

Ploidnost tumorskih stanica i tip humanog papiloma virusa u cervikalnim intraepitelnim neoplazijama

Župić, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:065558>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-02**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Župić, Tomislav (2011) *Ploidnost tumorskih stanica i tip humanog papiloma virusa u cervikalnim intraepitelnim neoplazijama*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1471>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Tomislav Župić

**Ploidnost tumorskih stanica i tip
humanog papiloma virusa u cervikalnim
intraepitelnim neoplazijama**

DISERTACIJA



Zagreb, 2011.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Tomislav Župić

**Ploidnost tumorskih stanica i tip
humanog papiloma virusa u cervikalnim
intraepitelnim neoplazijama**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disetracija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada je prof. dr. sc. Damir Babić.

Redni broj rada:

Ovaj rad izrađen je uz stručnu i prijateljsku pomoć mojih dragih kolega i prijatelja i čast mi je što im mogu na tome zahvaliti.

Posebnu i najveću zahvalu upućujem mentoru prof. dr. sc. Damiru Babiću.

Zahvaljujem kolegama Kliničkog zavoda za patologiju i Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb.

Zahvaljujem kolegama dr. Jozi Majiću, dr. Leu Žagaru i dr. Josipu Jurasu na pomoći pri izradi disertacije.

Zahvaljujem Mirjani Gašperov, prof. na lektoriranju disertacije.

Zahvaljujem mojoj obitelji na pomoći i razumijevanju.

Mojoj majci Ani

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CERVICALNA INTRAEPITELNA NEOPLAZIJA	1
1.1.1. Etiologija i epidemiologija	1
1.1.2. Povijesni pregled nazivlja	9
1.1.3. Citološka i patohistološka podjela	10
1.1.4. Dijagnoza i liječenje	13
1.2. PAPILOMA VIRUSI ČOVJEKA	17
1.2.1. Povijest	17
1.2.2. Klasifikacija	18
1.2.3. Genom i životni ciklus	20
1.3. PROTOČNA CITOMETRIJA	25
1.3.1. Faze staničnog ciklusa	25
1.3.2. Ploidnost stanica	26
1.3.3. Metode protočne citometrije	26
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
2.1. HIPOTEZA	29
2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3. ISPITANICE I METODE	30
3.1. ISPITANICE	30
3.2. METODE	30
3.2.1. Patohistološka analiza	31
3.2.2. PCR izolacija humanog papiloma virusa	31
3.2.3. Protočna citometrija	31
3.3. STATISTIČKA OBRADA	33
4. REZULTATI	34
5. RASPRAVA	44
6. ZAKLJUČCI	52
7. SAŽETAK	54
8. SUMMARY	55
9. LITERATURA	56
10. ŽIVOTOPIS	74

POPIS KRATICA

ASCUS – atipične pločaste stanice neodređenog značenja

CDK – ciklin ovisna kinaza

CIN – cervikalna intraepitelna neoplazija

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

HIV – virus humane imunodeficijencije

HLA – humani leukocitni antigen

HPV – humani papiloma virus

HR – visoki rizik

HSIL – skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja

LR – niski rizik

LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja

MIC – mikroinvazivni rak

ORF – otvoreni okvir očitavanja

PCR – polimerazna lančana reakcija

pRb – retinoblastomski protein

SIL – skvamozna intraepitelna lezija

SKG – skvamokolumna granica

TZ – zona preobrazbe

URR – nekodirajuća regulatorna regija

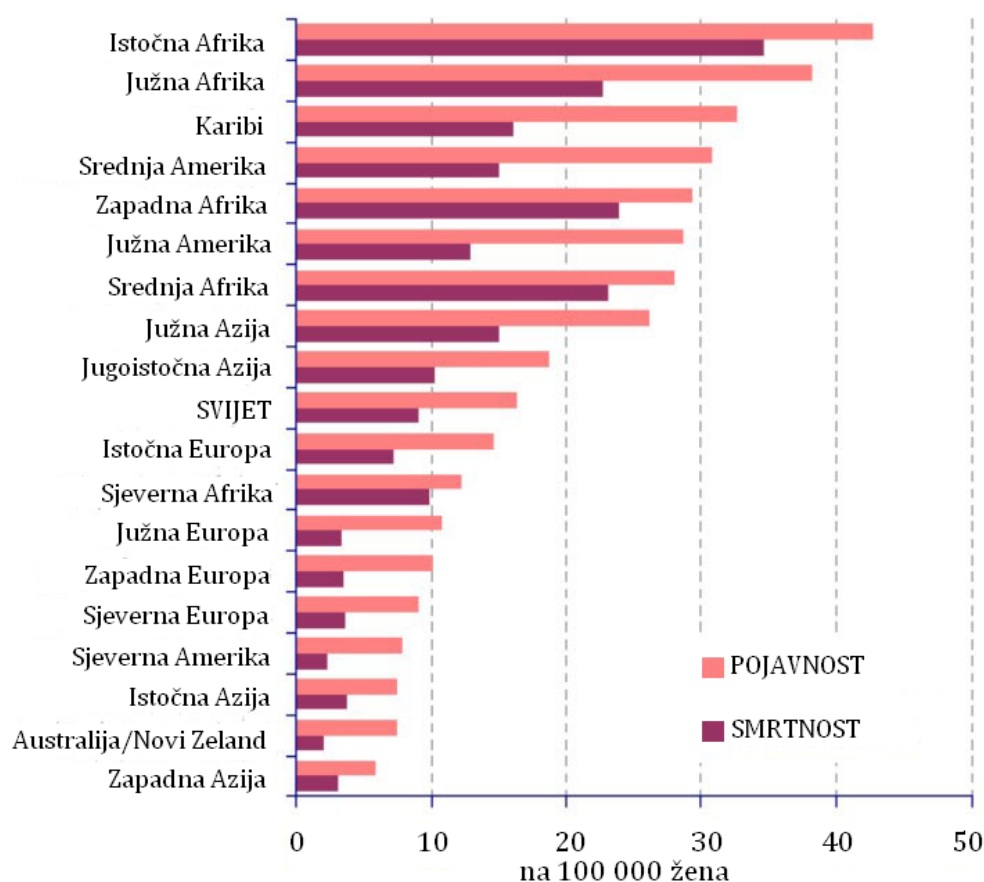
1. U V O D

1.1. CERVICALNA INTRAEPITELNA NEOPLAZIJA

1.1.1. Etiologija i epidemiologija

Rak vrata maternice je dugo bio najčešći rak među ženama u razvijenim zemljama dok ga u ranim devedesetim godinama prethodnog stoljeća nije premašio rak dojke (1,2). Najviše se pojavljuje u nerazvijenim zemljama jugozapadne Afrike, Južne Amerike i jugoistočne Azije. Na te zemlje otpada oko 80% svih novootkrivenih slučajeva raka vrata maternice (3). Godišnje se u svijetu registira gotovo 500 000 novooboljelih, a oko 270 000 je smrtnih ishoda (1).

Stope pojavnosti raka vrata maternice u razvijenim zemljama su do 10/100 000 žena, a u zemljama u razvoju i veće od 20/100 000 žena (slika 1.).



Slika 1. Pojavnost i smrtnost od raka vrata maternice u pojedinim dijelovima svijeta

U razvijenim se zemljama rak vrata maternice nalazi na desetom mjestu po učestalosti raka u žena, a u Hrvatskoj je osmi po učestalosti i pojavljuje se u 15,6/100 000 žena prema podacima Zavoda za javno zdravstvo iz 2008. godine. Smrtnost od raka vrata maternice u Hrvatskoj je 4,5/100 000 žena. U 2007. godini registrirano je 387 novih bolesnica, a 114 ih je umrlo od ove bolesti (4). U Hrvatskoj se rak vrata maternice rjeđe pojavljuje nego u državama srednje i jugoistočne Europe.

Pojavnost i smrtnost su značajno sniženi zahvaljujući citološkom Papanicolau (PAPA) testu kod dobro organiziranog programa probira otkrivanja preinvazivnih promjena (5). U populacijama, koje nisu podvrgnute citološkom probiru ili je on nepotpun, rak vrata maternice se češće javlja.

Rak vrata maternice nastaje iz preinvazivnih neoplastičnih promjena sa staničnom displazijom, kao što su *cervikalne intraepitelne neoplazije* (engl. *cervical intraepithelial neoplasia – CIN*) stupnja I, II i III (6). Što je veći stupanj displazije, to je vjerojatniji prijelaz u invazivni rak (6,7). Samo manji broj displazija progredira, a veći dio traje godinama ili spontano regredira (6).

Etiološka uloga ljudskog papiloma virusa (engl. *human papilloma virus – HPV*) u karcinogenezi vrata maternice dobro je proučena i potvrđena mnogim studijama (1,8-10). Većina drugih rizičnih čimbenika su zapravo povezani sa zarazom HPV-om i ne mogu se zasebno izdvojiti (11). Smatra se kako od trajne zaraze HPV-om do invazivnog raka vrata maternice treba proći od 7 do 10 godina (10).

Učestalost zaraze HPV-om u SAD-u i Europi među ženama u dobi od 14. do 59. godine je 26,8%, najveća je među ženama od 20. do 24. godine (33,8%), a smanjuje se nakon 30. godine (12,13). Smatra se kako će se 75% – 80% spolno aktivnih žena zaraziti HPV-om prije 50. godine života (14).

U svijetu je u urednim nalazima PAPA testova nađeno oko 10% žena zaraženih HPV-om, a najviše ih je u Africi 22% (15). Normalan PAPA nalaz imalo je 52% žena zaraženih HPV-om (16).

Najvažniji rizik zaraze HPV-om je spolna aktivnost (17,18). Izravno je povezan s brojem spolnih partnera, ali je relativno visok (4% – 20%) i kod onih sa samo jednim partnerom (16,18,19). Kao kod svih spolno prenosivih bolesti, spolni odnos s novim partnerom je najvažniji rizični čimbenik za razliku od odnosa sa stalnim partnerom (18,19).

Među adolescenticama, koje su bile spolno aktivne dvije godine i imale četiri partnera nađen je HPV u 64% slučajeva (16). Druge studije pokazuju učestalost nove zaraze HPV-om u studentica tijekom jedne do dviju godina nakon njihova prvog spolnog partnera

od oko 30% (18,20). Zarazu HPV-om nije moguće dokazati kod djevojica ili je mnogo niža nego kod spolno aktivnih žena – 4% prema 22% (21). Početak prijenosa zaraze HPV-om s muškarca na ženu je obično asimptomatski i bez znanja da se dogodila zaraza (22). Studije su jasno ukazale kako rak vrata maternice gotovo i ne postoji u žena koje nisu imale spolne odnose (23).

Stupanjem u spolne odnose 44% – 69% djevojaka dolazi u kontakt s HPV-om (17,24). Smatra se kako ih 91% razvije prolaznu zarazu HPV-om i većina ih u određenom vremenskom razdoblju postaje HPV negativna, a stalnu zarazu razvije samo manji broj žena (17). Žene koje su imale prvi spolni odnos u dobi mlađoj od 20 godina imaju relativni rizik nastanka raka vrata maternice 2,55 puta veći od onih koje su kasnije započele sa spolnim životom (25). Pretpostavlja se kako je razlog povećanog rizika adolescentica aktivni proces metaplazije na porciji jer su pričuvne stanice posebno podložne zloćudnim čimbenicima.

Spolni odnosi u mlađoj životnoj dobi, rana dob ulaska u bračnu zajednicu i prva trudnoća ne predstavljaju rizične čimbenike za razvoj raka vrata maternice, već izloženost spolno prenosivim kancerogenima. U zajednicama gdje žene tradicionalno rano stupaju u bračnu zajednicu i gdje je monogamija uobičajena, učestalost raka vrata maternice je vrlo niska (26). Pokazalo se kako broj spolnih partnera, ako nisu zaraženi HPV-om, ne predstavlja rizični čimbenik za nastanak raka vrata maternice (27).

U žena čiji su muževi imali spolne odnose sa ženama oboljelim od raka vrata maternice nađena je velika učestalost istog raka (28). Žene čiji muževi imaju spolne odnose izvan bračne zajednice imaju 7,8 puta veći rizik za nastanak raka vrata maternice (29).

Multicentrična studija IARC pokazala je kako veliki broj poroda povisuje rizik od raka vrata maternice među ženama zaraženim HPV-om (30). Moguće objašnjenje je u ponavljanoj ozljedi vrata maternice, nedostatku vitamina, nedostatnoj prehrani tijekom trudnoće te hormonskim čimbenicima. Niski socioekonomski status predstavlja čimbenik rizika nastanka raka vrata maternice i nakon isključivanja zaraze HPV-om i ostalih čimbenika (31).

Većina zaraze HPV-om među mladim ženama je prolazna i asimptomatska te više od 50% novonastalih zaraza nestaje u razdoblju od 6 do 8 mjeseci, a 80% – 90% nestaje unutar dviju do pet godina (32-34). Manji broj zaraza HPV-om perzistira i može započeti staničnu transformaciju, ali to nije uvijek dovoljno za razvoj prekanceroza i raka vrata maternice (35). Nije sasvim jasno je li kod HPV pozitivnih žena, koje s vremenom postanu

negativne, virus u potpunosti nestao iz organizma ili je ostao u inaktivnom, odnosno slabo aktivnom obliku.

Cervikalne displazije inducirane su zarazom HPV-om i genomi tih virusa otkriveni su kod njih u velikom broju, a nađeni su u gotovo svim slučajevima raka vrata maternice (36,37). Pojedini istraživači smatraju kako ne postoji rak vrata maternice negativan na HPV (38). Negativan nalaz je posljedica krivog uzimanja uzorka, osjetljivosti metode detekcije, postojanja još netipiziranih HPV-a i oštećenja genoma HPV-a tijekom ugradnje u kromosom domaćina.

Kod perzistentne zaraze HPV-om abnormalnosti pločastih stanica vrata maternice nakon nekog vremena otkrivaju se u 94% slučajeva (39). Stalna zaraza HPV-om ima 30 puta veći rizik nastanka CIN-a III te 213 puta veći rizik nastanka invazivnog raka u odnosu na nezaražene (40,41).

Nestajanje zaraze HPV-om predviđa regresiju cervikalne displazije (42). Perzistentna zaraza HPV-om je ona koja traje dulje od 6 ili 12 mjeseci i nije poznato zbog čega u nekih žena perzistira, a u drugih ne. Vjerojatnost stalne zaraze povezana je s nekoliko čimbenika:

- *onkogenost*: HPV visokog rizika češće perzistira nego HPV niskog rizika (17)
- *trajanje zaraze*: što je duže vremena zaraza HPV-om trajala, to je veća mogućnost perzistencije
- *starija dob*: 50% zaraza HPV-om visokog rizika perzistira u starijih od 55 godina u odnosu na 20% onih ispod 25 godina (43).

Danas se smatra kako je stalna zaraza HPV-om visokog rizika, dobivena spolnim putem, najvažniji nezavisni rizični čimbenik u razvoju visokostupnjevanih displazija i raka vrata maternice (32,33,43-48).

Praćenje žena koje su zaražene HPV-om tijekom četiriju godina pokazalo je perzistenciju istog tipa HPV-a u 4,8% žena uz povezanost s patološkim promjenama (49). Kod zaraze HPV-om visokog rizika, koja perzistira duže od 12 mjeseci, 21% žena razvilo je CIN II ili CIN III tijekom 30 mjeseci praćenja (33).

Povezanost između intraepitelnih neoplazija anogenitalne regije s HPV tipovima 16 i 18 je obilno dokumentirana, ali nesumljiva evidencija povezanosti HPV-a s rakom postoji jedino za rak vrata maternice (50,51). Da HPV visokog rizika zarazi ženski spolni trakt, nije nužna zona preobrazbe te je ista učestalost tih tipova u rodnicima histerektomiranih i nehisterektomiranih žena (52).

Utjecaj količine HPV-a na rizik nastanka displazija je predmet rasprave jer jedne studije pokazuju porast rizika s povećanjem količine virusa, a druge to ne pokazuju

(53,54). Predložene su sljedeće hipoteze koje objašnjavaju te razlike: količina virusa varira o tipu HPV-a ili je virusna integracija kod visokostupnjevane bolesti povezana sa smanjenjem njegove količine.

Pojavnost cervikalnih displazija varira među pojedinim zemljama, a razloge treba tražiti u gospodarskoj razvijenosti, o čemu ovisi dostupnost PAPA testa, različite spolne navike i utjecaj religije na sveukupan život populacije.

Blaži stupnjevi cervikalnih displazija ne prijavljuju se Nacionalnim registrima za rak te su stoga podatci o njihovoj učestalosti dostupni iz svega nekoliko objavljenih studija. Visokostupnjevane promjene su najčešće dijagnosticirane u dobi od 25. do 35. godine, a invazivni rak se većinom javlja nakon 40. godine. Danas se citološki nalaz CIN-a II/III može naći i u osoba mlađih od 15. godine i naglo raste od 20. do 24. godine neposredno nakon početka spolne aktivnosti. Najveća je učestalost od 25. do 29. godine s visokim pobolom sve do 50. godine.

Jednogodišnja procjena učestalosti u SAD-u bila je 4% za CIN I i 5% za CIN II/III (55). Studija Američkog društva patologa, nazvana Q-Probes, je na uzorcima PAPA testova našla 2% LSIL-a i 0,5% HSIL-a (56). U drugoj velikoj američkoj studiji *National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program* (NBCCEDP) učestalost abnormalnih PAPA testova među socijalno ugroženim ženama iznosila je 2,9% LSIL-a i 0,8% HSIL-a (57). Prema američkom registru za rak – SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) pojavnost CIN-a III iznosi 31,4/100 000 žena (58).

Porast učestalosti abnormalnih PAPA testova i citološki potvrđenih HPV promjena u adolescentica i mladih žena u Hrvatskoj pokazan je u istraživanju Audy-Jurković i sur. (59). Učestalost zaraze HPV-om u žena s citopatološkim suspektnim nalazom porasla je u Hrvatskoj s 5% 1990. godine na 66% 1996. godine (60). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2009. godine, broj hospitalizacija zbog preinvazivnih promjena vrata maternice iznosio je 2086, a broj operativnih postupaka izvedenih u privatnim poliklinikama nije poznat. U zemljama s organiziranim programom probira se na jedan invazivni rak vrata maternice otkrije 7 – 12 preinvazivnih promjena (61). Stoga se može pretpostaviti kako je broj cervikalnih intraepitalnih neoplazija u Hrvatskoj oko 4000 godišnje.

Iako rezultati jasno ukazuju kako je HPV nužan etiološki čimbenik raka vrata maternice, većina zaraženih ne će nikada oboljeti od raka (40,62,63). Nesklad između visoke učestalosti zaraze HPV-om i relativno niske učestalosti raka vrata maternice pokazuje kako zaraza predstavlja tek početak procesa karcinogeneze i sama nije dovoljna

za nastanak raka. Samo manji broj bolesnica s cervikalnim displazijama razvije invazivni rak nakon dugog razdoblja latencije te postoji opravdana sumnja kako neki genetski čimbenici, ovisni ili neovisni o djelovanju HPV-a, imaju ulogu u etiologiji ovog raka (64).

Još uvijek ne postoji pouzdani način utvrđivanja koja će cervikalna displazija nazadovati, ostati u istom obliku ili napredovati. Za dinamičku interpretaciju morfolologije cervikalnih displazija nužne su dodatne metode važne za bolje razlikovanje reaktivnih promjena od CIN-a, kao i za procjenu rizika njihove progresije.

U prospektivnoj analizi McIndoea i sur. CIN III progredirao je u invazivni rak u 34,6% slučajeva kroz 14 godina (65). Nasiell i sur. su još 1986. godine pokazali da 62% blagih displazija regredira prema normalnom nalazu, 22% perzistira, a 16% progredira (66). Kod srednje teških displazija (praćenih dulje od četiriju godina) došlo je do regresije u 28% slučajeva, a 50% progrediralo je prema teškoj displaziji (66). Oester je 1993. godine objavio kako je rizik progresije u invazivni rak različit i kako ovisi o stupnju displazije te za CIN I iznosi otprilike 1%, za CIN II 5% i za CIN III najmanje 12% (6). Regresija je u obrnutom odnosu sa stupnjem promjene, ali i viši stupnjevi mogu spontano regredirati u značajnom broju – CIN III u 32% (6). Prema kanadskoj studiji, bez liječenja i tijekom 10 godina, progredirat će 12% blagih, 17% srednje teških i 21% teških displazija (67).

HPV je epiteliotropni virus i kad je epitel jednom zaražen virusom može perzistirati u citoplazmi ili se integrirati u genom domaćina. Kada HPV ostaje u episomalnom neintegriranom obliku, to će rezultirati niskostupnjevanom promjenom (CIN I), a kada se ugradi u genom, može se razviti visokostupnjevana promjena (CIN II/III) i rak vrata maternice (68).

S obzirom da zaraza HPV-om ne dovodi nužno do neoplastične pretvorbe, u ranom je stadiju važan čimbenik individualna prijemljivost, određena imunološkim sustavom domaćina (69). On može eliminirati virus, ali ako je neprimjeren, tada zaraza može biti trajna i dovesti do prekanceroznih promjena i raka vrata maternice. Moguće je da sustav HLA (humani leukocitni antigen) ima važnu ulogu u nastanku trajne zaraze HPV-om jer proteinski produkti HLA sudjeluju u prezentaciji antigena HPV-a T-limfocitima domaćina. Određeni HLA tipovi mogu štetno utjecati na rizik stjecanja zaraze HPV-om i zbog toga su neke žene više podložne zarazi temeljenoj na genetskom faktoru (70).

