

Molekularna analiza humanih papilomavirusa i inačica HPV 16 u bolesnica s cervikalnom intraepitelnom lezijom visokog stupnja i karcinomom vrata maternice

Karadža, Magdalena

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:035394>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Magdalena Karadža

**Molekularna analiza humanih
papilomavirusa i inačica HPV 16 u
bolesnica s cervikalnom
intraepitelnom lezijom visokog stupnja
i karcinomom vrata maternice**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Magdalena Karadža

**Molekularna analiza humanih
papilomavirusa i inačica HPV 16 u
bolesnica s cervikalnom
intraepitelnom lezijom visokog stupnja
i karcinomom vrata maternice**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za ginekološku onkologiju KBC Zagreb i Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Adriana Vince

Zahvaljujem se kolegama i ostalim djelatnicima Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb koji su pomogli pri prikupljanju uzoraka, mentorici prof.dr.sc. Adriani Vince, prof.dr.sc. Snježani Lepej Židovec i kolegicama iz Klinike za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević gdje je učinjena analiza tipova HPV u uzorcima tkiva. Također se zahvaljem prof. dr. sc. Mariu Poljaku i njegovom timu iz Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju i dijagnostiku hepatitisa i AIDS-a Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani gdje je učinjeno sekvencioniranje HPV tip 16 i analiza inačica (varijanti) HPV 16. Mojoj obitelji hvala na potpori i strpljenju.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	HPV i rak vrata maternice	1
1.2	Epidemiologija.....	2
1.3	Humani papiloma virus.....	5
1.3.1	Klasifikacija humanih papiloma virusa	5
1.3.2	Genom HPV	10
1.3.3	Mehanizam infekcije i karcinogeneza	13
1.4	Dijagnostičke metode.....	17
1.4.1	Metode molekularne dijagnostike	18
1.4.2	Konvencionalni PAPA test i tekuća citologija (Liquid Based Cytology – LBC) 21	
1.4.3	Kolposkopija	23
1.5	Kliničke manifestacije i liječenje	25
1.5.1	Preinvazivne lezije.....	25
1.5.2	Rak vrata maternice	28
1.6	Prevenција	33
2	Hipoteza.....	37
3	Ciljevi rada	38
4	Ispitanice i metode	39
4.1	Ispitanice.....	39
4.2	Metode.....	40
4.2.1	Izolacija virusne DNA.....	40
4.2.2	Amplifikacija HPV-DNA.....	41
4.2.3	Hibridizacija PCR produkata.....	42
4.2.4	Sekvencioniranje inačica HPV 16.....	42
5	Rezultati	45
5.1	Raspodjela pacijentica prema patohistološkim dijagnozama	46
5.2	Podaci za srednju dob, dob menarhe, broj poroda i pobačaja te pušenje .	56
5.3	Raspodjela HPV tipova u uzorcima prema patohistološkoj dijagnozi	47
5.4	Usporedba broja jednostrukih naspram višestrukih infekcija HPV-om	54
5.5	Inačice HPV 16	62
5.6	Genomske inačice HPV 16 u preinvazivnim promjenama.....	63
5.7	Genomske inačice HPV 16 u invazivnim promjenama.....	67
6	Rasprava.....	75
7	Zaključak.....	86

8	Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku.....	90
9	Kratki sadržaj na engleskom jeziku	91
10	Popis literature	93
11	Kratka biografija	107

Popis oznaka i kratica

HPV – humani papilomavirus

DNA – deoksiribonukleinska kiselina; *eng. Deoxyribonucleic acid*

ICTV - Međunarodni odbor za taksonomiju virusa; *eng. International Committee on Taxonomy of Viruses*

HR-HPV – visokorizični HPV; *eng. High Risk HPV*

LR-HPV – niskorizični HPV; *eng. Low Risk HPV*

E - europska filogenetska linija HPV 16

As – azijska filogenetska linija HPV 16

AA - azijsko-američka filogenetska linija HPV 16

Af 1 - afrička 1 filogenetska linija HPV 16

Af 2 - afrička 2 filogenetska linija HPV 16

bp – parovi baza; *eng. base pairs*

ORF – slijed nukleotida koji može biti uključen u proces translacije; *eng. Open Reading Frames*

E – područje u genomu HPV odgovorno za umnožavanje virusa; *eng. Early*

L – područje u genomu HPV odgovorno za sintezu strukturnih proteina virusa; *eng. Late*

LCR – kontrolno, nekodirajuće područje u genomu HPV; *eng. Long Control Region*

VLP – čestice nalik virusima koje ne sadrže virusni genetski material; *eng. Virus Like Particles*

ATP – adenzin trifosfat

URR - dio nukleinske kiseline koji je sposoban povećati ili smanjiti ekspresiju specifičnih gena; *eng. Upstream Regulatory Region*

HSPG - heparan sulfat proteoglikani

DSBs - prekid dvolančane DNA u kojoj su oba lanca odcijepljena, no dva laca nisu razdvojena; *eng. Double Strand Breaks*

CFS - mjesto u kromosomu gdje je vjerojatno da će doći do loma; *eng. Chromosome Fragile Sites*

PCR - lančana reakcija polimeraze - brza tehnika za umnožavanje specifičnih DNA ili RNA podrčja; *eng. Polymerase Chain Reaction*

HC II - metoda za detekciju HPV DNA temeljena na hibridizaciji; *eng. Hybrid Capture II*

HC III - metoda za detekciju HPV DNA temeljena na hibridizaciji; *eng. Hybrid Capture III*

RNA – ribonukleinska kiselina, *eng. Ribonucleic acid*.

NASBA – metoda koja se koristi za kontinuirano amplifikaciju nukleinskih kiselina u smjesi na jednoj temperaturi; *eng. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*

PAPA – Papanicolaou

LBC – tekuća citologija, metoda pripreme citoloških uzoraka u kojoj je uzorak pacijenta suspendiran u tekućini, koja se koristi za proizvodnju tankog sloja stanica; *eng. Liquid Based Cytology*

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija; *eng. World Health Organisation*

SIL – skvamozna intraepitelna lezija; *eng. Squamous Intraepithelial Lesion*

LSIL – skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja; *eng. Low grade squamous Intraepithelial Lesion*

HSIL - skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja; *eng. High grade Squamous Intraepithelial Lesion*

CIN – cervikalna intraepitelna neoplazija; *eng. Cervical Intraepithelial Neoplasia*

G1 – blage promjene vidljive kolposkopski; *eng. minor changes*

G2 – grube promjene vidljive kolposkopski; *eng. maior changes*

CIN I - blaga cervikalna intraepitelna neoplazija

CIN II - umjerena cervikalna intraepitelna neoplazija

CIN III - teška cervikalna intraepitelna neoplazija

CIS - Carcinoma in situ

LLETZ – ekscizija transformacijske zone velikom omčom; *eng. Large Loop Excision of Transformation Zone*

UZV - ultrazvuk

PET/CT - pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija; *eng. Positron Emission Tomography/Computed Tomography*

MRI - Magnetska rezonancija; *eng. Magnetic resonance imaging*

FIGO - Međunarodna federacija za ginekologiju i porodništvo; *franc. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, eng. International Federation of Gynaecology and Obstetrics*)

LVSI - invazija limfokapilarnog prostora; *eng. Lymphovascular space invasion*

LPSC – laparoskopija

LAP – laparotomija

EU – Europska unija

HDGO - Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju

KBC – Klinički bolnički centar

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije; *eng. Acquired Immunodeficiency Syndrome*

dNTP - deoksoribonukleotid trifosfat

rpm – broj reakcija u minuti; *eng. reactions per minute*

AIS – adenocarcinoma in situ

MIC – mikroinvazivni karcinom

SD – standardna devijacija

nt - nukleotid

1 UVOD

1.1 HPV i rak vrata maternice

Rak vrata maternice predstavlja globalni javno-zdravstveni problem. U 2008. godini je zabilježeno je u svijetu 530.000 novooboljelih žena od raka vrata maternice i 275.000 umrlih,¹⁻³ a u 2018. godini zabilježen je porast na 570.000 novooboljelih i 311.000 umrlih žena.⁴ Već dugi niz godina je poznato da je glavni uzročnik nastanka preinvazivnih lezija i raka vrata maternice humani papiloma virus – HPV.^{5, 6}

Za istraživanje uloge HPV-a u nastanku raka vrata maternice je 2008. godine njemački znanstvenik Harald zur Hausen dobio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju.

Ukupna prevalencija HPV-a u vratu maternice u generalnoj populaciji žena je 10%. Prevalencija je veća u zemljama u razvoju.^{7, 8} Infekcija HPV-om je najčešća u mladih, seksualno aktivnih žena dobi do 25 godina, ali rak vrata maternice je češći u starijih žena, što sugerira nastanak infekcije u mlađoj dobi i sporu progresiju do karcinoma koja traje godinama.⁹

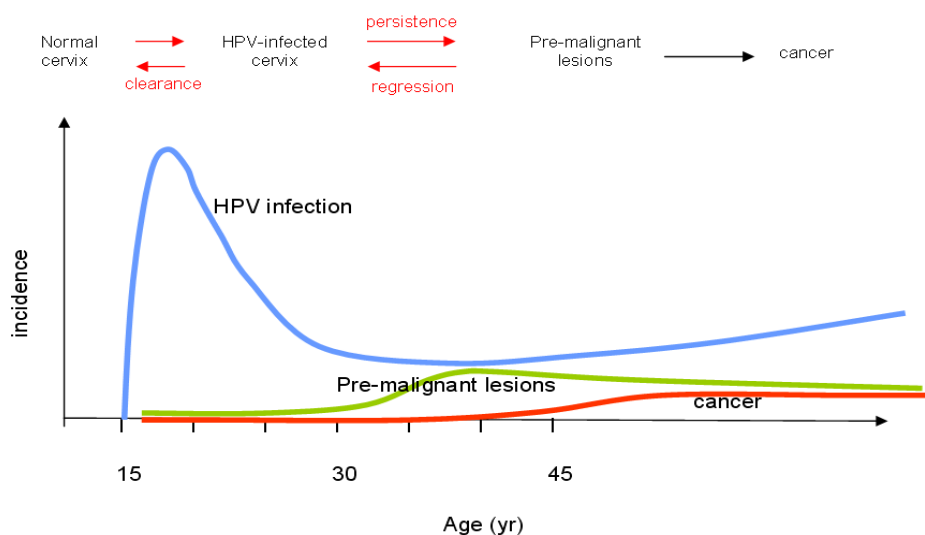
O HPV-u se danas mnogo zna, ali i dalje ostaje dosta nerazjašnjenih pitanja, stoga ne čudi veliki interes istraživačke zajednice u otkrivanju novih spoznaja, što će imati velikih implikacija i u kliničkoj praksi.

1.2 Epidemiologija

Rak vrata maternice je danas drugi vodeći uzrok smrti žena u svijetu, a to je bolest koju je danas zahvaljujući mjerama primarne i sekundarne prevencije moguće spriječiti.

Globalno, broj novooboljelih se procjenjuje na 570.000, odnosno 15,1 na 100.000 žena, a broj umrlih na 311.000, odnosno 8,2 na 100.000 žena.⁴ Postoje znatne razlike u incidenciji i mortalitetu između visokorazvijenih i zemalja u razvoju što je odraz nepostojanja programa probira raka vrata maternice ili njihove loše provedbe.^{1-3, 10}

Većina spolno aktivnih žena tijekom života biti će inficirana humanim papilloma virusom. Češće su infekcije onkogenim nego ne-onkogenim tipovima HPV.¹¹ Najveći broj infekcija prolazi spontano, no infekcija onkogenim tipovima HPV u određenom broju perzistira i napreduje prema prekanceroznim lezijama (cervikalna intraepitelna lezija) i raku vrata maternice (Slika 1).



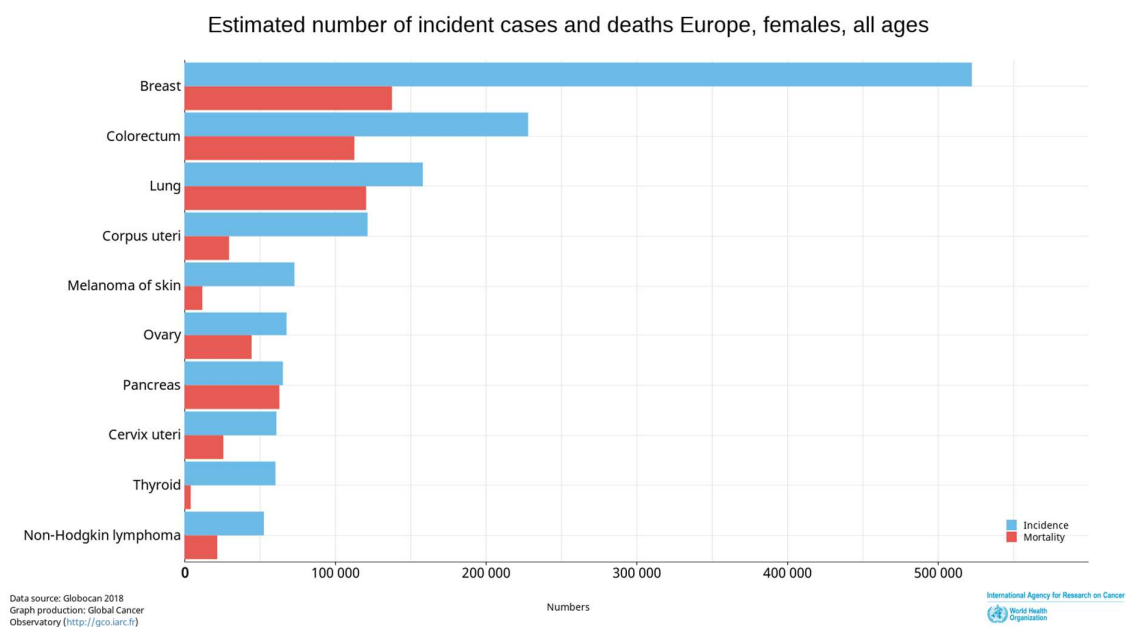
Slika 1. Prirodni tijek infekcije HPV-om. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.]. Dostupno na: <http://www.virology.uct.ac.za/vir/teaching/mbchb/human-papillomaviruses>

Manje od 5% žena zaraženih HPV tipovima visokog rizika razviti će cervikalnu intraepitelnu leziju, a samo 10-12% cervikalnih intraepitelnih lezija napreduje prema invazivnom karcinomu.^{6, 12}

Većina oboljelih i umrlih žena nalazi se u zemljama u razvoju. Incidencija raka vrata maternice varira između 1-50 na 100.000 žena, najviša je u Latinskoj Americi, Karibima, subsaharskoj Africi, Melaneziji, te u južnoj i jugoistočnoj Aziji.¹³

Predviđa se da će do 2050. godine biti milijun novodijagnosticiranih žena s rakom vrata maternice, osim ako se ne dogodi drastična promjena u prevenciji bolesti.¹⁴

U Europi je rak vrata maternice po incidenciji na osmom mjestu – 61.072 novooboljelih, odnosno 11,2 na 100.000 žena. Mortalitet je 25.829, odnosno 3,8 na 100.000 žena.⁴ (Slika 2).



Slika 2. Distribucija incidencije i mortaliteta od karcinoma žena u Europi. GLOBOCAN 2018 (IARC) Section of Cancer Information. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.]. Dostupno na: <http://gco.iarc.fr/today/home>

Također, primjetne su razlike između visokorazvijenih zemalja s dobro organiziranim programima probira i slabije razvijenih (jugoistočna Europa). (Tablica 1).

Tablica 1. Incidencija i mortalitet od raka vrata maternice u Europi po regijama

	INCIDENCIJA	MORTALITET
CENTRALNA ISTOČNA EUROPA	35 940 (58,9%)	16 011 (62%)
ZAPADNA EUROPA	9 658 (15,8%)	4 246 (16,4%)
JUŽNA EUROPA	9 155 (15%)	3 512 (13,6%)
SJEVERNA EUROPA	6 319 (10,3%)	2 060 (7,9%)

Veći broj novooboljelih i umrlih od raka vrata maternice u istočnoj Europi je posljedica velikih političkih i ekonomskih promjena u proteklih 20-30 godina koje su imale utjecaja na lošiju organizaciju javnog zdravstva i programa prevencije svih vrsta karcinoma, a rak vrata maternice nije bio izuzetak.

Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2015. godinu ukupna incidencija karcinoma vrata maternice u Hrvatskoj je 12,9 na 100.000 žena, a ukupna incidencija karcinoma in situ vrata maternice je 22,2 na 100.000 žena.¹⁵

Stope incidencije karcinoma in situ vrata maternice su najviše u dobi od 25 do 34 godine, a raka vrata maternice u dobi od 40 do 49 godine.¹⁵ Odnos između karcinoma in situ i invazivnog raka vrata maternice je u 2015. godini u Hrvatskoj bio 1,7:1.¹⁵ Incidencija karcinoma in situ vrata maternice najviša je u žena

reproduktivne dobi, što predstavlja značajan problem za žene koje nisu još rodile ili žele još rađati.

1.3 Humani papiloma virus

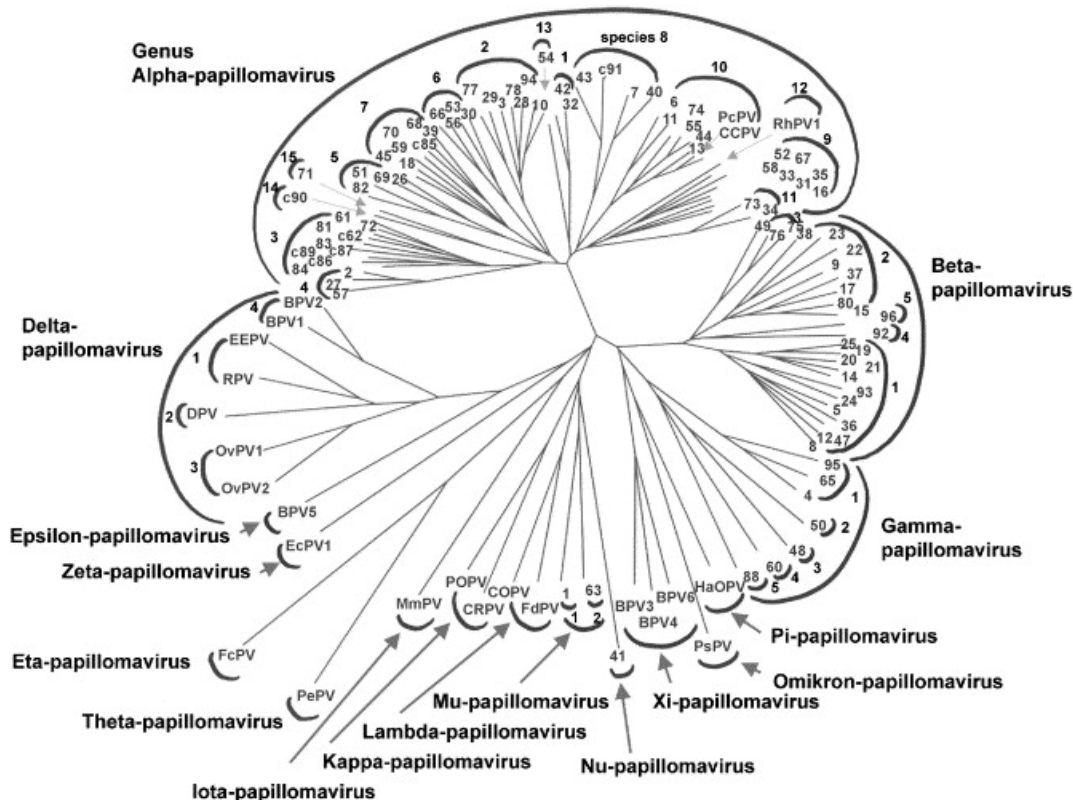
Nastanak raka vrata maternice nedvojbeno je povezan s trajnom infekcijom onkogenim tipovima humanog papiloma virusa (HPV). Unatoč regionalnim odstupanjima i raznolikosti u razdiobi različitih tipova HPV-a u pojedinim etničkim skupinama, najčešći onkogeni tipovi HPV-a u cijelom svijetu su HPV 16 i HPV 18, a odgovorni su za nastanak više od 70% svih karcinoma vrata maternice. Kada im se pribroje HPV 45 i HPV 31, imamo uzročnike 80% slučajeva raka vrata maternice.¹⁶⁻¹⁸ HPV 16 ima najveći onkogeni potencijal i dominantan je u svim dijelovima svijeta.

1.3.1 Klasifikacija humanih papiloma virusa

Humani papilloma virusi se klasificiraju u porodicu Papillomaviridae, koja je heterogena skupina virusa.^{6, 19} (Slika 3). To su mali virusi, u promjeru su približno 55 nm. Sastavljeni su od dvolančane DNA, obavijene proteinskim omotačem – kapsidom. Kapsida je ikozaedrične strukture, sastavljena je od 72 pentamerske podjedinice – kapsomere.

Molekularnom analizom je do sada dokazano 189 različitih tipova papiloma virusa, od toga je 120 ljudskih.²⁰ Tradicionalno, oznaka “tip” se odnosi na virus koji se od drugog tipa razlikuje u barem 10% slijeda DNA za L1 proteine omotača, a dva podtipa su različita kada je ta razlika u slijedu DNA 2-10%.^{12, 19} Prema najnovijoj

klasifikaciji International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), papiloma virusi su organizirani u filogenetsko stablo koje se sastoji od 29 rodova, označenih slovima grčkog alfabeta. Od toga je 5 rodova ljudskih papiloma virusa – Alfa, Beta, Gama, Mu i Nu.



Slika 3. Filogenetsko stablo papilomavirusa. Preuzeto iz: de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004 Jun 20;324(1):17-27.

Različiti rodovi dijele manje od 60% nukleotidnog slijeda L1 područja. Rodovi se dalje dijele na vrste, koje dijele 60-70% nukleotidnog slijeda. Unutar vrsta su tradicionalni tipovi s podudarnošću u slijedu od 71-89%.²⁰

Filogenetska istraživanja snažno upućuju da papiloma virusi evoluiraju zajedno sa svojim domaćinima. Ne prelaze s jednog domaćina na drugi, nema rekombinacije

gena i osnovna organizacija genoma je ostala očuvana tijekom 100 milijuna godina.

Molekulskoj raznolikosti HPV-a u svijetu pridonose i brojne inačice (varijante) unutar tipova virusa, a to su izolati koji se u DNA slijedu L1 područja razlikuju za manje od 2%. Genomske inačice HPV-a imaju različito biološko ponašanje i onkogeni potencijal.^{5, 21, 22}

Obzirom na onkogeni potencijal, humani papiloma virusi se dijele na visoko-rizične, nisko-rizične i tipove nedefiniranog malignog potencijala (Tablica 2.).^{18, 23-25}

Tablica 2. Podjela tipa HPV obzirom na onkogeni potencijal

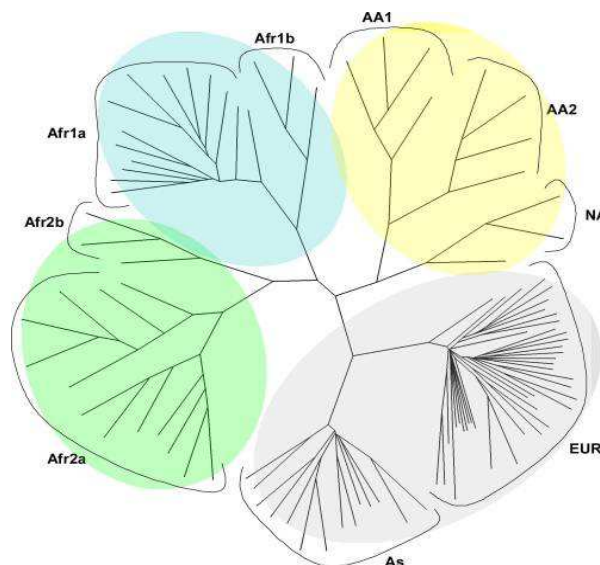
Kategorija rizika (onkogenog potencijala)	HPV tipovi
Visoko-rizični (High-risk HR)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Nisko-rizični (Low-risk LR)	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 83, 89
Nedefinirani rizik	26, 53, 66

Nisko-rizični tipovi uzrokuju nastanak genitalnih bradavica, dok su visoko-rizični tipovi povezani s nastankom preinvazivnih lezija vrata maternice i raka vrata maternice.

Kod žena kojima je dijagnosticiran invazivni rak vrata maternice najčešće izolirani tipovi HPV-a su slijedećim redoslijedom: 16, 18, 33, 45, 31 i 58.^{26, 27}

Humani papiloma virusi koegzistiraju s ljudima – domaćinima kroz jako dugo vremensko razdoblje i kroz taj period su se razvili u više evolucijskih linija.^{20, 28}

Obzirom da je HPV 16 najrasprostranjeniji tip, velika pažnja je usmjerena na njegovo proučavanje. Postoje multiple intratipske varijante – inačice HPV 16 nastale varijacijama nukleotidnog slijeda. Obzirom na njihovu geografsku distribuciju i etničku pripadnost domaćina, definirane su četiri filogenetske linije HPV 16: euro-azijska s podlinijama europska (E) i azijska (As), azijsko-američka (AA), afrička 1 (Af 1) i afrička 2 (Af 2). Istraživanje iz 2012. godine je na temelju sekvenciranja gena E6 i LCR područja dokazalo postojanje dvaju novih filogenetskih podlinija u svakoj od afričkih, tako da prema toj podjeli postoji sveukupno devet podlinija: E (europska), As (azijska), Af 1a (afrička 1a), Af 1b (afrička 1b), Af 2a (afrička 2a), Af 2b (afrička 2b), te prethodno identificirane NA (sjevernoamerička), AA1 (azijsko-američka 1) i AA2 (azijsko-američka 2).²⁹ (Slika 4).



Slika 4. Podjela filogenetskih linija HPV 16. Preuzeto iz: Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS I sur. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. J Virol. 2012 Jun;86(12):6855-61. doi: 10.1128/JVI.00483-12

U nekoliko je istraživanja potvrđeno da različite inačice imaju i različito biološko ponašanje i različit karcinogeni potencijal.^{5, 30-36}

Infekcija određenim inačicama nosi veću vjerojatnost razvoja preinvazivnih i invazivnih lezija vrata maternice,^{32, 37} a osobito su polimorfizmi u genu E6 visoko zastupljeni u cervikalnim intraepitelnim lezijama visokog stupnja i raku vrata maternice.³⁸ Uloga pojedinih genomskih inačica u karcinogenezi raka vrata maternice je još nedovoljno poznata.

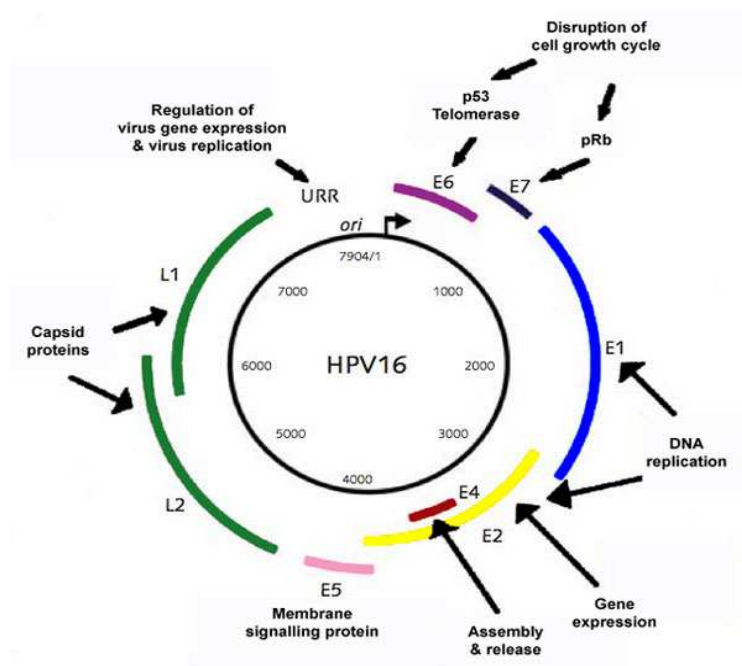
Izolati istog tipa HPV-a se nazivaju inačicama kada je razlika u slijedu njihovih nukleotida veća od 2% ili kada im se LCR područja razlikuju u slijedu barem 5%.²⁹ Različite inačice HPV 16, kao najvažnijeg tipa po rasprostranjenosti i ulozi u karcinogenezi, su povezane s različitim kliničkim ishodom.

