

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET

Janja Raonić

IMUNOHISTOHEMIJSKO ODREĐIVANJE
EKSPRESIJE INFLAMATORNIH I
PROLIFERATIVNIH MARKERA U
LEZIJAMA GRLIĆA MATERICE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Podgorica, 2022.

UNIVERSITY OF MONTENEGRO

FACULTY OF MEDICINE

Janja Raonić

IMMUNOHISTOCHEMICAL
DETERMINATION OF EXPRESSION OF
INFLAMMATORY AND PROLIFERATIVE
MARKERS IN CERVICAL LESSIONS

DOCTORAL DISSERTATION

Podgorica, 2022.

PODACI O DOKTORANDU

Ime i prezime: Janja Raonić

Datum i mjesto rođenja: 28. 12. 1987. godine, Pljevlja, Crna Gora

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: Medicinski fakultet
Univerziteta Crne Gore, 2012. godine

INFORMACIJE O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv studija: Doktorske studije

Naslov teze: Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

Fakultet na kojem je disertacija odbranjena: Medicinski fakultet, Univerziteta Crne Gore

OCJENA I ODBRANA DOKTORSKE DISERTACIJE

Datum prijave doktorske teze: 28. 4. 2016. godine; br. 1209.

Datum sjednice Senata Univerziteta na kojoj je prihvaćena teza: 21. 07. 2016. godine; br. 03-1773/2.

Komisija za ocjenu podobnosti teze i kandidata:

- Prof. dr Filip Vukmirović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Mileta Golubović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Gordana Mijović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore

Mentor: Prof. dr Ljiljana Vučković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore

Komisija za ocjenu doktorske disertacije:

- Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Ljiljana Vučković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Doc. Dr Dragana Tegeltija, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

- Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Ljiljana Vučković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Doc. Dr Dragana Tegeltija, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Lektor: mr Jelena Nikolić, profesor engleskog jezika

Datum odbrane: 30.9.2022. god.

Datum promocije:

INFORMATION ON DOCTORAL STUDENT

Name and surname: Janja Raonić

Date and place of birth: 28th December 1987, Pljevlja, Montenegro

Name and year of completed programme of study: Faculty of Medicine, University of Montenegro, 2012

INFORMATION ON DOCTORAL DISSERTATION

Name of programme of study: Doctoral studies

Thesis: Immunohistochemical determination of expression of inflammatory and proliferative markers in cervical lesions

Faculty of dissertation defence: Faculty of Medicine, University of Montenegro

EVALUATION AND DOCTORAL DISSERTATION DEFENCE

Date of doctoral defence application: 28th April 2016; number: 1209.

Date of the session of the Senate of the University when the thesis was accepted: 21st July 2016; number 03-1773/2.

Thesis and Candidate Assessment Committee:

- Prof. Filip Vukmirović, Faculty of Medicine, University of Montenegro
- Prof. Mileta Golubović, Faculty of Medicine, University of Montenegro
- Prof. Gordana Mijović, Faculty of Medicine, University of Montenegro
- Prof. Aleksandra Vuksanović Božarić, Faculty of Medicine, University of Montenegro

Mentor: Prof. Ljiljana Vučković, Faculty of Medicine, University of Montenegro

Doctoral dissertation evaluation committee:

- Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Ljiljana Vučković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Doc. Dr Dragana Tegeltija, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Doctoral dissertation defence committee:

- Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Prof. dr Ljiljana Vučković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore
- Doc. Dr Dragana Tegeltija, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Proofreader: MA Jelena Nikolić, english language teacher

Date of defence: September 30th, 2022.

Date of promotion:

Zahvaljujem svojoj porodici na bezrezervnoj podršci, vjeri, odricanju i ljubavi ukazanim na svakom mom putu.

Zahvalna sam mentorki, prof. dr Ljiljani Vučković na nesebičnom dijeljenju znanja i svesrdnoj pomoći tokom mog cjelokupnog stručnog i akademskog usavršavanja.

Veliku zahvalnost dugujem kolektivu Centra za patologiju i Ginekološko-akušerske klinike, Kliničkog centra Crne Gore, kao i kolektivu Centra za medicinsku mikrobiologiju, Instituta za javno zdravlje Crne Gore, koji su sudjelovali u prikupljanju i obradi uzoraka korišćenih u ovom istraživanju.

PREDGOVOR

Karcinom grlića materice na globalnom nivou predstavlja četvrti najčešći malignitet u ženskoj populaciji. Incidenca cervikalnog karcinoma pokazuje izražene geografske varijacije, sa znatno višom učestalošću u zemljama sa nižim socio-ekonomskim statusom, u odnosu na razvijene zemlje svijeta, što je prevashodno posljedica nejednakosti u sprovođenju mjera prevencije. Smatra se da bi uz sprovođenje HPV vakcinacije, skrining programe i liječenje premalignih promjena grlića, cervikalni karcinom mogao biti preveniran u gotovo svim slučajevima. U našoj državi posljednjih godina se bilježi trend porasta učestalosti ovog maligniteta, a incidenca cervikalnog karcinoma kod nas je među najvišim u svijetu.

Cervikalna kancerogeneza je kompleksan proces u čijoj osnovi se nalazi infekcija visokorizičnim tipovima humanog papiloma virusa (HR-HPV). Do sada su identifikovani brojni mehanizmi kojima virus zaobilazi imunološki nadzor i stupa u interakcije sa genima domaćina, dovodeći do gubitka kontrole ćelijskog ciklusa i nekontrolisane proliferacije ćelija. Rezultat ovih interakcija jeste razvoj najprije displastičnih – premalignih lezija, a potom u nekim slučajevima i invazivnog karcinoma.

Uprkos identifikaciji više kritičnih tačaka u dejstvu virusnih onkogeni na inficirane ćelije, i dalje je nepoznato zašto samo u malom procentu slučajeva proces progredira, dok kod većine dolazi do rezolucije infekcije, ali i displastičnih promjena. Danas je jasno da dejstvo virusnih onkogeni nije dovoljno da kompletira proces kancerogeneze.

Oslanjajući se na savremeni koncept humane kancerogeneze, u kome je inflamacija prepoznata kao važan kofaktor, u našem istraživanju izvršili smo imunohistohemijsku analizu sastava i gustine upalnih infiltrata u displastičnim lezijama grlića i smatramo da rezultati naše studije doprinose boljem razumijevanju inflamatornog odgovora na HPV infekciju i njegovog uticaja na evoluciju neoplastičnog procesa.

Detekcija i liječenje displastičnih lezija jedna je od važnih mjera u suzbijanju cervikalnog karcinoma. Razlikovanje ranih displastičnih promjena od reaktivnih stanja, kao i razdvajanje ranih displastičnih lezija od uznapredovalih, koje nose znatno viši rizik od progresije u invazivni karcinom, samo na osnovu morfolologije nekada predstavlja izazov i rezultira lošom reproducibilnošću. S tim u vezi, polazeći od poznatih mehanizama

virusom-indukovane kancerogeneze fokusirali smo se i na ispitivanje imunohistohemijske ekspresije pojedinih markera regulatora ćelijskog ciklusa i proliferativnih markera, sa ciljem detekcije biomarkera koji bi u svakodnevnoj praksi doprinio boljoj klasifikaciji displazija, a samim tim i adekvatnom menadžmentu ovih pacijentkinja.

Konačno, analizirajući rezultate socio-epidemiološke ankete ispitanica obuhvaćenih ovim istraživanjem, ukazali smo na najznačajnije faktore rizika za razvoj cervikalne neoplazije zastupljene u populaciji naših žena, a takođe kroz HR-HPV tipizaciju njihovih uzoraka, prezentovali prevalencu pojedinih visokorizičnih genotipova, što sve zajedno u budućnosti, može doprinijeti unapređenju strategija u suzbijanju ove bolesti u našoj državi.

IZVOD TEZE

Uvod: Cervikalni karcinom je jedan od najčešće dijagnostikovanih maligniteta u ženskoj populaciji, a njegova incidenca kod nas je među najvišim u Evropi. Razvoj cervikalnog karcinoma je složen i nedovoljno razjašnjen proces, u čijoj osnovi leži HR-HPV infekcija, a prethode mu displastične promjene čija morfološka klasifikacija nekada rezultira lošom reproducibilnošću.

Ciljevi: Ispitati obrasce imunohistohemijske ekspresije markera inflamacije, regulatora ćelijskog ciklusa i proliferativnih markera u skvamoznoj displaziji i izvršiti njihovu korelaciju sa gradusom lezije i HR-HPV infekcijom, čime bi se dao doprinos boljem razumijevanju HPV-indukovane karcinogeneze, imunološkog odgovora na HR-HPV infekciju i displaziju, ali i doprinos u identifikaciji biomarkera koji bi služili boljoj reproducibilnosti u dijagnostici ovih lezija. Takođe, kroz ispitivanje zastupljenosti HR-HPV genotipova i najznačajnijih faktora rizika u našoj populaciji, imali smo cilj da doprinesemo unapređenju strategija u suzbijanju cervikalnog karcinoma.

Metode: Sprovedena je semi-kvantativna analiza imunohistohemijske ekspresije CD68, CD4, CD8, CD20, p53, p16 i Ki67 u seriji od: 41 biopsije grlića bez displazije, 24 slučaja LSIL-a i 35 slučajeva HSIL-a. Kod svih ispitanica, prije biopsije je izvršena genotipizacija za 12 HR-HPV tipova. Sve ispitanice ispunile su socio-epidemiološku anketu vezanu za najčešće poznate faktore rizika u cervikalnoj kancerogenezi.

Rezultati: HR-HPV infekcija dokazana je kod više od polovine (55,0%) ispitanica, a najzastupljeniji genotipovi bili su: 16, 31, 45, 33 i 58. Sa izuzetkom p16, koji je pokazao jaku pozitivnu korelaciju sa HR-HPV infekcijom ($\gamma=0,914$; $p<0,001$), u ukupnom uzorku, nije nađena korelacija ove infekcije i ekspresije ispitivanih markera ($p>0,05$). Uočena je statistički značajna korelacija između displastičnih promjena i ekspresije CD68 ($p=0,003$), kao i između displastičnih promjena i ekspresije CD4 ($p=0,016$). Za ekspresiju CD68 nađena je pozitivna korelacija kako sa L-SIL-om, tako i sa H-SIL-om, a što se tiče ekspresije CD4, pozitivna korelacija postojala je prevashodno s LSIL-om. Kada su uzorci stratifikovani u odnosu na gradus lezije, takođe nije dokazana korelacija između HR-HPV infekcije i ekspresije inflamatornih markera CD68/CD4 ($p>0,05$). Korelacija ekspresije CD8 i CD20 s displazijom nije nađena ($p>0,05$). Pokazana je umjerena negativna

korelacija ekspresije p53 sa displazijom ($\gamma=-0,540$; $p=0,001$) i HR-HPV infekcijom ($\gamma=-0,540$; $p=0,007$), kao i jaka pozitivna korelacija između ekspresije p16 ($\gamma=-0,849$; $p<0,001$), kao i Ki67 (χ^2 test=91,73; $p<0,0001$) i displastičnih lezija, sa porastom nivoa njihove ekspresije u odnosu na stepen displazije. Među faktorima rizika utvrđeno je da su pušenje i izostanak kontracepcije karakteristike zastupljene kod više od polovine ispitanica, dok ostali faktori rizika nisu bili zastupljeni u značajnoj mjeri.

Zaključak: Smatramo da je viša prevalenca makrofaga i CD4 limfocita u displastičnim lezijama odgovor na displaziju, a ne samu HR-HPV infekciju. Povećanje nivoa ekspresije makrofaga sa gradusom lezije govori u prilog njihovoj potencijalnoj ulozi u napredovanju neoplastičnog procesa. Značajno viša ekspresija CD4 limfocita u LSIL-u u odnosu na normalnu sluznicu i H-SIL je potencijalni prediktor regresije displastičnih promjena. Za razliku od p53 čije funkcionalne aberacije nisu dio ranih stadijuma cervikalne kancerogeneze, p16 i Ki67 pokazali su se kao dobri prediktori displazije i njenog gradusa. Najzastupljeniji HR-HPV genotipovi u našoj ispitivanoj grupi obuhvaćeni su devetovalentnim profilaktičkom vakcinom, što bi uz redukciju pušenja i edukaciju stanovništva po pitanju upotrebe kontracepcije u našoj populaciji trebalo uzeti u obzir prilikom kreiranja budućih strategija u suzbijanju ovog maligniteta.

Ključne riječi: HR-HPV, cervikalna displazija, inflamacija, biomarkeri.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is one of the most frequently diagnosed malignancies in the female population, and its incidence in our country is among the highest in Europe. The cervical cancer development is a complex and insufficiently elucidated process, based on HR-HPV infection, and preceded by dysplastic changes whose morphological classification sometimes results in poor reproducibility.

Objectives: To examine the patterns of immunohistochemical expression of cell cycle regulators, proliferative and inflammatory markers in squamous dysplasia and their correlation with lesion grade and HP-HPV infection, with the aim of better understanding of HPV-induced carcinogenesis, immune response to HR-HPV infection and dysplasia and identification of the biomarkers that would serve to the better reproducibility of these lesions. Also, by examining the prevalence of HR-HPV genotypes and the most significant risk factors in our population, we aimed to contribute to the improvement of strategies in the prevention of cervical cancer.

Methods: A semi-quantitative analysis of immunohistochemical expression of CD68, CD4, CD8, CD20, p53, p16 and Ki67 was performed in a series of: 41 cervical biopsies without dysplasia, 24 cases of LSIL and 35 cases of HSIL. In each subject, genotyping for 12 HR-HPV types was done prior to the biopsy. All the subjects completed a socio-epidemiological survey concerning the most common risk factors for cervical carcinogenesis.

Results: HR-HPV infection was detected in more than half cases (55.0%), and the most prevalent genotypes were: 16, 31, 45, 33 and 58. With the exception of p16, which showed a strong positive correlation with HR-HPV infection ($\gamma=0,914$; $p<0.001$), in the total sample, no correlation between this infection and examined markers expression was found ($p>0.05$). A statistically significant correlation was observed between dysplastic changes and CD68 expression ($p=0.003$), as well as between dysplastic changes and CD4 expression ($p=0.016$). For CD68 expression, a positive correlation was found with both L-SIL and H-SIL, and in terms of CD4 expression, a positive correlation existed primarily with L-SIL. When the samples were stratified in relation to the lesion grade, a correlation between HR-HPV infection and CD68/CD4 ($p>0.05$) expression of the

inflammatory markers was not proved. No correlation between CD8 and CD20 expression with dysplasia was found ($p > 0.05$). We found a moderate negative correlation between p53 expression and dysplasia ($\gamma = -0.540$; $p = 0.001$) and HR-HPV infection ($\gamma = -0.540$; $p = 0.007$), as well as a strong positive correlation between p16 expression ($\gamma = -0.849$; $p < 0.001$) and Ki67 (χ^2 test = 91.73; $p < 0.0001$) and dysplastic lesions, with an increase in the level of their expression in relation to the degree of dysplasia. Among the risk factors, smoking and lack of contraception use were found to be present in more than a half of the respondents, while other risk factors were not present to a significant extent.

Conclusion: We consider a higher prevalence of macrophages and CD4 lymphocytes in dysplastic lesions to be a response to dysplasia rather than to the HR-HPV infection itself. The increase of the expression levels of macrophages with the degree of the lesion speaks in favour of their potential role in the progression of the neoplastic process. Significantly higher CD4 lymphocytes expression in LSIL compared to normal mucosa and H-SIL is a potential predictor of regression of dysplastic changes. Unlike p53, whose functional aberrations are not part of the early stages of cervical carcinogenesis, p16 and Ki67 have been shown to be good predictors of dysplasia and its grade. The most common HR-HPV genotypes in our study group are covered by a nine-valent prophylactic vaccine, which, in addition to smoking reduction and education regarding contraceptive use in our population, should be taken into account when creating future strategies to eliminate this malignancy.

Keywords: HR-HPV, cervical dysplasia, inflammation, biomarkers.

1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija cervikalnog karcinoma	1
1.2. Faktori rizika za razvoj cervikalnog karcinoma.....	5
1.2.1. Infektivni agensi	5
1.2.2. Hormonski činioci	6
1.2.3. Pušenje.....	7
1.2.4. Socio-ekonomski faktori	7
1.2.5. Genetski činioci	7
1.3. Histološka i ultrastrukturalna građa cerviksa uterusa	8
1.4. Morfologija i klasifikacija skvamoznih prekancerskih lezija cerviksa uterusa	11
1.4.1. Citološke promjene skvamoznog epitela cerviksa.....	11
1.4.1.1. L-SIL.....	13
1.4.1.2. H-SIL	16
1.4.2. Histološke promjene skvamoznog epitela cerviksa.....	18
1.5. Životni ciklus humanog papiloma virusa i HPV-indukovana kancerogeneza..	24
1.6. Imunološki nadzor u HPV infekciji i uloga inflamacije u HPV-indukovanoj kancerogenezi	32
1.7. Mjere u suzbijanju cervikalnog karcinoma	38
1.7.1. Skrining cervikalnog karcinoma	38
1.7.2. HPV vakcinacija.....	42
1.8. Imunohistohemijski markeri u dijagnostici intraepitelnih cervikalnih lezija i predikciji ishoda displazije	43
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE.....	48
2.1. Ciljevi istraživanja	48
2.2. Hipoteze	48
3. MATERIJAL I METODE.....	50
3.1. Odabir ispitanica	50
3.2. Socio-epidemiološka anketa	50
3.3. Prikupljanje cervikalnih briseva, HR-HPV ekstrakcija i genotipizacija.....	52
3.4. Patohistološka obrada i analiza biopsijskog materijala.....	53
3.5. Metodologija imunohistohemijskih bojenja	54
3.6. Morfometrijska analiza imunohistohemijske ekspresije.....	55
3.6.1. Evaluacija p16 ekspresije	55

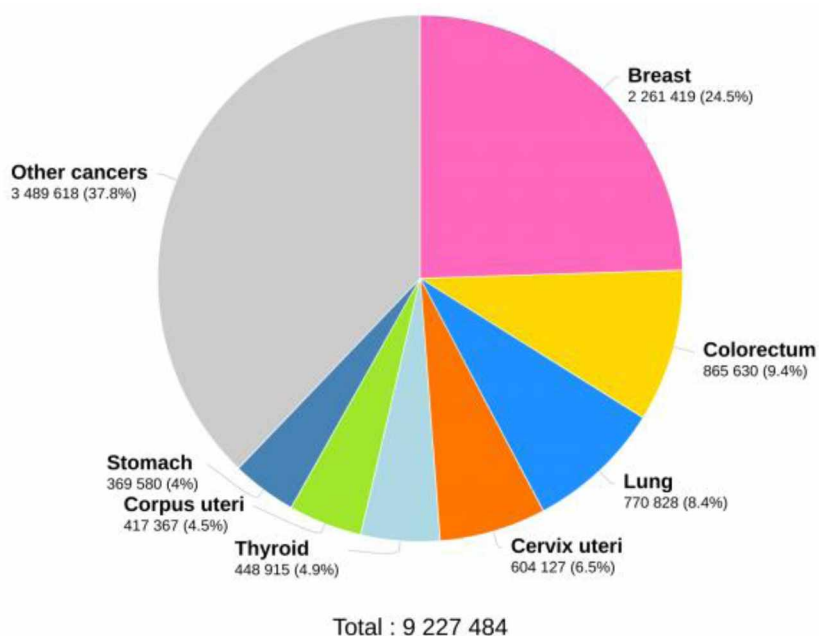
3.6.2. Evaluacija p53 ekspresije	55
3.6.3. Evaluacija Ki67 ekspresije	56
3.6.4. Evaluacija ekspresije CD68, CD4, CD8 i CD20.....	56
3.7. Statistička analiza podataka	56
4. REZULTATI	58
4.1. Rezultati socio-epidemiološke ankete	58
4.2. Rezultati HR-HPV genotipizacije uzoraka	61
4.3. Rezultati patohistološke analize bioptičkog materijala.....	65
4.4. Rezultati ispitivanja imunohistohemijske ekspresije markera inflamacije, regulatora ćelijskog ciklusa i proliferativnih markera u odnosu na displaziju i HPV status	66
4.4.1. Rezultati ispitivanja povezanosti između CD68 ekspresije i displazije	66
4.4.2. Rezultati ispitivanja CD68 ekspresije u odnosu na HPV status	69
4.4.3. Rezultati ispitivanja CD68 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije.....	70
4.4.4. Rezultati ispitivanja povezanosti CD4 ekspresije i displazije.....	72
4.4.5. Rezultati ispitivanja CD4 ekspresije u odnosu na HPV status	74
4.4.6. Rezultati ispitivanja CD4 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije.....	75
4.4.7. Rezultati ispitivanja povezanosti CD8 ekspresije i displazije.....	77
4.4.8. Rezultati ispitivanja CD8 ekspresije u odnosu na HPV status	78
4.4.9. Rezultati ispitivanja CD8 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije.....	79
4.4.10. Rezultati ispitivanja povezanosti CD20 ekspresije i displazije	80
4.4.11. Rezultati ispitivanja CD20 ekspresije u odnosu na HPV status	81
4.4.12. Rezultati ispitivanja CD20 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije.....	82
4.4.13. Rezultati ispitivanja povezanosti p53 ekspresije i displazije.....	83
4.4.14. Rezultati ispitivanja p53 ekspresije u odnosu na HPV status	84
4.4.15. Rezultati ispitivanja p53 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HPV infekcije.....	87
4.4.16. Rezultati ispitivanja povezanosti p16 ekspresije i displazije.....	88
4.4.17. Rezultati ispitivanja p16 ekspresije u odnosu na HPV status	91

4.4.18.	Rezultati ispitivanja p16 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije.....	93
4.4.19.	Rezultati ispitivanja povezanosti Ki67 ekspresije i displazije.....	94
5.	DISKUSIJA.....	96
6.	ZAKLJUČCI.....	113
7.	REFERENCE.....	115

1. UVOD

1.1. Epidemiologija cervikalnog karcinoma

Uprkos naporima koji se ulažu u njegovo suzbijanje, karcinom cerviksa i dalje predstavlja značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta širom svijeta. Na globalnom nivou, cervikalni karcinom predstavlja četvrti najčešći malignitet među ženama (Grafikon 1), a u 23 zemlje svijeta je najčešće dijagnostikovani malignitet u ženskoj populaciji. U 36 zemalja, pretežno subsaharske Afrike, jugo-istočne Azije i Južne Amerike, karcinom cerviksa predstavlja vodeći uzrok smrti (1, 2).

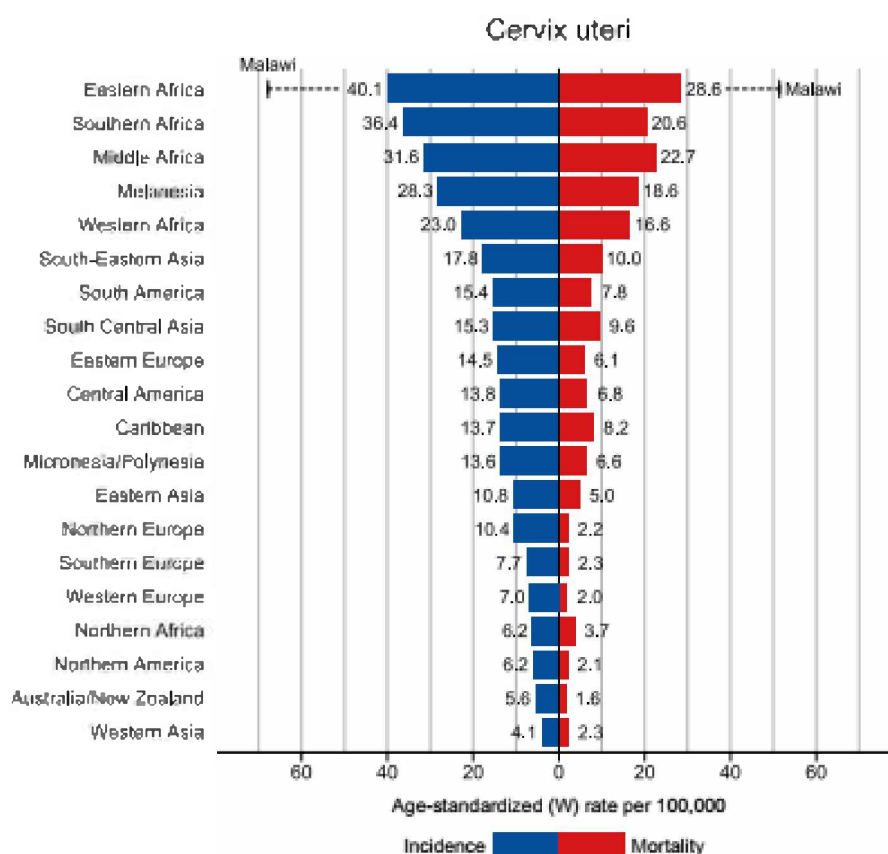


Grafikon 1. Procijenjeni broj novih slučajeva malignih tumora u ženskoj populaciji u 2020. godini u svijetu. Svako polje u dijagramu predstavlja proporciju ukupnog broja slučajeva. Izvor: *Globocan 2020*. (1)

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2020. godini je u svijetu dijagnostikovano 604 127 novih slučajeva cervikalnog karcinoma (1), a svake godine na

globalnom nivou se zabilježi prosječno 280 000 smrtnih slučajeva uzrokovanih ovim tumorom (3).

Incidenca cervikalnog karcinoma i stope mortaliteta variraju od zemlje do zemlje (Grafikon 2), pa tako incidenca ovog karcinoma u Sjevernoj Americi, Australiji, zapadnoj Aziji (Saudijska Arabija i Izrael) niža je čak 7 do 10 puta u odnosu na zemlje istočne Azije, južne i srednje Afrike (1).



Grafikon 2. Region-specifične stope incidence i mortaliteta standardizovane u odnosu na starosnu strukturu u 2020. godini. Stope su prikazane u opadajućem nizu. Izvor: *Globocan 2020*. (1)

Prema studiji koju su sproveli Čolaković i sardnici u periodu od 2000-2007. godine, u Crnoj Gori je otkriveno 550 slučajeva cervikalnog karcinoma, što je predstavljalo 45% svih maligniteta koji zahvataju ženske genitalne organe. U prvih pet godina prosječna

učestalost bolesti iznosila je 19,52 na 100 000 žena, a u posljednje tri godine ona je iznosila 25,61 (4).

Prema podacima SZO u 2020. godini incidenca cervikalnog karcinoma u našoj državi iznosila je 35,6, što sve ukupno ukazuje na trend porasta ovog maligniteta u našoj populaciji (5).

Incidenca karcinoma cerviksa raste među ženama starosne dobi od 20 do 29 godina, doseže pik među onima starosti između 55 i 64 godine i pada nakon 65. godine (6).

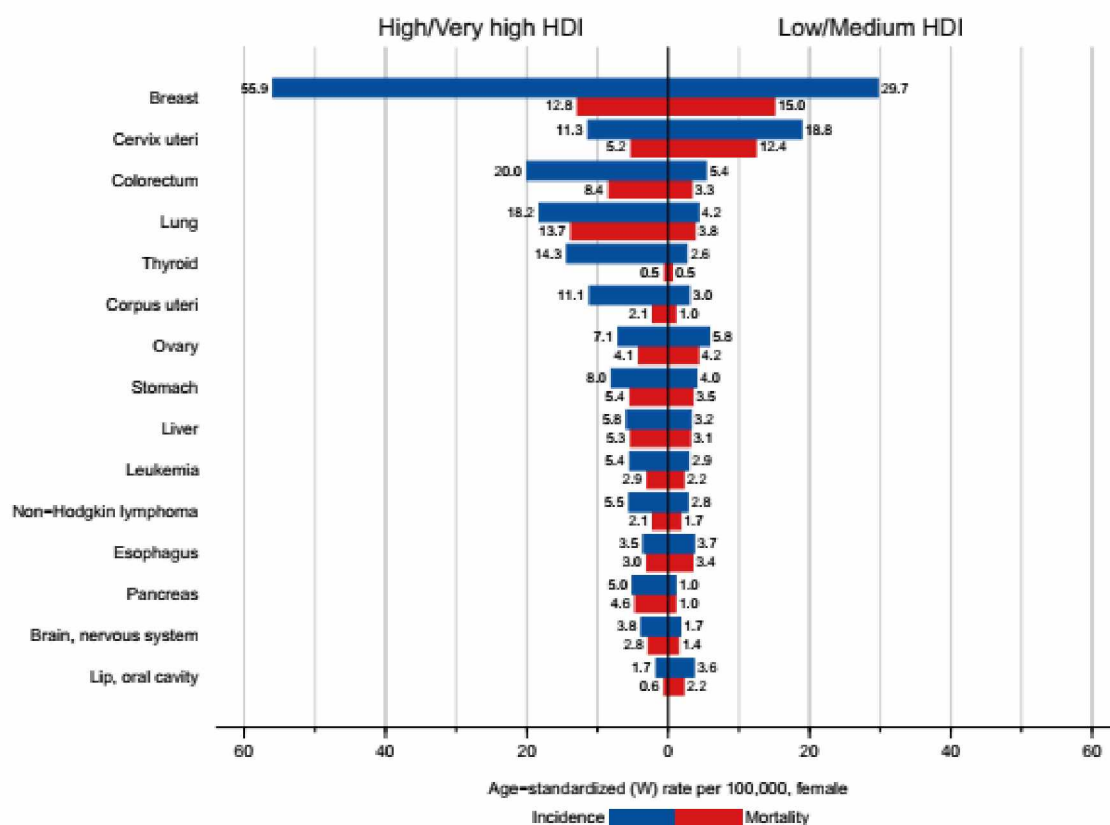
Kod većine slučajeva cervikalnog karcinoma dijagnostikovanih u Crnoj Gori u periodu od 2000-2007. oboljele su bile starosne dobi između 40 i 49 godina (4).

Incidenca cervikalnog karcinoma u našoj državi, u prošloj godini bila je značajno viša u odnosu na zemlje zapadne Evrope, Amerike i Australiju, ali viša i u odnosu na zemlje regiona, kao što su: Bosna i Hercegovina (18,6), Srbija (27), Rumunija (34,2), Bugarska (28,2), Hrvatska (15,8), Slovenija (10) i Albanija (9,4) (1).

Približno 90% svih smrtnih slučajeva uzrokovanih cervikalnim karcinomom bilježi se u zemljama sa niskim, odnosno srednjim socio-ekonomskim statusom (1). Najviša stopa mortaliteta standardizovana u odnosu na godine zabilježena je u Indiji – 16 na 100 000 žena (7).

Stope incidence i mortaliteta u direktnoj su vezi sa socio-ekonomskim statusom zemlje i izražena je disproporcija u incidenci (18,8 vs 11,3 na 100 000) i mortalitetu (12,4 vs 5,2 na 100 000) između zemalja u tranziciji i razvijenih zemalja (Grafikon 3). I dok se u razvijenim dijelovima svijeta posljednjih godina bilježi pad kako incidence, tako i mortaliteta, u zemljama Afrike, južne Evrope i centralne Azije bilježi se porast, i to kao posljedica nedostatka ili nedovoljne implementacije mjera prevencije (1).

Smatra se da bi uz mjere primarne prevencije, odnosno HPV vakcinaciju, potom implementaciju skrining programa - kao mjere sekundarne prevencije i liječenje premalignih lezija, što je mjera tercijarne prevencije, cervikalni karcinom mogao biti preveniran u gotovo svim slučajevima (8).



Grafikon 3. Stope incidence i mortaliteta standardizovane prema starosnoj dobi u zemljama sa visokim i veoma visokim HDI, u odnosu na zemlje sa niskim i srednjim HDI (*Human development index*) u 2020. godini. Izvor: *Globocan 2020*. (1)

Uzimajući u obzir izražene nejednakosti i globalno opterećenje cervikalnim karcinomom, SZO je 2018. godine uputila poziv za akciju eliminacije cervikalnog karcinoma (≤ 4 na 100 000 žena širom svijeta). Predložena je trostruka strategija (9):

- 1) vakcinacija najmanje 90% djevojčica do 15. godine života;
- 2) skrining najmanje 70% žena starosti od 35 do 45 godina;
- 3) liječenje najmanje 90% svih prekancerskih lezija detektovanih u toku skrininga.

Predviđa se da bi sprovođenjem ove strategije broj slučajeva obolijevanja bio smanjen za 74 miliona, a smrtni ishod izbjegnuto kod 52 miliona žena (9, 10).

1.2. Faktori rizika za razvoj cervikalnog karcinoma

1.2.1. Infektivni agensi

Infekcija visokorizičnim tipovima HPV-a (*High Risk Human Papilloma Virus* (HR-HPV)) odavno je prepoznata kao glavni faktor rizika u razvoju karcinoma cerviksa. HR-HPV nalazi se u osnovi čak 99% slučajeva ovog maligniteta (11).

Cervikalna HPV infekcija je najčešći tip seksualno prenosivih bolesti i pojavljuje se kod žena ubrzo nakon započinjanja seksualnog života. Procijenjeno je da većina žena u svijetu u životu dobije genitalnu HPV infekciju, sa prevalencom od 50-80% (12).

Mada postoje izvjesne geografske razlike u prevalenci, oko 10,2% žena sa normalnom cervikalnom citologijom ima genitalnu HPV infekciju (13).

Obrazac je takav da najčešće postoji mješovita HPV infekcija, kod mlađih žena, najčešće onih mlađih od 25 godina, sa rapidnim padom prevalence u tridesetim i četrdestim godinama, a zatim blagim porastom u postmenopauzalnoj starosnoj grupi (14). O razlozima porasta prevalence kod žena starije dobi se debatuje, a razlozi se vezuju za promjene u seksualnom ponašanju i pojavu nove, odnosno reinfekcije sa jedne strane, ili za reaktivaciju latentne HPV infekcije usled starenja imunološkog sistema, sa druge strane (15).

Mada upotreba kondoma značajno smanjuje rizik od infekcije, HPV se i dalje može prenijeti, preko nezaštićenih zona genitalne kože, kao što su vulva i skrotum (16). Podaci pokazuju da cirkumcizija kod muškaraca, može djelovati protektivno (17).

Ženski reproduktivni trakt sadrži sve potrebne elemente za efikasan imunološki odgovor na genitalne patogene i procjenjuje se da leukociti čine značajan dio ćelijske populacije genitalnog trakta žene (18,19). S toga, za 12 do 24 mjeseci kod 70-90% inficiranih žena dolazi do eliminacije virusa (20). Međutim, manji procenat žena ne ostvari uspješan imunološki odgovor, zbog čega ostaju HPV pozitivne, sa konstantnom produkcijom virusa (21,22), i upravo ove žene su u riziku od razvoja cervikalnog karcinoma.

Većina faktora rizika u razvoju karcinoma cerviksa upravo je u vezi sa rizikom od ekspozicije HPV-u i uključuju rano stupanje u seksualne odnose (prije 16. godine života) i veći broj seksualnih partnera (23, 11).

U faktore rizika ubrajaju se i druge seksualno prenosive infekcije, poput *Chlamidia trachomatis* infekcije, infekcije *Herpes simplex virus*-om (HSV) i virusom HIV-a (*Human immunodeficiency virus*) (24, 25).

Rezultati većeg broja studija ukazali su da je rizik od razvoja cervikalnog karcinoma kod žena sa *Chlamidia trachomatis* infekcijom i do dva puta viši, sugerišući da bi značaj skrininga na ovu infekciju doprinio ne samo smanjenju učestalosti pelvične inflamatorne bolesti i infertiliteta, već i invazivnog cervikalnog karcinoma (26, 27).

HSV nije tipični DNK onkogeni virus, ali se pretpostavlja da perzistentna ili abortivna HSV infekcija može indukovati permanentne genske alteracije, koje ometaju proliferaciju i diferencijaciju skvamoznih epitelnih ćelija grlića, što bi mogao biti kofaktor u razvoju nekih, ali ne svih slučajeva karcinoma cerviksa (28).

Rezultati više studija pokazuju višu stopu perzistentne HR-HPV infekcije, viši procenat abnormalnih Papa nalaza, višu incidencu cervikalnog karcinoma, kao i pojavu cervikalnog karcinoma u mlađoj životnoj dobi među HIV pozitivnim ženama (29, 30).

1.2.2. Hormonski činioci

Osim pomenutih infektivnih činilaca, pojedini hormonski činioci prepoznati su kao faktori rizika u cervikalnoj kancerogenezi.

Upotreba oralnih kontraceptiva se smatra faktorom rizika za razvoj cervikalnog karcinoma, a rizik raste sa dužinom njihove upotrebe. Navodi se da upotreba oralnih kontraceptiva u trajanju od 5 godina i duže, može udvostručiti rizik nastanka cervikalnog karcinoma (31).