Nestanak zaraze povezan je s regresijom citoloških promjena, što je barem djelomično uzrokovano sa stvaranjem protutijela na HPV i regrutiranjem makrofaga *natural killer cells* i aktiviranjem CD4⁺ T-limfocita (71,72). U većini slučajeva je imunološki odgovor

dominantan proces i zaraza ostaje latentna ili je brzo suprimirana, ali tim protutijelima trebaju mjeseci kako bi se razvili ili se uopće nikad ne razviju (73).

HPV se odlično prilagođuje različitim epitelnim stanicama sluznice i kože iskorištavajući stanične mehanizme i pritom izbjegava imunološki mehanizam domaćina. Naime, zaraza HPV-om je intraepitelna i teoretski bi trebala biti otkrivena putem lokalnih makrofaga – *antigen presenting cells* (APC), odnosno Langerhansovim dendritičkim stanicama. Tako aktivirane Langerhansove stanice kreću prema prvom drenažnom limfnom čvoru i prezentiraju antigen HPV-a T-limfocitima. Potom se T-limfociti diferenciraju u različite efektorne stanice koje se kreću prema mjestu zaraze i uništavaju zaražene stanice (71,72). Međutim, nije poznato zašto se to kod zaraze HPV-om ne događa i nedostaje li esencijalni signal aktivacije lokalnog imunološkog sustava.

Unatoč tomu, stanice zaražene HPV-om mogu aktivirati moćan obrambeni sustav preko sekrecije interferona 1 (IFN- α i IFN- β) koji imaju snažan protuvirusni, protuproliferacijski, protuangiogeni i imunostimulatorni učinak. Ovi interferoni su ključne „molekule mostovi” između urođenog i stečenog imuniteta. Međutim, HPV (kao i većina DNA-virusa) uzrokuje „downregulation” IFN- α gena i tako onemogućuje sintezu ovog interferona. Prema tome, HPV ima mehanizme „bijega” prirođenoj imunosti i tako onemogućuje stjecanje imuniteta. To objašnjava činjenicu kako žene, koje su imale prolaznu zarazu HPV-om, nisu imune na kasniju ponovnu zarazu. Važno je naglasiti kako kod zaraze HPV-om nema viremije i ne mogu se stvoriti cirkulirajuća blokirajuća antitijela na novu zarazu. Upravo je ova spoznaja omogućila stvaranje cjepiva protiv nekih tipova HPV-a.

Kod imunokompromitiranih češće se javljaju displazije vrata maternice zbog neprepoznavanja promijenjene stanice i smanjene otpornosti na mutagene viruse. Žene s kroničnim bolestima i dugotrajnom imunosupresivnom terapijom (transplantacija, sistemski lupus eritematoides) imaju povišeni rizik za razvoj displazija (74,75).

Zaraza HIV-om (engl. *human immunodeficiency virus*) predstavlja rizični čimbenik za nastanak zaraze HPV-om i za nastanak cervikalnih displazija (76,77). Rak vrata maternice je jedan od najčešćih s AIDS-om povezanih malignoma u žena (78). Učestalost zaraze HPV-om je značajno viša u žena zaraženih HIV-om unutar svih dobnih skupina i prema tipovima HPV-a visokog rizika (79,80).

Zaraza klamidijom, herpes simplex virusom ili drugim spolno prenosivim bolestima može biti samo biljeg spolnog ponašanja i izloženosti HPV-u, ali nisu i uzročni čimbenici

nastanka displazija vrata maternice (81,82). Oni mogu promijeniti i smanjiti imunitet domaćina i time olakšati perzistenciju zaraze HPV-om (83). Herpes simplex virus 2 ne smatra se bitnim etiološkim čimbenikom iako bi mogao biti kofaktor u stvaranju atipije stanica (82).

Pušenje i nastanak displazija i raka vrata maternice pozitivno su povezani (84,85). Razlog može biti u izravnom mutagenom djelovanju raspadnih produkata pušenja (nikotin i kotinin) koncentriranih u cervikalnoj sluzi, gdje mogu potaknuti stanične epitelne abnormalnosti sa slabijim lokalnim imunitetom na HPV zbog smanjenja broja Langerhansovih stanica (86,87). Pušenje i zaraza HPV-om imaju sinergističke učinke na razvoj displazija i raka vrata maternice pa je u žena koje puše cigarete rizik dva do četiri puta veći u odnosu na nepušačice (88). Jedna studija izvijestila je o relativnim rizicima (RR) od 2 za CIN II/III kod pušenja, 15 za zarazu HPV-om i 66 zajedno za pušenje i zarazu HPV-om (89).

Korištenje oralnih hormonskih kontraceptiva više od pet godina povisuje rizik nastanka raka vrata maternice od dva do četiri puta uz kontroverze načina utjecaja (90). Povišeni rizik opada nakon prekidanja oralne kontracepcije te se za deset godina vraća na osnovni rizik (91). Zato se smatra kako može biti samo biljeg izloženosti zarazi HPV-om prije nego uzročni čimbenik.

U bolesnica s cervikalnim displazijama nađene su niže koncentracije vitamina C, a nedostatak nije nađen kod oboljelih od raka vrata maternice (92,93). Neke studije našle su povezanost između niske razine beta karotena u krvi i invazivnog raka, ali primjena njegovih visokih doza nije spriječila progresiju displazija (94). Povezanost nedostatka folne kiseline i nastanka raka vrata maternice nije epidemiološki dokazana (95). Druge studije navode kako prehrana bogata voćem i povrćem, visoke doze C i E vitamina te alfa i beta-karotena mogu smanjiti rizik od zaraze HPV-om (34).

U nekim studijama nađeno je kako se utjecaj obiteljskog nasljeđivanja djelovanja čimbenika iz prirodne okoline kao kofaktora ne može isključiti (96). Danas se smatra kako genetski, obiteljski, prehrambeni i endogeni hormonski čimbenici nisu sposobni igrati ulogu u razvoju displazija prema raku vrata maternice (97).

1.1.2. Povijesni pregled nazivlja

John Williams je 1886. godine opisao postojanje neinvazivnih promjena epitela uz invazivni rak pločastih stanica vrata maternice (98). Cullen je 1900. godine objavio kako neinvazivne promjene epitela histološki slične raku vrata maternice (99).

Naziv karcinom *in situ* (lat. *carcinoma in situ* – CIS) prvi su predložili Schottländer i Kermauner 1912. godine (100). U praksu ga je uveo Broders 1932. godine i opisao morfološke karakteristike (101). Pemberton i Smith prikazali su povezanost između CIS-a i nastanka invazivnog raka vrata maternice retrospektivnom analizom biopsijskih materijala (102).

Prihvatanjem kako je CIS prethodnik invazivnog raka, postala je važna citološka analiza obrisaka vrata maternice. Uočene su epitelne abnormalnosti koje se citološki i histološki međusobno razlikuju i manje su izražene nego CIS, ali imaju i mnoge njegove karakteristike.

Za blaže oblike tih atipija korišten je veliki broj naziva: displazija, atipična hiperplazija itd. Reagan i Hamonic zaslužni su za širu uporabu naziva *displazija* i za objašnjenje razlike prema CIS-u (103).

Naziv displazija potvrdilo je 1961. godine *Povjerenstvo za histološko nazivlje lezija vrata maternice* na Prvom internacionalnom kongresu ekfolijativne citodijagnostike: „CIS-om se može smatrati samo ona lezija koja nije invazivna i kod koje u cijeloj debljini površnog epitela nema znakova diferencijacije. Procesom mogu biti zahvaćene i žlijezde. Svi drugi poremećaji diferencijacije u pločastom epitelu, koji pokriva žlijezde ili površinu, klasificiraju se kao displazija” (104). Od tada su displazija i CIS vodeće nazivlje koje koriste citolozi i patolozi, a odvajanje bi značilo postojanje biološke razlike između njih. Smatralo se kako displazija označava reverzibilni proces, a CIS premaligni proces.

Richart i Barron su 1969. godine uveli naziv cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) (105). Nazivlje CIN podijelilo je premaligne promjene u četiri stupnja: CIN I prije nazivan blaga (laka) displazija, CIN II umjerena (srednje) teška displazija, CIN III teška displazija, a CIS je bio četvrti stupanj. Budući da je CIN III i CIS teško citološki i histološki razlikovati, a imaju sličnu prognozu i indikaciju za liječenje, zajedno su grupirani u CIN III. Smatralo se da svi poremećaji, koji prethode raku vrata maternice, predstavljaju jedinstveni patohistološki proces (105).

Richart je 1990. godine modificirao svoje nazivlje pa je umjesto triju stupnjeva CIN-a predložio samo dva stupnja: CIN niskog stupnja (CIN I) i CIN visokog stupnja (CIN II i CIN III) (106).

1.1.3. Citološka i patohistološka podjela

Boljim razumijevanjem patogeneze prekanceroza vrata maternice predložena je najnovija terminologija nazvana „Bethesda sustav” koja je najveću primjenu našla u citološkoj dijagnostici (107). Ona koristi izraz skvamozna (pločasta) intraepitelna lezija niskog stupnja (*engl. low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL*) za promjene prije nazivane koilocitna atipija i CIN I te SIL visokog stupnja (*engl. high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL*) za promjene prije nazivane CIN II i CIN III.

Prednost SIL terminologije je točnije odražavanje bioloških procesa koji su podloga histološkim promjenama, a mogu se koristiti za citološku i histološku dijagnostiku u skladu s današnjim kliničkim pristupom u liječenju prekanceroza. Smatra se kako LSIL predstavlja biološki različitu skupinu u odnosu na HSIL, što se očituje višom stopom spontane regresije i nižom progresijom.

U Hrvatskoj se za opis PAPA testa koristi modificirani oblik Bethesda klasifikacije od 2001. godine (108).

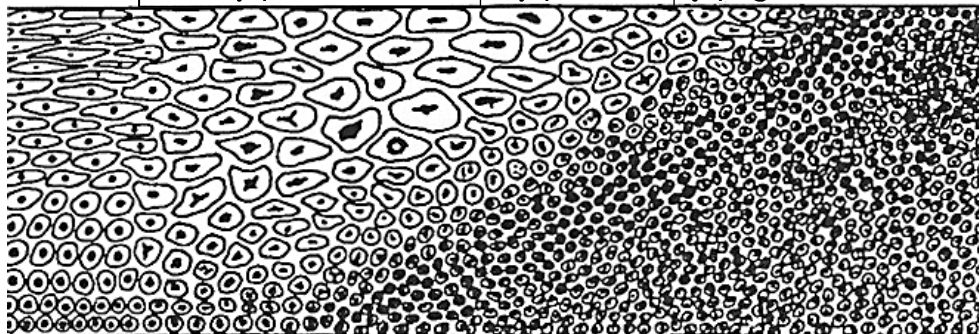
Citološki nalaz označava se kao uredan, bez citoloških atipija (ali uz upalne promjene i eventualno vidljivog uzročnika) i kao abnormalan nalaz.

Abnormalan citološki nalaz može biti iskazan kao atipija pločastih stanica (*engl. atypical squamous cell – ASC*), kao LSIL (odgovara patohistološkom nalazu CIN I) i kao HSIL (patohistološki CIN II i CIN III/CIS). Na nalazu se označava citološki vidljiva zaraza HPV-om kao koilocitoza.

Citološka dijagnoza ASC-a dijeli se u dvije podskupine: ASC neodređenog značenja (*engl. ASC of undetermined significance – ASCUS*) i ASC-HSIL se ne može isključiti (*engl. ASC – cannot exclude HSIL – ASC-H*).

Neki autori u SAD-u koriste modificirani Bethesda sustav za opisivanje histoloških nalaza tako da danas usporedno postoje obje terminologije (109). U većini drugih zemalja koristi se klasično nazivlje CIN za opis histoloških nalaza, a displazija/CIS se rijetko koristi (slika 2.).

	LSIL		HSIL		
	kondilom	CIN I	CIN II	CIN III	
	dysplasia levis		dyspl. media	dyspl. gravis	Ca <i>in situ</i>



Slika 2. Nazivi koji se koriste kod premalignih promjena vrata maternice

CIN se odnosi na epitelne promjene koje se smatraju prekancerozama, ali nemaju karakteristike invazivnog raka jer nema prodora kroz bazalnu membranu.

Stupnjevi CIN-a se mikroskopski određuju u odnosu na debljinu višeslojnog pločastog epitela s atipijama i abnormalnostima stanica, gledajući od bazalne membrane prema površini.

CIN se patohistološki dijeli na tri stupnja koji se zasnivaju na značajkama stanica, načinu njihova rasporeda, stupnju zrelosti i odnosu prema žljezdama i stromi. Te promjene se zbirno mogu prikazati kao nejednakosti u obliku i veličini stanica, poremećaju sazrijevanja i odnosa citoplazma/jezgra, različitoj količini i kvaliteti kromatina, izgledu i broju jezgri, nazočnosti mitozu te načinu orijentacije jezgara (slika 3.).

CIN I (dysplasia gradus levioris, SIL niskog rizika)

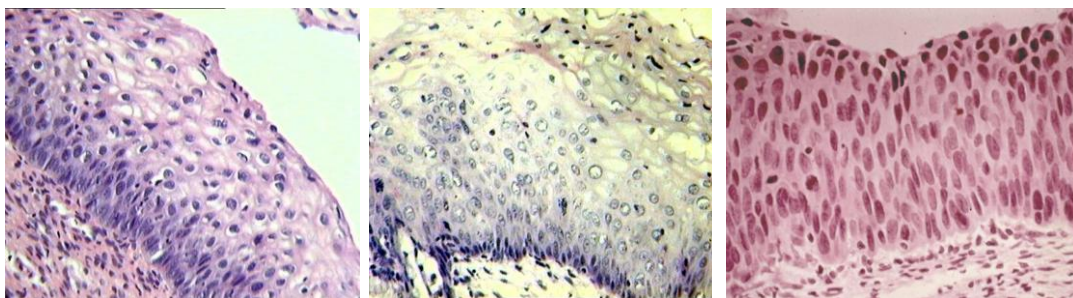
Morfološke promjene ograničene su na bazalni i parabazalni sloj, odnosno na jednu trećinu epitela ili područja pločaste metaplazije. Polaritet je umjereno poremećen, a stratifikacija i diferencijacija intermedijalnog i superficijalnog sloja je zadržana. Abnormalnosti jezgara su minimalne, a blago je povećan odnos između jezgre i citoplazme te se vidi svega nekoliko mitozu.

CIN II (dysplasia gradus medii, SIL visokog rizika)

Poremećaj rasporeda i sazrijevanja stanica vidljiv je u donjim dvjema trećinama epitela. Prisutne su i nezrele stanice uz povećan sadržaj kromatina, abnormalne mitoze i umjerene atipije stanica uz očuvano epitelno sazrijevanje (maturacija).

CIN III (dysplasia gradus gravis ili carcinoma in situ, SIL visokog rizika)

Promjene sa značajnom atipijom stanica zauzimaju više od dviju trećina epitela ili cijelu debljinu – CIS. Veći je broj nediferenciranih stanica bazalnog tipa, a mitoze su brojnije. Takva promjena ograničena je na epitelni sloj i nema prodora kroz bazalnu membranu, a širenje u žljezdane kripe cilindričnog epitela je često. Nalaz koilocita izražava se i u dijagnozi.



Slika 3. Cervikalna intraepitelna neoplazija: CIN I, CIN II i CIN III

Histološko razlikovanje displazija je zlatni standard u dijagnostici preinvazivnih promjena vrata maternice. Najčešći diferencijalno dijagnostički problemi vezani su za razlikovanje kondiloma i CIN-a. Kondilomatozna atipija je najočitije i predominantno izražena u gornjim slojevima, a CIN započinje u bazalnom i parabazalnom sloju. Abnormalne mitoze ne vide se ako je prisutan samo kondilom, ali se mogu naći ako je kondilom prisutan uz klasičnu displaziju.

Promjene nazivane koilocitna atipija, koilocitoza, ravni kondilom, laka displazija ili CIN I predstavljaju produktivnu virusnu zarazu, karakteriziranu promijenjenim stanicama zbog perinuklearne vakuolizacije i perifernog pomicanja zgusnute citoplazme (koilociti) (110). Promjene CIN-a II/III i CIS-a su uglavnom povezane s HPV-om visokog rizika, čija je DNA često inkorporirana u genom zaražene stanice i one imaju znatno veći potencijal progresije prema invazivnom raku.

Patohistološka klasifikacija CIN-a ima nedostataka jer se zasniva na morfološkim promjenama ne uzimajući u obzir kako je to dinamičan proces koji nekad progredira, ali može perzistirati ili regredirati.

1.1.4. Dijagnoza i liječenje

Cervikalne displazije su obično bez subjektivnih simptoma i makroskopski bez vidljivih promjena. Kod većih vulnerabilnih eritroplakija, ali i kod invazivnog raka moguće je kontaktno krvarenje. CIN se dva puta češće razvija u prednjoj usni porcije, a rijetko se nalazi na postraničnim mjestima. U najvećem broju slučajeva počinje u zoni preobrazbe po kojoj se horizontalno širi te u dodiru s originalnim pločastim epitelom njegovo širenje prestaje, a može se širiti u žljezdane kriptе cilindričnog epitela.

Displazije se uglavnom otkrivaju citološkim obriscima vagine, cerviksa i endocerviksa (VCE) – PAPA testom i kolposkopskim pregledom, a potvrđuju se patohistološkom analizom.

Prema preporuci Američkog društva ginekologa i opstetričara, PAPA test treba napraviti jednom godišnje kod spolno aktivnih žena ili s 18 godina. Ako je u žene tijekom triju godina uzastopce nalaz bio uredan, PAPA test može se raditi i rjeđe. Godišnje uzimanje PAPA testa smanjuje mogućnost smrti od raka vrata maternice s 5/10 000 na 4/1 000 žena (111).

Kolposkopija se danas smatra komplementarnom metodom citologiji za rano otkrivanje raka vrata maternice. Zasniva se na promatranju vrata maternice pod povećanjem od 3,5 do 50 puta radi otkrivanja promijenjenog i atipičnog epitela. Poboljšanje kolposkopskih slika postiže se premazivanjem s 3% ili 5% octenom kiselinom. Pod njezinim djelovanjem dolazi do koagulacije bjelančevina u epitelnim stanicama pa tkivo s većom proliferacijom (atipične i nezrele stanice) poprima bijelu boju. Karakteristične kolposkopske slike stvara i krvožilna mreža.

Kolposkopsko nazivlje koristi klasifikaciju usvojenu na 7. *svjetskom kongresu za cervikalnu patologiju i kolposkopiju* održanom 1990. godine u Rimu (112).

Normalne kolposkopske slike predstavljaju originalni pločasti epitel, cilindrični epitel i normalnu zonu preobrazbe.

Abnormalne kolposkopske slike su acidobijeli epitel, punktacije, mozaik, leukoplakija, jod-negativna područja i atipične krvne žile.

U slučaju kolposkopski vidljive abnormalne slike treba učiniti ciljanu *punch* biopsiju kliještima ili dijatermijskom petljom, a kod sumnje na početnu invaziju treba učiniti klinastu biopsiju nožem. Uzorak tkiva za patohistološku analizu treba sadržavati epitel, bazalnu membranu i dio podležeće strome. U slučajevima gdje promjena nije vidljiva u

cijelosti ili se jasno širi u cervikalni kanal treba učiniti ekskohleaciju endocerviksa i uzorak histološki analizirati.

Podjela prema morfološkom izgledu CIN-a u tri stupnja podložna je subjektivnosti patologa, što može rezultirati značajnim razlikama u nalazima (113,114). Pogrešna dijagnoza stupnja CIN-a može dovesti do nepotrebnog ili neprikladnog postupka liječenja, što je posebno bitno u reproduktivnoj dobi.

Kod CIN-a I je klinički postupak prvenstveno praćenje i uporaba manje agresivnih ablacijskih postupaka, a kod CIN-a II/III liječenje se temelji na ekscizijskim postupcima. Zbog toga je razgraničenje između CIN-a I i CIN-a II/III za kliničara ključno u odabiru metode liječenja te je poželjno potvrđivanje dijagnoze od dvoje ili više patologa.

U Hrvatskoj se za praćenje i liječenje cervikalnih displazija koristi *Hrvatski postupnik za dijagnosticiranje i liječenje premalignih lezija vrata maternice* (115) koji je modificirani postupnik *Federation International of Gynecology and Obstetrics – FIGO* (116).

Danas se u sklopu uobičajene obrade cervikalnih displazija predlaže i određivanje prisustva HPV-a visokog ili niskog rizika (117). To je uvršteno i u novi Hrvatski postupnik donesen 2005. godine (118).

Nedostatak seroloških pretraga na HPV je u slabom imunološkom odgovoru domaćina na zarazu jer serokonverzija može uslijediti tek nekoliko mjeseci nakon prisutnog virusnog genoma, ali može i u potpunosti izostati (119). Glavni problem je što su HPV ubikvitarni virusi pa je imunološki odgovor pretežno grupno specifičan i nije povezan s određenim genotipom te protutijela na njih imaju čak i djevice i mala djeca (120).