Prvi izolirani nukleotidni slijed HPV 16 je identificiran u žene europskog porijekla i nazvan je europskim prototipom.^{39, 40} Ne-europske inačice i europske inačice s polimorfizmom 350 G su povezane s lošijim kliničkim ishodom, odnosno s povišenim rizikom za progresiju prema cervikalnoj intraepitelnoj leziji visokog stupnja^{41, 42} i invazivnom karcinomu.^{30, 43, 44}

1.3.2 Genom HPV

Virion HPV-a sadrži cirkularnu dvolančanu DNA, obavijenu proteinskim omotačem – kapsidom. Samo jedan lanac služi kao predložak za transkripciju.

Genom HPV-a ima 7900 parova baza (bp – base pairs) odnosno osam dijelova (open reading frames - ORF) organiziranih u tri funkcijska područja: rano (E – early), kasno (L – late) i regulatorno, nekodirajuće područje (LCR – long control region).⁴⁵ (Slika 5)



Slika 5. Genom HPV. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.] Dostupno na: <https://bioofcancer.wordpress.com/2013/03/31/hpv-and-cancer/>

Produkti transkripcije kasnog područja (L1 i L2) su veliki i mali strukturni protein omotača. Kapsida je sastavljena od 72 pentamera L1 (veliki strukturni proteini čine 80-90% svih proteina kapside) i oko 12 molekula L2.

Prazne kapside, sastavljene samo od proteina L1 ili kombinacije proteina L1 i L2, a bez nukleinske kiseline se nazivaju Virus Like Particles – VLP.⁴⁶ VLP izazivaju snažan imuni odgovor posredovan neutralizirajućim protutijelima te su temelj razvoja cjepiva.^{47, 48} L1 je najsačuvanije područje genoma i stoga je tijekom posljednjih 15 godina upravo to područje korišteno pri otkrivanju novih tipova virusa. L2 protein osim svoje strukturne uloge pridonosi interakciji virusa sa staničnim receptorima na površini, olakšava prijenos virusa do stanične jezgre kroz citoplazmu i pojačava infektivnost virusa.

Geni ranog područja (E) reguliraju virusnu transkripciju, replikaciju i interakciju s genomom domaćina. Većina humanih papiloma virusa ima šest različitih E gena: E1, E2, E4, E5, E6 i E7.⁴⁹ Prepisivanjem ovih gena, nastaju proteini s različitim funkcijama:

E1 je protein neophodan za virusnu replikaciju, veže se na specifično vezno mjesto (origin of replication) i formira heksamerne komplekse uz pomoć E2. Nastali kompleks ima ATP-aznu i helikaznu aktivnost i započinje odmotavanje DNA, formirajući predložak za sintezu virusne DNA.⁵⁰

E2 je protein koji služi kao glavni regulator transkripcije za virusne promotore smještene primarno na LCR. Sastoji se od tri dijela. Prvi dio se veže na LCR, povezan je središnjim dijelom s trećim koji je esencijalan za regulaciju transkripcije i replikacije virusne DNA kroz interakciju s proteinom L1.⁵¹ Niske razine E2 proteina aktiviraju transkripciju virusne DNA, dok visoke razine djeluju kao represori

mehanizmom negativne povratne sprege snižavajući razinu E6 i E7 proteina.⁵² E2 također ima veliku ulogu u odvajanju novonastale virusne DNA i njezinom jednolikom raspoređivanju unutar stanica kćeri.⁵³

E4 protein primarno je izražen u kasnijoj fazi virusne infekcije. Funkcija E4 proteina je olakšavanje otpuštanja novonastalih viriona u okolinu zaražene stanice razdrom intermedijarnih filamenta njezinog citoskeletona.⁵⁴ E4 protein sudjeluje u zadržavanju stanica u G2 fazi staničnog ciklusa, te inhibicijom sinteze stanične DNA omogućuje pojačano umnožavanje virusne DNA.⁵⁵

E5 je mali protein koji pridonosi procesu karcinogeneze pojačavajući imortalizirajući potencijal E6 i E7 proteina.⁵⁶ Uz to, inhibira intercelularnu komunikaciju i na taj način onemogućava homeostatsku kontrolu okolnih zdravih stanica nad transformiranim stanicama.

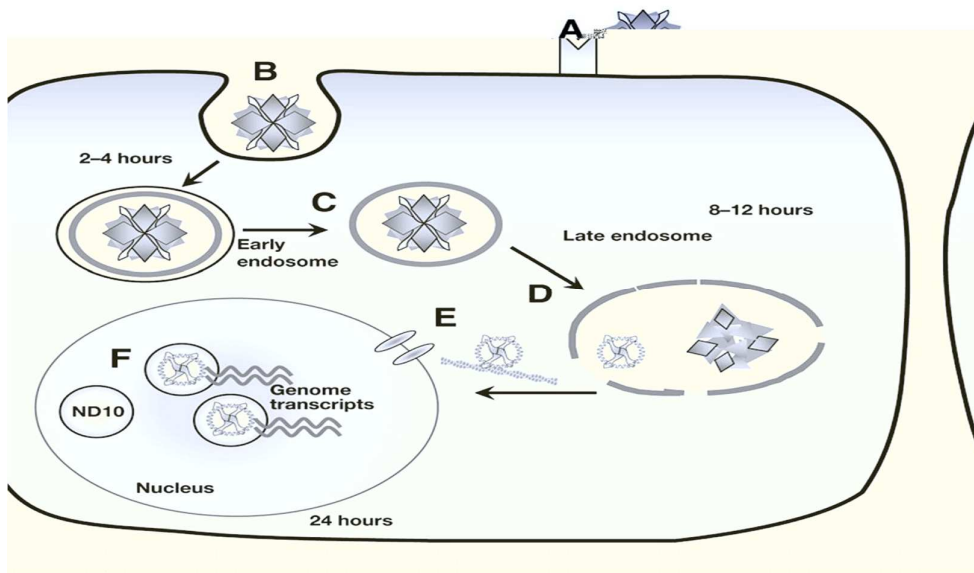
E6 je protein s višestrukim funkcijama, ali njegova najvažnija uloga je posredovanje u degradaciji tumor supresorskog gena p53. Na taj način zaustavlja apoptozu induciranu s p53, ukidajući sposobnost stanice da planiranom smrću odgovori na oštećenje DNA.⁵⁷ E6 djeluje i na ostale stanične proteine, mijenjajući nekoliko metaboličkih mehanizama. Njegovim djelovanjem dolazi do povišenih razina telomerase što omogućava stanicama da se neograničeno dijele.⁵⁸

E7 je protein čija je primarna funkcija inaktivacija pRb tumor supresorskih proteina i onemogućavanje normalnog staničnog odgovora apoptozom na oštećenje DNA.⁵⁹ Interakcijom s regulatorima staničnog ciklusa dovodi do nekontrolirane stanične diobe i proliferacije. Destabilizacijom centrosome dovodi do mitotskih grešaka i nestabilnosti genoma.⁶⁰

LCR ili URR (Upstream Regulatory Region) je područje važno za regulaciju virusnog umnožavanja i transkripcije virusnih gena. Sadrži DNA replication origin (ishodište replikacije virusne DNA), regulatorne sekvence transkripcije i jedan ili više promotora koji reguliraju ekspresiju virusnih onkoproteina E6 i E7.

1.3.3 Mehanizam infekcije i karcinogeneza

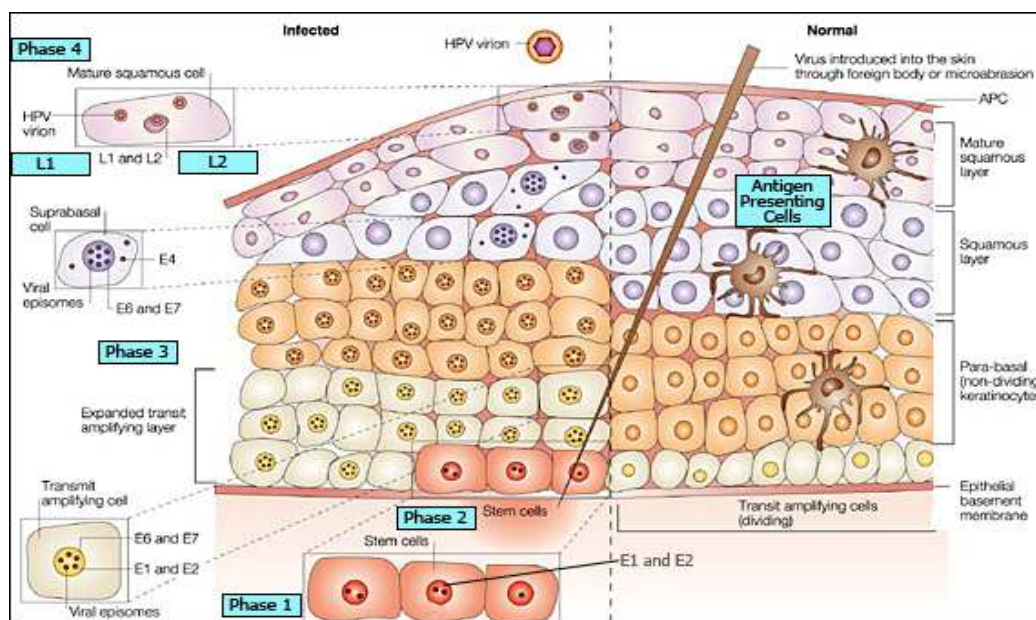
Humani papiloma virusi su epiteliotropni virusi i njihov životni ciklus je ograničen na tkivo u kojem se umnažaju. Imaju jedinstveni obrazac infekcije koji je ograničen na stanice epitela u bazalnom sloju. Nakon mikrotraume epitela, bazalna membrana ostaje ogoljena te se virus veže preko L1 kapsidnog proteina na dijelove membrane koji sadrže heparan sulfat proteoglikane (HSPG). Tada dolazi do konformacijske promjene, proteolize L2 kapsidnog proteina i vezanja L1 proteina na receptore s površine epitelnih stanica koje su u međuvremenu prekrile nastalu mikrotraumatsku ranu.^{61, 62} Papiloma virusi su jedini poznati virusi koji započinju proces infekcije izvan stanice. Nakon vezanja za stanični receptor, dolazi do internalizacije i endocitoze virusa posredovane heterotetramernim aneksinom A2/S100A10 (A2t).⁶³ Virus se u endosomu oslobađa svoje ovojnice i njegova DNA u kompleksu s L2 proteinom izlazi iz endosoma, preko mreže citoplazmatskih mikrotubula dolazi do stanične jezgre i smješta se u subnuklearno područje ND10, gdje započinje virusna transkripcija.⁶⁴ Cjelokupni proces je iznimno spor, traje 12-24 sata.⁶⁵ (Slika 6)



Slika 6. Mehanizam infekcije HPV-om. Preuzeto iz: Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. Gynecol Oncol. 2010 Jun; 118(1 Suppl): S12–S17. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004

Nakon uspješne infekcije epitelnih stanica bazalnog sloja, dolazi do sofisticirane transkripcijske kaskade. U zaraženim stanicama virus ostaje u malom broju, 10-200 kopija po stanici.⁶⁶ U donjim slojevima epitela dolazi do transkripcije E1 i E2 proteina koji održavaju virusnu DNA u episomalnom obliku⁵⁰ te olakšavaju ispravno odvajanje virusnog genoma od genoma domaćina. E6 i E7 proteini održavaju stanice u proliferacijskoj S-fazi, sprječavajući njihovu terminalnu diferencijaciju. E7 se veže na pRb, protein koji u normalnim uvjetima regulira stanični ciklus sprječavajući stanice da uđu u S-fazu. Inhibirajući funkciju pRb proteina, E7 stimulira staničnu proliferaciju.⁵⁹ Također, E6 sprječava staničnu apoptozu posredovanu s p53.⁵⁷ Smatra se da je predisponirajući faktor u nastanku karcinoma upravo djelovanje E6 proteina kojim dolazi do destabilizacije domaćinove DNA.⁶⁰

U središnjim i gornjim dijelovima zaraženog epitela dolazi do pojačane ekspresije E1, E2, E4 i E5 proteina koji omogućavaju umnažanje virusnog genoma u velikom broju. Virusni genom se umnožava samo u stanicama koje su u S-fazi. Strukturni proteini L1 i L2 izraženi su u gornjim slojevima epitela. Nakon završetka umnažanja virusnog genoma i proizvodnje L1 i L2 proteina, dolazi do smještanja virusne DNA u proteinsku kapsidu, te otpuštanja novonastalih viriona u okolinu deskvamacijom stanica.⁶⁶ (Slika 7) Za razliku od ostalih virusa, HPV ne koristi litički proces kako bi uništio stanicu domaćina i omogućio otpuštanje novonastalih viriona u okolinu. Često litički proces izaziva upalu koja aktivira imunski odgovor protiv virusa. Papiloma virusi koriste prirodni mehanizam deskvamacije diferenciranih epitelnih stanica kao neupalni mehanizam otpuštanja i time izbjegavanju odgovor imunološkog sustava domaćina.



Slika 7. Shematski prikaz promjena uzrokovanih infekcijom virusom HPV-a u slojevima epitela. Preuzeto iz: Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006 Aug 31;24 Suppl 3: S3/1-10

Iako većina žena tijekom života bude zaražena HPV-om, samo se kod nekih razvijaju preinvazivne lezije i rak vrata maternice. Tijekom akutne infekcije, ekspresija virusnih gena je ograničena na već diferencirane stanice epitela koje nemaju mogućnost daljnje diobe i nastanka genotoksičnih mutacija.

Ključni elementi u progresiji produktivne infekcije u cervikalnu intraepitelnu leziju i u rak vrata maternice su integracija virusnog genoma u ljudsku DNA i deregulacija u ekspresiji virusnih onkoproteina E6 i E7 u stanicama bazalnog epitela.^{67, 68}

Integracija genoma HPV u ljudski DNA nije dio normalnog životnog ciklusa virusa. Mehanizmi integracije još nisu u potpunosti razjašnjeni. Prema mnogim studijama, nisu svi dijelovi virusnog DNA integrirani u ljudski genom – E1, E6 i E7 su integrirani u cijelosti, dok E2, E4 i E5 nedostaju.^{69, 70} Integracija virusnog DNA najčešće se događa na mjestima u genomu domaćina u kojima postoji defekt nastao tijekom popravka DNA – Double Strand Breaks (DSBs). Na tim mjestima, nazvanim Chromosome Fragile Sites (CFS) postoji nestabilnost DNA i raspoređena su kroz cijeli genom. Istraživanja su potvrdila povišenu učestalost integracije DNA HPV tipova visokog rizika u područjima koja sadrže CFS.⁷¹⁻⁷³

Nejasno je da li je povećana učestalost virusne integracije u područjima s CFS rezultat genske nestabilnosti uzrokovane prekomjernom ekspresijom E6 i E7 virusnih onkoproteina, ili domaćinova DNA sadrži sekvence koje povećavaju mogućnost integracije.^{74, 75}

Do sada je identificirano preko 190 mjesta gdje se odvija integracija u domaćinovom genomu, raspršena su nasumce kroz cijeli genom. Potvrđeno je da su predilekcijska mjesta za integraciju područja koja sadrže CFS.⁷³

Prekomjerna ekspresija E6 i E7 proteina neophodna je za malignu progresiju. E6 posreduje u degradaciji tumor supresorskog gena p53 koji regulira zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu induciranu neuspješnim popravkom oštećenja DNA. E6 aktivira ekspresiju hTERT, katalitičku podjedinicu telomerase. E7 inaktivira retinoblastom protein – pRb, tumor supresorski protein, oslobađa ga iz kompleksa s transkripcijskim faktorom E2F i na taj način potiče transkripciju gena i ulazak u S-fazu staničnog ciklusa te stimulira staničnu proliferaciju.

Zajedničkim učinkom ova dva onkoproteina preuzimaju kontrolu nad staničnim ciklusom, izazivaju tešku gensku nestabilnost i nekontroliranu proliferaciju što vodi k malignoj transformaciji.

Također, oblik virusne DNA (episomalna ili integrirana) ima ulogu u regulaciji transkripcije. E2 u visokim razinama potiskuje E6 i E7 onkoproteine i besmrtnost stanica uzrokovanu njihovom prekomjernom ekspresijom. Gubitak E2 nakon integracije pridonosi nekontroliranom staničnom rastu i malignoj progresiji.^{76, 77}

1.4 Dijagnostičke metode

Primarne dijagnostičke metode u otkrivanju premalignih lezija i raka vrata maternice su citologija i histologija. Manjkavost citologije, odnosno PAPA testa je niska specifičnost zbog čega je potrebno često ponavljati pretragu, što je financijski i organizacijski ograničavajući čimbenik. Zahvaljujući napretku tehnologije, razvijene se brojne molekularne dijagnostičke metode za detekciju virusne DNA koje imaju visoku osjetljivost, ali i negativnu prediktivnu vrijednost te se na taj način produljuje period između dva pregleda i pojednostavljuje proces praćenja i liječenja

pacijentica. Zbog toga se preporuča uvrštavanje ovih metoda u programe probira za rano otkrivanje raka.

1.4.1 Metode molekularne dijagnostike

HPV se ne može uzgojiti u konvencionalnim staničnim kulturama. Prve metode za otkrivanje HPV su opisane prije 20-ak godina, a kao prva upotrijebljena polimerazna lančana reakcija (Polymerase Chain Reaction - PCR).

PCR je biokemijska metoda koja omogućava umnažanje malih količina specifične DNA u nekoliko milijuna kopija koje se koriste za daljnju analizu. Korištene su generičke početnice (primeri) koje odgovaraju L1 području genoma HPV: MY09/11, GP5+/6+.⁷⁸

Danas je dostupno više komercijalnih testova koji se mogu podijeliti u nekoliko skupina:

- 1) testovi koji detektiraju HPV-HR
- 2) testovi koji detektiraju HPV-HR uz istovremeno tipiziranje samo HPV 16 i HPV 18
- 3) testovi koji vrše tipizaciju
- 4) in situ hibridizacija

Glavni predstavnik testova iz prve skupine je Hybrid Capture II -HC II (Digene). To je signal amplifikacijska metoda temeljena na hibridizaciji ciljne HPV-DNA s dva različita koktela označenih RNA proba za HPV visokog rizika (tipovi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68) i HPV niskog rizika (tipovi 6, 11, 42, 43, 44) u tekućem

mediju. Nastali DNA-RNA hibridi se potom detektiraju specifičnim monoklonskim protutijelima označenim kemiluminiscentnom tvari, što ujedno omogućava semikvantitativno određivanje količine HPV-DNA prema intenzitetu kemiluminiscencije. HC II ne omogućava identifikaciju specifičnih tipova HPV (genotipizaciju) već samo daje informaciju da li je HPV iz skupine visokog rizika prisutan. Studije koje su uspoređivale HC II i PCR su dokazale da je HC II manje osjetljiva metoda i da križna reaktivnost između proba iz dva koktela može smanjiti klinički značaj pozitivnog rezultata testa.^{79, 80} Kako bi umanjili ovu negativnu stranu HC II i povećali osjetljivost, razvijena je nova metoda HC III (Hybrid Capture III) koja koristi RNA probe s biotiniliziranim oligonukleotidima usmjerenim na područja s jedinstvenim nukleotidnim slijedom unutar ciljanog dijela genoma.⁸¹ Ove dvije metode imaju gotovo jednaku specifičnost, dok HC III ima nešto veću osjetljivost.

Ostali testovi iz ove skupine kvalitativnih testova su Amplicor HPV test (Roche Molecular Systems) i Cervista HPV HR Test (Hologic). Amplicor HPV Test detektira također 13 tipova HPV iz skupine visokog rizika kao i HC II, ali se bazira na PCR tehnologiji. Cervista HPV HR test je također signal amplifikacijska metoda, te kao i HC II ima dozvolu američke FDA (Food and Drug Administration) za detekciju HPV-HR kao dodatna metoda u probiru za rak vrata maternice u žena iznad 30 godina u Sjedinjenim Američkim Državama.^{82, 83} Ova dva testa, kao i HC II izražavaju rezultat testa na HPV iz visokorizične skupine kao pozitivan ili negativan.

U drugu skupinu testova spadaju testovi koji uz kvalitativnu detekciju 13 do 14 visokorizičnih tipova HPV vrše i istodobnu tipizaciju HPV 16 i HPV 18. Tu spadaju Abbott RealTime High Risk HPV Test (Abbott Molecular), Cobas 4800 HPV Test (Roche Molecular Diagnostics) i Cervista HPV 16/18 Test (Hologic). Abbott RealTime High Risk HPV Test i Cobas 4800 HPV Test se temelje na real-time PCR

tehnologiji. Oba vrše individualnu tipizaciju HPV 16 i HPV 18 te zajedničku detekciju ostalih HPV-a iz skupine visokog rizika.

Polimerazna lančana reakcija (Polymerase Chain Reaction - PCR) pomoću enzima polimeraze umnožava ciljani dio DNA (target amplification) pomoću izabranih začetnica (primera) čime se osigurava visoka specifičnost testa. Ciljani dio DNA se ciklički umnožava kroz 30 do 40 ciklusa te se od malih količina DNA dobiva količina virusnog DNA dovoljna za daljnju analizu. Time se postiže visoka osjetljivost testa.⁸⁴ Testovi iz treće skupine koriste upravo PCR metodu za tipizaciju HPV tipova visokog rizika. Kako bi se u jednom testu moglo tipizirati više tipova HPV-HR koriste se generičke začetnice (primeri) usmjerene na L1 područje u genomu HPV (začetnici MY09/11, GP5+/6+, SPF10). Najčešće korišteni testovi za HPV genotipizaciju se temelje na principu reverzne line-blot hibridizacije – GP5+/6+ RLB Genotyping Assay.⁸⁵ Jedan od testova u najširoj upotrebi je INNO-LiPA HPV Genotyping Assay, kojim se umnožava dio DNA dug 65 kb u L1 području pomoću biotiniziranog SPF10 začetnika nakon čega slijedi hibridizacija s HPV specifičnim oligonukleotidnim probama koje se potom imobiliziraju na nitroceluloznoj membrani. Ovaj je test pokazao znatno veću osjetljivost u detekciji infekcije multiplim tipovima HPV-a u odnosu na Digene HPV Genotyping RH Test RUO.⁸⁶ Uz ovaj test, postoji i Linear Array HPV Genotyping Test koji kombinira umnožavanje pomoću PCR i reverznu line-blot hibridizaciju za identifikaciju 36 tipova HPV.

In situ hibridizacija je metoda koja omogućava pouzdanu detekciju HPV na mjestu patoloških lezija, odnosno detekcija HPV se odvija unutar jezgre zaražene stanice a ne u mediju. Rezultat hibridizacije evaluira se mikroskopski, prikazuje se odgovarajući precipitat unutar jezgre stanice indikativan za HPV.

Osim ovih opisanih testova koji detektiraju virusnu DNA, postoje i testovi koji detektiraju virusnu RNA, ali nisu još u široj upotrebi. Ovi testovi mogu biti od kliničkog značaja. To se prvenstveno odnosi na testove koji detektiraju transkripte virusnih onkoproteina E6 i E7. Virusna RNA može se detektirati metodom reverzne transkriptaze real-time PCR ili metodom NASBA (nucleic acid sequence-based amplification). Trenutno postoje tri komercijalna testa za detekciju E6/E7 transkripata: PreTect HPV-Proofer, NucliSENS EasyQ HPV V1 Assay i APTIMA HPV Assay.^{87, 88}

1.4.2 Konvencionalni PAPA test i tekućinska citologija (Liquid Based Cytology – LBC)

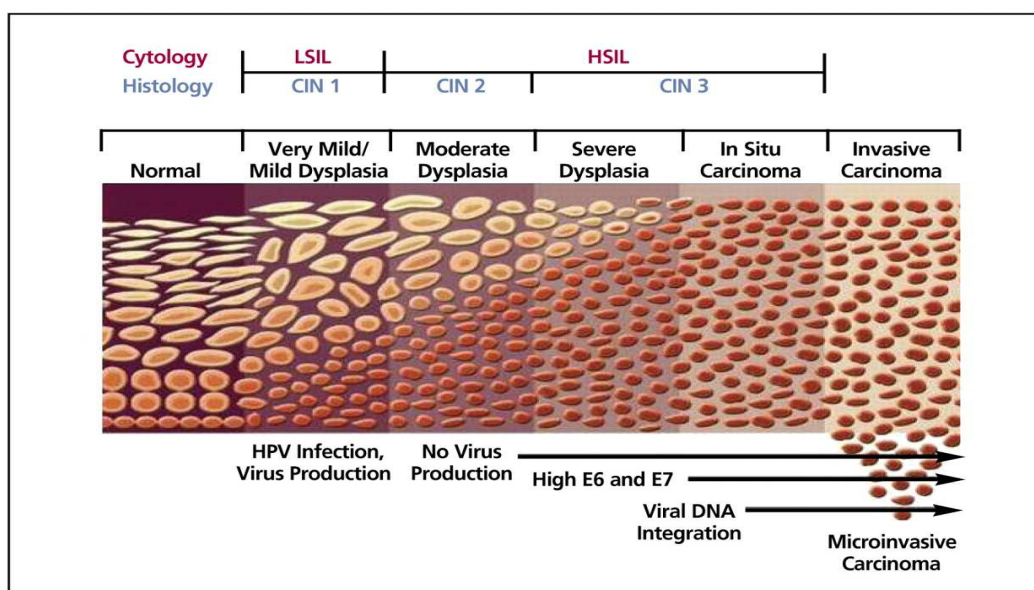
Citologija kao metoda probira je tijekom zadnjih 35 godina bitno doprinijela padu incidencije i mortaliteta od raka vrata maternice. Dvije su tehnike citološkog probira: konvencionalni PAPA test i tekućinska citologija (Liquid Based Cytology – LBC). Obje su metode prihvatljive u probiru. Prednosti tekućinske citologije su veća isplativost i mogućnost naknadnog testiranja na HPV.⁸⁹⁻⁹¹ Glavna zamjerka tekućinskoj citologiji je manja specifičnost te je stoga u našoj zemlji konvencionalni PAPA test, uz histološku analizu i dalje ostao “zlatni standard” u dijagnostici preinvazivnih lezija i raka vrata maternice.

PAPA test je skraćenica od Papanicolaou test, po američkom citologu grčkog podrijetla koji je 1943. godine inaugurirao ovu metodu. Postoji više klasifikacijskih metoda za procjenu PAPA testa. Uz originalnu klasifikaciju WHO, u široj je upotrebi Bethesda sistem (The Bethesda System) usvojen prvi put 1988. godine u američkom gradu Bethesda, revidiran do sada dva puta, 1991. i 2001. godine. U

Hrvatskoj se za procjenu PAPA testa koristi Bethesda sistem, odnosno citološki obrazac Zagreb 2016, nastao suradnjom svih citoloških laboratorija na području Hrvatske, na temelju ranijih obrazaca Zagreb 1990 i 2002.^{92, 93}

Prema ovom obrascu abnormalni citološki nalazi pločastih stanica se označavaju sa SIL (squamous intraepithelial lesion). Skvamozna intraepitelna lezija može biti niskog stupnja (LSIL – low grade squamous intraepithelial lesion) i visokog stupnja (HSIL - high grade squamous intraepithelial lesion) i po pravilu odgovara patohistološkim dijagnozama CIN (cervical intraepithelial neoplasia) odgovarajućeg stupnja.

LSIL odgovara patohistološkoj dijagnozi CIN I, a HSIL odgovara dijagnozama CIN II, CIN III i Ca in situ (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz usporedbe citološke i histološke klasifikacije promjena uzrokovanih HPV. Preuzeto iz: Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Clin Invest. 2006;116(5):1167-73.

