

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET

Milena Lopičić

**ULOGA FAKTORA RIZIKA I INFEKCIJE
HUMANIM PAPILOMAVIRUSIMA U
NASTANKU SKVAMOZNIH
CERVIKALNIH INTRAEPITELNIH LEZIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Podgorica, 2024. godine

UNIVERSITY OF MONTENEGRO
FACULTY OF MEDICINE

Milena Lopičić

**THE ROLE OF RISK FACTORS AND
HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION
IN THE OCCURRENCE OF SQUAMOUS
CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Podgorica, 2024

PODACI O DOKTORANDU, MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Doktorand:

Ime i prezime: Milena Lopičić

Datum rođenja: 12.11.1972. godine

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: Medicinski fakultet
Univerziteta u Beogradu, 2000. godine

Mentor: prof. dr Gordana Mijović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski
fakultet

Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata:

Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore,
Medicinski fakultet Podgorica

Prof. dr Mileta Golubović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet
Podgorica

Prof. dr Gordana Mijović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet
Podgorica

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije:

Datum odbrane:

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv doktorskih studija: Doktorske akademske studije Univerziteta Crne Gore, Medicinski fakultet Podgorica, Doktorski studijski program Medicina

Naslov doktorske disertacije: Uloga faktora rizika i infekcije humanim papilomavirusima u nastanku skvamoznih cervikalnih intraepitelnih lezija

Datum prijave doktorske teze: 26.12.2019. godine, br. 1839/4

Datum sjednice Senata Univerziteta Crne Gore na kojoj je prihvaćena doktorska teza: 12.03.2020. godine, br. 03-888/2

REZIME/IZVOD IZ TEZE

Uvod: Genitalna HPV infekcija je polno prenosiva bolest, a VR-HPV genotipovi su etiopatogenetski faktor razvoja cervikalnog karcinoma. Rak grlića materice je jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta žena u svetu i predstavlja ozbiljan javno-zdravstveni problem i u Crnoj Gori. Perzistentna cervikalna VR-HPV infekcija je najznačajnija karika u razvoju premalignih i malignih lezija grlića materice, ali za progresiju promena važni su i drugi kofaktori. Faktori rizika su povezani sa životnim dobom, seksualnim ponašanjem, socijalnim statusom, higijenskim navikama i kulturološkim shvatanjima određene populacije.

Ciljevi: Studija je bila fokusirana na ispitivanje prisustva VR-HPV infekcije i distribucije VR-HPV genotipova u monotipskim i multiplim infekcijama, kao i na ispitivanju značaja VR-HPV infekcije i multiple VR-HPV infekcije u nastanku skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice. Takođe, cilj istraživanja je bio i da se utvrde faktori rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije i skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice kod VR-HPV pozitivnih ispitanica.

Materijal i metode: Istraživanje je sprovedeno u periodu od 2012. do 2018. godine i obuhvatilo je 198 ispitanica kojima je bila indikovana biopsija grlića materice. Na osnovu nalaza biopsije, ispitanice (n=187) su bile podeljene u dve grupe: žene bez displazije i žene sa displazijom (LSIL i HSIL), a na osnovu utvrđenog VR-HPV statusa na grliću materice, ispitanice (n=198) su bile razvrstane takođe u dve grupe: žene bez VR-HPV infekcije i žene sa VR-HPV infekcijom. Za ispitivanje kofaktora za nastanak cervikalne displazije među VR-HPV pozitivnim ispitanicama (n=76) izvršena je podela na dve grupe: žene bez displazije i žene sa displazijom. Ispitanice uključene u ovu studiju prvo su popunile anketni upitnik, potom im je uzet cervikalni bris radi virusološkog ispitivanja prisustva VR-HPV infekcije i nakon toga odrađena je biopsija tkiva grlića materice za potrebe patohistološke analize. U daljem postupku obrade, izvršena je izolacija ukupne DNK iz cervikalnih briseva primenom komercijalnog kita, a dokazivanje i genotipizacija 12 VR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59) genotipova HPV DNK PCR metodom. Uzorci biopsije su stavljeni u parafin i isečeni na delove koji su obojeni hematoksilinom i eozinom, nakon čega je izvršena patohistološka analiza. Statistička

