIL lezijama, 75% ispitanica je imalo potvrđenu infekciju visokorizičnim HPV-om, dok je u skupini s HSIL lezijama taj postotak značajno veći i iznosi 98,9%
- U skupini ispitanica s LSIL lezijama, infekcija HPV-om 16 te 18 dokazana je u 25% i u 4,2% slučajeva, dok je u skupini ispitanica s HSIL lezijama taj postotak iznosio 42,4% i 4,4%
- Istovremena infekcija HPV-om 16 i 18 prisutna je u manjem postotku u ispitanica s HSIL lezijom (4,4%) u odnosu na ispitanice s LSIL lezijom (8,3%)

7. LITERATURA

Audy-Jurković S, Grgurević Batinica A, Mahovlić V, Krivak I. Ginekološka citologija – vrat maternice. *Gynaecol Perinatol*, 2003, 12, 1–9.

Babić D, Maca M. Prekursori karcinoma materničnoga vrata. *Medix*, 2013, 104/105, 182-186.

Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*, 2010, 19, 33-39.

Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L i sur. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine*, 2008, 26(S10), K1-K16.

Bosh FX, Manos MM, Muñoz N, i sur. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87, 796-802.

Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol*, 2008, 1, 2-10.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 1-17.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*, 2002, 89, 191–199.

Castellsague X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis—Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. *JNCI Monographs*, 2003, 20–28.

Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: genital tract infections, cervical inflammation and antioxidant nutrients assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Inst Monogr*, 2003, 31, 29–34.

Cervical cancer, Pathology Report And Staging, Cervical Intraepithelial Neoplasia, dohvaćeno iz <https://www.cancerquest.org/patients/cancer-type/cervical-cancer>, pristupljeno 2.3.2019.

Cid-Arregui A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Open Virol J*, 2009, 3, 67-83.

Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 2006, 24(S3), 26-34.

Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14, 1157–1164.

Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 2005, 24, 2796–2809.

Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*, 2009, 88, 307-317.

Cosette MW. Advances in primary and secondary intervention for cervical cancer: human papilloma virus prophylactic vaccines and testing. *Oncology*, 2007, 224-235.

Čorušić A. Farmakoeekonomska analiza isplativnosti cijepljenja adolescentica cervarixom. *Gynaecol Perinatol*, 2011, 20, 21–29.

Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, i sur. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136, 1266-1297

de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7, 453-459.

de Sanjose S, Quint WG, Alemany L i sur. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*, 2010, 11, 1048- 1056.

Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2013, 540850.

Devilee P. (2003) Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (IARC WHO Classification of Tumours). The International Agency for Research on Cancer

Diagnostics.Roche, Delivering confidence with every result on cobas® 4800/6800/8800 Systems, dohvaćeno iz <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-hpv.html?fbclid=IwAR3T5uUluPBKUMrw1Um95bjl95okVeaJt519iH1d7KLusmmhAvCItnfTNI#productInfo>, pristupljeno 25.4.2019.

Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, 2005, 24, 2810–2826.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle (Review). *Journal of Clinical Virology*, 2005, 32S, S7–S15.

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, 2015, 25, 2-23.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stole M, Broke TR, Stanley MA. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 2012, 30, F55-F70.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*, 2006, 110, 525-541.

Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 2003, 22, 5201–5207.

Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, Tommasino M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalscience*, 2015, 9, 526.

Grubišić G. Nova kolposkopska klasifikacija Rio de Janeiro 2011. *Gynaecol Perinatol*, 2012, 21, 22–30.

Hadžisejdić I, Grce M, Grahovac B. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa. *Medicina fluminensis*, 2010, 46, 112-123.

Hajdu SI, The link between koilocytes and human papillomaviruses. *Ann Clin Lab Sci Autumn*, 2006, 36, 485-487.

Halec G, Alemany L, Lloveras B, Schmitt M, Alejo M, Bosch FX i sur. Pathogenic role of the eight probably/possibly carcinogenic HPV types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82 in cervical cancer. *J. Pathol*, 2014, 234, 441-451.

Harari A, Chen Z, Burk RD. Human papillomavirus genomics: past, present and future. *Curr Probl Dermatol*, 2014, 45, 1-18.

Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2016, 772, 3-12.

Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J i sur. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes, *J Clin Microbiol*, 2011, 49, 3983–3985.

Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol*, 2006, 80, 4431-4439.

Howley PM, Schiller JT, Lowy DR. Papillomaviruses. U: Fields Virology. Knipe DM, Howley PM, urednici, Philadelphia, Pennsylvania, Lippincott Williams & Wilkins, 2013, str. 1662-1704.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Najčešća pitanja i odgovori vezani uz cijepljenje protiv HPV-a, dohvaćeno iz <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/cijepljenje-protiv-humanog-papilomavirusa-hpv-2018-2019/>, pristupljeno 14.5.2019.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Prijevod europskih smjernica za osiguranje kvalitete probira raka vrata maternice. Vuković AJ, Jelavić M, Zekan J, Vrdoljak-Mozetič D, urednici. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015, dohvaćeno iz https://www.hzjz.hr/wpcontent/uploads/2013/11/Prijevod_eu_smjernica_rak_vrata_maternice_1.pdf, pristupljeno 19.2.2019.

IARC Handbook of Cancer Prevention. Cervical Cancer Screening, 2005, Vol.10, IARC Press
IARC Working Group, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 100B: Biological agents, 2012, Lyon, IARC Press

IARC Working Group, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 90: Human Papillomaviruses, 2007, Lyon, IARC Press

Irabor GI, Aigbe EG, Akpan D. Human papillomavirus in the aetiology of cervical cancer: a literature review. *International Journal of Contemporary Medical Research*, 2018, 5, 1-4.

Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol*, 2012, 3, 152.

Karamanou M, Agapitos E, Kousoulis A. et al. From the humble wart to HPV: a fascinating story throughout centuries. *Oncol Rev*, 2010, 4, 133–135.

Karimi-Zarchi M, Peighmbari F, Karimi N, Rohi M, Chiti Z. A Comparison of 3 Ways of Conventional Pap Smear, Liquid-Based Cytology and Colposcopy vs Cervical Biopsy for Early Diagnosis of Premalignant Lesions or Cervical Cancer in Women with Abnormal Conventional Pap Test. *Int J Biomed Sci*, 2013, 9, 205–210.

Koss LG, Dufree GR. Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann NY Acad Sci* 1956, 63, 1245-61.

Wright, TC i sur. Precancerous Lesions of the Cervix. U: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, Sixth Edition. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, urednici, New York, Springer, 2011, str. 229-277.

Lešin J, Babić D, Forko -Ilić J, Skerlev M, Zekan J i sur. Infekcija s više od jednim podtipom HPV-a povezana je s lošom prognozom u bolesnica s invazivnim karcinomom vrata maternice. *Gynaecol Perinatol*, 2010, 19, 141–147.

Ljubojević S, Lipozenčić J, Skerlev M. Genitalne infekcije humanim papilomavirusom. *Medicus*, 2007, 16, 51 – 57.

Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. The paediatric story of human papillomavirus (Review). *Oncol Lett*, 2014, 8, 502–506.

Matijević R. Cijepljenje kao primarna prevencija infekcije humanim papilomavirusom. *Gynaecol Perinatol*, 2007, 16, 109–114.

McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*, 2008., 72, 155-205.

McGraw SL, Ferrante JM. Update on prevention and screening of cervical cancer. *World J Clin Oncol*, 2014, 5, 744-752.

Milutin Gašperov, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective Study of the Prevalence of High-Risk Human Papillomaviruses among Croatian Women. *Coll. Antropol*, 2007, 31(S2), 89–96 .

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348, 518-527.

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006, 24(S3), 1-10.

Munoz N, Mendez F, Posso H. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, 190, 2077–2087.

Muntean M, Simionescu C, Taslică R, et al. Cytological and histopathological aspects concerning preinvasive squamous cervical lesions. *Curr Health Sci J*, 2010, 36, 26-32.

Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 2006, 24, 11–25.

Pathology outlines, LSIL, dohvaćeno iz <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixcytologyLSIL.html>, pristupljeno 23.2.2019.

Pejković L, Jeličić I, Tomić S, Mimica M, Drmić Hoffman I. Važnost određivanja HPV infekcije i proteina P16INK4a u cervikalnim intraepitelnim novotvorinama i invazivnim karcinomima cerviksa. *Gynaecol Perinatol*, 2008, 17, 33–36.

Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G i sur. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *Maedica (Buchar)*, 2016, 11, 48-54.

Raff AB, Woodham AW, Raff LM i sur. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*, 2013, 87, 6062-6072.

Roden RBS., Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18, 240-254.

Sapp M, Volpers C, Müller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*, 1995, 76, 2407–2412.

Sapp M, Bienkowska Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS journal*, 2009, 276, 7206-7216.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 2007, 370, 890–907.

Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013, 22, 553-560.

Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*, 2010, 118(1 Suppl), S12-17.

Sellers JW, Sankaranarayanan R. Poglavlje 2 : An introduction to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginner's manual. IARC, 2003.

Slideserve, Pap smear pictures, dohvaćeno iz <https://www.slideserve.com/sheila/pathology-of-the-lower-female-genital-tract>, pristupljeno 2.3.2019.

Solomon D, Davey D, Kurman R. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287, 2114-2119.

Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. „Cristalline“ virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1949, 72, 45-50.

Subramanya D, Grivas PD. HPV and cervical cancer: updates on an established relationship. *Postgrad Med*. 2008, 120, 7-13.

Syrjänen SM, Syrjänen KJ. The History of Papillomavirus Research. *Cent Eur J Public Health*, 2008, 16, S7–S41.

Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetič D, Verša Ostojčić D, Rubeša-Mihaljević R, Dinter M. Citologija vrata maternice (Papa-test) – terminologija i značaj u probiru za rak vrata maternice. *Medicina fluminensis*, 2016, 52, 324-336.

Tan SY, Tatsumura Y. George Papanicolaou (1883-1962): Discoverer of the Pap smear. *Singapore Med J*, 2015, 56, 586-587.

Vince A, Židovec-Lepej S. Klinička značajnost molekularne analize humanih papilomavirusa. *Infektološki glasnik*, 2010, 30, 123–129.

Virology, HPV 16, dohvaćeno iz <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/hpv-gwb.jpg>, pristupljeno 10.2.2019.

White EA, Sowa ME, Tan MJ i sur. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109, E260-E267.

Zekan J, Sirotković-Skerlev M, Ćorušić A, Lešin J. Onkogeni aspekti HPV-genitalnih infekcija kod žena. *Medicus*, 2009, 18, 67-71.

Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 2006, 11, 2286-2302.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 2009, 384, 260-265.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. Sažetak

HPV je relativno mali DNA virus bez ovojnice, koji taksonomski pripada obitelji Papillomaviridae (rod Papillomavirus). S obzirom na onkogeni potencijal, dijeli se na niskorizične tipove koji uzrokuju benigne bradavice te visokorizične tipove. Visokorizični HPV 16 i HPV 18 odgovorni su za više od 70% karcinoma vrata maternice. Infekcija HPV-om je glavni čimbenik rizika nastanka CIN-a, odnosno premalignih lezija vrata maternice. Više od 90% infekcija HPV-om prolazi spontano zahvaljujući imunološkom odgovoru, a mali postotak žena će razviti perzistentnu (trajnu) infekciju, od kojih će samo 1% razviti karcinom vrata maternice. Promjene koje prethode karcinomu se razvijaju godinama, a da bi se osiguralo uspješno liječenje potrebno ih je otkriti na vrijeme.

Cilj rada bio je utvrditi učestalost infekcije visokorizičnim HPV-om u skupinama ispitanica bez premalignih lezija vrata maternice i sa skvamoznom intraepitelnom lezijom niskog (LSIL) i visokog stupnja (HSIL). Nadalje, određivao se postotak ispitanica koje imaju infekciju HPV-om 16, 18 te istovremenu infekciju HPV-om 16 i 18.

Istraživanje je uključivalo 169 ispitanica koje su bile podvrgnute Papa testu, a nalaz je klasificiran prema citološkom obrascu „Zagreb 2002.“ Na daljnju obradu, odnosno kolposkopski pregled i biopsiju upućene su pacijentice s abnormalnim citološkim nalazom, klasificiranim kao CIN. Uočene morfološke promjene vrata maternice klasificirane su prema kolposkopskom obrascu „Rio de Janeiro|Zagreb 2011“, a na području najveće morfološke promjene učinjena je biopsija, nakon čega se izvodi patohistološka analiza koja se smatra „zlatnim standardom“ u dijagnostici intraepitelnih novotvorina. Za detekciju DNA HPV-a je korištena PCR metoda, odnosno *cobas*® HPV test (Roche) koji može otkriti 14 visokorizičnih tipova HPV-a.