Vjeruje se da je među hormonskim činiocima koji su povezani sa višim rizikom za razvoj cervikalnog karcinoma, naročito među HPV pozitivnim ženama i multiparitet. Relativni

rizik cervikalnog karcinoma među ženama koje su imale pet ili više trudnoća varira od 3,8 do 4,4 u poređenju sa nuliparama (32, 33).

1.2.3. Pušenje

Osim prepoznatog uticaja pušenja u etiologiji velikog broja malignih tumora (34), ali i nemalighnih bolesti poput ateroskleroze (35) i dijabetesa (36) u većem broju studija pušenje se izdvaja kao nezavisan faktor rizika za razvoj kako premalignih cervikalnih lezija, tako i cervikalnog karcinoma (37, 38).

U ovim studijama pokazana je jaka pozitivna korelacija između pušačkog staža i broja popušenih cigareta sa pojavom karcinoma, a isto tako dvostruki pad rizika nakon prekida pušenja.

1.2.4. Socio-ekonomski faktori

O uticaju socio-ekonomskog statusa na pojavu cervikalnog karcinoma najbolje svjedoče naprijed navedeni epidemiološki podaci koji ukazuju na drastične razlike u stopama incidence i mortaliteta između zemalja sa niskim i srednjim HDI u odnosu na zemlje koje imaju visok i veoma visok HDI. Osim toga, u više studija pokazano je da žene niskog socio-ekonomskog statusa kako u nerazvijenim, tako i u razvijenim zemljama imaju viši rizik od obolijevanja (37, 39, 40).

1.2.5. Genetski činioci

U pokušaju boljeg razumijevanja cervikalne kancerogeneze i genetske podložnosti za cervikalni kancer izučavan je veći broj gena, a većina njih je iz grupe gena koji regulišu imunološki odgovor na HPV infekciju. U tom smislu ispitivani su geni koji kodiraju sintezu interleukina-1B, interleukina-12 A i B, interleukina-10, faktora tumorske nekroze α , humanog leukocitnog antigena, interferona γ i drugi.

Iako je pokazano da bi funkcionalni polimorfizmi ovih gena potencijalno mogli povećati podložnost cervikalnom karcinomu, i dalje se u tom polju nalaze brojne nejasnoće, te uloga ovih činilaca u razvoju cervikalnog karcinoma, iziskuje dodatna ispitivanja (41).

1.3. Histološka i ultrastrukturalna građa cerviksa uterusa

Cerviks je donji, cilindrični dio uterusa. Sastoji se od dva anatomske i funkcionalno različita dijela. Jedan je nastavak tijela uterusa-endocerviks, a drugi prominira u vaginu – ektocerviks. Zid cerviksa grade sluznica i ispodležeća stroma.

Sluznica endocerviksa je obložena prostim cilindričnim epitelom, čije ćelije sekretuju mukus, dok se subepitelno nalazi lamina propria u kojoj su smještene razgranate tubularne cervikalne žlijezde, također obložene prostim cilindričnim epitelom koji sekretuje mukus (42).

Epitel koji oblaže sluznicu ektocerviksa je pločastoslojeviti neorožavajući. Ispod epitela, smještena je lamina propria koja ne posjeduje žlijezde. Idući od bazalne membrane prema površini, u pločastoslojevitom epitelu se nalaze tri sloja: bazalni ili germinalni sloj, zadužen za stalno obnavljanje epitela, potom spinozni sloj, koji je najdeblji i superficijalni sloj koji sadrži najzrelije ćelije (43).

U bazalnom sloju se nalaze dvije vrste ćelija, bazalne i parabazalne. Bazalne ćelije su ovalnog oblika, imaju oskudnu citoplazmu, viši nukleo/citoplazmatski (n/c) odnos u odnosu na sve ćelije skvamoznog epitela (44) i ovalna jedra, perpendikularno orijentisana u odnosu na bazalnu membranu. Iznad bazalnih ćelija, smještene su parabazalne ćelije koje su krupnije u odnosu na bazalne i imaju obilniju citoplazmu (43).

Ultrastrukturalno, nađeno je da su parabazalne ćelije pričvršćene brojnim tonofilamentima i sadrže intracitoplazmatski glikogen. Enzimi fosforilaza i amilo-1-6-glukozidaza, koji su nophodni za sintezu glikogena lociraju se u parabazalnom regionu (45).

Bazalne ćelije predstavljaju stem ćelije, dok parabazalne ćelije obuhvataju aktivno-replikujući odjeljak, što podržava i činjenica da se mitotske figure najčešće nalaze upravo u parabazalnom, a ne bazalnom sloju (43).

U procesu maturacije ove ćelije prolaze kroz morfološke i funkcionalne promjene. Kako maturacija napreduje, epitelne ćelije se pomjeraju od bazalnog sloja ka površini, a u tom procesu progresivno postaju više spljoštene, sa redukcijom veličine jedra i uvećanjem volumena ćelija (44).

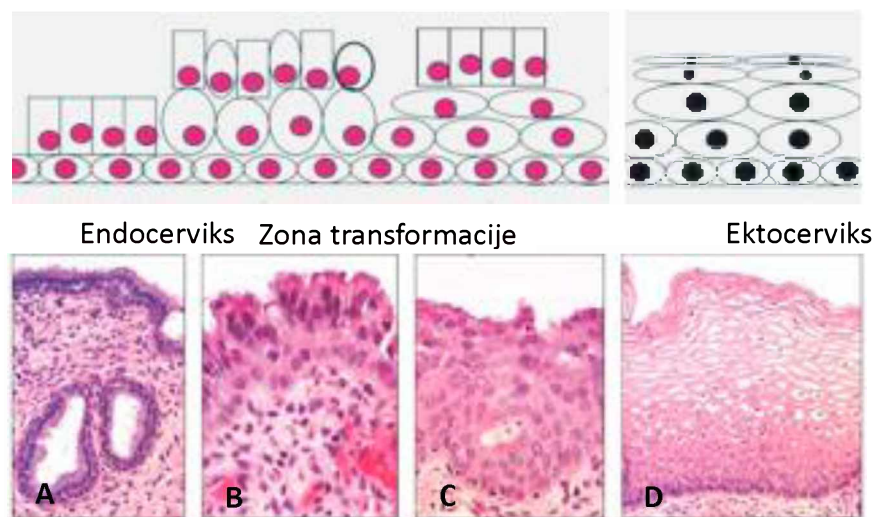
U skvamoznom cervikalnom epitelu uočene su i razlike u vrsti i distribuciji ćelijskih adhezija, a stoga i razlike u distribuciji ekstracelularnog matriksa. Okludentni spojevi najviše su zastupljeni u superficijalnom sloju, prema cervikalnom kanalu, gdje su ćelijske membrane susjednih epitelnih ćelija praktično fuzionisane, eliminišući ekstracelularni matriks i formirajući semipermeabilnu barijeru između lumena i ispodležećeg tkiva (46).

U manje zrelim slojevima nalaze se drugi tipovi adhezija, građeni od velikih proteinskih molekula ili mreže mikrofilamenata, koji uspješno povezuju membrane susjednih ćelija. U ovim slojevima ekstracelularni matriks je značajno veći u odnosu na površnije slojeve (47).

Na prelazu iz endocerviksa u ektocerviks nalazi se granica, gdje dolazi do nagle smjene prostog cilindričnog u pločastoslojeviti epitel bez orožavanja i označava se kao skvamokolumnarna junkcija (*squamo-columnar junction* (SCJ)). Pozicija SCJ varira u zavisnosti od anatomske građe, kao i hormonskog statusa. Na rođenju kod većine ženskih neonatusa, uslijed intrauterinog dejstva maternalnih hormona, SCJ je smještena na površini vaginalne porcije cerviksa, ali se vrlo brzo pomjera naviše, u endocervikalni kanal sve do menarhe (48).

U adolescenciji i tokom reproduktivnog života, javlja se fiziološki ektropion ili everzija, gdje se SCJ ponovo nalazi na nivou vaginalne porcije cerviksa. Zbog acidifikacije vagine i drugih faktora sredine kontinuirano se dešava zamjena dijela endocervikalnog cilindričnog epitela u pločastoslojeviti epitel, odnosno skvamozna metaplazija (Slika 1) (49, 50).

Ova zona remodelovanja ektropiona, u kojoj se dešava skvamozna metaplazija predstavlja region između fiziološke i funkcionalne SCJ i označava se kao zona transformacije. U menopauzi zona transformacije se povlači u endocervikalni kanal (48).



Slika 1. Zona transformacije – šematski prikaz i mikrofotografije. A. Cilindrični epitel endocerviksa; B. Početna metaplazija sa proliferacijom rezervnih ćelija; C. Kompletne skvamozne metaplazije; D. Pločastoslojeviti epitel ektocerviksa. Izvor: modificirano *WHO classification of female reproductive organs, 2020. (51)*

Ispod sluznice cerviksa nalazi se stroma (42). Nju grade mješavina fibroznog i mišićnog tkiva i elastična vlakna, a druge konstituente čine proteoglikani, hijaluron i voda. Fibrozna vlakna su predominantna komponenta, čine oko 85% volumena strome i predstavljaju jedan od ključnih elemenata u očuvanju strukturnog integriteta cerviksa tokom trudnoće, kada dolazi do značajnog uvećanja volumena tijela uterusa (52). Glatko mišićno tkivo čini svega 15% mase i uglavnom je lokalizovano u ektocerviksu (43).

Kao što je već navedeno, više od 99% slučajeva cervikalnog karcinoma povezano je sa HR-HPV infekcijom (53), ali nije do kraja razjašnjeno zašto se HPV infekcija, posljedično i prekancerske promjene, a kasnije i karcinom cerviksa uterusa javljaju najčešće u predjelu zone transformacije.

Pretpostavlja se da je zona transformacije najpodložnija HPV infekciji, zbog nezrelosti skvamoznog epitela (48), a u studiji koju su sprovedi Herfs i saradnici, opisan je nalaz rezidentnih embrionalnih ćelija na nivou SCJ, koje pokazuju jedinstven profil genske ekspresije koji se razlikuje od profila ćelija u okolnom epitelu. Ekspresija pojedinih markera u ovim ćelijama, nađena je i u fetalnom epitelu SCJ, što podržava teoriju da se radi o embrionalnim ćelijama, a ne da se ove ćelije pojavljuju kasnije u životu. Ova

opažanja, u kombinaciji sa preklapanjem imunofenotipa ćelija cervikalne junkcije i HPV-indukovanog skvamoznog karcinoma ukazuju na to da ova jedinstvena populacija ćelija, predstavlja jezgo iz koga se kasnije može razvijati više tumorskih fenotipova (49).

1.4. Morfologija i klasifikacija skvamoznih prekancerskih lezija cerviksa uterusa

1.4.1. Citološke promjene skvamoznog epitela cerviksa

U detekciji citoloških promjena cervikalnog epitela već decenijama je u upotrebi Papanikolau test i uprkos činjenici da u velikom broju zemalja ovaj test sve više ustupa mjesto HPV testiranju u primarnom skriningu cervikalnog karcinoma, njegova vrijednost u preventivnim programima bila je i ostala velika.

Radi se o metodi eksfolijativne citologije, gdje se korišćenjem pamučnog brisa, špatule ili endocervikalne četkice vrši kolekcija epitelnih elemenata cervikalne sluznice, pri čemu su do sada razvijene dvije metode kreiranja citološkog razmaza – konvencionalna i tečna citologija (*Liquid based cytology* (LBC)).

Kod konvencionalne metode nakon uzimanja uzorka korišćenjem špatule ili pamučnog brisa, vrši se direktan transfer ćelija na predmetno staklo, nakon čega slijede fiksacija i sušenje, a potom bojenje Papanikolau metodom (54).

Kod LBC metode uzorčenje se vrši korišćenjem endocervikalne četkice, nakon čega se uzorak prebacuje u tečni medijum koji obezbjeđuje njegovu prezervaciju do pristizanja u laboratoriju. Prema uputstvima proizvođača, dalje se vrši centrifugiranje, prečišćavanje uzorka, odvajanje supenanta, dehidracija, a potom transfer na predmetno staklo i bojenje po standardnoj Papanikolau metodi (54, 55).

Veći broj studija ukazuje da LBC metoda, kroz bolje optimizovan proces kolekcije uzoraka i pravljenja preparata, omogućava bolji kvalitet i smanjuje broj neadekvatnih uzoraka (56, 57, 58).

Takođe LBC metoda omogućava formiranje tankog jednoslojnog preparata sa čistom pozadinom, pa se na taj način smanjuje vjerovatnoća pogrešne interpretacije abnormalnih

ćelija kod prisustva inflamatorne ili hemoragične pozadine, koja je često prisutna u konvencionalnim razmazima (59). Sa druge strane LBC metoda u odnosu na konvencionalnu, iziskuje znatno kompleksniju i skuplju infrastrukturu, te je za sada konvencionalno testiranje i dalje u široj upotrebi.

Klasifikacija citološki detektovanih promjena cerviksa pretrpjela je više izmjena, ali sveopšte prihvaćena klasifikacija, bazira se na konsenzusu Američkog udruženja citologa i velikog broja eminentnih citologa širom svijeta okupljenih u *Bethesda, Maryland* 2014. godine. Sveobuhvatnije razumjevanje biologije HPV infekcije, iskustva sa primjenom LBC, HPV vakcinacija i implementacija skrining programa doprinijelo je kreiranju globalno prihvaćenog sistema izvještavanja i preporuka u menadžmentu testiranih žena. U skvamoznom epitelu aktuelna *Bethesda* klasifikacija obuhvata dolje navedene kategorije (60).

I) Negativan na intraepitelne lezije ili malignitet (*Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM)*)

Neneoplastični nalazi

Neneoplastične celularne varijacije

Skvamozna metaplazija

Keratitične promjene

Tubarna metaplazija

Atrofija

Reaktivne celularne promjene udružene sa:

Inflamacijom

Limfocitnim (folikularnim) cervicitisom

Intrauterinim kontraceptivima

Glandularni ćelijski status posle histerektomije

Organizmi

Trichomonas vaginalis

Gljivični organizmi morfološki konzistentni sa *Candida spp.*

Izmjene u flori koje sugerišu bakterijsku vaginozu

Bakterije morfološki konzistentne sa *Actinomyces spp.*

Ćelijske promjene konzistentne sa *Herpes simplex* virusom

Ćelijske promjene konzistentne sa *Cytomegalovirus*-om

Drugo

Endometrijalne ćelije (kod žena starijih od 45 godina)

II) Ćelijske abnormalnosti skvamoznih epitelnih ćelija

Atipične skvamozne ćelije nedeterminisanog značaja (*Atypical squamous cells of undetermined significance* (ASC-US))

Atipične skvamozne ćelije – ne može se isključiti H-SIL (ASC-H)

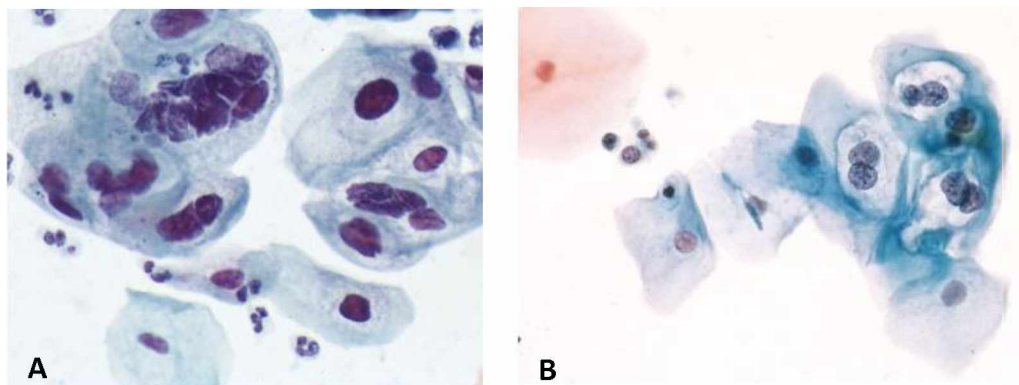
Skvamozna intraepitelna lezija niskog gradusa (*Low-grade squamous intraepithelial lesion* (L-SIL)); obuhvata lakostepenu displaziju / CIN I

Skvamozna intraepitelna lezija visokog gradusa (*High-grade squamous intraepithelial lesion* (H-SIL)); obuhvata displaziju umjerenog i teškog stepena, CIS; CINII i CIN III

Skvamozni karcinom

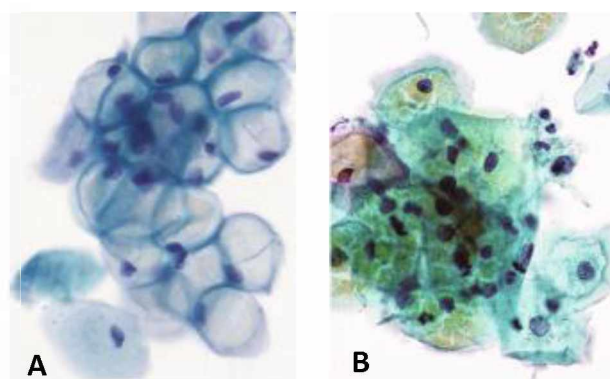
1.4.1.1. L-SIL

Morfološke promjene se nalaze u superficijalnim i intermedijarnim ćelijama i obuhvataju: uvećanje jedra (trostruko veće u odnosu na normalna jedra intermedijarnih ćelija), uz blago uvećanje n/c odnosa. Jedra ovih ćelija pokazuju anizonukleozu, iregularne konture, hiperhromaziju (mada mogu biti i normohromna), dok je hromatin uniformno distribuisan, granuliran ili „razmazan“, do grubo neproziran. Često su prisutne binukleacija i multinukleacija, dok su nukleolusi najčešće nevidljivi ili neupadljivi. Nerijetko su vidljivi koilociti, koji se karakterišu prisustvom perinuklearnog svijetlog haloa, uz periferni obruč tamno obojene citoplazme i gore opisane nuklearne karakteristike (Slika 2) (60).



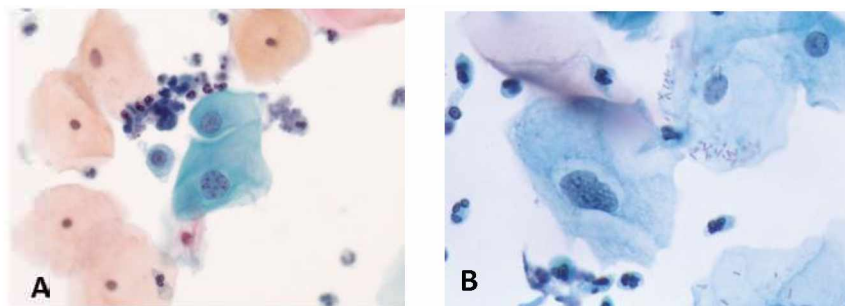
Slika 2. A. L-SIL. Jedra su uvećana, „razmazanog hromatina“, prisutna je multinukleacija, citoplazma je dobro definisana; B. L-SIL. HPV citopatski efekat – nuklearne abnormalnosti uz perinuklearne kavitacije citoplazme. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

Nalaz perinuklearnih haloa, koji je često prisutan u *Trichomonas vaginalis* infekciji, kao i brojnim reaktivnim stanjima ili kao posljedica akumulacije glikogena, bez pratećih nuklearnih promjena, ne smije se kvalifikovati kao L-SIL. Ovakav nalaz označava se kao pseudokoilocitoza (Slika 3) (60, 61).



Slika 3. A. Pseudokolilocitoza. Glikogen u skvamoznim epitelnim ćelijama; B. Pseudokoilocitoza. Haloj asocirani sa akumulacijama glikogena mogu imati narandžast, refraktilan izgled. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

Nuklearne promjene koje ne ispunjavaju sve gore navedene kriterijume često su razlog loše reproducibilnosti (62). Ove promjene se prema *Bethesda* klasifikaciji svrstavaju u kategoriju ASC-US (Slika 4) (60).



Slika 4. A. ASC-US. Intermedijarne skvamozne ćelije sa nuklearnim uvećanjima i lakim nepravilnostima nuklearne membrane. Nuklearne abnormalnosti ne ispunjavaju kriterijume za L-SIL; B. ASC-US. Izolovana atipična skvamozna ćelija sa loše definisanim citoplazmaskim haloom u inflamatornom okruženju. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology*, 2014. (60)

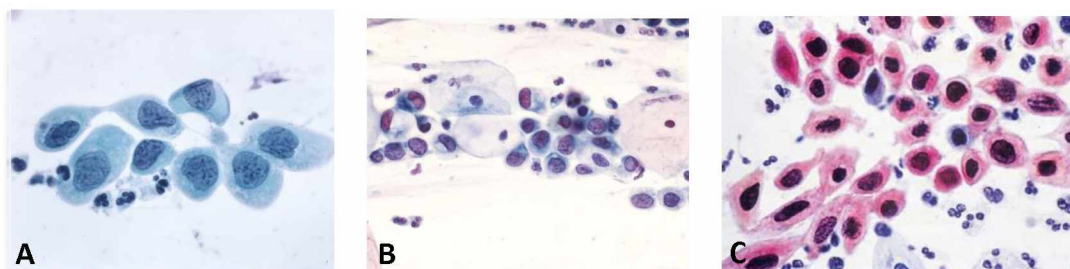
Za žene sa nalazom ASC-US preporučuje se HPV testiranje. U slučaju negativnog nalaza preporučuje se kotestiranje za tri godine, dok se HPV pozitivne žene upućuju na kolposkopiju. Ukoliko kolposkopija ne pokaže prisustvo abnormalnosti, preporučuje se kotestiranje za 12 mjeseci.

Preporuke u menadžmentu žena sa L-SIL nalazom zavise od životne dobi. Kod mlađih žena zbog visoke prevalencije HR-HPV infekcije i pozitivnog nalaza na HR-HPV genotipova u 85% mlađih žena sa L-SIL-om, HPV testiranje ne predstavlja korisnu trijažnu strategiju. S toga je Američko društvo za kolposkopiju i cervikalnu patologiju (*American society for colposcopy and cervical pathology (ASCCP)*) dalo preporuku da je kod žena mlađih od 25 godina i nalazom L-SIL, kao i kod onih sa nepoznatim HPV statusom bez obzira na starost, potrebno za 12 mjeseci ponoviti citologiju, dok se kod starijih od 25 godina preporučuje HPV testiranje. U slučaju negativnog nalaza preporučuje se kotestiranje za tri godine, odnosno kolposkopija za HPV pozitivne žene (63).

1.4.1.2. H-SIL

U skvamoznoj intraepitelnoj leziji visokog gradusa ćelije pokazuju niži stepen maturacije u odnosu na L-SIL i vide se pojedinačno, u listovima ili sincicijalnim agregatima. Mada veličina ovih ćelija varira, generalno su manje u odnosu na ćelije koje se vide u L-SIL-u. Veličina jedra je takođe varijabilna, ali u odnosu na L-SIL, n/c odnos je znatno viši.

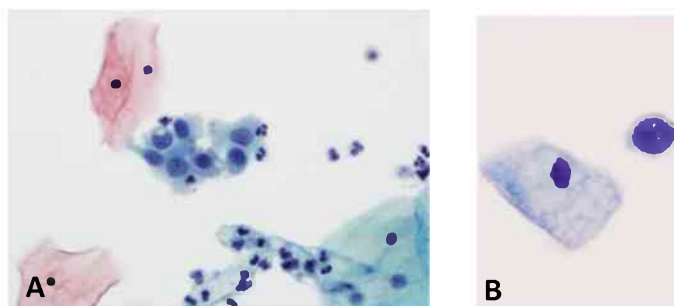
Jedra su najčešće hiperhromna, ali mogu biti normohromna ili čak hipohromna, sa fino ili grubo granuliranim hromatinom, mada hromatin može biti i ravnomjerno distribuisan. Konture jedarnih membrana su nepravilne i često pokazuju indentacije, dok se nukleolusi najčešće ne uočavaju, mada nekada mogu biti vidljivi, naročito kada H-SIL zahvata endocervikalne žlijezde. Izgled citoplazme takođe varira i kreće se od čipkastog do gustog, nekada keratinizovanog (Slika 5) (60).



Slika 5. A. Nuklearne promjene karakteristične za H-SIL, uz nizak n/c odnos; B. H-SIL ćelije sa varijacijama u veličini i n/c odnosu; C. H-SIL sa keratinizovanom citoplazmom.

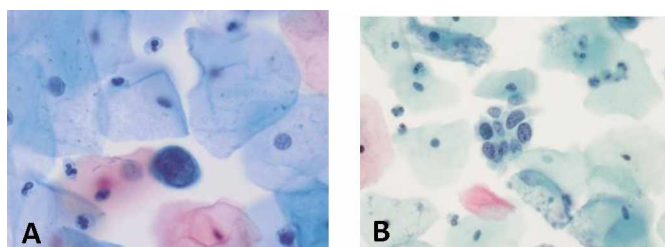
Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

Brojne neneoplastične ćelije u cervikalnom epitelu mogu imitirati H-SIL. Tu se ubrajaju rezervne, parabazalne ćelije, endocervikalne i imaturne metaplastične skvamozne ćelije. Ove ćelije nemaju karakteristične gore opisane nuklearne promjene, niti narušen n/c odnos (Slika 6) (60, 64).



Slika 6. A. Imaturna skvamozna metaplazija koja imitira H-SIL. Citološke karakteristike koje podržavaju benignu prirodu lezije su uniformnost jedara, glatke nuklearne konture i ravnomjerna distribucija hromatina; B. Endocervikalne ćelije sklone lizi citoplazme imitiraju H-SIL. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

Takođe, sljuštene endocervikalne ćelije zbog svog okruglastog izgleda i višeg n/c odnosa mogu imitirati H-SIL. Međutim, u ovim ćelijama uočavaju se nukleolusi, dok je hromatin fino granuliran. Slično je sa endometrijalnim ćelijama koje su veoma sitne, degenerisanih nukleusa, ali prisustvo ovih ćelija u trodimenzionalnim grupama u drugim dijelovima preparata olakšava njihovu pravilnu interpretaciju (60, 64). Za malobrojne slučajeve nalaza atipičnih skvamoznih ćelija, koje najčešće predstavljaju imaturne metaplastične skvamozne ćelije, atrofične ćelije, postiradijacione ili reparatorne promjene, a prisutne su najčešće u malom broju, rezervisana je kategorija ASC-H (Slika 7) (64). Za žene sa nalazom ASC-H preporučuje se kolposkopija bez obzira na HPV status (60).



Slika 7. A. ASC-H. Izolovana atipična ćelija uvećanog jedra i oskudne citolazme; B. ASC-H Grupa imaturnih metaplastičnih skvamoznih ćelija, visokog n/c odnosa, grubog hromatina i nepravilnih nuklearnih kontura. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

Kako većina žena sa citološkim nalazom H-SIL, ima H-SIL potvrđen na biopsiji (65), preporuka ASCCP je da sve žene sa citološkim nalazom skvamoznih intraepitelnih lezija visokog gradusa treba uputiti na eksciziju promjena, bez prethodne biopsije (60).

1.4.2. Histološke promjene skvamoznog epitela cerviksa

SZO je 1975. godine predložila univerzalnu terminologiju kojom se opisuju cervikalni karcinom i prekursorske lezije u cervikalnim biopsijama. Po ovoj klasifikaciji, skvamozna displazija se definiše kao lezija u kojoj je dio debljine skvamoznog epitela zamijenjen epitelnim ćelijama koje pokazuju različit stepen atipije i podijeljena je na laku, srednje tešku i tešku. Međutim, nisu postojali opšte prihvaćeni kriterijumi za gradiranje displazije, te je razlikovanje ovih lezija bilo podložno subjektivnosti. Cervikalni karcinom „*in situ*“ definisan je kao lezija u kojoj veći dio ili kompletan skvamozni epitel pokazuje citološke karakteristike karcinoma. Ovakva klasifikacija upućivala je da se u displazijama i cervikalnom karcinomu radi o dva različita patološka procesa, a ne o spektru lezija u čijoj se osnovi nalazi jedinstven patološki proces. S toga je Međunarodno udruženje ginekologa 1980. godine uvelo novu nomenklaturu u kojoj je termin „displazija“ zamijenjen, ove prekancerske lezije označene kao „cervikalna intraepitelna neoplazija“ (CIN), a kategorija karcinoma „*in situ*“ eliminisana. U ovoj klasifikaciji postavljena su tri gradusa cervikalne intraepitelne neoplazije – CIN I, CIN II i CIN III. (50)

U martu 2012. godine, Koledž američkih patologa i ASCCP, u saradnji sa 35 organizacija, sazvali su konferenciju pod nazivom „Donja anogenitalna skvamozna terminologija“ (*Lower Anogenital Squamous Terminology (LAST)*) (66).

Prema konsenzusu koji su postigli, date su preporuke za korišćenje „dvostepene“ terminologije u opisu bolesti skvamoznog epitela vulve, vagine, cerviksa, penisa, perianusa i anusa, povezanih sa HPV infekcijom. Preporučena terminologija podrazumijeva: niskostepene (*low-grade*) i visokostepene (*high-grade*) skvamozne intraepitelne lezije (L-SIL i H-SIL) (67).

Prema ovoj terminologiji koja je paralelna *Bethesda* sistemu izvještavanja korišćenom u cevikalnoj citologiji CIN II i CIN III su objedinjeni u kategoriju H-SIL, dok su kategoriji

L-SIL, u koju je smješten CIN I, pridodate promjene po tipu koilocitne atipije – ravni i šiljasti kondilomi, koji su do tada predstavljali posebnu kategoriju cervikalnih lezija (48).

Ova klasifikacija objedinjuje promjene u čijoj osnovi se nalazi HPV infekcija, a kako je paralelna *Bethesda* sistemu izvještavanja u cervikalnoj citologiji, bliža je i kliničarima. U svakodnevnoj praksi, u upotrebi su oba sistema za klasifikaciju.

Skvamozne intraepitelne lezije ne moraju biti makroskopski očigledne. Kod L-SIL-a, kolposkopski može postojati nalaz leukoplakije, koja predstavlja prisustvo nepravilnih, bjeličastih plakova na sluznici grlića, dok se kondilomi prezentuju kao egzofitične, nekad papilarne bjeličaste lezije (48, 68).

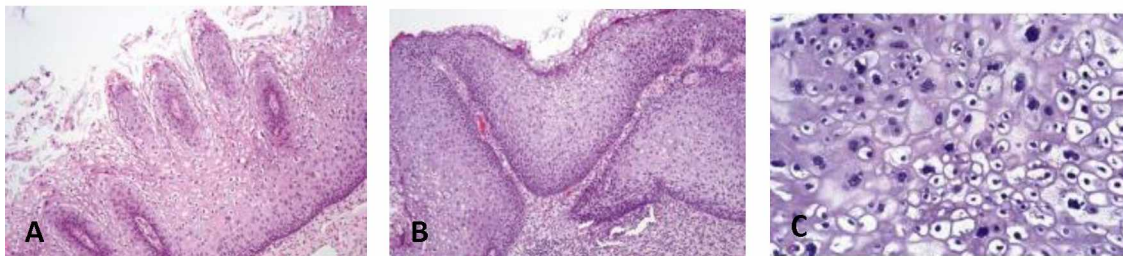
U H-SIL-u, uz leukoplakiju i sirćetnom kiselinom bjeličasto prebojen („*aceto-white*“) skvamozni epitel na kolposkopiji, moguć je i nalaz abnormalnosti u malim, površinskim krvnim sudovima što se označava kao mozaicizam. Mozaicizam je rezultat anastomoziranja razgranatih krvnih sudova, koji formiraju zavijutke idući prema površini, nakon čega se posuvraćaju ka stromi (68).

Histološki, u produktivnoj HPV infekciji morfološke promjene se dešavaju kako u nukleusu, tako i u citoplazmi keratinocita, što se označava kao koilocitna atipija i patognomonične su za HPV infekciju. Promjene koje se vide, slične su onim opisanim u citološkim preparatima i podrazumijevaju: hiperhromaziju i uvećanje jedra, iregularnost jedarne membrane i multinukleaciju, dok se u citoplazmi nalazi perinuklearno rasvjetljenje sa kondenzacijom citoplazme na periferiji ćelije. Mitotske figure su rijetke i ukoliko postoje, normalne su i ograničene na bazalni sloj. Diferencijalno dijagnostički u obzir treba uzeti glikogenizaciju ćelija skvamoznog epitela, koja se vidi u atrofiji epitela i različitim infekcijama. U ovom slučaju postoji rasvjetljenje citoplazme, ali su jedra mala i piknotična (48).

Kod šiljastih kondiloma (*condyloma accuminatum*) nalazi se akantoza, krvni sudovi dopiru gotovo do površine epitela, zbog čega je ona papilomatozna. Na površini svakog „šiljka“ se nalazi nekoliko slojeva diskariotičnih ćelija, često i atipična parakeratoza i hiperkeratoza (43, 48).

Kod ravnih kondiloma (*condyloma planum*) epitel je zadebljan sa hiperplazijom bazalnog sloja, u kome se mogu naći i mitoze, ali je polarizacija jedara očuvana. Nalaze se i parakeratoza, kao i diskeratoza, uz prisustvo koilocita (43).

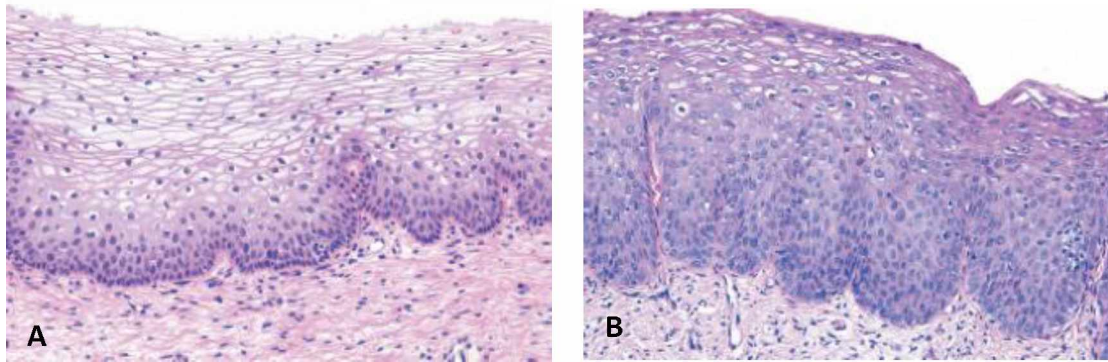
Histološki izgled promjena kod šiljastih i ravnih kondiloma prikazan je na Slici 8.



Slika 8. A. L-SIL - *Condyloma acuminatum*; B. L-SIL. Skvamozni epitel pokazuje poremećaj organizacije i koilocitnu atipiju, koja je najprominentnija na površini ; C. Koilocitna atipija. Izvor: *Nucci MR, Parra- Heran C, 2019. (50)*

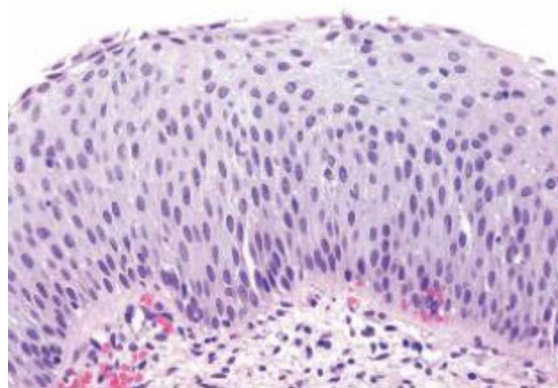
Displastične promjene u cervikalnom epitelu, odnose se na karakteristike ćelija, njihov raspored, stepen zrelosti i odnos prema stromi i žlijezdama. Nalaze se: nejednakost u obliku i veličini ćelija i jedara, poremećaj n/c odnosa, različita količina i karakteristike hromatina i razlike u izgledu i broju jedaraca i prisustvu mitozu (48).

Kod promjena po tipu CIN I obrazac skvamozne maturacije je očuvan, a mitotske figure ograničene su na bazalni i parabazalni sloj. S obzirom da glikogenizacija epitelnih skvamoznih ćelija, kao i reaktivne promjene u inflamaciji mogu imitirati koilocitozu, Kalof i saradnici preporučuju da je za postavljanje dijagnoze CIN I, pored koilocitoze, neophodno postojanje izraženih cito-nuklearnih pomjena u donjoj trećini skvamoznog epitela, kao što su iregularnost jedarnih kontura, binukleacija ili multinukleacija, hiperhromazija i/ili celularni pleomorfizam (Slika 9) (69).