analiza je odrađena primenom parametarskih i neparametarskih testova i logističke regresione analize, sa nivoom značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati: Prevalencija cervikalne VR-HPV infekcije kod testiranih žena bila je 42,4%. Najzastupljeniji genotipovi među VR-HPV pozitivnim ženama bili su: HPV 16 (40,5%), HPV 45 (23,8 %), HPV 31 (20,2%) i HPV 33 (15,5%). Prevalencija cervikalne infekcije sa najmanje jednim VR-HPV genotipom ciljanim 9vHPV vakcinom bila je 91,7%. Većina žena je imala monotipsku cervikalnu VR-HPV infekciju (69,1%), a najzastupljeniji HPV genotipovi u monotipskim infekcijama među VR-HPV pozitivnim ženama bili su 16, 31 i 45. Dominantni HPV genotipovi među VR-HPV pozitivnim ženama sa multiplom cervikalnom infekcijom bili su 16 i 45. Cervikalna VR-HPV infekcija je bila prisutna kod 59,2% žena sa displazijom, a VR-HPV pozitivne žene bile su u 3,7 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na VR-HPV negativne žene. Dominantan VR-HPV genotip kod žena sa cervikalnim premalignim lezijama bio je HPV 16 (28,9%). Cervikalna HPV 33 infekcija se pokazala kao prediktor nastanka skvamoznih intraepitelних lezija grlića materice. HPV 33 pozitivne žene su bile u 3,6 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na HPV 33 negativne žene. Cervikalna HPV 16 infekcija se izdvojila kao najjači nezavisni prediktor pojave cervikalne displazije, pri čemu su HPV 16 pozitivne žene imale 2,7 puta veći rizik da razviju displaziju na grliću materice u odnosu na one koje su bile HPV 16 negativne. Cervikalna VR-HPV infekcija, kao i HPV 16 i HPV 33 infekcije, visoko koreliraju sa nastankom cervikalne displazije gradusa HSIL, što potvrđuje značajnu ulogu VR-HPV infekcije, a posebno HPV genotipova 16 i 33, u napredovanju cervikalnih premalignih lezija. Infekcija grlića materice sa najmanje jednim VR-HPV genotipom ciljanim 9vHPV vakcinom bila je dokazana kod 56,6% žena sa displazijom i kod 83,8% žena sa displazijom gradusa HSIL, što se pokazalo statistički značajno. Predviđa se da bi 9vHPV vakcina mogla da prevenira 60% slučajeva cervikalne displazije kod ispitivane grupe žena. Multipla cervikalna infekcija je dijagnostikovana kod 31,1% žena sa displazijom (21,4% sa LSIL i 35,5% sa HSIL) i kod 22,6% žena bez displazije, ali nije dokazana povezanost između multiple cervikalne VR-HPV infekcije i nastanka skvamoznih intraepitelних lezija grlića materice. Životna dob se izdvojila kao jedan od kofaktora koji visoko korelira sa sticanjem cervikalne VR-HPV infekcije, pri čemu su mlađe žene bile u 0,9 puta većem riziku u odnosu na starije žene. Prosečna životna dob stupanja u prvi

seksualni odnos bila je 20 godina, a mlađe žene imale su 0,8 puta veći rizik da steknu cervikalnu VR-HPV infekciju u odnosu na starije. Žene koje su imale ≥ 3 seksualnih partnera tokom života su bile u 1,4 puta većem riziku da steknu genitalnu VR-HPV infekciju u odnosu na žene sa manjim brojem partnera. Broj seksualnih partnera se pokazao i kao najjači nezavisni prediktor pojave cervikalne displazije unutar grupe VR-HPV pozitivnih žena. VR-HPV pozitivne žene sa ≥ 3 partnera tokom života su imale 1,8 puta veću verovatnoću da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na žene sa manjim brojem seksualnih partnera. Konzumiranje cigareta je značajan kofaktor za nastanak skvamoznih intraepitelih lezija grlića materice u grupi VR-HPV pozitivnih žena. Žene pušači bile su u 2,7 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na žene nepušače.

Zaključak: Sprovedenom studijom utvrđena je visoka prevalencija VR-HPV infekcije u tkivu grlića materice. HPV 16 je bio najčešći genotip, a slede ga HPV tipovi 45, 31 i 33. HPV 16 i HPV 33 verovatno igraju važnu ulogu u razvoju prekanceroznih lezija grlića materice. Predviđa se da bi 9vHPV vakcina mogla da prevenira 90% cervikalnih VR-HPV infekcija i 60% slučajeva cervikalne displazije. Utvrđeno je da su mlađa životna dob, rano stupanje u seksualne odnose i veći broj seksualnih partnera tokom života faktori rizika koji snažno koreliraju sa sticanjem cervikalne VR-HPV infekcije. Takođe je utvrđeno da su veći broj seksualnih partnera i konzumiranje cigareta značajni kofaktori koji doprinose razvoju skvamoznih intraepitelih lezija grlića materice kod VR-HPV pozitivnih žena.