Citološke karakteristike poput povećanja jezgre, visokog omjera jezgra-citoplazma, gubitak polariteta stanica, nepravilna jezgrina membrane te povišeni broj mitoza su prisutne u svim slojevima epitela u intraepitelnim lezijama visokog stupnja.

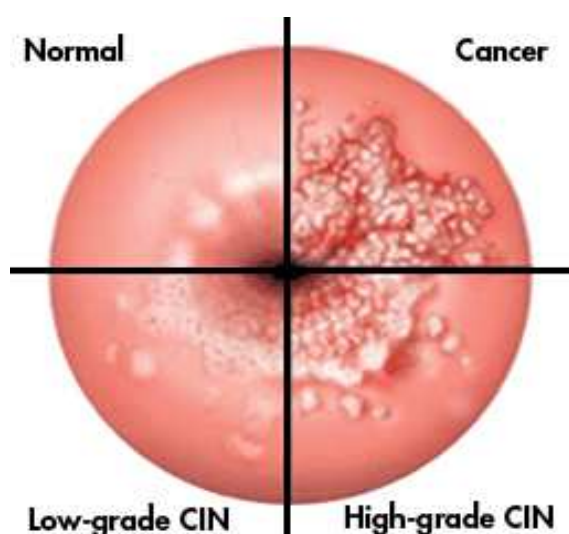
Manjkavost PAPA testa je njegova niska osjetljivost koja je između 50%- 80% za pojedini test. Osjetljivost PAPA testa za lezije CIN II i više je samo oko 50%. Serijsko ponavljanje PAPA testova povećava osjetljivost ove metode na 90%.⁹⁴ Relativno dugi period prelaska HSIL prema karcinomu kompenzira nisku osjetljivost PAPA testa, omogućavajući postavljanje ispravne dijagnoze ponavljanjem nekoliko testova u relativno kratkom intervalu.

Zbog niske osjetljivosti PAPA testova, predlaže se uvođenje dodatnih dijagnostičkih metoda detekcije visokorizičnih tipova HPV u programe probira. Kombinacija citološkog probira i HPV-HR testa pokazuje veću osjetljivost, ali nižu specifičnost, kao i veće troškove.⁹⁵ Zbog toga se dodatno testiranje na HPV-HR preporuča kod žena u dobnoj skupini iznad 30 godina, obzirom da je učestalost prolaznih infekcija u mlađoj životnoj dobi izuzetno visoka. LSIL u dobnoj skupini 18-22 godine regredira u 61%, odnosno 91% slučajeva u periodu od 1, odnosno 3 godine, a svega 3% lezija progredira do CIN III.⁹⁶

1.4.3 Kolposkopija

Kolposkopija je metoda vizualne inspekcije vrata maternice pomoću instrumenta – binokularnog mikroskopa koji omogućava povećanje slike 6-40 puta pod jakim osvjetljenjem. Ovu metodu je razvio njemački liječnik Hinselman još 1925. godine, a danas je standardni dio evaluacije vrata maternice žena s abnormalnim nalazom

PAPA testa.⁹⁷ Glavni cilj kolposkopije je pregled transformacijske zone na vratu maternice jer je upravo to najčešće područje nastanka prekanceroznih promjena i raka vrata maternice. Prednost kolposkopije je mogućnost ciljane biopsije detektiranih promjena. Kolposkopija je dijagnostička metoda koja se koristi u diferencijalnoj dijagnozi abnormalnog citološkog nalaza, nije prikladna u primarnom probiru raka vrata maternice. Makroskopske promjene vidljive kolposkopom se opisuju kao acetobijeljenje, mozaik, punktacije, nepravilni rub te atipične krvne žile.



Slika 9. Prikaz stupnja kolposkopski vidljivih promjena na vratu maternice. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.]. Dostupno na: <https://www.kkh.com.sg/patient-care/conditions-treatments/cervical-cancer-surgery>

Stupanj ovih promjena može biti blagog karaktera (G1 – minor changes) i grubog karaktera (G2 – maior changes) (Slika 9), a za njihovu procjenu se preporučuje koristiti kolposkopski obrazac “Rio de Janeiro/Zagreb 2011”.⁹⁸

Poznavanje citološkog nalaza poboljšava identifikaciju grubih (G2) kolposkopskih promjena koje odgovaraju cervikalnim intraepitelnim lezijama visokog stupnja.⁹⁹

Osjetljivost citologije u otkrivanju lezija visokog stupnja je 36-47%, kolposkopije 62-72%, a kombinacija citologije i kolposkopije poboljšava dijagnostičku osjetljivost za lezije visokog stupnja na 70-80%, što znači da još uvijek 20-30% tih lezija ostane neotkriveno.¹⁰⁰ Stoga svim ženama s abnormalnim citološkim nalazom treba učiniti kolposkopiju.

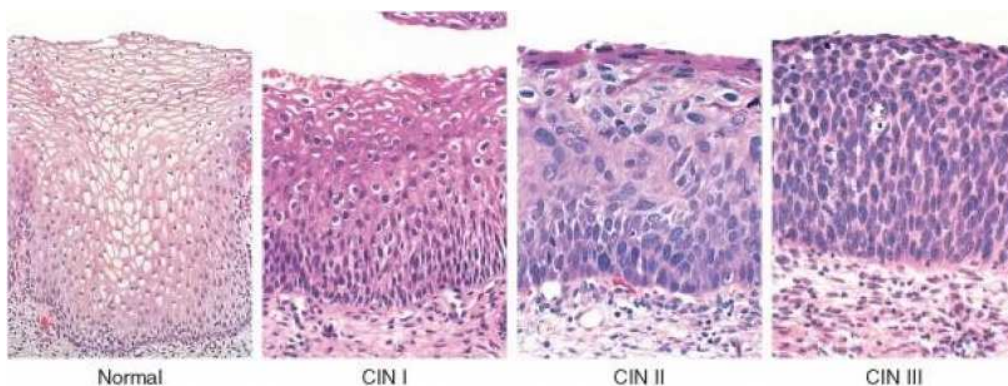
1.5 Kliničke manifestacije i liječenje

1.5.1 Preinvazivne lezije

Cervikalna intraepitelna lezija je premaligna promjena vrata maternice koja nastaje zbog kronične infekcije visokorizičnim tipovima HPV, a očituje se abnormalnim rastom pločastih stanica cervikalnog epitela. Ukoliko se ne liječe, cervikalne intraepitelne lezije visokog stupnja (HSIL), tijekom vremena (5-10 godina) u oko 30% slučajeva progrediraju u karcinom.¹⁰¹

Pacijentice s cervikalnom intraepitelnom lezijom nemaju specifičnih kliničkih simptoma. Zbog abnormalnog nalaza PAPA testa, pacijentice se upućuju na kolposkopiju, tijekom koje se abnormalnosti epitela mogu vizualizirati, a definitivna dijagnoza se postavlja nakon biopsije i histološke verifikacije nalaza.

Termin cervikalna intraepitelna neoplazija je uveden 1968. godine, kada je uvedena i svjetski prihvaćena klasifikacija.¹⁰² Stupanj cervikalne intraepitelne neoplazije se postavlja na temelju debljine zahvaćenosti epitela i postoje 3 stupnja. (Slika 10)



Slika 10. Histološka slika različitih stupnjava cervikalna intraepitelne neoplazije. Preuzeto iz: Sattar HA. Female Genital System and Breast. U: Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology: with STUDENT CONSULT. 10. izd. London: Elsevier Health Sciences; 2017.

CIN I (blaga cervikalna intraepitelna neoplazija) se odnosi na promjene ograničene na donju trećinu epitela.

CIN II (umjerena cervikalna intraepitelna neoplazija) se odnosi na promjene koje obuhvaćaju donje dvije trećine epitela.

CIN III (teška cervikalna intraepitelna neoplazija) se odnosi na promjenu koja obuhvaća više od dvije trećine epitela, može obuhvaćati epitel cijelom njegovom debljinom. Promjena koja obuhvaća epitel cijelom debljinom naziva se CIS (Carcinoma in situ).

Nova klasifikacija uvodi pojmove skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja (LSIL) u koju spadaju ASC-US i CIN I te skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja (HSIL) u koju spadaju CIN II, CIN III i CIS.¹⁰³ Smatra se da ta klasifikacija bolje zadovoljava kliničke potrebe i vjerodostojnije odražava prirodni tijek bolesti.

Mogućnost prelaska cervikalne intraepitelne lezije u karcinom ovisi o stupnju lezije.¹⁰⁴ CIN I u preko 50% slučajeva regredira, a tek u 1% progredira u invazivni karcinom. CIN II progredira u karcinom u oko 5% slučajeva.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Cervikalna intraepitelna lezija se najčešće dijagnosticira kod žena dobi 25-35 godina, ali može nastati u bilo kojoj dobi. Rizični faktori za nastanak bolesti su rano stupanje u seksualne odnose, veći broj partnera, imunosupresija zbog neke druge bolesti ili liječenja, HIV-infekcija te pušenje. Skvamozna intraepitelna lezija je čest problem žena reproduktivne dobi, stoga je njegovo adekvatno liječenje kritična komponenta rješavanja tog problema. Neadekvatno liječenje povećava rizik od karcinoma, ali i posljedica liječenja u smislu komplikacija u kasnijim trudnoćama (insuficijencija cerviksa povezana s kasnim spontanim pobačajima i prijevremenim porođajima).^{108, 109}

Histološka dijagnoza skvamozne intraepitelne lezije ukazuje na prisutnost lezije koja bi mogla progredirati u karcinom ukoliko se ne liječi. Lezije niskog stupnja u 60-70% slučajeva regrediraju u roku od 2 godine,¹⁰⁷ a lezije visokog stupnja posjeduju visoki potencijal progresije u invazivni karcinom i uvijek zahtijevaju liječenje.¹⁰⁹

Temeljni princip liječenja je uklanjanje transformacijske zone što se postiže destrukcijom ili ekscizijom,¹¹⁰ a stope izlječenja su vrlo visoke.¹¹¹

Cochrane analiza 29 randomiziranih kontroliranih studija navodi regresiju lezija visokog stupnja u 77-98% slučajeva.¹¹²

Destrukcijske metode liječenja su radikalna elektrokoagulacija, dijatermokoagulacija, laserska vaporizacija, krioterapija i hladna koagulacija.¹⁰⁹ Jedinstveni princip svih ovih metoda je uništenje kompletne transformacijske zone do dubine oko 7 mm.¹¹⁰

Ekscizijske metode su konizacija hladnim nožem, laserska ekscizija i ekscizija transformacijske zone električnom omčicom (LLETZ – Large Loop Excision of Transformation Zone).^{109, 110, 113} Prednost ekscizijskih metoda je mogućnost histološke analize oboljelog tkiva. Stopa inkompletne ekscizije iznosi 3-7%,^{114, 115} a histološka potvrda kompletne ekscizije ne isključuje pojavu ostatne bolesti, stoga je neophodno redovito praćenje svake pacijentice nakon liječenja.

Većina recidiva nastupa unutar dvije godine nakon liječenja.¹¹⁶ Incidencija invazivnog karcinoma cerviksa u žena liječenih od CIN-a ostaje i do 10 puta veća tijekom najmanje sljedećih 20 godina nakon liječenja, zbog čega se preporuča učestaliji nadzor ovih pacijentica.¹¹⁷

1.5.2 Rak vrata maternice

Unatoč mogućnostima rane prevencije rak vrata maternice i dalje predstavlja važan zdravstveni problem. Karcinom je moguće spriječiti pravovremenim postavljanjem dijagnoze i liječenjem preinvazivne bolesti. Većina žena s rakom vrata maternice u ranom stadiju može biti izliječena, iako je dugotrajni morbiditet značajan.¹¹⁸

Perzistentna infekcija onkogenim tipovima HPV uzrokuje gotovo sve slučajeve karcinoma. HPV DNA je detektirana u 99,7% uzoraka karcinoma.¹¹⁹ Četiri su glavna koraka u razvoju karcinoma vrata maternice: infekcija metaplastičnog epitela transformacijske zone, virusna perzistencija, progresija prema prekanceroznim lezijama i invazija bazalne membrane.¹²⁰ Infekcija je česta u mladih žena, no perzistira tek u 10% slučajeva. Invazivni karcinom nastaje tijekom nekoliko godina

u manjeg broja žena s prekanceroznim lezijama, a najveći broj žena je dobi 35-55 godina starosti, što ukazuje na vrlo spori nastanak i progresiju bolesti.^{120, 121}

Rizični faktori za nastanak karcinoma, uz perzistentnu infekciju visokorizičnim tipovima HPV-a kao glavnim faktorom su: rano stupanje u seksualne odnose (dob manja od 16 godina), veći broj seksualnih partnera (više od 4), niski socioekonomski status, imunosuprimiranost zbog neke druge bolesti ili liječenja, prethodno liječenje genitalnih bradavica te pušenje (aktivno i pasivno) kao nezavisni faktor.¹²⁰ Karcinogeni iz duhana i policiklički aromatski ugljikohidrati su pronađeni u cervikalnom epitelu žena koje puše.¹²²

Histološki, u oko 80% slučajeva se radi o karcinomima pločastog epitela koji nastaju iz preegzistirajućih displazija.^{118, 119} Adenokarcinom čini oko 15-20% slučajeva karcinoma. U regijama svijeta s dobro organiziranim programima probira doima se da udio adenokarcinoma raste, pretpostavlja se da je to posljedica kvalitetnijeg uzimanja uzoraka i boljeg prepoznavanja prekursorskih lezija u odnosu na zemlje u kojima je probir loše organiziran.^{120, 123} Rjeđe zastupljeni histološki tipovi su adenoskvamozni karcinom i karcinom malih stanica.

Najčešći simptom zbog kojeg se pacijentice javljaju na pregled je vaginalno krvarenje, vrlo često postkoitalno. Pacijentice u uznapredovaloj fazi bolesti mogu imati iscjedak neugodnog mirisa, gube na težini ili imaju opstruktivnu uropatiju.¹²⁴ Većina žena s rakom vrata maternice ipak ima dugi asimptomatski period tijekom kojeg se karcinom uglavnom otkrije putem abnormalnog nalaza PAPA testa.

Sve pacijentice s rakom vrata maternice treba detaljno pregledati. Uz ginekološki pregled u spekulima je neophodan i digitorektalni pregled u anesteziji od strane dvoje subspecijalista ginekološke onkologije radi procjene zauzetosti parametrija.

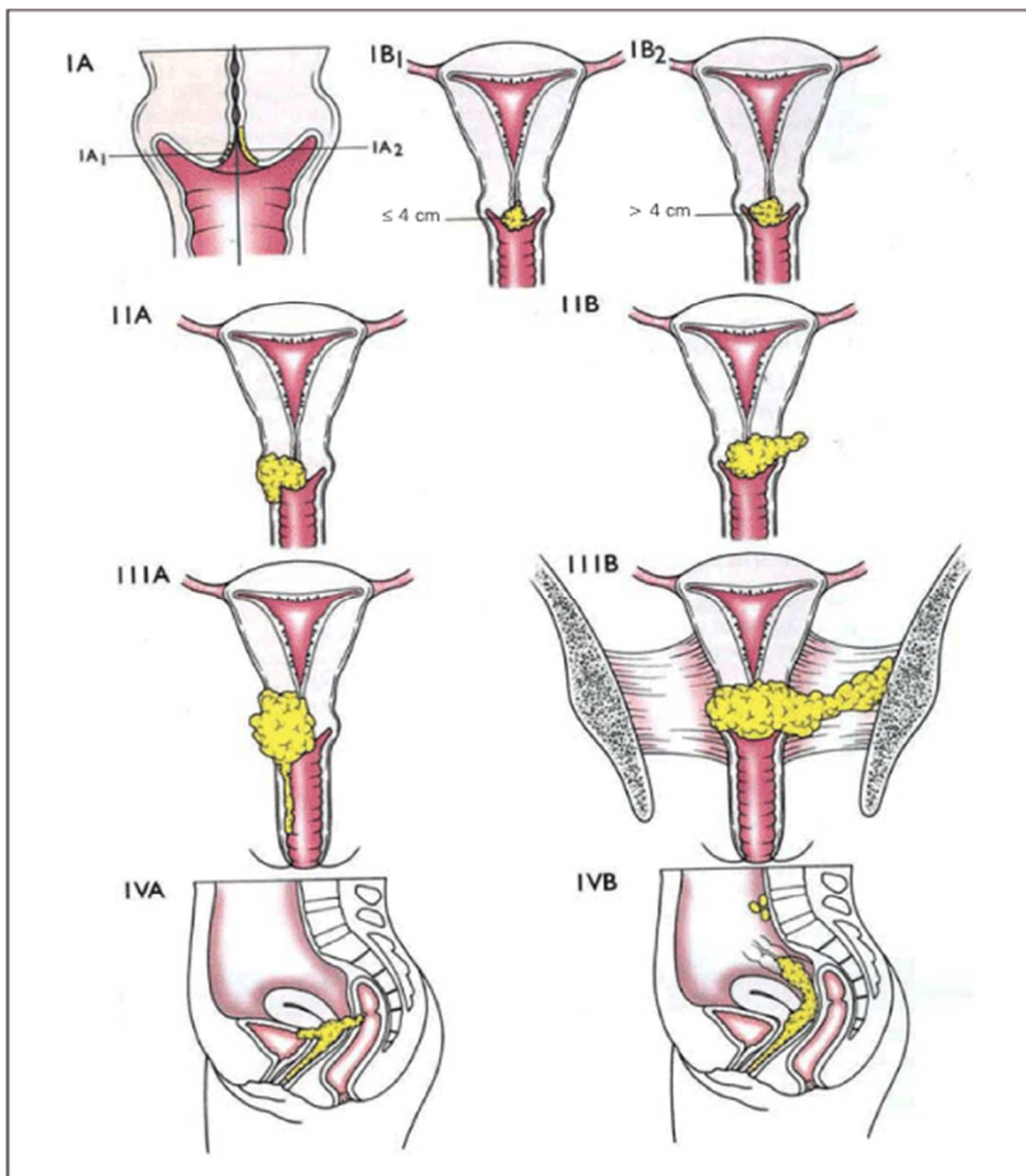
Ukoliko tumor nije vidljiv makroskopski, neophodno je učiniti kolposkopiju i biopsiju i dobiti patohistološku potvrdu dijagnoze. Ukoliko postoji sumnja na mikroinvaziju potrebno je učiniti konizaciju.¹¹⁸

Rak vrata maternice svrstava se u kliničke stadije prema FIGO sistemu, čija je modifikacija iz 1994. godine olakšala stupnjevanje mikroinvazivnog karcinoma (IA1 i IA2), te podjelu IB grupe u dvije kategorije.^{118, 125} (Tablica **Error! Reference source not found.** 3, Slika 11) Stadij se određuje kod primarnog postavljanja dijagnoze i ne smije se mijenjati zbog naknadnih nalaza dobivenih proširenom obradom (UZV, PET/CT, MRI) ili zbog uznapredovalijeg stadija ustanovljenog tijekom operacije.¹¹⁸ Stadij se utvrđuje na temelju veličine tumora na vratu maternice i njegovog širenja u parametrije.¹¹⁸

Tablica 3. FIGO klasifikacija raka vrata maternice

IA	IB	II	III	IV
Lezije dijagnosticirane mikroskopski, nisu vidljive golim okom	Lezije kod kojih je dubina invazije > 5 mm	Karcinom se širi izvan cerviksa ali ne dopire do zida zdjelice	Karcinom se širi do zida zdjelice, donje 1/3 rodnice, sve pacijentice s hidronefrozom ili afunkcionalnim bubregom	Karcinom se širi na bliske i udaljene organe
IA1 dubina invazije < 3 mm	IB1 tumor ≤ 4 cm	IIA karcinom se širi u rodnicu, ali ne dopire do donje 1/3	IIIA karcinom se širi u donju 1/3 rodnice	IVA karcinom se širi na priležeće organe (mjehur, rektum)
IA2 dubina invazije 3-5 mm, horizontalno dužina lezije < 7 mm	IB2 tumor > 4 cm	IIB karcinom se širi u parametrija	IIIB karcinom zauzima parametrija do zida zdjelice, sve pacijentice s hidronefrozom ili afunkcionalnim bubregom	IVB udaljene metastaze

Za potvrdu postojanja metastatske bolesti u zdjeličnim i paraaortalnim limfnim čvorovima je potrebno kirurško stupnjevanje (stage-iranje).



Slika 11. FIGO klasifikacija raka vrata maternice. Preuzeto iz: Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, I sur. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. Int J Gynaecol Obstet. 2006 Nov;95 Suppl 1: S43-103.

Liječenje podrazumijeva sve moguće opcije: kirurško liječenje, radijacija, kemoterapija ili kemoiradijacija). Kirurško liječenje je ograničeno na pacijentice sa stadijem bolesti I i IIA.

Kirurško liječenje se preferira ukoliko je moguće, osobito kod mlađih žena kod kojih je važno očuvati funkciju jajnika, ali i kod starijih, kako bi se izbjegao nastanak fibroze od zračenja (postiradijacijski cistitis i kolitis).

Generalno, ne savjetuje se operirati pacijentice s tumorom >4 cm jer će takve pacijentice trebati poslijeoperacijsku radioterapiju, a morbiditet se povećava ako se kombiniraju oba modaliteta liječenja. Ukoliko je potrebno zračenje, funkciju jajnika je moguće očuvati njihovom transpozicijom izvan polja zračenja.

Vrsta kirurškog liječenja:

Konizacija ili jednostavna histerektomija je izbor liječenja za stadij IA1 (invazija <3 mm i negativna invazija limfokapilarnog prostora - LVSI) jer je rizik za zdjelčne metastaze limfnih čvorova u ovom stadiju <1%.^{126, 127}

Radikalna trahelektomija sa zdječnom limfadenektomijom (LPSC ili LAP) je prihvatljiva metoda liječenja za pacijentice sa stadijem bolesti IA1 s pozitivnim LVSI, zatim za pacijentice sa stadijem IA2 i IB1 koje žele zadržati mogućnost rađanja. Idealne kandidatkinje za ovaj postupak imaju tumor <2 cm, negativne limfne čvorove i negativan LVSI.^{128, 129}

Primarna radioterapija može biti primijenjena u pacijentica sa svim stadijima bolesti, obično se sastoji od kombiniranja vanjskog zračenja (za regionalne limfne čvorove) i unutarnjeg zračenja – brahiterapije (usmjereno na sami tumor). U pacijentica s

uznapređovalom bolesti se koristi istodobno kemoterapija kojom se senzitiviraju stanice na radioterapiju, a čime se postiže bolji učinak.^{130, 131}

5-godišnje preživljenje pacijentica u stadiju IA je gotovo 100%, a pacijentica u stadiju IB1 i IIA (manji tumori) je između 70-85%. Pacijentice u uznapređovalijoj fazi bolesti imaju lošije 5-godišnje preživljenje i to: IB2 i IIB je 50-70%, za stadij III je 30-50%, a za stadij IV je 5-15%.¹¹⁸

1.6 Prevencija

Dvije su razine prevencije karcinoma vrata maternice: primarna i sekundarna.

Primarna prevencija podrazumijeva primjenu cjepiva kojima se sprječava infekcija onkogenim tipovima HPV-a. Registrirana su tri cjepiva: dvovalentno, četirivalentno i devetvalentno, koja sadrže specifične pročišćene L1 proteine kapside, odnosno virus-like particles (VLP). Dvovalentno cjepivo sadrži pročišćene L1 proteine tipova 16 i 18 HPV-a, četirivalentno tipova 16, 18, 6 i 11 HPV-a, a devetvalentno tipova 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 HPV-a. Četirivalentno i devetvalentno cjepivo, osim što preveniraju nastanak prekanceroznih lezija i raka vrata maternice, štite i od nastanka anogenitalnih bradavica koje su uzrokovane HPV tipovima 6 i 11. HPV cjepiva služe samo za profilaksu infekcije, ne mogu izliječiti već postojeću HPV infekciju.¹³² Još nije u cijelosti razjašnjen mehanizam kojim cjepiva induciraju zaštitu, ali uključuje stvaranje i staničnog imuniteta i neutralizirajućih protutijela klase IgG.^{133, 134} Cjepiva su namijenjena adolescenticama i mladim ženama koje još nisu spolno aktivne, odnosno prije njihovog prvog kontakta s HPV virusom. Dokazano je da nakon 3 doze dvovalentnog i četirivalentnog cjepiva praktički sve cijepljene mlade

žene razvijaju adekvatan imunološki odgovor u vidu specifičnih protutijela.^{135, 136} Dosadašnja praćenja su pokazala visoku kliničku djelotvornost i zaštitu cjepiva.¹³⁷ Protektivni učinak dvovalentnog cjepiva je očuvan i nakon 9,4 godine,¹³⁸ a protektivni učinak četirivalentnog cjepiva traje barem 9 godina.¹³⁹ Nakon cijepljenja se razvija imunitet ograničen na tip HPV-a čiji se L1 proteini nalaze u cjepivu, ali nastaje djelomična križna zaštita i protiv drugih filogenetski srodnih onkogenih tipova HPV-a. Dvovalentno cjepivo pruža zaštitu i protiv HPV 45 (59% slučajeva), HPV 31 (36% slučajeva) i HPV 52 (32% slučajeva).¹⁴⁰ Četirivalentno cjepivo smanjuje incidenciju skvamoznih intraepitelnih lezija visokog stupnja uzrokovanu s drugih 9 filogenetski srodnih tipova HPV-a koji su uzročnici otprilike 20% karcinoma vrata maternice diljem svijeta. Četirivalentno cjepivo pruža križnu zaštitu protiv HPV tipova 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 i 59. Ova zaštita je predominantno usmjerena na HPV 31 (70% slučajeva).¹⁴¹ U Hrvatskoj se od 2009. godine prema preporukama Hrvatskog instituta za javno zdravstvo vrši cijepljenje koje nije obavezno, a preporuča se cijepiti djevojke u dobi između 9 i 26 godina.¹⁴²

Sekundarna prevencija uključuje rano dijagnosticiranje i liječenje bolesti. Metode sekundarne prevencije su citološka analiza stanica dobivenih obriskom vrata maternice (PAPA test ili LBC), a prema suvremenim smjernicama i testovi otkrivanja HPV DNA u obrisku vrata maternice.¹⁴³ Dobro organiziran probir konvencionalnom citološkom analizom smanjuje incidenciju i mortalitet uzrokovan karcinomom vrata maternice do 70%.¹⁴⁴ Obzirom da samo nekoliko razvijenih zemalja svijeta ima potpuno uspostavljene programe probira, većina žena u svijetu, osobito u zemaljama u razvoju biva rijetko ili gotovo nikada podvrgnuta testovima probira kojima se mogu detektirati prekancerozne lezije.^{145, 146} Prema preporukama vijeća EU programe ranog probira bi trebalo započeti provoditi u žena dobi 20-30 godina i nastaviti u 3-5

godišnjim intervalima do dobi od 60-65 godina.^{147, 148} Velike političke i ekonomske promjene na prostoru jugoistočne Europe u proteklih 25 godina su imale utjecaj na zapostavljanje javnog zdravstva i programa prevencije raka.^{149, 150} U Hrvatskoj ne postoji organizirani probir, nego oportunistički još od 1968. godine. To je popraćeno smanjenjem incidencije karcinoma vrata maternice, no od 1991. godine nije zabilježen daljni pad.¹⁵¹ Incidencija raka vrata maternice od 12,9/100.000 žena iz 2015. godini je i dalje viša nego u državama koje imaju dobro organizirani program probira.¹⁵ U Hrvatskoj godišnje od raka vrata maternice umre 150 žena. Manjkavost oportunističkog probira leži u činjenici da u tom probiru rjeđe sudjeluju žene koje su izložene većem riziku za nastanak karcinoma vrata maternice (žene nižeg socioekonomskog statusa) i time izbjegnu pravovremenoj dijagnozi u ranijem stadiju bolesti i adekvatnom liječenju koje podrazumijeva poštenije kirurške postupke. Zapažen je blagi pad u incidenciji raka vrata maternice u period od 1988.-2008. godine u Hrvatskoj što je posljedica suboptimalne prevencije.¹⁵²

2003. godine je osnovana radna grupa Ministarstva zdravlja koja je predložila program koji podrazumijava uzimanja PAPA testa u 3-godišnjim intervalima u populaciji žena dobi od 25-64 godine, a sukladno europskim smjernicama.⁹² Obzirom na trenutne visoke troškove zbog liječenja i bolovanja postojala je procjena se da će uvođenjem nacionalnog programa probira uštedjeti znatna sredstva već tijekom prvih 10 godina provođenja.¹⁵³ Krajem 2012. godine hrvatsko Ministarstvo zdravlja je pokrenulo nacionalni program probira kojeg organizira Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Plan programa je bio obuhvatiti populaciju žena dobi 20-64 godine, kojima će se uzimati konvencionalni PAPA test u 3-godišnjem intervalu.⁹² U prosincu 2012. je Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju (HDGO) izdalo S3 stručne smjernice za dijagnostiku i liječenje skvamoznih intraepitelnih lezija čiji je cilj postići veću

sigurnost u odabiru i provođenju medicinskih postupaka u dijagnostici i liječenju skvamoznih intraepitelih lezija, čime se pridonosi napretku u prevenciji, dijagnostici i liječenju.⁹⁸

Većina programa probira karcinoma vrata maternice je preskupa za zemlje u razvoju,¹⁵⁴ pa razvoj profilaktičkog cjepiva omogućuje prevenciju za sve žene. Unatoč visokoj učinkovitosti PAPA testa i u zemljama s dobro organiziranim programima probira do 20% karcinoma vrata maternice biva neotkriveno.^{146, 155, 156} Treba naglasiti da programi probira ne sprječavaju uzrok karcinoma vrata maternice – trajnu infekciju onkogenim tipovima HPV-a. Za očekivati je da će cijepljenje značajno smanjiti incidenciju karcinoma vrata maternice, a samim time i potrebu za skupim liječenjem. Cijepljenje bi moglo smanjiti životni rizik za nastanak karcinoma vrata maternice za 35%-80%, no biti će potrebno čak 20-30 godina za procjenu učinkovitosti cijepljenja.¹⁵⁷ Neka dosadašnja istraživanja već upućuju na redukciju prevalencije HPV tipova sadržanih u cjepivu u općoj populaciji¹⁵⁸, kao i sniženje u incidenciji skvamoznih intraepitelih lezija visokog stupnja.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Nažalost, i dalje najveće koristi od cijepljenja imaju žene iz bogatijih zemalja svijeta, dok one iz siromašnih zemalja u kojima je najveća incidencija raka vrata maternice i mortalitet dalje ostaju nezaštićene zbog niske pokrivenosti cijepljenjem.¹⁶²

Cijepljenje ne eliminira potrebu za testovima probira kasnije u životu nakon cijepljenja jer su i drugi tipovi HPV-a, osim tipova 16 i 18 uzročnici do 30% karcinoma vrata maternice.