Udio ispitanica s pozitivnim visokorizičnim HPV-om u skupinama bez premalignih lezija vrata maternice, s LSIL i HSIL lezijama iznosio je 75%, 75% i 99%. U podskupini ispitanica bez dokazanih premalignih lezija vrata maternice, 54,5% ispitanica koje su imale potvrđenu infekciju visokorizičnim HPV-om, imalo je infekciju HPV-om 16, 3% HPV-om 18, a 15% istovremenu infekciju HPV-om 16 i 18. U skupini ispitanica s LSIL lezijama, infekcija HPV-om 16 i 18 dokazana je u 25% i u 4,2% slučajeva, dok je u skupini ispitanica s HSIL lezijama taj postotak iznosio 42,4% i 4,4%. Istovremena infekcija HPV-om 16 i 18 prisutna je u

manjem postotku u ispitanica s HSIL lezijom (4,4%) u odnosu na ispitanice s LSIL lezijom (8,3%).

Na temelju prikazanih podataka potvrđena je vrlo visoka učestalost infekcije visokorizičnim HPV-om u skupini ispitanica s potvrđenim premalignim lezijama vrata maternice. Očekivano, najveći postotak infekcije visokorizičnim HPV-om nađen je u ispitanica s HSIL lezijama. Međutim, začuđujuće visoki postotak žena bez dokazanih premalignih lezija ima dokazanu infekciju HPV-om visokog rizika i veliku vjerojatnost za razvoj premalignih lezija kroz budući vremenski period.

8.2. Summary

HPV is a relatively small, non-enveloped DNA virus, which belongs to the Papillomaviridae family (genus Papillomavirus). HPV has been classified into low-risk types and high-risk types, based on its oncological potential. Low-risk types cause benign genital warts. High-risk HPV types, HPV 16 and HPV 18, cause more than 70% of cervical cancer. HPV infection is the main risk factor for CIN or cervical premalignant lesions. More than 90% of HPV infections are cleared by the immune system and a small percentage of women will develop persistent infection, but only 1% of them will develop cervical cancer. It takes years for premalignant lesions to occur, so it is important to discover them on time to provide successful treatment.

The aim of this study was to determine the frequency of high-risk HPV infection in groups of patients without premalignant lesions, with low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Furthermore, the aim was to investigate the percentage of women who had HPV 16, HPV 18 and multiple infections (HPV 16 and HPV 18 at the same time).

169 women were enrolled in the study and were submitted to the Pap test. The results were classified using a modified Bethesda cytologic classification named „Zagreb 2002“. Women with abnormal cytological results, classified as CIN, were sent for further analysis – colposcopy and biopsy. Morphological changes that have been observed were classified using the colposcopic classification „Rio de Janeiro|Zagreb 2011“, whereas the sample for biopsy was taken from the place with biggest morphological change and followed by PhD (pathohistological diagnosis), which is considered to be a gold standard in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. PCR method that has been used for HPV DNA detection in cervical DNA samples is cobas® HPV test (Roche), which can detect 14 high-risk HPV types in a single analysis.

Percentage of women who were high-risk HPV positive in the groups of women without premalignant lesions of cervix uteri, with LSIL and HSIL was 75%, 75% and 99%. In the group of women without premalignant cervical lesions, 54,5% women with confirmed high-risk HPV infection had an infection with HPV type 16, 3% had an infection with HPV type 18, and 15% had multiple infections with both HPV 16 and HPV 18. In the group of women with LSIL, infection with HPV type 16 and HPV type 18 has been proven in 25% and 4,2% of women, whereas in the group of women with HSIL prevalence of HPV 16 and HPV 18

was 42,4% and 4,4%. Multiple infections with both HPV type 16 and HPV type 18 were found less frequent in women who had HSIL (4,4%) compared to women who had LSIL (8,3%).