Ključne reči: VR-HPV infekcija, VR-HPV genotipovi, 9vHPV vakcina, skvamozne intraepitelne lezije grlića materice, faktori rizika

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska mikrobiologija

UDK broj:

DATA ON THE DOCTORAL DISSERTATION

Name of doctoral studies: Doctoral academic studies at the University of Montenegro, Faculty of Medicine Podgorica, Doctoral study program Medicine

Doctoral thesis title: The role of risk factors and human papillomavirus infection in the occurrence of squamous cervical intraepithelial lesions

Thesis application date: 26.12.2019, number: 1839/4

Thesis acceptance date (UoM Senate Session): 12.03.2020, number: 03-888/2

ABSTRACT/THESIS OVERVIEW

Intraduction: Genital HPV infection is a sexually transmitted disease and HR-HPV genotypes are an etiopathogenetic factor in the development of cervical cancer. Cervical cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality among women in the world and represents a serious public health problem in Montenegro. Persistent cervical HR-HPV infection is the most significant link in the development of premalignant and malignant lesions of the cervix, but other cofactors are also important for the progression of changes. Risk factors are related to age, sexual behavior, social status, hygienic and cultural understandings of certain populations.

Objectives: The study was focused on examining the presence of HR-HPV infection and the distribution of HR-HPV genotypes in single and multiple infections, as well as examining the significance of HR-HPV infection and multiple HR-HPV infection in the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. Also, the aim of the research was to determine the risk factors for the occurrence of cervical HR-HPV infection and squamous intraepithelial lesions of the cervix in HR-HPV positive women.

Material and methods: The research was conducted in the period from 2012 to 2018 and included 198 subjects who were indicated for cervical biopsy. Based on the findings of biopsy, the subjects (n=187) were divided into two groups: women without dysplasia and women with dysplasia (LSIL and HSIL), and based on the established HR-HPV status on the cervix, the subjects (n=198) were also classified into two groups: women without HR-HPV infection and women with HR-HPV infection. To examine cofactors for the development of cervical dysplasia among VR-HPV positive subjects (n=76), a division was made into two groups: women without dysplasia and women with dysplasia. The subjects included in this study first filled out a questionnaire, then a cervical smear was taken for the virological examination of the presence of HR-HPV infection, and then a biopsy of the cervical tissue was performed for the purposes of pathohistological analysis. In the further processing procedure, isolation of total DNA from cervical swabs was performed using a commercial kit, and 12 VR-HPVs (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 and 59) were tested and genotyped genotypes by HPV DNA PCR method. Biopsy samples were placed in paraffin and cut into parts that were stained with hematoxylin and eosin, after which pathohistological analysis was performed. Statistical analysis was

performed using parametric and non-parametric tests and logistic regression analysis, with a significance level of $p < 0.05$.