Specifično određivanje genotipa HPV-a korisnije je od testova na pozitivnu ili negativnu skupinu HPV-a visokog rizika jer je to klinički važno u donošenju odluke o liječenju, ali ti testovi nisu uvijek dostupni (121,122).

Nakon upoznavanja genoma HPV-a razvijene su dijagnostičke metode kojima se on može otkriti i diferencirati osjetljivim i specifičnim testovima znatno pouzdanije nego serološkim pretragama (123). Korištene su *metode hibridizacije* po Southernu – *dot-blot* i *slot-blot*, *in situ* hibridizacija na membrani (engl. *filter in situ hybridization* – FISH) i tkivna *in situ* hibridizacija. Kako bi se metodom *in situ* hibridizacije utvrdila prisutnost genoma HPV-a, potrebno je oko 50 njegovih kopija (124).

Najspecifičnijom i najosjetljivijom metodom za detekciju DNA HPV-a pokazala se metoda umnožavanja DNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) kojom se, teoretski, može otkriti jedna kopija genoma u 100 000 stanica

(125). Zato se za izolaciju DNA HPV-a u displazijama i stanicama raka vrata maternice najčešće koristi metoda PCR (44).

Međutim, PCR određuje samo tip HPV-a kojeg je u uzorku najviše, a oko 20% izoliranih nisu najčešći tipovi 16, 18, 31, 33 i 45. Budući da su sve češće višestruke zaraze HPV-om potrebno je odrediti i druge tipove. Zato se koristi PCR s reverznom hibridizacijom koja se u mnogim studijama pokazala pouzdanim dijagnostičkim postupkom za otkrivanje i diferencijaciju svih 25 tipova HPV-a u tumorskim stanicama CIN-a i raka vrata maternice (126).

Nedostatak metode PCR je što je pretežno kvalitativna, a ne i kvantitativna pa će latentna subklinička zaraza i jaka klinička promjena dati usporedive pozitivne rezultate. Osim toga, čak i mala kontaminacija uzoraka može dati lažno pozitivne rezultate.

Nova metoda pretraživanja DNA HPV-a je *Hybrid Capture System* koja se zasniva na hibridizaciji (u mikrotitarskim pločama) DNA uzoraka s dvjema skupinama proba. Prva proba je mješavina devet virusnih DNA povezanih s rakom (tip 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 i 56), a druga je mješavina pet virusnih DNA povezanih s kondilomima (tip 6, 11, 42, 43 i 44). Detekcija hibrida obavlja se s enzimatsko-kalorimetrijskom metodom koja je pogodna za klinička i epidemiološka istraživanja šireg opsega. Manje je osjetljiva od metode PCR, ali je prednost niska cijena.

Za liječenje preinvazivnih promjena vrata maternice potrebno je odabrati metode koje će biti dostatne u njihovu odstranjenju, a ne će ostaviti trajnije posljedice na reproduktivnu funkciju. Uglavnom se koriste medikamentozne metode liječenja, lokalno destruktivni i ekscizijski kirurški postupci.

Medikamentozno liječenje displazija (podofilin, podofilotoksin, trikloroctena kiselina, 5-fluorouracil, imiquimod, interferon) za sada nije dalo zadovoljavajuće rezultate jer je virusna DNA, prisutna u okolnom tkivu, dovoljna za razvoj novih promjena.

U lokalno destruktivne metode ubrajaju se elektroauterizacija, krioterapija, laser evaporizacija ugljičnim dioksidom i hladna koagulacija. Ovim metodama nastoji se uništiti promijenjeni epitel, ali se ne dobiva uzorak za patohistološku analizu i ostaje upitno je li abnormalni epitel u potpunosti uništen. Za liječenje lokalno destruktivnim metodama pogodne su samo kolposkopski vidljive promjene i sljedeći uvjeti: patohistološki nalaz CIN-a I ili CIN-a II bez HPV-a visokog rizika te mala i glatka promjena smještena samo na egzocerviksu (127). PAPA test i patohistološka analiza su otežani i neprimjereni nakon lokalno destruktivnih metoda te se one nastoje izbjegavati.

Konizacija hladnim nožem (engl. *conisation*) je godinama bila glavna kirurška ekscizijska metoda liječenja CIN-a. Konizacijom se nastoje postići dva cilja: postavljanje točne dijagnoze i izlječenje odstranjivanjem promjene u cijelosti. Kod CIN-a u perimenopauzi i postmenopauzi, a nakon isključivanja moguće invazivne promjene metoda izbora je histerektomija.

Danas se u operativnom liječenju displazija u žena, koje još nisu rodile, prednost daje poštenijim zahvatima, kao što su ekscizija niskovoltaznom dijatermijskom petljom – LLETZ (engl. *Large Loop Excision of the Transformation zone*) ili LEEP (engl. *Loop Electrosurgical Excision Procedure*) i laserska konusna biopsija ugljičnim dioksidom. Prednosti ekscizijskih metoda nad lokalno destruktivnim je dobivanje tkiva za patohistološku analizu.

Za pravilno liječenje cervikalnih displazija važno je otkriti čimbenike rizika njihove progresije. Za sada ipak nema dovoljno pokazatelja koji upućuju na sigurnu progresiju prekanceroznih promjena. Uz klasične citološke i patohistološke čimbenike govori se o tipu HPV-a i ploidnosti stanica CIN-a.

Prema Hrvatskom i FIGO postupniku konizacija ili histerektomija je potrebna kod patohistološkog nalaza biopsije CIN-a II/III i HPV-a visokog rizika te ponovljenog nalaza PAPA testa CIN-a II/III nakon dva do tri mjeseca.

U Hrvatskoj se godišnje učini oko 700 konizacija uglavnom u žena generativne dobi s obzirom na to da je najveća učestalost CIN-a III od 25. do 35. godine. Trećina tih žena nije još rodila, a trećina je imala samo jedan porod. Veliki broj želi roditi i poslije konizacije, ali ih više od 10% ima komplikacije vezane za operativni zahvat ili daljnji fertilitet – neplodnost, pobačaj ili prijevremeni porod. Zbog toga je oko 70 žena godišnje u Hrvatskoj hendikepirano za jedan ili više poroda. Također, oko 500 konizacija godišnje u Hrvatskoj je možda nepotrebno ili prerano učinjeno jer oko 80% CIN-a II/III ne će napredovati u invazivni rak.

Zbog toga je od velike kliničke važnosti imati individualni pristup i kod nekih žena produžiti vrijeme do konizacije jer su žene s cervikalnim displazijama sve mlađe. Time bi mogli smanjiti broj nepotrebnih ili preranih konizacija i omogućiti dijelu žena ostvarenje reproduksijske želje uz privremenu ili trajnu odgodu operativnog zahvata.

Ako se potvrdi prognostička uloga tipa HPV-a i ploidnosti stanica u CIN-u visokog stupnja (CIN II/III), kod jednog dijela žena ne će uopće biti potrebe za operativnim zahvatom.

U zadnjih nekoliko godina sve se više napora ulaže u dobivanje kvalitetnog cjepiva protiv HPV-a. Danas su na tržištu dvije vrste profilaktičkih cjepiva, a u ispitivanju su i terapijska cjepiva (128,129).

1.2. PAPILOMA VIRUSI ČOVJEKA

1.2.1. Povijest

Uočivši kako je rak vrata maternice češći u promiskuitetnih osoba, Rigoni-Stern je 1842. godine postavio hipotezu o njegovoj virusnoj etiologiji (130). Tek 1976. godine zur Hausen je iznio pretpostavku o ulozi HPV-a u nastanku raka vrata maternice (131).

Pojam *epitelioza* kao proliferacija epitelnih stanica pod utjecajem raznih virusa uveden je 1903. godine (132). Potom je 1907. godine potvrđena virusna etiologija bradavica na osnovi pokusa bezstaničnog prijenosa papiloma virusa (133). Zatim je postavljena hipoteza o djelovanju papiloma virusa u divljeg kunića (*engl. cottontail rabbit papillomavirus – CRPV*) i kemijskih kancerogena (mazut) u nastanku raka kože (134). Virusna čestica u bradavicama čovjeka viđena je prvi put 1949. godine putem elektronskog mikroskopa (135).

Koss i Durfee primijenili su 1956. godine naziv *koilocitna atipija* za opis promijenjenih stanica pločastog epitela s perinuklearnom vakuolizacijom i perifernim pomicanjem zgusnute strome (*koilociti*) u obriscima vrata maternice kod displazije i invazivnog raka (136). Crawford je 1965. godine detaljno opisao strukturu DNA papiloma virusa (137).

Nekoliko autora je 1976. godine ukazalo na istovjetnost koilocita i stanica spolnih bradavica koje sadrže HPV (138,139). Uporaba metoda molekularne biologije omogućila je razumijevanje odnosa između HPV-a i raka vrata maternice. Zur Hausen i sur. su prvi izolirali nove tipove HPV-a iz anogenitalne regije: 1980. godine izoliran je HPV tip 6 iz spolnih bradavica, a 1985. godine HPV tipovi 16 i 18 iz raka vrata maternice (140,141).

Prvi opisani slijed nukleotida cijelog genoma virusa bio je slijed goveđeg papiloma virusa tip 1 (*engl. bovine papillomavirus – BVP 1*) (142). Istraživanja bioloških funkcija, poglavito način specifičnog prepisivanja i ugrađivanja genoma HPV-a, započeta su 1985. godine (143,144). Iste godine je u kulturi stanica miša i u kulturi fibroblasta i keratinocita čovjeka postignuta zloćudna preobrazba putem DNA HPV tipa 16 (145).

Svjetska zdravstvena organizacija proglasila je HPV humanim karcinogenom 1995. godine (146).

Do 2000. godine klonirano je i sekvencionirano više od 85 različitih genotipova papiloma virusa, a preko 120 novih tipova je djelomično sekvencionirano (147).

Zbog otkrića poveznice između zaraze onkogenim tipovima HPV-a i raka vrata maternice, Harald zur Hausen je 2008. godine dobio Nobelovu nagradu za medicinu.

1.2.2. Klasifikacija

Papiloma virusi pripadaju obitelji *Papovaviridae* i podobitelji *Papillomaviridae*. Specifični i patogeni su za određenu vrstu domaćina te tako dobivaju i ime: papiloma virus čovjeka – HPV, goveđi papiloma virus – BPV itd.

Za razliku od većine drugih virusa u kojima bjelančevine kapside imaju različitu antigenu strukturu, kod svih papiloma virusa životinja i ljudi je konzerviran slijed aminokiselina (148). Zbog toga protutijela na bjelančevine kapside BPV-a križno reagiraju s HPV-om pa se specifični tipovi ne mogu identificirati serološkim metodama (serotipovi), već sekvencioniranjem DNA (genotipovi) (149).

Tipovi HPV-a označavaju se brojevima prema vremenskom slijedu njihovih otkrića. Izolati iz iste vrste domaćina prvobitno su se tipizirali prema sličnosti genoma temeljenoj na hibridizacijskim svojstvima. Izolat je novi tip ako je pokazivao manje od 50% križne hibridizacije u restrikcijskim uvjetima s prethodno definiranim tipovima.

S obzirom da danas postoji mogućnost sekvencioniranja genomske DNA, nova definicija genotipova temelji se na homologiji slijeda nukleotida. Različitim tipovima smatraju se izolati koji dijele manje od 90% nukleotida u konzerviranim regijama genoma L1, E6 i E7 (150). Izolirane su i varijante specifičnih tipova, odnosno podtipovi koji moraju imati više od 90% homologije s originalnim tipom. Različiti podtipovi mogu imati drukčije biološke značajke pa je tako otkriveno kako neki podtipovi HPV-a 16 imaju najizraženiju sposobnost zloćudne preobrazbe (151).

Osim što su vrsno specifični, ovi virusi imaju poseban afinitet za epitelne stanice sluznice i kože pa na tim mjestima izazivaju proliferaciju epitela (152). Te dobroćudne proliferacije epitela ili papilomi u određenim uvjetima imaju sposobnost zloćudne preobrazbe. HPV zaražava epitel genitalne regije obaju spolova, analnog područja, mokraćnog mjehura, usne šupljine, grkljana, dušnika, jednjaka i spojnice oka.

Prema tkivu kojeg najčešće zaraze, pojedini se tipovi HPV-a dijele u tri skupine: kutanu, mukokutanu i mukoznu.

Mukokutanoj skupini pripadaju virusi koji zaraze anogenitalnu regiju, sluznicu i kožu usne šupljine, a i oni koji uzrokuju *epidermodysplasiu verruciformis*.

Određeni tipovi HPV-a imaju sklonost prema zarazi mukozne membrane spolnih područja u žena: vrat maternice, rodnica, stidnica i perianalna regija. Glavne manifestacije zaraze anogenitalnih tipova HPV-a su:

- Bowenoidne papule i Bowenova bolest
- genitalne ili spolne bradavice (*condylomata accuminata*)
- velika bradavica (*giant condyloma, Buschke-Loewenstein tumors*)
- intraepitelne neoplazije i rak vrata maternice, rodnice i stidnice.

Bowenova bolest je forma pločastog raka in situ i ima obje forme – genitalnu i ekstragenitalnu, a mnogi tipovi HPV-a mogu se izolirati iz tih promjena uključujući i visokoonkogene (1,153).

U spolno aktivnih osoba prisutnost spolnih bradavica je visoka, s učestalosti od 1% u SAD-u do približno 10% u skandinavskim zemljama (22,154). Muškarci i žene sa spolnim bradavicama često doživljavaju psihološke poremećaje i prekide seksualne veze (155).

Postoji oko 100 tipova HPV-a, a približno 40 ih je specifično za anogenitalnu regiju i imaju različiti potencijal uzrokovanja raznih poremećaja, od spolnih bradavica do prekanceroznih i zloćudnih promjena (156).

Oko 15 tipova HPV-a visokog su onkogenog rizika (engl. *high risk – HR*) i značajno su povezani s progresijom u invazivni rak vrata maternice (73).

Drugi tipovi HPV-a niskog su onkogenog rizika (engl. *low risk – LR*) i ne ugrađuju se u stanični genom domaćina, nego samo uzrokuju niskostupnjevane promjene (CIN I, LSIL) i benigne spolne bradavice (157-159). Stoga se smatra kako je sposobnost izazivanja zloćudne preobrazbe ovih tipova HPV-a niska.

Prema kliničkoj manifestaciji zaraze i promjenama koje najčešće uzrokuju, odnosno na osnovi potencijala izazivanja zloćudne preobrazbe, tipovi HPV-a dijele se u dvije skupine:

- niskog onkogenog rizika (HPV LR): 6, 11, 14, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 70, 72 i 81
- visokog onkogenog rizika (HPV HR): 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 i 82 (36,157).

Tipovi HPV-a 6 i 11 odgovorni su za oko 10% niskostupnjevanih promjena i 90% spolnih bradavica (157,159).

Tipovi HPV-a visokog rizika povezani su u pravilu s visokostupnjevanim promjenama (CIN II/III, HSIL), ali su često prisutni i u niskostupnjevanim promjenama. Oni imaju različiti onkogeni potencijal, čak i među varijantama unutar specifičnih tipova (151,159,160). Tipovi HPV-a visokog rizika, povezani s pločastim rakom vrata maternice, različito su zastupljeni kod adenokarcinoma (161).

HPV tip 16 je najznačajniji čimbenik rizika za postojanost i visoku stopu progresije displazija tijekom praćenja (126,162). Dvogodišnji kumulativni apsolutni rizik za razvoj CIN-a III je značajno veći u zaraženih HPV tipom 16 nego u zaraženih drugim tipovima HPV-a visokog rizika (30% – 40% prema 8% – 10%) (163). HPV tip 18 je uz promjene pločastog epitela odgovoran i za prekanceroze žljezdanog epitela i adenokarcinom vrata maternice (36).

Distribucija tipova HPV-a različita je prema zemljopisnim područjima, što se istražilo na preko 15 000 spolno aktivnih žena u dobi od 15 do više od 65 godina s normalnim PAPA nalazom (164). U svijetu su najzastupljeniji HPV tipovi 16 i 18, a u Europi je više zastupljen HPV tip 16 (15,164). Istraživanje u SAD-u pokazalo je različitu učestalost HPV tipova 6, 11, 16 i 18 od 17%, 7%, 16% i 7% (165). Stjecanje jednog tipa HPV-a i nestanak drugog su neovisni događaji.

1.2.3. Genom i životni ciklus

HPV pripada skupini DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) virusa. Organizacija genoma ista je za različite tipove HPV-a, a sastoji se od triju većih regija:

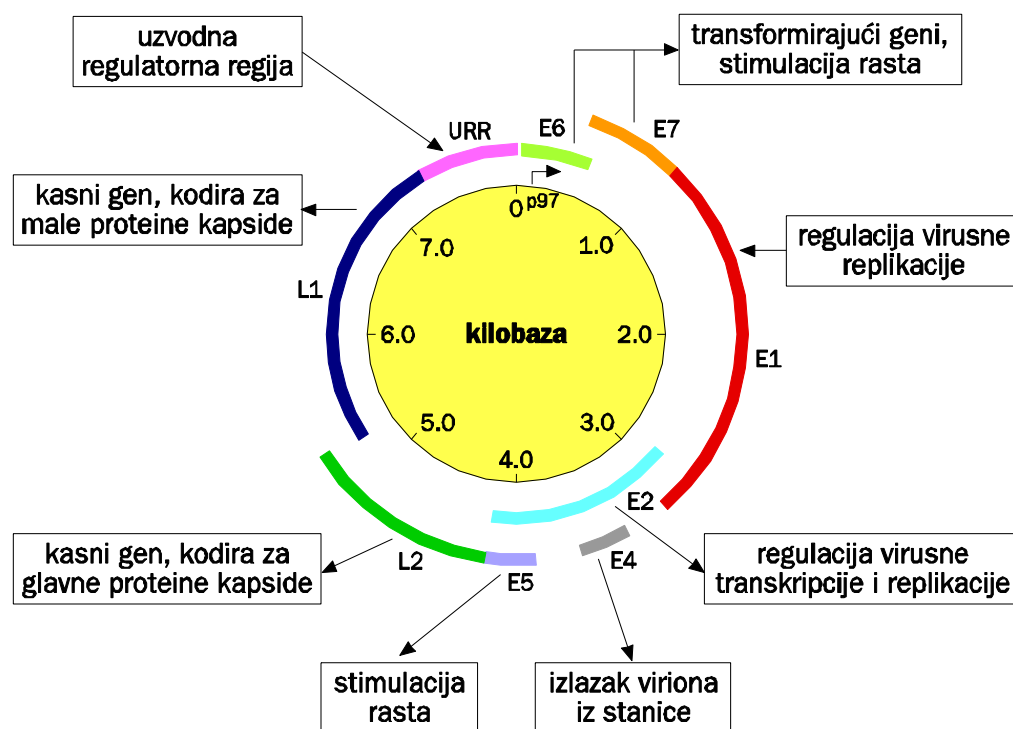
1. uzvodna regulatorna regija (engl. *upstream regulatory region – URR*)
veličine 1 kb (kilobaza) koja se naziva i dugačka kontrolna regija (engl. *long control region – LCR*) ili nekodirajuća regija (engl. *noncoding region – NCR*)
2. rana kodirajuća regija (engl. *early – E*) veličine oko 4,5 kb
3. kasna kodirajuća regija (engl. *late – L*) veličine 2,5 kb (slika 4.).

Virion je bez ovojnice promjera od 55 do 60 nm s ikozaedarnom kapsidom koja se sastoji od 72 kapsomere. Genom je vezan histonima i građen od dugačke dvolančane kružne DNA veličine 7200 – 8.000 pb (parova baza) uklopljene u ljusku sastavljenu od dviju molekula bjelančevina L1 i L2.

Obje skupine gena razdvojene su uzvodnom regulatornom regijom (URR) koja ne može kodirati bjelančevine, ali sadržavaju elemente potrebne za regulaciju ekspresije pojedinih gena, replikaciju i inkorporiranje genoma. URR sadrži vezna mjesta za virusne i stanične bjelančevine uključene u regulaciju transkripcije ranih i kasnih regija.

Rana regija sastoji se od šest otvorenih okvira očitavanja (engl. *open reading frames* – ORF) koji se nazivaju E1, E2, E4, E5, E6 i E7. Oni su segmenti DNA koji predstavljaju transkripcijske jedinice i kodiraju sintezu bjelančevina važnih za virusnu replikaciju u zaraženoj stanici domaćina. Dva ORF-a rane regije E6 i E7 daju šifru za sintezu onkoproteina ključnih za kontrolu staničnog ciklusa.

Kasna regija sadrži dva ORF-a nazvana L1 i L2 koji daju kod za bjelančevine virusne kapside.



Slika 4. Genom papilomavirusa čovjeka

Zaraza HPV-om nastaje kod mikrotraume epitela kada virus dolazi u kontakt s bazalnim epitelnim ili nezrelim pločastim stanicama transformacijske zone vrata maternice. Čini se kako ove stanice posjeduju receptore za HPV (166).