Based on the results shown in the study, a very high frequency of high-risk HPV infection was confirmed in the group of women with confirmed premalignant cervical lesions. Expectedly, the highest percentage of high-risk HPV infection was found in the group of women with HSIL lesions. However, surprisingly high percentage of women without proven premalignant lesions have been proven high-risk HPV infection and have a high probability of developing premalignant lesions in the future.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

ADC – adenokarcinom (engl. *Adenosquamous carcinoma*)

ASCUS - atipične skvamozne stanice neodređenog značenja (engl. *Atypical squamous cells of undetermined significance*)

CIN - cervikalna intraepitelna neoplazija

CIS – karcinom in situ

CRPV - papilomavirus divljeg kunića (engl. *Cottontail rabbit papillomavirus*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

E6AP – E6-povezani protein (engl. *E6 associated protein*)

HPV – humani papiloma virus

HR HPV - visokorizični tip HPV-a (engl. *High risk HPV*)

HSIL- skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja (engl. *High-grade squamous intraepithelial lesion*)

LCR - dugačka centralna regija (engl. *Long central region*)

LR HPV – niskorizični tip HPV-a (engl. *Low risk HPV*)

LSIL - skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja (engl. *Low-grade squamous intraepithelial lesion*)

ORF – otvoreni okvir čitanja (engl. *Open reading frame*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)

PhD – patohistološka dijagnoza

pRb - protein retinoblastoma

SCC – karcinom pločastih stanica (engl. *Squamous cell carcinoma*)

SIL - skvamozna intraepitelna lezija (engl. *Squamous intraepithelial lesion*)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za Medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UČESTALOST INFEKCIJE HPV-OM VISOKOG RIZIKA U PREMALIGNIM LEZIJAMA VRATA MATERNICE

Dorjana Mačukat

SAŽETAK

HPV je relativno mali DNA virus bez ovojnice, koji taksonomski pripada obitelji Papillomaviridae (rod Papillomavirus). S obzirom na onkogeni potencijal, dijeli se na niskorizične tipove koji uzrokuju benigne bradavice te visokorizične tipove. Visokorizični HPV 16 i HPV 18 odgovorni su za više od 70% karcinoma vrata maternice. Infekcija HPV-om je glavni čimbenik rizika nastanka CIN-a, odnosno premalignih lezija vrata maternice. Promjene koje prethode karcinomu se razvijaju godinama, a da bi se osiguralo uspješno liječenje potrebno ih je otkriti na vrijeme. Cilj rada bio je utvrditi učestalost infekcije visokorizičnim HPV-om u skupinama ispitanica bez premalignih lezija vrata maternice i sa skvamoznom intraepitelnom lezijom niskog (LSIL) i visokog stupnja (HSIL). Nadalje, određivao se postotak ispitanica koje imaju infekciju HPV-om 16, 18 te istovremenu infekciju HPV-om 16 i 18. Istraživanje je uključivalo 169 ispitanica s pozitivnim Papa testom, koje su na temelju patohistološkog nalaza svrstane u skupine bez premalignih promjena vrata maternice i skupine LSIL te HSIL. Za detekciju DNA HPV-a korištena je PCR metoda, odnosno cobas® HPV test (Roche). Udio ispitanica s pozitivnim visokorizičnim HPV-om u skupinama bez premalignih lezija vrata maternice, s LSIL i HSIL lezijama iznosio je 75%, 75% i 99%. U podskupini ispitanica bez dokazanih premalignih lezija vrata maternice, 54,5% ispitanica koje su imale potvrđenu infekciju visokorizičnim HPV-om, imalo je infekciju HPV-om 16, 3% HPV-om 18, a 15% istovremenu infekciju HPV-om 16 i 18. U skupini ispitanica s LSIL lezijama, infekcija HPV-om 16 i 18 dokazana je u 25% i u 4,2% slučajeva, dok je u skupini ispitanica s HSIL lezijama taj postotak iznosio 42,4% i 4,4%. Istovremena infekcija HPV-om 16 i 18 prisutna je u manjem postotku u ispitanica s HSIL lezijom (4,4%) u odnosu na ispitanice s LSIL lezijom (8,3%). Na temelju prikazanih podataka potvrđena je vrlo visoka učestalost infekcije visokorizičnim HPV-om u skupini ispitanica s potvrđenim premalignim lezijama vrata maternice. Očekivano, najveći postotak infekcije visokorizičnim HPV-om nađen je u ispitanica s HSIL lezijama. Međutim, začuđujuće visoki postotak žena bez dokazanih premalignih lezija ima dokazanu infekciju HPV-om visokog rizika i veliku vjerojatnost za razvoj premalignih lezija kroz budući vremenski period. Na temelju prikazanih podataka potvrđena je vrlo visoka učestalost infekcije visokorizičnim HPV-om u skupini ispitanica s potvrđenim premalignim lezijama vrata maternice. Očekivano, najveći postotak infekcije visokorizičnim HPV-om nađen je u ispitanica s HSIL lezijama. Međutim, začuđujuće visoki postotak žena bez dokazanih premalignih lezija ima dokazanu infekciju HPV-om visokog rizika i veliku vjerojatnost za razvoj premalignih lezija kroz budući vremenski period.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