Cijepljenje i učinkoviti programi probira čine najučinkovitiji pristup u prevenciji raka vrata maternice.

2 Hipoteza

Humani papilomavirus 16 (HPV 16) najčešći je visokorizični tip u žena sa skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog stupnja i karcinomom pločastih stanica vrata maternice u Hrvatskoj, a prevalencija ostalih onkogenih tipova značajno je manja u odnosu na tip 16.

Razdioba genomskih inačica HPV 16 u skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog stupnja (HSIL) različita je u odnosu na invazivni karcinom vrata maternice.

3 Ciljevi rada

Opći cilj istraživanja je analizirati razdiobu visokorizičnih tipova humanih papilomavirusa u žena sa skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog stupnja i karcinomom vrata maternice u Hrvatskoj iz svježih uzoraka.

Specifični ciljevi su:

Analizirati genomske inačice HPV 16 u E6 području, u različitim patohistološkim promjenama komadića tkiva vrata maternice dobivenog biopsijom

Utvrđiti učestalost pojedinih genomskih inačica HPV 16 u postojećim premalignim (HSIL) i malignim promjenama

Analizirati dobivene rezultate molekularne tipizacije HPV u kontekstu sociodemografskih i geografskih parametara

4 Ispitanice i metode

4.1 Ispitanice

U istraživanje su uključene žene s citološkim nalazima HSIL (CIN II i CIN III), karcinom in situ i invazivni karcinom vrata maternice koje su liječene u Zavodu za ginekološku onkologiju i Zavodu za ginekološku kirurgiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb.

U razdoblju od 01.12.2009. do 19.12.2013. godine je uključeno ukupno 406 ispitanica dobi od 19 do 83 godine, pregledanih i liječenih u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb zbog abnormalnog nalaza PAPA testa koji je ukazivao na skvamoznu intraepitelnu leziju visokog stupnja ili karcinom vrata maternice.

4.2 Metode

U ispitanica su prikupljeni uzorci za genotipizaciju HPV-a (pomoću standardiziranog kompleta za uzorkovanje Female Swab Specimen Collection Kit, Qiagen, Germany, Digene). Uzorci u kojima je analizirana HPV DNA su uzeti na sljedeći način: obrisak vrata maternice i komadić tkiva s kolposkopski sumnjive lezije vrata maternice prilikom biopsije ili operativnog zahvata stavljeni su u originalni transportni medij. Manji dio tkiva je namijenjen za analizu HPV DNA, a drugi veći dio tkiva ili kompletni preparat (konus ili maternica s vratom maternice) za patohistološku analizu. Također su uzeti i odgovarajući klinički podaci (dob, mjesto stanovanja, citološka dijagnoza, podaci o postupku liječenja, rizični čimbenici za nastanak karcinoma vrata maternice – pušenje, paritet, menarhe) i rezultati histopatološke obrade. Uzorci su pohranjeni na -20°C i dostavljeni u Kliniku za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu gdje je učinjena izolacija DNA i genotipizacija HPV. Uzorci izolirane DNA su potom dostavljeni u Ljubljani u Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju i dijagnostiku hepatitisa i AIDS-a Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani gdje je učinjeno sekvencioniranje HPV 16 i analiza inačica (varijanti) HPV 16.

4.2.1 Izolacija virusne DNA

U Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu izolirana je virusna DNA pomoću standardizirane metode, kompletom reagensa QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) prema „Blood and Body Fluid Spin Protocol” uz početni volumen izdvojenog uzorka od 200 µl i krajnjom

eluacijom nukleinske kiseline u 100 µl elucijskog AE pufera (Qiagen, Germany). Izolirana DNA je pohranjena na -20°C do amplifikacije.

4.2.2 Amplifikacija HPV-DNA

U Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju Sveučilišta u Ljubljani učinjena je daljnja obrada uzoraka. Za amplifikaciju HPV-DNA metodom konvencionalne lančane reakcije polimerazom (PCR) upotrijebljeni su biotinizirani nukleotidi ("primeri") GP5+/6+/68 kojim se dokazuje 140-150 parova baza (bp) veliki dio gena L1 najmanje 40 različitih genotipova HPV: 6, 11, 13, 26, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 56, 58, 59, 61, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 89, 90 i 91.

U zasebne reakcijske posudice ispipetirano je 20 µl reakcijske smjese i 5 µl HPV-DNA. Reakcijska smjesa napravljena je sukladno uputama proizvođača sadržanim u HotStar Taq Plus DNA Polymerase (Qiagen) komercijalno dostupnim kompletom kemikalija. Amplifikacija ciljne sekvence L1 regije genoma duge oko 150 bp HPV-a metodom PCR izvršena je pomoću aparata GenAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)¹⁶³. Nakon amplifikacije, prisutnost ciljnog fragmenta DNA veličine 150 bp je dokazana elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu.

4.2.3 Hibridizacija PCR produkata

Amplificirani uzorci su potom uključeni u postupak hibridizacije na nitroceluloznim membranama komercijalno dostupnog kita Ampliquality HPV-type (AB Analitica). Označeni PCR produkti, odnosno umnoženi dijelovi HPV-DNA se tijekom postupka vežu na oligonukleotidne probe specifične za pojedine tipove HPV-a na nitroceluloznim membranama u aparatu AUTO-LIPA, što omogućuje razlikovanje različitih virusnih genotipova (reverse line blot). Rezultati hibridizacije su očitani pomoću predloška za genotipizaciju priloženog u Ampliquality HPV-type testu s kompletom kemikalija koji omogućuje razlikovanje 29 različitih tipova HPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 i 82.

4.2.4 Sekvenciranje inačica HPV 16

DNA izolirana iz uzoraka žena pozitivnih na HPV 16 je potom izdvojena za potrebe ispitivanja raznolikosti sekvence HPV 16 unutar genomskih područja LCR, E6 i E7. Fragment HPV 16 koji se sastoji od otprilike 1700 parova baza (base pairs -bp), a koji sadrži cijele regije LCR, E6, te E7 open reading frames je jednom amplificiran metodom polimerazne lančane reakcije (PCR) koristeći početnice g16f-7122 / g16-r913 (Tablica 4). Sve probe korištene u istraživanju su osmišljene prema genomskim slijedovima referentnog izolata HPV 16 (GenBank accession No. K02718).

Tablica 4. . Popis početnica korištenih za sekvencioniranje HPV 16 produkata dobivenih PCR-om

HPV genotip	Početnica	Sekvenca	Genomska pozicija	Sekvencirano područje
HPV 16	g16f-7122	5' ACAACTGCTAAACGCAAAAA 3'	7122-7141	7155-82
HPV 16	g16r-7714	5' GCCAAAAATATGTGCCTAACA 3'	7694-7714	(LCR)
HPV 16	g16f-7663	5' AATCACTATGCGCCAACG 3'	7663-7680	83-559
HPV 16	g16r-376	5' TGCTGTTCTAATGTTGTTCCATA 3'	353-376	(E6)
HPV 16	g16f-273	5' GGAATCCATATGCTGTATGTG 3'	273-293	562-858
HPV 16	g16r-913	5' CATTACATCCCGTACCCTCT 3'	893-913	(E7)

U zasebne reakcijske posudice su ispipetirane 45 µl reakcijske smjese i 5µl HPV-DNA. Reakcijska smjesa je napravljena sukladno uputama proizvođača sadržanim u High Fidelity PCR Master (Roche) kompletom kemikalija. Amplifikacija ciljne sekvence L1-LCR-E6 regije genoma duge oko 1700 bp HPV-a 16 metodom PCR izvršena je pomoću aparata GenAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Nakon amplifikacije, prisutnost ciljnog fragmenta veličine oko 1700 bp je dokazana elektroforezom na 0,8%-tnom agaroznom gelu uz dodatak 2 µl Loading Dye u svaku posudicu s uzorkom od 10 µl DNA zasebno. Nakon izdvojenih pozitivnih uzoraka nakon elektroforeze, učinjeno je čišćenje PCR produkata po EXOSAP protokolu (Fermentas): dodatakom egzonukleaze uzorak se čisti od zaostalih početnica, a Shrimp Alkaline Phosphatase uklanja suvišak dNTP.

Potom je očišćeni produkt pripremljen sa tri para oligonukleotidnih početnica za daljnju amplifikaciju: g16f-7122, g16r-7714, g16f-7663, g16r-376, g16f-273 i g16r-913, po prethodno opisanom postupku¹⁶⁴ pomoću aparata GenAmp® PCR System 9700.

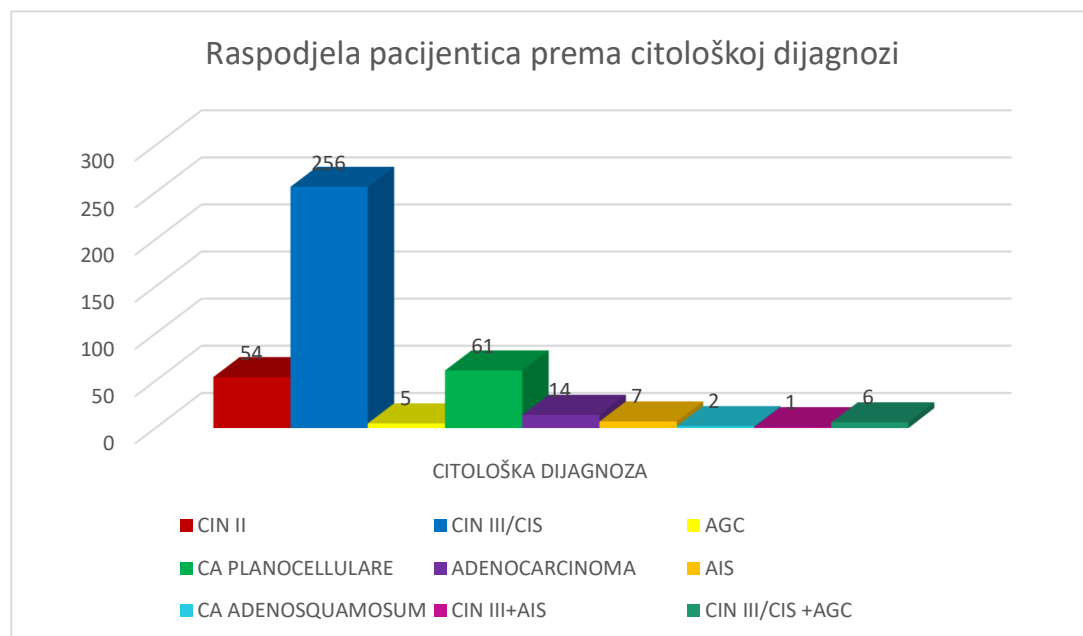
Dobiveni PCR produkti pročišćeni su pomoću Big Dye X Terminator®, Applied Biosystems (kompleta sastavljenog od dvije kemikalije: X Terminator® otopine koja skuplja nečistoće i SAM® otopine koja pojačava djelovanje X Terminator otopine i stabilizira uzorak nakon čišćenja. Big Dye X Terminator® se dodaje direktno u PCR produkte i vorteksira kroz 25 minuta na 2000 rpm (reactions per minute), tijekom čega Big Dye X Terminator® imobilizira neželjene nečistoće na dno, a pročišćeni produkt na vrh posudice, koji je potom postavljen u aparat za sekvenciranje 3500 Dx Genetic Analyzer (Applied BioSystems) koji omogućava automatsko određivanje slijeda. Nakon završene analize, podaci o slijedu nukleotida su analizirani kompjuterski posebnim software-om Vector NTI Advance v11.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) koji ih prikazuje u obliku elektroferograma s pripadajućim nukleotidnim slijedom. LCR, E6 i E7 genomske inačice HPV 16 su utvrđene pomoću BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5.3 (North Carolina State University, Raleigh, NC) koristeći slijed referentnog izolata HPV 16 kao standard za usporedbe. Nukleotidne sekvence HPV16 (geni E6, E7 te područje LCR) svih uključenih uzoraka i referentni nukleotidni slijedovi su bili uspoređeni sa algoritmom MAFFT v6.846 software.¹⁶⁵ Maximum likelihood filogenetsko stablo je bilo konstruirano sa algoritmom RAxML HPC2 v7.6.3,¹⁶⁶ na osnovi evolucijskog modela GTRCAT i sa bootstrap vrijednosti 1.000.

5 Rezultati

U istraživanje je uključeno ukupno 406 pacijentica s citološkim nalazom HSIL

($\geq$ CIN II) pregledanih i liječenih u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb u razdoblju od 01.12.2009. do 19.12.2013. godine.

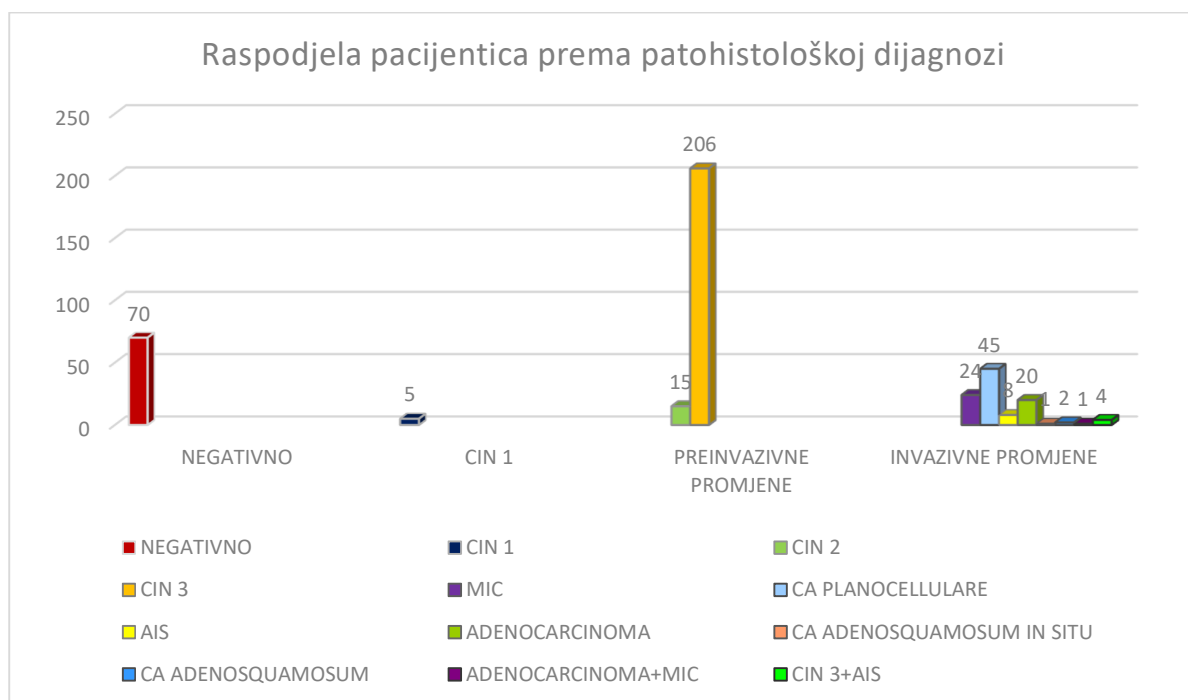
Raspodjela pacijentica obzirom na citološku dijagnozu bila je kako slijedi: 54 (13,3%) pacijentica s nalazom CIN II, 256 (63%) pacijentica s nalazom CIN III/CIS, 5 (1,2%) pacijentica s nalazom AGC, 61 (15%) pacijentica s nalazom carcinoma planocellulare, 14 (3,5%) pacijentica s nalazom adenocarcinoma, 7 (1,7%) pacijentica s nalazom AIS, 2 (0,5%) pacijentice s nalazom carcinoma adenosquamosum, 1 pacijentica s nalazom CIN III+AIS (0,3%) te 6 pacijentica s nalazom CIN III/CIS+AGC (1,5%). (Slika 12)



Slika 12. Raspodjela pacijentica prema citološkoj dijagnozi

5.1 Raspodjela pacijentica prema patohistološkim dijagnozama

Nakon provedene patohistološke obrade i dijagnostike uzoraka, iz daljnje analize je isključeno 5 pacijentica s patohistološkom dijagnozom koja je odgovarala karcinomu drugog porijekla (3 karcinoma endometrija i 2 karcinoma vagine). Raspodjela prema patohistološkim dijagnozama kod preostale 401 pacijentice je bila sljedeća: negativnih nalaza je bilo 70 (17,5%); 5 (1,2%) pacijentica je imalo CIN I; preinvazivnih promjena bilo je ukupno 221 (55,1%), od toga CIN II 15 (3,7%), CIN III 206 (51,4%); a invazivnih promjena bilo je 105 (26,2%), od toga MIC u 24 (6%) uzorka, carcinoma planocellulare u 45 (11,2%), AIS 8 (2%), adenocarcinoma je bilo 20 (5%), carcinoma adenosquamosum in situ je samo 1 (0,2%) i carcinoma adenosquamosum je u 2 (0,5%) uzorka. Jedan uzorak je imao patohistološku dijagnozu adenocarcinoma i MIC (0,2%), a 4 uzorka su imala dijagnozu CIN III i AIS (1%). Oni su pribrojeni u skupinu invazivnih lezija obzirom na agresivniju komponentu. (Slika 13)



Slika 13. raspodjela pacijentica prema patohistološkoj dijagnozi

5.2 Raspodjela HPV tipova u uzorcima prema patohistološkoj dijagnozi

U 6 uzoraka HPV DNA nije bilo moguće izolirati zbog loše kvalitete tkiva (negativna unutarnja kontrola). U 13 uzoraka HPV nije otkriven (patohistološki nalaz u ovim uzorcima je također bio negativan). U jednom uzorku s negativnim patohistološkim nalazom je otkriven LR HPV, a u 3 uzorka je otkriven HR HPV nepoznatog tipa, stoga ta 23 uzorka nisu uključena u daljnju analizu.

Genotipizacija je učinjena u preostalim 378 uzoraka: 324 pacijentice s patohistološki potvrđenim HSIL ili karcinomom vrata maternice, 5 pacijentica s LSIL i 49 pacijentica s negativnim patohistološkim nalazom i pozitivnim HR HPV.

HR HPV tipovi su otkriveni u 360 od 378 uzoraka (95,5%), a u 3 (0,8%) uzorka je otkrivena LR HPV infekcija. 15 od 378 (4%) uzoraka bilo je negativno na HPV DNA, sa sljedećim patohistološkim dijagnozama: 8 HSIL, 3 karcinom pločastih stanica i 4 adenokarcinom.

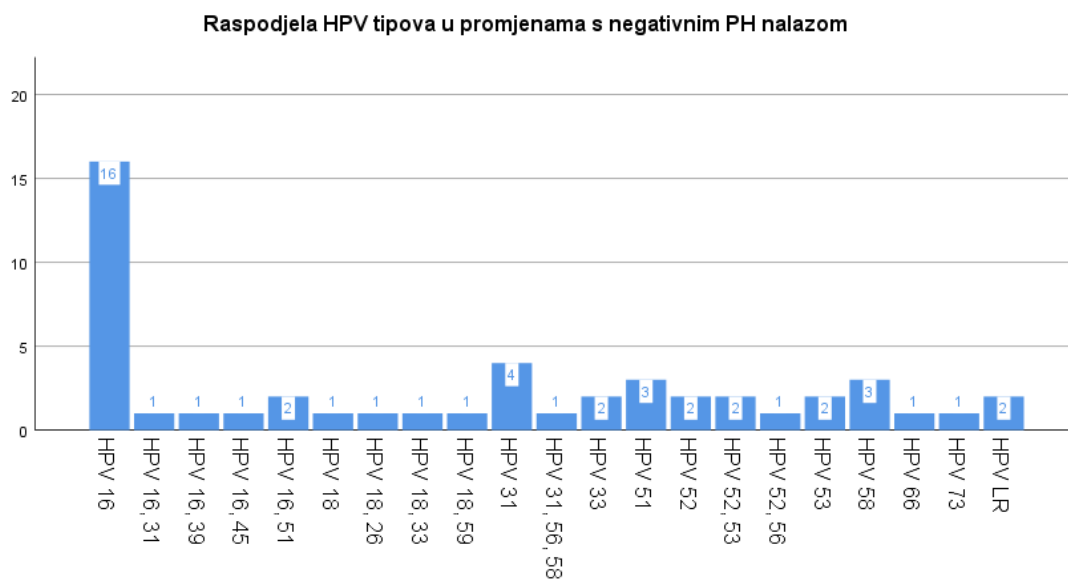
Patohistološke dijagnoze kod HR HPV pozitivnih uzoraka su bile sljedeće: 47 uzoraka s negativnim patohistološkim nalazom, 5 uzoraka s LSIL (CIN I), 210 uzoraka s HSIL (15 CIN II i 195 CIN III) i 98 uzoraka s dijagnozom karcinoma vrata maternice (66 karcinom pločastih stanica i 32 adenokarcinom).

U 282 od 360 (78,3%) uzoraka je otkrivena infekcija jednim genotipom HR HPV, a u 78 (21,7%) uzoraka infekcija s više genotipova HR HPV: 61 uzorak s infekcijom s 2 genotipa, 12 uzoraka s 3 genotipa i 5 uzoraka s 4 genotipa (Tablica 5).

Tablica 5. Jednostruke i višestruke infekcija humanim papilomavirusom (HPV) u odnosu na patohistološke dijagnoze. HR – visoki rizik; LR – niski rizik

		Patohistološka analiza				
		NEGATIVNO (n)	LSIL (n)	HSIL (n)	KARCINOM PLOČASTIH STANICA (n)	ADENOCARCINOM (n)
H P V	NEGATIVNO	0	0	8	3	4
	JEDNOSTRUKA HPV HR INFEKCIJA	35	3	167	52	25
	VIŠESTRUKA HPV HR INFEKCIJA	12	2	43	14	7
	LR HPV	2	0	1	0	0

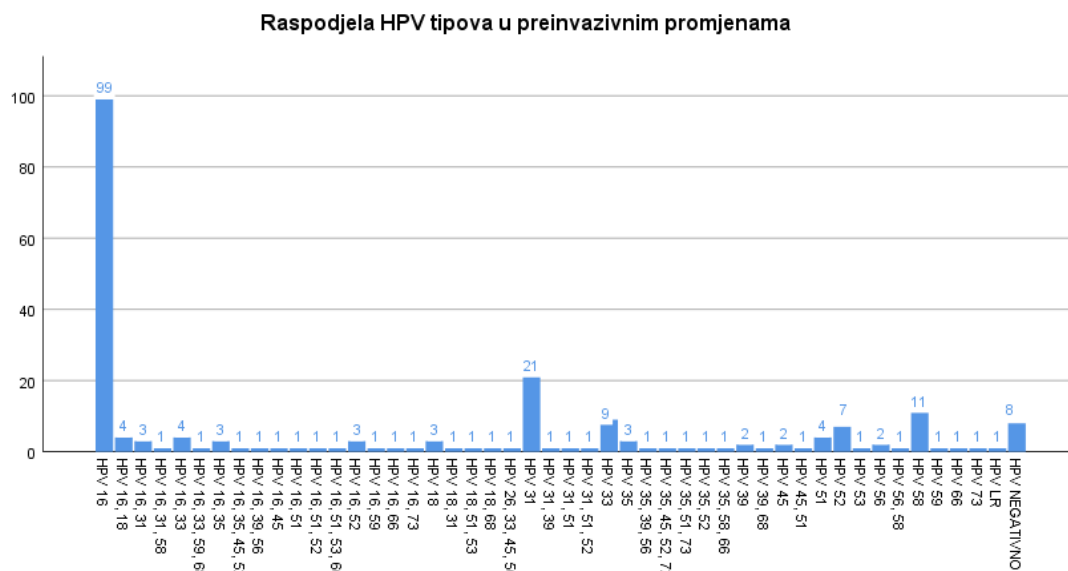
Kod pacijentica s negativnom patohistološkom dijagnozom (n=49), HPV 16 je bio najčešći genotip, izoliran je u 21 (42,9%) uzoraka (16 jednostrukih i 5 višestrukih infekcija). Od ostalih genotipova izolirani su sljedećim redom: HPV 31 u 6 (12,2%) uzoraka (4 jednostruke i 2 višestruke infekcije), HPV 51 u 5 (10,2%) uzoraka (3 jednostruke i 2 višestruke infekcije), HPV 52 u 5 uzoraka (2 jednostruke i 3 višestruke infekcije), HPV 58 u 4 (8,2%) uzoraka (3 jednostruke i 1 višestruka infekcija) i HPV 18 u 4 (8,2%) uzorka (1 jednostruka i 3 višestruke infekcije). Ostali tipovi su nađeni u jednom ili dva uzorka. U uzorcima s negativnom patohistološkom dijagnozom je bilo 12 (25,5%) višestrukih infekcija. (Slika 14)



Slika 14. Raspodjela HPV tipova u uzorcima s konačnim negativnim patohistološkim nalazom

Bilo je samo 5 pacijentica s LSIL dijagnozom, od kojih je 3 imalo infekciju s jednim genotipom, a 2 su imale infekciju s više tipova HR HPV. HPV 51 je bio najčešći genotip (2 jednostruke i jedna višestruka infekcija).