Results: The prevalence of cervical HR-HPV infection in the tested women was 42.4%. The most common genotypes among HR-HPV positive women were: HPV 16 (40.5%), HPV 45 (23.8%), HPV 31 (20.2%) and HPV 33 (15.5%). The prevalence of cervical infection with at least one HR-HPV genotype targeted by the 9vHPV vaccine was 91.7%. The majority of women had single cervical HR-HPV infection (69.1%), and the most common HPV genotypes in single infections among HR-HPV positive women were 16, 31 and 45. The dominant HPV genotypes among HR-HPV positive women with multiple cervical infection were 16 and 45. Cervical HR-HPV infection was present in 59.2% of women with dysplasia, and HR-HPV positive women had a 3.7 times higher risk of developing cervical dysplasia compared to HR-HPV negative women. The dominant HR-HPV genotype in women with cervical premalignant lesions was HPV 16 (28.9%). Cervical HPV 33 infection has been shown to be a predictor of the occurrence of squamous intraepithelial lesions of the cervix. HPV 33 positive women had a 3.6 times higher risk of developing cervical dysplasia compared to HPV 33 negative women. Cervical HPV 16 infection emerged as the strongest independent predictor of cervical dysplasia, with women positive for HPV 16 having a 2.7-fold increased risk of developing cervical dysplasia compared to those who were HPV 16 negative. Cervical HR-HPV infection, as well as HPV 16 and HPV 33 infections, are highly correlated with the occurrence of HSIL grade cervical dysplasia, which confirms the significant role of HR-HPV infection, and especially HPV genotypes 16 and 33, in the progression of premalignant lesions of the cervix. Cervical infection with at least one genotype of HR-HPV targeted by the 9vHPV vaccine was demonstrated in 56.6% of women with dysplasia and in 83.8% of women with HSIL grade dysplasia, which proved to be statistically significant. It was predicted that the 9vHPV vaccine could prevent 60% of cases of cervical dysplasia in the study group of women. Multiple cervical infection was diagnosed in 31.1% of women with dysplasia (21.4% with LSIL and 35.5% with HSIL) and in 22.6% of women without dysplasia, but there was no association between multiple cervical HR-HPV infection and the formation of squamous intraepithelial lesions of the cervix. Age was singled out as one of the cofactors that highly correlates with acquiring VR-HPV infection of the cervix, with younger women being at 0.9 times higher risk than

older women. The average age of first sexual intercourse was 20 years, with younger women having a 0.8 times higher risk of acquiring HR-HPV infection of the cervix compared to older women. Women who had ≥ 3 sexual partners during their lifetime has a 1.4 times higher risk of acquiring genital HR-HPV infection compared to women with fewer partners. The number of sexual partners proved to be the strongest independent predictor of cervical dysplasia in the group of women positive for HR-HPV. HR-HPV positive women with ≥ 3 lifetime partners were 1.8 times more likely to develop cervical dysplasia compared to women with fewer sexual partners. Cigarette consumption is a significant cofactor for the occurrence of squamous intraepithelial lesions of the cervix in the group of women positive for HR-HPV. Female smokers were 2.7 times more likely to develop cervical dysplasia than non-smoking females.

Conclusion: The conducted study established a high prevalence of HR-HPV infection in the tissue of the cervix. HPV 16 was the most common genotype, followed by HPV types 45, 31 and 33. HPV 16 and HPV 33 probably play an important role in the development of precancerous cervical lesions. It is predicted that the 9vHPV vaccine could prevent 90% of cervical HR-HPV infections and 60% of cases of cervical dysplasia. It was found that younger age, early initiation of sexual relations and a greater number of sexual partners during life are risk factors that are strongly correlated with cervical HR-HPV infection. It was also determined that a greater number of sexual partners and cigarette consumption are significant cofactors that contribute to the occurrence of squamous intraepithelial lesions of the cervix in HR-HPV positive women.

Key words: HR-HPV infection, HR-HPV genotypes, 9vHPV vaccine, squamous intraepithelial lesions of the cervix, risk factors

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Medical Microbiology

UDC number:

PREDGOVOR

Veza između infekcije humanim papilomavirusima (HPV) i nastanka karcinoma grlića materice (*engl.* cervical cancer - CC) je dokazana 90- tih godina XX veka. Danas se sa sigurnošću zna da je HPV infekcija polno prenosiva bolest i da su visoko-rizični HPV genotipovi etiopatogenetski faktor razvoja CC. Ova saznanja su od krucijalnog značaja, jer su postala polazna tačka za rasvetljavanje patogeneze HPV infekcije i razumevanje njenih najvažnijih aspekata. Osim toga, virusna etiologija premalignih i malignih lezija grlića materice ukazuje na mogućnost specifične imunološke profilakse, prevencije i terapije.