- Rad sadrži: 53 stranica, 14 grafičkih prikaza, 12 tablica i 87 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: HPV, infekcija HPV-om, visokorizični HPV, učestalost visokorizičnih genotipova HPV-a, LSIL, HSIL, cervikalna intraepitelna neoplazija, premaligne promjene vrata maternice, *cobas*
- Mentor: **Doc. dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Dražan Butorac, *docent Sveučilišta u Zagrebu Katoličko bogoslovnog fakulteta, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice.*
- Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Dražan Butorac, *docent Sveučilišta u Zagrebu Katoličko bogoslovnog fakulteta, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

FREQUENCY OF HIGH-RISK HPV INFECTION IN PREMALIGNANT LESIONS OF THE UTERINE CERVIX

Dorjana Mačukat

SUMMARY

HPV is a relatively small, non-enveloped DNA virus, which belongs to the Papillomaviridae family (genus Papillomavirus). HPV has been classified into low-risk types and high-risk types, based on its oncological potential. Low-risk types cause benign genital warts. High-risk HPV types, HPV 16 and HPV 18, cause more than 70% of cervical cancer. HPV infection is the main risk factor for CIN or cervical premalignant lesions. It takes years for premalignant lesions to occur, so it is important to discover them on time to provide successful treatment. The aim of this study was to determine the frequency of high-risk HPV infection in groups of patients without premalignant lesions, with low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Furthermore, the aim was to investigate the percentage of women who had HPV 16, HPV 18 and infection with HPV 16 and HPV 18 at the same time. 169 women were enrolled in the study and had positive Pap test results. All of them were classified based on pathohistological analysis into groups of subjects without premalignant lesions of the uterine cervix and groups of subjects with LSIL and HSIL. PCR method that has been used for HPV DNA detection in cervical DNA samples is cobas® HPV test (Roche). Percentage of women who were high-risk HPV positive in the groups of women without premalignant lesions of the uterine cervix, with LSIL and HSIL was 75%, 75% and 99%. In the group of women without premalignant cervical lesions, 54,5% women with confirmed high-risk HPV infection had an infection with HPV type 16, 3% had an infection with HPV type 18, and 15% had multiple infections with both HPV 16 and HPV 18. In the group of women with LSIL, infection with HPV type 16 and HPV type 18 has been proven in 25% and 4,2% of women, whereas in the group of women with HSIL frequency of HPV 16 and HPV 18 was 42,4% and 4,4%. Multiple infections with both HPV type 16 and HPV type 18 were found less frequent in women who had HSIL (4,4%) compared to women who had LSIL (8,3%). Based on the results shown in the study, a very high frequency of high-risk HPV infection was confirmed in the group of women with confirmed premalignant cervical lesions. Expectedly, the highest percentage of high-risk HPV infection was found in the group of women with HSIL lesions. However, surprisingly high percentage of women without proven premalignant lesions have been proven high-risk HPV infection and have a high probability of developing premalignant lesions in the future.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 53 pages, 14 figures, 12 tables and 87 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HPV, HPV infection, high-risk HPV, frequency of high-risk HPV genotypes, LSIL, HSIL, cervical intraepithelial lesion, premalignant lesions, *cobas*

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dražan Butorac, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Catholic Faculty of Theology, Sestre milosrdnice University Hospital Center

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dražan Butorac, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Catholic Faculty of Theology, Sestre milosrdnice University Hospital Center

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019.