Ulaskom u stanicu replikacija virusnog genoma odvija se na tri načina:

1. umnažanje u mali broj kopija koje mogu uzrokovati odgovor stanica imunološkog sustava domaćina i možda *suzbiti zarazu* u ovom stadiju
2. minimalno umnožavanje kad se virus nalazi u latentnom stanju u bazalnim stanicama u formi episoma i prati njihovu diobu (*latentna zaraza*)
3. normalno umnožavanje i stvaranje novih viriona u diferenciranim bazalnim stanicama epitela (*produktivna zaraza*).

Zaražene bazalne stanice napreduju u suprabazalni sloj (*stratum spinosum*) uz replikaciju virusa i time gube mogućnost diobe. Zrele virusne čestice oslobađaju se u okružje s odljuštenim epitelnim stanicama, što uzrokuje njihov novi život u stanicama površnog epitelnog sloja.

Kao rezultat zaraze HPV-om mogu nastati različite posljedice:

- *latentna zaraza* bez vidljive citološke ili histološke manifestacije; ovo je najčešća posljedica i javlja se u više od 90% slučajeva
- *aktivna zaraza* kod koje dolazi do vegetativne replikacije HPV-a, ali bez ugradnje u genom
- *neoplastična transformacija* kojom se HPV integrira u humani genom; klinička manifestacija uključuje HSIL i rak, a za to treba proći više godina nakon zaraze.

U stanici se virus stabilizira u episomalnom stanju i umnoži u oko 20 do 100 kopija. Replikacija episomalne DNA u latentnoj se zarazi održava na razini koja prati diobu bazalnih i parabazalnih slojeva. Budući da se u latentnoj zarazi ne stvaraju kompletni virioni, to ne dovodi do nastanka karakterističnog citopatskog učinka i prisustvo HPV-a može se utvrditi jedino metodama molekularne biologije.

Usporedno s diferencijacijom stanica intermedijalnog i superficijalnog sloja, virus umnaža svoj genom dovodeći do ekspresije kasnih gena i korištenja specifičnih čimbenika transkripcije koji stimuliraju stvaranje bjelančevina kapside virusa. Taj proces omogućuje stvaranje zrelog virusnog potomstva i nastanak karakterističnog citopatskog učinka (koilociti).

Aktivno replicirajući HPV uzrokuje karakteristične stanične promjene: uvećanje jezgre, multinuklearnost, hipekromaziju i perinuklearni citoplazmatski halo (167). Ove promjene se obično javljaju dva do osam mjeseci nakon primarne zaraze (73). Citološki nalazi s karakteristikama ASCUS-a i LSIL-a uz pozitivan HPV smatraju se manifestacijama aktivne zaraze.

Povećani rizik za napredak nastalih promjena u neoplaziju je rezultat međudjelovanja virusnih DNA sekvenci s određenim sekvencama stanice domaćina. Ugradnjom virusne DNA nastaje ireverzibilno oštećenje genoma zaražene stanice. S obzirom na ciljno mjesto u genomu, ugradnja DNA HPV-a je slučajan događaj i stoga može dovesti do različitih kromosomskih promjena. Razlog brže progresije u zloćudnu preobrazbu (nakon ugradnje HPV-a) mogu biti strukturne promjene virusnog genoma koje omogućuju pojačanu i nekontroliranu ekspresiju virusnih onkogenata.

Razlika između zaraza HPV-om visokog i niskog rizika je u fizičkom stanju njihovih genoma u stanici domaćina. Episomalni oblik DNA HPV-a prisutan je u kondilomima i CIN-u I (143). U stanicama CIN-a III i raka vrata maternice stvaranje viriona je neznatno jer su genomi HPV-a ugrađeni u kromosome stanica domaćina (144).

Virusna DNA, ugrađena u genom domaćina, nalazi se u većini stanica CIN-a II/III, u stanicama raka vrata maternice i njegovim metastazama (168). Do ugradnje dolazi u ranoj fazi nastanka zloćudne preobrazbe, što se očituje monoklonalnošću stanica tumora (169). Ugradnja DNA HPV-a predstavlja mutaciju genoma virusa i genoma stanice domaćina (143,144).

Onkogeneza inducirana HPV-om djeluje mijenjajući stanični ciklus u zaraženim stanicama preko više mehanizama od kojih se neki tek trebaju razjasniti. Zato su identifikacije oštećenja genoma i novih genetskih ili kromosomskih promjena bitne za razumijevanje biologije ovog tumora i predviđanje daljnjeg tijeka bolesti.

Pokazateljima staničnog ciklusa pripisuje se potencijalni prognostički značaj te je otkrivanjem staničnih regulacijskih gena i nekih specifičnih mutacija moguć nalaz biljega tumorske progresije.

Geni povezani s nastankom raka mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: *onkogeni* i *tumor supresorski geni*.

Onkogeni nastaju strukturnom ili funkcionalnom promjenom protoonkogenata normalnih gena stanice koji su uključeni u reguliranje rasta i diferencijacije. Različiti su mehanizmi pretvorbe normalnog gena s fiziološkom funkcijom u onaj onkogeni – translokacije, točkaste mutacije, amplifikacije i gubitak heterozigotnosti. Bez obzira kojim mehanizmom nastaje onkogen, posljedica njegove aktivacije je stvaranje ili povećanje količine strukturno/funkcionalno promijenjenih proteinskih produkata i izazivanje zloćudne preobrazbe.

Tumor supresorski geni reguliraju normalan rast stanice i koče nenormalnu proliferaciju, a uslijed gubitka njihove funkcije ili inaktivacije dolazi do progresije prema

zloćudnoj promjeni. U mnogim radovima istraživani su postojanje i smještaj tumor supresorskih gena (170,171).

Produkti tumor supresorskih gena normalne stanice su p53 i pRb (engl. *retinoblastoma gene*). To su središnje molekule kontrole staničnog ciklusa i mutirane su u mnogim ljudskim zloćudnim tumorima. U patogenezi raka vrata maternice uloga HPV-a može biti slična genetski nastaloj mutaciji jer zaražene stanice slične onima s mutiranim p53 i pRb (172). Gubitak funkcije p53 i pRb dovodi do kontinuirane replikacije i proliferacije stanica. Zbog toga je stimulirana sinteza DNA bez popravka oštećene DNA, nakupljaju se genetske grješke, izostavljena je programirana smrt stanice i tako dolazi do zloćudne preobrazbe.

Godine 1988. otkriveno je kako onkogeni E6 i E7 imaju ključnu ulogu u nastanku zloćudne preobrazbe (173). Dugotrajna zaraza HPV-om uzrokuje stalnu aktivnost virusnih regija E6 i E7, povećava gensku nestabilnost, akumulira onkogene mutacije i uzrokuje gubitak kontrole staničnog ciklusa, što na kraju rezultira razvojem raka.

HPV utječe na mehanizam kontrole staničnog ciklusa i potiče zloćudnu transformaciju tako što se onkoproteini E6 i E7 vežu na tumor supresorske bjelancevine p53 i pRb. Nastanak displazije ili raka vrata maternice potaknut je nekontroliranom ekspresijom E6 ili E7 u proliferirajućim bazalnim i parabazalnim epitelnim stanicama (174). Pritom dolazi do integracije virusne DNA u genom stanice domaćina, što se smatra kritičnim trenutkom u HPV-om induciranoj onkogenezi. Kao posljedica kromosomske nestabilnosti i virusne integracije dolazi do razdora E1 i E2 genskih sekvenci koje obavljaju kontrolu transkripcijske regulacije E6 i E7 te je njihovo prekomjerno izražavanje čimbenik koji potiče karcinogenezu (175).

Model patogeneze raka vrata maternice, temeljen na inaktivaciji E2 uslijed virusne ugradnje i time povećane ekspresije E6 i E7, ne objašnjava u potpunosti njegov nastanak. Iako je u većini slučajeva raka virusna DNA ugrađena u genom stanica, u rijetkim je nađena u episomalnom obliku i tada je E2 obično mutiran (176). Nađeno je kako spajanje virusom promijenjenih stanica s normalnima može dovesti do stvaranja zdravih hibrida iako je u njima i dalje povećana ekspresija E6 i E7 (177).

Neoplastična transformacija, nastala kao rezultat zaraze HPV-om, može se dokazati specifičnim DNA, RNA ili proteinskim biljezima. Idealan biomarker trebao bi se aktivirati u stanicama domaćina kao odgovor na ekspresiju virusnih onkogenih i ne nalaziti se u normalnim nepromijenjenim stanicama. Zajedno s morfološkim pretragama (citologija i histologija) i određivanjem HPV-a takav biomarker mogao bi pokazivati je li došlo do promjena koje vode prema zloćudnoj preobrazbi. Veliki broj biomarkera proučavan je u

svrhu točnijeg otkrivanja preinvazivnih promjena vrata maternice. Potencijalno najkorisniji biljezi su *proliferacijski antigen Ki-67* i *inhibitor ciklin ovisnih kinaza p16INK4a* (p16).

Djelovanje p16 regulirano je negativnom povratnom spregom od strane pRb preko E7 pa smanjenje ili gubitak aktivnosti pRb rezultira porastom p16 (178). Aneuploidnost se javlja prije integracije genoma HPV-a, a pojačano djelovanje p16 posljedica je te integracije.

Smatra se kako je prvi događaj u nastanku HSIL-a zaraza HPV-om visokog rizika koju slijede genetske promjene (aneuploidnost) i gubitak regulacije p16, što na kraju dovodi do porasta proliferacijske aktivnosti koja se dokazuje s Ki-67 (179).

1.3. PROTOČNA CITOMETRIJA

1.3.1. Faze staničnog ciklusa

Jedna od zadaća staničnog ciklusa je osigurati vjernu kopiju DNA i raspodijeliti je na dvije stanice kćeri. Vrijeme i redoslijed tih događaja regulirani su nizom gena čiji produkti (bjelančevine) djeluju u kontrolnim točkama i u slučaju pogreške na DNA ili diobenom vretenu inhibiraju stanični ciklus (180).

Stanični ciklus je slijed zbivanja u stanici (ponajviše u jezgri) između dviju mitozu i ima nekoliko faza: G0 faza mirovanja (engl. *gap phase*), G1 presintetska faza, S faza biosinteze i udvostručenja (engl. *synthesis*), G2 prediobena faza i M faza diobe (engl. *mitosis*). G1 i G2 su međufaze između mitoze (M) i S faze. U njima nema biosinteze DNA. U G1 fazi sintetiziraju se stanične bjelančevine, a u G2 fazi bjelančevine potrebne za mitozu.

Prolaz stanica kroz ciklus omogućuju ciklin ovisne kinaze (engl. *cyclin dependent kinases – CDK*). To su enzimi koji fosforiliraju čitav niz bjelančevina čime se koči ili potiče njihovo djelovanje.

Izmjena stanica u epitelu vrata maternice je vrlo brza i smatra se kako je životni vijek normalnih stanica četiri do pet dana, displastičnih stanica još i kraći, a stanica CIN-a III samo 12 sati (181).

Dva su osnovna stanična mehanizma prevencije razvoja raka u stanicama s akumuliranim somatskim mutacijama: starenje (engl. *senescence*) i programirana smrt (engl. *apoptosis*). Starenje je stanje u kojem se metabolički aktivne stanice prestanu dijeliti

i stanični ciklus se zaustavlja u G1 fazi (182,183). Smatra se kako je to mehanizam koji sprječava da stanice, koje sadrže onkogene mutacije, idu u daljnju replikaciju i razvoj raka.

Aktivacija p53 dovodi do zaustavljanja stanice u G1 fazi, čime se osigurava vrijeme potrebno za popravak oštećenja DNA i sprječava prijenos oštećenja na stanice potomke (184). U situacijama kad stanica ne može popraviti DNA oštećenje, p53 vodi stanicu prema apoptozi (185). Ovim se procesom organizam rješava stanica s izraženim genskim oštećenjem i čuva genom od zloćudne preobrazbe. Produkt retinoblastoma gena pRb inhibira ulazak stanice u S fazu.

1.3.2. Ploidnost stanica

Dugotrajna zaraza onkogenim tipovima HPV-a dovodi do zloćudne preobrazbe izazivajući promjene regulacije staničnog ciklusa, gensku nestabilnost i inducira DNA aneuploidnost stanice domaćina (36,186). Aneuploidnost odražava stanje nekontroliranog porasta DNA i gubitak esencijalnih informacija.

Krajnji stupanj u procesu zloćudne preobrazbe stanice je akumuliranje mnogih genskih događanja koji vode do DNA oštećenja, što se manifestira kao kvantitativne promjene DNA sadržaja. Genska nestabilnost, koja dovodi do aneuploidnosti i stanične proliferacije, dio je istog patološkog procesa koji vodi od zaraze HPV-om preko displazija do raka vrata maternice.

U populaciji zloćudnih stanica, kod kojih je proces karcinogeneze završen, sadržaj DNA je abnormalan – aneuploidan (186). Stanična atipija i posljedične promjene sadržaja DNA u cervikalnim displazijama rezultati su prethodne zaraze HPV-om. Displazije s episomalnom zarazom HPV-om su DNA diploidne.

1.3.3. Metode protočne citometrije

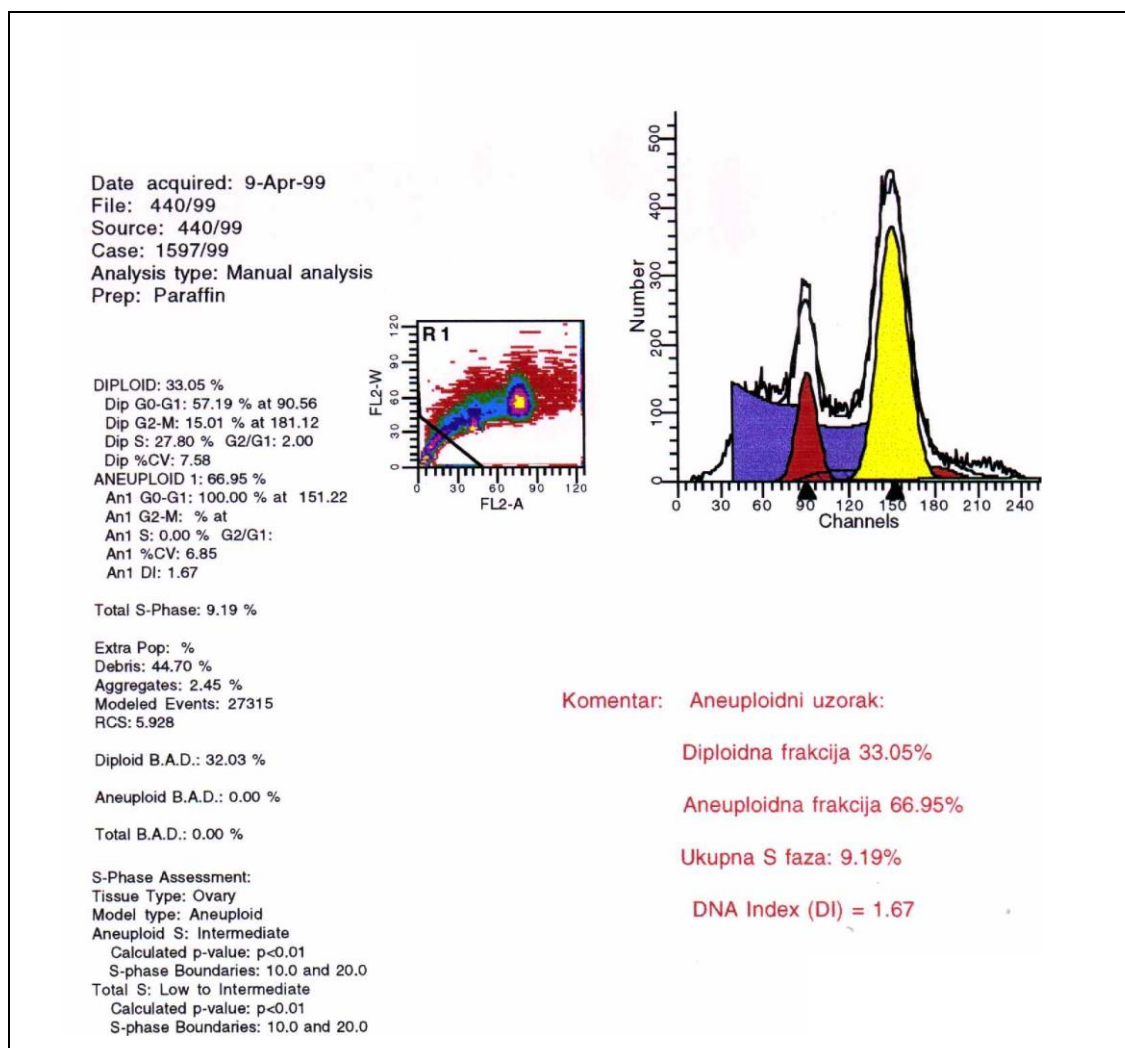
Klonovi aneuploidnih stanica mogu se otkriti u tumorskim stanicama displazija i raka vrata maternice s pomoću visokorezolutne DNA *protočne citometrije* (162).

Korištenjem DNA protočne citometrije i DNA prikazane citometrije uočena je značajna korelacija između aneuploidnosti i stupnja displazije vrata maternice (37,126). Nekoliko istraživača pokušalo je odrediti prognostičku vrijednost aneuploidnih histograma u perzistenciji ili progresiji cervikalnih displazija, većinom koristeći DNA prikazanu analizu (126,187).

Na temelju jednoparametrijskog histograma fluorescencije i njegovih brojčanih izvedenica dobiva se sadržaj DNA i raspodjela stanica prema fazama ciklusa (188).

Određivanjem ploidnosti tumorskih stanica može se dobiti diploidni, tetraploidni, poliploidni i aneuploidni nalaz. Histogram se tumači kao diploidan ako postoji jedan simetričan vršak G0-G1, a prisutnost dodatnog odvojenog G0-G1 vrška pokazuje da se radi o aneuploidnosti, što je prikazano na slici 5. (189).

Nalazi s trima ili više G0-G1 vršaka su tetraploidni.



Slika 5. Primjer nalaza aneuploidnosti tumorskih stanica

Proliferacijska aktivnost stanica izražena je kao ukupna S faza (USF), odnosno kao postotak svih izmjerenih stanica u toj fazi. USF diploidnih nalaza je izmjerena vrijednost

udjela stanica u S fazi, a kod aneuploidnih nalaza moguće je ustanoviti posebno udjele diploidnih i aneuploidnih stanica.

Brojčani pokazatelj stupnja ploidnosti stanica je DNA-index. To je omjer relativnog sadržaja DNA G0-G1 faze ispitivanog uzorka i relativnog sadržaja DNA stanica standarda. Međutim, preporuka je SAC-a (engl. *Society of Analytical Cytology Subcommittee, 1990*) da se aneuploidni DNA sadržaj ne izražava putem DNA-indexa (189).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. HIPOTEZA

Određivanjem tipa HPV-a i ploidnosti stanica u CIN-u visokog stupnja moguće je izdvojiti skupinu bolesnica kod kojih nije potrebna žurna konizacija.

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- pokušati otkriti ulogu i međusobnu vezu tipa HPV-a i ploidnosti stanica u CIN-u visokog stupnja (CIN II i CIN III) u njihovoj progresiji u invazivni rak vrata maternice
- u Hrvatski postupnik predložiti određivanje tipa HPV-a i ploidnosti stanica u CIN-u visokog stupnja (CIN II i CIN III)

3. ISPITANICE I METODE

3.1. ISPITANICE

U 147 bolesnica s potvrđenom dijagnozom CIN-a II ili CIN-a III na *punch* biopsiji vrata maternice učinjena je konizacija ili histerektomija postupajući po *Hrvatskom postupniku za dijagnosticiranje i liječenje premalignih lezija vrata maternice*.

Sve bolesnice liječene su i praćene u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prema definitivnom patohistološkom nalazu vrata maternice (konus, uterus) dobivene su četiri skupine: CIN I, CIN II, CIN III i mikroinvazivni karcinom (MIC).

Patohistološka analiza, metoda PCR i protočna citometrija učinjene su u Laboratoriju za molekularnu patologiju Kliničkog zavoda za patologiju KBC-a Zagreb.

3.2. METODE

Kriteriji za uključivanje u ovo istraživanje su patohistološki nalaz CIN-a II ili CIN-a III biopsije vrata maternice. Isključene su bolesnice s promjenama žljezdanog epitela i prethodnim terapijskim postupcima na vratu maternice. Nakon biopsije provedena je citološka kontrola PAPA testom za tri mjeseca i u slučaju nalaza CIN-a II ili CIN-a III učinjen je operativni zahvat prema Hrvatskom postupniku – konizacija ili histerektomija.

Uspoređeni su prisutnost tipa HPV-a i nalazi ploidnosti stanica prema stupnjevima CIN-a i mikroinvazivnog karcinoma.

Na svim uzorcima provedeni su sljedeći postupci:

- patohistološka analiza
- tipizacija HPV-a visokog i niskog rizika lančanom reakcijom polimeraze (PCR)
- određivanje DNA ploidnosti protočnom citometrijom.

3.2.1. Patohistološka analiza

Tkivo za patohistološku analizu fiksirano je 24 sata u 4%-tnom puferiranom formalinu. Nakon fiksacije uklopljeno je u parafin, rezano u rezove debljine 4 µm, a zatim bojano hemalaun-eozinom.

Kriterij uključenja u istraživanje je jasno definirana patohistološka dijagnoza od strane istog patologa eksperta za ginekološku patologiju.