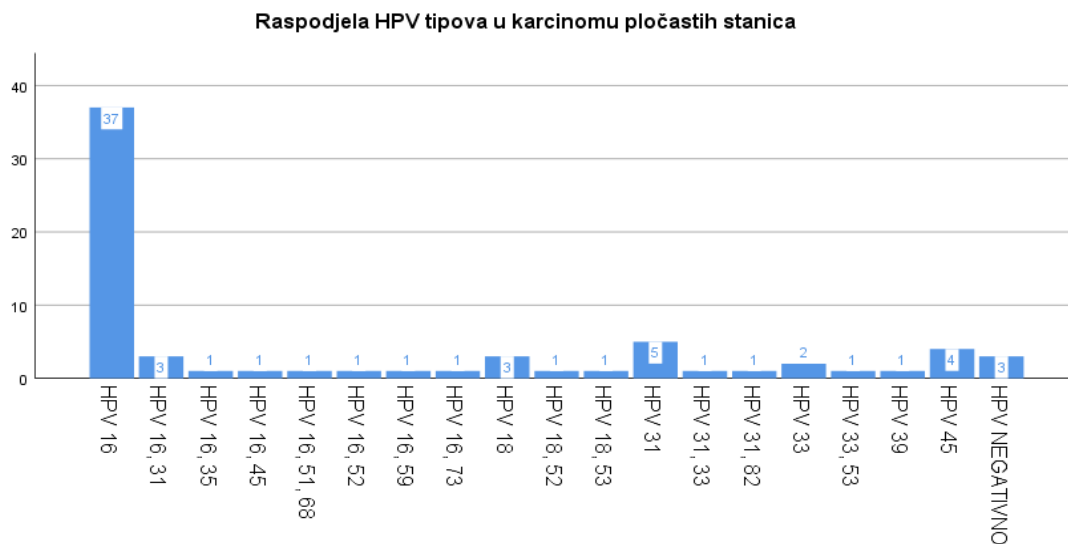
U grupi pacijentica s preinvazivnim lezijama (HSIL grupa; n=219) high-risk HPV dokazan je u 210 (95.9%) uzoraka, dok je 8 (3,7%) je bilo negativno na HPV DNA, a 1 (0.4%) pacijentica je imala infekciju genotipom niskog rizika (LR HPV). Pri tome 167 (76,3%) pacijentica je imalo infekciju samo jednim tipom dok je njih 43 (19,6%) imalo višestruku infekciju. HPV 16 bio je najčešći genotip: 99 jednostrukih i 28 višestrukih infekcija, ukupno je izoliran u 127 (57,9%) uzoraka. Ostali izolirani tipovi po učestalosti su bili: HPV 31 u 28 (12,8%) uzoraka (21 jednostruka i 7 višestrukih infekcija), HPV 33 u 15 (6,8%) uzoraka (9 jednostrukih i 6 višestrukih infekcija), HPV 58 u 14 (6,4%) uzoraka (11 jednostrukih i 3 višestruke infekcije), HPV 52 u 13 (5,9%) uzoraka (7 jednostrukih i 6 višestrukih infekcija), HPV 18 u 10 (4,6%) uzoraka (3 jednostruke i 7 višestrukih infekcija) i HPV 45 u 7 (3,2%) uzorka (2 jednostruke i 5 višestrukih infekcija) dok su ostali tipovi bili zastupljeni u manjem broju. (Slika 15)



Slika 15. Raspodjela HPV tipova u preinvazivnim promjenama

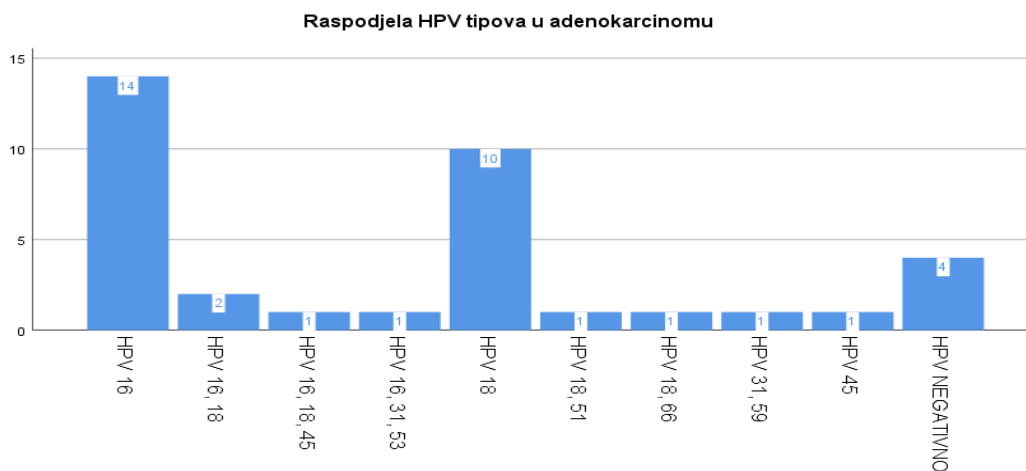
U grupi pacijentica s invazivnim lezijama (karcinom pločastih stanica i adenokarcinom; n=105) high-risk HPV dokazan je u 98 uzoraka (93,7%) dok je 7 (6,7%) bilo negativno na HPV DNA. Od pozitivnih uzoraka 77 uzoraka (73,3%) je imalo jednostruku infekciju, a 21 (20%) uzoraka je imalo višestruku infekciju.

U uzorcima s dijagnozom karcinoma pločastih stanica (n=69) HPV je dokazan u 66 (95,7%) a negativan u 3 (4,3%) uzorka. U 66 pozitivnih uzoraka HPV 16 je bio dominantan: 37 jednostrukih i 9 višestrukih infekcija, ukupno 46 (66,7%). Ostali tipovi po učestalosti bili su: HPV 31 u 10 (14,5%) uzoraka (5 jednostrukih i 5 višestrukih infekcija), HPV 45 u 5 (7,2%) uzoraka (4 jednostruke i 1 višestruka infekcija), HPV 18 u 5 (7,2%) uzoraka (3 jednostruke i 2 višestruke infekcije) i HPV 33 u 4 (5,8%) uzorka (2 jednostruke i 2 višestruke infekcije), dok su ostali nađeni u manjem broju. Višestrukih infekcija je bilo 14 (20,3%). (Slika 16)



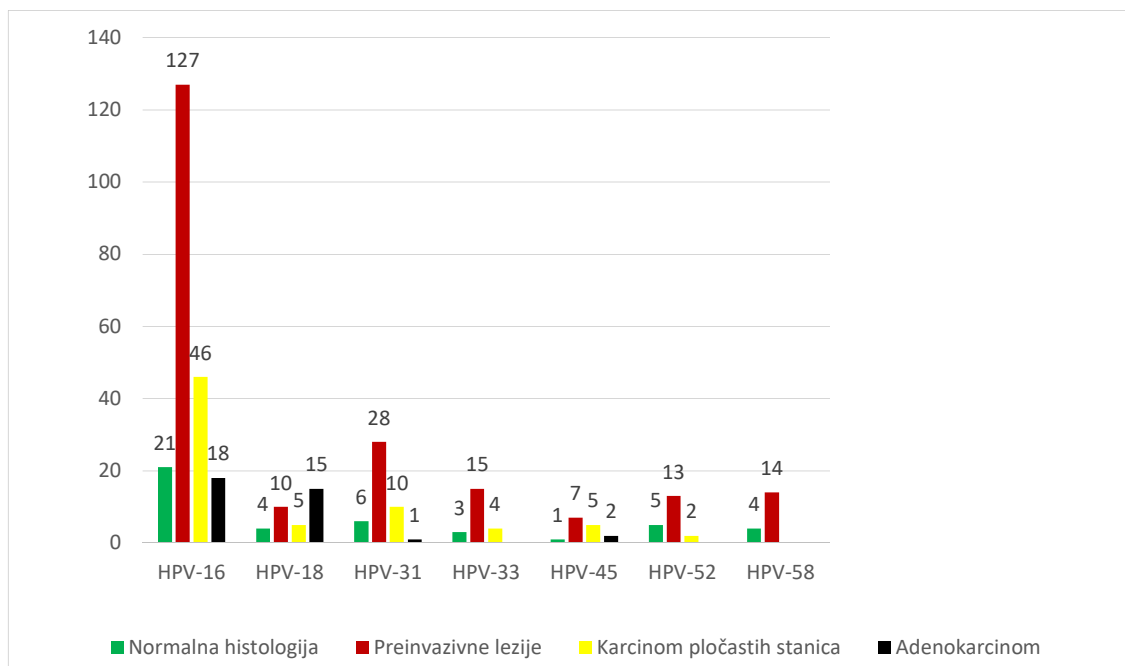
Slika 16. Raspodjela HPV tipova u karcinomu pločastih stanica

U uzorcima s dijagnozom adenokarcinoma (n=36) HPV je dokazan u 32 (88,9%) a negativan u 4 (11,1%) uzorka. HPV 16 je bio zastupljen ukupno u 18 (50,0%) uzoraka (14 jednostrukih i 4 višestruke infekcije). HPV 18 je otkriven u 15 (41,7%) uzoraka (10 jednostrukih i 5 višestrukih infekcija), a HPV 45 u 2 (5,6%) uzorka (1 jednostruka i 1 višestruka infekcija). Uzoraka s višestrukom infekcijom je bilo 7 (19,4%). (Slika 17)



Slika 17. Raspodjela HPV tipova u uzorcima s adenokarcinomom

Na slici 18 je prikazana distribucija najčešćih HR HPV tipova (uključujući i one iz višestrukih infekcija) u uzorcima pacijentica s različitim patohistološkim dijagnozama (grupa s negativnim nalazom, grupa s preinvazivnim lezijama, grupa s karcinomom pločastih stanica i grupa s adenokarcinomom).



Slika 18. Distribucija najčešćih HPV genotipova (uključujući višestruke infekcija) u uzorcima pacijentica s različitim patohistološkim dijagnozama (negativno, preinvazivne lezije, karcinom pločastih stanica i adenokarcinom)

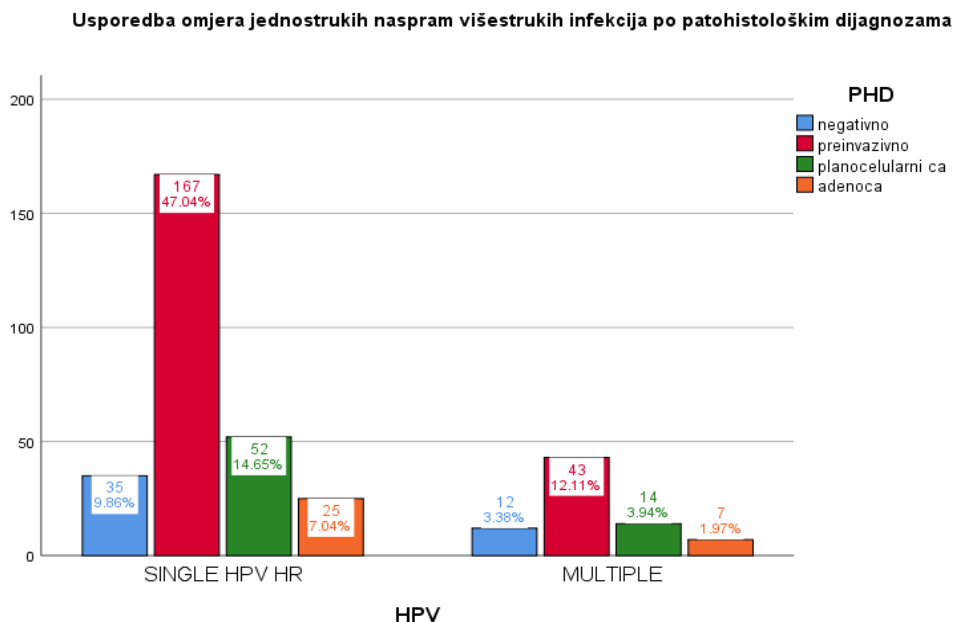
HPV-16 bio je najčešće otkriveni genotip u ispitivanim uzorcima, bez obzira na histopatološku dijagnozu. Sveukupno, HPV-16 otkriven je u 212 od 358 uzoraka (59,2%): u 166 uzoraka s jednostrukom infekcijom i u 46 uzoraka s višestrukoum infekcijom. Prevalencija ostalih visoko rizičnih genotipova HPV-a u uzorcima bila je sljedeća: HPV-31 u 45 (12,6%), HPV-18 u 24 (6,7%), HPV-33 u 22 (6,1%), HPV-52 (5,6%) i HPV-58 (5,0%).

5.3 Usporedba broja jednostrukih naspram višestrukih infekcija HPV-om

Učinjenom usporedbom broja jednostrukih i višestrukih infekcija HPV-om po dijagnozama uočljivo je da je broj jednostrukih infekcija veći nego broj višestrukih infekcija u svim patohistološkim dijagnozama, odnosno ukupno je jednostrukih infekcija bilo 78,6% naspram 21,4% višestrukih. (Tablica 6) (Slika 19)

Tablica 6. Usporedba broja jednostrukih i višestrukih infekcija HPV-om po patohistološkim dijagnozama

HPV * PHD Crosstabulation							
			PHD				Total
			Negativno	Preinvazivno	Planocelularni karcinom	Adenokarcinom	
HPV	SINGLE HPV HR	Count	35	167	52	25	279
		% within HPV	12.5%	59.9%	18.6%	9.0%	100.0 %
		% within PHD	74.5%	79.5%	78.8%	78.1%	78.6%
		% of Total	9.9%	47.0%	14.6%	7.0%	78.6%
	MULTIPLE	Count	12	43	14	7	76
		% within HPV	15.8%	56.6%	18.4%	9.2%	100.0 %
		% within PHD	25.5%	20.5%	21.2%	21.9%	21.4%
		% of Total	3.4%	12.1%	3.9%	2.0%	21.4%
	Total	Count	47	210	66	32	355
		% within HPV	13.2%	59.2%	18.6%	9.0%	100.0 %
		% within PHD	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0 %
		% of Total	13.2%	59.2%	18.6%	9.0%	100.0 %

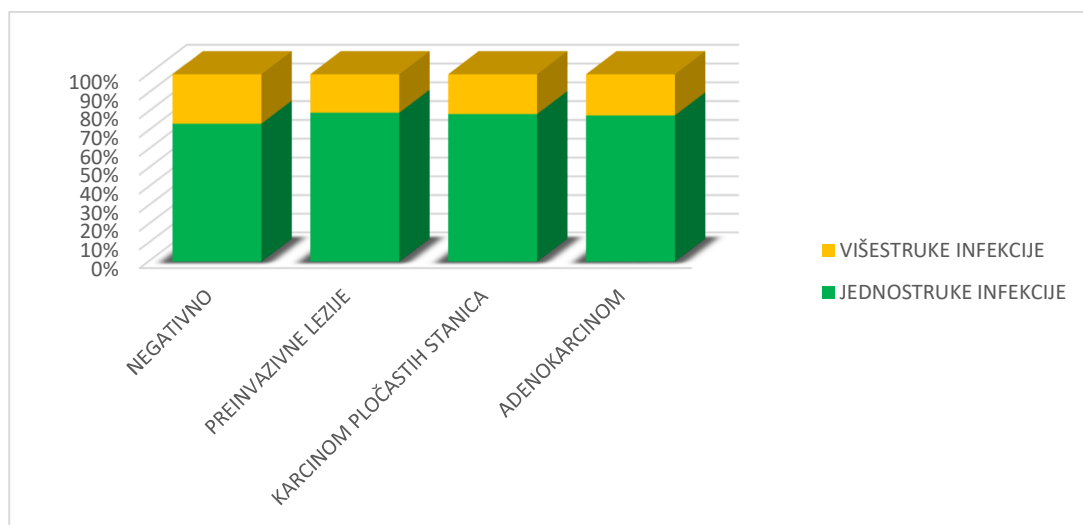


Slika 19. Usporedba broja jednostrukih i višestrukih infekcija HPV-om po patohistološkim dijagnozama

Analizom dobivenih rezultata u IBM® SPSS® Statistics (Pearson χ^2 test 0,899) nije dokazana statistički značajna razlika u razdiobi jednostrukih i višestrukih infekcija u uzorcima prema različitim patohistološkim dijagnozama. (Tablica **Error! Reference source not found. 7**) (Slika 20)

Tablica 7. Pearson χ^2 test

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	.589	3	.899
Likelihood Ratio	.570	3	.903
Linear-by-Linear Association	.084	1	.772
N of Valid Cases	355		



Slika 20. Udio pojedinačnih i višestrukih infekcija HPV-om po patohistološkim dijagnozama

5.4 Podaci za srednju dob, dob menarče, broj poroda i pobačaja te pušenje

Srednja dob pacijentica s preinvazivnim lezijama je bila 36,07 godina (SD 9,091), pacijentica s invazivnim lezijama je bila 46,35 godina (SD 11,699). Srednja dob pacijentica s negativnim patohistološkim nalazom je bila 38,10 godina (SD 12,180). (Tablica 8)

Tablica 8. Srednja dob pacijentica prema patohistološkoj dijagnozi

PHD	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Negativno	49	38.10	12.180	21	69
Preinvazivno	219	36.07	9.091	19	69
Invazivno	105	46.35	11.699	27	83
Ukupno	373	39.23	11.234	19	83

Srednja dob menarče kod pacijentica s preinvazivnim promjenama je bila 13,15 godina, a pacijentica s invazivnim promjenama je bila 12,86. Pacijentice s negativnim nalazom su imale srednju dob menarče 12,98. (Tablica 9)

Tablica 9. Srednja dob menarče pacijentica prema patohistološkoj dijagnozi

PHD	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Negativno	49	12.98	1.436	10	17
Preinvazivno	219	13.15	1.177	10	17
Invazivno	105	12.86	.955	11	15
Ukupno	373	13.05	1.162	10	17

Srednja vrijednost za paritet pacijentica s preinvazivnom promjenom je bio 1,31 djece, a za paritet pacijentica s invazivnim promjenama je bio 1,89 djece. Pacijentice s negativnim nalazom su imale srednju vrijednost za paritet 1,14 djece. (Tablica 10)

Tablica 10. Srednja vrijednost za paritet ispitanica prema patohistološkoj dijagnozi

PHD	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Negativno	49	1.14	1.099	0	4
Preinvazivno	219	1.32	1.179	0	5
Invazivno	105	1.89	1.146	0	5
Ukupno	373	1.45	1.190	0	5

Srednja vrijednost za broj pobačaja pacijentica s invazivnim lezijama je bio 0,63, dok je kod pacijentica s preinvazivnim lezijama taj broj bio 0,47. Pacijentice s negativnim nalazom su imale prosječan broj pobačaja 0,43. (Tablica 11)

Tablica 11. Srednja vrijednost za broj pobačaja ispitanica prema patohistološkoj dijagnozi

PHD	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Negativno	49	.43	.764	0	3
Preinvazivno	219	.47	.750	0	4
Invazivno	105	.63	.953	0	6
Ukupno	373	.51	.815	0	6

Analiza dobivenih rezultata je učinjena statističkim programom IBM® SPSS® Statistics, razlike u grupama su uspoređivane koristeći ANOVA post hoc test.

Rezultati upućuju da postoji statistički značajna razlika u srednjoj dobi, broju poroda i navike pušenja pacijentica s invazivnim lezijama u odnosu na pacijentice s negativnim nalazom i pacijentice s preinvazivnim lezijama ($p \leq 0,05$), dok ne postoji statistički značajna razlika u broju pobačaja i dobi menarhe. (Tablica 12)

Tablica 12. ANOVA test usporedbe skupina pacijentica prema pušenju, dobi, broju poroda, broju pobačaja, dobi menarhe i pušenju

ANOVA						
		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
DOB	Between Groups	7571.425	2	3785.713	35.575	.000
	Within Groups	39373.283	370	106.414		
	Total	46944.708	372			
P	Between Groups	28.540	2	14.270	10.605	.000
	Within Groups	497.889	370	1.346		
	Total	526.429	372			
AB	Between Groups	2.146	2	1.073	1.620	.199
	Within Groups	245.071	370	.662		
	Total	247.217	372			
MENARCHE	Between Groups	6.361	2	3.181	2.373	.095

	Within Groups	495.864	370	1.340		
	Total	502.225	372			
PUŠENJE	Between Groups	5.840	2	2.920	12.506	.000
	Within Groups	86.391	370	.233		
	Total	92.231	372			

Detaljnijom usporedbom ustanovljeno je da su pacijentice s invazivnim promjenama imale statistički značajnu veću srednju dob, veći broj poroda i češće su pušile u odnosu na pacijentice s negativnim nalazom i pacijentice s preinvazivnim promjenama. (Tablice 13, 14 i 15)

Tablica 13. ANOVA post hoc test usporedbe skupina po dobi

(I) PHD	(J) PHD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Negativno od	preinvazivno	2.029	1.630	.428	-1.81	5.87
	invazivno	-8.250*	1.785	.000	-12.45	-4.05
Preinvazivno od	negativno	-2.029	1.630	.428	-5.87	1.81
	invazivno	10.279*	1.224	.000	7.40	13.16
Invazivno od	Negativno	-8.250*	1.785	.000	-12.45	-4.05
	Preinvazivno	10.279*	1.224	.000	7.40	13.16

Tablica 14. ANOVA post hoc test usporedbe skupina po broju poroda

(I) PHD	(J) PHD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Negativno od	Preinvazivno	-.172	.183	.616	-.60	.26
	Invazivno	-.743*	.201	.001	-1.22	-.27
Preinvazivno od	Negativno	.172	.183	.616	-.26	.60
	Invazivno	-.571*	.138	.000	-.89	-.25
Invazivno od	Negativno	.743*	.201	.001	.27	1.22
	Preinvazivno	.571*	.138	.000	.25	.89

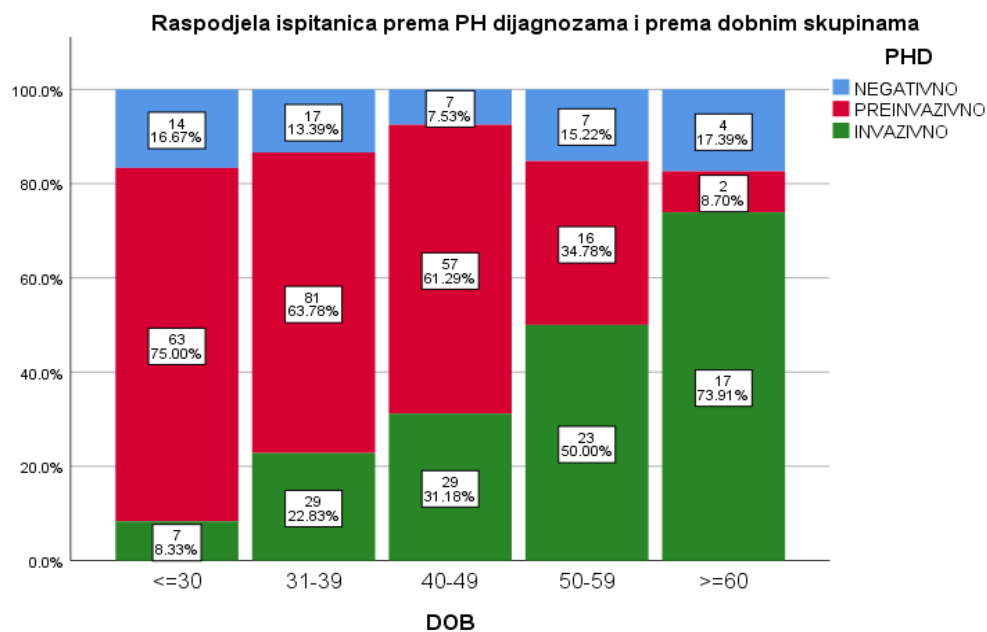
Tablica 15. ANOVA post hoc test usporedbe skupina po pušenju

(I) PHD	(J) PHD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Negativno od	preinvazivno	-.003	.076	.999	-.18	.18
	invazivno	-.280*	.084	.003	-.48	-.08
Preinvazivno od	negativno	.003	.076	.999	-.18	.18
	invazivno	-.278*	.057	.000	-.41	-.14
Invazivno od	negativno	.280*	.084	.003	.08	.48
	preinvazivno	.278*	.057	.000	.14	.41

Najviše pacijentica s dijagnozama CIN II i CIN III (preinvazivne promjene) je bilo u mlađoj životnoj dobi, dok je iznad 50. bilo svega 18 pacijentica s preinvazivnim promjenama. Pacijentica s dijagnozom karcinoma u dobnoj skupini ispod 30. godina je bilo 7, dok iznad 30. godine broj pacijentica s dijagnozom karcinoma raste – u dobnoj skupini 30-39 godina ih je 29, u dobnoj skupini od 40-49 godina ih je 29, u skupini od 50-59 ih je 23, a u skupini žena starijih od 60 godina ih je 17. (Tablica 16) (Slika 21)

Tablica 16. Raspodjela pacijentica prema dobnim skupinama i prema patohistološkom nalazu

		DOB				
		<=30	31-39	40-49	50-59	>=60
PHD	Negativno	14	17	7	7	4
	Preinvazivno	63	81	57	16	2
	Invazivno	7	29	29	23	17

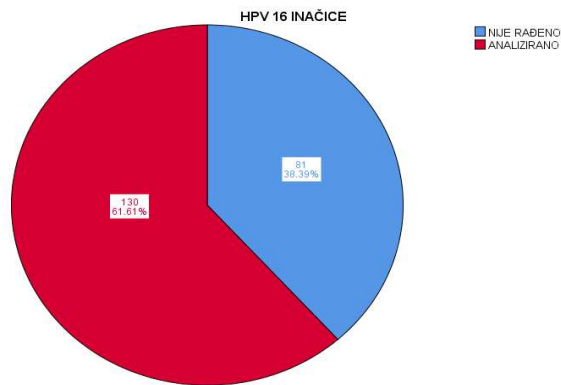


Slika 21. Raspodjela pacijentica prema dijagnozama i prema dobnim skupinama

Bolesnice su uglavnom bile iz Zagreba (165) i Zagrebačke županije (72), ukupno 237 (62,7%), ali i iz drugih dijelova Hrvatske: Središnja Hrvatska 50 (13,2%), Slavonija 44 (11,6%), Dalmacija 34 (9 %) i Istre, Primorja i Gorske Hrvatske 13 (3,5%).