Slika 9. A. Normalan glikogenizovan skvamozni epitel; B. L-SIL koji pokazuje pravu koilocitozu i cito-nuklearnu atipiju. Izvor: *Kalof NA, Cooper K, 2007. (69)*

Diferencijalno dijagnostički, treba imati u vidu mogućnost hiperplazije ćelija bazalnog sloja (Slika 10), koja se karakteriše zadebljanjem bazalnog i parabazalnog sloja, uvećanjem jedara i bazofilijom citoplazme. Aranžman ćelija bazalnog sloja po tipu “drvene ograde” je narušen, ali se ne nalaze hiperhromazija ili nuklearni pleomorfizam, a iznad ovog zadebljanog sloja maturacija i polarnost epitela su očuvani (69).



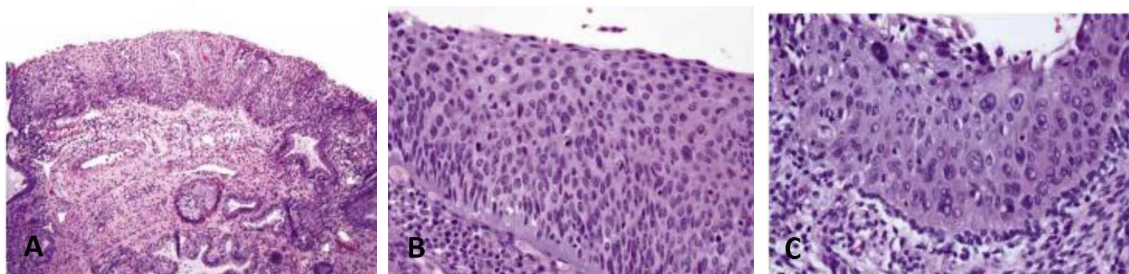
Slika 10. Hiperplazija ćelija bazalnog sloja. Obrazac “drvene ograde” u bazalnom sloju je narušen, postoji proliferacija monomorfnih bazalnih ćelija u gotovo kompletnoj debljini epitela, ali su ćelije bez nuklearne atipije i hiperhromazije. Izvor: *Kalof NA, Cooper K, 2007. (69)*

Kod displazija teškog stepena (Slika 11), postoji gubitak maturacije, poremećaj orijentacije jedara, povećanje n/c odnosa, iregularne nuklearne konture i grublji hromatin, a mitoze se vide u gornjim slojevima epitela, pri čemu su pojedine patološke (69).

Kod H-SIL-a, kao i kod L-SIL-a jedarca su neuočljiva. Displastične ćelije pokazuju sincicijalni način rasta, bez jasnih granica između ćelija zbog nagomilavanja u parabazalnom sloju (48).

Kod CIN II, ćelijska atipija je prisutna cijelom debljinom, ali se u površinskim slojevima epitela nalazi skvamozna maturacija sa stratifikacijom (69), ili koilocitna atipija (48). Većina cito-nuklearnih abnormalnosti nalaze se u donjoj i srednjoj trećini epitela (69).

Kod CIN III, prisutna je cito-nuklearna atipija cijelom debljinom epitela, maturacija je odsutna ili minimalna (69), često sa slojem atipičnih parakeratotičnih ćelija na površini (48), a nalaze se i brojne mitotske figure, koje postoje i u gornjim slojevima epitela.



Slika 11. A. CIN II. Imaturne epitelne ćelije u donje dvije trećine epitela, uz prisutno sazrijevanje u gornjoj trećini. U bazalnom sloju prisutni su poremećaj organizacije epitelnih ćelija i nuklearno uvećanje; B. CIN III. Uočavaju se diskeratotične ćelije i izostanak maturacije u svim slojevima; C. CIN III. Prisutan je izražen sincicijalni obrazac bazalnih ćelija uz izražen poremećaj n/c odnosa i anizonukleozu u svim slojevima. Izvor: *Nucci MR, Parra- Heran C, 2019. (50)*

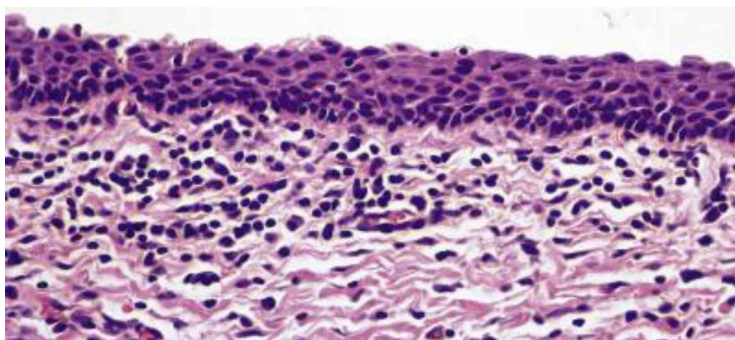
U diferencijalnoj dijagnozi H-SIL-a, u obzir najčešće dolaze: imaturna skvamozna metaplazija, reaktivna atipija, hiperplazija ćelija bazalnog sloja i skvamozna atrofija (69).

Pojam atipične imaturne skvamozne metaplazije uveden je 1983. godine kako bi opisao cervikalne lezije sa jedinstvenom intraepitelnom proliferacijom bazalnih ćelija cijelom

debljinom, s visokim nuklearnim denzitetom i odsustvom sazrijevanja, ali uz nedovoljno kriterijuma za dijagnozu CIN III (70). Kod imature skvamozne metaplazije, uprkos povećanju n/c odnosa i relativnog gubitka maturacije, generalno se nalaze epitelne ćelije koje su okruglog do ovalnog oblika, uniformne, bez njihovog nagomilavanja, dobro definisanim ćelijskim membranama, sa jednim nukleolusom, jasnim konturama jedra i normalnom distribucijom hromatina. Na površini mogu biti prisutne cilindrične ćelije, što olakšava dijagnozu (48, 69).

Kod reaktivnih i reparativnih promjena nalaze se uvećana, vezikularna jedra, prominentni nukleolusi, a česta je i povećana mitotska aktivnost. U reaktivnim stanjima, atipija koja se vidi je ograničena na donju polovinu epitela, sa održavanjem maturacije epitelnih ćelija u površinskom sloju (69).

Skvamozna atrofija, koja se javlja kod žena u menopauzi i onih na terapiji oralnim kontraceptivima, karakteriše se istanjenjem epitela i odsustvom dokaza o ćelijskoj diferencijaciji. Ćelije su parabazalnog tipa, monomorfne, postoji povećanje n/c odnosa, ali bez jedarnog pleomorfizma, uz odsustvo ili vrlo nisku mitotsku aktivnost (Slika 12) (69).



Slika 12. Skvamozna atrofija. Atrofične epitelne ćelije pokazuju povećanje n/c odnosa i nuklearno uvećanje i imitiraju H-SIL. Izvor: *Nucci MR, Parra- Heran C, 2019. (50)*

Kod žena u menopauzi, u zoni transformacije se nekad nalazi i tranziciocelularna metaplazija koja takođe može imitirati H-SIL. Podrazumijeva postojanje više od deset ćelijskih slojeva, odsustvo maturacije, dok su jedra vretenasta i iregularnih kontura. Međutim, za razliku od H-SIL-a u ovom entitetu ćelije površinskih slojeva su orijentisane

paralelno, a jedra su izdužena sa karakterističnim nuklearnim žljebovima, dok su mitoze rijetke (48).

1.5. Životni ciklus humanog papiloma virusa i HPV-indukovana kancerogeneza

Procjenjuje se da je čak 18% maligniteta u humanoj patologiji u vezi sa hroničnom infekcijom (71). Na listi patogena prvog reda kancerogenih za ljude, pored HPV-a, nalaze se i *Helicobacter pylori*, virus hepatitisa B, virus hepatitisa C, *Epstein-Barr* virus, humani herpes simplex virus-8, humani T-ćelijski limfotropni virus i dr. (72).

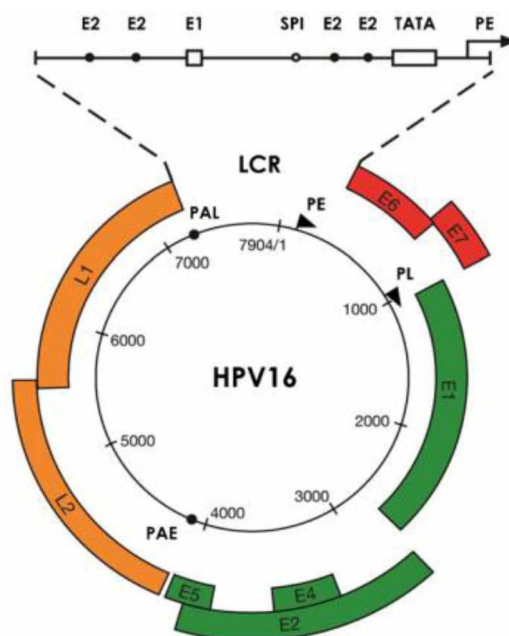
Nobelovu nagradu za 2008. godinu dobila su tri virusologa: François Barré-Sinoussi i Luc Montagnier za izolaciju HIV-a i Harald zur Hausen za izolaciju DNK tipova 16 i 18 humanog papiloma virusa u cervikalnom karcinomu. Doprinos zur Hausen-a i njegovih kolega u razjašnjenju uloge infekcije u nastanku cervikalnog karcinoma je od fundamentalnog značaja (73).

HPV je član porodice *Papillomaviridae*, koji inficiraju epitelne ćelije skvamoznog epitela. Papilomavirusi klasifikovani su po genotipu i do sada je u kliničkim biopsijama prema sekvenci gena koji kodira veliki kapsid-protein L1 identifikovano preko 200 tipova. Pojedini tipovi virusa pokazuju predilekciju ka kutanom ili mukoznom skvamoznom epitelu, a u obje grupe nalaze se tipovi koji imaju nizak, odnosno visok onkogeni potencijal (73).

HPV infekcija udružena je sa velikim brojem benignih i malignih promjena kože, anogenitalne regije, usne duplje i larinksa. Kutane promjene poput virusnih bradavica i veruciformne displazije su uzrokovane niskorizičnim genotipovima kao što su genotipovi: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 14, 15 i drugi. U larinksu se mogu detektovati kako benigne lezije uzrokovane ovim virusom, poput laringealne papilomatoze, u čijoj osnovi su niskorizični HPV genotipovi 6 i 11, tako i maligne promjene u čijoj osnovi se najčešće nalazi genotip 16 (74).

U genitalnom traktu do sada je izolovano oko 30-40 HPV genotipova. Među niskorizičnim genotipovima nalaze se: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, 81. U grupu visokorizičnih genotipova spadaju: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82 (48, 74). U 50-70% slučajeva karcinoma cerviksa nađena je infekcija genotipom 16, a

u 7-20% slučajeva nađen je genotip 18 (75). Humani papiloma virusi su mali DNK virusi koji imaju jednostavan dvostruko uvijeni DNK lanac sa 8000 baznih parova, koji kodiraju do deset proteina. HPV genom sadrži tri regiona (Šema 1): rani (*early*) region koji sadrži gene za nestrukturane proteine: E1, E2, E4, E5, E6, E7 i E8; kasni (*late*) region koji sadrži gene L1 i L2 zadužene za sintezu strukturnih proteina virusnog kapsida i nekodirajući region - LCR (*long control region*) koji sadrži vezujuća mjesta za mnoštvo transkripcijskih i regulatornih faktora kojima se aktiviraju ili suprimiraju rani i kasni promotori (76).



Šema 1. Prikaz HPV genoma, genotipa 16. Izvor: Doobar J, 2012. (77)

HPV inficira ćelije bazalnog sloja kroz mikroabrazije epitela (76). Pretpostavlja se da prisustvo određenih površinskih receptora na membranama koji su ograničeni na bazalne ćelije uslovljava da upravo one budu mjesto inicijalnog vezivanja virusa. U nekim od najranijih studija, korišćenjem neinfektivnih virusu-sličnih partikula (*non-infectious virus like particles* (VLPs)), prikazano je da su VLPs građene samo od L1 i da se vezuju slično kao i one koje sadrže i L1 i L2, što ukazuje da L1 sadrži glavne determinante za inicijalno pričvršćivanje virusa (78).

Pokazano je da L1/L2 pseudovironi nemaju sposobnost infekcije primarno kultivisanih keratinocita i ne pokazuju mogućnost infekcije intaktnog epitelnog tkiva *in vivo* kako pločastoslojevitog, tako ni prostog cilindričnog epitela. Na modelu miša prikazano je da je inicijalno vezivanje HPV pseudoviriona ograničeno na bazalnu membranu i to samo nakog što ovi regioni epitela budu izloženi mehaničkoj ili hemijskoj traumi. Nekoliko časova nakon vezivanja za bazalnu membranu, kapsidi se detektuju na površini epitelnih ćelija koje se nalaze u blizini oštećenja (79).

Pričvršćivanje virusa za membrane bazalnih ćelija može biti posredovano heparin-sulfatom nakon čega virus ulazi u ćeliju procesom endocitoze (77).

Većina *in vitro*, kao i *in vivo* studija danas, ukazuju da heparin-sulfat proteoglikani (HSPGs) predstavljaju kritični primarni faktor za pričvršćivanje virusa, a u prilog ovoj teoriji ide i činjenica da primjena heparinaza ili heparina dovodi do inhibicije vezivanja (80, 81).

HPV infekcija je spora i asinhrona. Na modelima miša prikazano je da je za reparaciju epitela potrebno jedan do dva dana. Samim tim dolazi do odlaganja inicijacije virusne genske ekspresije u trajanju od dan-dva, što može olakšati izbjegavanje inicijalnog imunološkog odgovora na infekciju. Međutim, upravo to može biti slaba tačka virusa u primjeni vakcina, jer prolongirano izlaganje neutrališućim antitijelima potencijalno doprinosi efikasnosti L1/L2-baziranih profilaktičkih vakcina (82).

E1 i E2 proteini zaduženi su za virusnu DNK replikaciju. E1 je ATP-zavisna helikaza koja inicira virusnu replikaciju u sadejstvu sa E2 proteinom. Protein E2 igra važnu ulogu u segregaciji virusnog DNK plazmida u ćelijskoj diobi. Simultanim vezivanjem za virusni genom i hromatin-vezane proteine u ćeliji, E2 protein osigurava pravilnu segregaciju virusne DNK u kćerke ćelije (74, 83).

Uloga E4 proteina nije do kraja razjašnjena, ali je poznato da je njegova ekspresija neophodna za produktivnu fazu životnog ciklusa virusa. Takođe, protein E4 se obilno eksprimira u kasnoj fazi životnog ciklusa virusa, pa je moguće da olakšava oslobađanje zrelog virusa iz ćelija. Takođe kod HPV genotipova 16 i 18, nađeno je da protein E4 može da vezuje i stabilizuje E2, sugerišući mogućnost postojanja regulatorne petlje usmjerene

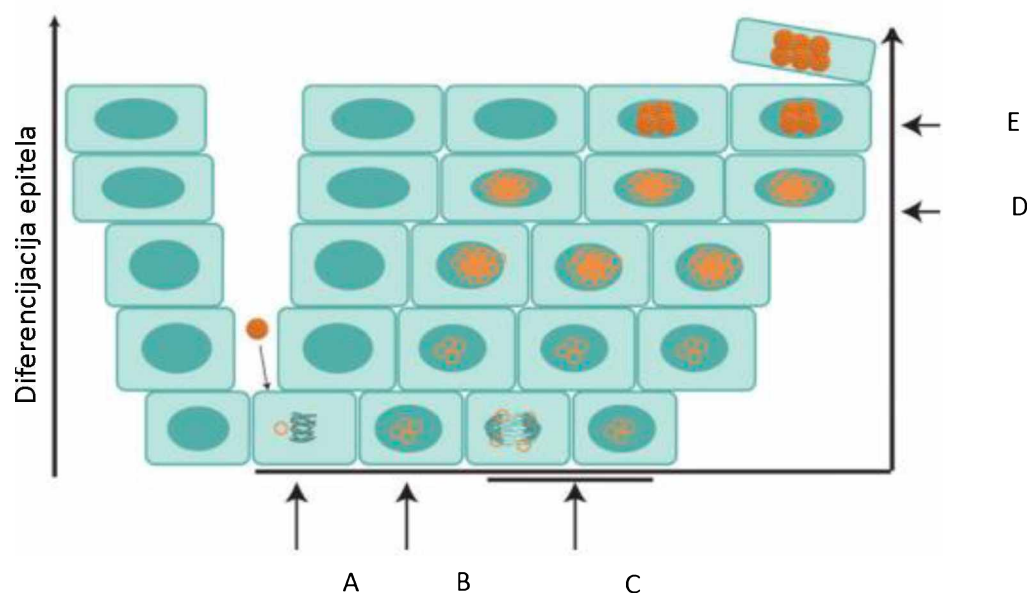
na virusnu replikaciju i transkripciju (84). Protein E4 takođe pojačava amplifikaciju genoma direktno kroz regulaciju prekida G2 faze i aktiviranjem ćelijskih kinaza (85, 86, 87). Jedna od važnih uloga E4 proteina jeste sposobnost da restrukturiše keratinske filamente čineći inficirane ćelije fragilnim i podložnim za oslobađanje virusa potomaka (88, 89, 90, 91).

Protein E5 je kratak, transmembranski protein koji ima antiapoptotsku ulogu, pogađa adhezije ćelija za matriks i ometa diferencijaciju epitelnih ćelija. E5 može da stabilizuje EGFR i stimuliše aktivaciju MAP kinaza (*mitogen-activated protein kinase*) (92). Takođe, protein E5 omogućava izbjegavanje imunološkog odgovora kroz represiju prezentacije virusnih peptida (93).

E6 i E7 proteini promovišu progresiju ćelijskog ciklusa i replikaciju virusne DNK u zrelih keratinocitima. Kod visokorizičnih tipova HPV-a, protein E6 se vezuje za p53 tumor supresorski protein i uslovljava njegovu degradaciju preko ubikvitin-posredujućeg procesa. Protein E6 vezuje se direktno sa E6-vezujućim proteinom koji funkcioniše kao specifična ubikvitin-ligaza za p53 degradaciju. Niskorizični tipovi HPV-a mogu takođe da vežu E6-vezujući protein i formiraju kompleks sa p53, ali ovo vezivanje ne dovodi do njegove degradacije. E6 može da se veže za dva različita regiona p53 - region na karboksi-kraju za koji mogu da se vežu oba nisko- i visokorizična tipa i kor region koji korelira sa p53 degradacijom. Skorije je prikazano da je represija E6/E7 ekspresije genotipa 16, povezana sa brзом restoracijom tumor supresorskih puteva i masivnom apoptozom. Unikatna karakteristika visokorizičnih E6 onkoproteina je prisustvo PDZ vezujućih motiva na C-kraju, koji su odsutni kod niskorizičnih tipova i predstavljaju jedinstven molekularni potpis za onkogeni potencijal kod različitih HPV genotipova (94, 95). PDZ domeni su sekvence dužine 80-90 aminokiselina. Ovi domeni su mjesta protein-protein interakcija sa ligandima koji sadrže takozvane PDZ-vezujuće motive. U slučaju mnogih proteina koji sadrže PDZ domene, smatra se da djeluju tako što, olakšavaju sastavljanje multiproteinskih kompleksa (96). Protein E7 vezuje ciklin-2-ubikvitin-ligazu kompleks i vrši ubikvitinaciju tumor supresorskog proteina - retinoblastoma (pRb) i njemu srodnih proteina (74, 77, 97).

Kasni geni, L1 i L2, kodiraju proteine virusnog kapsida. L1 kapsid proteini se sintetišu u citoplazmi inficirane epitelne ćelije, a potom prenose u jedro. L2 kapsid protein vezuje

se za specifična mjesta virusne DNK u jedru i regrutuje L1 za sklapanje novih virusnih partikula (77, 97, 98). I mada je HPV genom mali, vremenski i prostorni obrazac genske ekspresije je veoma kompleksan i zavisian od epitela koji se diferentuje (Šema 2) (77). HPV infekcija započinje, kako je već rečeno, kada virus uđe u ćelije bazalnog sloja koje predstavljaju ciljne ćelije virusa. Virusna DNK se transportuje u nukleus gdje HPV genom perzistira u vidu višestrukih epizomalnih kopija (99). Na početku infekcije u epitelnim ćelijama bazalnog sloja postoji mali broj virusnih kopija, da bi nakon nekog vremena od infekcije došlo do replikacije virusa koja se odigrava nezavisno od ćelijskog ciklusa, kojom se broj virusnih kopija amplifikuje (77). Proteini E1 i E2 regulišu ovu ranu virusnu DNK transkripciju (100). Kada je ekspresija E2 izraženija, E2 suprimira replikaciju virusne DNK blokiranjem ćelijskih transkripcionih faktora, čime se kontroliše broj HPV DNK kopija u bazalnim ćelijama u procesu koji je analogan procesu negativne povratne sprege. Stabilan broj od oko 20-100 HPV DNK kopija po ćeliji regulisano je E1 i E2 virusnim proteinima u bazalnim ćelijama dokle god infekcija perzistira (101).



Šema 2. Životni ciklus HPV-a. A. Ulazak virusa, gubitak omotača i vezivanje za hromosome domaćina; B. Inicijalna amplifikacija DNK; C. Uspostavljenje genoma, održavanje replikacije, dioba kroz vezivanje hromozoma domaćina; D. Amplifikacija DNK; E. Pakovanje genoma. Izvor: modificovano *McBride AA, 2017.* (98)

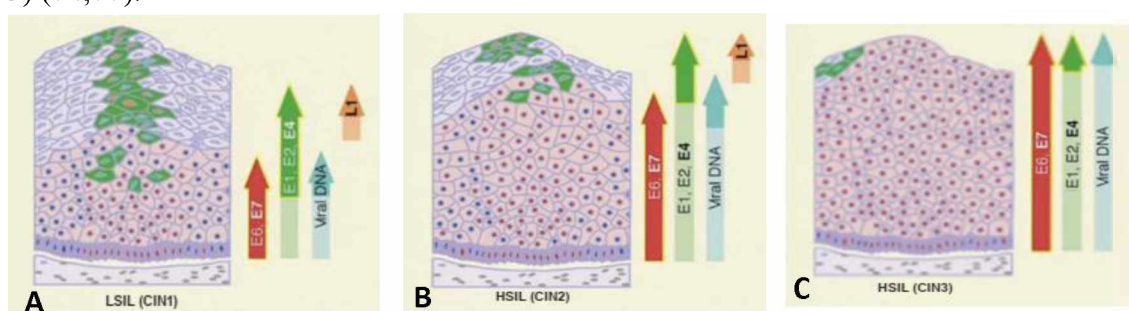
Kako se epitelne ćelije dijele, E2 posreduje u distribuciji HPV DNK na kćerke ćelije, dok određeni broj kopija ostaje u progenitorskim ćelijama, u oba slučaja kao epizomi (102). Nakon određenog vremena dolazi do pomjeranja ćelija bazalnog sloja u parabazalni sloj u kome se dešava njihova proliferacija. Ovde se odigrava faza plazmidskog ili epizomalnog održavanja, u kojoj je virusna genska ekspresija minimalna, preciznije ekspresija onkogeni E6 i E7 je pod čvrstom kontrolom sa jedva detektibilnim brojem mRNK kopija (97).

Kada inficirani keratinociti dalje uđu u proces diferencijacije pobuđujući ćelijski ciklus, dolazi do masivne ushodne regulacije virusnih gena sa obilnom ekspresijom ranih gena E6 i E7. Dolazi do replikacije virusne DNK, sa amplifikacijom broja virusnih kopija na najmanje 1000 kopija po inficiranoj ćeliji i konačno do ekspresije kasnih proteina L1 i L2 i sklapanja virusa. Ovaj ciklus *in vivo* traje 2 do 3 nedelje, koliko je potrebno i bazalnim keratinocitima da se diferenciraju (77, 103).

Dakle, ova dešavanja moguća su samo u ćelijama koje se diferenciraju i imaju pobuđen ćelijski ciklus. Papiloma virusi kodiraju samo jedan enzim za replikaciju DNK - E1, pa pored ovoga i virusnog proteina E2, replikacija virusa u potpunosti je zavisna od ćelijske DNK-sintetišuće mašinerije. Problem za replikaciju virusa predstavlja to što su DNK-polimeraze i faktori replikacije dostupni jedino u ćelijama koje se dijele, ali HPV prevazilazi ovaj problem kodirajući proteine, koji reaktiviraju ćelijsku DNK sintezu, inhibiraju apoptozu i odlažu ćelijsku diferencijaciju, na taj način kreirajući sredinu koja dozvoljava replikaciju virusne DNK. Precizni mehanizmi kojima HPV ovo postiže nisu dovoljno poznati, ali smatra se da virusni geni E6 i E7 u ovom procesu imaju centralnu ulogu (74, 77).

Kako se epitelne ćelije, idući ka površini diferenciraju, tako se virus produktivno replikuje. U HPV inficiranom epitelu, epitelne ćelije ekspresiraju E6 i E7 proteine u suprabazalnom sloju. Protein E6 inhibira apoptozu koja je normalan odgovor na virusnu infekciju, dok E7 ima kapacitet da prevaziđe fiziološku blokadu DNK sinteze u G1/S fazi ćelijskog ciklusa u ovim postmitotskim ćelijama. Stoga, E7 aktivira mehanizme replikacije ćelijske DNK, dozvoljavajući zrelim epitelnim ćelijama da ponovo uđu u S fazu ćelijskog ciklusa, i mada ovo obično rezultira nekompletnom replikacijom ćelijskog genoma, čini da ćelijska mašinerija za replikaciju postane dostupna za virusnu DNK

replikaciju (77). Razlike u kancerogenosti cerviks-specifičnih tipova HPV-a najvećim dijelom su u vezi sa ekspresijom gena E6 i E7. Kod većine slučajeva L-SIL-a postoji održavanje virusa kao epizoma, kompletan ciklus replikacije virusa, a virusna genska ekspresija, naročito ekspresija E6 i E7 je dobro regulisana. Kasni virusni geni se ekspimiraju i virusne partikule se sklapaju. H-SIL je povezan gotovo isključivo sa visokorizičnim tipovima HPV-a. Usled poremećaja u diferencijaciji epitelnih ćelija, ne postoji ni mogućnost da se virusni ciklus kompletira. Samim tim ekspresija kasnih gena je ili izgubljena ili značajno redukovana, a ekspresija E6 i E7 gena je deregulisana (Šema 3) (74,77).



Šema 3. Ekspresija virusnih gena u: A. L-SIL-u (CIN I); B. H-SIL-u (CIN II); C. H-SIL-u (CIN III). Izvor: modifikovano *WHO classification of female reproductive organs, 2014.* (104)

Kao što smo već napomenuli, kod HR-HPV genotipova, E6 protein, produkt E6 gena, formira ubikvitin-ligaza kompleks sa E6-vezujućim proteinom, na taj način promovišući degradaciju p53 proteina (105).

Protein p53 je produkt jednog od najvažnijih tumor supresorskih gena. Njegova aktivacija dešava se kao odgovor na različite vrste stresa počevši od anoksije, preko neadekvatne ekspresije onkogeno do oštećenja integriteta DNK (106). U ćeliji kod koje se dešava neki od već pomenutih procesa, p53 podleže post-transkripcionim modifikacijama, zahvaljujući kojima se on oslobađa od veze sa proteinom MDM2 (*Mouse Double Minute 2 homolog*), sa kojim je u zdravim ćelijama udružen, što ga usmjerava ka sistemu za uništenje. Po oslobađanju veze sa proteinom MDM2, p53 biva aktiviran, te ovaj protein sprečava neoplastičnu transformaciju ćelije na nekoliko načina (107, 108, 109).

Jedan od načina je izazivanje zastoja u ćelijskom ciklusu što pruža vrijeme da se oštećenje ispravi. Zastoj se dešava u G1 fazi, i to transkripcijom inhibitora ciklin-zavisne kinaze 1A - p21. Takođe, p53 potpomaže reparaciju povećanjem ekspresije pojedinih proteina, kao što je GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage*). Ako je popravka bila uspješna, p53 će povećati transkripciju MDM2, što će dovesti do njegove razgradnje i nastavka ćelijskog ciklusa (110).

Ukoliko popravka nije moguća, p53 će indukovati starenje ćelije, koje predstavlja trajni zastoj u ćelijskom ciklusu ili apoptozu, posredstvom nekoliko apoptotskih gena, kao što su BAX i PUMA (111).

U HPV infekciji drugi važan događaj je vezivanje proteina E7 za pRb. Ovaj protein, produkt tumor supresorskog Rb gena predstavlja glavni negativni regulator ćelijskog ciklusa (112, 113). Rb vrši kontrolu ćelijskog ciklusa u G1 fazi, koja je jedna od glavnih kontrolnih tačaka (114). Kada ćelija prođe G1 fazu ćelijskog ciklusa, ona će obavezno završiti mitozu, sa ili bez pauze. Međutim, u G1 fazi ćelija može privremeno ili trajno da napusti ćelijski ciklus. Rb upravo u ovoj fazi igra ključnu ulogu, tako što će u svom aktivnom hipofosforilisanom obliku, spriječiti transkripciju ciklina E, vezivanjem i inhibicijom E2F familije transkripcijskih faktora (115).

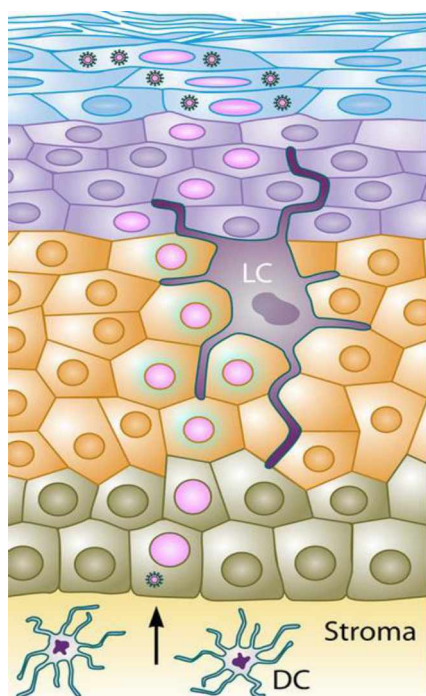
Onkoprotein E7 vezuje Rb i izmješta transkripcioni faktor E2F, što podstiče prolaz ćelije kroz ćelijski ciklus. E7 takođe inaktivira i inhibitore ciklin-zavisnih kinaza CDKN1A (p21) i CDKN1B (p27), a može da aktivira cikline E i A. Poznato je da E7 protein stupajući u interakcije sa ciklinA-CDK2 kompleksom stimuliše progresiju ćelijskog ciklusa (116, 117, 118).

Opisane interakcije virusnih onkoproteina E6 i E7 prikazane su na Šemi 4.

Replikacija HPV-a odigrava se znatno sporije u poređenju sa nekim drugim, naročito RNK virusima. Samim tim, da bi infekcija perzistirala dovoljno dugo kako bi virus kompletirao svoj životni ciklus, neophodan je razvoj mehanizama izbjegavanja imunološkog nadzora. Kontrola HPV infekcije uspostavlja se dejstvom kako urođenog, tako i stečenog imuniteta, uključujući dejstvo specifičnih antitijela i efektorskih T limfocita (121).

Srećom, većina HPV infekcija podliježe rezoluciji, iako ovaj proces može trajati jednu do dvije godine, mali procenat inficiranih osoba razvije HPV-indukovani karcinom (122).

HPV ne sekretuje proteine, virusni proteini se eksprimiraju na jako niskom nivou, virus ne indukuje viremiju, kao ni ćelijsku smrt (Šema 5) (123, 121). Takođe, virus ne prolazi kroz bazalnu membranu, gdje su inflamatorne ćelije zastupljene u većoj mjeri. Sve ovo uslovljava slab humoralni i poremećen ćelularni imuni odgovor na HPV proteine E2, E6 i E7. Neodgovarajući imuni odgovor na HPV infekciju bazira se na širokom spektru strategija koje je ovaj virus razvio.



- Virusni protein se eksprimiraju na niskom nivou
- Nema viremije, ćelijske smrti, ni inflamacije
- U odsustvu inflamacije keratinociti ne oslobađaju proinflamatorne citokine
- Izostaje aktivacija Langerhansovih i stromalnih dendritskih ćelija
- Izostaju stimulusi za aktivaciju i migraciju, dendritskih ćelija, kao i procesuiranje i prezentaciju antigena

Šema 5. Odnos između humanog papiloma virusa i Langerhansovih ćelija (LC) u epitelu i dendritskih ćelija (DC) u stromi. Izvor: modifikovano *Stanley MA, 2012.* (73)

Jedna od tih strategija je sposobnost HPV-a da održava ekspresiju ranih gena na niskom nivou. U nižim slojevima epitela niska ekspresija ranih gena kontrolisana je od strane proteina E2. Tako niži nivoi ekspresije ometaju detekciju inficiranih ćelija od strane antigen-prezentujućih ćelija, a samim tim i adekvatan stečeni imunološki odgovor (124).

Takođe, visoko imunogeni virioni nalaze se samo u gornjim slojevima epitela, u kojima se nalaze terminalno diferentovani keratinociti, pa će virioni biti oslobođeni u procesu normalne deskvamacije keratinocita, pri čemu nema litičke smrti ćelija. U ovim površinskim slojevima ćelije imunog sistema imaju ograničen pristup, što dodatno otežava proces imunološkog prepoznavanja (121, 125).

HPV kroz uticaj na DNK metilacione mehanizme može modifikovati ekspresiju određenih gena domaćina. U uslovima hipermetilacije generalno, smanjuje se transkripcija, pa je tako pokazano da posredstvom proteina E7 u HPV infekciji dolazi do hipermetilacije promotera CXCL14 koji je važan hemokin za više različitih limfocita, NK ćelija, Langerhansovih i dendritskih ćelija (126, 127, 128).

Isto tako, posredstvom E6 dešava se metilacija transkripcionih mjesta u blizini gena koji kodiraju sintezu interferona tipa I (IFN)- κ koji se eksprimira samo u keratinocitima i dendritskim ćelijama (129). Protein E7 takođe indukuje metilaciju promotera E-kaderina, koji je glavni adhezioni molekul važan za pomjeranje Langerhansovih ćelija kroz pločastoslojeviti epitel (130).

Osim DNK metilacije, utvrđeno je da HPV indukuje i modifikaciju histona, što može kao epigenetski mehanizam usloviti alteraciju genske ekspresije Toll-like receptora (131).

Keratinociti su prva fizička barijera koju patogeni treba da prevaziđu. Stoga, keratinociti imaju sposobnost indukcije različitih interferona i takođe ekspimiraju Toll-like receptore. Dokazano je da u HPV infekciji postoji deregulacija signalizacije interferona na različitim nivoima (132).

Takođe, HPV ometa multiple komponente antigen-prezentujuće mašinerije, ometa i efikasno stvaranje epitopa na citotoksičnim limfocitima koji su direktno odgovorni za ubijanje inficiranih ćelija. Tako na primjer, virusni protein E7 direktno blokira teški lanac

promotera velikog kompleksa histokompatibilnosti tip I (*Major histocompatibility complex* (MHC I)) (124, 133).

Uz sve navedene intracelularne mehanizme, HPV takođe posjeduje sposobnost ometanja celularne imune mreže, kroz ometanje dejstva antigen-prezentujućih ćelija, kao i efektorskih ćelija. U tom smislu Langerhansove ćelije ne bivaju aktivirane virusu-sličnim partikulama, a već pomenutom nishodnom regulacijom E-kaderina Langerhansove ćelije napuštaju epitel. Dokazano je da je samo protein E7 dovoljan da dovede do redukcije intraepitelnih Langerhansovih ćelija (134, 135).

HPV takođe pokazuje sposobnost ometanja polarizacije Th1/Th2 odgovora, pa je tako u ranim lezijama pokazano da se citokini udruženi sa Th2 odgovorom detektuju u maloj mjeri, dok u lezijama višeg gradusa dolazi do ushodne regulacije citokina asociranih i sa Th1 i sa Th2 odgovorom, što oslikava nekoordinisan imunološki odgovor (136, 137).

U cilju izbjegavanja imunološkog nadzora HPV-indukovani tumori kreiraju imunosupresivnu sredinu, u kojoj dolazi do infiltracije imunosupresivnim tipovima ćelija, kao što su M2 polarizovani makrofagi, supresorne ćelije porijekla koštane šrži i regulatorni T limfociti (138).