Iako je neosporno dokazana povezanost HPV infekcije i karcinoma grlića materice, kancerogeneza i dalje predstavlja naučnu enigmu koja je stalni izazov istraživačima širom sveta. Istraživanje koje je predmet ove doktorske teze je doprinos naporima da se rasvetle različiti aspekti nastanka i razvoja karcinoma, što bi moglo doprineti njegovoj prevenciji.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Porodica papilomavirusa.....	2
1.1.1. Klasifikacija papilomavirusa	2
1.2. Humani papilomavirusi.....	5
1.2.1. Klasifikacija humanih papilomavirusa	5
1.2.2. Struktura viriona humanih papilomavirusa	8
1.2.3. Kapsid humanih papilomavirusa	8
1.2.4. Organizacija genoma humanih papilomavirusa	8
1.2.5. Replikacija humanih papilomavirusa	9
1.2.6. Funkcija pojedinih gena/proteina humanih papilomavirusa.....	12
1.2.6.1. E1 gen/protein	12
1.2.6.2. E2 gen/protein	12
1.2.6.3. E4 gen/protein	13
1.2.6.4. E5 gen/protein	14
1.2.6.5. E6 gen/protein	14
1.2.6.6. E7 gen/protein	16
1.2.6.7. L1 gen/protein	17
1.2.6.8. L2 gen/protein	17
1.2.7. Životni ciklus humanih papilomavirusa	17
1.3. Kancerogeneza indukovana humanim papilomavirusima	20
1.4. Patogeneza infekcije humanim papilomavirusima	22
1.5. Faktori rizika.....	23
1.6. Imunitet kod infekcije humanim papilomavirusima	24
1.7. HPV vakcine	26
1.7.1. Profilaktičke HPV vakcine.....	27
1.7.2. Terapijske HPV vakcine	28
1.8. Virusološka laboratorijska dijagnostika HPV infekcije.....	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	31
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Materijal.....	32
3.1.1. Ispitanice	32

3.1.2. Klinički uzorci.....	33
3.2. Metode	34
3.2.1. Socio-epidemiološka anketa.....	34
3.2.2. Virusološka dijagnostika VR-HPV infekcija	34
3.2.2.1. DNK ekstrakcija	34
3.2.2.2. Dokazivanje i genotipizacija HPV DNK PCR metodom	35
3.2.3. Patohistološka dijagnostika uzoraka tkiva grlića materice	36
3.2.4. Statistička obrada podataka	36
4. REZULTATI	38
4.1. Cervikalna VR-HPV infekcija	38
4.1.1. Distribucija cervikalnih VR-HPV genotipova	38
4.1.2. Distribucija monotipskih i multiplih cervikalnih VR-HPV infekcija	39
4.1.3. Distribucija VR-HPV infekcije u odnosu na pojavu cervikalne displazije...	41
4.1.4. Distribucija VR-HPV infekcije u odnosu na tip cervikalne displazije.....	42
4.2. Faktori rizika.....	46
4.2.1. Faktori rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije	46
4.2.2. Faktori rizika za nastanak cervikalne displazije kod VR-HPV pozitivnih ispitanica.....	51
5. DISKUSIJA	56
5.1. Distribucija VR-HPV infekcije i VR-HPV genotipova u cervikalnim displastičnim lezijama.....	57
5.2. Uticaj faktora rizika na sticanje cervikalne VR-HPV infekcije i nastanak displazije na grliću materice	65
6. ZAKLJUČCI.....	74
7. LITERATURA	76
8. PRILOZI	105
Prilog 1.....	105

Lista slika

Slika 1. Filogenetsko stablo porodice Papillomaviridae. Izvor: Van Doorslaer K i sar, 2018 (18)	4
Slika 2. Klasifikacija humanih papilomavirusa: Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus Izvor: Doorbar J i sar, 2020 (28)	5
Slika 3. Klasifikacija humanih papilomavirusa Alphapapillomavirus roda. HPV koji pripadaju rodu Alpha često se klasifikuju kao NR-HPV kožni (sivo polje), NR-HPV mukozni (narandžasto polje) ili VR-HPV tipovi (ružičasto polje). VR-HPV tipovi koji su boldovani crveno, prema epidemiološkim podacima, potvrđeni su kao humani kancerogeni. Preostali VR-HPV tipovi su „verovatno“ ili „moguće“ kancerogeni. Izvor: Doorbar J i sar, 2012 (30).....	7
Slika 4. Struktura HPV-a. Izvor: Howley PM i sar, 2001 (38)	8
Slika 5. Organizacija HPV genoma. Izvor: modifikovano iz Hampson i sar, 2020 (41) .	8
Slika 6. Ulazak HPV-a u bazalne ćelije. Izvor: Deligeoroglou E i sar, 2013 (46)	10
Slika 7. Interakcija HPV proteina E6 i E7 sa ćelijskim antionkogenima p53 i pRb. Izvor: Seo YS i sar, 1993 (56)	15
Slika 8. Životni ciklus HPV-a. Izvor: modifikovano iz Hampson JN i sar, 2020 (41) ..	19