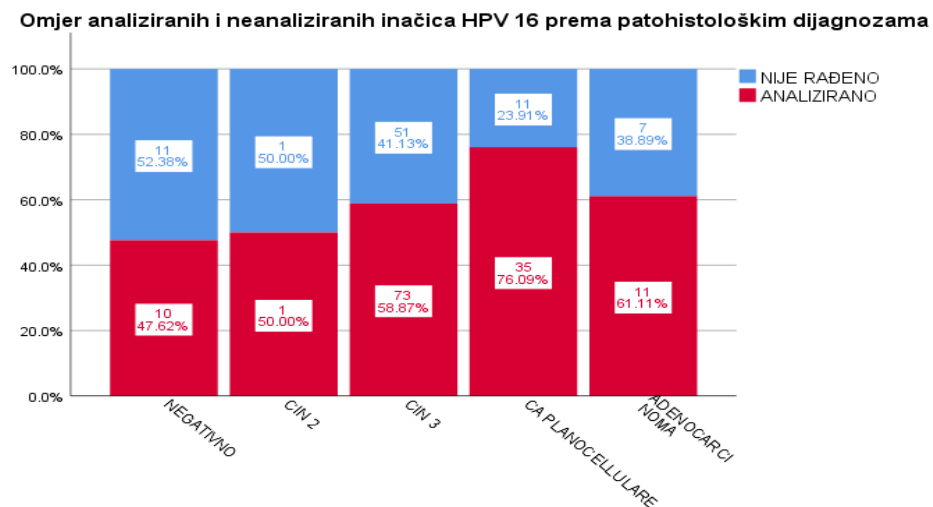
5.5 Inačice HPV 16

Genotipizacija HPV bila je izvedena za 373 uzorka, a HPV16 pozitivnih uzoraka je bilo ukupno (jednostruke i višestruke infekcije) 211. Zbog financijskih ograničenja HPV16 LCR-E6-E7 inačice su bile određene za 130 HPV16 pozitivnih uzoraka. (Slika 22)



Slika 22. HPV 16 inačice

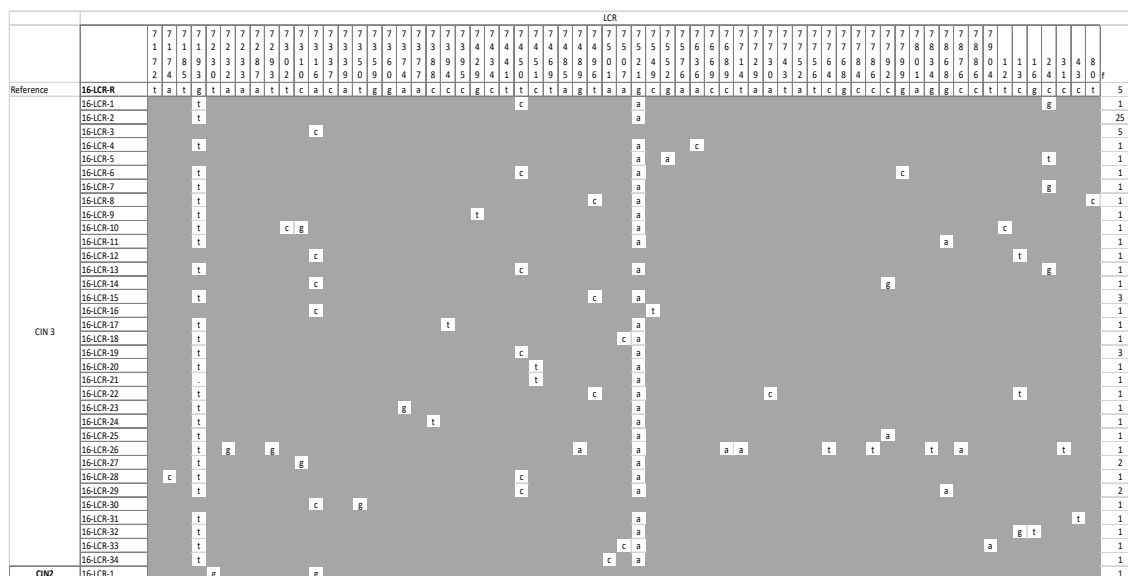
Na slici 23 je prikazan udio analiziranih inačica HPV 16 naspram neanaliziranih.



Slika 23. Analizirane i neanalizirane inačice HPV 16

5.6 Genomske inačice HPV 16 u preinvazivnim promjenama

Genomske inačice u području LCR HPV 16 iz 73 uzorka s patohistološkom dijagnozom CIN III i iz jednog uzorka s CIN II su prikazane na slici 24.



Slika 24. Genomske inačice: LCR područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu

Ukupno je nađeno 35 LCR inačica u uzorcima s CIN III i jedna LCR inačica u uzorku s CIN II. Pet izolata u uzorcima s CIN III je potpuno nalikovalo referentnom LCR slijedu. Analizirajući cijeli LCR slijed (823 bp, nt 7155 do 82), nađeno je 43 nt substitucije i jedna delecija u uzorcima s CIN III, te 2 nt substitucije u CIN II.

Genetički najudaljenija inačica u CIN III se razlikovala od referentnog HPV 16 u 12 nt, a maksimalna varijabilnost LCR genomskog područja u uzorcima s CIN III je bila 1,4%. Inačica u uzorku s CIN II se razlikovala od referentnog HPV 16 u 2 nt, dakle varijabilnost LCR genomskog područja u uzorku s CIN II je bila 0,2%. Najčešća inačica u uzorcima s CIN III je bila 16-LCR-2, s dvije mutacije (G7193T i G7521A), koja je

Genomske inačice u E6 području 73 HPV 16 izolata kod pacijentica s CIN III i 1 HPV 16 izolat kod pacijentice s CIN II je prikazana na slici 25.

Slika 25. Genomske inačice: E6 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu

Genomske inačice E7 područja 73 HPV 16 izolata nađenih kod pacijentica s CIN III i 1 HPV 16 izolat kod pacijentice s CIN II je prikazan na slici 26.

E7									
		7	7	7	7	8	8		
		1	3	8	9	0	2		
		2	2	9	5	2	2		f
Reference	16-E7-R	c	t	t	t	g	a		66
	16-E7-1						g		5
CIN 3	16-E7-2	a					a		1
	16-E7-3			c	g				1
CIN2	16-E7-R								1

Slika 26. Genomske inačice: E7 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu

Ukupno je nađeno 4 E7 inačice u uzorcima s CIN III. E7 inačica u uzorku s CIN II je potpuno nalikovala referentnom slijedu. 66 (90,4%) izolata u uzorcima s CIN III je potpuno nalikovalo referentnom E7 slijedu. Analizom kompletnog E7 slijeda (297 bp, nt 562 do 858), nađeno je 5 nt substitucija u uzorcima s CIN III. Maksimalna varijabilnost E7 genomske slijeda u uzorcima s CIN III je bila 0,6% (2nt).

Nakon spajanja slijedova LCR, E6 i E7 područja za svaki pojedini izolat, u 73 uzorka s CIN III je nađeno 40 različitih genomske inačice. (**Error! Reference source not found.**).

Tablica 17. Genomske inačice u uzorcima s CIN III; R- inačice koje potpuno nalikuju slijedu referentnog HPV 16. N-broj inačica. E – Europska grana, Af – Afrička grana

Genomska inačica	LCR inačica	E6 inačica	E7 inačica	N	Grana
GV1	LCR-R	E6-R	E7-R	5	E
GV2	LCR-1	E6-1	E7-R	1	E
GV3	LCR-2	E6-2	E7-R	20	E
GV4	LCR-2	E6-R	E7-R	1	E
GV5	LCR-2	E6-5	E7-R	1	E

GV6	LCR-2	E6-6	E7-R	1	E
GV7	LCR-2	E6-7	E7-R	1	E
GV8	LCR-2	E6-9	E7-R	1	E
GV9	LCR-3	E6-R	E7-R	5	E
GV10	LCR-4	E6-2	E7-R	1	E
GV11	LCR-5	E6-2	E7-R	1	E
GV12	LCR-6	E6-2	E7-R	1	E
GV13	LCR-7	E6-2	E7-R	1	E
GV14	LCR-8	E6-3	E7-1	1	E
GV15	LCR-9	E6-2	E7-R	1	E
GV16	LCR-10	E6-4	E7-2	1	E
GV17	LCR-11	E6-R	E7-R	1	E
GV18	LCR-12	E6-R	E7-R	1	E
GV19	LCR-13	E6-1	E7-R	1	E
GV20	LCR-14	E6-R	E7-R	1	E
GV21	LCR-15	E6-R	E7-1	3	E
GV22	LCR-16	E6-R	E7-R	1	E
GV23	LCR-17	E6-2	E7-R	1	E
GV24	LCR-18	E6-R	E7-R	1	E
GV25	LCR-19	E6-2	E7-R	3	E
GV26	LCR-20	E6-2	E7-R	1	E
GV27	LCR-21	E6-2	E7-R	1	E
GV28	LCR-22	E6-R	E7-1	1	E
GV29	LCR-23	E6-2	E7-R	1	E
GV30	LCR-24	E6-2	E7-R	1	E
GV31	LCR-25	E6-R	E7-R	1	E
GV32	LCR-26	E6-8	E7-3	1	Af
GV33	LCR-27	E6-R	E7-R	2	E
GV34	LCR-28	E6-2	E7-R	1	E
GV35	LCR-29	E6-2	E7-R	2	E
GV36	LCR-30	E6-R	E7-R	1	E

GV37	LCR-31	E6-2	E7-R	1	E
GV38	LCR-32	E6-10	E7-R	1	E
GV39	LCR-33	E6-R	E7-R	1	E
GV40	LCR-32	E6-1	E7-R	1	E

Uzorak s CIN II je imao inačicu u LCR području, dok su E6 i E7 potpuno nalikovale slijedu referentne inačice. Sveukupno, u 74 uzorka s CIN III i CIN II pronađena je 41 genomska inačica, njih 73 (98,6%) su pripadale europskoj grani, dok je jedna (1,4%) inačica pripadala afričkoj grani. (Slika 31)

5.7 Genomske inačice HPV 16 u invazivnim promjenama

Genomske inačice LCR područja HPV 16 iz 35 uzorka s karcinomom pločastih stanica i iz 11 uzorka s adenokarcinomom su prikazane na slici 27 i Slika 28.

[illegible]

Slika 27. Genomske inačice uzoraka s karcinomom pločastih stanica. LCR područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu

[illegible]

Slika 28. Genomske inačice uzoraka s adenokarcinomom. LCR područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu

Ukupno je nađeno 26 LCR inačica u uzorcima s karcinomom pločastih stanica, te 11 LCR inačica u uzorcima s adenokarcinomom. Jedan izolat u uzorcima s karcinomom pločastih stanica je potpuno nalikovao referentnom LCR slijedu. Analizirajući cijelo LCR područje (823 bp, nt 7155 do 82), nađeno je 34 nt substitucija u uzorcima s karcinomom pločastih stanica i 27 nt substitucija u uzorcima s adenokarcinomom.

Genetički najudaljenija inačica u uzorcima s karcinomom pločastih stanica razlikovala se od referentnog HPV 16 u 15 nt, a maksimalna varijabilnost LCR genomskog područja u uzorcima s karcinomom pločastih stanica je bila 1,8%.

Genetički najudaljenija inačica u uzorcima s adenokarcinomom razlikovala se od referentnog HPV 16 u 16 nt, a maksimalna varijabilnost LCR genomskog područja u uzorcima s adenokarcinomom je bila 1,9%.

Najčešća inačica u uzorcima s karcinomom pločastih stanica je bila 16-LCR-17, s dvije mutacije (G7193T i G7521A), a koja je nađena u 4/35 (11%) izolata. U uzorcima s adenokarcinomom sve inačice su bile jednako zastupljene, svaka 9%, a niti jedan izolat nije nalikovao referentnom slijedu.

Genomske inačice E6 područja HPV 16 iz 35 uzoraka s karcinomom pločastih stanica i 11 uzoraka s adenokarcinomom su prikazane na slici 29.

		E7						
		7	7	7	7	8	8	
		1	3	8	9	0	2	
HPV16		2	2	9	5	2	2	f
Reference	16-E7-R	c	t	t	t	g	a	32
SCC	16-E7-1			c	g			1
	16-E7-2						g	2
		7	7	7	7	8	8	
		1	3	8	9	0	2	
HPV16		2	2	9	5	2	2	f
Reference	16-E7-R	c	t	t	t	g	a	8
AC	16-E7-1						g	2
	16-E7-2			c	c	g		1

Slika 30. Genomske inačice uzoraka s karcinomom pločastih stanica i adenokarcinomom. E7 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija, označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu

Ukupno je nađeno 3 E7 inačice u uzorcima s karcinomom pločastih stanica i 3 E7 inačice u uzorcima s adenokarcinomom. Referentnom slijedu E7 potpuno je nalikovalo 32 (91,4%) izolata u uzorcima s karcinomom pločastih stanica i 8 (72,7%) izolata u uzorcima s adenokarcinomom.

Analizirajući cijeli E7 slijed (297 bp, nt 562 do 858), nađene su 3 nt substitucije u uzorcima s karcinomom pločastih stanica i 4 nt substitucije u uzorcima s adenokarcinomom. Maksimalna varijabilnost E7 genomskog područja u uzorcima s karcinomom pločastih stanica je bila 0,6% (2nt), dok je maksimalna varijabilnost E7 područja u uzorcima s adenokarcinomom bila 1,0% (3nt).

Nakon spajanja slijedova LCR, E6 i E7 područja za svaki pojedini izolat, u 35 uzorka s karcinomom pločastih stanica je nađeno 30 različitih genomskih inačica. (Tablica 18).

Tablica 18. Genomske inačice u uzorcima s karcinomom pločastih stanica; R-
inačice koje potpuno nalikuju slijedu referentnog HPV 16. N –broj inačica. E –
Europska grana, NA – Sjevernoamerička grana

Genomska inačica	LCR inačica	E6 inačica	E7 inačica	N	Grana
GV1	LCR-R	E6-R	E7-R	1	E
GV2	LCR-1	E6-1	E7-R	2	E
GV3	LCR-1	E6-2	E7-R	1	E
GV4	LCR-2	E6-R	E7-R	1	E
GV5	LCR-3	E6-R	E7-R	1	E
GV6	LCR-4	E6-R	E7-R	1	E
GV7	LCR-5	E6-R	E7-R	1	E
GV8	LCR-6	E6-R	E7-R	1	E
GV9	LCR-7	E6-3	E7-R	1	E
GV10	LCR-7	E6-4	E7-R	1	E
GV11	LCR-7	E6-5	E7-R	1	E
GV12	LCR-8	E6-6	E7-1	1	NA
GV13	LCR-9	E6-R	E7-R	1	E
GV14	LCR-10	E6-R	E7-R	1	E
GV15	LCR-11	E6-R	E7-R	1	E
GV16	LCR-12	E6-7	E7-R	2	E
GV17	LCR-13	E6-R	E7-R	1	E
GV18	LCR-12	E6-8	E7-R	1	E
GV19	LCR-14	E6-R	E7-R	1	E
GV20	LCR-15	E6-R	E7-R	1	E
GV21	LCR-16	E6-R	E7-R	1	E
GV22	LCR-17	E6-9	E7-R	4	E
GV23	LCR-18	E6-10	E7-R	1	E
GV24	LCR-19	E6-9	E7-R	1	E
GV25	LCR-20	E6-R	E7-R	1	E
GV26	LCR-21	E6-R	E7-R	1	E

GV27	LCR-22	E6-R	E7-R	1	E
GV28	LCR-23	E6-R	E7-2	1	E
GV29	LCR-24	E6-R	E7-2	1	E
GV30	LCR-25	E6-R	E7-R	1	E

Nakon spajanja slijedova LCR, E6 i E7 područja, u 11 uzorka s adenokarcinomom je nađeno 11 različitih genomskih inačica. (Tablica 19).

Tablica 19. Genomske inačice u uzorcima s adenokarcinomom; R- inačice koje potpuno nalikuju slijedu referentnog HPV 16. N – broj inačica. E – Europska grana, AA – Azijskoamerička grana

Genomska inačica	LCR inačica	E6 inačica	E7 inačica	Frekvencija	Grana
GV-1	LCR-1	E6-R	E7-1	1	E
GV-2	LCR-2	E6-1	E7-R	1	E
GV-3	LCR-3	E6-2	E7-R	1	E
GV-4	LCR-4	E6-3	E7-R	1	E
GV-5	LCR-5	E6-4	E7-2	1	AA
GV-6	LCR-6	E6-5	E7-R	1	E
GV-7	LCR-7	E6-5	E7-R	1	E
GV-8	LCR-8	E6-5	E7-R	1	E
GV-9	LCR-9	E6-R	E7-1	1	E
GV-10	LCR-10	E6-R	E7-R	1	E
GV-11	LCR-11	E6-R	E7-R	1	E

Sveukupno gledajući za uzorke s karcinomom pločastih stanica i uzorke s adenokarcinomom, 44 (95%) izolata koji se grupiraju u 41 genomske inačice pripadaju europskoj grani, jedan izolat (2.5%) pripada sjevernoameričkoj grani (jedan uzorak s karcinomom pločastih stanica), te jedan (2.5%) pripada azijskoameričkoj grani (jedan uzorak s adenokarcinomom). (Slika 31).



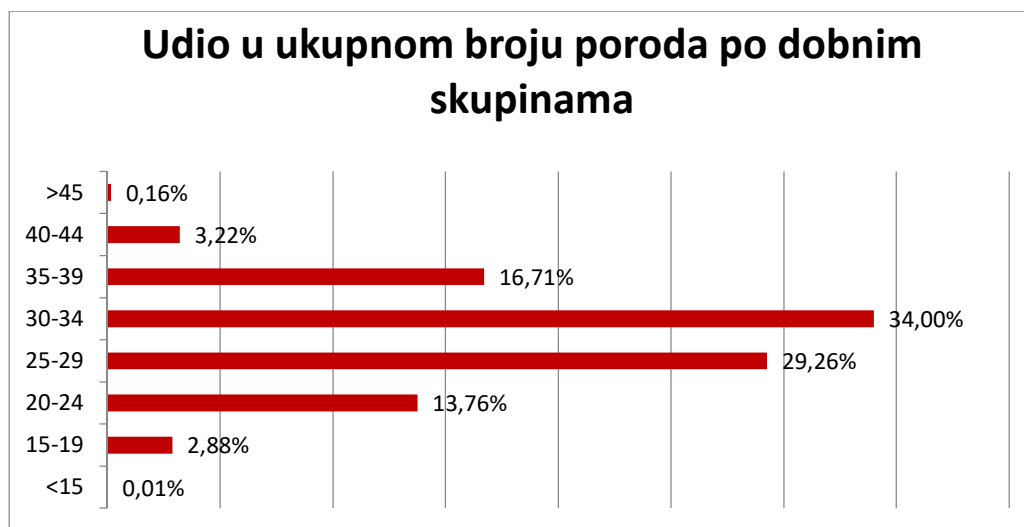
Slika 31. Filogenetsko stablo HPV 16 inačica u bolesnica s HSIL i karcinomom vrata maternice u Hrvatskoj

6 Rasprava

Rak vrata maternice zauzima 10. mjesto po učestalosti sijela raka u žena u Hrvatskoj.¹⁵ U žena fertile dobne skupine (dobne skupine 20-29, 30-39 i 40-49) spada među 3 najčešća raka, te stoga predstavlja značajan javno-zdravstveni problem koji se potencijalno negativno odražava i na demografsku statistiku u Hrvatskoj.

Prosječna dob prvorotkinja 1960. godine bila je 23,5 godina, 90-ih godina je ta dob bila 24,3 godine. Idućih desetljeća trend odgađanja rađanja se nastavio, te je 2015. godine prosječna dob prvorotkinje bila 28,6 godina.¹⁶⁷

Prema dobi majke, najveći udio u porodicama od 34% odnosi se na skupinu roditelja starijih 30-34 godina, slijede porodi od majki u dobi 25-29 godine u udjelu od 29,26%, 16,71% poroda je od majki u dobi 35-39 godine, a svi ostali porodi su u znatno manjem udjelu.¹⁶⁸ (Slika 32)



Slika 32. Rodilje prema dobi u rodilištima Hrvatske u 2016. godini

U 2015. godini je bilo 280 novootkrivenih slučajeva oboljelih od raka vrata maternice, od toga je bilo najviše u žena dobi 45-59 godina - 99 (35,4%). Za ca in situ vrata maternice stope incidencije su najviše u dobi 30-34 godine.¹⁵ Odnos između karcinoma in situ i invazivnog raka vrata maternice je u 2015. godini u Hrvatskoj bio 1,7:1. Taj odnos u 2011. godini je bio 2:1.¹⁵

Broj novootkrivenih pacijentica od 2010. godine je relativno stacionaran. (Tablica 20)

Tablica 20. Broj novooboljelih od raka vrata maternice u Hrvatskoj po godinama

Godina	2010.	2011.	2012.	2013.	2014.	2015.	2017.
Broj novooboljelih	320	324	315	339	307	280	305

Uočljivo je da su stope incidencije Ca in situ vrata maternice najviše u dobnoj skupini 30-34 godine, jednako kao i broj poroda. Preinvazivne i invazivne lezije vrata maternice predstavljaju značajan i opstetrički problem, obzirom da pacijentice liječene nekom od kirurških metoda imaju značajno povišen rizik od komplikacija u budućim trudnoćama u smislu pobačaja i prijevremenog poroda.^{169, 170} Stoga, visoka stopa incidencije od preinvazivnih i invazivnih bolesti vrata maternice predstavlja veliki problem ne samo na osobnoj razini oboljele žene koja želi trudnoću, nego se taj problem negativno odražava na demografsku statistiku države.

U našem istraživanju najveći broj pacijentica s dijagnozom HSIL je bio u dobnoj skupini od 31-39 (81 od 319, tj. 25%), a broj pacijentica s dijagnozom karcinoma je bio podjednak u dobnim skupinama 31-39 godina i 40-49 godina (29 u svakoj skupini od ukupno 105 pacijentica s dijagnozom karcinoma). Upravo prema tim dobnim skupinama treba usmjeriti pozornost u smislu rane dijagnoze i liječenja, a kako bi se smanjila stopa incidencije od raka vrata maternice ali i spriječila potencijalne

opstetričke komplikacije u mlađoj dobnoj skupini (31-39) jer je ukupni broj poroda u toj dobnoj skupini u 2016. godini (Slika 32) bio 50,71%.

Stopa incidencije raka vrata maternice u Hrvatskoj prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo je 12,9/100.000 žena, a incidencija karcinoma in situ vrata maternice je 22,2/100.000.¹⁵ Najveći broj pacijentica je otkriven u ranom stadiju bolesti (FIGO I – 100 pacijentica). Mortalitet od raka vrata maternice je 5,1/100 000 žena.¹⁵

Globalno je evidentna razlika u razvijenim i nerazvijenim zemljama. Naime, u razvijenim zemljama godišnje se otkrije oko 70 tisuća novooboljelih, a umre oko 27 tisuća, dok je u slabije razvijenim zemljama disparitet novooboljelih i umrlih puno veći, novooboljelih oko 69 tisuća i umrlih oko 50 tisuća.¹⁷¹

Usporedimo li dobno standardizirane stope za incidenciju i mortalitet od raka vrata maternice u Europi, također su vidljive znatne razlike po geografsko-gospodarskoj raspodjeli.¹⁷¹ (Tablica 2**Error! Reference source not found.**1).

Tablica 21. Incidencija, mortalitet (*dobno standardizirana stopa, svjetski standard /100 000) i broj novootkrivenih slučajeva u Europi po regijama

	Incidencija *	Mortalitet *	Broj novootkrivenih slučajeva (tisuće)
Europa	11,2	3,8	61,07
Centralna i istočna Europa	16,0	3,4	35,9
Sjeverna Europa	9,5	2,1	6,3
Južna Europa	7,8	2,2	9,1
Zapadna Europa	6,8	2,1	9,6

Dobno standardizirana stopa incidencije od 12,9 u Hrvatskoj je niža od zemalja u regiji, ali još uvijek dvostruko viša od one u razvijenim zemljama.

Trajna infekcija onkogenim tipovima HPV je povezana s nastankom raka vrata maternice i preinvazivnih lezija vrata maternice. Bez obzira na regionalna odstupanja u razdiobi različitih tipova HPV-a najčešći onkogeni tipovi HPV-a u cijelom svijetu su HPV 16 i HPV 18. Oni su odgovorni za nastanak više od 70% svih karcinoma vrata maternice, a kada im se pribroje HPV 45 i HPV 31, imamo uzročnike 80% slučajeva raka vrata maternice.¹⁶⁻¹⁸ HPV 16 ima najveći onkogeni potencijal i dominantan je u svim dijelovima svijeta.

U Hrvatskoj je provedeno nekoliko istraživanja o distribuciji HPV tipova.¹⁷²⁻¹⁷⁹ ali još nije sustavno proučavana prevalencija HR HPV-a u tkivu pacijentica s histološki dokazanim HSIL-om i karcinoma vrata maternice. Tri istraživanja provedena s ciljem otkrivanja distribucije HPV tipova u uzorcima cervikalnih briseva uzetih od žena s abnormalnim nalazima PAPA testa. Četiri istraživanja su bila usmjerena na detekciju prevalencije HPV tipova u općoj populaciji.^{172, 174, 175} U jednom istraživanju je određivana prevalencija HR HPV bez određivanja tipova, HPV HR je bio pozitivan u 34,6% slučajeva.¹⁷⁶ (Tablica 22).

Tablica 22. Istraživanja o distribuciji HPV tipova u Hrvatskoj; *istraživanja provedena na općoj populaciji

Istraživanje	Distribucija HPV tipova
Grce M. (1997)	HPV 16 (20,2%), HPV 31 (17,8%)
Grahovac M. (2007)*	HPV 16 (60,4%), HPV 31 (8,5%), HPV 33 (6,6%), HPV 18 (3,7%)
Kaliterna V. (2007)*	HPV 16 (10%), HPV 18 (6,1%), HPV 31 (2,6%), HPV 33 (1,9%)
Milutin-Gašperov N. (2007)	HPV 16 (15,9%), HPV 31 (8,7%), HPV 33 (3,8%), HPV 18 (2,3%)
Roksandić-Križan (2013)	HPV 16 (27,6%), HPV 31 (11,8%), HPV 51 (10,2%), HPV 52 (10,2)
Kaliterna V. (2013)*	HPV 16 (15,9%), HPV 18 (7,8%), HPV 31 (2,3%), HPV 33 (1,1%)
Sabol I. (2017)*	HPV 16 (19,8%), HPV 31 (8,3%), HPV 33 (3,1%), HPV 18 (3,8%), HPV 52 (4,8%), HPV 58 (3,3%) <u>HPV 16 HSIL (33,3%), HPV 16 Ca Cervicis (60,9%)</u>

Rezultati pokazuju da je u svim istraživanjima HPV 16 najčešći, dok je udio ostalih tipova u infekcijama različit.

Od navedenih istraživanja najobuhvatnije u procjeni HPV tipova u Hrvatskoj je istraživanje provedeno 2017. godine (Sabol i suradnici) na 4432 uzorka cervikalnih briseva i 35 parafinskih uzoraka raka vrata maternice, prikupljenih tijekom perioda od 16 godina.¹⁷⁹ Od ukupnog broja uzoraka, njih 36,3% je bilo pozitivno na HPV-HR. Samo 1% uzoraka je imalo potvrđeno patohistološku dijagnozu raka vrata maternice, a 27,9% je bilo s citološkom dijagnozom HSIL.¹⁷⁹ U uzorcima s HSIL po učestalosti su izolirani sljedeći HPV tipovi: HPV 16, HPV 31, HPV 52, HPV 18 i HPV 58. U uzorcima s karcinomom su po učestalosti bili: HPV 16, HPV 33, HPV 45, HPV 18, HPV 31 i HPV

58. Unatoč velikom broju uzoraka, ovo istraživanje je imalo relativno mali broj uzoraka s najtežim dijagnozama, a četvrtina pacijentica je bila dobi mlađoj od 25 godina. Obzirom na činjenicu o spontanoj prolaznosti HPV infekcija i regresiji abnormalnog citološkog nalaza nižeg stupnja (a takvih je bilo 71,1% uzoraka), osobito kod pacijentica mlađe životne dobi, ovo istraživanje možemo smatrati značajnim za procjenu distribucije HPV tipova u općoj populaciji, ali ne i u populaciji pacijentica s najtežim dijagnozama, a upravo su te pacijentice su od najvećeg kliničkog značaja.

2007. godine je provedeno istraživanje Hadžisejdić i suradnika o distribuciji HPV tipova u parafinskim uzorcima (n=102) s dokazanom patohistološkom dijagnozom adenokarcinoma.¹⁸⁰ U uzorcima s adenokarcinomom i adenokarcinomom in situ najčešći je bio HPV 18, a u uzorcima s adenoskvamoznim karcinomom je najčešći bio HPV 16.¹⁸⁰

U naše istraživanje je bilo uključeno 373 pacijentice s patohistološki potvrđenim dijagnozama, a HPV 16 je također bio dominantan u svim uzorcima.

U preinvazivnim promjenama HPV 16 je bio najčešći genotip, ukupno je izoliran u 127/219 (57,9%) uzoraka. Nakon njega po učestalosti su bili: HPV 31 u 28 (12,8%), HPV 33 u 15 (6,8%), HPV 58 u 14 (6,4%), HPV 52 u 13 (5,9%), HPV 18 u 10 (4,6%) i HPV 45 u 7 (3,2%) uzoraka. Višestruke infekcije u preinvazivnim promjenama su nađene u 43 (19,6%) uzorka.