U kontekstu inflamatornog odgovora na HPV infekciju ispitivana je uloga transkripcionog nuklearnog faktora κB (*nuclear factor* (NF))- NF κB , koji predstavlja glavni faktor u inflamaciji i regulaciji ekspresije gena uključenih u kontrolu inflamatornih procesa, uključujući regulaciju sinteze interleukina 1β (*interleukine* 1β (IL1 β)), ciklooksigenaze-2 (*cyclooxygenase*-2 (COX-2)) i faktora tumorske nekroze α (*tumor necrosis factor* (TNF α)) (139, 140). (NF)- κB posreduje i u ekspresiji matriksne metaloproteinaze 9 (*matrix metalloproteinase*-9 (MMP9)) i EGFR, za koje se smatra da imaju ulogu u procesu progresije tumora i njihovom metastaziranju (139). Dokazano je da su u normalnom tkivu cerviksa, kao i u intraepitelnim neoplazijama niskog gradusa NF- κB subjediničice, p50 i p65, kao i njegov inhibitor I $\kappa B\alpha$ uglavnom lokalizovani u citosolu, dok je kod intraepitelnih neoplazija visokog gradusa, kao i kod invazivnog planocelularnog karcinoma p50-p65 heterodimer translociran u jedro (141).

U uslovima inflamacije, kako u inflamatornim, tako i u epitelnim ćelijama stvaraju se reaktivne vrste kiseonika i reaktivna azotna jedinjenja, uključujući azot-oksidi. Ovi molekuli, izuzetno su reaktivni i mogu uzrokovati oksidativna i nitritivna oštećenja DNK (141, 142, 143).

U toku inflamacije formira se nitritivna DNK lezija, 8-nitroguanin. Reaktivna azotna jedinjenja takođe mogu indukovati aktivaciju prethodno pomenutog NF- κ B molekula u određenim okolnostima. Odatle, recipročna i pozitivna regulacija reaktivnih azotnih jedinjenja i NF- κ B molekula može voditi ka perzistentnoj inflamaciji i nitritivnom oštećenju DNK, doprinoseći na taj način karcinogenezi (141).

Inflamacija takođe, može dovesti i do epigenetskih modifikacija uključujući već pomenutu metilaciju DNK i histona, vodeći do utišavanja tumor-supresorskih lokusa (144, 145).

HPV onkoproteini E6 i E7 kroz indukciju ćelijske besmrtnosti, deregulaciju ćelijskog ciklusa i izazivanje hromozomske nestabilnosti, promovišu ćelijsku proliferaciju i transformaciju iniciranu oksidativnim i nitritivnim DNK oštećenjem i što sve zajedno doprinosi promociji tumorogeneze (141).

Prvi sveobuhvatan koncept kancerogeneze uopšte predložili su Hanahan i Weinberg 2000. godine i prema ovom konceptu, kancerogeneza je višestepeni proces u kome tumorske ćelije stiču sposobnost da održavaju proliferativnu signalizaciju, izbegavaju dejstvo supresora rasta, izbegavaju apoptozu, omogućavajući replikativnu besmrtnost, indukuju angiogenezu i aktiviraju mehanizme invazije i metastaziranja. U osnovi ovog višestepenog procesa je nestabilnost genoma, koja generiše genetski diverzitet i inicira inflamaciju (120).

Daljim istraživanjima u domenu kancerogeneze, ovom konceptu su kasnije dodata dva nova obilježja neoplastičnog procesa i to: reprogramiranje energetskeg metabolizma tumorskih ćelija i sposobnost tumorskih ćelija da izbegavaju imuni sistem. Osim toga pokazano je da tumori u svojoj stromi sadrže širok repertoar, naizgled normalnih ćelija koje doprinose sticanju i održavanju karakterističnih osobina stvaranjem tzv. tumorskog mikrookruženja (146).

Još u XIX vijeku Virhof je notirao prisustvo leukocita u neoplastičnim tkivima i sugerisao da „limforetikularni infiltrati“ reflektuju porijeklo karcinoma na mjestima hronične inflamacije (147). Sa pronalaskom specifičnih imunohistohemijskih markera, danas je jasno da svaka neoplastična lezija sadrži inflamatorne ćelije čija gustina varira od niske, detektibilne samo upotrebom specifičnih antitijela do veoma izražene, uočljive na rutinskim histohemjskim bojenjima (146). U tumorskoj stromi i graničnoj zoni nalaze se različite ćelije imunskog sistema uključujući T i B limfocite, makrofage, dendritske ćelije, neutrofilne granulocite i mastocite (148, 149).

Tradicionalno, ovaj upalni infiltrat smatran je pokušajem imunološkog sistema da eliminiše tumorske ćelije i veliki je broj dokaza koji potkrijepljuju hipotezu o anti-tumorskom dejstvu imunog sistema. Nekroza tumorskih ćelija, koja je kako istraživanja sugerišu u nekim slučajevima genetski orkestriran, a ne nasumičan i slučajan proces (150, 151), dovodi do oslobađanja proinflamatornih signala, što nije slučaj u procesima apoptoze i autofagije. Rezultat ovoga je regrutacija različitih ćelija imunog sistema čija je fundamentalna uloga, kako je već rečeno da proces oštećenja ograniče i njegov uzrok eliminišu. Adekvatan imunološki nadzor, prije svega kroz očuvanje funkcije i integriteta T-limfocita, omogućava detekciju i eliminaciju maligno transformisanih ćelija prije nego što bolest postane klinički evidentna (120, 146).

Rezultati brojnih studija na različitim solidnim tumorima ukazuju na postojanje snažne veze između većeg procenta tumor-infiltrirajućih limfocita u stromi i bolje prognoze samog tumora (152). Međutim, u kontekstu neoplazije, sve je više naučnih dokaza koji upućuju da inflamatorni odgovor, paradoksalno može djelovati i pro-tumorogeno, te da u kontekstu inflamacije dolazi do napredovanja malignog procesa. Uloga inflamacije u tumorogenezi danas je generalno prihvaćena i evidentno je da je inflamatorna mikrosredina esencijalna komponenta svih tumora (153).

Inflamatorne ćelije u tumorskom mikrokruženju, oslobađaju različite bioaktivne molekule, uključujući faktore rasta koji održavaju proliferativnu signalizaciju, faktore preživljavanja koji ograničavaju ćelijsku smrt, proangiogene faktore i enzime koji modifikuju ekstracelularni matriks i olakšavaju angiogenezu, invaziju i metastaziranje (154). S toga nekroza tumorskih ćelija, kroz naizgled pozitivan efekat u balansiranju

nasuprot nekontrolisanoj hiperproliferaciji, zapravo kroz stimulaciju inflamatornog odgovora donosi više negativnih efekata nego koristi.

Takođe, evidentno je da u nekim slučajevima inflamacija i u najranijim stadijumima neoplastične progresije može usloviti razvoj incipijentne neoplazme u uznapredovali karcinom (148, 154). Uz to, kroz oslobađanje hemijskih produkata, prevashodno reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, koja su aktivno mutagena za okolne kancerske ćelije, dolazi do genetske evolucije ka stanju ubrzavanja malignog potencijala (155).

U tom smislu, pored prepoznatog značaja proučavanja sastava intratumorskog upalnog infiltrata u malignim tumorima, kvantitativna analiza sastava ovog infiltrata u prekancerskim lezijama, za šta je cerviks idealan kandidat, mogla bi dati značajan doprinos razumijevanju evolucije i kompleksnosti imunološkog odgovora na displaziju i malignitet.

Pregled literature u pogledu zastupljenosti pojedinih inflamatornih ćelija u upalnom infiltratu u premalignim i malignim cervikalnim lezijama i njihova veza sa HPV infekcijom i neoplastičnim procesom pokazuje oprečne rezultate.

1.7. Mjere u suzbijanju cervikalnog karcinoma

1.7.1. Skrining cervikalnog karcinoma

Rana detekcija i tretman visokorizičnih lezija grlića materice od krucijalnog su značaja za suzbijanje cervikalnog karcinoma. SZO sugerše da obuhvat stanovništva skrining programima od 80% do 100% može biti efikasan metod za prevenciju cervikalnog karcinoma u zemljama u razvoju (156), te da bi doveo do redukcije učestalosti ovog kancera za 60% do 80% (157).

Međutim, većina žena u zemljama u razvoju i dalje nema pristup programima prevencije (158), te je na primjer, u Bangladešu obuhvat skriningom svega 1% (159).

Trenutno postoji više modela skrininga cervikalnog karcinoma koji obuhvataju: cervikalnu citologiju - Papanikolau test, HPV testiranje ili kombinaciju ovih testova. U

Tabeli 1 su prikazana tri trenutno dostupna modaliteta skrininga sa važnim karakteristikama kao što su senzitivnost, intervali skrininga i potrebe za trijažnim testom.

Tabela 1. Metode u skriningu cervikalnog karcinoma. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

	Cytology	HPV	Cotesting (Cytology and HPV)
Sensitivity	Lowest	Higher	Highest
Repeat interval for negative screen	Shortest (highest cNPV)	Longer (lower cNPV)	Longest (lowest cNPV)
Number of women with positive screening results	Lowest	Higher	Highest
Triage test required	For equivocal cytology results	For all positive results	For all HPV-positive, cytology-negative results
Triage test options	HPV Repeat cytology Biomarkers	Cytology HPV genotyping Biomarkers	Repeat cotest HPV genotyping Biomarkers
Diagnostic test	Colposcopic biopsy		

Sama citologija, kao primarni skrining test, pokazuje nižu senzitivnost u detekciji cervikalnih prekancerskih lezija i viši procenat negativnih kolposkopija u odnosu na algoritme koji uključuju HPV testiranje, zbog čega je neophodan češći skrining. Senzitivnost HPV testiranja je viša sa manjim brojem negativnih kolposkopija što omogućava produžavanje intervala skrininga (60), međutim specifičnost ovog testa zbog detekcije i tranzijentnih infekcija je manja (160).

Svi skrining testovi zahtijevaju dalji trijažni postupak kako bi se identifikovale žene kojima je neophodna kolposkopija. U skriningu baziranom samo na citologiji, kategorija ASC-US zahtijeva trijažne testove koji u ovom slučaju predstavljaju: ponavljanje citologije, HPV testiranje i eventualnu upotrebu biomarkera. U skriningu koji se bazira

na HPV testiranju, trijažni test se zahtijeva kod svih HPV pozitivnih žena i obuhvata: HPV genotipizaciju, cervikalnu citologiju i upotrebu biomarkera (60).

Najšire ispitivani biomarkeri u citološkim uzorcima su p16 i Ki67. Rezultati većeg broja studija upućuju da upotreba dualnog p16/Ki67 bojenja u cervikalnoj citologiji pokazuje visoku senzitivnost i specifičnost u detekciji H-SIL-a i skvamoznog karcinoma (161).

Takođe, u pojedinim zemljama svijeta kao primarni skrining test koristi se vizuelna inspekcija grlića upotrebom sirćetne kiseline (*Visual Inspection using Acetic acid* (VIA)) ili Lugolovog rastvora (*Visual Inspection using Lugol's iodine* (VILI)). VIA i VILI podliježu subjektivnoj interpretaciji, zavisne su od nivoa treninga osoblja i zahtijevaju kontinuiranu provjeru kvaliteta rada onih koji je sprovode (162, 163).

S obzirom na naučne dokaze koji neosporno ukazuju da je infekcija visokorizičnim tipovima HPV-a udružena sa nastankom cervikalnog karcinoma, Američko udruženje za kancer, ASCCP i Američko udruženje za kliničku patologiju dali su preporuku da se u okviru skrining progama uz citologiju uvede HPV kotestiranje, kao i preporuke za dalji menadžment pacijentkinja (Tabela 2).

U skriningu u kome se sporovodi HPV/citologija kotestiranje, povećava se senzitivnost i znatno smanjuje potreba za trijažnim strategijama u slučajevima HPV pozitivnih žena sa citološki negativnim nalazom. Za slučajeve HPV pozitivnih žena, sa citološkim nalazom ASC-US ili L-SIL, indikovano je hitan kolposkopski pregled (60).

Međutim postavljeno je pitanje menadžmenta žena koje su HPV pozitivne, sa negativnom citologijom, a procjenjuje se da je ovakvih nalaza 4%. Smatra se da bi upućivanje ovih žena na kolposkopski pregled, udvostručio broj kolposkopija, dok kod mnogih, kolposkopski vidljive lezije još uvijek ne bi bile razvijene. Stoga su preporuke vodiča, da se kod ovih žena za godinu dana od inicijalnog HPV testiranja, testiranje ponovi, ali se preporučuje i HPV genotipizacija, pa u slučajevima kada se dokaže infekcija genotipovima 16 ili 18, savjetuje se hitan kolposkopski pregled, umjesto da se testiranje ponavlja za godinu dana (164).

Tabela 2. ASCCP 2012 preporuke u skriningu cervikalnog karcinoma. Izvor: *The Bethesda system for reporting cervical cytology, 2014.* (60)

Immediate colposcopy	SCC	HPV+/HSIL
	HSIL	HPV+/AGC
	ASC-H	HPV-/HSIL
	AGC	HPV+/ASC-H
	LSIL	HPV-/ASC-H
6–12 month return	ASC-US	HPV-/AGC
		HPV+/ASC-US
3–year return	NILM	HPV+/LSIL
		HPV-/NILM
5–year return		HPV-/ASC-US
	Cytology result	Co-testing result

Uz toliko mogućnosti, izbor optimalne strategije u skriningu je izazov i mora predstavljati balans između uspješnosti rezultata pretrage i materijalnih troškova. Dostupnost većeg broja testova, sa jedne strane omogućava dizajniranje skrining programa koji su prilagođeni datom zdravstvenom sistemu, a sa druge strane, kompleksnost opcija može biti zbunjujuća za one koji pružaju zdravstvene usluge, što je rizik za „osipanje“ žena koje se prate u vremenu (60).

SZO je u julu 2021. dala najnovije smjernice za skrining i tretman cervikalnog karcinoma, u kojima se nalaze preporuke za žene iz opšte populacije i žene koje su inficirane HIV-om. U obje grupe preporučeno je započinjanje skrininga od 30. godine života i HPV testiranje se preporučuje kao primarni skrining test (156).

Nacionalni skrining program cervikalnog karcinoma u Crnoj Gori započet je u februaru 2018. godine, a skriningom su obuhvaćene žene između 30 i 42 godine starosti. Primarni skrining test je određivanje prisustva HR-HPV, a žene sa pozitivnim testom pozivaju se

na ginekološke preglede: kolposkopiju, PAPA test - citološki pregled cervikalnog brisa metodom LBC i eventualnu biopsiju (165).

1.7.2. HPV vakcinacija

Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti trenutno odobrava upotrebu tri profilaktičke HPV vakcine koje se daju u dvije doze u razmaku od 6 mjeseci za osobe starosti od 9 do 16 godina i tri doze za starije od 16 godina (166).

Sve tri vakcine su razvijene na bazi virusu-slične partikule (*virus-like particle* (VLP)) velikog kapsid proteina L1 (167). S obzirom da se radi o vakcinama koje sadrže protein, a ne virusni genom, ove vakcine se smatraju neinfektivnim i neonkogenim, a samim tim bezbjednim (168).

U zavisnosti od proizvođača razlikuje se i sastav vakcina, odnosno VLPs pojedinih HPV genotipova. Dvovalenta vakcina sadrži VLPs HPV genotipova 16 i 18, i time targetira dva genotipa koji se nalaze u osnovi 70% cervikalnih karcinoma u svijetu. Četvorovalentna vakcina, uz to obuhvata i genotipove 6 i 11, koji su uzrok kondiloma u više od 80% slučajeva (169), dok se u devetovalentnoj vakcini uz 6, 11, 16 i 18 nalaze VLPs onkogenih genotipova 31, 33, 45, 52 i 58 (170, 171).

Mnogi faktori mogu uticati na obuhvat vakcinacije i efikasnost vakcine, a najprije životno doba u kome se započinje imunizacija (172). Studije su pokazale da vakcinacija prije prvog seksualnog kontakta može djelovati protektivno u 90% slučajeva, dok vakcinacija nakon ekspozicije HPV-u štiti u svega 50-60% slučajeva (173, 174). Što ranije započinjanje vakcinacije u populaciji omogućava i veću efikasnost. S tim u vezi najveći broj studija sugerše da bi vakcinaciju trebalo započeti kod djevojčica starosti 12 godina (175). Izbor vakcine u okviru nacionalnih programa treba bazirati na prevalenci HPV genotipova u datoj populaciji. Takođe, edukacija stanovništva jedan je od važnih faktora u uspješnosti implementacije programa imunizacije (176).

Preporuke SZO ukazuju da vakcinacija treba biti usmjerena prevashodno na djevojčice, s obzirom da je rizik kod njih deset puta veći u odnosu na HPV-povezane malignitete u muškoj populaciji. Visok obuhvat vakcinacije žena, kroz „imunitet krda“ obezbijedio bi

protekciju i heteroseksualnih muškaraca (177, 178). Jedna studija je pokazala da bi u slučaju vakcinacije 90% djevojčica rizik od razvoja karcinoma povezanih sa HPV-om kod muškaraca bio smanjen za 66%. Međutim mnoge zemlje, poput naše i dalje ne sprovode vakcinaciju djevojčica, a u mnogim zemljama u kojima se ona sprovodi obuhvat je manji od 60% (179).

Broj HPV-indukovanih karcinoma orofarinksa, usne duplje i larinksa kod muškaraca je 4 do 7 puta veći u odnosu na žene (180, 181). Takođe, u čak 90% slučajeva analnog karcinoma kod muškaraca i 75% slučajeva ovog maligniteta kod žena nalazi se HPV infekcija. Najčešće detektovani HPV genotipovi u analnim karcinomima su: 16, 18, 31, 33 i 45 i svi su pokriveni devetovalentnom vakcinom (181, 182). S toga, vakcinacija oba pola implementirana je u većem broju zemalja poput Australije, Austrije, Sjedinjenih Američkih Država, Norveške, Novog Zelanda itd (183).

Pomenute vakcine djeluju profilaktički, a savremena istraživanja usmjerena su na razvoj vakcine koja bi imala terapijski učinak, kroz aktivaciju celularnog imunog odgovora na infekciju i malignitet (184).

Vakcinacija profilaktičkim HPV vakcinama u Crnoj Gori se još uvijek ne sprovodi.

1.8. Imunohistohemijski markeri u dijagnostici intraepitelnih cervikalnih lezija i predikciji ishoda displazije

Uprkos velikom napretku postignutom na polju razjašnjavanja HPV-indukovane kancerogeneze i molekularne detekcije HPV-a u citološkim i hirurškim uzorcima, morfološka patohistološka procjena promjena u cervikalnom epitelu ostaje „zlatni standard“ u dijagnozi cervikalne displazije (69).

Terapijski pristup ovim lezijama zavisi od mnogih faktora, kao što su starost pacijentkinje, paritet i veličina promjene (69). Kod oko 80% pacijentkinja, kod kojih je dijagnostikovano CIN I, dolazi do spontane regresije lezija (185). Sa druge strane CIN II i CIN III lezije nose izvjesni rizik od progresije u invazivni karcinom (69). Međutim, uprkos niskom riziku progresije CIN I i relativno niskom riziku progresije CIN II, ove lezije se nerijetko tretiraju invazivnim hirurškim metodama (186, 187).

Sa ciljem da se ograniči tretman u grupi CIN I i CIN II lezija, nameće se potreba ka pronalaženju novih biomarkera uz pomoć kojih bi se sa sigurnošću pravila razlika između onih lezija koje će najvjerojatnije spontano regredirati i onih kod kojih postoji visok rizik ka progresiji. Primjena novih markera potrebna je i kod prevazilaženja nekih dijagnostičkih nepreciznosti. Usljed nekonzistentne upotrebe morfoloških kriterijuma, pogrešne interpretacije pojedinih već pomenutih promjena koje mogu imitirati CIN (69), u morfološkoj dijagnozi ovog entiteta mogu postojati značajne intra- i interposmatračke razlike.

Zajedno sa HPV DNK i PAPA testiranjem, primjena biomarkera bi imala dodatnu vrijednost u dijagnostici, kao i procjeni rizika za nastanak cervikalnog karcinoma.

Da bi neki biomarker bio korišćen u praksi mora da ima (188):

1. sposobnost rane detekcije karcinoma (identifikacija individua sklonih razvoju karcinoma u periodu koji još uvijek dozvoljava sprovođenje efikasnih kurativnih mjera);
2. dokazanu reproducibilnost histopatološke dijagnoze (dozvoljavajući procjenu i stratifikaciju rizika);
3. da omogućava nadzor osoba u riziku (omogućavajući neinvazivni monitoring i smanjujući upotrebu invazivnih procedura);
4. da omogućava monitoring nakon sprovođenja terapije (predviđajući progresiju i monitoring nakon terapije).

U tom smislu, uzimajući u obzir sve do sada poznate mehanizme HPV-indukovane kancerogeneze, sproveden je veliki broj studija sa ciljem ispitivanja ekspresije širokog panela biomarkera na bioptičkim uzorcima sluznice cerviksa.

Veći broj studija bio je usmjeren na ispitivanje ekspresije markera regulacije ćelijskog ciklusa, potom markera epitelne ćelijske organizacije i diferencijacije, transkripcionih faktora, apoptotskih markera, markera hromozomske nestabilnosti, kao i markera imunološkog prepoznavanja.

U prvoj grupi pomenutih markera, polazeći od premise da HPV onkoproteini direktnim ili indirektnim dejstvom uslovljavaju akceleraciju ćelijske proliferacije, nalaze se pored već opisanih p53, Rb proteina i ciklini, kao i inhibitori ciklin zavisnih kinaza.

Ciklini, kao što je ciklin D1, podliježu molekularnim alteracijama koje karakterišu cervikalni karcinom. Ciklin D1 formira kompleks sa CDK4 i CDK6 proteina čime dovodi do fosforilacije Rb proteina. Njegova fosforilacija uslovljava oslobađanje transkripcionog faktora E2F koji zatim indukuje ekspresiju proteina potrebnih za S fazu ćelijskog ciklusa. Kako ciklin D i virusni E7 protein posjeduju slične vezujuće regione na Rb proteinu, inaktivacija Rb proteina posredstvom ciklin/CDK kompleksom u G1 fazi ili interakcijom virusnog E7 proteina uslovljava smanjenje ekspresije ciklina D1. Međutim, pregledom literature nailazi se na kontroverzne rezultate uloge ciklina D1 u cervikalnoj kancerogenezi i kliničkom ishodu. I mada neke studije upućuju da korelacija između ekspresije ciklina D1 i displazije ne postoji (189), druge pak pokazuju prekomjernu ekspresiju ovog markera u displazijama i ukazuju na lošiju prognozu (190). Po pitanju ekspresije drugih ciklina u cervikalnim lezijama, u studiji koju su sproveli Talboti i saradnici je pokazana značajno viša ekspresija ciklina B1 u cervikalnom karcinomu u odnosu na normalno tkivo cerviksa (191). U studiji Weavera i saradnika, ciklin E je predložen kao potentan biomarker cervikalne displazije koji pomaže u njenom razlikovanju u odnosu na reaktivne promjene (192), a u studiji Erlandsona i saradnika ispitivana je i ekspresija ciklina A kao prognostičkog markera, ali su rezultati limitirani (193).

Među inhibitorima ciklin-zavisnih kinaza, najviše je ispitivana ekspresija p16. Najveći broj studija pokazuje njegovu pojačanu ekspresiju u HPV inficiranom displastičnom epitelu i cervikalnom karcinomu. Ekspresija p16 rezultat je negativne povratne sprege funkcionalne inaktivacije pRb od strane virusnog onkoproteina E7 (194). Sa druge strane u nekim studijama pokazana je njegova ekspresija u normalnom epitelu, glandularnom i metaplastičnom cervikalnom epitelu (102). Takođe je u pojedinim studijama nađena jaka pozitivna korelacija između p16 ekspresije i HPV infekcije, ali autori nisu ukazali na poseban obrazac ekspresije (195).

Od proliferativnih markera, imunohistohemijski je najviše ispitivan Ki67 i nađena je pozitivna korelacija između njegove ekspresije i histološkog gradusa lezije, pri čemu su

gradus i obrazac ekspresije i dalje predmet debata (196). Osim toga u posljednje vrijeme ispitivana je i ekspresija pojedinih članova porodice MCM (*Minichromosome maintenance complex*) markera i u većem broju radova pokazana je povezanost između njihove ekspresije i cervikalne kancerogeneze (197, 198).

Uzimajući u obzir poznatu činjenicu da HPV u inficiranim ćelijama dovodi do promjena u diferencijaciji skvamoznog epitela, što se reflektuje promjenom obrasca ekspresije citokeratina (199), veliki broj studija bavio se ispitivanjem ekspresije citokeratina 17 (CK17) i pokazano je da CK17 može biti dobar marker cervikalne displazije, ali jedino ako je korišćen sinhrono sa nekim od proliferativnih markera (70). Takođe, veći broj studija upućuje na nishodnu regulaciju ekspresije E-kaderina u progresivnoj displaziji i karcinomu, a njegova nishodna regulacija rezultira povećanjem celularnog motiliteta i metastatskog potencijala (200).

Među transkripcionim faktorima ispitivana je ekspresija NF- κ B, koji kao što je ranije opisano ima važnu ulogu u intracelularnoj regulaciji imunog odgovora, inflamaciji i regulaciji ćelijskog ciklusa. Imunohistohemijski je verifikovana njegova konstitutivna aktivacija u displastičnim lezijama visokog gradusa. Kao biomarker, njegova povišena ili normalna citoplazmatska ekspresija u detekciji CIN-a ima visoku specifičnost, ali nisku senzitivnost, dok sa druge strane nuklearna ekspresija pokazuje nisku senzitivnost. Takođe je dokazano da ni citoplazmatsko, niti nuklearno bojenje nisu dobri prediktori ishoda HPV infekcije nakon tretmana displazije (139, 201).

Apoptoza može biti inicirana na dva načina i to: spoljašnjim signalima, tj. specifičnim ligandima koji aktiviraju FAS receptore i unutrašnjim signalima, odnosno mitohondrijalnim putem koji se javlja kao odgovor na nespecifične stimuluse kao što su: alteracije DNK molekula, radijacija, osmotski stres itd. U HPV inficiranim ćelijama inhibicija apoptoze može biti mehanizam kojim se promoviše perzistiranje virusa (202). Izbjegavanje apoptoze virus uspostavlja dejstvom E6 proteina koji vezuje p53, a sa druge strane virusni E5 suprimira Fas ligand. Kroz redukciju Fas-posredovane apoptoze, olakšana ćelijska proliferacija pokazana je u cervikalnoj karcinogenezi upotrebom imunohistohemije. Sa druge strane parakrina hiperprodukcija Fas liganda može olakšati progresiju tumora indukcijom apoptoze ćelija imunskog sistema, kao što su citotoksični limfociti i NK ćelije. U studiji Reesinka i saradnika pokazano je da imunohistohemijska

ekspresija ovog markera direktno korelira sa stadijumom tumora (203). BCL2, lociran u membrani mitohondrija kao dio unutrašnjeg puta apoptoze, takođe je ispitivan u ovom kontekstu, međutim njegova prediktivna vrijednost još nije razjašnjena. U studiji koju su sprovedi Guimarães i saradnici, nađeno je da imunohistohemijska ekspresija BCL2 nije dobar prediktor progresije displazije (204), dok druge studije pokazuju da citoplazmatska ekspresija ovog markera i intenzitet bojenja koreliraju sa gradusom displazije (205). Daljim istraživanjima pokazano je da ekspresija BCL2 može biti dobar marker u identifikaciji CIN III lezija sa niskim rizikom progresije (206).

Imajući u vidu sve gore navedene poznate činioce uključene u onkogenezu cervikalnog karcinoma, u ovom istraživanju smo se bavili ispitivanjem imunohistohemijske ekspresije panela markera u grupi ispitivanih žena sa dijagnozom skvamozne intraepitelne lezije u poređenju sa kontrolnom grupom žena, bez morfoloških znakova prisustva intraepitelne lezije.

S tim u vezi, vršena je evaluacija ekspresije p53 proteina, produkta već opisanog tumorsupresorskog gena, do čije inaktivacije dolazi pod uticajem HPV virusnih onkoproteina, potom nivo ekspresije p16 proteina koji je jedan od inhibitora ciklin-zavisnih kinaza, Ki67 koji je marker mitotske aktivnosti ćelija i markera inflamacije – CD68, CD4, CD8 i CD20.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

U skladu sa svim što je izloženo u uvodu ciljevi našeg istraživanja bili su:

1. identifikovati sastav inflamatornih infiltrata u ranim i kasnim displastičnim lezijama skvamoznog epitela cerviksa i ispitati korelaciju ekspresije pojedinih markera inflamacije (makrofaga, B limfocita i CD4 i CD8 subpopulacija T limfocita) sa stepenom displazije;
2. ispitati korelaciju obrazaca imunohistohemijske ekspresije regulatora ćelijskog ciklusa - p53 i p16, kao i proliferativnog markera Ki67 sa cervikalnom displazijom;
3. ispitati povezanost ekspresije navedenih markera u odnosu na prisustvo HR-HPV infekcije;
4. ispitati međusobnu korelaciju ekspresije markera inflamacije i ekspresije markera regulatora ćelijskog ciklusa, odnosno proliferativnih markera u cervikalnoj displaziji;
5. ispitati zastupljenost poznatih faktora rizika za cervikalni karcinom u našoj populaciji;
6. ispitati prevalencu HR-HPV genotipova u našoj populaciji;

2.2. Hipoteze

Ispitivanjem sastava inflamatornih infiltrata i zastupljenosti pojedinih inflamatornih ćelija u skvamoznim displastičnim lezijama očekujemo da damo naučni doprinos razumjevanju složenog procesa kancerogeneze i sagledavanju uloge imunog odgovora u HPV infekciji i HPV-indukovanoj kancerogenezi u njenim ranim stadijumima. U skladu sa tim postavili smo sljedeće hipoteze:

1. očekujemo porast nivoa imunohistohemijske ekspresije barem jednog od markera inflamacije sa stepenom displazije;
2. očekujemo pozitivnu korelaciju prisustva jednog ili više tipova inflamatornih ćelija sa HR-HPV infekcijom.

Nadalje, osvrćući se na poteškoće u dijagnostici prekancerkih lezija, a uzimajući u obzir poznate interakcije virusnih onkogenih sa genima inficiranih ćelija, kroz ispitivanje obrazaca imunohistohemijske ekspresije p53, p16, Ki67 identifikovaćemo biomarker koji će doprinijeti boljoj reproducibilnosti u dijagnostici cervikalne displazije. U skladu sa opisanim prepoznatim patogenetskim mehanizmima HPV-indukovane kancerogeneze postavljamo i sljedeću hipotezu:

3. očekujemo da nivo ekspresije sva tri pomenuta markera raste sa gradusom displazije i pozitivno korelira sa HR-HPV infekcijom.

Konačno, očekujemo da kroz rezultate socio-epidemiološke ankete detektujemo najzastupljenije faktore rizika za nastanak cervikalne displazije u našoj populaciji, a kroz HR-HPV genotipizaciju odredimo prevalencu HR-HPV genotipova, čime bi naši rezultati mogli dati doprinos budućem kreiranju nacionalnih strategija u suzbijanju ove bolesti kod nas.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Odabir ispitanica

Istraživanje je sprovedeno u Kliničkom centru Crne Gore u okviru Nacionalnog naučno-istraživačkog projekta pod nazivom: “Dijagnostički potencijal prekancerskih lezija grlića materice žena u Crnoj Gori”, koji je realizovan u periodu od 2012-2017. godine. U okviru pomenutog projekta obuhvaćeno je 198 ispitanica kod kojih je postojala klinička indikacija za biopsiju cerviksa uterusa - abnormalan kolposkopski i/ili citološki nalaz, a sve one čiji su bioptički uzorci bili dostupni za dalju morfološku analizu, uključene su u ovo istraživanje.

Ispitanicama su objašnjeni ciljevi istraživanja i nakon informisanog pristanka, ispitanice su samostalno ispunjavale socio-epidemiološku anketu, a potom je kod svake od njih uzet bris za ispitivanje prisustva visokorizičnih tipova HPV-a i učinjena biopsija klinički suspektih promjena cerviksa.

3.2. Socio-epidemiološka anketa

Pitanja u socio-epidemiološkoj anketi odnosila su se na: obrazovni, socio-ekonomski status i bračni status, vrijeme menarhe, vrijeme stupanja u seksualne odnose, broj seksualnih partnera, broj porođaja i pobačaja, upotrebu kontracepcije, kao i podatke o postojanju prethodnih genitalnih infekcija i displastičnih lezija. Na ovaj način prikupljeni su podaci o zastupljenosti najvažnijih poznatih faktora rizika u cervikalnoj kancerogenezi među našim ispitanicama.

Pitanja sadržana u anketi prikazana su na Slici 13.

<ol style="list-style-type: none"> 1. Godina rođenja: 2. Školska sprema: <ol style="list-style-type: none"> a) Osnovna b) Srednja c) Viša d) Visoka 3. Bračni status: <ol style="list-style-type: none"> a) Udata b) Razvedena c) Udovica d) Samica 4. U kojoj godini života ste dobili prvu menstruaciju? 5. Koliko godina ste imali prilikom prvog seksualnog odnosa? 6. Broj trudnoća: _____ 7. Broj pobačaja: _____ 8. Broj porođaja: _____ 9. Da li imate stalnog seksualnog partnera: <ol style="list-style-type: none"> a) Da b) Ne 	<ol style="list-style-type: none"> 10. Koliko seksualnih partnera ste imali tokom života? 11. Da li ste do sada imali neku seksualno prenosivu bolest (kondilomi, genitalni herpes, hlamidija)? <ol style="list-style-type: none"> a) Da b) Ne 12. Koju vrstu zaštite koristite prilikom seksualnih odnosa? <ol style="list-style-type: none"> a) Ne koristim zaštitu b) Prezervativ c) Prekinuti seksualni odnos d) Kontraceptivne tablete e) Spiralu 13. Da li ste do sada liječeni od premalignih lezija grlića materice? <ol style="list-style-type: none"> a) Da b) Ne 14. Da li ste pušač? <ol style="list-style-type: none"> a) Da b) Ne c) Bila sam pušač 15. Kako procijenjujete Vaše imovinsko stanje? <ol style="list-style-type: none"> a) Loše (lošije nego u većine) b) Srednje (kao u većine) c) Dobro (bolje nego u većine)
--	---

Slika 13. Socio-epidemiološka anketa korišćena u istraživanju.

3.3. Prikupljanje cervikalnih briseva, HR-HPV ekstrakcija i genotipizacija

Prikupljanje cervikalnih briseva vršeno je korišćenjem četkice (*Kito-Brush, Kaltek, Padova, Italy*) 1,0 do 1,5 cm u cervikalni kanal.

Uzorci su potom stavljeni u bočice sa po 20 ml transportnog medijuma *ThinPrep Pap Test PreservCyt® Solution (Cytic Corporation, Marlborough, MA, USA)* i zamrzavani na -70°C do konačne obrade.

Dalja obrada uzoraka za HR-HPV genotipizaciju vršena je u Centru za medicinsku mikrobiologiju, Instituta za javno zdravlje Crne Gore.

Po otapanju i vorteksovanju, po 1-10 ml uzorka (5 ml bistrog i 3 ml zamućenog) prebačeno je u sterilnu plastičnu tubu zapremine 1,5 ml i centrifugirano 12 minuta na 1300 obrtaja u minuti. Odlivanje 3 ml supernatanta vršeno je Pasterovom pipetom, a sediment je korišćen za izolaciju i prečišćavanje DNK, primjenom ekstrakcionog kita *DNA-Sorb-A (REF K-1-1/A, Sacace Biotechnologies, Como, Italy)*. Ekstrakcija je rađena u laminarnoj komori, uz određene modifikacije, a svi reagensi su prije primjene stabilizovani na sobnoj temperaturi 1-2 h i pripremljeni prema uputstvu proizvođača. DNK ekstrakcija vršena je na sljedeći način:

1. Sediment je resuspendovan u 500 µl *Transport medium-* a.
2. U plastičnu tubu zapremine 1,5 ml sipano je 300 µl *Lysis Solution*, dodato 200 µl resuspendovanog sedimenta i vorteksovano 15 sekundi.
3. Plastična tuba je zatim inkubirana 5 minuta na 65°C, a potom kratko centrifugirana (7-10 sekundi). U slučaju kada uzorak nije bio u potpunosti rastvoren, vršilo se recentrifugiranje 5 minuta na maksimalnoj brzini obrtaja (12000 – 16000 g.) i supernatant je sipan u novu plastičnu tubu od 1,5 ml za DNK ekstrakciju.
4. Nakon energičnog vorteksovanja, 20 µl *Sorbent-* a je dodato u plastičnu tubu sa uzorkom, a potom ponovo vorteksovano 5-7 sekundi i inkubirano 3 minuta na sobnoj temperaturi. Opisani korak je potom ponovljen.
5. Nakon toga je uzorak centrifugiran 30 sekundi na 5000 g, a zatim je pažljivo uklonjen supernatant.