Lista tabela

Tabela 1. Distribucija VR-HPV genotipova u monotipskim i multiplim infekcijama kod ispitanica.....	40
Tabela 2. Distribucija VR-HPV genotipova u odnosu na patohistološki status (sa i bez displazije) kod žena u Crnoj Gori	42
Tabela 3. Distribucija VR-HPV infekcije prema patohistološkom nalazu bioptata grlića materice	43
Tabela 4. Univarijantna logistička regresiona analiza razlike između ispitanica sa i bez cervikalne displazije u odnosu na VR-HPV infekciju	44
Tabela 5. Razlike u riziku od nastanka cervikalne displazije kod žena sa VR-HPV infekcijom procenjene multivarijantnom logističkom regresionom analizom..	45
Tabela 6. Razlika u verovatnoći nastanka cervikalne displazije u odnosu na prisustvo različitih VR-HPV genotipova kao prediktora displastičnih promena.....	46

Tabela 7. Socio-demografske karakteristike ispitanica i cervikalna VR-HPV infekcija	47
Tabela 8. Seksualne navike ispitanica i cervikalna VR-HPV infekcija	48
Tabela 9. Reproductivne karakteristike i briga o reproductivnom zdravlju ispitanica i cervikalna VR-HPV infekcija	49
Tabela 10. Univarijantna logistička regresiona analiza razlike između ispitanica sa i bez VR-HPV infekcije	50
Tabela 11. Multivarijantna logistička regresiona analiza razlike između ispitanica sa i bez cervikalne VR-HPV infekcije	50
Tabela 12. Socio-demografske karakteristike ispitanica i cervikalna displazija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica	51
Tabela 13. Seksualne navike ispitanica i cervikalna displazija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica.....	52
Tabela 14. Reproductivne karakteristike i briga o reproductivnom zdravlju ispitanica i cervikalna displazija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica	54
Tabela 15. Univarijantna logistička regresiona razlike između VR-HPV pozitivnih ispitanica bez displazije i sa displazijom grlića materice.....	55
Tabela 16. Multivarijantna logistička regresiona razlike između VR-HPV pozitivnih ispitanica bez displazije i sa displazijom grlića materice.....	55

Lista grafikona

Grafikon 1. Zastupljenost žena sa VR-HPV infekcijom	38
Grafikon 2. Distribucija 12 VR-HPV genotipova među VR-HPV pozitivnim ženam...	39
Grafikon 3. Zastupljenost infekcija VR-HPV tipovima ciljanih 9vHPV vakcinom	39
Grafikon 4. Zastupljenost monotipskih i multiplih VR-HPV infekcija.....	40
Grafikon 5. VR-HPV infekcija u odnosu na pojavu cervikalne displazije.....	41

1. UVOD

Rak grlića materice je i dalje jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta žena u svetu, posebno u nerazvijenim zemljama. Više od 85% novih slučajeva CC dijagnostikuje se u zemljama u razvoju, u koje spada i Crna Gora (1). Prema GLOBOCAN podacima iz 2020. godine, rak grlića materice je dijagnostikovao kod 604.127 žena (13,3/100.000) kao četvrti karcinom po učestalosti i bio je odgovoran za 341.831 smrtnih slučajeva (7,3/100.000), što ga je činilo trećerangiranim karcinomom u pogledu smrtnosti žena na globalnom nivou (<http://globocan.iarc.fr/>).

CC predstavlja ozbiljan javno-zdravstveni problem i u Crnoj Gori (2). Prema podacima Registra malignih neoplazmi Crne Gore za 2013. godinu, CC je bio četvrti maligni tumor (ne računajući nemelanomske maligne neoplazme kože) i četvrti vodeći uzrok smrti žena u Crnoj Gori (3). Uprkos skriningu raka grlića materice, koji se od februara 2018. godine sprovodi na nacionalnom nivou, podaci GLOBOCAN studije za 2020. su pokazali da je Crna Gora imala najveću stopu incidencije CC (26,2 /100.000) i najveću stopu smrtnosti od CC (10,5/100.000) u Evropi u 2020. godini (<http://globocan.iarc.fr/>).