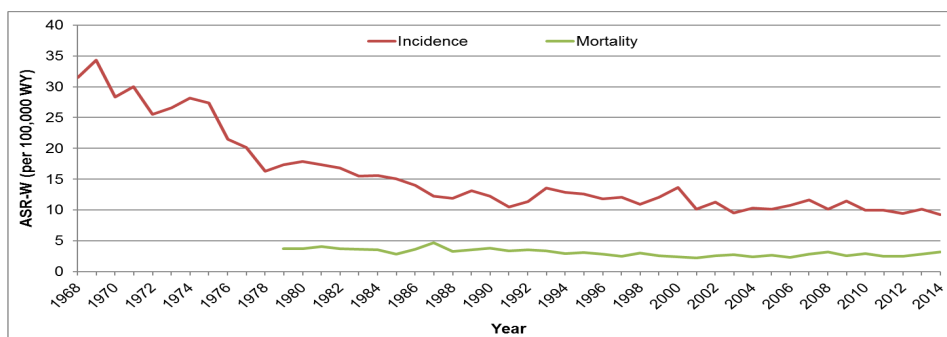
U uzorcima s karcinomom pločastih stanica također je dominantno izoliran HPV 16 – u 46/69 (66,7%) uzoraka. Od ostalih tipova po učestalosti su izolirani: HPV 31 je izoliran u 10 (14,5%), HPV 45 u 5 (7,2%), HPV 18 u 5 (7,2%) i HPV 33 u 4 (5,8%) uzorka. Višestrukih infekcija je bilo 14 (20,3%).

U uzorcima s adenokarcinomom HPV 16 je izoliran u 18/36 (50,0%) uzoraka. HPV 18 je izoliran u 15 (41,7%), a HPV 45 u 2 (5,6%) uzoraka. Višestrukih infekcija je bilo u 7 (19,4%) uzoraka. (Tablica 23)

Tablica 23. Distribucija najučestalijih HPV tipova po patohistološkim dijagnozama

	HPV 16	HPV 31	HPV 33	HPV 18	HPV 45	HPV 58	HPV 52	<u>VIŠESTRUKÉ INFEKCIJE</u>
PREINVAZIVNE PROMJENE	57,9%	12,8%	6,8%	4,6%	3,2%	6,4%	5,9%	<u>19,6%</u>
KARCINOM PLOČASTIH STANICA	66,7%	14,5%	5,8%	7,2%	7,2%			<u>20,3%</u>
ADENOKARCINOM	50,0%			41,7%	5,6%			<u>19,4%</u>

U Hrvatskoj postoji dugogodišnja tradicija edukacije citologa i citodijagnostičara s dobro organiziranom mrežom citoloških laboratorija koja omogućuje upotrebu konvencionalnog PAPA testa kao dijagnostičkog testa s visokom stopom točnosti od 97,2%.^{93, 181} Metoda probira je oportunistička, s relativno niskom stopom pokrivenosti populacije od 68%.^{93, 181, 182} Unatoč dugogodišnjoj tradiciji oportunističkog probira, u posljednja dva desetljeća se ne bilježi više tako izraziti pad incidencije raka vrata maternice.¹⁷⁹ (Slika 33 **Error! Reference source not found.**). Još od 2007. se naglašava potreba uvođenja organiziranog probira s ciljem daljnjeg smanjenja incidencija raka vrata maternice.^{183, 184}



Slika 33. Dobno standardizirana stopa incidencije i mortaliteta (na 100.000 žena) od raka vrata maternice u Hrvatskoj od 1968. Do 2014. Godine. Preuzeto iz: Sabol I, Gašperov NM, Matovina M, Božinović K, Grubišić G, Fistončić I, i sur. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. PloS one. 2017; 12(7): e0180480. doi: 10.1371/journal.pone.0180480

Obzirom na nezadovoljavajuće stanje u prevenciji raka vrata maternice, u studenom 2012. godine je pokrenut Nacionalni program ranog otkrivanja raka vrata maternice. Cilj programa je bio smanjenje incidencije raka vrata maternice za 60%-70% u dobnoj skupini žena od 25-64 godine osam godina od početka programa te smanjenje mortaliteta od raka vrata maternice za 80% u dobnoj skupini 25-70 godina 13 godina od početka programa, uz obuhvat 85% ciljane populacije programom ranog otkrivanja raka vrata maternice tijekom tri godine od početka programa.¹⁸⁵ Rezultati programa nisu poznati, možemo smatrati da je bio neuspješan zbog nepostojanja informatičke potpore, loše pripreme i nekoordiniranosti na više razina. U praksi je probir i dalje oportunistički, s velikim brojem pacijentica kojima se učestalo (nepotrebno) ponavljaju PAPA testovi. U tijeku je reevaluacija programa, uz potencijalno uvođenje novih metoda probira (HPV tipizacija u dobnoj skupini 30-35 godina). Kao dobar primjer uspješno provedenog nacionalnog probira može poslužiti Slovenija, koja je postigla

40% sniženje incidencije raka vrata maternice u roku od 6 godina od početka uvođenja programa.^{186, 187}

Uz navedeno, od 2007. godine su dostupna HPV cjepiva, kao mjera primarne prevencije^{142, 186}. Cijepljenje protiv infekcije HPV-om sve od registracije cjepiva pa do 2015. godine je bilo samo preporučeno, ali ne i financirano. Od 2015. godine cijepljenje je u redovitom programu, kao preporučeno neobavezno cjepivo. Od školske godine 2017/2018 cijepi se besplatno djevojčice i dječaci u osmom razredu osnovne škole te djeca iste dobi koja ne pohađaju školu.¹⁸⁸ Na žalost odaziv na cijepljenje u Hrvatskoj je izuzetno nizak, oko 10%, što je povezano s negativnom percepcijom javnosti te nedovoljnom edukacijom i informiranosti o sigurnosti cjepiva i koristi za zdravlje. Potrebna je intenzivna javno-zdravstvena aktivnost kako bi se povećao pozitivan stav o cjepivu prvenstveno roditelja, čemu bi uvelike doprinijelo postojanje jasnih preporuka Ministarstva zdravstva.

Za svaku državu je važno procijeniti prevalenciju HPV tipova prije implementacije profilaktičkih cjepiva, a u Hrvatskoj te podatke imamo zahvaljujući dosadašnjim istaživanjima.¹⁷²⁻¹⁷⁹ Obzirom da je prevalencija HPV tipova određivana uglavnom u općoj populaciji, zatim u populaciji s abnormalnim citološkim nalazima koji nisu potvrđeni patohistološkim dijagnozama, ili u mlađoj populaciji za koju je poznato da velika većina infekcija HPV prolazi spontano, cilj našeg istraživanja bio je istražiti distribuciju HPV tipova u uzorcima tkiva s patohistološki potvrđenim dijagnozama (preinvazivnih lezija i karcinoma gdje s dokazanom prisutnosti HPV-a, kako bismo znali koji tipovi HPV-a dovode do progresivnih lezija i karcinoma. Naši rezultati potvrđuju da je HPV 16 dominantan i u preinvazivnim i u invazivnim lezijama, dok su ostavi tipovi nađeni u nižoj učestalosti. HR HPV tipovi koje sadrži najnovije devetvalentno cjepivo su izolirani u 91,5% naših uzoraka s patohistološkim

dijagnozama HSIL i karcinoma vrata maternice što znači da bi se najveći dio preinvazivnih lezija i karcinoma mogao prevenirati obuhvatnijom implementacijom cijepljenja ciljane populacije. K tome treba nadodati da je cjepivo izuzetno sigurno, najčešća nuspojava je crvenilo na mjestu uboda.¹⁸⁹ Nije dokazana veća učestalost Guillain-Barre sindroma u cijepljene populacije u usporedbi s necijepljenom.¹⁹⁰

U ovom istraživanju je po prvi put istraživana genomska raznolikost HPV 16, najčešćeg uzročnika HSIL i karcinoma cerviksa kod pacijentica u Hrvatskoj. Pretpostavlja se da neke inačice imaju povećan onkogeni potencijal.

LCR je najvarijabilnija regija u genomu HPV 16 u različitim populacijama,¹⁹¹⁻¹⁹⁴ a bila je najvarijabilnija i u našoj studiji. HPV E7 regija je bila vrlo stabilna, s minimalnim promjenama u genomu. Genomska varijanta T350G HPV 16 pronađena je u 45/72 (62,5%) izolata u HSIL uzorcima, u 15/35 (42,8%) izolata u uzorcima karcinoma skvamoznih stanica i 7/11 (63,6%) izolata u uzorcima adenokarcinoma.

Neke prethodne studije^{5, 193, 195, 196} pokazale su snažniji onkogeni potencijal ne-europskih genomskih varijanti, dok druge studije^{44, 197, 198} nisu podržale ovaj nalaz. U njemačkoj studiji pokazalo se da je onkogeni potencijal azijsko-američkih ili sjevernoameričkih loza pod utjecajem polimorfizama u LCR-u i vjerojatno u drugim regijama virusnih genoma. Nasuprot tome, čini se da je u europskoj liniji ovaj fenomen povezan s promjenama E6 regiji, a ne LCR regiji.³⁸ U europskim HPV 16 izolatima, polimorfizmi u LCR regiji su češći nego u E6.³⁸

U slovenskom istraživanju,³⁶ ne-europske varijante pronađene su u samo 5% uzoraka karcinoma cerviksa, što potvrđuje zaključke o tome da europske varijante prevladavaju u etnički homogenim populacijama europskih žena. U našoj studiji od sveukupno 74 uzorka s HSIL pronađena je 41 genomska inačica, njih 73 (98,6%) su

pripadale europskoj grani, dok je jedna (1,4%) inačica pripadala afričkoj grani, dok gledajući uzorke s karcinomom pločastih stanica i s adenokarcinomom, 44 (95%) izolata koji se grupiraju u 41 genomske inačice pripada europskoj grani, jedan izolat (2,5%) pripada sjevernoameričkoj grani (jedan uzorak s karcinomom pločastih stanica), te jedan (2,5%) pripada azijskoameričkoj grani (jedan uzorak s adenokarcinomom).

U našem istraživanju koje uključuje bolesnice s HSIL i karcinomom vrata maternice iz Hrvatske, u većini su nađene europske genomske inačice HPV 16.

Ova studija pruža važne informacije o genetskoj varijabilnosti HPV 16 u jugoistočnoj Europi. HPV 16 je najčešći onkogeni genotip širom svijeta, a genomske inačice izolirane u uzorcima karcinoma cerviksa predstavljaju većinu onkogenih inačica. Nedostatak naše studije je mali broj analiziranih uzoraka zbog ograničenih financijskih sredstava.

Naši rezultati podupiru prijašnja otkrića da se uglavnom europske inačice HPV 16 mogu naći u etnički homogenim europskim populacijama, ali daljnje studije su neophodne kako bi se dobile više informacija o genomskoj raznolikosti HPV 16 kod pacijenata s karcinomom cerviksa u ovom dijelu Europe.

Osim što naši podaci daju uvid u distribuciju HPV tipova u histološki potvrđenim lezijama, jednako tako mogu biti podloga za daljnja istraživanja i praćenje utjecaja cijepljenja na kontrolu incidencije preinvazivnih lezija i raka vrata maternice u našoj populaciji, kao i u procjeni promjene u incidenciji i distribuciji različitih HPV tipova, kao i njihovih inačica.

7 Zaključak

U ovom istraživanju po prvi put je istražena distribucija HPV tipova i genomski raznolikost HPV 16 u uzorcima tkiva s patohistološki potvrđenom dijagnozom HSIL i karcinoma vrata maternice u pacijentica u Hrvatskoj.

HPV-16 bio je najčešće otkriveni genotip u ispitivanim uzorcima, bez obzira na patohistološku dijagnozu. Sveukupno, HPV-16 otkriven je u 212 od 358 uzoraka (59,2%): u 166 uzoraka s jednostrukom infekcijom i u 46 uzoraka s višestrukom infekcijom. Prevalencija ostalih visoko rizičnih genotipova HPV-a u uzorcima bila je sljedeća: HPV-31 u 45 (12,6%), HPV-18 u 24 (6,7%), HPV-33 u 22 (6,1%), HPV-52 (5,6%) i HPV-58 (5,0%)

Višestrukih HPV infekcija bilo je 76 (20,4%).

U preinvazivnim promjenama HPV 16 bio je najčešći genotip, ukupno izoliran u 127/219 (57,9%) uzoraka. Ostali izolirani tipovi po učestalosti su bili: HPV 31 u 28 (12,8%), HPV 33 u 15 (6,8%), HPV 58 u 14 (6,4%), HPV 52 u 13 (5,9%), HPV 18 u 10 (4,6%) i HPV 45 u 7 (3,2%) uzorka. U 8/219 (3,7%) uzoraka je HPV bio negativan. Višestruke infekcije u preinvazivnim promjenama su nađene u 43 (19,6%).

U uzorcima s karcinomom pločastih stanica također je dominantno izoliran HPV 16 u 46/69 (66,7%) uzoraka. Ostali tipovi po učestalosti su bili: HPV 31 u 10 (14,5%), HPV 45 u 5 (7,2%), HPV 18 u 5 (7,2%) i HPV 33 u 4 (5,8%)

uzorka. Višestrukih infekcija bilo je 14 (20,3%). HPV je bio negativan u 3/69 (4,3%) uzorka, a višestrukih infekcija je bilo 14/69 (20,3%).

U uzorcima s adenokarcinomom HPV 16 je izoliran u 18/36 (50%) uzoraka. HPV 18 je izoliran u 15 (41,7%), a HPV 45 u 2 (5,6%) uzoraka. Višestrukih infekcija je bilo u 7/36 (19,4%) uzoraka, a negativnih na HPV je bilo 4/36 (11,1%).

Nije dokazana statistički značajna razlika u razdiobi jednostrukih i višestrukih infekcija u uzorcima prema različitim patohistološkim dijagnozama.

U 74 uzorka s HSIL pronađena je 41 genomski inačica, njih 73 (98,6%) su pripadale europskoj grani, dok je jedna (1,4%) inačica pripadala afričkoj grani.

Najčešća inačica u uzorcima s HSIL je imala dvije mutacije (G7193T i G7521A), koja je nađena u 25/74 (34,2%) izolata.

U 35 uzorka s karcinomom pločastih stanica je nađeno 30 različitih genomskih inačica, a u 11 uzorka s adenokarcinomom je nađeno 11 različitih genomskih inačica.

Sveukupno gledajući za uzorke s karcinomom pločastih stanica i uzorke s adenokarcinomom, njih 44 (95%) izolata pripadaju europskoj grani, jedan

izolat (2,5%) pripada sjevernoameričkoj grani (jedan uzorak s karcinomom pločastih stanica), te jedan (2,5%) pripada azijskoameričkoj grani (jedan uzorak s adenokarcinomom).

Genomska inačica T350G HPV 16 je nađena u 45/73 (61,6%) izolata u uzorcima s HSIL, u 15/35 (42,8%) izolata u uzorcima s karcinomom pločastih stanica, te u 6/11 (54,5%) izolata u uzorcima s adenokarcinomom.

Očekivano, najviše mutacija HPV16 je pronađeno u genskom području LCR, a najmanje u genu E7.

HPV16 varijante iz naših uzoraka uglavnom potječu iz europske linije (E).

U našem istraživanju najveći broj pacijentica s dijagnozom HSIL je bio u dobnoj skupini od 31-39 (81/319, tj. 25%), a broj pacijentica s dijagnozom karcinoma je bio podjednak u dobnim skupinama 31-39 godina i 40-49 godina (29 u svakoj skupini od ukupno 105 pacijentica s dijagnozom karcinoma).

Srednja dob pacijentica s preinvazivnim lezijama (HSIL) je bila 36,07 godina, a pacijentica s invazivnim lezijama (planocelularni karcinom i adenokarcinom vrata maternice) je bila 46,35 godina.

Pacijentice s invazivnim promjenama imale su statistički značajnu ($p \leq 0.05$) veću srednju dob, veći broj poroda i češće su pušile u odnosu na pacijentice s negativnim nalazom i pacijentice s preinvazivnim promjenama.

Ne postoji statistički značajna razlika u broju pobačaja i dobi menarhe.

Svi najčešće nađeni tipovi HPV u preinvazivnim lezijama i karcinomima iz našeg istraživanja su tipovi protiv kojih je usmjereno najnovije devet-valentno cjepivo što znači da bi se najveći dio preinvazivnih lezija i karcinoma (91,5%) mogao prevenirati obuhvatnijom implementacijom cijepljenja ciljane populacije.

Dobiveni podaci daju uvid u distribuciju HPV tipova u patohistološki potvrđenim lezijama te mogu biti polazište za daljnja istraživanja i praćenje utjecaja cijepljenja na kontrolu incidencije preinvazivnih lezija i raka vrata maternice u našoj populaciji.

8 Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku

Cilj istraživanja bio je analizirati distribuciju HR-HPV tipova u bolesnica s HSIL i karcinomom vrata maternice, te utvrditi učestalost HPV 16 genomskih inačica u premalignim i malignim promjenama.

HPV-DNA je izolirana iz 373 uzorka pacijentica s HSIL i karcinomom vrata maternice.

Najčešći tip u HSIL bio je HPV 16 (57,9%), zatim HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 52, HPV 18 i HPV 45 (12,8%, 6,8%, 6,4%, 5,9%, 4,6% i 3,2%). HPV 16 je bio dominantan u karcinomu pločastih stanica (66,7%), ostali tipovi su bili: HPV 31, HPV 45, HPV 18 i HPV 33 (14,5%, 7,2%, 7,2% i 5,8%) uzorka. U adenokarcinomu HPV 16 bio je u 50,0%, HPV 18 u 41,7% a HPV 45 u 5,6% uzoraka. Određene su HPV16 inačice za 130 HPV16 pozitivnih uzoraka. U 74 uzorka HSIL-a pronađena je 41 inačica, 98,6% pripadalo je europskoj grani, a jedna (1,4%) afričkoj grani. Promatrajući uzorke karcinoma, 95% izolata svrstano u 41 varijantu pripadalo je europskoj grani, jedan izolat (2,5%) u Sjeverno Američkoj i jedan (2,5%) azijsko-američkoj grani.

HPV 16 je bio dominantan. HPV 16 varijante dominantno pripadaju europskoj grani bez obzira na patohistološku dijagnozu. Sveobuhvatnim cijepljenjem devetvalentnim HPV cjepivom mogla bi se prevenirati 91,5% premalignih i malignih llezija vrata maternice u Hrvatskoj.

9 Kratki sadržaj na engleskom jeziku

Molecular analysis of human papillomaviruses and HPV 16 variants in patients with high-grade cervical intraepithelial lesion and cervical carcinoma

Magdalena Karadža, MD

The aim of the study was to analyze the distribution of HR-HPV types in patients with HSIL and cervical carcinoma and to determine the incidence of HPV 16 genomic variants in premalignant and malignant changes.

HPV-DNA was isolated from 373 samples from patients with HSIL and cervical carcinoma. The most common type in HSIL was HPV 16 (57.9%), followed by HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 52, HPV 18 and HPV 45 (12.8%, 6.8%, 6.4%, 5.9%, 4.6% and 3.2%). HPV 16 was dominant in squamous cell carcinoma (66.7%), other types were: HPV 31, HPV 45, HPV 18 and HPV 33 (14.5%, 7.2%, 7.2% and 5.8%). In adenocarcinoma HPV 16 was in 50.0%, HPV 18 in 41.7% and HPV 45 in 5.6% samples. HPV16 variants were determined for 130 HPV16 positive samples. In 74 HSIL samples 41 variants were found, 98.6% belonged to the European branch, one (1.4%) to the African branch. Observing carcinoma samples, 95% isolates grouped in 41 variants belonged the European branch, one isolate (2.5%) the North American, and one (2.5 %) the Asian-American branch.

HPV 16 was dominant. HPV 16 variants dominantly belong to European branch regardless of pathohistological diagnosis. Comprehensive vaccination with the

nine-valent HPV vaccine could prevent 91.5% of premalignant and malignant cervical lesions in Croatia.

10 Popis literature

1. Basen-Engquist K, Paskett ED, Buzaglo J, Miller SM, Schover L, Wenzel LB, i sur. *Cervical cancer. Cancer.* 2003; 98(9 Suppl): 2009-14. doi: 10.1002/cncr.11681
2. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S3/11-25. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.111
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin.* 2005; 55(2): 74-108.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
5. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, i sur. *Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(11): 796-802.
6. zur Hausen H. *Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta.* 1996; 1288(2): F55-78.
7. Castellsague X. *HPV and Cervical Cancer in the World: 2007 report (Section I Continents and Regions). Vaccine.* 2007; 25: C1-C26.
8. Georgieva S, Iordanov V, Sergieva S. *Nature of cervical cancer and other HPV - associated cancers. J buon.* 2009; 14(3): 391-8.
9. Blumenthal PD, Gaffikin L. *Cervical cancer prevention: making programs more appropriate and pragmatic. Jama.* 2005; 294(17): 2225-8.
10. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer.* 2010; 127(12): 2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516
11. Baseman JG, Koutsky LA. *The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1: S16-24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008
12. Burd EM. *Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1): 1-17.
13. World Health Organisation. *Weekly Epidemiological Record. [Internet] Geneva: World Health Organisation; 2009, vol. 84, 15: 117-132. [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: <https://www.who.int/wer/2009/wer8415.pdf?ua=1>*
14. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. *Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer.* 2001; 37 Suppl 8: S4-66.
15. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. *Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Šekerija M. ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018; Bilten br. 40. [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf*
16. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol.* 2002; 55(4): 244-65.

17. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S3/26-34. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.026
18. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, i sur. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004; 111(2): 278-85. doi: 10.1002/ijc.20244
19. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1): 17-27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033
20. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401(1): 70-9. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002
21. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1: S1-6. doi: 10.1016/j.jcv.2004.10.021
22. Lizano M, Berumen J, Garcia-Carranca A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res*. 2009; 40(6): 428-34. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.06.001
23. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011; 128(4): 927-35. doi: 10.1002/ijc.25396
24. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, i sur. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641
25. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(3): 779-87.
26. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi 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. doi: 10.1093/jnci/djj067
27. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, i sur. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121(3): 621-32. doi: 10.1002/ijc.22527
28. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006; 118(5): 1071-6. doi: 10.1002/ijc.21655
29. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, i sur. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012; 86(12): 6855-61. doi: 10.1128/jvi.00483-12
30. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, i sur. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(17): 1325-30.

31. Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, Charoensri N. Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(2): 212-9. doi: 10.1016/j.ijid.2008.06.017
32. Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Briolat J, Birembaut P, Tommasino M, i sur. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res.* 2008; 131(1): 106-10. doi: 10.1016/j.virusres.2007.08.003
33. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, i sur. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology.* 2006; 350(1): 216-27. doi: 10.1016/j.virol.2006.01.038
34. Sabol I, Matovina M, Gasperov NM, Grce M. Identification of a novel human papillomavirus type 16 E1 gene variant with potentially reduced oncogenicity. *J Med Virol.* 2008; 80(12): 2134-40. doi: 10.1002/jmv.21304
35. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, i sur. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.* 2004; 74(1): 117-26. doi: 10.1002/jmv.20154
36. Vrtacnik Bokal E, Kocjan BJ, Poljak M, Bogovac Z, Jancar N. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010; 36(6): 1204-13. doi: 10.1111/j.1447-0756.2010.01316.x
37. Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol.* 2005; 96(3): 695-700. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.11.045
38. Kämmer C, Tommasino M, Syrjänen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, i sur. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *British journal of cancer.* 2002; 86(2): 269-73. doi: 10.1038/sj.bjc.6600024
39. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology.* 1985; 145(1): 181-5.
40. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, i sur. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997; 71(3): 2463-72.
41. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, i sur. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(4): 820-2. doi: 10.1158/1055-9965.epi-05-0864
42. Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, i sur. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer.* 2007; 120(8): 1763-8. doi: 10.1002/ijc.22481
43. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, i sur. Distribution of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Variants in Squamous Cell Carcinomas and Adenocarcinomas of the Cervix. *Cancer Research.* 2003; 63(21): 7215-20.
44. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human Papillomavirus 16 E6 Variants Are More Prevalent in Invasive Cervical Carcinoma than the Prototype. *Cancer Research.* 1998; 58(4): 829-33.

45. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(5): 525-41. doi: 10.1042/cs20050369
46. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 1993; 67(1): 315-22.
47. Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(10): 753-63. doi: 10.1038/nrc1973
48. Schiller JT LD. Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001; 23(3): 50/4.
49. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsague X, i sur. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol*. 2001; 54(3): 163-75.
50. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002; 24(3): 275-90.
51. Deng S-J, Pearce KH, Dixon EP, Hartley KA, Stanley TB, Lobe DC, i sur. Identification of peptides that inhibit the DNA binding, trans-activator, and DNA replication functions of the human papillomavirus type 11 E2 protein. *Journal of virology*. 2004; 78(5): 2637-41. doi: 10.1128/JVI.78.5.2637-2641.2003
52. Soeda E, Ferran MC, Baker CC, McBride AA. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology*. 2006; 351(1): 29-41. doi: 10.1016/j.virol.2006.03.016
53. McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol*. 2004; 12(12): 527-9. doi: 10.1016/j.tim.2004.10.002
54. Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, i sur. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol*. 2004; 78(2): 821-33.
55. Davy CE, Jackson DJ, Raj K, Peh WL, Southern SA, Das P, i sur. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol*. 2005; 79(7): 3998-4011. doi: 10.1128/jvi.79.7.3998-4011.2005
56. Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, i sur. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80(12): 1930-5. doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.013
57. Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, i sur. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol*. 1999; 73(9): 7297-307.
58. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J Virol*. 2005; 79(6): 3737-47. doi: 10.1128/jvi.79.6.3737-3747.2005
59. Helt AM, Funk JO, Galloway DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol*. 2002; 76(20): 10559-68.
60. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004; 109(2): 157-62. doi: 10.1002/ijc.11691
61. Cruz L, Biryukov J, Conway MJ, Meyers C. Cleavage of the HPV16 Minor Capsid Protein L2 during Virion Morphogenesis Ablates the Requirement for

- Cellular Furin during De Novo Infection. *Viruses*. 2015; 7(11): 5813-30. doi: 10.3390/v7112910
62. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*. 2010; 118(1 Suppl): S12-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004
 63. Taylor JR, Fernandez DJ, Thornton SM, Skeate JG, Luhen KP, Da Silva DM, i sur. Heterotetrameric annexin A2/S100A10 (A2t) is essential for oncogenic human papillomavirus trafficking and capsid disassembly, and protects virions from lysosomal degradation. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 11642. doi: 10.1038/s41598-018-30051-2
 64. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J*. 2010; 7: 11. doi: 10.1186/1743-422x-7-11
 65. Culp TD, Christensen ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*. 2004; 319(1): 152-61. doi: 10.1016/j.virol.2003.11.004
 66. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1: S7-15. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006
 67. Raybould R, Fiander A, Hibbitts S. Human papillomavirus integration and its role in cervical malignant progression. *The Open Clinical Cancer Journal*. 2011; 5(1).
 68. 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.
 69. Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Kawana T, Yoshiike K. Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *Journal of virology*. 1986; 58(3): 979-82.
 70. Pater MM, Dunne J, Hogan G, Ghatage P, Pater A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in early cervical neoplasia. *Virology*. 1986; 155(1): 13-8.
 71. Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, Winder DM, Stanley MA, Muralidhar B, i sur. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. *Cancer research*. 2008; 68(20): 8249-59.
 72. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*. 2003; 22(8): 1225.
 73. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer research*. 2004; 64(11): 3878-84.
 74. Duensing S, Münger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research*. 2002; 62(23): 7075-82.
 75. Matzner I, Savelyeva L, Schwab M. Preferential integration of a transfected marker gene into spontaneously expressed fragile sites of a breast cancer cell line. *Cancer letters*. 2003; 189(2): 207-19.
 76. Herdman MT, Pett MR, Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang X-Y, i sur. Interferon- β treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome

- numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis*. 2006; 27(11): 2341-53.
77. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, i sur. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(10): 3822-7.
 78. Jacobs MV, Snijders P, Van Den Brule A, Helmerhorst T, Meijer C. Walboomers J. A general primer GP5+/GP6 (+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of clinical microbiology*. 1997; 35(3): 791-5.
 79. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *Journal of clinical Virology*. 2009; 45: S3-S12.
 80. Munoz M, Camargo M, Soto-De Leon SC, Rojas-Villarraga A, Sanchez R, Jaimes C, i sur. The diagnostic performance of classical molecular tests used for detecting human papillomavirus. *Journal of virological methods*. 2012; 185(1): 32-8.
 81. Castle PE, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, i sur. Comparison between prototype hybrid capture 3 and hybrid capture 2 human papillomavirus DNA assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(9): 4022-30.
 82. Day SP, Hudson A, Mast A, Sander T, Curtis M, Olson S, i sur. Analytical performance of the Investigational Use Only Cervista™ HPV HR test as determined by a multi-center study. *Journal of Clinical Virology*. 2009; 45: S63-S72.
 83. Vernick J. Steigman C. The HPV DNA virus hybrid capture assay: what is it--and where do we go from here? MLO: medical laboratory observer. 2003; 35(3): 8-10, 3; quiz 4-5.
 84. Gravitt PE, Coutlée F, Iftner T, Sellors JW, Quint WG. Wheeler CM. New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine*. 2008; 26: K42-K52.
 85. van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM. Snijders PJF. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(3): 779-87. doi: 10.1128/JCM.40.3.779-787.2002
 86. Seme K, Lepej SŽ, Lunar MM, Iščić-Beš J, Planinić A, Kocjan BJ, i sur. Digene HPV Genotyping RH Test RUO: comparative evaluation with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Test for detection of 18 high-risk and probable high-risk human papillomavirus genotypes. *Journal of clinical virology*. 2009; 46(2): 176-9.
 87. Oliveira A, Delgado C, Verdasca N. Pista A. Biomarkers of cervical carcinogenesis associated with genital human papillomavirus infection. *Acta medica portuguesa*. 2013; 26(2): 139-44.
 88. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, i sur. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(2): 557-64.