6. U plastičnu tubu sa uzorkom je sipano 500 μ l *Washing Solution*, energično vorteksovano i centrifugirano 30 sekundi na 10000 g. Supernatant je zatim pažljivo uklonjen.
7. Prethodni korak je ponovljen i tuba je inkubirana sa otvorenim čepom 5 - 10 minuta na 65°C.
8. Talog je resuspendovan dodavanjem 100 μ l *DNA-eluent*-a, vorteksovano, inkubiran 5 minuta na 65°C i vorteksovano periodično.
9. Plastična tuba je centrifugirana 1 minut na 12000 g.
10. U plastičnu tubu od 0,5 ml dodat je supernatant, koji je sadržao izolovan i prečišćen DNK spreman za amplifikaciju.

Dobijeni filtrat je čuvan na temperaturi od -80°C do dalje obrade.

HR-HPV DNK detekcija i genotipizacija 12 HR-HPV genotipova (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59) vršena je korišćenjem *HPV High-Risk Typing Real-TM test-a* (Sacace Biotechnologies, Como, Italy). Test je baziran na multiploj *real-time* PCR amplifikaciji u četiri tube za svaki uzorak. Svaka tuba sadržala je prajmere usmjerene na regione tri HPV tipa sa humanim β -globin genom koji je korišćen kao unutrašnja kontrola. Korišćeno je 20 μ l ukupne nukleinske kiseline u četiri PCR reakcije (8 μ l *master mix*-a i 5 μ l eluata - u svakom od četiri PCR *mix*-a). Po pitanju validnosti korišćenog testa, oslanjali smo se na sertifikat proizvođača.

3.4. Patohistološka obrada i analiza bioptičkog materijala

Bioptički uzorci fiksirani su u 4% neutralnom rastvoru formalina u toku 24h na sobnoj temperaturi. Po završenoj fiksaciji, uzorci su dehidratirani provođenjem kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 96% i 100%), prosvjetljivani u ksilolu i kalupljeni u parafinu. Serijski presjeci, debljine 5 μ m, sječeni su mikrotomima *Leica SM 200R*, Austria.

Posle deparafinisanja u ksilolu i hidracije u opadajućem redu alkohola, isječki su bojani hematoksilinom po *Mayer*-u i 1% rastvorom eozina, zatim prosvjetljivani i montirani na

pločice sa *Canada* balzomom, nakon čega je sprovedena histopatološka morfološka analiza.

Na osnovu patohistološkog pregleda dostupnog bioptičkog materijala za dalju imunohistohemijsku obradu i morfometrijsku analizu, odbačeni su bioptički uzorci koji su bili oskudni (sadržali su samo sluznicu endocerviksa, kratke segmente pločastoslojevitog epitela, epitel bez pripadajuće lamine proprije i sl.) ili egzogeno oštećeni, kao i svega jedan dijagnostikovani slučaj invazivnog karcinoma, a za dalju obradu selektovano je 100 reprezentativnih bioptičkih uzoraka.

Na reprezentativnim isječcima tkiva bioptiranih uzoraka vršena su dalja imunohistohemijska bojenja. U onim slučajevima kada je nakon biopsije vršeno hirurško otklanjanje promjena (*loop* ekscizija ili konizacija), zbog veće reprezentativnosti materijala, za imunohistohemijske analize u obzir su uzimani hirurški dobijeni uzorci.

3.5. Metodologija imunohistohemijskih bojenja

Tkivni presjeci su tretirani u 10 mM citratnom puferu u mikrotalasnoj rerni 2 puta po 10 minuta, nakon čega su ispirani dejonizovanom vodom. Nakon izvršene deparafinizacije i postupka demaskiranja antigena, blokirana je endogena peroksidaza 3% rastvorom H₂O₂ u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su tkivni presjeci inkubirani sa primarnim antitijelom u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h. Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih antigena je vršena primjenom Streptavidin-biotin-peroksidaza tehnike. Isječki su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi sa biotiniliziranim antimišijim, odnosno antizečijim antitijelom, a zatim su inkubirani streptavidin-peroksidaza kompleksom, u trajanju od 30 minuta. Kao hromogeni substrat primjenjen je 3-amino-9-etilkarbazol. Nakon svakog inkubiranja uzorci su ispirani u Tris puferisanom rastvoru (TBS: 0,05 M, pH 7,6) i kontrastirani hematoksilinom. Isječki su pokriveni specijalnim vodenim medijumom.

Korišćena su sledeća primarna antitijela:

- **p16** (*Monoclonal mouse primary antibody, CINtec p16 Histology Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ*);

- **p53** (*Monoclonal Rabbit Anti-Human p53, Clone 318-6-11, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*);
- **Ki-67** (*Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*);
- **CD68** (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*);
- **CD4** (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*);
- **CD8** (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C8/144B, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*);
- **CD20** (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*).

Procedura bojenja vršena je automatizovano korišćenjem: Autostainer Link 48, DAKO za p53, Ki67, CD68, CD4, CD8 i CD20 i Ventana, Bench Mark GX za p16.

3.6. Morfometrijska analiza imunohistohemijske ekspresije

Stepen ekspresije panela biomarkera određivan je semikvantitativno na dolje navedeni način.

3.6.1. Evaluacija p16 ekspresije

Pozitivna reakcija – jaka difuzna citoplazmatska i nuklearna prebojenost

skor 0: nema reakcije u epitelnim ćelijama

skor 1: prebojenost ćelija bazalnog sloja

skor 2: prebojenost ćelija 1/3 do 2/3 debljine epitela

skor 3: prebojenost ćelija 2/3 do pune debljine epitela

3.6.2. Evaluacija p53 ekspresije

Pozitivna reakcija – jaka nuklearna prebojenost

skor 0: nema reakcije u epitelnim ćelijama

skor 1: prebojenost ćelija bazalnog sloja

skor 2: prebojenost ćelija 1/3 do 2/3 debljine epitela

skor 3: prebojenost ćelija 2/3 do pune debljine epitela

3.6.3. Evaluacija Ki67 ekspresije

Pozitivna reakcija – jaka nuklearna prebojenost analizirana na 200 epitelnih ćelija u cijeloj debljini epitela, na uveličanju 400x

skor 1: < 5% imunoreaktivnih ćelija

skor 2: 5-30% imunoreaktivnih ćelija

skor 3: > 30% imunoreaktivnih ćelija

3.6.4. Evaluacija ekspresije CD68, CD4, CD8 i CD20

Evaluacija imunohistohemijskog bojenja vršena je najprije analizom pločica na uveličanju od 100x, a za dalju analizu odabrano je po 5 vidnih polja sa najvećim brojem imunoreaktivnih ćelija – hot spots. Na uveličanju od 400x na odabranih 5 polja, na osnovu srednje vrijednosti ekspresije, izvršeno je skorovanje prisustva određenih ćelijskih populacija u upalnom infiltratu u epitelu i stromi neposredno ispod epitela.

skor 0: <5% imunoreaktivnih ćelija

skor 1: 5-20% imunoreaktivnih ćelija

skor 2: 20-50% imunoreaktivnih ćelija

skor 3: > 50% imunoreaktivnih ćelija

3.7. Statistička analiza podataka

Analiza dobijenih podataka vršena je korišćenjem verzije 23.0 softvera IBM SPSS Statistics (*IBM SPSS for Windows, Armonk, NY, USA*), upotrebom deskriptivnih i inferencijalnih statističkih metoda.

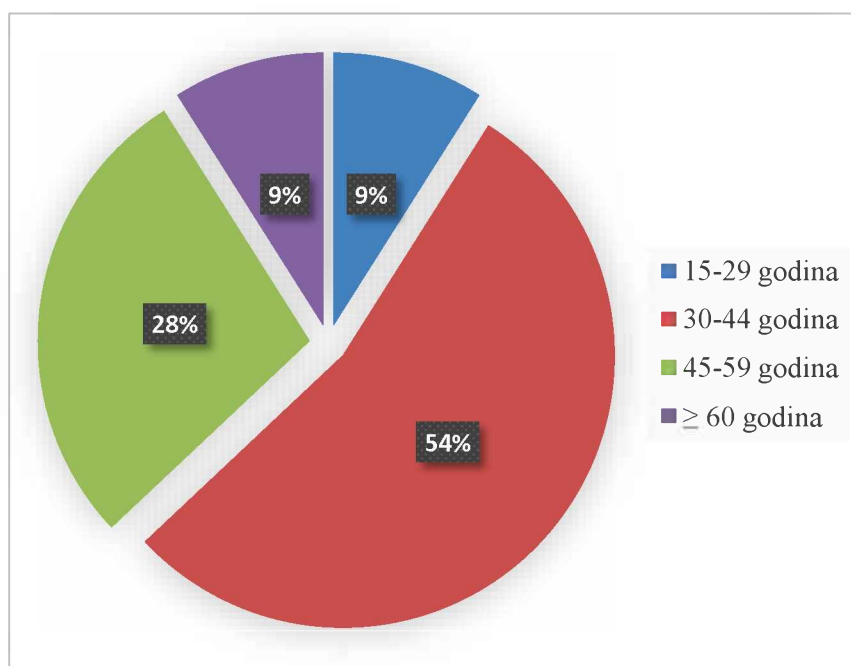
Od deskriptivne statistike korišćene su prosječna vrijednost i standardna devijacija, u oznaci $\bar{x} \pm std.$

Statistička značajnost ispitivana je korišćenjem testova za neparametrijske podatke - χ^2 testa i Fišerovog testa. Ispitivanje prediktivne vrijednosti različitih faktora rizika vršeno je korišćenjem multinominalne statističke regresije. Za sve statističke testove nivo povjerenja iznosio je 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati socio-epidemiološke ankete

Prosječna starost naših ispitanica je bila 41.91 ± 10.9 godina, a raspon se kretao od 19 do 74 godine. Na osnovu godina starosti ispitanice su podijeljene u 4 grupe sa intervalom od 15 godina. Najveći broj žena je bio u starosnoj grupi 30-44 godine (54; 54,0%), dok je u starosnim grupama 15-29 godina i ≥ 60 godina bilo najmanje žena (9; 9%) (Grafikon 4).



Grafikon 4. Procenat ispitanica klasifikovanih prema starosnim grupama

Tabela 3. Zastupljenost pojedinih socio-epidemioloških karakteristika ispitanica

Socio-epidemiološke karakteristike	Broj (procenat)
Školska sprema	
Osnovna	4 (4,30%)
Srednja	60 (64,52%)
Viša/Visoka	29 (31,18%)
Menarha	
<12	8 (8,16%)
≥12	90 (91,84%)
Bračni status	
Udata	72 (72,0%)
Udovica/razvedena/ samica	28 (28,0%)
Vrijeme stupanja u seksualne odnose	
≤16	5 (5,26%)
≥17	90 (94,74%)
Trudnoća	
0	19 (20,43%)
1-2	52 (55,91%)
3-4	22 (23,66%)
≥5	0 (0,0 %)
Abortusi	
Da	33 (35,49%)
Ne	60 (64,51%)
Stalni seksualni partner	
Da	87 (87%)
Ne	13 (13%)
Broj partnera	
1-2	52 (52,53%)
3-5	41 (41,42%)
≥6	6 (6,06%)
Ranije dijagnostikovana displazija	
Da	5 (5,0%)
Ne	95 (95,0%)
Prisustvo polno prenosivih bolesti	
Da	9 (9,0%)
Ne	91 (91,0%)
Primjena kontracepcije	
Bez zaštite	65 (66,33%)
Prezervativi	26 (26,53%)
Oralni kontraceptivi	1 (1,02%)
Intrauterina kontracepcija (IUD)	6 (6,12%)
Pušenje	
Da (pušači i bivši pušači)	51 (51,52%)
Ne	48 (48,48%)
Imovinsko stanje	
Loše	11 (11,11%)
Srednje dobro/dobro	88 (88,89%)

U Tabeli 3 prikazana je zastupljenost pojedinih socio-epidemioloških karakteristika naših ispitanica.

Na sva pitanja iz ankete većina ispitanica je dala odgovor, dok su na nekim pitanjima, naročito iz domena najintimnijih, odgovori pojedinih ispitanica izostali.

Rezultati ankete pokazali su da je među našim ispitanicama većina bila sa osnovnom i srednjom stručnom spremom (64; 68,82%), srednjeg i dobrog imovinskog statusa (88; 88,89%), udato (72; 72%) i sa stalnim seksualnim partnerom (87; 87,0%).

Veoma mali procenat ispitanica imao je ranu menarhu (8; 8,16%), većina njih je imala jednu ili dvije trudnoće (52; 55,91%), a više od polovine nije imala ranije abortuse (60; 64,51%).

Najveći procenat njih je u prvi seksualni odnos stupilo sa 17 i više godina starosti (90; 94,74%) i imala do pet seksualnih partnera (93; 93,95%).

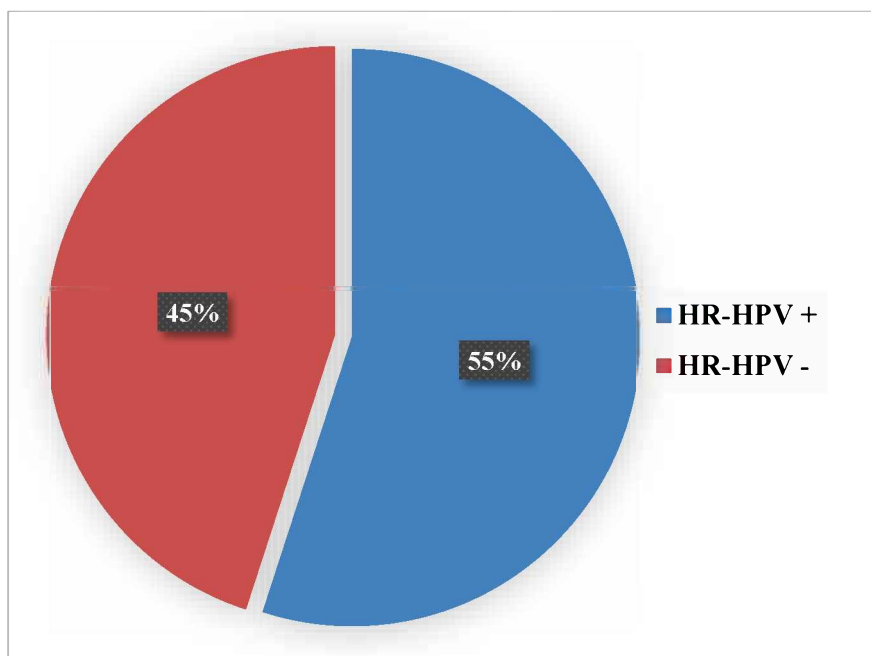
Većina ispitanica se izjasnila da ne koristi kontracepciju (65; 66,33%), dok je među korsnicama kontracepcije bilo najviše onih koje koriste prezervative (26; 26,53%).

Pušača i bivših pušača je bilo više od polovine ispitanih (51; 51,52%).

Kod malog procenta žena postojale su ranije dijagnostikovane displastične lezije cerviksa (5; 5,0%) i ranije dijagnostikovane polno prenosive bolesti (9; 9,0%).

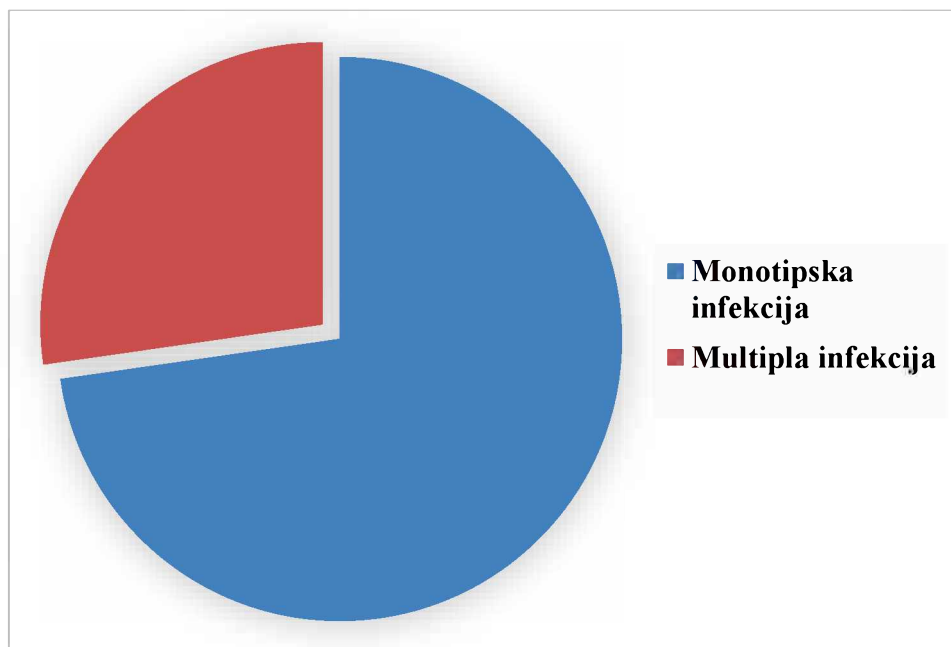
4.2. Rezultati HR-HPV genotipizacije uzoraka

Infekcija HR-HPV genotipovima je utvrđena kod više od polovine, odnosno 55 (55%) žena obuhvaćenih istraživanjem (Grafikon 5).



Grafikon 5. Procenat ispitanica sa i bez HR-HPV infekcije

Dalje je izvršena analiza u odnosu na prisutvo infekcije jednim ili više različitih HR-HPV genotipova i utvrđeno je da je među HR-HPV pozitivnim ispitanicama značajno veći broj imao monotipsku HR-HPV infekciju (40; 72.73%) (Grafikon 6).



Grafikon 6. Procenat ispitanica sa monitipskom i multiplom HR-HPV infekcijom

Posmatrajući monotipske infekcije, najzastupljeniji genotipi su bili: HPV genotip 16 (14; 25.9%), HPV genotip 31 (8; 14.8%) i HPV genotip 45 (6; 11.1%) (Tabela 4).

Tabela 4. Učestalost HR-HPV genotipova kod monotipskih infekcija

HR-HPV genotip	Broj	Procenat (%)
16	14	25,9
18	1	1,9
31	9	14,8
33	5	9,3
45	6	11,1
51	1	1,9
52	1	1,9
56	1	1,9
58	2	3,7

Kod multiplih infekcija, najzastupljenija kombinacija HR-HPV genotipova bila je kombinacija 16 i 51, koja je dijagnostikovana kod 3 (5,6%) ispitanice, dok su kombinacija 16 i 52, kao i kombinacija 16 i 33 dijagnostikovane kod 2 (3,7%) ispitanice (Tabela 5).

Tabela 5. Učestalost kombinacije HR-HPV genotipova kod multiplih infekcija

HPV tip	Broj	%
16, 51	3	5,6
18, 45	1	1,9
16, 45	1	1,9
16, 52	2	3,7
16, 33	2	3,7
35, 39, 36	1	1,9
16, 39, 45	1	1,9
31, 56	1	1,9
16, 52, 58	1	1,9
16, 45, 51, 33	1	1,9
31, 33, 45	1	1,9

4.3. Rezultati patohistološke analize bioptičkog materijala

Analizom bioptičkog materijala kod 41 (41,0%) ispitanice nije bilo nalaza displazije; 24 (24,0%) je bilo sa nalazom lakostepene displazije - CIN I; CIN II je dijagnostikovano u 8 (8%) slučajeva; a CIN III u 27 (27%) slučajeva. U daljoj analizi podataka bioptički uzorci su klasifikovani prema važećoj Bethesda klasifikaciji (Tabela 6).

Tabela 6. Učestalost pojedinih histoloških nalaza

Histološki nalaz	Učestalost	Procenat (%)
Uredan nalaz	41	41,0%
L-SIL (CIN I)	24	24,0%
H-SIL (CIN II, CIN III)	35	35,0%

4.4. Rezultati ispitivanja imunohistohemijske ekspresije markera inflamacije, regulatora ćelijskog ciklusa i proliferativnih markera u odnosu na displaziju i HPV status

4.4.1. Rezultati ispitivanja povezanosti između CD68 ekspresije i displazije

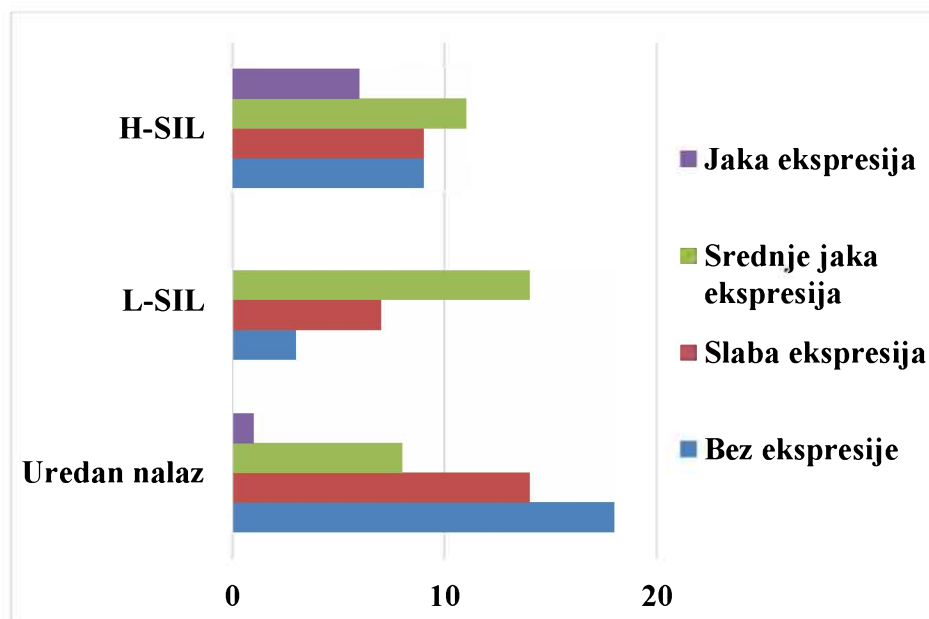
U našoj studiji najveći broj uzoraka sa urednim nalazom bio je bez ekspresije ili sa slabom ekspresijom CD68. Kod displazija, u većini slučajeva L-SIL-a nađena je slaba i srednje jaka ekspresija ovog markera, dok su kod H-SIL-a u skoro polovini svih dijagnostikovanih slučajeva nađene srednje jaka i jaka ekspresija.

Tabela 7. Distribucija ekspresije CD68 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

CD68 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
Bez ekspresije	18 18,0%	3 3,0%	9 9,0%	30 30,0%	0,003
Slaba ekspresija	14 14,0%	7 7,0%	9 9,0%	30 30,0%	
Srednje jaka ekspresija	8 8,0%	14 14,0%	11 11,0%	33 33,0%	
Jaka ekspresija	1 1,0%	0 0,0%	6 6,0%	7 7,0%	
Ukupno	41 41,0%	24 24%	35 35,0%	100 100,0%	

Statističkom analizom utvrđena je bitna statistički značajna povezanost ekspresije CD68 sa prisustvom displastičnih lezija cerviksa (Fisher's test=18,345; p=0,003) (Tabela 7).

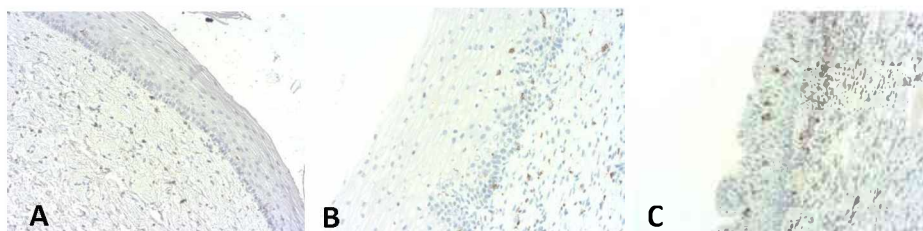
Frekvencija ekspresije makrofaga u različitim histološkim nalazima prikazana je na Grafikonu 7.



Grafikon 7. Frekvencija CD68 ekspresije u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

Vrijednost gama korelacionog koeficijenta ($\gamma=0,358$; $p=0,004$) pokazuje srednje jaku pozitivnu korelaciju između ekspresije CD68 i displastičnih cervikalnih lezija, a uz pomoć multinominalne logističke regresije, utvrđeno je da marker CD68 kod žena u našoj studiji ima bitno statistički značajnu povezanost sa prisustvom kako L-SIL-a, tako i H-SIL-a.

Morfološkom analizom, u našim uzorcima zapažen je porast gustine infiltrirajućih makrofaga sa gradusom displazije (Slika 14).



Slika 14. Obrasci imunohistohemijske ekspresije CD68: A. normalan epitel (x100); B. L-SIL (x200); C. H-SIL (x100)

Navedeno zapažanje podržavaju rezultati multinominalne logističke regresije. Ti rezultati su pokazali da uzorak sa srednje jakom ekspresijom CD68 ima 10,5 puta veća šansu da bude klasifikovan kao L-SIL (Tabela 8) i 12 puta veću vjerovatnoću da bude klasifikovan kao H-SIL kod nalaza jake ekspresije (Tabela 9).

Tabela 8. CD68 ekspresija kao riziko faktor za utvrđivanje postojanja L-SIL

CD68 ekspresija	L-SIL	
	OR (95% CI)	p
Bez ekspresije	1 (Referentna grupa)	
Slaba ekspresija	3 (0,66 - 13,75)	p=0,157
Srednje jaka ekspresija	10,5 (2,34 – 47,03)	p=0,002
Jaka ekspresija	0,05 (0,03 – 1,14)	p=0,088

Tabela 9. CD68 ekspresija kao riziko faktor za utvrđivanje postojanja H-SIL

CD68 ekspresija	H-SIL	
	OR (95% CI)	p
Bez ekspresije	1 (Referentna grupa)	
Slaba ekspresija	1,29 (0,40 – 4,09)	p=0,671
Srednje jaka ekspresija	2,75 (0,82 – 9,24)	p=0,091
Jaka ekspresija	12 (1,25 – 115,36)	p=0,031

4.4.2. Rezultati ispitivanja CD68 ekspresije u odnosu na HPV status

Ispitivanjem CD68 ekspresije, u odnosu na prisustvo/odsustvo HR-HPV infekcije, nađeno je da ukupno 30 (30,0%) uzoraka nije imalo ekspresiju. Najveći broj uzoraka je pokazao slabu i srednje jaku ekspresiju CD68 (63; 63,0%) dok je najmanji broj njih pokazao jaku ekspresiju (7; 7,0%).

Tabela 10. Distribucija ekspresije CD68 kod pacijentkinja sa i bez HR-HPV infekcije

CD68 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	HR-HPV -	HR-HPV +		
Bez ekspresije	10	20	30	0,213
	10%	20,0%	30,0%	
Slaba ekspresija	14	16	30	
	14,0%	16,0%	30,0%	
Srednje jaka ekspresija	19	14	33	
	19,0%	14%	33,0%	
Jaka ekspresija	2	5	7	
	2,0%	5,0%	7,0%	
Ukupno	45	55	100	
	45,0%	55,0%	100,0%	

Na osnovu ovih rezultata, može se reći da ne postoji povezanost između CD68 ekspresije i prisustva HR-HPV infekcije (Fisher's test=4,449; p=0,213) (Tabela 10).

Uz pomoć multinominalne logističke regresije dokazano je da CD68 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom HR-HPV infekcije.

4.4.3. Rezultati ispitivanja CD68 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije

U daljem istraživanju izvršena je analiza ekspresije CD68 u odnosu na obrazac HR-HPV infekcije. Nađeno je da se CD68 ravnomjerno eksprimira u monotipskim i multiplim infekcijama.

Tabela 11. Distribucija ekspresije CD68 kod pacijentkinja sa monotipskom i multiplom HR-HPV infekcijom

CD68 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	Monotipska infekcija	Multipla infekcija		
Bez ekspresije	14 25,5%	6 10,9%	20 36,4%	0,622
Slaba ekspresija	11 20,0%	5 9,1%	16 29,1%	
Srednje jaka ekspresija	12 21,8%	2 3,6%	14 25,5%	
Jaka ekspresija	3 5,5%	2 3,6%	5 9,1%	
Ukupno	40 72,7%	15 27,3%	55 100,0%	

Nije nađena statistički značajna povezanost između CD68 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske ili infekcije sa više različitih HR-HPV genotipova (Fisher's test=2,024; p=0,622) (Tabela 11).

Korišćenjem multinominalne logističke regresije je dokazano da CD68 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom monotipske ili multiple HR-HPV infekcije.

S obzirom na dobijeni rezultat, stratifikacijom uzorka, dalje je analiziran nivo ekspresije CD68 u HR-HPV+ i HR-HPV- uzorcima sa prisutnim displastičnim promjenama.

U L-SIL uzorcima (Fisher's test=2,537, p=0,055), kao ni u H-SIL uzorcima (Fisher's test=0,004, p=0,677) nije nađena povezanost između nivoa ekspresije CD68 i HPV statusa (Tabela 12).

Tabela 12. Distribucija ekspresije CD68 kod HR-HPV + i HR-HVP – slučajevima sa displazijom

		CD68		p
		slaba ekspresija	jaka ekspresija	
L-SIL	HR-HPV +	7 29,2%	4 16,7%	0,055
	HR-HPV -	3 12,5%	10 41,7%	
H-SIL	HR-HPV +	16 45,7%	15 42,9%	0,677
	HR-HPV -	2 5,7%	2 5,7%	

4.4.4. Rezultati ispitivanja povezanosti CD4 ekspresije i displazije

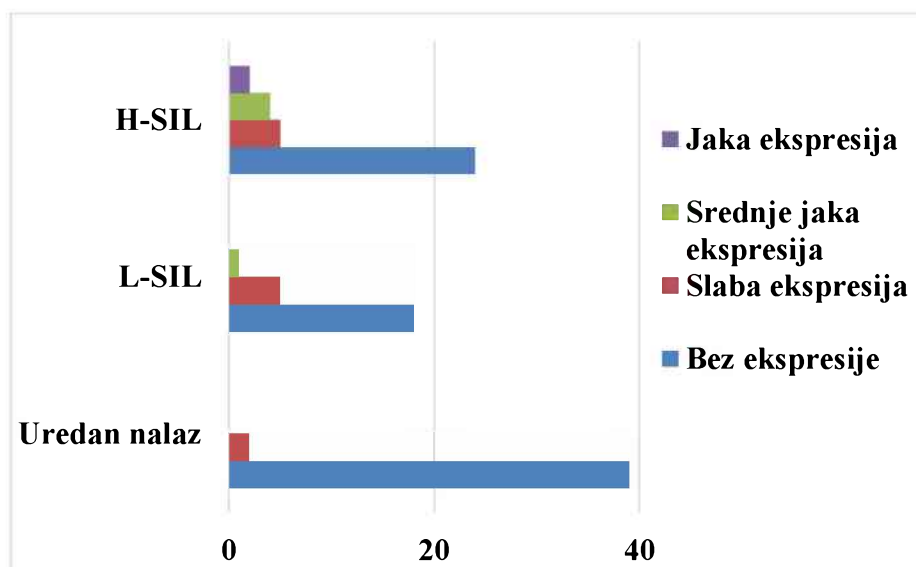
Utvrđeno je da se većini ispitivanih uzoraka (81; 81%), CD4 ekspresija ne registruje. Svega 2 (2%) uzoraka sa urednim nalazom pokazalo je slabu ekspresiju CD4 limfocita, dok slučajeva sa srednje jakom i jakom ekspresijom ovog markera u kontrolnoj grupi nije bilo.

U displazijama, po 5 (5%) slučajeva L-SIL-a i H-SIL-a imalo je slabu ekspresiju ovog markera. Srednje jaka ekspresija nađena je u jednom (1%) slučaju L-SIL-a i 4 (4%) slučajeva H-SIL-a, dok je jaka ekspresija registrovana samo u slučajevima H-SIL-a, i to kod 2 (2%).

Tabela 13. Distribucija ekspresije CD4 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

CD4 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
Bez ekspresije	39	18	24	81	0,016
	39,0%	18,0%	24,0%	81,0%	
Slaba ekspresija	2	5	5	12	
	2,0%	5,0%	5,0%	12,0%	
Srednje jaka ekspresija	0	1	4	5	
	0,0%	1,0%	4,0%	5,0%	
Jaka ekspresija	0	0	2	2	0,016
	0,0%	0,0%	2,0%	2,0%	
Ukupno	41	24	35	100	
	41,0%	24,0%	35,0%	100,0%	

Frekvencija CD4 ekspresije u odnosu na histološki nalaz prikazana je na Grafikonu 8.



Grafikon 8. Frekvencija CD4 ekspresije u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

Statističkom analizom dobijenih podataka, u našoj studiji nađena je povezanost između ekspresije CD4 limfocita i displastičnih promjena grlića materice (Fisher's test=12,325; $p=0,016$) (Tabela 13).

Vrijednost gama korelacionog koeficijenta ($\gamma=0,591$; $p=0,001$) pokazuje jaku pozitivnu korelaciju između ekspresije CD4 i displastičnih promjena, ali je njegova ekspresija povezana prevashodno sa postojanjem L-SIL-a. Uzorci sa jakom CD4 ekspresijom pokazuju 1,27 puta veću šansa da budu klasifikovani kao L-SIL-a u odnosu na uzorke bez ekspresije ovog markera (Tabela 14).

Tabela 14. CD4 ekspresija kao riziko faktor za utvrđivanje postojanja L-SIL

CD4 ekspresija	L-SIL	
	OR (95% CI)	p
Bez ekspresije	1 (Referentna grupa)	
Slaba ekspresija	4,77 (0,76 - 29,81)	$p=0,094$
Srednje jaka ekspresija	2,45 (1,95 – 15,52)	$p=0,997$
Jaka ekspresija	1,27 (1,25 – 2,34)	$p=0,041$

4.4.5. Rezultati ispitivanja CD4 ekspresije u odnosu na HPV status

Naši rezultati pokazali su da je skoro podjednak broj HR-HPV pozitivnih i HR-HPV negativnih slučajeva bilo bez ekspresije CD4. U HR-HPV negativnim slučajevima 5 (5%) njih je imalo slabu ekspresiju ovog markera, dok slučajeva sa srednje jakom i jakom ekspresijom u kontrolnoj grupi nije bilo. U HR-HPV pozitivnim slučajevima, 7 (7%) je imalo slabu ekspresiju CD4, 5 (5%) je bilo sa srednje jakom, a 2 (2%) sa jakom ekspresijom ovog markera.

Tabela 15. Distribucija ekspresije CD4 kod pacijentkinja sa i bez HR-HPV infekcije

CD4 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	HR-HPV -	HR-HPV +		
Bez ekspresije	40 40,0%	41 41,8%	81 81,0%	0,093
Slaba ekspresija	5 5,0%	7 7,0%	12 12,0%	
Srednje jaka ekspresija	0 0,0%	5 5,0%	5 5,0%	
Jaka ekspresija	0 0,0%	2 2,0%	2 2,0%	
Ukupno	45 45,0%	55 55,0%	100 100,0%	

Međutim statističkom analizom statistički značajna povezanost između CD4 ekspresije i HPV statusa nije nađena (Fisher's test=5,900; p=0,093), (Tabela 15).

Rezultati multinominalne logističke regresije su pokazali da CD4 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom HR-HPV infekcije.

4.4.6. Rezultati ispitivanja CD4 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije

U daljem istraživanju analizirana je ekspresija CD4 u odnosu na obrazac HR-HPV infekcije.

Tabela 16. Distribucija ekspresije CD4 kod pacijentkinja sa monotipskom i multiplom HR-HPV infekcijom

CD4 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	Monotipska infekcija	Multipla infekcija		
Bez ekspresije	28 50,9%	13 23,6%	41 74,5%	0,819
Slaba ekspresija	6 10,9%	1 1,8%	6 12,7%	
Srednje jaka ekspresija	4 7,3%	1 1,8%	5 9,1%	
Jaka ekspresija	2 3,6%	0 0,0%	2 3,7%	
Ukupno	40 72,7%	15 27,3%	55 100,0%	

Statistički značajna povezanost u obrascima CD4 ekspresije nije nađena u odnosu na to da li se radilo o monotipskoj ili multiploj HR-HPV infekciji (Fisher's test=1,305; p=0,819) (Tabela 16).

Primjenom multinominalne logističke regresije je utvrđeno da CD4 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom monotipske ili multiple HR-HPV infekcije.

Osvrćući se na dobijene rezultate, u daljoj analizi uzorak je stratifikovan i izvršena je analiza ekspresije CD4 u HR-HPV+ i HR-HPV- uzorcima sa prisutnim displastičnim promjenama.

Tabela 17. Distribucija ekspresije CD4 kod HR-HPV + i HR-HPV - slučajevima sa displazijom

		CD4		p
		slaba ekspresija	jaka ekspresija	
L-SIL	HR-HPV +	10	1	0,458
		41,7%	4,2%	
	HR-HPV -	13	0	
		54,2%	0,0%	
H-SIL	HR-HPV +	25	6	0,454
		71,4%	17,1%	
	HR-HPV -	4	0	
		11,4%	0,0%	

U L-SIL uzorcima (Fisher's test = 1,233, $p=0,458$), kao ni H-SIL uzorcima (Fisher's test = 0,934, $p=0,454$) nije nađena povezanost između nivoa ekspresije CD4 i prisustva HR-HPV infekcije (Tabela 17).