3.2.2. PCR izolacija humanog papiloma virusa

Korišten je PCR s reverznom hibridizacijom za izolaciju DNA HPV-a iz tkivnih blokova uklopljenih u parafin koristeći *Nucleo Spin Tissue* reagens (Machery-Nagel, Düren, Njemačka). Prije izdvajanja DNA učinjena je deparafinizacija koristeći uobičajeni trostupnjevani postupak ksilolom i apsolutnim etanolom.

Kombinirane su zajedničke početnice za većinu tipova HPV-a – degenerirane početnice My09/My 11, CPI/CP2I G i Gp5/6+ koje se detektiraju na L1 i E1 regijama. Svaki je uzorak potom proveden kroz sve reakcije s početnicama specifičnih tipova HPV-a za niski, visoki i nepoznati rizik onkogenosti.

Uvjeti u kojima se PCR odvijala bili su sljedeći: 94 °C – 5 min; 94 °C – 0,5 min; 55 °C – 2 min; 72 °C – 2 min (30 ciklusa) i 72 °C – 10 min. Pozitivna i negativna kontrola provedene su u svakoj reakciji. Produkti PCR-a analizirani su elektroforezom na 3%-tnom agarozu gelu.

Određivani su genotipovi HPV-a visokog rizika 16, 18, 31 i 33 i genotipovi HPV-a niskog rizika 6 i 11 te skupno ostalih 15 genotipova HPV-a nepoznatog rizika onkogenosti (tip X).

3.2.3. Protočna citometrija

Dobiveno tkivo pregledao je patolog i parafinski uzorak bojan je hemalaun-eozinom prije i poslije rezanja za protočnu citometriju radi odabira najreprezentativnijih uzoraka i provjere njihove valjanosti.

Analiza sadržaja DNA stanica provedena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb na protočnom citometru FACScan (Calibur/Becton Dickinson,

San Jose, CA, SAD) na osobnom računalu Macintosh 7600 uz uporabu računalnih programa CellquestTM (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, CA, SAD) i Modfit LTV 2.0 (Verity Software House, Inc., SAD). Program CellquestTM služi za mjerenje uzoraka i pohranjivanje izmjerenih podataka.

Za svaki uzorak se kroz protočni citometar propušta 20 000 jezgara. Dobiveni jednoparametrijski histogram je prikaz relativnog intenziteta fluorescencije i broja propuštenih jezgara analiziranih programom ModFit LTV 2.0. Iz njega su dobiveni podatci o udjelu stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa: G0 faza mirovanja, G1 presintetska faza, S faza sinteze i proliferacije, G2 prediobena faza i M faza diobe.

Nalazi s jednim G0-G1 vrškom klasificirani su kao diploidni, oni koji imaju i dodatni odvojeni G0-G1 vršak (s više od 10% jezgara cijele populacije) kao aneuploidni, a oni s trima ili više odvojenih G0-G1 vršaka su tetraploidni (poliploidni) (55). Koeficijent varijacije (CV – standardna devijacija u odnosu na srednju vrijednost) izračunat je na G0-G1 vršku, uz gornju prihvatljivu vrijednost od 8%. Uzorci s CV > 8%, agregatima > 10% te BAD (pozadina histograma, agregati i debri) > 20% neprimjereni su za identifikaciju DNA aneuploidnih populacija ili za određivanje S faze te su po preporukama konsenzusa isključeni iz ispitivanja (55).

3.3. STATISTIČKA OBRADA

Statistička obrada dobivenih podataka provedena je sljedećim testovima:

1. χ^2 test, odnosno po potrebi *Fischerov egzaktni test*
2. *ocjena valjanosti* ploidnosti u procjeni CIN-a i MIC-a prema tipovima HPV-a

Za statističku obradu podataka koristio se program Statistica 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Nominalni podatci bili su uspoređeni χ^2 testom, a kontinuirani podatci Studentovim *t* testom i analizom varijance. Normalnost raspodjele kontinuiranih vrijednosti provjerena je upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa normalnosti. Tamo gdje je raspodjela značajno odstupala od normalnosti, koristili su se neparametrijski testovi (Mann-Whitney U-test i Kruskal-Wallis test).

U svim statističkim analizama značajnom je smatrana *p vrijednost* manja od 0,05.

4. REZULTATI

Ukupno je analizirano 147 bolesnica liječenih konizacijom ili histerektomijom zbog CIN-a II ili CIN-a III dobivenih *punch* biopsijom. Raspodjela težine patohistološke dijagnoze i dobi bolesnica prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Patohistološka dijagnoza i dob analiziranih bolesnica

DIJAGNOZA	N (%)	DOB (god.)
CIN I	39 (26,5)	25,9±4,8
CIN II	37 (25,2)	27,2±6,6
CIN III	40 (27,2)	31,6±6,0
MIC	31 (21,1)	33,3±4,2
UKUPNO	147 (100)	29,4±6,3

$$p < 0,001$$

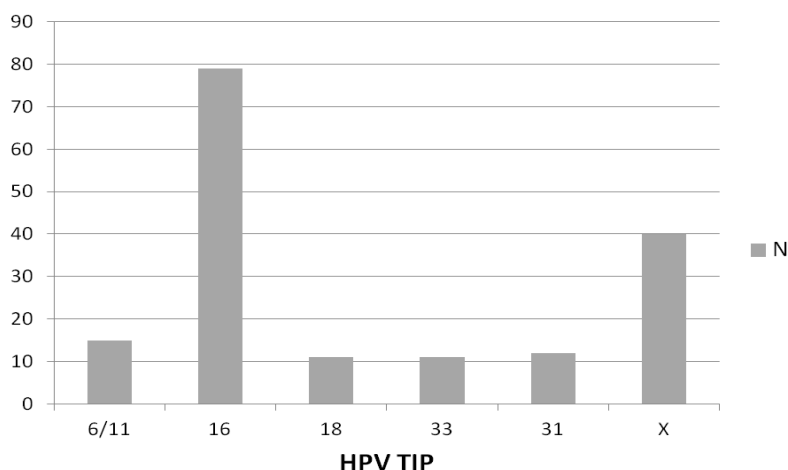
Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost dobi bolesnica i težine patohistološke dijagnoze među svim promatranim skupinama s koeficijentom povezanosti ($r = 0,516$; $p < 0,001$).

Tipovi HPV-a nađeni u analiziranih bolesnica prikazani su u tablici 2. i na slici 6.

Tablica 2. Tipovi HPV-a u analiziranih bolesnica

HPV TIP	N	%
6/11	15	8,9
16	79	47,0
18	11	6,6
33	11	6,6
31	12	7,1
X*	40	23,8
UKUPNO	168	100

*tip X – HPV nepoznatog rizika onkogenosti



Slika 6. Raspodjela tipova HPV-a u analiziranih bolesnica

Kako je iz tablice 2. vidljivo, u 147 analiziranih bolesnica izolirano je ukupno 168 tipova HPV-a, što govori da je u pojedinim bolesnica istodobno nađeno više tipova HPV-a: visokog rizika (tip 16, 18, 31 i 33), niskog rizika (tip 6 i 11) i HPV nepoznatog rizika onkogenosti (tip X). Od 168 izoliranih virusa u njih 40 (23,8%) nije se moglo odrediti pripadaju li visokom ili niskom riziku onkogenosti (tip X).

Bolesnice istodobno zaražene s 2 ili više tipova HPV-a prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Raspodjela istodobne višestruke zaraze tipovima HPV-a

HPV TIPOVI	N	%
LR/X	4	20
LR/HR (16 i 16+31)	2	10
HR/X (3x16, 2x33, 1x31)	6	30
HR/HR (4x16/18, 2x16/33, 1x16/31, 1x18/33)	8	40
UKUPNO	20	100

(LR – niski rizik, HR – visoki rizik)

Tablica 3. pokazuje istodobnu zarazu s više tipova HPV-a u ukupno 20 (13,6%) analiziranih bolesnica kod kojih se radi o kombinaciji raznih tipova virusa. Vidljivo je da se gotovo uvijek radi o zarazi s 2 tipa HPV-a (95%), a vrlo rijetko o istodobnoj zarazi s više tipova HPV-a (5%).

Nalaz pojedinih tipova HPV-a u analiziranih bolesnica podijeljenih prema težini patohistološke dijagnoze prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Tip HPV-a i patohistološka dijagnoza

DIJAGNOZA (N=147)	HPV TIP					
	6/11	16	18	31	33	X
CIN I (N=39)	8 (20,5%)	18 (46,2%)	0	4 (10,3%)	3 (7,7%)	15 (38,5%)
CIN II (N=37)	5 (13,5%)	18 (48,6%)	3 (8,1%)	3 (8,1%)	2 (5,4%)	10 (27%)
CIN III (N=40)	2 (5%)	24 (60%)	3 (7,5%)	3 (7,5%)	3 (7,5%)	10 (25%)
MIC (N=31)	0	19 (61,3%)	5 (16,1%)	2 (4,8%)	3 (9,7%)	5 (16,1%)
HPV (N=168)	15	79	11	12	11	40

$p < 0,01$

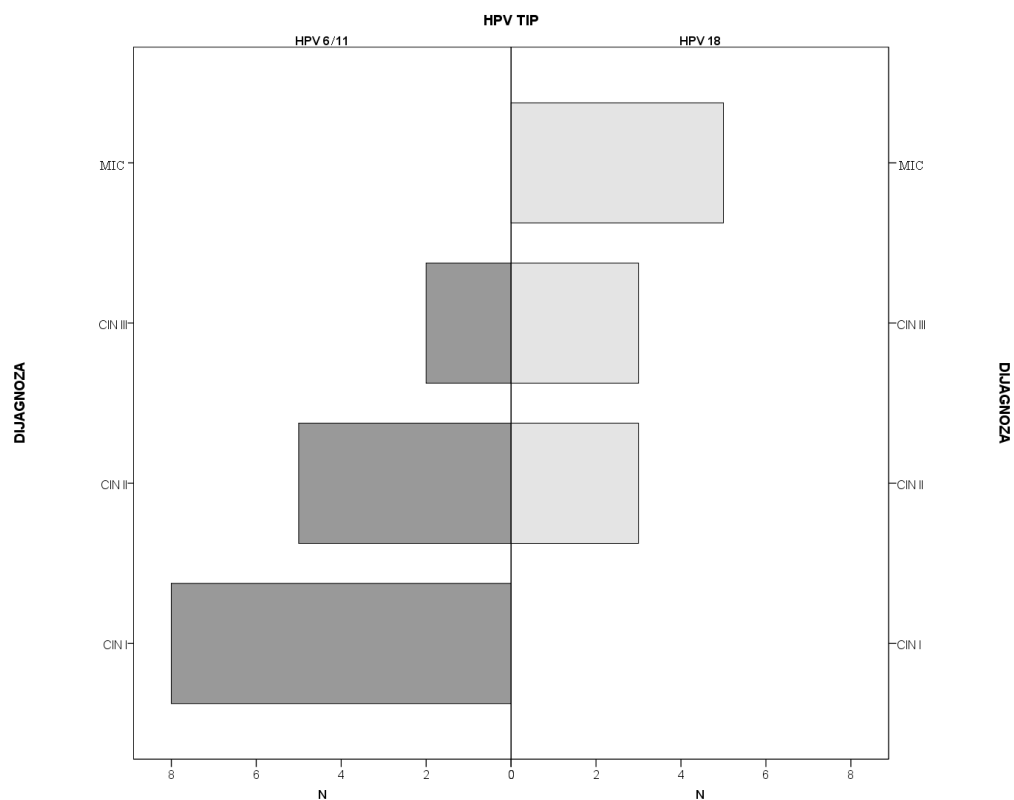
$p < 0,05$

Iz tablice 4. vidljivo je kako se zastupljenost tipova HPV-a 6 i 11 (niski rizik) smanjuje s težinom patohistološke dijagnoze, odnosno u mikroinvazivnom karcinomu (MIC) zaraze ovim virusom nema (0/31), što predstavlja statistički značajnu negativnu povezanost ($r = -0,256$; $p = 0,002$).

U slučaju zaraze HPV tipom 18 dolazi do potpuno suprotne situacije jer se ovaj tip virusa najčešće nalazi u bolesnica s MIC-om, a u onih s CIN-om I ga nema, što predstavlja statistički pozitivnu povezanost ($r = 0,195$; $p = 0,018$).

U slučajevima zaraze ostalim tipovima HPV-a nema statistički značajnih razlika u odnosu na težinu patohistološke dijagnoze.

Na slici 7. prikazane su statistički značajne razlike težine patohistološke dijagnoze u bolesnica zaraženih HPV tipovima 6 i 11, odnosno HPV tipom 18.



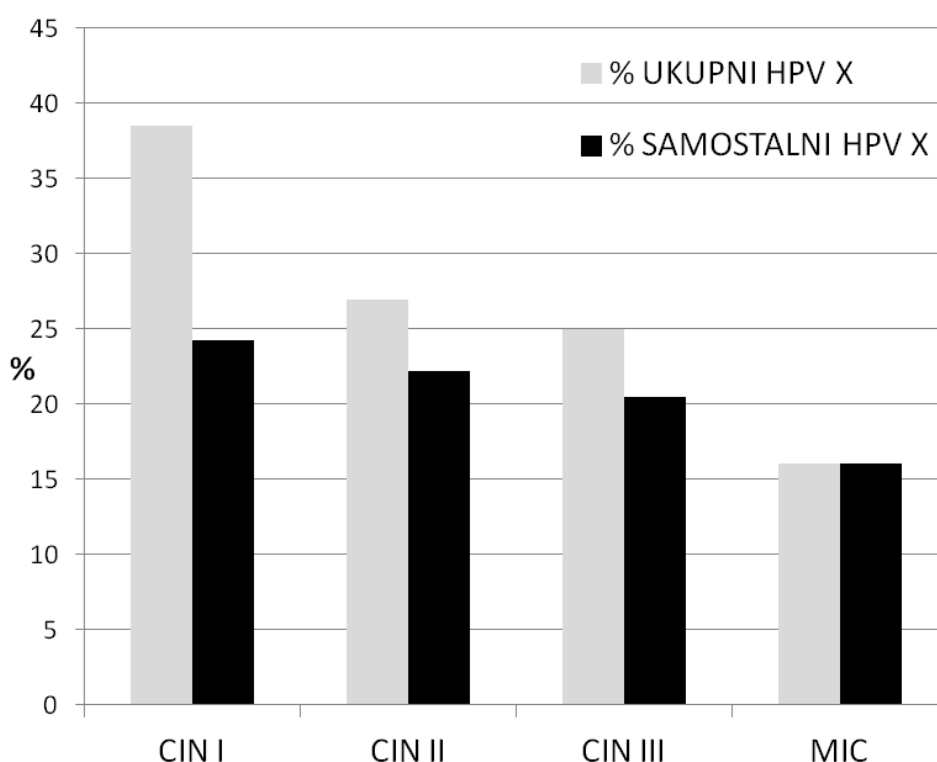
Slika 7. Patohistološka dijagnoza uz HPV tipove 6 i 11 i HPV tip 18

Iz slike 7. vidljiva je negativna povezanost težine patohistološke dijagnoze u slučaju zaraze HPV tipovima 6 i 11, odnosno pozitivna povezanost u slučaju zaraze HPV tipom 18.

Također, iz tablice 4. vidljivo je da se HPV nepoznatog rizika onkogenosti (tip X) nalazi u svim cervikalnim intraepitelnim neoplazijama, ali i u MIC-u.

Od 147 analiziranih bolesnica u njih 30 (20,4%) nađen je virus nepoznatog rizika onkogenosti (tip X) samostalno, a u 10 (6,8%) bolesnica uz neki drugi tip (ili visoki ili niski rizik).

Na slici 8. prikazana je raspodjela HPV-a nepoznatog rizika onkogenosti (tip X) prema težini patohistološke dijagnoze.



Slika 8. HPV tip X i patohistološka dijagnoza

Iz slike 8. vidljivo je kako se učestalost HPV-a nepoznatog rizika onkogenosti (tip X) smanjuje prema težini patohistološke dijagnoze, bilo samostalno ili uz neke druge tipove HPV-a, a jedino u mikroinvazivnom karcinomu se uvijek nalazi samostalno u pet (16%) uzoraka.

Nalazi istodobne zaraze s 2 i više tipova HPV-a u 20 (13,6%) analiziranih bolesnica prema težini patohistološke dijagnoze prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Istodobna višestruka zaraza tipovima HPV-a i patohistološka dijagnoza

DIJAGNOZA (N=147)	VIŠE HPV TIPOVA
CIN I (N=39)	8 (20,5%)
CIN II (N=37)	4 (10,8%)
CIN III (N=40)	5 (12,5%)
MIC (N=31)	3 (9,7%)
UKUPNO	20 (13,6%)

Iz tablice 5. vidljivo je da se učestalost istodobne višestruke zaraze tipova HPV-a smanjuje s težinom patohistološke dijagnoze, ali ona nije statistički značajna.

Nalazi ploidnosti tumorskih stanica u analiziranih bolesnica podijeljenih prema težini patohistološke dijagnoze prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Ploidnost tumorskih stanica i patohistološka dijagnoza

DIJAGNOZA (N=147)	PLOIDNOST		
	DIPLOIDNI	ANEUPLOIDNI*	TETRAPLOIDNI
CIN I (N=39)	37 (94,9%)	0	2 (5,1%)
CIN II (N=37)	26 (70,3%)	7 (18,9%)	4 (10,8%)
CIN III (N=40)	16 (40%)	20 (50%)	4 (10%)
MIC (N=31)	7 (22,6%)	22 (71,0%)	2 (6,5%)
UKUPNO	86 (58,5%)	49 (33,3%)	12 (8,2%)

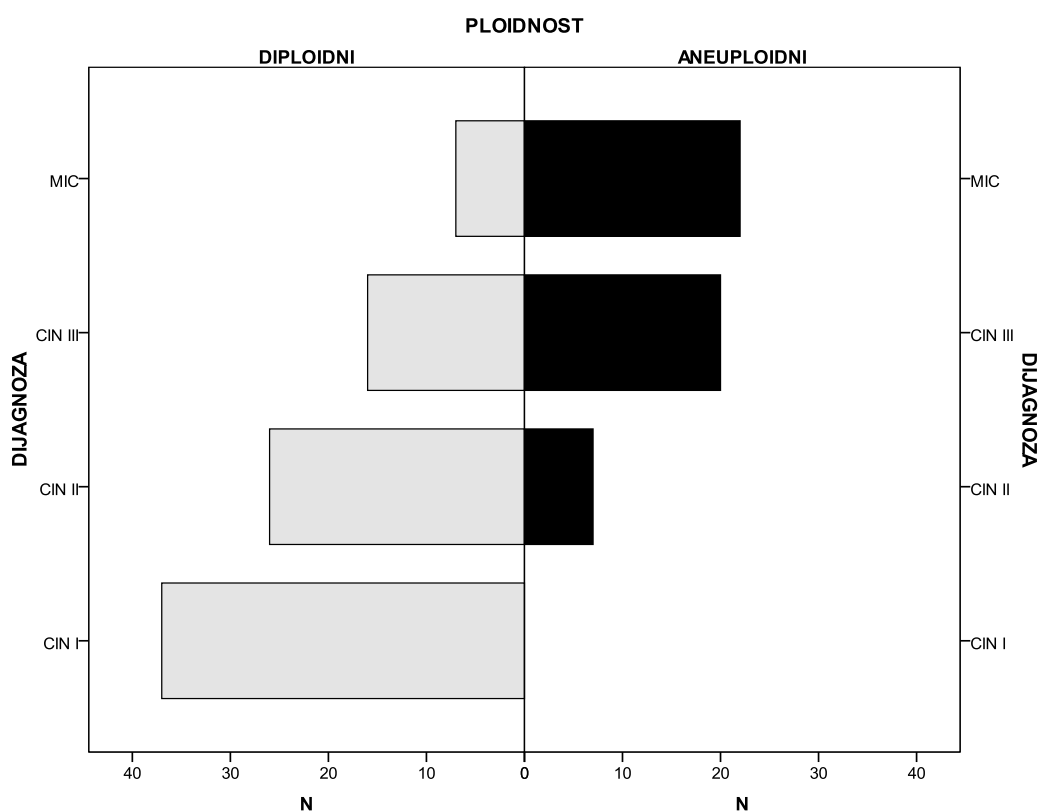
*p < 0,001

Iz tablice 6. vidi se negativan odnos diploidnosti tumorskih stanica i težine patohistološke dijagnoze jer se najčešće nalaze u CIN-u I, a najrjeđe u MIC-u, ali bez statističke značajnosti.

Pozitivan odnos aneuploidnosti tumorskih stanica i težine patohistološke dijagnoze također se vidi iz ove tablice, odnosno u CIN-u I ne nalazi se aneuploidnost, a ona raste prema MIC-u, što predstavlja statistički značajnu povezanost ($r = 0,554$; $p < 0,001$).

Tetraploidnost tumorskih stanica nije povezana s težinom patohistološke dijagnoze.

Na slici 9. prikazana je raspodjela diploidnih i aneuploidnih nalaza u analiziranih bolesnica prema težini patohistološke dijagnoze.