Sredinom 70- tih godina XX veka postavljena je hipoteza o vezi između HPV infekcije i CC, a 90- tih godina, zahvaljujući metodama molekularne biologije i epidemiološkim studijama, veza je dokazana (4,5). Harald zur Hausen dobitnik je Nobelove nagrade za fiziologiju ili medicinu 2008. godine za otkriće da je HPV uzročnik CC. On je pretpostavio i dokazao da je HPV DNK ugrađena u genom tumorske ćelije i da se može dokazati specifičnim metodama detekcije virusne DNK. Takođe je utvrdio da je HPV heterogena virusna porodica, a samo neki od HPV genotipova mogu uzrokovati tumor (6). Prisustvo HPV DNK je potvrđeno u tkivu više od 99,7% invazivnih karcinoma grlića materice (*engl.* invasive cervical cancer - ICC) (5,7), a genotipovi 16 i 18 se smatraju klinički najznačajnijim izolatima, jer se dovode u vezu sa ~70% ICC žena u svetu (8).

Iako epidemiološki podaci na globalnom nivou upućuju na to da se genotipovi 16 i 18 smatraju najagresivnijim i najfrekventnijim izolatima opisanima kod CC širom sveta, HPV prevalenca i genotipovi nisu globalno ujednačeni. Faktori rizika za nastanak i

perzistenciju HPV infekcije, kao i kofaktori kancerogeneze, i dalje su predmet brojnih istraživanja koja treba da doprinesu boljem razumevanju procesa nastanka CC i njegove prevencije (8–12), što ukazuje na opravdanost sprovođenja studije koja je predmet ove doktorske teze.

1.1. Porodica papilomavirusa

Papilomavirusi su drevni i široko rasprostranjeni virusi viših kičmenjaka (13) i prema dosadašnjim saznanjima smatra se da su jedna od najstarijih i najvećih poznatih familija/porodica virusa (14). Filogenetska istraživanja ukazuju da su nastali na području Afrike pre ~330 miliona godina, u paleozojskoj eri, odakle su se postepeno širili na ostale kontinente tokom više od milion godina (15). Pretpostavlja se da su koevoluirali zajedno sa svojim domaćinima, adaptirali se na njih i postali vrsno specifični (16,17). Inficiraju ćelije skvamoznog epitela i sluznica kičmenjaka (riba, gmizavaca, ptica i sisara), dovodeći do benignih ili malignih promena, što je uslovljeno genotipom virusa, vrstom domaćina i uslovima života (13,18). Izuzetak su goveđi papilomavirusi (*Bovine papillomaviruses*), tipovi 1 i 2, koji pokazuju unakrsnu transmisiju sa drugim vrstama, a mogu da inficiraju i ćelije mezenhimalnog tkiva (16,19,20). Filogenetske analize ukazuju da su papilomavirusi stekli onkogeni potencijal tek nakon što se inficirao ljudski rod (8).

1.1.1. Klasifikacija papilomavirusa

Papilomavirusi su izuzetno raznovrsna grupa virusa sa relativno stabilnim genomom. Prvobitno su bili grupisani zajedno sa poliomavirusima u porodicu *Papovaviridae*, jer su elektronskom mikroskopijom i analizom nukleinskih kiselina bile utvrđene zajedničke osobine ovih virusa: mali virion bez omotača, ikozaedarni kapsid, genom u vidu cirkularne dvolančane dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i jedro ćelije kao mesto replikacije virusne DNK i sklapanja viriona. Familija *Papovaviridae* je bila podeljena na dva roda: *Polyomavirus* i *Papillomavirus* (21). Kasnije, molekularne i funkcionalne studije su pokazale da uočene sličnosti nisu dovoljne i da postoje fundamentalne razlike u veličini i organizaciji genoma papilomavirusa i poliomavirusa (22). Papilomavirusi imaju značajno veći genom (~8000 baznih parova) i više otvorenih okvira čitanja (*engl.* open reading frames - ORFs) od poliomavirusa (~5000 baznih parova). Geni papilomavirusa se prepisuju sa istog DNK lanca, dok se neki geni