4.4.7. Rezultati ispitivanja povezanosti CD8 ekspresije i displazije

U najvećem broju slučajeva (68; 68%), CD8 ekspresija nije registrovana bez obzira na histološki nalaz, dok je u slučajevima koji su pokazali ekspresiju ovog markera distribucija ekspresije bila ravnomjerna u ispitivanoj i kontrolnoj grupi.

Tabela 18. Distribucija ekspresije CD8 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

CD8 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
Bez ekspresije	31	14	23	68	0,320
	31,0%	14%	23,0%	68,0%	
Slaba ekspresija	7	7	7	21	
	7,0%	7,0%	7,0%	21,0%	
Srednje jaka ekspresija	3	3	2	8	
	3,0%	3,0%	2,0%	8,0%	
Jaka ekspresija	0	0	3	3	
	0,0%	0,0%	3,0%	3,0%	
Ukupno	41	24	35	100	
	41%	24,0%	35,0%	100,0%	

Statističkom analizom dobijenih podataka, povezanost između ekspresije CD8 limfocita i displazije u našem istraživanju nije potvrđena (Fisher's test=6,575; p=0,320) (Tabela 18).

Multinomialna logistička regresija je pokazala da CD8 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom cervikalne displazije.

4.4.8. Rezultati ispitivanja CD8 ekspresije u odnosu na HPV status

Analizom ekspresije CD8 u odnosu na HPV status, nađena je ravnomjerna distribucija ovog tipa inflamatornih ćelija u HR-HPV + i HR-HPV - slučajevima.

Tabela 19. Distribucija ekspresije CD8 kod pacijentkinja sa i bez HR-HPV infekcije

CD8 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	HR-HPV -	HR-HPV +		
Bez ekspresije	31 31,0%	37 37,0%	68 68,0%	0,442
Slaba ekspresija	11 11,0%	10 10,0%	21 21,0%	
Srednje jaka ekspresija	3 3,0%	5 5,0%	8 8,0%	
Jaka ekspresija	0 0,0%	3 3,0%	3 3,0%	
Ukupno	45 44,9%	55 55,1%	100 100,0%	

Statističkom analizom ovih podataka, nije utvrđena povezanost između ekspresije markera citotoksičnih limfocita i prisustva HR-HPV infekcije (Fisher's test=2,750; p=0,442) (Tabela 19).

Multinomialna logistička regresija je pokazala da CD8 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom HR-HPV infekcije.

4.4.9. Rezultati ispitivanja CD8 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije

U daljoj analizi ispitivana je ekspresija CD8 u odnosu na utvrđeni obrazac HR-HPV infekcije.

Tabela 20. Distribucija ekspresije CD8 kod pacijentkinja sa monotipskom i multiplom HR-HPV infekcijom

CD8 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	Monotipska infekcija	Multipla infekcija		
Bez ekspresije	26 47,3%	10 20,0%	37 67,3%	0,387
Slaba ekspresija	6 10,9%	4 7,3%	10 18,2%	
Srednje jaka ekspresija	5 9,1%	0 0,0%	5 9,1%	
Jaka ekspresija	3 5,5%	0 0,0%	3 5,5%	
Ukupno	40 72,7%	15 27,3%	55 100,0%	

Statističkom analizom podataka, povezanost CD8 ekspresije sa prisustvom monotipske ili multiple HR-HPV infekcije, takođe nije utvrđena (Fisher's test=3,113; p=0,387) (Tabela 20).

Multinomialna logistička regresija je pokazala da CD8 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom monotipske ili multiple HR-HPV infekcije.

4.4.10. Rezultati ispitivanja povezanosti CD20 ekspresije i displazije

Kod više od polovine (55; 55%) svih ispitivanih uzoraka CD20 ekspresija nije nađena. U slučajevima kod kojih je registrovana ekspresija ovog markera distribucija ekspresija bila je ravnomjerna u ispitivanoj i kontrolnoj grupi.

Tabela 21. Distribucija ekspresije CD20 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

CD20 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
Bez ekspresije	27	13	15	55	0,240
	27,0%	13,0%	15,0%	55,0%	
Slaba ekspresija	9	6	7	22	
	9,0%	6,0%	7,0%	22,0%	
Srednje jaka ekspresija	3	3	5	11	
	3,0%	3,0%	5,0%	11,0%	
Jaka ekspresija	2	2	8	12	
	2,0%	2,0%	8,0%	12,0%	
Ukupno	41	4	35	100	
	41,0%	24,0%	35,0%	100,0%	

Slično rezultatu ekspresije citotoksičnih limfocita u cervikalnoj displaziji, u našoj studiji statističkom analizom nije utvrđena ni povezanost između ekspresije B limfocita i displazije (Fisher's test=7,873; p=0,240) (Tabela 21).

Rezultati multinominalne logističke regresije su pokazali da CD20 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom displastičnih lezija cerviksa.

4.4.11. Rezultati ispitivanja CD20 ekspresije u odnosu na HPV status

Analizom ekspresije CD20 u odnosu na HPV status, nađena je ravnomjerna distribucija ovog tipa inflamatornih ćelija u HR-HPV + i HR-HPV - slučajevima.

Tabela 22. Distribucija ekspresije CD20 kod pacijentkinja sa i bez HR-HPV infekcije

CD20 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	HR-HPV -	HR-HPV +		
Bez ekspresije	28 28,0%	27 27,0%	55 55,0%	0,156
Slaba ekspresija	11 11,0%	11 11,0%	22 22,0%	
Srednje jaka ekspresija	4 4,0%	7 7,0%	11 11,0%	
Jaka ekspresija	2 2,0%	10 10,0%	12 12,0%	
Ukupno	45 45,0%	55 55,0%	100 100,0%	

Statističkom analizom podataka, u našoj studiji nije utvrđena povezanost CD20 ekspresije i HPV statusa (χ^2 test=5,222; p=0,156) (Tabela 22).

Primjenom multinominalne logističke regresije je utvrđeno da CD20 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom HR-HPV infekcije.

4.4.12. Rezultati ispitivanja CD20 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije

U daljem toku istraživanja izvršena je analiza CD20 ekspresije u odnosu na obrazac HR-HPV infekcije.

Tabela 23. Distribucija ekspresije CD20 kod pacijentkinja sa monotipskom i multiplom HR-HPV infekcijom

CD20 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	Monotipska infekcija	Multipla infekcija		
Bez ekspresije	19 34,5%	8 14,5%	27 49,1%	0,293
Slaba ekspresija	6 10,9%	5 9,1%	11 20,0%	
Srednje jaka ekspresija	6 10,9%	1 1,8%	7 12,7%	
Jaka ekspresija	9 16,4%	1 1,8%	10 18,2%	
Ukupno	40 72,7%	15 27,3%	55 100,0%	

Statističkom analizom, rezlike u ekspresiji CD20 nisu nađene, bez obzira da li se radilo o uzorcima sa monotipskom ili multiplom HR-HPV infekcijom (Fisher's test=3,626; p=0,293) (Tabela 23).

Multinomialna logistička regresija je pokazala da CD20 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom monotipske ili multiple HR-HPV infekcije.

4.4.13. Rezultati ispitivanja povezanosti p53 ekspresije i displazije

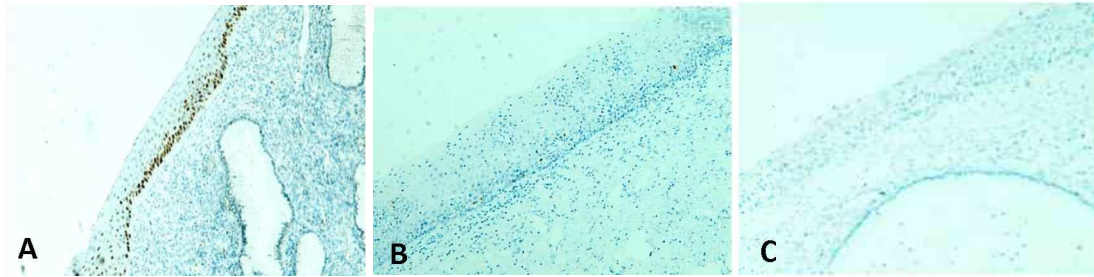
U našem istraživanju ekspresija p53 je nađena u 38 (38,0%) uzoraka, dok je bez ekspresije ovog markera bilo njih 62 (62,0%).

Tabela 24. Distribucija ekspresije p53 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

p53 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
p53 -	20	11	31	62	<0,001
	20,0%	11,0%	31,0%	62,0%	
p53 +	21	13	4	38	
	21,0%	13,0%	4,0%	38%	
Ukupno	41	24	35	100	
	41,0%	24,0%	35,0%	100,0%	

Statističkim testovima, dokazana je povezanost između ekspresije markera p53 i histološkog nalaza u cervikalnom epitelu (χ^2 test=16,192; $p<0,001$) (Tabela 24).

Histološkom analizom, ekspresija p53 u našim uzorcima zapažena je predominantno u bazalnom sloju ćelija kontrolne grupe – normalnog pločastoslojevitog epitela, dok se u displastičnim lezijama ona generalno ne uočava (Slika 15).



Slika 15: Obrasci imunohistohemijske ekspresije p53: A. normalan epitel (x100); B. L-SIL (x100); C. H- SIL (x100)

Naše zapažanje potkrijepljuju rezultati statističke analize koji su pokazali umjerenu negativnu korelaciju između p53 ekspresije i displastičnih lezija cerviksa ($\gamma=-0,540$; $p=0,001$).

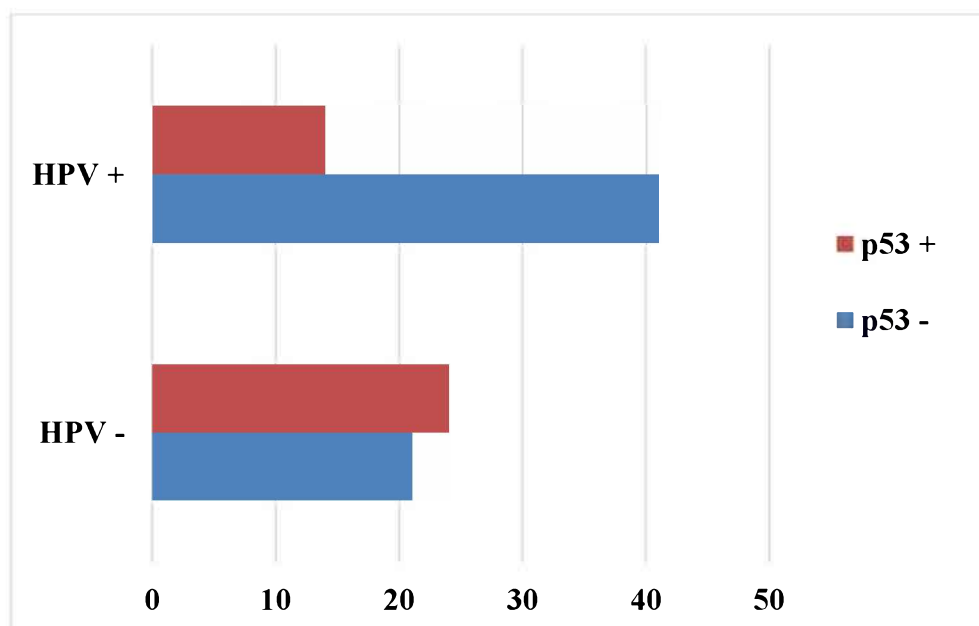
4.4.14. Rezultati ispitivanja p53 ekspresije u odnosu na HPV status

U daljoj analizi posmatrana je distribucija p53 ekspresije u odnosu na HPV status i utvrđeno je da se p53 ekspresija češće nalazi u odsustvu HR-HPV infekcije, odnosno da se u HR-HPV pozitivnim slučajevima češće detektuje odsustvo p53 ekspresije.

Tabela 25. Distribucija ekspresije p53 kod pacijentkinja sa i bez HR-HPV infekcije

p53 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	HR-HPV -	HR-HPV +		
p53 -	21	41	62	0,007
	21,0%	41,0%	62,0%	
p53 +	24	14	38	
	24,0%	14,0%	38,0%	
Ukupno	45	55	100	
	45,8%	54,2%	100,0%	

Frekvencija p53 ekspresije u odnosu na HR-HPV status prikazana je na Grafikonu 9.



Grafikon 9. Frekvencija ekspresije p53 markera kod HPV pozitivnih i HPV negativnih pacijentkinja

Statističkom analizom navedenih podataka, potvrđena je povezanost između p53 ekspresije i HPV statusa (Fisher's test=8,165; $p=0,007$) (Tabela 25), odnosno njihova umjerena negativna korelacija ($\gamma=-0,540$; $p=0,007$).

Ova povezanost odnosi se na povezanost p53 ekspresije i odsustva HR-HPV infekcije, što je dokazano primjenom multinominalne statističke regresije.

Tabela 26. p53 ekspresija kao riziko faktor za utvrđivanje odsustva HR-HPV infekcije

p53 ekspresija	HPV -	
	OR (95% CI)	p
p53 -	1 (Referentna grupa)	
p53 +	3,35 (1,44 – 7,77)	p=0,005

Statističkom analizom je pokazano da bioptički uzorci sa prisutnom p53 ekspresijom pokazuju 3,35 veću šansu da se pri testiranju pokažu kao HR-HPV negativni (Tabela 26).

4.4.15. Rezultati ispitivanja p53 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HPV infekcije

U daljoj analizi posmatrana je distribucija p53 ekspresije u odnosu na obrazac HR-HPV infekcije.

Tabela 27. Distribucija ekspresije p53 kod pacijentkinja sa monotipskom i multiplom HPV infekcijom

p53 ekspresija	HPV		Ukupno	p
	Monotipska infekcija	Multipla infekcija		
p53 -	30	11	41	0,998
	54,5%	20,0%	73,1%	
p53 +	10	4	14	
	18,20%	7,30%	26,9%	
Ukupno	40	15	55	
	72,7%	27,3%	100,0%	

Statističkom analizom podataka, korelacija u odnosu na prisustvo monotipske ili multiple HPV infekcije i p53 ekspresije takođe nije utvrđena (Fisher's test=0,016; p=0,998) (Tabela 27).

Naši rezultati pokazuju da marker p53 ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom kako monotipske, tako ni multiple HPV infekcije.

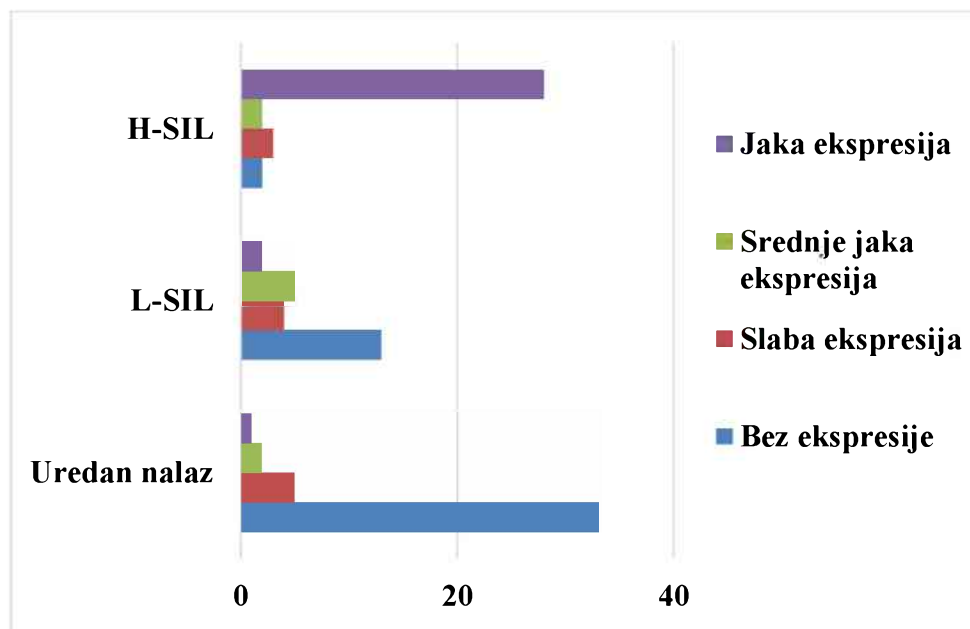
4.4.16. Rezultati ispitivanja povezanosti p16 ekspresije i displazije

Odsustvo p16 ekspresije nađeno je u većini uzoraka kontrolne grupe, dok je u većini uzoraka ispitivane grupe, odnosno uzoraka sa displazijom p16 ekspresija bila prisutna.

Tabela 28. Distribucija ekspresije p16 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

p16 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
Bez ekspresije	33 33.0%	13 13.0%	2 2.0%	48 48.0%	<0,001
Slaba ekspresija	5 5.0%	4 4.0%	3 3.0%	12 12.0%	
Srednje jaka ekspresija	2 2.0%	5 4.0%	2 2.0%	8 8.0%	
Jaka ekspresija	1 1.0%	2 2.0%	28 28.0%	31 31.0%	
Ukupno	41 41.0%	24 24.0%	35 35.0%	100 100.0%	

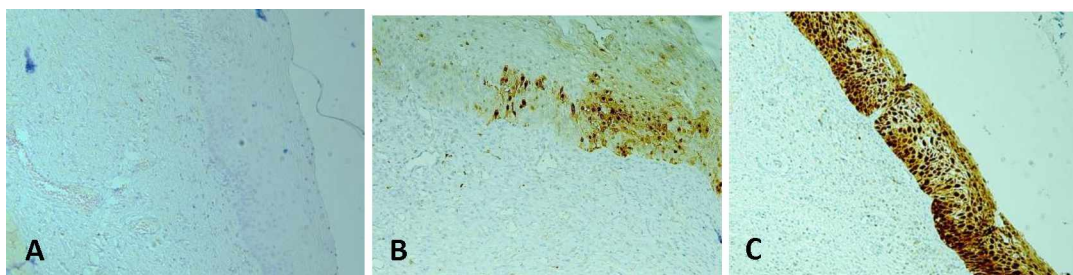
Frekvencija p16 ekspresije u odnosu na histološki nalaz prikazana je na Grafikonu 10.



Grafikon 10. Frekvencija p16 ekspresije u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

Statističkom obradom dobijenih podataka, utvrđena je povezanost između p16 ekspresije i displastičnih lezija cerviksa (Fisher's test=72,4; $p<0,001$) (Tabela 28). Rezultati pokazuju jaku pozitivnu korelaciju između ekspresije ovog markera i nalaza displazije ($\gamma=0,849$; $p<0,001$).

Po pitanju obrasca p16 ekspresije u našim uzorcima, u histološkoj analizi je zapažen porast nivoa ekspresije p16 sa gradusom lezije (Slika 16).



Slika 16: Obrasci imunohistohemijske ekspresije p16: A. normalan epitel (x100); B. L-SIL (100); C. H- SIL (x100)

Ovo zapažanje potkrijepljuju rezultati multinominalne logističke regresije koji pokazuju da kod srednje jake ekspresije markera p16 postoji 2,03 veća šansa da uzorak bude klasifikovan kao L-SIL u odnosu na uzorke bez ekspresije (Tabela 29). U lezijama višeg gradusa, šansa da uzorak bude klasifikovan kao H-SIL, kod slabe ekspresije p16 iznosi 9,9; kod srednje jake ekspresije 16,5 puta i 462 puta kod jake ekspresije (Tabela 30).

Tabela 29. Ekspresija p16 markera kao riziko faktora za utvrđivanje postojanja L-SIL

p16 ekspresija	L-SIL	
	OR (95% CI)	p
Bez ekspresije	1 (Referentna grupa)	
Slaba	2,03 (0,47 – 8,77)	p=0,343
Srednje jaka	6,35 (1,10 – 36,92)	p=0,040
Jaka	5,07 (0,42 – 60,92)	p=0,200

Tabela 30. Ekspresija p16 markera kao riziko faktora za utvrđivanje postojanja H-SIL

p16 ekspresija	H-SIL (CIN 2, CIN 3 i CA)	
	OR (95% CI)	p
Bez ekspresije	1 (Referentna grupa)	
Slaba	9,90 (1,31 - 74,73)	p=0,026
Srednje jaka	16,50 (1,46 – 186,41)	p=0,023
Jaka	462 (39,76 – 5368,35)	p<0,001

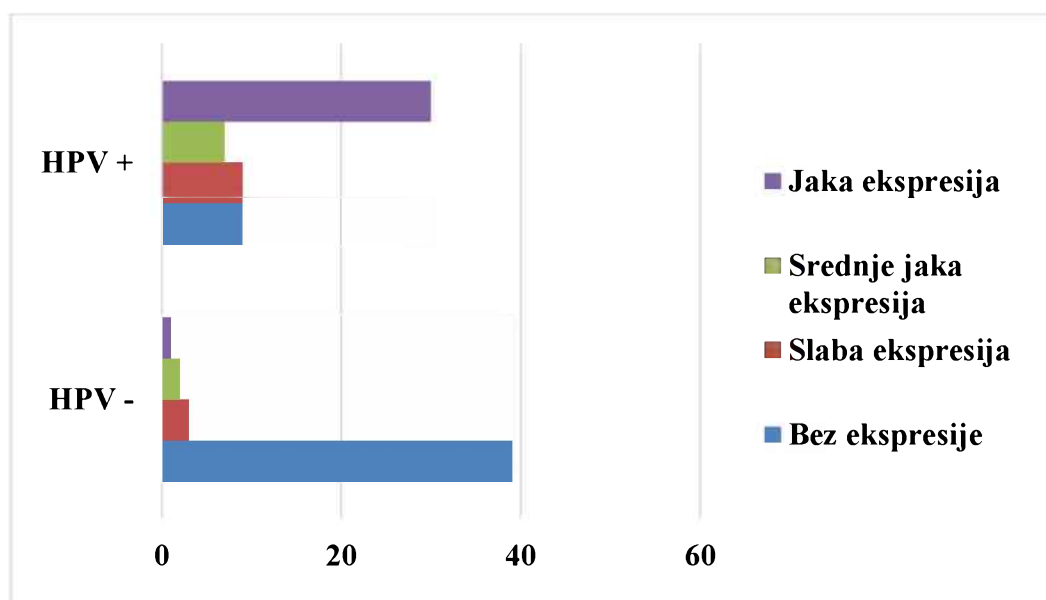
4.4.17. Rezultati ispitivanja p16 ekspresije u odnosu na HPV status

U našem istraživanju, dalje je ispitivana p16 ekspresija u odnosu HPV status. Naši rezultati su pokazali da je među HR-HPV negativnim ženama najviše njih (39; 39,0%) bilo bez ekspresije p16 u bioptičkim uzorcima. Sa druge strane sa jakom ekspresijom p16 je bilo 30 (30,0%) uzoraka ispitanica koje su bile HR-HPV pozitivne.

Tabela 31. Distribucija ekspresije p16 kod pacijentkinja sa i bez HR-HPV infekcije

p16 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	HR-HPV -	HR-HPV +		
Bez ekspresije	39	9	48	p<0,001
	39,0%	9,0%	48,0%	
Slaba ekspresija	3	9	12	
	3,0%	9,0%	12,0%	
Srednje jaka ekspresija	2	7	9	
	2,0%	7,0%	9,0%	
Jaka ekspresija	1	30	31	
	1,0%	30,0%	31,0%	
Ukupno	45	55	100	
	45,0%	55,0%	100,0%	

Frekvencija p16 ekspresije u odnosu na HR-HPV status prikazana je na Grafikonu 11.



Grafikon 11. Frekvencija ekspresije p16 kod HR-HPV pozitivnih i HR-HPV negativnih pacijentkinja

Na osnovu statističke analize ovih rezultata, može se reći da postoji povezanost između ekspresije p16 i postojanja HR-HPV infekcije (Fisher's test=51,168; $p<0,001$) (Tabela 31).

Pri ispitivanju povezanosti utvrđen je gama korelacioni koeficijent ($\gamma=0,914$; $p<0,001$) koji pokazuje jaku pozitivnu korelaciju između ekspresije p16 i postojanja HR-HPV infekcije.

Tabela 32. p16 ekspresija kao riziko faktor za utvrđivanje prisustva HR-HPV infekcije

p16 ekspresija	HPV+	
	OR (95% CI)	p
Bez ekspresije	1 (Referentna grupa)	
Slaba	13 (2,92 - 57,92)	$p=0,001$
Srednje jaka	15,17 (2,69 - 85,60)	$p=0,002$
Jaka	130 (15,60 - 1083,16)	$p<0,001$

Uz pomoć multinominalne logističke regresije, utvrđeno je da ekspresija p16 dobro klasifikuje uzorke sa prisutnom HR-HPV infekcijom. U uzorcima sa slabom ekspresijom p16, postoji 13 puta veća vjerovatnoća HR-HPV infekcije, u uzorcima sa srednje jakom ekspresijom vjerovatnoća je 15,17 puta veća, dok je kod jake ekspresije ta vjerovatnoća čak 130 puta veća (Tabela 32).

4.4.18. Rezultati ispitivanja p16 ekspresije u odnosu na prisustvo monotipske/multiple HR-HPV infekcije

U daljoj analizi posmatrana je distribucija p16 ekspresije u odnosu na obrazac HR-HPV infekcije.

Tabela 33. Distribucija ekspresije p16 kod pacijentkinja sa monotipskom i multiplom HR-HPV infekcijom

p16 ekspresija	HR-HPV		Ukupno	p
	Monotipska infekcija	Multipla infekcija		
Bez ekspresije	8 14,5%	1 1,8%	9 16,4%	0,115
Slaba ekspresija	7 12,7%	2 3,6%	9 16,4%	
Srednje jaka ekspresija	7 12,7%	0 0,0%	6 12,7%	
Jaka ekspresija	18 32,7%	12 21,8%	30 54,5%	
Ukupno	40 72,7%	15 27,3%	55 100.0%	

Statističkom analizom dobijenih podataka nije utvrđena bitna statistički značajnost povezanost između p16 ekspresije i obrasca HR-HPV infekcije (Fisher's test=5,708; p=0,115), što se može vidjeti u Tabeli 33.

Ekspresija p16 se ne mijenja u odnosu na obrazac infekcije. Rezultati multinominalne logističke regresije su pokazali da p16 ekspresija ne predstavlja dobar prediktor i nema statistički značajnu povezanost sa prisustvom monotipske ili multiple HR-HPV infekcije.

4.4.19. Rezultati ispitivanja povezanosti Ki67 ekspresije i displazije

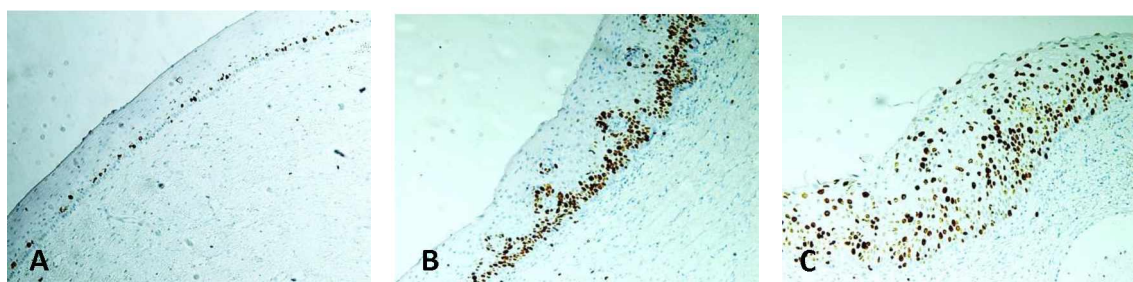
Analizom ekspresije Ki67 u bioptičkim uzorcima, utvrđeno je da se ovaj marker eksprimira u svim slučajevima displazija, dok se u u normalnom epitelu kontrolne grupe, kod većine slučajeva zapaža odsustvo njegove ekspresije.

Tabela 34. Distribucija ekspresije Ki67 u odnosu na prisustvo/odsustvo displastičnih lezija

Ki67 ekspresija	Uredan nalaz	Displazija		Ukupno	p
		L-SIL	H-SIL		
Bez ekspresije	35 35,0%	0 0,0%	0 0,0 %	35 35,0%	<0,0001
Slaba ekspresija	6 6,0%	3 3,0%	0 0,0 %	9 9,0%	
Srednje jaka ekspresija	0 0,0%	19 19,0%	8 8,0%	30 30,0%	
Jaka ekspresija	0 0,0%	2 2,0%	27 27,0%	29 29,0%	
Ukupno	41 41,0%	24 24,0%	35 35,0%	100 100,0%	

U našem istraživanju, statističkom analizom podataka utvrđena je povezanost između Ki67 ekspresije i displastičnih lezija (χ^2 test=91,73; $p<0,0001$) (Tabela 34). Pokazana je pozitivna korelacija Ki67 ekspresije kako sa L-SIL-om ($\gamma=0,208$; $p<0,001$), tako i H-SIL-om ($\gamma=0,754$; $p<0,001$).

Morfološkom analizom u posmatranim bioptičkim uzorcima zapažen je porast nivoa Ki67 ekspresije sa stepenom displazije (Slika 17).



Slika 17: Obrasci imunohistohemijske ekspresije Ki67: A. normalan epitel (x100); B. L-SIL (x100); C. H-SIL (x100)

Navedeno zapažanje su potvrdili i rezultati statističke analize iz kojih se vidi da 85,36% uzoraka bez displazije ne pokazuje ekspresiju ovog markera; 79,16% slučajeva L-SIL pokazuje srednje jaku ekspresiju, dok 77,14% slučajeva H-SIL-a pokazuje jaku ekspresiju Ki67 (Tabela 34).

5. DISKUSIJA

Cervikalni karcinom na globalnom nivou i dalje predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Kako se u osnovi gotovo svih slučajeva ovog tumora nalazi HR-HPV infekcija, a razvoju invazivne neoplazme prethode premaligne – displastične promjene, koje se razvijaju u dužem vremenskom periodu, cervikalni karcinom bi prema procjenama relevantnih izvora mogao biti preveniran gotovo u svim slučajevima (156).

Samo u Evropi u 2018. godini otkriveno je 61 100 novih slučajeva cervikalnog karcinoma i zabilježeno je 25 800 smrtnih ishoda uzrokovanih ovom bolešću (207). Razlike u oboljevanju zabilježene su u odnosu na regione, pa tako kumulativni rizik od oboljevanja u zemljama istočne i centralne Evrope je 4 do 5 puta veći u odnosu na zapadnu Evropu i Nordijske zemlje. U većini zemalja istočne Evrope incidenca cervikalnog karcinoma iznosi 20 na 100 000 žena, a čak i duplo više u pojedinim zemljama, poput zemalja Balkana (208). U Sjedinjenim Američkim Državama prema podacima SEER (*Cancer Statistics Review*) u periodu od 1975. do 2008. godine zabilježen je značajan pad incidence cervikalnog karcinoma sa 14,8 na 6,6 na 100 000 žena (209). U Evropskoj uniji u posljednjoj deceniji stopa mortaliteta je značajno smanjena među starim zemljama članicama, sa manjom stopom smanjivanja u istočnoj Evropi i Baltičkim zemljama (210).

Stopa redukcije morbiditeta i mortaliteta od cervikalnog karcinoma u direktnoj su vezi sa organizacijom i implementacijom skrining programa (211), ali i efikasnim mjerama prevencije faktora rizika.

U okviru velikog broja epidemioloških studija, kao što je prezentovano u uvodu teze, faktori rizika za nastanak HPV infekcije, samim tim displastičnih i neoplastičnih lezija grlića materice, dobro su prepoznati.

U prvom dijelu našeg istraživanja kroz socio-epidemiološku anketu prikupili smo podatke o zastupljenosti pojedinih poznatih faktora rizika u našoj populaciji žena, čije bi prepoznavanje u budućnosti moglo doprinijeti unapređenju nacionalne strategije suzbijanja karcinoma grlića, čija je incidenca u našoj državi među najvišim u regionu i Evropi (5).

Kao što se vidi iz rezultata, na sva pitanja iz ankete odgovorila je većina ispitanica. Ispitanice su upitnike ispunjavale samostalno, a kako je postupak sproveden u ginekološkoj ambulanti neposredno pred pregled i uzorčenje materijala, razumljivo je da neke ispitanice nisu imale potpuni utisak anonimnosti, te su na pojedina pitanja, naročito iz sfere najintimnijih neke od njih izbjegle odgovor.

Povišen rizik za HPV infekciju i nastanak displazije vezuje se prevashodno za određene oblike seksualnog ponašanja. U tom smislu, rano stupanje u seksualne odnose, u većem broju epidemioloških studija prikazano je kao značajan faktor rizika, a definisano je kao stupanje u seksualne odnose prije 16. godine života (212, 213). U našoj studiji takvih slučajeva je bilo svega 5,26%, pa možemo reći da ovaj faktor rizika u populaciji naših žena nije zastupljen u značajnoj mjeri.

Među faktorima rizika koji se vezuju za seksualno ponašanje je i broj partera i pokazano je da kod žena koje su imale više od šest partnera postoji i do 11,5 puta veći rizik za nastanak displazije u odnosu na kontrolnu grupu (212, 213, 214). Među našim ispitanicama, šest i više partnera prijavilo je svega 6,06% ispitanica, te vidimo da ni ovaj faktor rizika u našoj populaciji nije značajno zastupljen.

Osim pomenutih faktora rizika, u različitim epidemiološkim studijama ukazano je na uticaj pojedinih endogenih i egzogenih hormonskih činilaca na pojavu displazije i karcinoma. Pokazano je da je taj rizik kod žena koje koriste oralne kontraceptive za 2 do 4 puta viši (31, 213). Osim toga, rezultati velike prospektivne studije *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study* koja je sprovedena na 308 036 ispitanica pokazali su i da se rizik smanjuje sa povećanjem godina od posljednje upotrebe oralnih kontraceptiva (215).

Mogući mehanizam za objašnjenje povezanosti između primjene oralnih kontraceptiva i cervikalnog karcinoma je da estrogen i progesteron mogu stupiti u interakciju sa hormonskim receptorima, uglavnom progesteronskim, inače prisutnim u cervikalnom tkivu i uticati na prirodni tok HPV infekcije, prvenstveno povećanjem ekspresije HPV 16 onkogeni E6 i E7 (215).

Svega jedna ispitanica u našoj studiji sprovedenoj na 100 žena prijavila je upotrebu oralnih kontraceptiva. Naš rezultat govori u prilog tome da primjena egzogenih hormona u našoj populaciji, kao faktor rizika, nije zastupljena.

Među faktorima rizika za razvoj cervikalnog karcinoma u literaturi se nalazi i visok paritet (216). Pojedina istraživanja ukazala su da je broj terminskih trudnoća povezan sa povećanim rizikom za nastanak neoplastičnih lezija, a da rizik za nastanak cervikalnog karcinoma raste i sa brojem pobačaja (215).

Trudnoća indukuje nekoliko promjena u cerviksu koje bi mogle predisponirati malignu transformaciju. Te promjene su održavanje zone transformacije u ektocervikalnom regionu sa jedne strane, a sa druge strane primjećeno je da se broj metaplastičnih skvamoznih ćelija povećava u zoni transformacije (75), pa bi takav epitel u imaturnoj fazi razvoja bio podložniji za HPV infekciju i kasniju moguću progresiju u cervikalni karcinom. Metaplastični epitel zone transformacije bi u regionu ektocerviksa bio ponavljano izložen karcinogenim agensima, pa samim tim multiparitet bi mogao intenzivirati dejstvo karcinogenih agenasa (217).

Većina naših ispitanica je imala jednu do dvije trudnoće i nije imalo ranijih abortusa. U pomenutim studijama, u kojima se multiparitet ističe kao faktor rizika, taj rizik je prepoznat kod žena koje su imale pet i više trudnoća. Među našim ispitanicama nije bilo onih koje su prijavile više od četiri trudnoće.

Pregledom literature po pitanju uticaja pojedinih vidova kontracepcije na pojavu displazije, u jednom istraživanju opažen je smanjen rizik od oboljevanja među korisnicima IUD-a (*Intra-uterine device*), dok druga istraživanja pokazuju sasvim suprotne rezultate (215, 218). Uloga ove metode kontracepcije u cervikalnoj kancerogenezi ostaje kontroverzna.

U našoj ispitivanoj grupi svega 6,12% ispitanica je koristilo ovaj tip kontracepcije.