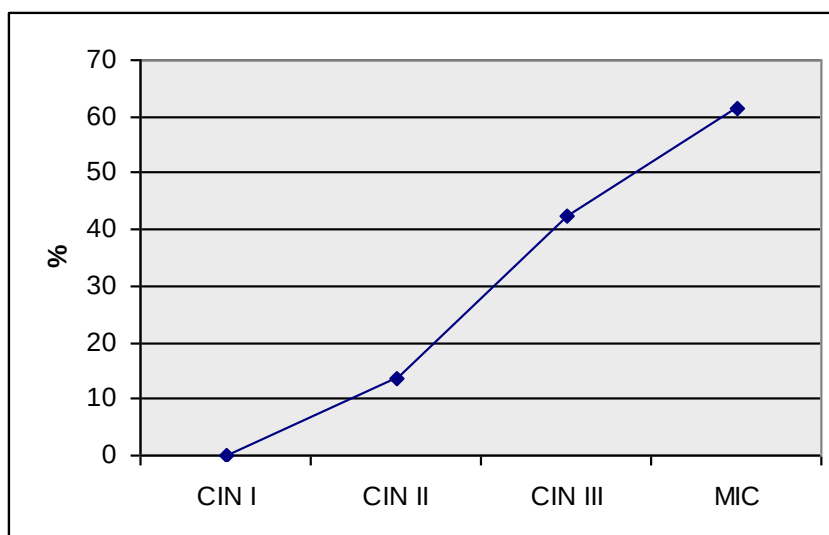


Slika 9. Diploidnost i aneuploidnost prema patohistološkoj dijagnozi

Istodobni nalazi očekivanih negativnih prognostičkih čimbenika (aneuploidnost tumorskih stanica i tipovi HPV-a visokog rizika – 16, 18, 31 i 33) u odnosu na težinu patohistološke dijagnoze u analiziranih bolesnica prikazani su u tablici 7. i na slici 10.

Tablica 7. Patohistološka dijagnoza i aneuploidnost uz HPV visokog rizika

DIJAGNOZA (N=147)	ANEUPLOIDNOST + HPV visokog rizika	DIJAGNOZA %
CIN I (N=39)	0	0
CIN II (N=37)	5	13,5
CIN III (N=40)	17	42,5
MIC (N=31)	19	61,3
UKUPNO	41	27,9



Slika 10. Patohistološka dijagnoza i aneuploidnost uz HPV visokog rizika

Iz tablice 7. i slike 10. vidljivo je da se radilo o ukupno 41 (27,9%) analiziranoj bolesnici zaraženoj tipovima HPV-a visokog rizika (16, 18, 31 i 33) uz istodobni nalaz aneuploidnosti tumorskih stanica. Ova kombinacija negativnih prognostičkih čimbenika nije pronađena u CIN-u I (0/39), a njihov postotak raste prema težini patohistološke dijagnoze, što predstavlja statistički značajnu pozitivnu povezanost među svim promatranim skupinama (razlike u postotku aneuploidnosti + HPV visokog rizika) – CIN II prema CIN-u III ($\chi^2 = 6,564$; $p = 0,014$) i CIN II prema MIC-u ($\chi^2 = 14,848$; $p < 0,001$).

Nalazi ploidnosti tumorskih stanica i tipova HPV-a u analiziranih bolesnica prema težini patohistološke dijagnoze prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Ploidnost i tip HPV-a prema patohistološkoj dijagnozi

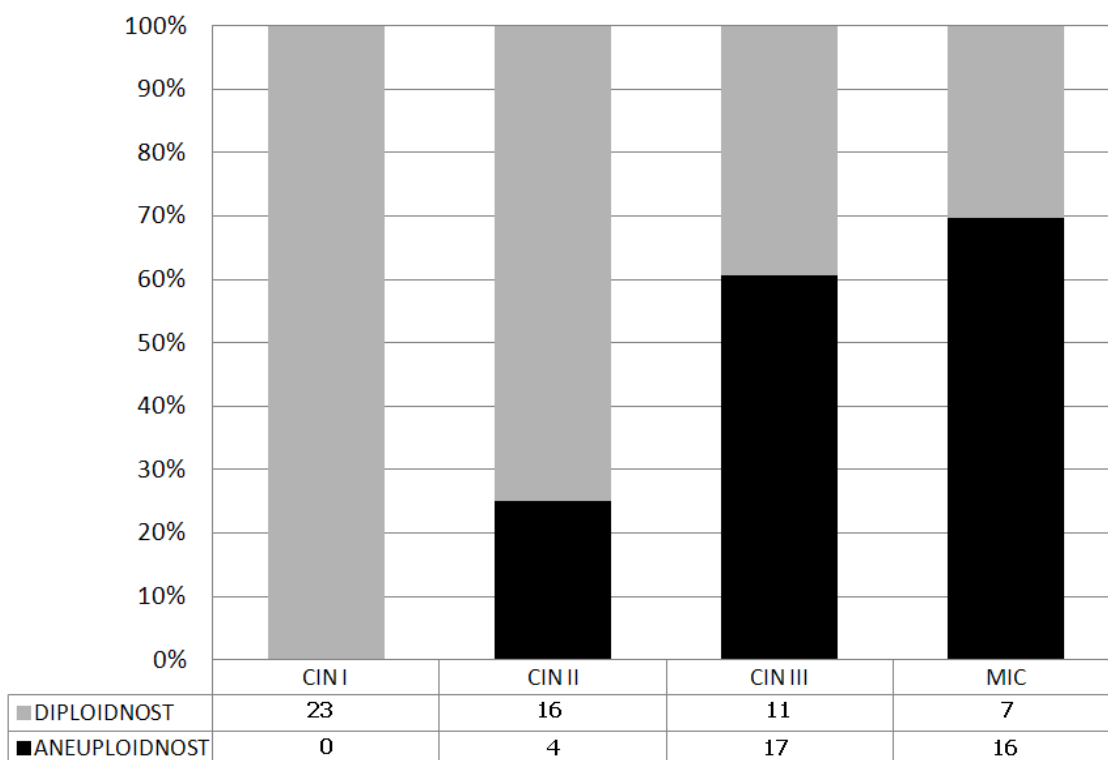
DIJAGNOZA (N=147)	HPV TIP						
	6/11	16	18	31	33	X	UKUPNO
CIN I (N=39)							
DIPLOIDNOST	8	17	0	3	3	14	45
ANEUPLOIDNOST	0	0	0	0	0	0	0
TETRAPLOIDNOST	0	1	0	1	0	1	3
CIN II (N=37)							
DIPLOIDNOST	5	14	0	2	0	6	27
ANEUPLOIDNOST	0	3	3	0	1	2	9
TETRAPLOIDNOST	0	1	0	1	1	2	5
CIN III (N=40)							
DIPLOIDNOST	1	9	0	1	1	4	16
ANEUPLOIDNOST	0	13	3	2	2	5	25
TETRAPLOIDNOST	1	2	0	0	0	1	4
MIC (N=31)							
DIPLOIDNOST	0	4	0	1	2	1	8
ANEUPLOIDNOST	0	14	5	1	1	3	24
TETRAPLOIDNOST	0	1	0	0	0	1	2
UKUPNO	15	79	11	12	11	40	168

Iz tablice 8. vidljivo je da u bolesnica s patohistološkom dijagnozom CIN I, bez obzira na tip HPV-a, niti u jednom slučaju nije pronađena aneuploidnost.

Također je vidljivo da u MIC-u, bez obzira na ploidnost tumorskih stanica, niti u jednom slučaju nisu samostalno pronađeni tipovi HPV-a niskog rizika (6 i 11).

Vidljivo je i da su kod bolesnica zaraženih HPV tipom 18, bez obzira na težinu patohistološke dijagnoze, tumorske stanice uvijek aneuploidne.

Za ostale tipove HPV-a visokog rizika (16, 31 i 33) tek je s progresijom bolesti u CIN III u većini slučajeva nađena i aneuploidnost tumorskih stanica – CIN I u 0% (0/23), CIN II u 25% (4/20), CIN III u 60,7% (17/28) i MIC 69,6% (16/23), što je prikazano na slici 11.



Slika 11. Diploidnost i aneuploidnost prema patohistološkoj dijagnozi uz tipove HPV-a visokog rizika (16, 31 i 33).

5. RASPRAVA

Unatoč velikom uspjehu, koji je postignut uobičajenim probirom na rak vrata maternice, pouzdanost standardne citološke i histološke dijagnostike nastoji se poboljšati novim metodama. Zaraza HPV-om i cervikalne displazije uočavaju se prosječno desetak godina prije nastanka invazivnog raka vrata maternice, a samo manji broj zaraženih žena razvije rak, što je potvrđeno i ovim istraživanjem jer je s porastom životne dobi bolesnica statistički značajno rasla i izraženost, odnosno težina epitelne promjene (od CIN-a I do mikroinvazivnog karcinoma).

Prema podacima iz literature promjene CIN-a I/II samo će u oko 1/3 progredirati u CIN III od kojeg će samo nešto više od 12% progredirati dalje u invazivni rak (6). Vrijeme progresije od CIN-a III do invazivnog raka vrata maternice vjerojatno iznosi 3 – 10 godina, o čemu je teško pronaći pouzdane podatke, upravo zbog karaktera bolesti i nemogućnosti provođenja istraživanja na ljudima (7,10).

Poznato je kako će promjene vrata maternice, pozitivne na DNA HPV-a, vjerojatnije rezultirati progresijom bolesti nego one koje ne sadrže virusnu DNA (162). Mnoge studije pišu o zloćudnom potencijalu HPV-a visokog rizika u displazijama i invazivnom raku vrata maternice, a različiti tipovi posjeduju individualni rizik za tumorsku progresiju. Smatra se kako će zaraza HPV-om visokog rizika rezultirati razvojem displazija u 20% slučajeva (190).

Za razliku od HPV-a visokog rizika, HPV niskog rizika nema utjecaja na nastanak raka vrata maternice jer se ne ugrađuje u genom stanice domaćina. On se nalazi u tkivu dobroćudnih promjena kao što su spolne bradavice (*condylomata accuminata*) i niskostupnjevane promjene (CIN I, LSIL) (36,157). HPV tipovi 6 i 11 odgovorni su za oko 10% CIN-a I i 90% spolnih bradavica (157-159). U tkivu CIN-a I utvrđena je zaraza brojnim tipovima HPV-a koji uzrokuju anogenitalne zaraze, a ima ih više od 40 (110,191).

U ovom istraživanju HPV tipovi 6 i 11 najčešće su bili prisutni u CIN-u I (53,3%), u promjenama CIN-a II i CIN-a III pronađeni su statistički značajno rjeđe, a u tkivu mikroinvazivnog karcinoma nisu pronađeni niti u jednom slučaju. U samo 10,3% slučajeva CIN-a I zaraza HPV tipovima 6 i 11 bila je samostalna, a u ostalim promjenama CIN-a I pronađena je zaraza različitim tipovima HPV-a, kako niskog, tako i visokog rizika onkogenosti pa i zaraza tipovima nepoznatog rizika onkogenosti (tip X), no zanimljivo je kako nije pronađen niti jedan slučaj zaraze HPV-om visokog rizika tipa 18.

Za razliku od promjena niskog stupnja (CIN I), u visokostupnjevanim promjenama (CIN II/III) istraživanja ukazuju na prevladavanje HPV tipa 16 pa čak i na njegovu veću povezanost s prekancerozama u odnosu na druge tipove visokog rizika (162,163). HPV tipovi 16 i 18 otkriveni su u 25% niskostupnjevanih (CIN I) i 50% – 60% visokostupnjevanih promjena (CIN II/III) (192).

I u ovom istraživanju HPV tip 16 pronađen je najčešće u svim uzorcima displazija – 46,2% u CIN-u I, 48,6% u CIN-u II i 60% u CIN-u III. HPV tip 18 nije pronađen niti u jednom slučaju promjena CIN-a I, a u CIN-u II/III zaraza HPV tipovima 16 i 18 nađena je u 62,3% slučajeva.

Podatci iz literature pokazuju kako su i drugi tipovi HPV-a visokog rizika također povezani s CIN-om II/III i rakom vrata maternice, no znatno rjeđe iako imaju sposobnost zloćudne preobrazbe (193). U ovom istraživanju HPV tipovi 31 i 33 nađeni su u 18% CIN-a I, 13,5% CIN-a II, 15% CIN-a III i 16,2% u MIC-u.

Premda većina podataka dobivena istraživanjima ove problematike ukazuje i dokazuje da su cervikalne displazije inducirane zarazom HPV-om, a genomi tih virusa otkriveni su u velikom broju njih, podatci o slabij povezanosti tipa HPV-a i stupnja bolesti ipak postoje (194).

Povezanost invazivnog raka vrata maternice s HPV tipom 16 u literaturi iznosi oko 50%, a s HPV tipom 18 znatno je manja i iznosi od 15% – 20% (168,183,192). Slični su rezultati dobiveni i ovim istraživanjem: HPV tip 16 nađen je u 61,3% MIC-a, a HPV tip 18 u 16,1% slučajeva (zajedno 77,4%).

U tkivu karcinoma pločastih stanica vrata maternice najčešće su dokazani HPV tipovi visokog rizika 16, 18, 31, 33 i 45 i zajedno su prisutni u oko 90% slučajeva (157,183). U ovom su istraživanju HPV tipovi 16, 18, 31 i 33 dokazani u 93,5% mikroinvazivnih karcinoma.

U radovima se navodi da su česte istodobne višestruke zaraze različitim tipovima HPV-a, a prema nekima i do 43,2% slučajeva (195,196). Međutim, ovo je istraživanje pokazalo takvu zarazu s više tipova HPV-a svih kombinacija u 13,6% slučajeva, a samo u jednom slučaju dokazana je istodobna zaraza s 3 tipa HPV-a. Takva istodobna višestruka zaraza tipovima HPV-a, prema ovim rezultatima, ne utječe na progresiju bolesti u odnosu na zarazu s jednim tipom HPV-a visokog rizika.

Oko 10% nalaza kod CIN-a III i invazivnog raka vrata maternice može biti negativno na HPV visokog rizika (197). U ovom istraživanju takvih negativnih nalaza na određivane tipove HPV-a visokog rizika 16, 18, 31 i 33 bilo je 22,5% u CIN-u III i 16,1% u MIC-u.

Međutim, HPV nepoznatog rizika onkogenosti (tip X) samostalno je nađen u 20% CIN-a III i 16,1% MIC-a.

U literaturi se uočavaju nalazi visokostupnjevanih promjena (CIN II/III) negativni na HPV visokog rizika, a uz prisutne samo HPV niskog rizika u oko 3% (198). Samostalna zaraza HPV-om niskog rizika u promjenama CIN-a III u ovom radu pronađena je rijetko (2,5%), a u slučajevima MIC-a nije pronađena niti jednom.

Usprkos tehnološkom napretku i novim mogućnostima dijagnostike, postoje i određena ograničenja zbog čega sve dobivene rezultate treba uvijek prihvaćati s malom zadržskom. Naime, uslijed fiksacije u formalinu i uklapanja u parafin može doći do fragmentacije DNA, što smanjuje uspješnost njena izoliranja lančanom reakcijom polimeraze (194). Kako se iz istog uzorka tkiva za patohistološku analizu često rade pretrage genotipizacije HPV-a i DNA ploidnost, moguće je da se u rezovima za analizu DNA HPV-a nije nalazila dovoljna količina tumorskih stanica ili ih nije ni bilo. Također, ne treba zaboraviti da HPV nije neophodan za nastanak raka vrata maternice i kako do aktivacije gena uključenih u proces karcinogeneze može doći i na drugi način.

Specifično određivanje genotipa HPV-a je bolje od testiranja na pozitivni ili negativni HPV visokog rizika jer je klinički korisnije, ali ti testovi nisu uvijek dostupni (122). Metodom PCR određuju se samo tipovi HPV-a kojih je u uzorku najviše, a oko 20% izoliranih virusa nisu najčešći tipovi 16, 18, 31, 33 i 45.

Identični su podatci nađeni i u ovom istraživanju gdje su u 23,8% uzoraka izolirani tipovi HPV-a nepoznatog rizika onkogenosti (tip X), a samostalna zaraza ovim tipovima HPV-a pronađena je u 20,4% analiziranih uzoraka. U ovim nalazima su među pronađenim HPV tipovima X gotovo sigurno zastupljeni i oni visokog rizika. U prilog tomu govori činjenica da je samostalna zaraza HPV tipom X otkrivena u 16,1% MIC-a i 20% CIN-a III te u 16,3% aneuploidnih tumorskih stanica, što naglašava potrebu određivanja i drugih tipova HPV-a. U te svrhe se, kao pouzdan dijagnostički postupak za otkrivanje i diferencijaciju svih 25 tipova HPV-a u tumorskim stanicama displazija i raka vrata maternice, koristi PCR s reverznom hibridizacijom. Međutim, ova metoda je vrlo skupa, što je čini neprikladnom za svakodnevnu primjenu (126).

Zaraza HPV-om dovodi do kromosomske nestabilnosti koja uzrokuje aneuploidne promjene, a one olakšavaju ugradnju genoma HPV-a u genome stanica displazija i invazivnog raka vrata maternice (199,200). Aneuploidnost je uočena kod displazija s HPV-om visokog rizika, a kod onih s HPV-om niskog rizika nije pronađena (201).

U ovom istraživanju promjene sadržaja DNA bile su značajno povezane s HPV statusom jer je nađena statistički značajna razlika kod usporedbe nalaza tipova HPV-a visokog rizika u diploidnim prema aneuploidnim tumorskim stanicama analiziranih bolesnica. Od 49 nalaza aneuploidnih uzoraka bilo je 83,7% s analiziranim tipovima HPV-a visokog rizika (16, 18, 31 i 33), a 16,3% sadržavalo je samostalni HPV nepoznatog rizika onkogenosti (tip X). Niti jedan aneuploidni uzorak nije sadržavao tipove HPV-a niskog rizika 6 i 11. U aneuploidnim tumorskim stanicama najčešće je nađen HPV tip 16 (61,2%). Svi uzorci u kojima je dokazana zaraza HPV tipom 18 sadržavali su aneuploidne tumorske stanice.

S obzirom na to da displastični epitel predstavlja potencijalno prekancerozno stanje, u kojem je rizik progresije prema invazivnom raku obično nepoznat, smatra se da određivanje aneuploidnosti u displastičnim stanicama može povisiti prognostičku vrijednost za zloćudnu preobrazbu (202).

Većina studija pokazuje da se rak vrata maternice razvija na temelju perzistencije aneuploidnosti te kako ona ukazuje na razvoj teških displazija ili na invazivni rak (203,204). Neki autori smatraju da aneuploidnost igra ključnu ulogu u neoplastičnom razvoju (205,206). Duesberg je pokazao da se aneuploidni rak općenito smatra opasnijim i agresivnijim od diploidnoga (207).

Kod prekanceroza i raka vrata maternice pronađeni su genski poremećaji i poremećaji broja kromosoma (aneuploidija i tetraploidija), često uz prisutnost HPV-a (199,203,208). Ovisno o zarazi HPV tipom 16 i aneuploidnosti kao prognostičkim čimbenicima, pokušala se naći moguća povezanost preživljenja ili prognoze kod bolesnica s invazivnim rakom pločastih stanica vrata maternice (209).

Pronađeno je kako sadržaj DNA tumorskih stanica displazija i invazivnog raka vrata maternice može korelirati s prognozom (210-212). Klinička istraživanja pokazuju da promjene s aneuploidnim DNA sadržajem imaju veću vjerojatnost perzistiranja ili napredovanja iz blažih prema težim stupnjevima displazija nego one s diploidnim sadržajem DNA (162,210,213,214).

Bollmann i sur. usporedili su HPV status i aneuploidnost u 112 tekućinskih citoloških preparata (engl. *liquid-based cytology*) od kojih je bilo 63 CIN-a I i 49 CIN-a II/III te su našli ukupno 44% aneuploidnih tumorskih stanica, a od toga 8% u CIN-u I (201). Singh i sur. su u svojoj studiji pokazali da je aneuploidnost stanica u svim stupnjevima displazija iznosila sveukupno 92% uz povećanje postotka aneuploidnih nalaza s progresijom težine stupnja promjene, čemu se pridaje prognostička važnost (215).

Za razliku od prethodno navedenih istraživanja u ovom su istraživanju rezultati pokazali znatno manji ukupni broj aneuploidnosti od 23,3% u svim stupnjevima displazija. Sveukupno manji postotak aneuploidnih nalaza vjerojatno se može pripisati činjenici da u promjenama CIN-a I aneuploidnost uopće nije pronađena. Potvrđena je progresija aneuploidnosti prema težini promjene jer je zastupljenost aneuploidnih tumorskih stanica statistički značajno rasla prema težini patohistološke dijagnoze (18,9 % u CIN-u II, 50% u CIN-u III i 71% u MIC-u), a diploidnih se značajno smanjivala.

Rezultati ovog istraživanja ukupnog postotka aneuploidnosti tumorskih stanica u displazijama su niži iako je broj CIN-a II/III u odnosu na CIN I bio veći. Osim činjenice da aneuploidnost uopće nije pronađena u promjenama CIN-a I, ova se razlika može objasniti činjenicom da su Bollmann i Singh analizirali citološke preparate u kojima je dijagnoza displazija manje pouzdana u odnosu na *zlatni standard* patohistološkog nalaza.