89. Cox JT. Liquid-based cytology: evaluation of effectiveness, cost-effectiveness, and application to present practice. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2004; 2(6): 597-611.
90. Karon J, Peters J, Platt J, Chilcott J, McGoogan E, Brewer N. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*. 2004;8(20): 1-78. doi: 10.3310/hta8200
91. Ronco G, Confortini M, Maccallini V, Naldoni C, Segnan N, Sideri M, i sur. Health technology assessment report. Use of liquid-based cytology for cervical cancer precursors screening. *Epidemiologia e prevenzione*. 2012; 36(5 Suppl 2): e1-e33.
92. Maver PJ, Seme K, Korac T, Dimitrov G, Dobrossy L, Engele L, i sur. Cervical cancer screening practices in central and eastern Europe in 2012. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22(1): 7-19.
93. Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T, Audy-Jurković S, Ljubojević N. *KLASIFIKACIJA CITOLOŠKIH NALAZA VRATA MATERICE» ZAGREB 2002 «Modifikacija klasifikacija» Zagreb 1990 «i» NCI Bethesda system 2001 «.* *Gynaecologia et perinatologia: journal for gynaecology, perinatology, reproductive medicine and ultrasonic diagnostics*. 2003; 12(4): 148-53.
94. Priebe AM. 2012 cervical cancer screening guidelines and the future role of HPV testing. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2013; 56(1): 44-50.
95. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry K-U, Szarewski A, Munk C, i sur. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *Bmj*. 2008; 337: a1754.
96. Moscicki A-B, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, i sur. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *The Lancet*. 2004; 364(9446): 1678-83.
97. Baggish MS. Historical Background. U: Baggish MS. *Colposcopy of the cervix, vagina, and vulva: a comprehensive textbook*. St Louis: Mosby Inc; 2003.
98. Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju. HDGO smjernice iz ginekološke onkologije. Cervikalne intraepitelne lezije. [Internet] Zagreb: Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju; 2012 [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: <http://www.hdgo.hr/Default.aspx?sifraStranica=909>
99. Pretorius RG, Belinson JL, Zhang W-H, Burchette RJ, Elson P, Qiao Y-L. The colposcopic impression. Is it influenced by the colposcopist's knowledge of the findings on the referral Papanicolaou smear? *The Journal of reproductive medicine*. 2001; 46(8): 724-8.
100. Kierkegaard O, Byrjalsen C, Frandsen KH, Hansen KC, Frydenberg M. Diagnostic accuracy of cytology and colposcopy in cervical squamous intraepithelial lesions. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 1994; 73(8): 648-51.
101. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, i sur. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *The lancet oncology*. 2008; 9(5): 425-34.
102. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1967; 10(4): 748-84.
103. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstetrics and gynecology*. 1990; 75(1): 131-3.

104. Anderson MC. The pathology of cervical cancer. *Clin Obstet Gynaecol*. 1985; 12(1): 87-119.
105. Holowaty P, Miller AB, Rohan T. To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999; 91(3): 252-8.
106. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, i sur. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003; 95(17): 1336-43.
107. Syrjänen KJ. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *European Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1996; 65(1): 45-53.
108. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, Raifu A, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, i sur. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *Bmj*. 2008; 337: a1284.
109. Jordan J, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Schenck U, Baldauf JJ, Da Silva D, i sur. European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2. *Cytopathology*. 2009; 20(1): 5-16.
110. Prendiville W. The treatment of CIN: what are the risks? *Cytopathology*. 2009; 20(3): 145-53.
111. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *The Lancet*. 2004; 364(9430): 249-56.
112. Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev [Internet]*. 2013 Dec 4;(12):CD001318. doi: 10.1002/14651858.CD001318.pub3 [pristupljeno 29.12.2018.].
Dostupno na:
<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001318.pub3/full>
113. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1989; 96(9): 1054-60.
114. Shafi MI, Jordan JA, Singer A. The Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia (Squamous). U: Jordan JA, Singer A, Jones H, Shafi MI, ur. *The Cervix*. 2. izd. Oxford: Blackwell publications; 2006.
115. Prendiville W. LLETZ: theoretical rationale, practical aspects, clinical experience, optimizing the technique. U: Prendiville W, Ritter J, Tatti S, Twiggs L, ur. *Colposcopy: Management Options*. Philadelphia WB: Saunders; 2003. Str. 75-89.
116. Persad VL, Pierotic MA, Guijon FB. Management of Cervical Neoplasia: A 13-Year Experience with Cryotherapy and Laser. *Journal of lower genital tract disease*. 2001; 5(4): 199-203.
117. Kalliala I, Anttila A, Pukkala E, Nieminen P. Risk of cervical and other cancers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: retrospective cohort study. *Bmj*. 2005; 331(7526): 1183-5.
118. Waggoner SE. Cervical cancer. *The Lancet*. 2003; 361(9376): 2217-25.
119. Goldie SJ, Grima D, Kohli M, Wright TC, Weinstein M, Franco E. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV-16/18 vaccine. *International Journal of cancer*. 2003; 106(6): 896-904.

120. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007; 370(9590): 890-907.
121. Gustafsson L, Pontén J, Zack M, Adami H-O. International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer causes & control*. 1997; 8(5): 755-63.
122. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Steven E SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997; 89(12): 868-73.
123. Cancer ICoESoC. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *International journal of cancer*. 2007; 120(4): 885-91.
124. Krivak TC, McBroom JW, Elkas JC. Cervical and vaginal cancer. U: Berek JS, ur. *Novak's gynecology*. 13. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2002.
125. Quinn M, Benedet J, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman W, i sur. Carcinoma of the Cervix Uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2006; 95(S1): S43-S103. doi: doi:10.1016/S0020-7292(06)60030-1
126. Gadducci A, Sartori E, Maggino T, Landoni F, Zola P, Cosio S, i sur. The clinical outcome of patients with stage Ia1 and Ia2 squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a Cooperation Task Force (CTF) study. *European journal of gynaecological oncology*. 2003; 24(6): 513-6.
127. Jones WB, Mercer GO, Lewis JL, Rubin SC, Hoskins WJ. Early invasive carcinoma of the cervix. *Gynecologic oncology*. 1993; 51(1): 26-32.
128. Beiner ME, Covens A. Surgery insight: radical vaginal trachelectomy as a method of fertility preservation for cervical cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2007; 4(6): 353.
129. Burnett AF. Radical trachelectomy with laparoscopic lymphadenectomy: review of oncologic and obstetrical outcomes. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2006; 18(1): 8-13.
130. Angioli R, Plotti F, Montera R, Aloisi A, Luvero D, Capriglione S, i sur. Neoadjuvant chemotherapy plus radical surgery followed by chemotherapy in locally advanced cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2012; 127(2): 290-6.
131. Grigsby PW. Cervical cancer: combined modality therapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2001; 7: S47-50.
132. Ault KA, Group FIS. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *The Lancet*. 2007; 369(9576): 1861-8.
133. Olsson S-E, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, i sur. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine*. 2007; 25(26): 4931-9.
134. Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine*. 2006; 24: S106-S13.
135. Pederson C, Petaja T, Strauss G, Rumke H, Poder A, Richardus J, i sur. Immunization in early adolescent females with human papillomavirus types 16 and 18 L1 virus-like particle vaccine containing AS04 adjuvant. *Journal of Adolescent Health*. 2007; 40(6): 564-71.

136. Villa LL. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. *International Journal of Infectious Diseases*. 2007; 11: S17-S25.
137. Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines – A review of the first decade. *Gynecologic Oncology*. 2017; 146(1): 196-204. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.04.004
138. Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, de Borja PC, Sanchez N, i sur. Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10(8): 2147-62. doi: 10.4161/hv.29532
139. Nygard M, Saah A, Munk C, Tryggvadottir L, Enerly E, Hortlund M, i sur. Evaluation of the Long-Term Anti-Human Papillomavirus 6 (HPV6), 11, 16, and 18 Immune Responses Generated by the Quadrivalent HPV Vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2015; 22(8): 943-8. doi: 10.1128/cvi.00133-15
140. Jenkins D. A review of cross-protection against oncogenic HPV by an HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: importance of virological and clinical endpoints and implications for mass vaccination in cervical cancer prevention. *Gynecologic oncology*. 2008; 110(3): S18-S25.
141. Wheeler CM, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen O-E, Hernandez-Avila M, Perez G, i sur. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in sexually active women aged 16–26 years. *The Journal of infectious diseases*. 2009; 199(7): 936-44.
142. Seme K, Maver PJ, Korać T, Canton A, Částková J, Dimitrov G, i sur. Current status of human papillomavirus vaccination implementation in central and eastern Europe. *Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat*. 2013; 22(1): 21-5.
143. Solomon D, Papillo JL, Davey DD, Education C, Consortium T. Statement on HPV DNA test utilization. *American journal of clinical pathology*. 2009; 131(6): 768-9.
144. Bosch F, Castellsague X, De Sanjosé S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *British journal of cancer*. 2008; 98(1): 15.
145. Blumenthal PD, Gaffikin L. Cervical cancer prevention: making programs more appropriate and pragmatic. *Jama*. 2005; 294(17): 2225-8. doi: 10.1001/jama.294.17.2225
146. Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R. Effective screening programmes for cervical cancer in low-and middle-income developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001; 79: 954-62.
147. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, i sur. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. —summary document. *Annals of Oncology*. 2010; 21(3): 448-58.
148. The Council of the European Union. Council recommendation of 2 December 2003 on cancer screening. *Off. J. Eur. Union*. 2003; L 327 (2003): 34-8
149. Arbyn M, Raifu A, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004. *Annals of Oncology*. 2007; 18(10): 1708-15.
150. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in Europe. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2012; 21(9): 1423-33.

151. Nicula FA, Anttila A, Neamtiu L, Žakelj MP, Tachezy R, Chil A, i sur. Challenges in starting organised screening programmes for cervical cancer in the new member states of the European Union. *European journal of cancer*. 2009; 45(15): 2679-84.
152. Kelava I, Tomičić K, Kokić M, Ćorušić A, Planinić P, Kirac I, i sur. Breast and gynecological cancers in Croatia, 1988-2008. *Croatian medical journal*. 2012; 53(2): 100-8.
153. Znaor A, Babić D, Ćorušić A, Grce M, Mahovlić V, Pajtler M. Prijedlog programa ranog otkrivanja raka vrata maternice u Hrvatskoj.[Proposed program for early detection of cervical cancer in Croatia]. *Lijec Vjesn*. 2007; 129: 158-63.
154. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal*. 2001; 164(7): 1017-25.
155. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006; 24: S63-S70.
156. Sankaranarayanan R, Gaffikin L, Jacob M, Sellors J, Robles S. A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2005; 89: S4-S12.
157. Schiller JT, Davies P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2(4): 343.
158. Chow EPF, Machalek DA, Tabrizi SN, Danielewski JA, Fehler G, Bradshaw CS, i sur. Quadrivalent vaccine-targeted human papillomavirus genotypes in heterosexual men after the Australian female human papillomavirus vaccination programme: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(1): 68-77. doi: 10.1016/s1473-3099(16)30116-5
159. Arbyn M, Xu L, Simoens C, Martin-Hirsch PP. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 5: Cd009069. doi: 10.1002/14651858.CD009069.pub3
160. Patel C, Brotherton JM, Pillsbury A, Jayasinghe S, Donovan B, Macartney K, i sur. The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2018; 23(41): 1700737. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1700737
161. Pollock KG, Kavanagh K, Potts A, Love J, Cuschieri K, Cubie H, i sur. Reduction of low- and high-grade cervical abnormalities associated with high uptake of the HPV bivalent vaccine in Scotland. *Br J Cancer*. 2014; 111(9): 1824-30. doi: 10.1038/bjc.2014.479
162. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, i sur. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health*. 2016; 4(7): e453-63. doi: 10.1016/s2214-109x(16)30099-7
163. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert review of anti-infective therapy*. 2010; 8(10): 1139-62.
164. Platt AR, Woodhall RW, George Jr AL. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*. 2007; 43(1): 58-62.

165. Katoh K, Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*. 2010; 26(15): 1899-900. doi: 10.1093/bioinformatics/btq224
166. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst Biol*. 2008; 57(5): 758-71. doi: 10.1080/10635150802429642
167. Državni zavod za statistiku. Dan žena. [Internet] Zagreb: Državni zavod za statistiku; 2016 [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: https://www.dzs.hr/hrv/important/Interesting/Dan_Zena/index.html
168. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Porodi u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2016. godine. Izvješće za 2016. Rodin U, Draušnik Ž, Cerovečki I. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo ;2017 [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/08/Porodi_2016.pdf
169. Kitson SJ, Greig E, Michael E, Smith M. Predictive value of volume of cervical tissue removed during LLETZ on subsequent preterm delivery: a cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014; 180: 51-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.06.011
170. Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaïdi M, Mitra A, Kalliala I, Martin-Hirsch P, i sur. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2016; 354: i3633.
171. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018 Cancer today. [Internet] Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2018. [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: <http://gco.iarc.fr/today/home>
172. Grahovac M, Račić I, Hadžisejdić I, Dorić A, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus among Croatian women attending regular gynecological visit. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 73-7.
173. Grce M, Husnjak K, Magdić L, Ilijaš M, Zlački M, Lepušić D, i sur. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *European journal of epidemiology*. 1997; 13(6): 645-51.
174. Kaliterna V, Anđelinović Š, Pejković L, Drmiš Hofman I. Human papillomavirus DNA typing in the cervical specimens among women of Split and Dalmatian County. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 79-82.
175. Kaliterna V, Pejković L, Hofman ID, Anđelinović Š. Prevalence and Genotyping of the Human Papillomavirus in the Cervical Specimens among Women in Dalmatia County. Opatija: 6. Hrvatski kongres o urogenitalnim i spolnoprenosivim infekcijama; 2014.
176. Marijan T, Vraneš J, Mlinarić-Džepina A, Leskovar V, Knežević J, Kvaternik M. Genital human papillomavirus infection in women from the Zagreb region. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 83-7.
177. Milutin-Gašperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 89-96.
178. Rokсандić-Križan I, Bošnjak Z, Perić M, Đurkin I, Zujčić Atalić V, Vuković D. Distribution of Genital Human Papillomavirus (HPV) Genotypes in Croatian Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)—A Pilot Study. *Collegium antropologicum*. 2013; 37(4): 1179-83.

179. Sabol I, Gašperov NM, Matovina M, Božinović K, Grubišić G, Fistonić I, i sur. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. *PloS one*. 2017; 12(7): e0180480. doi: 10.1371/journal.pone.0180480
180. Hadžisejdić I, Krašević M, Haller H, Grahovac B. Distribution of human papillomavirus types in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 97-102.
181. Mahovlic V, Pajtler M, Mozetic-Vrdoljak D, Ovanin-Rakić A, Audy-Jurković S, Kardum-Skelin I. Cervical screening in Croatia. Lisbon :35th European Congress of Cytopathology; 2009.
182. Syrjänen K, Di Bonito L, Gonçalves L, Murjal L, Santamaria M, Mahovlic V, i sur. Cervical cancer screening in Mediterranean countries: implications for the future. *Cytopathology*. 2010; 21(6): 359-67.
183. Pajtler M, Audy-Jurković S, Kardum-Skelin I, Mahovlić V, Mozetić-Vrdoljak D, Ovanin-Rakić A. Organisation of cervical cytology screening in Croatia: past, present and future. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 47-54.
184. Znaor A, Strnad M. Cervical cancer in Croatia: state of the art and possibilities for prevention. *Collegium antropologicum*. 2007; 31(2): 37-40.
185. Ministarstvo zdravstva republike Hrvatske. Prijedlog nacionalnog programa ranog otkrivanja raka vrata maternice. [Internet] 2010 [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/Programi,%20projekti%20i%20strategije/Nacionalni%20program%20ranog%20otkrivanja%20raka%20vrata%20maternice.pdf>
186. Poljak M, Seme K, Maver PJ, Kocjan BJ, Cuschieri KS, Rogovskaya SI, i sur. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine*. 2013; 31 Suppl 7: H59-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.03.029
187. Zadnik V, Primic Zakelj M, Lokar K, Jarm K, Ivanus U, Zagar T. Cancer burden in slovenia with the time trends analysis. *Radiology and oncology*. 2017; 51(1): 47-55. doi: 10.1515/raon-2017-0008
188. Ministarstvo zdravstva republike Hrvatske. Trogodišnji program imunizacije, seroprofilakse i kemoprofilakse za posebne skupine stanovništva i pojedince pod povećanim rizikom od: tuberkuloze, hepatitisa A i B, bjesnoće, žute groznice, kolere, trbušnog tifusa, tetanusa, malarije, streptokokne bolesti, haemophilus influenzae – invazivne bolesti, meningokokne bolesti i HPV infekcije u 2019.-2021. godini. [Internet] 2018 [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: <https://zdravstvo.gov.hr/nacrt-trogodisnjeg-programa-imunizacije-seroprofilakse-i-kemoprofilakse-za-posebne-skupine-stanovnistva-i-pojedince-pod-povecanim-rizikom-od-tuberkuloze-hepatitisa-a-i-b-bjesnoce-zute-groznice-kolere/3211>
189. World Health Organisation. Weekly Epidemiological Record. [Internet] Geneva: World Health Organisation; 2017, vol. 92, 18: 393-404. [pristupljeno 29.12.2018.]. Dostupno na: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255870/WER9228.pdf;jsessionid=EECA1EA913C40E10568779B956589C8F?sequence=1>
190. Andrews N, Stowe J, Miller E. No increased risk of Guillain-Barré syndrome after human papilloma virus vaccine: a self-controlled case-series study in England. *Vaccine*. 2017; 35(13): 1729-32.

191. Hubert WG. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *Journal of virology*. 2005; 79(10): 5914-22.
192. Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjänen K. Syrjänen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *European journal of cancer*. 2000; 36(11): 1402-10.
193. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, i sur. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology*. 2000; 81(12): 2959-68.
194. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, i sur. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of virology*. 1997; 71(3): 2463-72.
195. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez AC, i sur. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93(4): 315-8.
196. Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyškova I, Delius H, i sur. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *International journal of cancer*. 2001; 94(5): 711-6.
197. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *International journal of cancer*. 1999; 82(2): 203-7.
198. van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, i sur. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology*. 2000; 81(2): 317-25.

11 Kratka biografija

Rođena sam 09. Studenog 1978. Godine u Jajcu, BiH. Završila sam Opću gimnaziju u Makarskoj te diplomirala na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2003. godine. Položila sam specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije 2010. godine, a ispit iz uže specijalizacije iz ginekološke onkologije 2018. godine. Polja interesa su mi endoskopska kirurgija, laparoskopska kirurgija, kirurško liječenje ginekoloških malignih bolesti i endometrioze.

Popis slika

Slika 1. Prirodni tijek infekcije HPV-om. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.]. Dostupno na: http://www.virology.uct.ac.za/vir/teaching/mbchb/human-papillomaviruses	2
Slika 2. Distribucija incidencije i mortaliteta od karcinoma žena u Europi. GLOBOCAN 2018 (IARC) Section of Cancer Information. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.]. Dostupno na: http://gco.iarc.fr/today/home	3
Slika 3. Filogenetsko stablo papilomavirusa. Preuzeto iz: de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004 Jun 20;324(1):17-27. ...	6
Slika 4. Podjela filogenetskih linija HPV 16. Preuzeto iz: Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS I sur. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. J Virol. 2012 Jun;86(12):6855-61. doi: 10.1128/JVI.00483-12...9	9
Slika 5. Genom HPV. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.] Dostupno na: https://bioofcancer.wordpress.com/2013/03/31/hpv-and-cancer/	10
Slika 6. Mehanizam infekcije HPV-om. Preuzeto iz: Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. Gynecol Oncol. 2010 Jun; 118(1 Suppl): S12–S17. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004.....	14
Slika 7. Shematski prikaz promjena uzrokovanih infekcijom virusom HPV-a u slojevima epitela. Preuzeto iz: Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006 Aug 31;24 Suppl 3: S3/1-10.....	15
Slika 8. Shematski prikaz usporedbe citološke i histološke klasifikacije promjena uzrokovanih HPV. Preuzeto iz: Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Clin Invest. 2006;116(5):1167-73.....	22
Slika 9. Prikaz stupnja kolposkopski vidljivih promjena na vratu maternice. Preuzeto s Interneta. [Pristupljeno 26.01.2021.]. Dostupno na: https://www.kkh.com.sg/patient-care/conditions-treatments/cervical-cancer-surgery	24
Slika 10. Histološka slika različitih stupnjava cervikalna intraepitelne neoplazije. Preuzeto iz: Sattar HA. Female Genital System and Breast. U: Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology: with STUDENT CONSULT. 10. izd. London: Elsevier Health Sciences; 2017.....	26
Slika 11. FIGO klasifikacija raka vrata maternice. Preuzeto iz: Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, I sur. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. Int J Gynaecol Obstet. 2006 Nov;95 Suppl 1: S43-103.	31
Slika 12. Raspodjela pacijentica prema citološkoj dijagnozi.....	45
Slika 13. raspodjela pacijentica prema patohistološkoj dijagnozi.....	47
Slika 14. Raspodjela HPV tipova u uzorcima s konačnim negativnim patohistološkim nalazom.....	49
Slika 15. Raspodjela HPV tipova u preinvazivnim promjenama.....	50
Slika 16. Raspodjela HPV tipova u karcinomu pločastih stanica.....	51
Slika 17. Raspodjela HPV tipova u uzorcima s adenokarcinomom.....	52
Slika 18. Distribucija najčešćih HPV genotipova (uključujući višestruke infekcija) u uzorcima pacijentica s različitim patohistološkim dijagnozama (negativno, preinvazivne lezije, karcinom pločastih stanica i adenokarcinom).....	53
Slika 19. Usporedba broja jednostrukih i višestrukih infekcija HPV-om po patohistološkim dijagnozama.....	55
Slika 20. Udio pojedinačnih i višestrukih infekcija HPV-om po patohistološkim dijagnozama.....	56
Slika 21. Raspodjela pacijentica prema dijagnozama i prema dobnim skupinama.....	61
Slika 22. HPV 16 inačice.....	62
Slika 23. Analizirane i neanalizirane inačice HPV 16.....	62

Slika 24. Genomske inačice: LCR područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	63
Slika 25. Genomske inačice: E6 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	64
Slika 26. Genomske inačice: E7 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	65
Slika 27. Genomske inačice uzoraka s karcinomom pločastih stanica. LCR područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	68
Slika 28. Genomske inačice uzoraka s adenokarcinomom. LCR područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija; označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	68
Slika 29. Genomske inačice uzoraka s karcinomom pločastih stanica i adenokarcinomom. E6 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija, označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	70
Slika 30. Genomske inačice uzoraka s karcinomom pločastih stanica i adenokarcinomom. E7 područje. Vertikalno – nukleotidne pozicije; sivo – pozicije bez mutacija, označeno malim slovom – mutirana baza na točno određenoj nukleotidnoj poziciji; f - broj izolata za određenu genomsku inačicu	71
Slika 31. Filogenetsko stablo HPV 16 inačica u bolesnicima HSIL i karcinomom vrata maternice u Hrvatskoj	74
Slika 32. Rodilje prema dobi u rodilištima Hrvatske u 2016. godini	75
Slika 33. Dobno standardizirana stopa incidencije i mortaliteta (na 100.000 žena) od raka vrata maternice u Hrvatskoj od 1968. Do 2014. Godine. Preuzeto iz: Sabol I, Gašperov NM, Matovina M, Božinović K, Grubišić G, Fistić I, i sur. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. PloS one. 2017; 12(7): e0180480. doi: 10.1371/journal.pone.0180480	82

Popis tablica

Tablica 1. Incidencija i mortalitet od raka vrata maternice u Europi po regijama	4
Tablica 2. Podjela tipa HPV obzirom na onkogeni potencijal	7
Tablica 3. FIGO klasifikacija raka vrata maternice.....	30
Tablica 4. . Popis začetnica korištenih za sekvencioniranje HPV 16 produkata dobivenih PCR-om ...	43
Tablica 5. Jednostruke i višestruke infekcija humanim papilomavirusom (HPV) u odnosu na patohistološke dijagnoze. HR – visoki rizik; LR – niski rizik.....	48
Tablica 6. Usporedba broja jednostrukih i višestrukih infekcija HPV-om po patohistološkim dijagnozama.....	54
Tablica 7. Pearson χ^2 test	55
Tablica 8. Srednja dob pacijentica prema patohistološkoj dijagnozi	56
Tablica 9. Srednja dob menarhe pacijentica prema patohistološkoj dijagnozi	57
Tablica 10. Srednja vrijednost za paritet ispitanica prema patohistološkoj dijagnozi	57
Tablica 11. Srednja vrijednost za broj pobačaja ispitanica prema patohistološkoj dijagnozi	58

Tablica 12. ANOVA test usporedbe skupina pacijentica po pušenju, dobi, broju poroda, broju pobačaja, dobi menarhe i pušenju	58
Tablica 13. ANOVA post hoc test usporedbe skupina po dobi	59
Tablica 14. ANOVA post hoc test usporedbe skupina po broju poroda	60
Tablica 15. ANOVA post hoc test usporedbe skupina po pušenju	60
Tablica 16. Raspodjela pacijentica prema dobnim skupinama i prema patohistološkom nalazu	61
Tablica 17. Genomske inačice u uzorcima s CIN III; R- inačice koje potpuno nalikuju slijedu referentnog HPV 16. N-broj inačica. E – Europska grana, Af – Afrička grana	65
Tablica 18. Genomske inačice u uzorcima s karcinomom pločastih stanica; R- inačice koje potpuno nalikuju slijedu referentnog HPV 16. N – broj inačica. E – Europska grana, NA – Sjevernoamerička grana	72
Tablica 19. Genomske inačice u uzorcima s adenokarcinomom; R- inačice koje potpuno nalikuju slijedu referentnog HPV 16. N – broj inačica. E – Europska grana, AA – Azijskoamerička grana.....	73
Tablica 20. Broj novooboljelih od raka vrata maternice u Hrvatskoj po godinama	76
Tablica 21. Incidencija, mortalitet (*dobno standardizirana stopa, svjetski standard /100 000) i broj novootkrivenih slučajeva u Europi po regijama	77
Tablica 22. Istraživanja o distribuciji HPV tipova u Hrvatskoj; *istraživanja provedena na općoj populaciji	79
Tablica 23. Distribucija najučestalijih HPV tipova po patohistološkim dijagnozama.....	81