Takođe, kada je u pitanju uticaj upotrebe kondoma na pojavu displazije pregledom literature se nalaze kontradiktorni rezultati, ali rezultati velikih meta-analiza pokazuju da upotreba kondoma i ako ne eliminiše, u značajnoj mjeri smanjuje rizik od HPV infekcije,

a takođe i da je njihova upotreba povezana sa nešto manjim rizikom za nastanak displazija teškog stepena i invazivnog karcinoma (219, 220).

Zabrinjavajući je podatak da više od polovine naših ispitanica ne koristi kontracepciju uopšte, a među onima koje je koriste svega četvrtina koristi kondome, mada se uglavnom radilo o ženama koje imaju stalnog seksualnog partnera.

Pušenje cigareta je jedini faktor rizika koji nije u vezi sa seksualnim ponašanjem, a korelira sa nastankom cervikalnog karcinoma, povećavajući njegov rizik za dva do četiri puta (213, 214, 221, 222, 223).

Među našim ispitanicama uočena je visoka prevalenca pušenja. Čak 51,52% njih je ili aktuelni ili bivši korisnik duvanskih proizvoda.

Veza između pušenja i progresije displastičnih lezija, kao i invazivnog karcinoma objašnjava se činjenicom da sastojci duvanskog dima umanjuju efikasnost imunološkog odgovora na HPV infekciju i displaziju (214).

Kao što je naprijed napisano, pojedine seksualno prenosive infekcije poput *Chlamidia trachomatis* infekcije, infekcije *Herpes simplex virus*-om i virusom HIV-a, identifikovani su kao mogući kofaktori uključeni u cervikalnu kancerogenezu (25, 26, 28,29).

Mogući mehanizmi, kojim se u ovim koinfekcijama povećava rizik od nastanka cervikalnog karcinoma, povezani su sa inflamatornim odgovorom koji dovodi do reaktivne produkcije oksidativnih metabolita, povećane ekspresije citokina, hemokina, angiogenetskih faktora, smanjenja ćelijski posredovanog imunološkog odgovora, produkcije slobodnih radikala, što sve zajedno uslovljava oštećenje DNK, ometa mehanizme DNK popravke, rezultirajući genetskom nestabilnošću (224, 225).

Od svih ispitivanih žena mali procenat, njih 9%, je odgovorilo da je ranije imalo neku od pomenutih seksualno prenosivih bolesti. Međutim, podatak je dobijen anketiranjem ispitanica, a ne mikrobiološkim ispitivanjem cervikalnih briseva u vrijeme sprovođenja istraživanja, pa samim tim realnu zastupljenost ovog faktora rizika u ispitivanoj grupi na ovaj način teško je procijeniti.

U našoj ispitivanoj grupi, najveći broj žena bilo je sa osnovnom i srednjom stručnom spremom, srednjeg i dobrog imovinskog statusa. Veći broj studija ukazuje na jaku inverznu korelaciju između tih karakteristika i nastanka cervikalnog karcinoma. Cervikalni karcinom kod žena sa višim nivoom obrazovanja i višim socio-ekonomskim statusom detektuje se dvostruko rjeđe u odnosu na one sa osnovnim obrazovanjem (226, 227).

Sa druge strane, u velikim meta-analizama pokazano je da nivo obrazovanja ne pokazuje povezanost sa prevalencom HPV infekcije. Iz svega toga proističe zaključak da nizak nivo obrazovanja i niži socio-ekonomski status ne mogu biti posmatrani kao izolovani riziko faktori za nastanak cervikalnog karcinoma, već markeri kombinacije karakteristika koje predominiraju među ovim ženama (227) i uslovljavaju da žene sa nižim nivoom obrazovanja generalno rjeđe pristupaju preventivnim pregledima u odnosu na ostale (228).

U zaključku, od svih ispitivanih socio-epidemioloških faktora rizika, možemo reći da se kod nas pušenje i odsustvo upotrebe kondoma izdvajaju kao faktori rizika koji su zastupljeni kod više od polovine ispitivanih žena i da ova obilježja treba uzeti u obzir prilikom unapređenja postojećih i kreiranja novih strategija u borbi protiv cervikalnog karcinoma.

Među našim ispitanicama nađena je visoka prevalenca HR-HPV infekcije i dokazana je kod više od polovine njih.

Prevalenca HPV infekcije se u evropskim zemljama kreće od 2% u Španiji do 12,5% u Belgiji i Francuskoj (229, 230). Među kineskom populacijom ona iznosi 15,4% (231), u Južnoj Koreji 16,71% (232), 20,4% u Južnoj Africi (233), do skoro 30% u među ženama u Čileu (234).

Značajno viša prevalenca HR-HPV infekcije među našim ispitanicama u odnosu na pojedine gore navedene zemlje rezultat je dizajna same studije. U našoj studiji ulazni kriterijumi bili su abnormalni Papa i/ili kolposkopski nalazi, pa je samim tim za očekivati i viši procenat HPV pozitivnih slučajeva.

Najveći broj naših ispitanica imala je monotipsku infekciju, a manji procenat koinfekciju sa više različitih HR-HPV genotipova. Kako kod monotipskih, tako i u multiplim infekcijama, među našim ispitanicama, najzastupljeniji je bio genotip 16, a sledeći po učestalosti su bili genotipovi 31, 45, 33, 58, 18, 51, 52 i 56.

Analizom većeg broja studija primjećuju se razlike u geografskoj distribuciji HR-HPV genotipova. U Evropi je, uz HPV genotip 16, najčešće detektovan genotip 18 (229).

Zhu i saradnici, u velikoj meta-analizi, koja je obuhvatila 1,7 miliona žena, prikazali su da su među kineskom populacijom posle genotipa 16, najzastupljeniji genotipovi bili: 52, 58, 18 i 33 (231).

U studiji sprovedenoj na uzorku od 18 170 žena u Južnoj Koreji najzastupljeniji je bio genotip 53, a potom genotipovi 58 i 52 (232), dok su u Čileu, predominantni genotipovi bili: 16, 52, 51, 56 i 58 (234). U Japanu uz genotip 16, najzastupljeniji su genotipovi: 18, 52, 58 i 33. (235).

Ispitivanje prevalence i distribucije HR-HPV genotipova značajno je, uz gore navedene mjere, sa aspekta pravljenja nacionalnih strategija u skriningu cervikalnog karcinoma, kao i procjenu potencijalnog uticaja vakcina na smanjenje stope morbiditeta i mortaliteta od cervikalnog karcinoma u čijoj osnovi se nalazi upravo HR-HPV infekcija.

Rezultat naše studije saglasan je sa rezultatom druge, šire studije koju su u Crnoj Gori sprovedeli Lopičić i saradnici na 187 žena. Svi genotipovi koji su pokazani u našoj studiji, kao i u pomenutoj studiji obuhvaćeni su devetovalentnom profilaktičkom HPV vakcinom. Takođe, u istraživanju Lopičić i saradnika pokazano je da bi primjena ove vakcine u našoj populaciji dovela do redukcije HR-HPV infekcije za 90%, odnosno, cervikalne displazije za 60% (236).

Iako je potvrđeno da u osnovi cervikalnog karcinoma leži HR-HPV infekcija, osvrćući se na savremeni koncept humane kancerogeneze, posmatran kao višestepeni proces sa više nepoznatih koraka, ne može se ignorisati činjenica da samo mali procenat žena sa HR-HPV infekcijom razvije displaziju, a još manji procenat njih razvije invazivni karcinom. Iz toga je jasno da dejstvo virusnih onkogeni nije dovoljno da kompletira proces cervikalne kancerogeneze (20, 146).

Jedan od “stubova” savremene kancerogeneze, kao što je navedeno ranije, jeste sposobnost maligno transformisanih ćelija da izbjegnu imuni odgovor. Kako je prezentovano u uvodu teze, HR-HPV genotipovi imaju sposobnost zaobilazjenja imunog odgovora i perzistiranja u donjem genitalnom traktu. Mehanizmi koje virus koristi da izbjegne imuni sistem ogledaju se u činjenici da virus uspostavlja sporu infekciju usled čega su samo male količine virusa izložene imunom sistemu. Potom, HPV pokazuje sposobnost modulacije prezentacije antigena, ometanja dejstva interferona, poremećaja profila citokina i hemokina, distordiranja i modulacije adhezionih molekula, preveniranja apoptoze i inhibicije migracije antigen prezentujućih ćelija. Sve navedeno uslovljava neadekvatan imuni odgovor koji može imati imunosupresivni efekat, dovodeći do nesposobnosti imunog sistema domaćina da eliminiše infekciju (124, 126, 127, 128, 129).

Veći broj studija usmjeren na ispitivanje intratumorskog i peritumorskog upalnog infiltrata u invazivnom cervikalnom karcinomu ukazao je na njihov prediktivni potencijal, pa su tako neke studije pokazale da je niska ekspresija CD3 limfocita povezana sa češćim relapsima, veća prevalenca CD8 limfocita udružena je sa povoljnom prognozom, dok je nizak broj CD4 limfocita povezan sa višim stadijumima bolesti (237, 238, 239, 240).

Ispitivanje vrste i zastupljenosti pojedinih tipova upalnih ćelija u ranim fazama kancerogeneze, a ne samo invazivnim tumorima, za šta je cerviks idealan kandidat, mogla bi doprinijeti boljem razumjevanju ovog kompleksnog procesa. Posebno u virus-indukovanim neoplastičnim procesima, kakav je proces proučavan u našoj studiji, ispitivanje sastava upalnog infiltrata u kontekstu HPV infekcije, moglo bi pomoći u jasnijem sagledavanju posljedica ove infekcije.

Po pitanju ekspresije pojedinih tipova inflamatornih ćelija u premalignim lezijama grlića i njihov potencijalni uticaj na proces HR-HPV indukovane kancerogeneze u literaturi se nalaze oprečni rezultati.

U našoj studiji kroz semikvantitativnu analizu, izraženu kao procenat imunoreaktivnih ćelija u samom epitelu i stromi neposredno ispod epitela, izvršili smo procjenu zastupljenosti makrofaga, CD4, CD8 i CD20 limfocita u ranim i kasnim displastičnim lezijama i odnos ekspresije ovih ćelija u odnosu na HR-HPV infekciju.

Interesantno je da, gledano u ukupnom uzorku, nije nađena korelacija između HR-HPV infekcije i zastupljenosti makrofaga, B limfocita, kao ni CD4 i CD8 subpopulacija T limfocita, bez obzira da li se radilo o monotipskoj infekciji ili koinfekciji sa više različitih HR-HPV genotipova.

Sa druge strane, naši rezultati su pokazali povezanost između nivoa ekspresije makrofaga i prisustva displastičnih lezija. I dok su u pojedinim studijama dobijeni sasvim suprotni rezultati (241, 242), što pojedini autori objašnjavaju neoptimalnom selekcijom antitijela za vizuelizaciju makrofaga i polja za interpretaciju (243), rezultati većeg broja studija u saglasnosti su sa našim rezultatom koji pokazuje povezanost između nivoa ekspresije infiltrirajućih makrofaga i gradusa cervikalnih lezija (243, 244).

I dok pojedini autori pokazuju korelaciju između HR-HPV infekcije i ekspresije makrofaga, sa porastom ekspresije u lezijama višeg gradusa (244) u našoj studiji nije nađena ovakva povezanost.

Slično našim rezultatima, u istraživanjima Hammesa i saradnika, kao Davidsona i saradnika, nije dokazana korelacija između HR-HPV infekcije i ekspresije makrofaga stratifikovano u odnosu na gradus lezije, ali u pomenutim studijama nije bilo dalje diskusije u vezi sa ovom opservacijom (241, 243).

Posmatrajući naše rezultate, smatramo da se infiltracija makrofagima javlja kao odgovor na započeti neoplastični proces, koji je praćen i morfološkim promjenama cervikalnog epitela, a da HR-HPV infekcija ne indukuje prisustvo ovih inflamatornih ćelija u sluznici cerviksa.

Uzimajući u obzir naše rezultate, kao i rezultate pomenutih studija koje su u ispitivanu grupu uključivale i slučajeve cervikalnog karcinoma, vjerujemo da makrofagi čiji broj u infiltratu raste sa gradusom lezije, doprinose progresiji neoplastičnog procesa.

Makrofagi su nosioci urođenog imuniteta, a kroz svoju sposobnost obrade i prezentacije antigena, te produkcije citokina neophodnih za aktivaciju T-limfocita, imaju presudan značaj u započinjanju i medijaciji specifičnog imunološkog odgovora. U tom kontekstu, makrofagi imaju bitnu ulogu u borbi protiv infekcije, rezoluciji akutne inflamacije, ali i regulaciji metaboličkog odgovora na tkivni stres (245).

Međutim, makrofagi predstavljaju fenotipski heterogenu grupu ćelija, čija fiziologija se značajno može modifikovati u odgovoru na različite biohemijske faktore iz mikrookoline (246). Tako se razlikuju dvije osnovne subpopulacije makrofaga - klasično aktivirani (M1) i alternativno aktivirani (M2). M1 makrofagi kroz sekreciju proinflammatoryh citokina (od koji su najvažniji IL-6, IL-12 i TNF- α) i hemokina, te prezentaciju antigena, promovišu inflamatorni odgovor i ispoljavaju antitumorsku aktivnost. Sa druge strane, M2 polarizovani makrofagi, nazvani i tumor-udruženim makrofagima (*tumor-associated macrophages* (TAM)), posjeduju veoma slabu antigen-prezentujuću sposobnost. Takođe, kroz sekreciju arginaze, IL-10, TNF- β i drugih citokina imaju ulogu u smanjivanju inflamacije, značajni su u reparaciji tkiva i zarastanju rana, a doprinose i rastu tumora (247).

Makrofagi su prepoznati kao bitna ćelijska populacija upalnog infiltrata mikrookoline malignih tumora (248), gdje bivaju privučeni od strane brojnih faktora poput hipoksije, visokog ćelijskog obrta i sl. sa ciljem učešća u uspostavljanju tkivne homeostaze (245). Međutim, ovo rezultira maladaptivnim odgovorom koji, umjesto supresije tumorskog rasta i progresije, promoviše rast tumora kroz pokretanje procesa angiogeneze, tkivnog remodelovanja i uspostavljanja imunosupresivne okoline (154). Samim tim, sve je više studija koje ispituju ulogu makrofaga u kancerogenezi, prognostički i prediktivni značaj njihovog prisustva i zastupljenosti u upalnom infiltratu tumorske mikrookoline, ali i mogućnost imunoterapijske intervencije na M2 populaciju makrofaga.

U studiji Chena i saradnika vodeći se pretpostavkom da virusna infekcija promoviše M2 polarizaciju makrofaga, uz CD68 korišćen je marker CD163 i pokazana je pozitivna asocijacija između ekspresije oba markera i cervikalne kancerogeneze (244).

Novije studije, koje su se bavile proteinskom ekspresijom markera polarizacije makrofaga in situ, ipak ukazuju na to da se CD163 ne može koristiti kao samostalan marker M2 diferencijacije, te da bi ga u te svrhe bilo poželjno koristiti u kombinaciji sa nekim drugim markerima, poput CMAF (249).

Takođe, istraživanja pokazuju da makrofagi oba fenotipa mogu biti u različitom stepenu zastupljeni unutar strome jednog istog tumora. Tako, na primjer, TAM sa visokom ekspresijom MHC molekula II klase mogu biti ograničeni na normoksične zone unutar

tumorskog tkiva i eksprimirati M1 markere i anti-angiogene hemokine, dok u ostatku tumora mogu dominirati TAM sa klasičnim M2 fenotipom i niskom ekspresijom MHC molekula II klase (250). Kao dobar primjer tumora sa hibridnim fenotipom makrofaga često se navodi renalni karcinom, u kom je pokazana ekspresija proinflammatoryh citokina poput TNF α , IL-1 β i IL-6, ali i CCL2 (251).

Iz ovih razloga, dalja *in situ* ispitivanja polarizacije makrofaga kroz istovremenu primjenu većeg broja markera, kako u tumorskoj stromi, tako i u premalignim lezijama bi mogla biti interesantna.

Pregledom literature po pitanju ekspresije subpopulacija T limfocita u displastičnim lezijama i cervikalnom karcinomu nađeno je da pojedini autori prikazuju porast broja CD8 i CD4 limfocita sa porastom gradusa lezije (252), druge studije pokazuju povezanost između visokog broja CD4 i CD8 limfocita (253, 254) i regresije lezija, dok najveći broj studija pokazuje nishodnu regulaciju obje subpopulacije T limfocita u premalignim lezijama i cervikalnom karcinomu potencirajući značaj lokalne imunosupresije na evoluciju HPV indukovanih promjena (255, 256).

U našoj studiji nije nađena korelacija između nivoa ekspresije CD8 limfocita i prisustva displazije, dok je pokazana pozitivna korelacija između ekspresije CD4 subpopulacije limfocita i L-SIL promjena. Imajući u vidu opšte poznato zapažanje da veći procenat L-SIL lezija podliježe rezoluciji u odnosu na H-SIL (257, 258), ovo saznanje bi moglo objasniti veću procentualnu zastupljenost CD4 limfocita u upalnom infiltratu ranih displastičnih lezija.

Nažalost, ograničenje naše studije bila je nemogućnost praćenja potencijalne regresije praćenjem pacijentkinja u vremenu.

Slično kao za makrofage nismo našli povezanost između nivoa ekspresije CD20 limfocita i prisustva HR-HPV infekcije u uzorcima stratifikovanih u odnosu na gradus lezije.

Sa izuzetkom nekoliko slučajeva u kojima je primijećen visok nivo ekspresije CD20 limfocita, u našim uzorcima generalno, registrovana je njihova mala procentualna zastupljenost u upalnom infiltratu i nije nađena korelacija kako je već rečeno, između njihove zastupljenosti sa prisustvom HR-HPV genotipova, ali ni sa prisustvom

displastičnih lezija. Odsustvo B ćelija u inflamatornom infiltratu ne isključuje mogućnost dejstva antitijela usmjerenih na molekule eksprimirane na površini inficiranih ili transformisanih ćelija.

U zaključku, naše istraživanje pokazalo je da prisustvo HR-HPV infekcije, kako monotipske tako ni HR-HPV koinfekcije ne korelira sa ekspresijom makrofaga, CD4, CD8 i CD20 limfocita u inflamatornom infiltratu.

Pokazali smo veću zastupljenost CD4 limfocita u ranim displastičnim lezijama u odnosu na normalan cerviks, kao i povezanost između nivoa ekspresije makrofaga i gradusa displastičnih lezija, oboje nezavisno u odnosu na HR-HPV status, što smatramo odgovorom na prisustvo displazije, a ne na samu HR-HPV infekciju. Porast nivoa ekspresije makrofaga sa gradusom lezije govori u prilog njihovoj potencijalnoj ulozi na progresiju neoplastičnog procesa.

Iz svega što smo opisali, smatramo da bi dalja *in situ* ispitivanja sastava inflamatornog infiltrata sa osvrtnom na druge subpopulacije limfocita i druge ćelijske tipove, kao što su Langerhansove ćelije, mogla doprinijeti boljem razumjevanju tkivnog odgovora na HPV infekciju i displaziju.

Kao što smo napomenuli ranije, biopsija lezija klinički suspektne na displaziju, u svakodnevnoj praksi nekada nosi dijagnostičke dileme, a pravilna klasifikacija ovih promjena ključna je determinanta u prognozi i načinu menadžmenta pacijentkinja. Razlikovanje reaktivnih promjena i L-SIL-a, a nekada i diferencijacija L-SIL-a od H-SIL-a, nerijetko je praćena slabom reproducibilnošću (69).

Iz tog razloga brojna istraživanja danas, usmjerena su na traženje pouzdanog dijagnostičkog alata - biomarkera koji bi ove razlike u interpretaciji morfologije promjena sveo na minimum.

Kao što je prikazano u uvodu teze, do sada je veliki broj markera ispitan u svrhe dijagnostike i predikcije ishoda cervikalnih lezija, ali uz oprečne rezultate u ekspresiji, koji su nekada posljedica razlika u interpretaciji i/ili skorovanju. Do danas nijedan od opisanih markera, sa izuzetkom p16 čija će primjena biti prodiskutovana u daljem tekstu, nije postao suveren.

Takođe, pregledom literature, zapažene su razlike u zaključcima po pitanju ekspresije pojedinih markera u kontekstu samo HR-HPV infekcije, kao i obrazac ekspresije markera u odnosu na stepen uznapredovalosti neoplastičnog procesa.

Gubitak kontrole ćelijskog ciklusa HR-HPV onkoproteinima kroz direktnu ili indirektnu interakciju sa genima domaćina, dovodi akceleracije proliferacije ćelija koje ekspimiraju ove markere. Među ciklinima i ciklin-zavisnim kinazama koje vode ćelijski ciklus, p53, pRb i inhibitori ciklin-zavisnih kinaza (p15, p16, p18, p19, p21, p27) igraju posebnu ulogu u prekidu ćelijskog ciklusa dok oštećenja DNK ne budu potpuno sanirana (259).

Polazeći od prvih opservacija malignog potencijala HR-HPV genotipova, a to su upravo uočene interakcije E6 i E7 onkoproteina sa ključnim intracelularnim tumor-supresorima kakav je p53, u našim uzorcima koji su obuhvatili slučajeve rane i kasne displazije, ispitivali smo ekspresiju ovog markera.

Poznato je da p53 kao multifunkcionalni modulator transkripcije i induktor apoptoze u odgovoru na oštećenje DNK, depleciju nukleotida i hipoksiju biva aktiviran i indukuje gene uključene u inhibiciju ćelijskog ciklusa i apoptozu (260).

Inaktivacija genskog proizvoda *wild type* p53 predstavlja najčešću genetsku alteraciju u humanoј kancerogenezi uopšte, a njegova prekomjerna ekspresija, detektovana imunohistohemijski, ukazuje na pogoršanu prognozu kod nekih maligniteta (261, 262).

Vjeruje se da gubitak funkcije p53 igra važnu ulogu u patogenezi karcinoma grlića materice. Razgradnja proteina p53, indukovana od strane virusnog onkoproteina E6, smatra se determinantnim korakom u HR-HPV-indukovanoј onkogenezi.

Moguće objašnjenje za prekomjernu ekspresiju p53 u skvamoznim karcinomima grlića može implicirati nekoliko stvari. Gen p53 može biti nasumično mutiran, pa se p53 mutacija može naći i kod HR-HPV pozitivnih i negativnih karcinoma grlića materice (263). Može doći do abnormalne akumulacije normalnog p53 proteina zbog izmijenjene homeostaze p53 u tumorskim ćelijama, konformacione promjene *wild type* p53 koje uzrokuju da umjesto supresora postane promoter ili p53 može biti normalan p53 koji je abnormalno stabilizovan ili povećan u količini (259).

Međutim, zanimljivo je da je p53 rijetko mutiran u ranim tumorima grlića materice, što je izuzetak u genetici kancera (264).

I mada našim istraživanjem nisu bili obuhvaćeni slučajevi cervikalnog karcinoma, interesantno je da je u našem uzorku p53 imunoekspresija zapažena u bazalnom sloju normalnog pločastoslojevitog epitela, dok u displastičnim lezijama grlića, kako niskog tako i visokog gradusa ona generalno nije nađena.

U literaturi se nalaze oprečni rezultati po pitanju p53 ekspresije u premaligim cervikalnim lezijama.

Studija koju su sporveli Hunt i saradnici pokazala je da je proizvod gena p53 bio prekomjerno eksprimiran u 17,1% cervikalnih karcinoma, kao i u oblastima cervikalne intraepitelne neoplazije teškog stepena uz invazivni karcinom (260).

Pojedine studije su pokazale značajnu korelaciju ekspresije p53 sa HSIL-om u poređenju sa normalnim epitelom i ukazale da ekspresija p53 izvan bazalnih ćelija u intraepitelijalnim premaligim lezijama upućuje na gubitak normalne regulacije ćelijske proliferacije (260). Sa druge strane ovakva povezanost nije nađena u studiji koju su sprovveli Conesa-Zamora i saradnici (259). Takvi rezultati sugerišu da smanjena ekspresija može biti posljedica sposobnosti pojedinih tipova HPV-a da u različitoj mjeri dovedu do nishodne regulacije p53 ekspresije, vjerovatno kroz E6 indukovanu ubikvitinaciju. Zapravo, neki autori smatraju da prekomjerna ekspresija p53 nije povezana sa dejstvom HPV onkoproteina i sugerišu potencijanu protektivnu ulogu *wild-type* p53 proteina u ranim fazama cervikalnih lezija (265).

Primjećeni obrazac ekspresije p53 u našim uzorcima, u kojima se ona detektuje u bazalnom sloju normalnog epitela, vidimo kao ekspresiju *wild type* p53, a u prilog tome govori činjenica da bazalni sloj predstavlja replikujući kompartman u kome se nalaze mitotski aktivne ćelije, u kojima upravo ekspresija p53, kao “čuvara genoma” omogućava pravilnu proliferaciju epitelnih ćelija.

Pojedini autori koji su imali slično zapažanje ovaj obrazac ekspresije smatraju posledicom efekta zagrijavanja u mikrotalasnoj pećnici u odsustvu mutacija (266). Sa

druge strane, u pojedinim studijama prilikom evaluacije p53 ekspresije korišćen je značajno niži *cut off* (267).

Ranije navedena činjenica da se mutacije p53 gena dešavaju veoma rijetko u ranim stadijumima cervikalnog karcinoma, uz naše rezultate koji su pokazali izostanak prekomjerne ekspresije p53 u premalignim lezijama grlića, govore u prilog tome da je poremećaji regulatorne funkcije p53 kasno dešavanje u cervikalnoj kancerogenezi, te da p53 ne može biti korišćen kao marker cervikalne displazije.

Sljedeći marker čija je ekspresija ispitivana u kontekstu HR-HPV infekcije i HPV-indukovane kancerogeneze, u našem istraživanju bio je p16.

Analize mutacija u različitim humanim tumorskim ćelijama sugerišu da p16, koji je produkt INK-4 gena, predstavlja važnu kariku regulatornog puta ćelijskog ciklusa. Protein p16 djeluje kao tumor-supresor, a pripada familiji INK4 inhibitora ciklin-zavisnih kinaza.

Rezultati biohemijskih studija pokazuju da p16 može da onemogući kompleks ciklin-D–CDK4 u fosorilaciji pRb, koji reguliše tranziciju ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu (268).

U našem istraživanju pokazana je jaka pozitivna korelacija između p16 ekspresije i displastičnih promjena cerviksa, što je u saglasnosti sa rezultatima većeg broja drugih studija u kojima je p16 predložen kao moćan marker cervikalne neoplazije (204, 269, 270).

Naši rezultati su dalje pokazali povećanje nivoa ekspresije p16, te značajno veću ekspresiju izraženu kroz procenat i distribuciju imunoreaktivnih ćelija u epitelu, sa povećanjem gradusa lezije.

U pojedinim studijama ekspresija p16 je nađena u glandularnom i metaplastičnom epitelu u odsustvu displazije, a pojedine studije sugerišu da p16 pokazuje nižu specifičnost i senzitivnost u lezijama niskog gradusa. Naime u ovim studijama nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji p16 između L-SIL-a i normalnog epitela (271).

U najvećem broju studija, slično našoj, nađena je pozitivna korelacija između intenziteta, ali i distribucije bojenja i gradusa displastičnih lezija (272, 273, 274). Osim toga, u studiji

Guimaraes-a i saradnika pokazano je da ekspresija p16 može biti i prediktor progresije displastilnih lezija (204).

Ekspresija p16 smatra se rezultatom negativnog *feed-back*-a, usled funkcionalne inaktivacije pRb od strane E7 onkoproteina (194, 195). Protein p16 djeluje kao inhibicioni protein, ali njegovo dejstvo nije dovoljno da zaustavi proliferaciju HR-HPV inficiranih ćelija.

U studiji Yildiz-a i saradnika, p16 ekspresija je nađena u svim HR-HPV pozitivnim slučajevima, ali nije utvrđena statistički značajna povezanost u intenzitetu i distribuciji p16 bojenja i HR-HPV infekcije (195).

Rezultati naše studije pokazali su takođe jaku pozitivnu korelaciju između ekspresije p16 i postojanja HR-HPV infekcije, bez obzira da li se radilo o monotipskoj ili infekciji sa više različitih HR-HPV genotipova.

Međutim, u našem istraživanju p16 ekspresija nije nađena u svim slučajevima dokazane HR-HPV infekcije. U našoj grupi ispitivanih žena od ukupno 55 HR-HPV pozitivnih, njih 9 nije imalo ekspresiju p16, dok je u 9 slučajeva ona bila slaba.

Iz naših rezultata proističe zaključak da je pojačana ekspresija p16 posljedica napredujućeg neoplastičnog procesa u čijoj osnovi je svakako HR-HPV, ali da p16 nije marker i same HR-HPV infekcije.

Uzimajući u obzir rezultate naše studije, kao i rezultate pomenutih studija smatramo da upotreba imunohistohemijskog bojenja na p16 u bioptičkim uzorcima cervikalnih lezija može doprinijeti boljoj reproducibilnosti klasifikacije morfoloških promjena u skvamoznom epitelu cerviksa materice.

Pod uticajem ranije navedenih dešavanja u HR-HPV indukovanom neoplastičnom procesu dolazi do deregulacije ćelijskog ciklusa i pojačane proliferacije epitelnih ćelija. U tom kontekstu u našoj studiji bavili smo se ispitivanjem ekspresije Ki67 koji je nehistonski protein eksprimiran u jedrima tokom cijelog ćelijskog ciklusa, izuzev u fazi mirovanja – G0 (275).

U normalnom epitelu Ki67 boji ćelije bazalnog sloja koji, kao što je već rečeno predstavlja sloj rezervnih, stem ćelija koje omogućavaju stalno obnavljanje epitela (43).

U našem istraživanju u kome je evaluacija ekspresije Ki67 vršena određivanjem procenta imunoreaktivnih ćelija na 200 epitelih ćelija na velikom uveličanju mikroskopa, pri čemu je bojenje jedara ćelija bazalnog sloja služilo kao unutrašnja kontrola, pokazano je da ekspresija proliferativnog markera Ki67 korelira sa stepenom displazije.

Naš rezultat je u saglasnosti sa većim brojem studija, koje takođe pokazuju da Ki67 predstavlja dobar marker proliferišućih ćelija i jaku korelaciju sa displastičnim lezijama i skvamoznim karcinomom. U većini ovih studija prikazano je da Ki67 predstavlja dobar marker u razlikovanju neneoplastične atipije od skvamoznih intraepitelih lezija. Sa druge pokazano je da se Ki67 eksprimira se u bazalnom, parabazalnom i intermedijernom sloju kondiloma, a klasteri Ki67 pozitivnih ćelija pokazani su u pojedinim studijama i unutar u imaturne skvamozne metaplazije (276, 277, 278, 279).

Brojne studije sprovedene su sa ciljem uspostavljanja objektivne, reproducibilne i pouzdane upotrebe Ki67 u klasifikaciji displastičnih lezija cervikalnog epitela. Mittal i saradnici predložili su da ekspresija Ki67 u gornjim slojevima skvamoznog epitela cerviksa, uz više od 15% imunoreaktivnih ćelija bazalnog sloja, može služiti u distinkciji metaplastičnih lezija i kondiloma sa jedne, i displastičnih intraepitelih lezija sa druge strane (280).

Uz to u studiji koju su sproveli Kruse i saradnici, sugerise se da lažno pozitivni slučajevi pokazuju specifičan obrazac bojenja koji se razlikuje od onog u displastičnim lezijama. Naime, obrazac Ki67 nuklearnog bojenja u ovim lezijama nije difuzan, već “grudvast”, a takođe za razliku od displastičnih lezija u kojima su pozitivni nukleusi gusto “upakovani” u neneoplastičnim lezijama to nije slučaj (281).

U našoj ispitivanoj grupi nije bilo slučajeva kondiloma, ali pokazano je da osim što procenat Ki67 imunoreaktivnih ćelija raste sa stepenom displazije, distribucija ovih ćelija pomjera se ka višim slojevima skvamoznog epitela sa većim gradusom displastičnih lezija.

Nalaz klastera od najmanje dvije imunoreaktivne ćelije u gornje dvije trećine epitela visoko je senzitivna i specifična za razlikovanje displastičnog od normalnog skvamoznog epitela (282).

U većem broju studija koje pokazuju da ekspresija Ki67 i p16 ekspresija ne pokazuju značajnu razliku u lezijama niskog rizika i normalnom epitelu, sugeriraju se paralelna upotreba ova dva markera, čime se senzitivnost i specifičnost u dijagnostici povećavaju (271, 283, 284).

Korelacijom ekspresije inflamatornih markera sa ekspresijom markera regulatora ćelijskog ciklusa, odnosno proliferativnim markerima smo dokazali da ekspresija bilo kog tipa ispitivanih inflamatornih ćelija ne korelira sa HPV infekcijom, te da se infiltracija makrofaga i CD4 limfocita dešava kao odgovor na displaziju sa jedne strane, a da p16 i Ki67 ekspresija odražavaju poremećaj ćelijskog ciklusa indukovani HPV-om sa druge strane.

6. ZAKLJUČCI

1. Dokazana je veća zastupljenost makrofaga i CD4 limfocita u upalnim infiltratima displastičnih lezija u odnosu na neneoplastični epitel.
2. Veća zastupljenost makrofaga i CD4 limfocita predstavlja odgovor na displaziju, a ne HR-HPV infekciju.
3. Povećanje nivoa ekspresije makrofaga sa gradusom lezije govori u prilog njihovoj ulozi u napredovanju neoplastičnog procesa.
4. Značajno viša ekspresija CD4 limfocita u LSIL-u u odnosu na normalnu sluznicu i H-SIL je potencijalni prediktor regresije displastičnih promjena.
5. Imunohistohemijski markeri p16 i Ki67 su dobri prediktori cervikalne displazije i njenog gradusa.
6. Iako se p16 ne eksprimira u svim slučajevima HR-HPV infekcije, ovaj marker može biti korišćen kao njen prediktor.
7. Poremećaji funkcije p53 proteina, izraženi kroz prekomjernu imunohistohemijsku ekspresiju nisu dio ranih faza cervikalne kancerogeneze, te p53 ne može biti korišćen kao biomarker cervikalne displazije.
8. Ekspresija p53 u ćelijama bazalnog sloja skvamoznog epitela odražava ekspresiju *wild type* p53 i predstavlja negativan prediktor cervikalne displazije i HR-HPV infekcije.
9. Tkivna infiltracija makrofagima i CD4 limfocitima se dešava kao odgovor na displaziju i nije u vezi sa HR-HPV infekcijom, dok se pojačana ekspresija p16 i Ki67 javljaju kao posljedica dejstva virusnih onkogenih, pa ekspresija ove dvije grupe markera nije u međusobnoj korelaciji.
10. Najzastupljeniji HR-HPV genotipovi u našoj ispitivanoj grupi obuhvaćeni su devetovalentnom profilaktičkom vakcinom, što bi uz redukciju pušenja i

edukaciju stanovništva po pitanju upotrebe kontracepcije u našoj populaciji trebalo uzeti u obzir prilikom izrade strategija u suzbijanju ovog maligniteta.

8. REFERENCE

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Ferlay J, Shin H-R, 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.
3. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2(9):533–43.
4. Colaković B, Colaković-Popović V. Incidence of cervical cancer in Montenegro. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2008;35(4):275–8.
5. Cervical cancer Montenegro 2021 country profile [Internet]. Who.int. [cited 2022 Jan 22]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/m/item/cervical-cancer-mne-country-profile-2021>
6. Kashyap N, Krishnan N, Kaur S, Ghai S. Risk factors of cervical cancer: A case-control study. *Asia Pac J Oncol Nurs.* 2019;6(3):308–14.
7. Shrestha AD, Neupane D, Vedsted P, Kallestrup P. Cervical Cancer prevalence, incidence and mortality in low and middle income countries: A systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(2):319–24.
8. Simms KT, Steinberg J, Caruana M, Smith MA, Lew J-B, Soerjomataram I, et al. Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020–99: a modelling study. *Lancet Oncol.* 2019;20(3):394–407.
9. Cervical cancer elimination initiative [Internet]. Who.int. [cited 2022 Jan 22]. Dostupno na: <https://www.who.int/initiatives/cervical-cancer-elimination-initiative>
10. Canfell K, Kim JJ, Brisson M, Keane A, Simms KT, Caruana M, et al. Mortality impact of achieving WHO cervical cancer elimination targets: a

- comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet*. 2020;395(10224):591–603.
11. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019;393(10167):169–82.
 12. Koutsky PhD L. Epidemiology of genital human Papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997;102(5):3–8.
 13. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005;366(9490):991–8.
 14. Peto J, Gilham C, Deacon J, Taylor C, Evans C, Binns W, et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2004;91(5):942–53.
 15. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K1-16.
 16. Lam JUH, Rebolj M, Dugué P-A, Bonde J, von Euler-Chelpin M, Lynge E. Condom use in prevention of Human Papillomavirus infections and cervical neoplasia: systematic review of longitudinal studies. *J Med Screen*. 2014;21(1):38–50.
 17. Morris BJ, Hankins CA, Banerjee J, Lumbers ER, Mindel A, Klausner JD, et al. Does male circumcision reduce women’s risk of sexually transmitted infections, cervical cancer, and associated conditions? *Front Public Health*. 2019;7:4.
 18. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol*. 1997;38(5):350–9.
 19. Johansson EL, Rudin A, Wassén L, Holmgren J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology*. 1999;96(2):272–7.

20. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338(7):423–8.
21. Moscicki A-B, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*. 2004;364(9446):1678–83.
22. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C, et al. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol*. 2005;58(9):946–50.
23. Wang Z, Wang J, Fan J, Zhao W, Yang X, Wu L, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Chinese women: large study in Jiexiu, Shanxi Province, China. *J Cancer*. 2017;8(6):924–32.
24. Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloigu A, Anttila T, Hallmans G, et al. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am J Epidemiol*. 2002;156(8):687–92.
25. Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, Ibrahim Khalil A, Baussano I, Shah ASV, et al. Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob Health*. 2021;9(2):e161–9.
26. Koskela P, Anttila T, Bjørge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2000;85(1):35–9.
27. Paavonen J. Chlamydia trachomatis and cancer. *Sex Transm Infect*. 2001;77(3):154–6.
28. Jones C. Cervical cancer: is herpes simplex virus type II a cofactor? *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):549–56.
29. Yuan Y, Cai X, Shen F, Ma F. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. *Cancer Lett*. 2021;497:243–54.
30. Adler DH, Wallace M, Bennie T, Mrubata M, Abar B, Meiring TL, et al. Cervical dysplasia and high-risk human papillomavirus infections among HIV-infected and HIV-uninfected adolescent females in South Africa. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2014;2014:498048.

31. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, et al. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*. 2007;370(9599):1609–21.
32. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Cecchetti G, Fedele L. Reproductive factors and the risk of invasive and intraepithelial cervical neoplasia. *Br J Cancer*. 1989;59(5):805–9.
33. Hinkula M, Pukkala E, Kyyrönen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J, et al. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *Br J Cancer*. 2004;90(5):1025–9.
34. Jacob L, Freyn M, Kalder M, Dinas K, Kostev K. Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK: a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years. *Oncotarget*. 2018;9(25):17420–9.
35. Mercado C, Jaimes EA. Cigarette smoking as a risk factor for atherosclerosis and renal disease: novel pathogenic insights. *Curr Hypertens Rep*. 2007;9(1):66–72.
36. Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ, British Regional Heart Study. Smoking as a modifiable risk factor for type 2 diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care*. 2001;24(9):1590–5.
37. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort: Smoking and cervical cancer in EPIC. *Int J Cancer*. 2014;135(2):453–66.
38. Moralejo D. Smoking increased risk of cervical cancer, independent of infection with high-risk HPV types. *Evid Based Nurs*. 2009;12(4):122.

39. Ghebre RG, Grover S, Xu MJ, Chuang LT, Simonds H. Cervical cancer control in HIV-infected women: Past, present and future. *Gynecol Oncol Rep.* 2017;21:101–8.
40. Segnan N. Socioeconomic status and cancer screening. *IARC Sci Publ.* 1997;(138):369–76.
41. Chen X, Jiang J, Shen H, Hu Z. Genetic susceptibility of cervical cancer. *J Biomed Res.* 2011;25(3):155–64.
42. Vesna Lačković, Ivan R. Nikolić, Vera Todorović. Muški i ženski reproduktivni sistem. In: Nikolić IR, editor. *Osnovna i oralna histologija i embriologija.* Beograd: Datastatus; 2012. p. 291–304.
43. Thomas C. Wright, Brigitte M. Ronnett, Robert J. Kurman. Precancerous Lesions of the Cervix. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, editors. *Blaustein's pathology of the female genital tract.* 7th ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2019. p. 240–84.
44. Walker DC, Brown BH, Blackett AD, Tidy J, Smallwood RH. A study of the morphological parameters of cervical squamous epithelium. *Physiol Meas.* 2003;24(1):121–35.
45. Foraker AG, Marino GA. Glycogen-synthesizing enzymes in the uterine cervix. *Obstet Gynecol.* 1961;17:311–5.
46. Timmons BC, Mitchell SM, Gilpin C, Mahendroo MS. Dynamic changes in the cervical epithelial tight junction complex and differentiation occur during cervical ripening and parturition. *Endocrinology.* 2007;148(3):1278–87.
47. Feldman D, Romney SL, Edgcomb J, Valentine T. Ultrastructure of normal, metaplastic, and abnormal human uterine cervix: Use of montages to study the topographical relationship of epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;150(5):573–688.
48. Maureen L. Harmon KC. In: Nucci MR, Oliva E, editors. *Gynecologic pathology: A volume in the series: Foundations in diagnostic pathology.* London, England: Churchill Livingstone; 2009. p. 141–56.
49. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated

- in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10516–21.
50. Kay J. Park, Robert A. Soslow. Neoplastic lesions of the cervix. In: Marisa R. Nucci, Carlos-Parra Herran, editors. *Gynecologic pathology*. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 229–39.
 51. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of female genital tumours: Who classification of tumours. 5th ed. Who Classification of Tumours Editorial Board, editor. IARC; 2020.p. 268.
 52. House M, Kaplan DL, Socrate S. Relationships between mechanical properties and extracellular matrix constituents of the cervical stroma during pregnancy. *Semin Perinatol*. 2009;33(5):300–7.
 53. Alexander KA, Giuliano AR. HPV-beyond cervical cancer (online resource center). *Am J Med*. 2012;125(7):S1.
 54. Haghighi F, Ghanbarzadeh N, Ataee M, Sharifzadeh G, Mojarrad JS, Najafi-Semnani F. A comparison of liquid-based cytology with conventional Papanicolaou smears in cervical dysplasia diagnosis. *Adv Biomed Res*. 2016;5(1):162.
 55. Pankaj S, Nazneen S, Kumari S, Kumari A, Kumari A, Kumari J, Choudhary V, Kumar S. Comparison of conventional Pap smear and liquid-based cytology: A study of cervical cancer screening at a tertiary care center in Bihar. *Indian J Cancer*. 55(1):80–3.
 56. Bernstein SJ, Sanchez-Ramos L, Ndubisi B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(2):308–17.
 57. Limaye A, Connor AJ, Huang X, Luff R. Comparative analysis of conventional Papanicolaou tests and a fluid-based thin-layer method. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(2):200–4.
 58. Longatto Filho A, Pereira SMM, Di Loreto C, Utagawa ML, Makabe S, Sakamoto Maeda MY, et al. DCS liquid-based system is more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesions: study in high-risk

- population with biopsy-based confirmation. *Gynecol Oncol.* 2005;97(2):497–500.
59. Hashmi AA, Naz S, Ahmed O, Yaqeen SR, Irfan M, Asif MG, et al. Comparison of liquid-based cytology and conventional Papanicolaou smear for cervical cancer screening: An experience from Pakistan. *Cureus.* 2020;12(12):e12293.
 60. Nayar R, Wilbur D, editors. *The Bethesda system for reporting cervical cytology: Definitions, criteria, and explanatory notes.* 3rd ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2015.
 61. Jovanovic AS, Mclachlin CM, Shen L, Welch WR, Crum CP. Postmenopausal squamous atypia: a spectrum including “pseudo-koilocytosis.” *Mod Pathol.* 1995;8(4):408–12.
 62. Duggan MA. Cytologic and histologic diagnosis and significance of controversial squamous lesions of the uterine cervix. *Mod Pathol.* 2000;13(3):252-60.
 63. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol.* 2013;121(4):829–46.
 64. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, Khan MYA, Shidham VB. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal.* 2021;18(16):16.
 65. Muntean M, Simionescu C, Taslîcă R, Gruia C, Comanescu A, Pătrână N, et al. Cytological and histopathological aspects concerning preinvasive squamous cervical lesions. *Curr Health Sci J.* 2010;36(1):26–32.
 66. Darragh TM. The LAST Project and the diagnostic bottom line. *Cytopathology.* 2015 Dec;26(6):343-5.
 67. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki A-B. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol.* 2012;120(6):1465–71.

68. IARC Working Group. Human Papillomaviruses. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 100B, A Review of Human Carcinogens, Part B: Biological Agents. Lyon: IARC Press; 2011. p. 261–319.
69. Kalof AN, Cooper K. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol*. 2007;60(5):449–55.
70. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology*. 2007;50(5):629–35.
71. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):607-15.
72. Hatta MNA, Mohamad Hanif EA, Chin SF, Neoh HM. Pathogens and Carcinogenesis: A Review. *Biology (Basel)*. 2021 Jun 15;10(6):533.
73. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):215–22.
74. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(17):2201-2221.
75. Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
76. Burley M, Roberts S, Parish JL. Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle. *Semin Immunopathol*. 2020;42(2):159–71.
77. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S7-15.
78. Kimbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(24):12180–4.
79. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med*. 2007;13(7):857–61.

80. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*. 1999;274:5810–22.
81. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001;75:1565–70.
82. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2010;118(1):S12–7.
83. Ilves I, Kivi S, Ustav M. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol*. 1999;73:4404–12.
84. Davy C, McIntosh P, Jackson DJ, Sorathia R, Miell M, Wang Q. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1/E4 proteins leads to stabilization of E2. *Virology*. 2009;394:266–75.
85. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF. Identification of a G2 arrest domain in the E1/E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 2002;76:9806–18.
86. 87. Davy CE, Jackson DJ, Raj K, Peh WL, Southern SA, Das P. Human papillomavirus type 16 E1/E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol*. 2005;79:3998–4011.
87. Egawa N, Wang Q, Griffin HM, Murakami I, Jackson D, Mahmood R, et al. HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006282.
88. Bryan J, Brown DR. Association of the human papillomavirus type 11 E1/E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology*. 2000;277:262–9.
89. Brown DR, Kitchin D, Qadadri B, Neptune N, Batteiger T, Ermel A. The human papillomavirus type 11 E1-E4 protein is a transglutaminase 3 substrate

- and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology*. 2006;345:290–8.
90. Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1–E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2005;79:6732–40.
 91. Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol*. 2004;78(4):2142–51.
 92. Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*. 1997;15(12):1437–44.
 93. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain: HPV-16 E5 and MHC Class I. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2105–12.
 94. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(21):11612–6.
 95. Lee SS, Weiss RS, Javier RT. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(13):6670–5.
 96. Ye F, Zhang M. Review Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J*. 2013; 455(1):1–14.
 97. Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G, Zervoudis S, Koukouli Z, Bothou A, Galazios G, Vladareanu S. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *Maedica (Bucur)*. 2016;11(1):48–54.
 98. McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem*. 2017;398(8):919–927.
 99. Del Mistro A, Chieco Bianchi L. HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer*. 2001;37(10):1227–35.

100. Dreer M, Van De Poel S, Stubenrauch F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8AE2 protein. *Virus Res.* 2017;231:96–102.
101. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2004;68(2):362–72.
102. 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.
103. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol.* 2021;102(3).
104. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of female reproductive organs: Who classification of tumours. 4th ed. Who Classification of Tumours Editorial Board, editor. IARC; 2014. p. 173.
105. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63(6):1129–36.
106. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):402–12.
107. Levine A. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323–331.
108. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(5):a001883.
109. Yee KS, Vousden KH. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis.* 2005;26(8):1317–22.
110. Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. P53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(7):393–405.

111. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):199–210.
112. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996;56(20):4620–4.
113. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007;81:9737–47.
114. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(12):910–7.
115. Dick FA. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein - is the whole a sum of its parts? *Cell Div.* 2007;2(1):26.
116. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090–100.
117. Noya F, Chien WM, Broker TR, Chow LT. p21^{cipl} Degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. *J Virol.* 2001;75(13):6121–34.
118. Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, et al. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene.* 1993;8(1):195–202.
119. Prati B, Marangoni B, Boccardo E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. *Clinics (Sao Paulo) [Internet].* 2018;73(suppl 1):e539s.
120. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
121. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol.* 2008;109(2 Suppl):S15–21.

122. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* . 2013;382(9895):889–99.
123. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16086.
124. Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update: HPV immune evasion mechanisms. *Int J Cancer*. 2018;142(2):224–9.
125. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F71-82.
126. Cicchini L, Westrich JA, Xu T, Vermeer DW, Berger JN, Clambey ET, et al. Suppression of antitumor immune responses by human Papillomavirus through epigenetic downregulation of CXCL14. *MBio*. 2016;7(3).
127. Shurin GV, Ferris RL, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, et al. Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2005;174(9):5490–8.
128. Schaerli P, Willimann K, Ebert LM, Walz A, Moser B. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity*. 2005;23(3):331–42.
129. Rincon-Orozco B, Halec G, Rosenberger S, Muschik D, Nindl I, Bachmann A, et al. Epigenetic silencing of interferon-kappa in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res*. 2009;69(22):8718–25.
130. Laurson J, Khan S, Chung R, Cross K, Raj K. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis*. 2010;31(5):918–26.
131. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
132. Nasu K, Narahara H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:976024.

133. Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene*. 2000;19(42):4930–5.
134. Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol*. 2002;169(6):3242–9.
135. Jemon K, Leong C-M, Ly K, Young SL, McLellan AD, Hibma MH. Suppression of the CD8 T cell response by human papillomavirus type 16 E7 occurs in Langerhans cell-depleted mice. *Sci Rep*. 2016;6:34789.
136. Moerman-Herzog A, Nakagawa M. Early defensive mechanisms against human Papillomavirus infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(8):850–7.
137. Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol*. 2004;35(11):1376–84.
138. Lepique AP, Daghasanli KRP, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4391–400.
139. Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431–6..
140. Kundu, J. K., & Surh, Y.-J. (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation Research*, 659(1–2), 15–30.
141. Nair J, Gansauge F, Beger H, Dolara P, Winde G, Bartsch H. Increased etheno-DNA adducts in affected tissues of patients suffering from Crohn's disease, ulcerative colitis, and chronic pancreatitis. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(5–6):1003–10.
142. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2373–80.
143. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2003;417(1):3–11.

144. Hahn MA, Hahn T, Lee D-H, Esworthy RS, Kim B-W, Riggs AD, et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res.* 2008;68(24):10280–9.
145. Edwards RA, Witherspoon M, Wang K, Afrasiabi K, Pham T, Birnbaumer L, et al. Epigenetic repression of DNA mismatch repair by inflammation and hypoxia in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Cancer Res* 2009;69(16):6423–9.
146. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
147. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539–45.
148. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(1):24–37.
149. Johansson M, Tan T, de Visser KE, Coussens LM. Immune cells as anti-cancer therapeutic targets and tools. *J Cell Biochem.* 2007;101(4):918–26.
150. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell.* 2008;135(7):1161–3.
151. Zong W-X, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006;20(1):1–15.
152. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer.* 1999;86(8):1537–43.
153. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436–44.
154. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39–51.
155. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity.* 2019;51(1):27–41.
156. World Health Organization. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition [Internet]. Geneva; 2021. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030824>

157. Boyle CF, Levin C, Hatefi A, Madriz S, Santos N. Achieving a “grand convergence” in global health: Modeling the technical inputs, costs, and impacts from 2016 to 2030. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140092.
158. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):e359-86.
159. Gakidou E, Nordhagen S, Obermeyer Z. Coverage of cervical cancer screening in 57 countries: low average levels and large inequalities. *PLoS Med*. 2008;5(6):e132.
160. Giorgi-Rossi P, Franceschi S, Ronco G. HPV prevalence and accuracy of HPV testing to detect high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2012;130(6):1387–94.
161. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer*. 2019;10(12):2654–60.
162. Sangwa-Lugoma G, Mahmud S, Nasr SH, Liaras J, Kayembe PK, Tozin RR, et al. Visual inspection as a cervical cancer screening method in a primary health care setting in Africa. *Int J Cancer*. 2006;119(6):1389–95.
163. Xie Y, Tan X, Shao H, Liu Q, Tou J, Zhang Y, et al. VIA/VILI is more suitable for cervical cancer prevention in Chinese poverty-stricken region: a health economic evaluation. *BMC Public Health*. 2017;17(1):118.
164. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol*. 2013;121(4):829–46.
165. Institut za javno zdravlje Crne Gore - IJZCG [Internet]. Institut za javno zdravlje Crne Gore. [cited 2022 Jan 22]. Dostupno na: <https://www.ijzcg.me/me/odjeljenje-za-skrininge>
166. Prevention and control measures for human papillomavirus [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. [cited 2022 Jan 22]. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/human-papillomavirus/prevention-control>

167. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 1991;185(1):251–7.
168. Kimbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(24):12180–4.
169. Schmiedeskamp MR, Kockler DR. Human papillomavirus vaccines. *Ann Pharmacother*. 2006;40(7–8):1344–52.
170. Mitchell TC, Casella CR. No pain no gain? Adjuvant effects of alum and monophosphoryl lipid A in pertussis and HPV vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2017;47:17–25.
171. Paz-Zulueta M, Álvarez-Paredes L, Rodríguez Díaz JC, Parás-Bravo P, Andrada Becerra ME, Rodríguez Ingelmo JM, et al. Prevalence of high-risk HPV genotypes, categorised by their quadrivalent and nine-valent HPV vaccination coverage, and the genotype association with high-grade lesions. *BMC Cancer*. 2018;18(1):112.
172. Markowitz LE, Hariri S, Lin C, Dunne EF, Steinau M, McQuillan G, et al. Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003-2010. *J Infect Dis*. 2013;208(3):385–93.
173. Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, Bloigu A, Anttila T, Hallmans G, et al. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am J Epidemiol*. 2002;156(8):687–92.
174. Castle PE, Maza M. Prophylactic HPV vaccination: past, present, and future. *Epidemiol Infect*. 2016;144(3):449–68.
175. Taira AV, Neukermans CP, Sanders GD. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(11):1915–23.
176. Cheng L, Wang Y, Du J. Human Papillomavirus vaccines: An updated review. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3):391.

177. World Health Organization. Electronic address: sageexecsec@who.int. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017-Recommendations. *Vaccine*. 2017;35(43):5753–5.
178. Mitchell TC, Casella CR. No pain no gain? Adjuvant effects of alum and monophosphoryl lipid A in pertussis and HPV vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2017;47:17–25.
179. Petrosky E, Bocchini JA Jr, Hariri S, Chesson H, Curtis CR, Saraiya M, et al. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;64(11):300–4.
180. Näsman A, Du J, Dalianis T. A global epidemic increase of an HPV-induced tonsil and tongue base cancer - potential benefit from a pan-gender use of HPV vaccine. *J Intern Med [Internet]*. 2020;287(2):134–52.
181. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type: Worldwide burden of cancer attributable to HPV. *Int J Cancer*. 2017;141(4):664–70.
182. Salati SA, Al Kadi A. Anal cancer - a review. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2012;6(2):206–30.
183. Prue G, Baker P, Graham D, Nutting C, Greenhouse P, Lawler M. It is time for universal HPV vaccination. *Lancet*. 2018;392(10151):913–4.
184. Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Res*. 2018;5:46–58.
185. Follen M, Richards-Kortum R. 2000 Emerging technologies and cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 92 363365 .
186. Spitzer M, Apgar BS, Brotzman GL. Management of histologic abnormalities of the cervix. *Am Fam Physician*. 2006;73(1):105–12.
187. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(4):340–5.

188. Wentzensen N, von Knebel, Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening, *Dis Markers*. 2007;23 315330 .
189. Gu J, Zhang X, Yang Z, Wang N. Expression of cyclin D1 protein isoforms and its prognostic significance in cervical cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:9073–83.
190. Baed S, Chos B, Kimy J. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol*. 2001;81.
191. Talboti C. Aberrant cytological localization of 16 and CDK4 in colorectal epithelia in the normal adenoma carcinoma sequence. *World J Gastroenterol*. 2006;12:6391–6.
192. Weaver J, Kovatischa J. Cyclin E expression in early cervical neoplasia in ThinPrep specimens. *Acta Cytologica*. 2000;44.
193. Erlandsson F, Martinsson-Ahlzén H-S, Wallin K-L, Hellström A-C, Andersson S, Zetterberg A. Parallel cyclin E and cyclin A expression in neoplastic lesions of the uterine cervix. *Br J Cancer*. 2006;94(7):1045–50.
194. zurHausen. H. 1994 Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol*. 186 131156 .
195. Yildiz IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract*. 2007;203(6):445–9.
196. Vijayalakshmi N, Selvaluxmi G, Majhi U, Rajkumar T. Alterations found in p16/Rb/cyclin D1 pathway in the dysplastic and malignant cervical epithelium. *Oncol Res*. 2007;16(11):527–33.
197. Kaur G, Balasubramaniam SD, Lee YJ, Balakrishnan V, Oon CE. Minichromosome maintenance complex (MCM) genes profiling and MCM2 protein expression in cervical cancer development. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(10):3043–9.

198. Das M, Prasad SB, Yadav SS, Govardhan HB, Pandey LK, Singh S, et al. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PLoS One*. 2013;8(7):e69607.
199. Kellokoski J, Syrjänen S, Tosi P, Cintonino M, Leoncini P, Syrjänen K. Cytokeratin pattern in normal and HPV infected oral mucosa in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med*. 1991;20(1):26–31.
200. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Down-regulation of E-cadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (HPV) or disease outcome in cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2006;27(3):215–23.
201. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al.; HPV-Pathogen ISS Study Group. Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol*. 2006;34(8):555–63.
202. Fahey M, Kastw M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response, *Curr. Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7.
203. Reesink-Peters N, Hougardy BMT, van den Heuvel FAJ, Ten Hoor KA, Hollema H, Boezen HM, et al. Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol*. 2005;96(3):705–13.
204. Guimarães MCM, Gonçalves MAG, Soares CP, Bettini JSR, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(4):509–16.
205. Singh M, Srivastava S, Singh U, Mathur N, Shukla Y. Co-expression of 53 and Bcl-2 proteins in human papillomavirus-induced premalignant lesions of the uterine cervix: correlation with progression to malignancy. *Tumour Biol*. 2009;30(5-6):276–85.
206. Fonseca-Moutinho JA, Cruz E, Carvalho L, Prazeres HJM, de Lacerda MMP, da Silva DP, et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 are

- markers with prognostic significance in CIN III. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14(5):911–20.
207. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018;103:356–87.
 208. Kesic V, Poljak M, Rogovskaya S. Cervical cancer burden and prevention activities in Europe. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(9):1423–33.
 209. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al., editors. SEER cancer statistics review 1975-2008 - previous version - SEER cancer statistics [Internet]. SEER. [cited 2022 Jan 20]. Dostupno na: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/
 210. Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer*. 2009;45(15):2640–8.
 211. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition--summary document. *Ann Oncol*. 2010;21(3):448–58.
 212. Brinton LA, Hamman RF, Huggins GR, Lehman HF, Levine RS, Mallin K, et al. Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1987;79(1):23–30.
 213. Clarke EA, Hatcher J, McKeown-Eyssen GE, Lickrish GM. Cervical dysplasia: association with sexual behavior, smoking, and oral contraceptive use? *Am J Obstet Gynecol*. 1985;151(5):612–6.
 214. de Vet HC, Sturmans F. Risk factors for cervical dysplasia: implications for prevention. *Public Health*. 1994;108(4):241–9.
 215. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. Correction: The influence of hormonal factors on the risk of developing cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151427.

216. Bayo S, Bosch FX, de Sanjosé S, Muñoz N, Combita AL, Coursaget P, et al. Risk factors of invasive cervical cancer in Mali. *Int J Epidemiol*. 2002;31(1):202–9.
217. Nair BS, Pillai R. Oncogenesis of squamous carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*. 1992;11(1):47–57.
218. Averbach S, Silverberg MJ, Leyden W, Smith-McCune K, Raine-Bennett T, Sawaya GF. Recent intrauterine device use and the risk of precancerous cervical lesions and cervical cancer. *Contraception*. 2018;98(2):130–4.
219. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 2002;29(11):725–35.
220. Chelimo C, Woulides TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect*. 2013;66(3):207–17.
221. Winkelstein W. Smoking and cervical cancer-current status: a review. *Am J Epidemiol*. 1990;131(6):945-57; 958-60.
222. Nagelhout G, Ebisch RM, Van Der Hel O, Meerkerk G-J, Magnée T, De Bruijn T, et al. Is smoking an independent risk factor for developing cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer? A systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2021;21(7):781–94.
223. Sugawara Y, Tsuji I, Mizoue T, Inoue M, Sawada N, Matsuo K, et al. Cigarette smoking and cervical cancer risk: an evaluation based on a systematic review and meta-analysis among Japanese women. *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49(1):77–86.
224. Simonetti AC, Melo JH de L, de Souza PRE, Bruneska D, de Lima Filho JL. Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis, a cervical cancer cofactor. *Microbes Infect*. 2009;11(4):435–42.
225. Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, et al. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. *BMC Infect Dis*. 2009;9(1):16.
226. Corral F, Cueva P, Yépez J, Montes E. Limited education as a risk factor in cervical cancer. *Bull Pan Am Health Organ*. 1996;30(4):322–9.

227. Franceschi S, Plummer M, Clifford G, de Sanjose S, Bosch X, Herrero R, et al. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. *Br J Cancer*. 2009;101(5):865–70.
228. Damiani G, Basso D, Acampora A, Bianchi CBNA, Silvestrini G, Frisicale EM, et al. The impact of level of education on adherence to breast and cervical cancer screening: Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Prev Med*. 2015;81:281–9.
229. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer*. 2009;45(15):2632–9.
230. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124(7):1626–36.
231. Zhu B, Liu Y, Zuo T, Cui X, Li M, Zhang J, et al. The prevalence, trends, and geographical distribution of human papillomavirus infection in China: The pooled analysis of 1.7 million women. *Cancer Med*. 2019;8(11):5373–85.
232. Ouh Y-T, Min K-J, Cho HW, Ki M, Oh J-K, Shin SY, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and precancerous cervical lesions in a screening population in the Republic of Korea, 2014–2016. *J Gynecol Oncol*. 2018;29(1).
233. Allan B, Marais DJ, Hoffman M, Shapiro S, Williamson A-L. Cervical human papillomavirus (HPV) infection in South African women: implications for HPV screening and vaccine strategies. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):740–2.
234. Ferreccio C, Corvalán A, Margozzini P, Viviani P, González C, Aguilera X, et al. Baseline assessment of prevalence and geographical distribution of HPV types in Chile using self-collected vaginal samples. *BMC Public Health*. 2008;8(1):78.
235. Onuki M, Matsumoto K, Satoh T, Oki A, Okada S, Minaguchi T, et al. Human papillomavirus infections among Japanese women: age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer. *Cancer Sci*. 2009;100(7):1312–6.
236. Lopicic M, Raonic J, Antunovic M, Milicic B, Mijovic G. Distribution of vaccine-related high-risk human papillomaviruses and their impact on the

- development of cervical dysplasia in women in Montenegro. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2021; 1:2021.01606.
237. Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyegaard JR, Nielsen K. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer, *Br J Cancer*. 2007;97:8 11351138 .
 238. Bell MC, Edwards RP, Partridge EE, Kuykendall K, Conner W, Gore H, et al. CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. *J Clin Immunol*. 1995;15(3):130–6.
 239. Bethwaiter B, Holloway J. Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology*. 1996;28(4):321–7.
 240. Chao HT, Wang PH, Tseng LY, Lai CR, Chiang SC, Yuan CC. Lymphocyte-infiltrated F. I. G. O. Stage I. I. B. squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1999;20(2):136–40.
 241. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract*. 1997;193(7):491–5.
 242. Heller DS, Hameed M, Cracchiolo B, Wiederkehr M, Scott D, Skurnick J, et al. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13(1):67–70.
 243. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. *Gynecol Oncol*. 2007;105(1):157–65.
 244. Chen X-J, Han L-F, Wu X-G, Wei W-F, Wu L-F, Yi H-Y, et al. Clinical significance of CD163+ and CD68+ tumor-associated macrophages in high-risk HPV-related cervical cancer. *J Cancer*. 2017;8(18):3868–75.
 245. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*. 2012;33(3):119–26

246. Goswami KK, Ghosh T, Ghosh S, Sarkar M, Bose A, Baral R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell Immunol.* 2017;316:1–10.
247. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425–40.
248. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006;66(2):605–12.
249. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013;8(11):e80908.
250. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood.* 2004;104(8):2224–34.
251. Kovaleva OV, Samoilova DV, Shitova MS, Gratchev A. Tumor associated macrophages in kidney cancer. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2016;2016:9307549.
252. Maskey N, Thapa N, Maharjan M, Shrestha G, Maharjan N, Cai H, et al. Infiltrating CD4 and CD8 lymphocytes in HPV infected uterine cervical milieu. *Cancer Manag Res.* 2019;11:7647–55.
253. Øvestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, Malpica A, Kruse A-J, Janssen EAM, et al. Local immune response in the microenvironment of CIN2-3 with and without spontaneous regression. *Mod Pathol.* 2010;23(9):1231–40.
254. Origoni M, Parma M, Dell’Antonio G, Gelardi C, Stefani C, Salvatore S, et al. Prognostic significance of immunohistochemical phenotypes in patients treated for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biomed Res Int.* 2013;2013:831907.
255. Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Singer A. Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987;94(1):16–21.
256. Fan JT, Liao Y, Si XH, Geng XL, Wei W, Xie QL. Expression of HLA-I, CD8, and CD4 and their clinical significance in cervical cancer. *World J Oncol.* 2011;2(1):10–5.

257. Silveira FA, Almeida G, Furtado YL, Cavalcanti S, Silva KS, Maldonado P, et al. The association of HPV genotype with the regression, persistence or progression of low-grade squamous intraepithelial lesions. *Exp Mol Pathol*. 2015;99(3):702–6.
258. Moscicki A-B, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/42-51.
259. Conesa-Zamora P, Doménech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Ortiz-Reina S, Sahuquillo-Frías L, Acosta-Ortega J, et al. Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(3):378–90.
260. Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J. P53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol*. 1996;49(12):971–4.
261. Yildirim M, Kaya V, Demirpence O, Gunduz S, Bozcuk H. Prognostic significance of p53 in gastric cancer: a meta- analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(1):327–32.
262. Bansal A, Gupta A, Saxena S. Correlation of p53 immunoexpression with DNA ploidy and apoptotic index in subsets of prostate cancer: A marker reiterated in progression and recurrence of prostate cancer. *South Asian J Cancer*. 2015;4(2):88–90.
263. Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2003;21(3):307–12.
264. Garima, Pandey S, Pandey LK, Saxena AK, Patel N. The role of p53 gene in cervical carcinogenesis. *J Obstet Gynaecol India*. 2016;66(Suppl 1):383–8.
265. Vassallo J, Derchain SF, Pinto GA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Andrade LA. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000;71(1):45–8.
266. Tan GC, Salwati SN, Shiran S, Hatta MS. Immunohisto-chemical Study of p53 Expression in Premalignant and Malignant Cervical Neoplasms. *Med & Health*. 2007;2(2):125–32.

267. Mitildzans A, Arechvo A, Rezeberga D, Isajevs S. Expression of p63, p53 and Ki-67 in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Turk Patoloji Derg.* 2017;33(1):9–16.
268. Bruce JL, Hurford RK Jr, Classon M, Koh J, Dyson N. Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol Cell.* 2000;6(3):737–42.
269. Murphy N, Ring M, Heffron CCBB, King B, Killalea AG, Hughes C, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2005;58(5):525–34.
270. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(7):884–91.
271. Shi Q, Xu L, Yang R, Meng Y, Qiu L. Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol Lett.* 2019;18(2):1351–5.
272. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol.* 2005;18(2):267–73.
273. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(5):674–9.
274. Pandey A, Chandra S, Nautiyal R, Shrivastav V. Expression of p16INK4a and human papillomavirus 16 with associated risk factors in cervical premalignant and malignant lesions. *South Asian J Cancer.* 2018;7(4):236–9.
275. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311–22.
276. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, De Angelo Andrade LAL. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2006;102(3):537–41.

277. Zhao F-X, Sun R-F, Wang J-F, Chen X-W. Relationship among HPV16 infection and Expression of hTERT, p21waf1, Ki67 in cervical intraepithelial neoplasias and squamous cell carcinomas of cervix uteri. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2005;19(4):370–4.
278. Hebbar A, Murthy VS. Role of p16/INK4a and Ki-67 as specific biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia: An institutional study. *J Lab Physicians*. 2017;9(2):104–10.
279. Diouf D, Diop G, Fall C, Sarr S, Diarra CAT, Ngom AI, et al. The association of molecular biomarkers in the diagnosis of cervical pre-cancer and cancer and risk factors in Senegalese. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(11):3221–7.
280. Mittal K. Utility of proliferation-associated marker MIB-1 in evaluating lesions of the uterine cervix. *Adv Anat Pathol*. 1999;6(4):177-85.
281. Kruse AJ, Baak JPA, Helliesen T, Kjelleevold KH, Bol MG, Janssen EAM. Evaluation of MIB-1-positive cell clusters as a diagnostic marker for cervical intraepithelial neoplasia, *Am J Surgical Pathol*. 2002;26:1115011507 .
282. Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, DeMattia AE, Chen Y-T, et al. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB-1 immunostaining. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(1):70–5.
283. Mandal R, Ghosh I, Banerjee D, Mittal S, Muwonge R, Roy C, et al. Correlation between p16/Ki-67 expression and the grade of cervical intraepithelial neoplasias. *Int J Gynecol Pathol*. 2020;39(4):384–90.
284. Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating high-grade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis. *J Low Genit Tract Dis*. 2005;9(2):100–7.

BIOGRAFIJA

Janja Raonić rođena je 28.12.1987. godine u Pljevljima, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Dobitnik je diplome Luča. Medicinski fakultet upisala je u Podgorici 2006. godine i diplomirala za 5 godina i 10 mjeseci sa prosječnom ocjenom 9,18. U toku studija, dva puta je nagrađivana kao jedan od najboljih studenata Fakulteta.

Pripravnički staž obavila je u Domu zdravlja Podgorica, a nakon toga je 2016. godine radni angažman započela u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore.

Specijalizaciju iz oblasti patologije završila je na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu 2020. godine sa odličnom ocjenom.

Od 2013. godine angažovana je kao saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Podgorici.

Na doktorskim studijama odbranila je polazna istraživanja pod nazivom: „Citohistološke karakteristike vaskularnog zida aneurizme abdominalne aorte“.

Do sada je učestvovala u jednom međunarodnom i četiri bilateralna naučno-istraživačka projekta.

Kao doktorand Medicinskog fakulteta u Podgorici i saradnik u pomenutim naučno-istraživačkim projektima, prošla je edukacije iz oblasti genetskog inženjeringa i rada sa ćelijskim kulturama u prestižnim naučno-istraživačkim centrima u Francuskoj i Italiji.

Autor je i koautor pet naučnih radova u časopisima koji se nalaze u međunarodnim citatnim bazama, kao i više od 20 radova objavljenih u domaćim časopisima i prezentovanih na domaćim i međunarodnim kongresima. Takođe, jedan je od autora Praktikuma iz histologije za studente medicine i stomatologije, čiji je izdavač Univerzitet Crne Gore.

Osim stručnim i naučnim radom, bavi se i pisanjem poezije. Autor je jedne zbirke poezije i dobitnik brojnih priznanja i nagrada, od kojih je među najznačajnijima, nagrada Biblioteke u Čačku – Mladi Dis.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: dr Janja Raonić

Broj indeksa/upisa: 1/12

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja,
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedio/la autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

Potpis doktoranda

U _____

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: dr Janja Raonić

Broj indexa/upisa: 1/12

Studijski program: Medicina

Naslov rada: Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

Mentor: Prof. dr Ljiljana Vučković

Potpisani/a _____

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predao/a za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti kao što su ime i prezime, godina i mjesta rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

Potpis doktoranda

U _____

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative commons) za koju sam se odlučio/la

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jedno od šest ponuđenih licenci, kratak opis licence dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U _____

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: dr Janja Raonić

Broj indeksa/upisa: 1/12

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja,
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedio/la autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

U _____

Potpis doktoranda



Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: dr Janja Raonić

Broj indexa/upisa: 1/12

Studijski program: Medicina

Naslov rada: Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

Mentor: Prof. dr Ljiljana Vučković

Potpisani/a Ljiljana Vučković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predao/a za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti kao što su ime i prezime, godina i mjesta rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

U _____

Potpis doktoranda

J. Raonić

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije inflamatornih i proliferativnih markera u lezijama grlića materice

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative commons) za koju sam se odlučio/la

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jedno od šest ponuđenih licenci, kratak opis licence dat je na poledini lista).

U _____

Potpis doktoranda