Lorenzato i sur. su u istraživanju na 99 bioptičkih uzoraka tkiva vrata maternice u skupini od 27 histološki normalnih nalaza pronašli aneuploidnost u 11% uzoraka (179). U istom istraživanju u CIN-u I pronađeno je 73% aneuploidnih uzoraka, a u CIN-u II/III 93% uzoraka. Analizirajući samo pozitivne uzorke s HPV-om visokog rizika, dobili su u objema skupinama gotovo iste postotke (179).

U ovom istraživanju, čak niti uz dokazanu zarazu HPV-om visokog rizika, u promjenama CIN-a I aneuploidnih tumorskih stanica nije bilo. Za razliku od tog nalaza, aneuploidne stanice pronađene su u 35,6% uzoraka CIN-a II/III, od čega 28,6% uz HPV visokog rizika, što je znatno manje od prethodnog rada.

Melsheimer i sur. su u 85 bioptičkih uzoraka tkiva vrata maternice pozitivnih na HPV 16, našli aneuploidnost tumorskih stanica u 20% CIN-a I, 32% CIN-a II/III i 80% u invazivnom raku vrata maternice (199). Ti su rezultati samo donekle slični rezultatima ovog istraživanja za aneuploidnost tumorskih stanica uz HPV tip 16 od 20,8% u CIN-u II/III i 41,2% u mikroinvazivnom karcinomu, a u CIN-u I nisu nađene aneuploidne tumorske stanice.

Razlike u rezultatima ovog istraživanja prema prethodnim dvama radovima objašnjive su time što su ovim istraživanjem obuhvaćeni veći patohistološki uzorci (konus ili cijeli vrat maternice nakon histerektomije), gdje su materijal i količina epitelnih stanica bili znatno veći.

Izrazito različiti nalazi učestalosti aneuploidnosti tumorskih stanica u pojedinim stupnjevima displazija kod raznih autora upućuju na oprez pri tumačenju rezultata, što

dijelom potvrđuje i ovo istraživanje. Kako aneuploidnost tumorskih stanica u ovom radu ipak nije nađena kod većeg broja teških displazija (81,1% CIN II i 50% CIN III), a kod mikroinvazivnog karcinoma nije nađena u čak 29% nalaza, to ukazuje da ona sama po sebi nije dovoljno pouzdan biljeg u procjeni progresije bolesti.

Istraživanja pokazuju da je abnormalni DNA sadržaj u stanicama uzrok, a ne posljedica zloćudne preobrazbe (216). DNA sadržaj može odražavati genetsku nestabilnost stanica veoma rano u zloćudnom procesu u trenutku kad morfološke promjene prekanceroze ili zloćudnosti nisu još histološki očigledne (217).

Studija Singha i sur. prikazala je pozitivnu korelaciju progresije bolesti kod aneuploidnosti uz perzistentnu zarazu HPV-om, što je navelo na zaključak da bi određivanje ploidnosti (kao biološkog biljega kod normalnog ili ASCUS nalaza) moglo biti vrijedna pomoć u ranom praćenju razvoja bolesti (215). Do sličnog zaključka došli su i Bollman i sur. čiji je rad pokazao da nalazi ASCUS-a s abnormalnim DNA sadržajem uz HPV visokog rizika imaju iste biološke osobine ponašanja kao visokostupnjevane promjene uz visoki rizik napredovanja prema težim stupnjevima displazija i razvoja raka (201).

Moguće je da promjene označene kao nedisplastične (zbog čega se smatra da ne predstavljaju rizik za razvoj zloćudnosti ili da je on minimalan) mogu ipak sadržavati promjene DNA s aneuploidnosti i biti potencijalno zloćudne (217,218).

Boecking je također iznio prospektivnu studiju predviđanja progresije zloćudnosti kod nalaza ASCUS-a te je zaključio kako se na temelju visoke prognostičke vrijednosti aneuploidnosti takve promjene moraju histološki kontrolirati ili kirurški ukloniti (219).

Navedeni autori zaključuju da analiza DNA sadržaja protočnom citometrijom pruža kvalitativne podatke o nalazu aneuploidnih stanica i može, u kombinaciji s citologijom i patohistologijom, poslužiti kao koristan parametar i biti novo dijagnostičko oruđe za ranu detekciju prekanceroza vrata maternice uz dobru specifičnost i osjetljivost.

Citodijagnostika je omogućila pouzdano otkrivanje promjena visokog stupnja displazije (CIN II/III), ali se ona većinom oslanja na subjektivne parametre. Neodgovarajuće uzimanje i pregledavanje uzoraka može dovesti do nalaženja blažih morfoloških promjena unatoč ranoj progresivnosti ponašanja (220). Ako bi se rizične bolesnice s cervikalnim displazijama mogle ranije otkriti analizom parametara koji odražavaju biološko ponašanje promjene (ploidnost, HPV tipizacija), način liječenja postao bi selektivniji i time bi se poboljšao sadašnji loš stupanj preživljenja kod raka vrata maternice (221).

Postoji više radova u kojima se izvještava o povezanosti tipa HPV-a i ploidnosti stanica kod displazija na citološkim uzorcima vrata maternice (126,222,223). Singh predlaže koncept probira na HPV pri kojem bi se citologija kombinirala s DNA protočnom citometrijom radi otkrivanja moguće progresije displazije uz najveću osjetljivost i specifičnost (215). O osjetljivosti takve kombinacije za otkrivanje onih CIN-a I/II koji će perzistirati ili napredovati postoje i drugačija mišljenja (162).

Upravo zbog proturječnosti mišljenja o kombinaciji dijagnostičkih metoda, ovo je istraživanje pouzdanije jer je na patohistološkim uzorcima vrata maternice pronađeno da aneuploidnost tumorskih stanica u kombinaciji s prisutnošću tipova HPV-a visokog rizika raste s težinom patohistološke dijagnoze sa statistički značajnom povezanosti.

Kad se koristi termin HSIL važno je definirati radi li se o CIN-u II ili CIN-u III, osobito u mlađih bolesnica i onih koje nisu rađale. Istraživanja su pokazala da će CIN II regredirati nakon biopsije u približno 40% slučajeva zbog čega kliničar/kolposkopičar mora na odgovarajući način dijagnostički pratiti mlađe žene koje nisu ispunile reproduktivnu funkciju, a u slučajevima CIN-a III, koji regredira u vrlo malom postotku slučajeva, klinički postupak odnosno liječenje mora biti agresivnije (224).

Prijelomna vrijednost učestalosti aneuploidnosti tumorskih stanica kod zaraze s tipovima HPV-a visokog rizika nalazi se između CIN-a II i CIN-a III, što su pokazali i rezultati ovog istraživanja jer je nađena statistički značajna povezanost porasta takvih nalaza između CIN-a II i CIN-a III. Zbog toga se u bolesnica, koje žele odgoditi kirurški zahvat, može učiniti tipizacija HPV-a i u slučaju nalaza visokog rizika odrediti i ploidnost tumorskih stanica. Kad su tumorske stanice diploidne bolesnicu se može pratiti, a u slučaju aneuploidnosti treba pristupiti zahvatu. To govori o važnosti određivanja ploidnosti stanica cervikalnih displazija prije operacijskog zahvata u nekih bolesnica jer nam može ukazati na moguću progresiju ili regresiju promjene.

Određivanje tipa HPV-a i ploidnosti stanica u bioptičkim uzorcima CIN-a II/III ima vrijednost u procjeni progresije promjene, što je ovim istraživanjem i potvrđeno. Međutim, ove dvije dijagnostičke metode u kombinaciji nije potrebno provoditi rutinski, već samo kod određenih bolesnica. Time bi se i liječenje individualiziralo, smanjio bi se broj nepotrebnih kirurških zahvata (konizacija, histerektomija) i mnogim bi se ženama omogućila bolja kvaliteta života i ostvarenje reproduktivske želje.

S obzirom na to da u *Hrvatskom postupniku za liječenje preinvazivnih lezija vrata maternice* nije uključeno određivanje tipa HPV-a niti analiza ploidnosti tumorskih stanica, doprinos ovog istraživanja mogao bi biti u *nadopunjavanju i poboljšanju* našeg postupnika,

a u svrhu još točnijeg i pravilnijeg dijagnosticiranja, liječenja i praćenja bolesnica s cervikalnim intraepitelnim neoplazijama.

Otkrivanje ploidnosti stanica u kombinaciji s tipizacijom HPV-a u CIN-u II/III moglo bi koristiti *u kliničkoj primjeni* pronalaženja onih bolesnica u kojih nema potrebe za operativnim zahvatom.

6. ZAKLJUČCI

- Težina bolesti statistički značajno raste s dobi bolesnica.
- Bolesnice s najslabijim stupnjem promjene (CIN I) mogu biti zaražene i s HPV-om niskog i visokog rizika, ali nije pronađen niti jedan slučaj s izoliranom zarazom HPV-om tipa 18.
- U mikroinvazivnom karcinomu se nikad ne nalazi samostalno HPV niskog rizika, ali se rijetko (2,5%) nalazi u CIN-u III, što znači da se takve bolesnice mogu duže pratiti bez terapijskog zahvata (konizacija ili histerektomija) kako bi sigurnije obavile reproduksijsku funkciju. Ovo je razlog da se kod žena koje žele odgoditi zahvat može u CIN-u III određivati tip HPV-a kako bi se isključio HPV niskog rizika.
- Gotovo 14% bolesnica je istodobno zaraženo s dvama ili više tipova HPV-a, što prema rezultatima ovog istraživanja ne utječe na progresiju bolesti u odnosu na zarazu jednim tipom HPV-a visokog rizika.
- Prema rezultatima ovog istraživanja najagresivniji je HPV tip 18 i u svih bolesnica zaraženih ovim tipom HPV-a tumorske stanice su aneuploidne, što govori u prilog potrebi što hitnijeg kirurškog zahvata.
- U CIN-u II/III i MIC-u tumorske stanice mogu biti diploidne, tetraploidne i aneuploidne, a u CIN-u I tumorske stanice, prema rezultatima ovog istraživanja, nikada nisu aneuploidne pa ploidnost u CIN-u I nije potrebno određivati.
- Aneuploidnost tumorskih stanica statistički značajno raste prema težini bolesti, a učestalost nalaza diploidnih tumorskih stanica se značajno smanjuje s težinom bolesti. Prijelomna vrijednost učestalosti nalaza aneuploidnosti kod zaraze HPV-om visokog rizika događa se između CIN-a II i CIN-a III. S obzirom na to, u određenih bolesnica koje žele odgoditi kirurški zahvat (konizacija ili histerektomija) zbog očuvanja fertilne sposobnosti može se učiniti i tipizacija HPV-a te u slučaju nalaza visokog rizika (osim HPV tipa 18) odrediti i ploidnost tumorskih stanica. Ako su tumorske stanice aneuploidne, trebalo bi odmah pristupiti kirurškom postupku.

- Na temelju prethodnih zaključaka smatra se da u određenim (gore navedenim) situacijama nije dovoljno samo rutinsko određivanje skupine HPV-a visokog rizika, već je potrebno odrediti genotip pojedinog virusa i ploidnost tumorskih stanica.
- U skupini HPV-a nepoznatog rizika onkogenosti (tip X) su vrlo vjerojatno zastupljeni i tipovi HPV-a visokog rizika. Na to navodi činjenica da je taj tip HPV-a nađen samostalno u 16,1% MIC-a i u 20% CIN-a III. Ovaj tip HPV-a nađen je samostalno u sveukupno 16,3% uzoraka s aneuploidnim tumorskim stanicama, što zahtijeva dodatnu analizu genotipa tih virusa i njihova utjecaja na biologiju tumora.

7. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Pokušati otkriti ulogu i međusobnu vezu tipa HPV-a i ploidnosti stanica u CIN-u visokog stupnja (CIN II i CIN III) u njegovoj progresiji u invazivni rak vrata maternice te izdvojiti skupinu bolesnica kod kojih nije potrebna žurna konizacija.

Ispitanice i metode: U 147 bolesnica s dijagnozom CIN-a visokog stupnja (CIN II i CIN III) na biopsiji vrata maternice učinjena je konizacija ili histerektomija. Dobiveni materijali pregledani su patohistološki, učinjena je PCR i analiza sadržaja DNA protočnom citometrijom.

Rezultati: Dob bolesnica je pozitivno korelirala s porastom stupnja epitelne promjene od CIN-a I do MIC-a ($p < 0,001$). Ukupno je nađeno 168 tipova HPV-a: 67,3% visokog rizika, 8,9% niskog rizika i 23,8% tipova nepoznatog rizika onkogenosti. HPV tip 16 je najčešći izolirani virus (47%), a istodobna višestruka zaraza tipova HPV-a nađena je u 13,6% uzoraka (NS). Prema težini patohistološke dijagnoze pronađena je negativna povezanost za HPV tipove 6 i 11 ($p < 0,01$) (nikad aneuploidni) i pozitivna povezanost za HPV tip 18 ($p < 0,05$) (uvijek aneuploidni), a za ostale tipove HPV-a nije nađena (NS). U MIC-u se nikada ne nalaze samostalno HPV tipovi 6 i 11, ali se nalaze u 2,5% bolesnica s CIN-om III. Nađeno je 58,5% diploidnih, 33,3% aneuploidnih i 8,2% tetraploidnih uzoraka. Nađena je povezanost aneuploidnosti s porastom težine dijagnoze – 0% za CIN I; 18,9% za CIN II; 50% za CIN III i 71% za MIC ($p < 0,001$). Kod zaraze tipovima HPV-a visokog rizika (16, 31 i 33) raste učestalost aneuploidnosti prema težini dijagnoze sa statistički značajnom povezanosti.

Zaključak: U cervikalnim intraepitelnim neoplazijama nije potrebno rutinski određivati tipove HPV-a (osim skupine HPV-a visokog rizika) i ploidnost tumorskih stanica. Tipizacija HPV-a opravdana je u bolesnica s CIN-om II ili III koje žele zanijeti, zbog mogućnosti poštenog pristupa (praćenje bez žurne konizacije). Uz nalaz HPV tipova 6 i 11 bolesnicu je moguće samo pratiti, u slučaju nalaza HPV tipa 18 potrebno je učiniti zahvat, a kod nalaza HPV tipova 16, 31 i 33 treba odrediti ploidnost tumorskih stanica jer diploidnost ukazuje na sporiju progresiju promjene, što omogućuje kliničko praćenje.

8. SUMMARY

Research goals: It is an attempt to discover the relationship between HPV type and cell ploidy in high grade CIN in its progression to invasive cervical cancer and to detect the fraction of the patients who do not need urgent conization.

Examinees and methods: Hysterectomy or conization was done in 147 patients with the diagnosis of high grade CIN on the biopsy. Patohystological analysis, PCR and flow citometry of the DNA was done on the obtained specimen.

Results: Patient age positively correlates with higher grade of CIN, from CIN I to MIC ($p < 0,01$). 168 HPV types was detected; 67.3% of HR, 8.9% of LR and 23.8% of unknown oncogenic risk type. The most common was HPV type 16 in 47% samples and in 13.6% samples we found infection with multiple HPV types. Higher CIN negatively correlates with HPV types 6 and 11 ($p < 0,01$) (never aneuploid) and positive correlates with HPV type 18 ($p < 0,05$) (always aneuploid). Correlation between higher CIN and other HPV types was not established. HPV types 6 and 11 was not solely found in MIC but it was found solely in 2.5% of the patients with CIN III. In all samples we detected 58.5% diploidy, 33.3% aneuploidy and 8.2% tetraploidy. We found correlation of aneuploidy with higher grade of the disease - 0% CIN I; 18,9% CIN II; 50% CIN III; 71% MIC ($p < 0,001$). We found statistically significant correlation between high risk HPV types (16, 31 and 33) and frequency of aneuploidy in patients with higher grade CIN.

Conclusion: It is not necessary to routinely detect HPV types (it is enough to establish high risk HPV group) or ploidy of the tumor cells in CIN. If the patient with CIN II/III desires fertility and insists on conservative approach (follow up without immediate conization), HPV type can be detected. If HPV types 6 and 11 was detected, patient can be only closely followed; in the case of HPV type 18 we should proceed with the treatment and if HPV types 16, 31 or 33 are detected, ploidy of the tumor cells should be assessed and if the tumor cells are diploid, close follow up is warranted.

9. LITERATURA

1. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001;164(7):1017-25.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80(6):827-41.
3. WHO: Global incidence of cervical cancer, projections for 2025, accessed 15. 08. 2009, Available from <http://www.who.int.bulletin/volumes84/2news>.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj. Bilten br. 32, Zagreb, 2007.
5. Hakama M. Screening for cervical cancer. *Cancer Treat Res* 1996;86:41-9.
6. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critic review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12(2):186-92.
7. Duggan MA. A review of natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Jpn J Cancer Chemother* 2002;29:176-193.
8. Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002;89(2):183-90.
9. Sonnex C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. *J Clin Pathol* 1998;51(9):643-8.
10. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, i sur. Relation of human papilloma virus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354(9172):20-5.
11. Kaufman RH, Adam E, Icenogle J, i sur. Relevance of human papillomavirus screening in management of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176(1):87-92.
12. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, i sur. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007;297(8):813-9.
13. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, i sur. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006; 119(5):1095-101.
14. Centers for Disease Control and Prevention, Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55(11):1-94.

15. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, i sur. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(7):453-9.
16. Tarkowski TA, Koumans EH, Sawyer M, i sur. Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J Infect Dis* 2004;189(1):46-50.
17. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338(7):423-8.
18. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003;157(3):218-26.
19. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, i sur. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 2001;285(23):2995-3002.
20. Winer RL, Feng Q, Hughes JP, O'Reilly S, Kiviat NB, Koutsky LA. Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. *J Infect Dis* 2008;197(2):279-82.
21. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, i sur. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(2):101-6.
22. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102:3-8.
23. Shepherd J, Weston R, Peersman G, Napuli IZ. Interventions for encouraging sexual lifestyles and behaviours intended to prevent cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD001035.
24. Wheeler CM, Greer CE, Becker TM, Hunt WC, Anderson SM, Manos MM. Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol* 1996;88(2):261-8.
25. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Fedele L, Franceschi S, Gallotta L. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1992;69(9):2276-82.
26. Affandi MZ, Dun T, Mantuano V, Sidhu R, Lumplugh C, Telisinghe PU. Epidemiology of cervical carcinoma in Brunei Darussalam. Analysis of data on 27,208 women screened with cytologic examinations. *Acta Cytol* 1993;37(2):175-80.

27. Bosch FX, de Sanjosé S, Castellsague X, Muñoz N. Geographical and social patterns of cervical cancer incidence. U: Franco E, Monsonego J, ur. New developments in cervical cancer screening and prevention. Oxford: Blackwell Science, 1997, str. 23-33.
28. Buckley JD, Harris RW, Doll R, Vessey MP, Williams PT. Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet* 1981;2(8254):1010-5.
29. Harris RW, Brinton LA, Cowdell RH, i sur. Characteristics of women with dysplasia or carcinoma in situ of the cervix uteri. *Br J Cancer* 1980;42(3):359-69.
30. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, i sur. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1093-101.
31. Ngelangel C, Muñoz N, Bosch FX, i sur. Causes of cervical cancer in the Philippines: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(1):43-9.
32. Wright TC, Cox JT. Human papillomaviruses-natural history of infections. U: Clinical uses of human papillomavirus (HPV) DNA testing. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, 2004.
33. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, i sur. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(7):513-7.
34. Woodman CB, Collins S, Winter H, i sur. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1831-6.
35. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002;3(1):11-6.
36. zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288(2):55-78.
37. Lizard G, Roignot P, Brunet-Lecomte P, Chardonnet Y. Morphological analysis of in situ hybridization signals in cervical intraepithelial neoplasia containing human papillomavirus type 16 or 18: relationship with histological grade and DNA content. *Cytometry* 1998;34(4):180-6.
38. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, i sur. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-9.

39. Hopman EH, Rozendaal L, Voorhorst FJ, i sur. High risk human papillomavirus in women with normal cervical cytology prior to the development of abnormal cytology and colposcopy. *BJOG* 2000;107(5):600-4.
40. Josefsson AM, Magnusson PK, Yitalo N, i sur. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355(9222):2189-93.
41. Wallin KL, Wiklund F, Angström T, i sur. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;341(22):1633-8.
42. Nobbenhuis MA, Helmerhous TJ, van den Brule AJ, i sur. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001;358(9295):1782-3.
43. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168(2):123-37.
44. Rozendaal L, Westerga J, van der Linden JC, i sur. PCR based high risk HPV testing is superior to neural network based screening for predicting incident CIN III in women with normal cytology and borderline changes. *J Clin Pathol* 2000; 53(8):606-11.
45. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, i sur. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002;325(7364):572-6.
46. Schelcht NF, Kulaga S, Robitaille J, i sur. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001;286(24):3106-14.
47. Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, i sur. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* 2002;102(5):519-25.
48. Moberg M, Gustavsson I, Gyllenstein U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 2004;112(5):854-9.

49. Sycuro LK, Xi LF, Hughes JP, i sur. Persistence of genital human papillomavirus infection in a long-term follow-up study of female university students. *J Infect Dis* 2008;198(7):971-8.
50. Bonnez W, Reichman RC. Papillomaviruses. U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ur. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, str. 1630-44.
51. Sedlacek TV. Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42(2):206-20.
52. Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, i sur. A population-based study of vaginal human papillomavirus infection in hysterectomized women. *J Infect Dis* 2004;190(3):458-67.
53. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, i sur. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003;103(4):519-24.
54. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(5):1590-7.
55. Insinga RP, Glass AG, Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(1):105-13.
56. Jones BA, Novis DA. Follow-up of abnormal gynecologic cytology: a college of American pathologists Q-probes of 16132 cases from 306 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(5):665-71.
57. Lawson HW, Lee NC, Thames SF, Henson R, Miller DS. Cervical cancer screening among low-income women: results of a national screening program, 1991-1995. *Obstet Gynecol* 1998;92(5):745-52.
58. Friedell GH, Tucker TC, McManmon E, Moser M, Hernandez C, Nadel M. Incidence of dysplasia and carcinoma of the uterine cervix in an Appalachian population. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(13):1030-2.
59. Audy-Jurković S, Mahovlić V, Šimunić V. Cervical neoplasia and human papillomavirus infection in adolescents and young women. *Eur J Gynecol Oncol* 1991;12:160.
60. Grce M, Husnjak K, Magdić L, i sur. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *Eur J Epidemiol* 1997;13(6):645-51.

61. Goldie SJ, Kohli M, Grima D, i sur. Projected clinical benefitts and cost-effectiveness of a human papillomavirus 16/18 vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(8):604-15.
62. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7(1):11-22.
63. Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, i sur. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer* 2001;85(3):398-404.
64. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989;49:49(17):4677-81.
65. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol* 1984;64(4):451-8.
66. Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behaviour of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986;67(5):665-9.
67. Halowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(3):252-8.
68. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212(4):356-67.
69. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006;208(2):152-64.
70. Mahmud SM, Robinson K, Richardson H, i sur. HLA polymorphisms and cervical human Papillomavirus infection in a cohort of Montreal University students. *J Infect Dis* 2007;196(1):82-90.
71. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, i sur. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J Gen Virol* 1999;80 (2):409-17.
72. Arany I, Tyring SK. Activation of local cell-mediated immunity in interferonresponsive patients with human papillomavirus-associated lesions. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16(6):453-60.
73. Association of Reproductive Health Professionals. Clinical Proceedings. Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Washington, DC, Association of Reproductive Health Specialists, March 2001.
74. Ozsaran AA, Ateş T, Dikmen Y, i sur. Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection in renal transplant

- patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999;20(2):127-30.
75. Tam LS, Chan AY, Chan PK, Chang AR, Li EK. Increased prevalence of squamous intraepithelial lesions in systemic lupus erythematosus: association with human papillomavirus infection. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3619-25.
 76. Ahdieh L, Muñoz A, Vlahov D, Trimble CL, Timpson LA, Shah K. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *Am J Epidemiol* 2000;151(12):1148-57.
 77. Jamieson DJ, Duerr A, Burk R, i sur. Characterization of genital human papillomavirus infection in women who have or who are at risk of having HIV infection. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(1):21-7.
 78. Maiman M, Fruchter RG, Clark M, Arrastia CD, Matthews R, Gates EJ. Cervical cancer as an AIDS-defining illness. *Obstet Gynecol* 1997;89(1):76-80.
 79. Singh DK, Anastos K, Hoover DR, i sur. Human papillomavirus infection and cervical cytology in HIV-infected and HIV-uninfected Rwandan women. *J Infect Dis* 2009;199(12):1851-61.
 80. Mbulawa ZZ, Coetzee D, Marais DJ, i sur. Genital human papillomavirus prevalence and human papillomavirus concordance in heterosexual couples are positively associated with human immunodeficiency virus coinfection. *J Infect Dis* 2009;199(10):1514-24.
 81. Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, i sur. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer* 2007;120(3):650-5.
 82. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, i sur. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1604-13.
 83. Silins I, Ryd W, Strand A, i sur. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 2005;116(1):110-5.
 84. Szerewski A, Cuzick J. Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *J Epidemiol Biostat* 1998;3:229-56.
 85. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, i sur. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* 2000;82(7):1332-8.

86. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(12):868-73.
87. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, i sur. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13(9):839-46.
88. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, i sur. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(18):1406-14.
89. Olsen AO, Dillner J, Skrondal A, Magnus P. Combined effect of smoking and human papillomavirus type 16 infection in cervical carcinogenesis. *Epidemiology* 1998;9:346-9.
90. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, i sur. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359(9312):1085-92.
91. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, i sur. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007;370(9599):1609-21.
92. VanEnwyk J, Davis FG, Colman N. Folate, vitamin C, and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1(2):119-24.
93. Herrero R, Potischman N, Brinton LA, i sur. A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer. I. Dietary indicators. *Am J Epidemiol* 1991;134(11):1335-46.
94. de Vet H, Knipschild PG, Willebrand D, Schouten HJ, Sturmans F. The effect of beta-carotene on the regression and progression of cervical dysplasia: a clinical experiment. *J Clin Epidemiol* 1991;44(3):273-83.
95. Potischman N, Brinton LA, Laiming VA, i sur. A case-control study of serum folate levels and invasive cervical cancer. *Cancer Res* 1991;51(18):4785-9.
96. Zelmanowicz Ade M, Schiffman M, Herrero R, i sur. Family history as a co-factor for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix: results from two studies conducted in Costa Rica and the United States. *Int J Cancer* 2005;116:599-605.

97. García-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, González CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* 2005;117(4):629-37.
98. Williams J. Cancer of the uterus: Hareveian lectures for 1886. HK Lewis, London, 1888.
99. Cullen TS. Cancer of the uterus. Appelton and Company, New York, 1900.
100. Schottländer J, Kermauner F. Zur Kenntnis des Uteruskarzinoms; monographische Studie über Morphologie, Entwicklung, Wachstum nebst Beiträgen zur Klinik der Erkrankung. Karger, Berlin, 1912.
101. Broders AC. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *JAMA* 1932;99(20):1670-74.
102. Pemberton FA, Smith GV. The early diagnosis and prevention of carcinoma of the cervix: a clinical pathologic study of borderline cases treated at the Free Hospital for women. *Am J Obstet Gynecol* 1929;17:165-76.
103. Reagan JW, Hamonic MJ. Dysplasia of the uterine cervix. *Ann NY Acad Sci* 1956;63:662-82.
104. Weid GL. Proceedings of the First International Congress on Exfoliative Cytology. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1961.
105. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969;105(3):386-93.
106. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):131-3.
107. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, U.S.A., December 12-13, 1988. *Acta Cytol* 1989;33(5):567-74.
108. Solomon D, Davey D, Kurman R i sur. The Forum Group Members; The Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287(16):2114-9.
109. Wright TC, Kurman RJ. A critical review of the morphologic classification systems of preinvasive lesions of the cervix: the scientific basis of the paradigm. *Papillomavirus Rep* 1994;5:175-81.
110. Lungu O, Sun XW, Felix J, Richart RM, Silverstein S, Wright TC Jr. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 1992;267(18):2493-6.

- 111.DiSaia PJ, Creasman WT. Clinical Gynecologic Oncology. 6 th ed. St. Louis, Mosby Inc, 2002, str. 1-33.
- 112.Stafl A, Wilbanks G. An international terminology of colposcopy: report of the Nomenclature Committee of the International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 1991;77(2):313-4.
- 113.Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, i sur. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990;16(4):371-6.
- 114.Heatley MK. How should we grade CIN? *Histopathology* 2002;40(4):377–90.
- 115.Ljubojević N. Babić S, Audy-Jurković A, i sur. Improved national Croatian diagnostic and therapeutic guidelines for premalignant lesions of the uterine cervix with some cost-benefit aspects. *Coll Antropol* 2001;25(2):467-74.
- 116.Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;70(2):209-62.
- 117.Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson JE. 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. *J Low Genit Tract Dis* 2002;6(2):127-43.
- 118.Ljubojević N, Babić S. Preinvazivne promjene vrata maternice. U: Ćorušić A, Babić D, Šamija M, Šobat H. *Ginekološka onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2005:162-81.
- 119.Viscidi RP, Sun Y, Tsuzaki B, Bosch FX, Muñoz N, Shah KV. Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1993; 55:780-4.
- 120.Evander M, Edlund K, Gustafsson A, i sur. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995;171(4):1026-30.
- 121.Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, i sur. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(14):1072-9.
- 122.Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 2006;103(1):12-7.

- 123.Nindl I, Jacobs M, Walboomers JM, i sur. Interlaboratory agreement of different human papillomavirus DNA detection and typing assays in cervical scrapes. *Int J cancer* 1999;81(4):666-8.
- 124.Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstet Gynecol* 1984;64(6):767-72.
- 125.de Villiers EM. Hybridization methods other than PCR: an update. *IARC Sci Publ.* 1992;(119):111-9.
- 126.Lorenzato M, Clavel C, Masure M, i sur. DNA image cytometry and human papillomavirus (HPV) detection help to select smears at high risk of high-grade cervical lesions. *J Pathol* 2001;194(2):171-6.
- 127.Singer A, Monaghan JM. Lower Genital Tract Precancer, Colposcopy, Pathology and Treatment. 2. izd. Oxford, Blackwell Science ltd, 2000, str. 161-213.
- 128.Stanley M. Immune response to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24:16-22.
- 129.Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/106-13.
- 130.Rigoni-Stern D. Fatti statistici relativi alle malattie cancerose. *G Serv Prog Pathol Therap* 1842;2:507-17.
- 131.zur Hausen H. Condyloma acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36:794.
- 132.Borrel A. Epithelioses infectieuses et epitheliomas. *Ann Inst Pasteur* 1903;17:81-112.
- 133.Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verrucae volgane. *G Ital Mal Venerol* 1907;48:12-7.
- 134.Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. *J Exp Med* 1934;62:523-48.
- 135.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.
- 136.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(6):1245-61.
- 137.Crawford LV. A study of papilloma virus DNA. *J Mol Biol* 1965;13(2):362-72.
- 138.Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic Patterns. *Acta Cytol* 1976;20(6):505-9.

139. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977;21(1):26-31.
140. Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condyloma acuminata*). *Int J Cancer* 1980;25(5):605-9.
141. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3(5):1151-7.
142. Chen EY, Howley PM, Levison AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organisation of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299:529-34.
143. Schwarz E, Freese UK, Gissman L, i sur. Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314(6006):111-4.
144. Yee C, Krishnan-Hewlett Z, Baker CC, Schlegel R, Howey PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985;119(3):361-6.
145. Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M, Doninger JK, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987;61(4):1061-6.
146. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risks to Humans. Lyon; 1996, vol. 64,1-6. (Meeting of IARC Working Group on 6-13 June 1995).
147. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690-8.
148. Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol* 1975;15(5):1239-47.
149. Jenson AB, Rosenthal JD, Olson C, Pass F, Lancaster WD, Shah K. Immunologic relatedness of papillomavirus from different species. *J Natl Cancer Inst* 1980;64:495-500.
150. Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:13-31.
151. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, i sur. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer* 1998;78(2):166-71.
152. Howley PM. Papillomaviridae and their replication. U: Fields BN, Kripe DM, ur. *Fundamental virology*. Raven Press, New York, 1990, str. 743-70.

- 153.Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. Clin Lab Med 2000;20(2):235-55.
- 154.Kjaer SK, Tran TN, Sparen P, i sur. The burden of genital warts: a study of nearly 70,000 women from the general female population in the 4 Nordic countries. J Infect Dis 2007;196(10):1447-54.
- 155.Insinga RP, Dasbach EJ, Myers ER. The health and economic burden of genital warts in a set of private health plans in the United States. Clin Infect Dis 2003; 36(11):1397-403.
- 156.de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004;324(1):17-27.
- 157.Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, i sur. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348:518-27.
- 158.Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Cancer 2003;88(1):63-73.
- 159.Mao C, Hughes JP, Kiviat N, i sur. Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. Am J Obstet Gynecol 2003;188(3):677-84.
- 160.Centers for Disease Control and Prevention. STD Prevention. Genital HPV infection. May 2001.
- 161.Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, i sur. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. J Natl Cancer Inst 2006;98(5):303-15.
- 162.Melsheimer P, Klaes R, Doeberitz MV, Bastert G. Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive test for persistence and progression of CIN I/II. Cytometry 2001;46(3):166-71.
- 163.Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. J Natl Cancer Inst 2005;97(14):1066-71.
- 164.Clifford GM, Gallus S, Herrero R, i sur. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. Lancet 2005;366(9490):991-8.

165. Markowitz LE, Sternberg M, Dunne EF, McQuillan G, Unger ER. Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J Infect Dis* 2009;200(7):1059-67.
166. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71:2449-56.
167. Nucci MR, Crum CP. Redefining early cervical neoplasia: recent progress. *Adv Anat Pathol* 2007;14(1):1-10.
168. Bosh FX, Manos MM, Muñoz N, i sur. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(11):796-802.
169. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomavirus and human cancer. *Human Pathol* 1990;21(7):686-98.
170. Durst M, Croce C, Gissman L, Schwartz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrated near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(4):1070-4.
171. Popescu NC, Zimonjic D, DiPaolo JA. Viral integration, fragile sites, and proto-oncogenes in human neoplasia. *Hum Genet* 1990;84(5):383-6.
172. Kubbutat MHG, Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced anogenital malignancies. *Semin Virol* 1996;7:295-304.
173. von Knebel Doeberitz M, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissman L. Correlation to modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical cancer cells. *Cancer Res* 1988;48(13):3780-6.
174. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002;38(17):2229-42.
175. Thorland EC, Myers SL, Persing DH, i sur. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 2000;60(21):5916-21.
176. Cullen AP, Reid R, Champion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J Virol* 1991;65(2):606-12.
177. Chen TM, Pecoraro G, Defendi V. Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Res* 1993;53(5):1167-71.

- 178.Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, i sur. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(9):4350-4.
- 179.Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, i sur. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol* 2005;36(10):1101-7.
- 180.Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2000; 2(4):291-9.
- 181.Ferenczy A, Wright TC. Anatomy and histology of the cervix. U: Kurman RJ, ur. Blaustein's pathology of the female genital tract. New York: Springer-Verlag; 1994, str. 185–201.
- 182.Collado M, Gil J, Efeyan A, i sur. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005;436(7051):642.
- 183.Sharpless NE, DePinho RA. Cancer: crime and punishment. *Nature* 2005; 436(7051):636-7.
- 184.Tishler RB, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Increase in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res* 1993;53(10 Suppl):2212-6.
- 185.Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3(6):614-20.
- 186.Hanselaar AG, Vooijs GP, Mayall BH, Pahlplatz MM, Van't Hof-Grootenboer AE. DNA changes in progressive cervical intraepithelial neoplasia. *Anal Cell Pathol* 1992;4(4):315-24.
- 187.Bollmann R. DNA cytometry in dysplasias of the uterine cervix. *Zentralbl gynaekol* 2001;123(4):206-10.
- 188.Wersto RP, Liblit RL, Koss LG. Flow citometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol* 1991;22(11):1085-98.
- 189.Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 1984;5:445-6.
- 190.Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EAM, van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol* 2006;59(10):1017-28.

- 191.de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989;63(11):4898-903.
- 192.Bosch X, Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 2006;103(1):21-4.
- 193.Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous Lesions of the Cervix. U: Kurman RJ ur. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 5 izd. Springer Verlag, New York, 2002, str. 253-324.
- 194.Pirog EC, Kleter B, Olgac S, i sur. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2000;157(4):1055-62.
- 195.Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, i sur. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011;203(7):910-20.
- 196.Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucourt-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 2007;195(11):1582-9.
- 197.Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, i sur. Ki-67, Cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25(7):884-91.
- 198.Lerma Puertas E, Otal Salaverri C, Rios Martin JJ, i sur. Human papillomavirus detection by PCR assay in a large series of high-grade squamous intraepithelial lesions with cytohistological correlation and follow-up. *Acta Cytol* 2011; 55(5):426-32.
- 199.Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 2004;10(9):3059-63.
- 200.Rihet S, Lorenzato M, Clavel C. Oncogenic human papillomaviruses and ploidy in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1996;49(11):892-6.
- 201.Bollmann R, Méhes G, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M. Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. *Cancer* 2003;99(1):57-62.

202. Bocking A, Motherby H. Assessment of cervical dysplasia with DNA image cytometry. *Pathologie* 1999;20(1):25-33.
203. Kashyap V, Das BC. DNA aneuploidy and infection of human papillomavirus type 16 in preneoplastic lesions of the uterine cervix: correlation with progression to malignancy. *Cancer Letters* 1998;123(1):47-52.
204. Bollmann R, Bollmann M, Henson DE, Bodo M. DNA cytometry confirms the utility of the Bethesda system for the classification of Papanicolaou smears. *Cancer* 2001;93(3):222-8.
205. Webb T. When theories collide: experts develop different models for carcinogenesis. *Journal Natl Cancer Inst* 2001;93(2):92-4.
206. Hanselaar AG, Böcking A, Gundlach H, i sur. Summary statement on quantitative cytochemistry (DNA and molecular biology): Task force 8. *Acta Cytol* 2001;45(4):499-501.
207. Duesberg P, Li R, Rasnick D. Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer: highlights from a conference held in Oakland, CA in January, 2004. *Cell Cycle* 2004;3(6):823-828.
208. Olaharski AJ, Eastmond DA. Elevated levels of tetraploid cervical cells in human papillomavirus-positive Papanicolaou smears diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer* 2004;102(3):192-9.
209. Jarrell MA, Heintz N, Howard P, i sur. Squamous cell carcinoma of cervix: HPV 16 and DNA ploidy as predictors of survival. *Gynecol Oncol* 1992;46(3):361-6.
210. Hering B, Horn LC, Nenning H, Kuhndel K. Predictive value of DNA cytometry in CIN 1 and CIN 2. Image analysis of 193 cases. *Annual Quant Cytol Histol* 2000;22(4):333-7.
211. Riháková P, Brychtová S, Kotrsová L, Pilka R, Kolár Z. DNA ploidy correlates with grade, proliferation and clinical outcome but not with presence of human oncogenic HPVs or expression of Bcl-2 in preneoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix. *Neoplasma* 2001;48(4):274-7.
212. Nemec E, Vandeputte S, Van Pachterbeke C, i sur. Ploidy and chromatin pattern analysis as an aid for cervical smear diagnosis. *Histol Histopathol* 2002;17(2):403-9.
213. Lorenzato M, Bory JP, Cucherousset J, i sur. Usefulness of DNA ploidy measurement on liquid-based smears showing conflicting results between cytology and high-risk human papillomavirus typing. *Am J Clin Pathol* 2002;118(5):708-13.

214. Bollmann R, Méhes G, Speich N, Schmitt C, Bollmann M. Aberrant, highly hyperdiploid cells in human papillomavirus-positive, abnormal cytologic samples are associated with progressive lesions of the uterine cervix. *Cancer* 2005;105(2):96-100.
215. Singh M, Mehrotra S, Kalra N, Singh U, Shukla Y. Correlation of DNA ploidy with progression of cervical cancer. *J Cancer Epidemiol* 2008;2008:298495. doi: 10.1155/2008/298495
216. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12(1):82-8.
217. Nguyen VQ, Grote HJ, Pomjanski N, Knops K, Böcking A. Interobserver reproducibility of DNA-image-cytometry in ASCUS or higher cervical cytology. *Cell Oncol* 2004;26(3):143-50.
218. Böcking A, Nguyen VQ. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. *Cancer* 2004;102(1):41-54.
219. Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol* 1995;8(1):67-74.
220. Robertson JH, Woodend B. Negative cytology preceding cervical cancer: causes and prevention. *J Clin Pathol* 1993;46(8):700-2.
221. Reich O, Pürstner P, Klaritsch P, i sur. Prognostic significance of preoperative DNA flow cytometry in surgically-treated cervical cancer. *Eur J of Gynaecol Oncol* 2003;24(1):13-7.
222. van der Laak JA, Siebers AG, Cuijpers VM, Pahlplatz MM, de Wilde PC, Hanselaar AG. Automated identification of diploid reference in cervical smears using image analysis. *Cytometry* 2002;47(4):256-64.
223. Bollmann R, Méhes G, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M. Determination of features indicating progression in atypical squamous cells with undertermined significance: human papillomavirus typing and DNA ploidy analysis from liquid-based cytologic samples. *Cancer* 2003 Apr 25;99(2):113-7.
224. Galgano MT, Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. Can HPV-16 genotyping provide a benchmark for cervical biopsy specimen interpretation? *Am J Clin Pathol* 2008;130(1):65-70.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen je 1959. godine u Splitu, a osnovnu školu i gimnaziju završio je u Sinju. Godine 1978. upisao je Medicinski fakultet u Zagrebu i diplomirao 1984. godine. Radio je u Domu zdravlja Sinj u primarnoj zdravstvenoj zaštiti.

Godine 1989. započeo je specijalizaciju iz ginekologije i porodništva za Sveučilišnu bolnicu Zagreb i položio specijalistički ispit 1993. godine. Od 1995. godine radi u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb. Magistrirao je 2001. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2003. prijavio je temu doktorskog rada koju je obranio 2004. godine. Radi u Zavodu za ginekološku kirurgiju i urologiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i voditelj je II ginekološkog odjela. Položio je subspecijalistički ispit iz uroginekologije 2010. u Zagrebu.

Objavio je više stručnih radova iz područja ginekologije i aktivno sudjelovao na kongresima i stručnim predavanjima. Pohađao je i bio predavač na više tečajeva trajne edukacije liječnika. Izvodi nastavu sa studentima dodiplomskog i poslijediplomskih studija.

Sudionik je Domovinskog rata. Oženjen je i otac troje djece. Živi u Zagrebu.