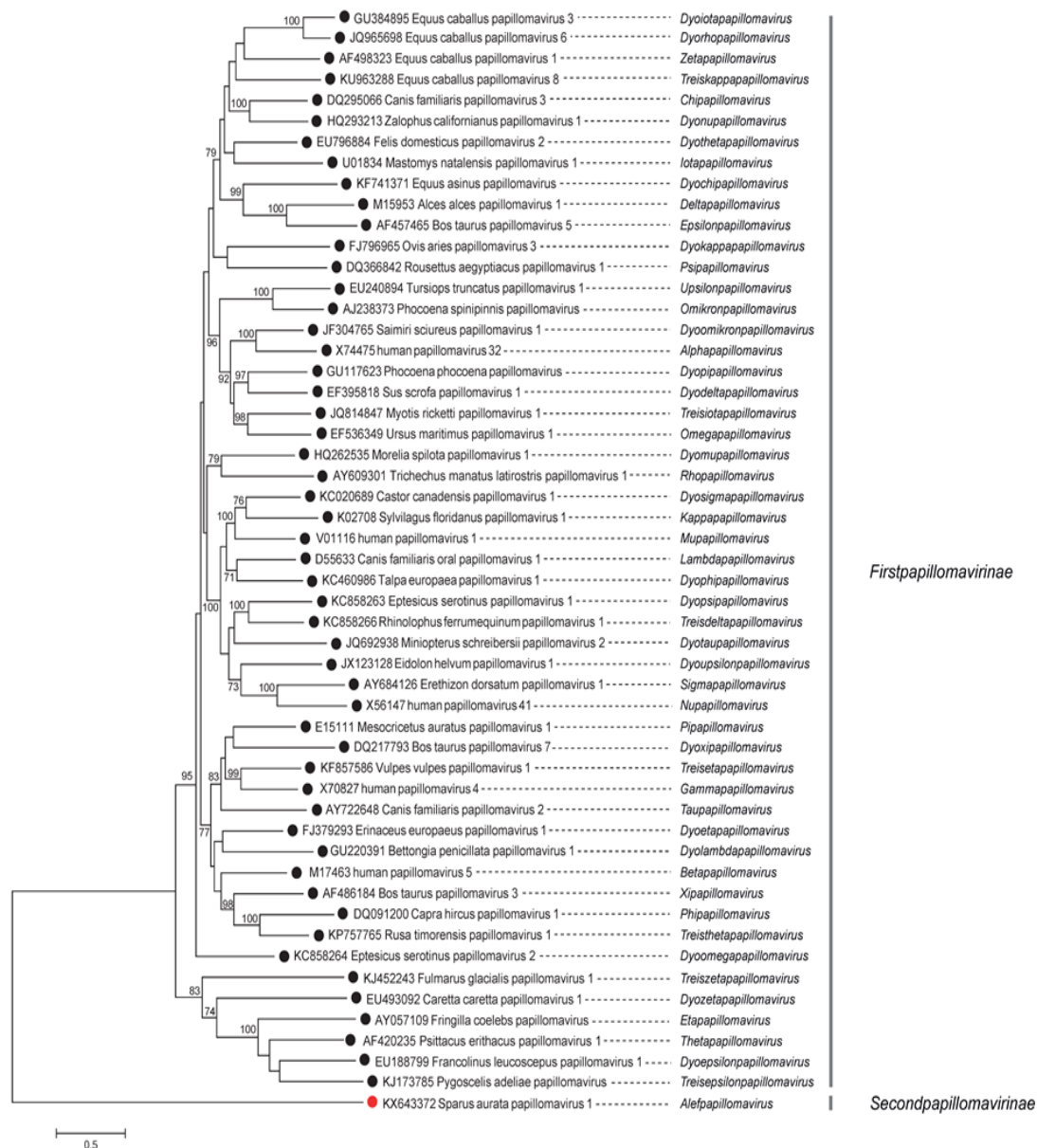
poliomavirusa prepisuju i sa komplementarnog lanca. Pored toga, ovi virusi se mogu razlikovati i po prisustvu specifičnih epitopa na glavnom proteinu kapsida (L1 protein). Međutim, najvažnija razlika je da papilomavirusi i poliomavirusi nemaju značajnu homologiju nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci, osim jednog malog segmenta T-antigena i jednog malog segmenta E1 gena (23). Iz navedenih razloga, Međunarodni savet za taksonomiju virusa je 2004. godine usvojio odluku da se sada već nepostojeća familija *Papovaviridae* podeli na dve nove familije: *Papillomaviridae* i *Polyomaviridae* (21,24).

Naziv papilomavirusa poreklom je od latinske reči *papilla*, „bradavica“, i grčkog sufiksa – *oma*, koji se koristi za formiranje imenica koje označavaju "tumore" (18). Familija *Papillomaviridae* se na osnovu poređenja sekvenci najviše konzerviranog gena L1 ORF- a, taksonomski dalje klasifikuje u:

1. podfamilije - virusi koji pokazuju više od 45% sličnosti,
2. rodove/genuse - virusi koji pokazuju više od 60% sličnosti,
3. vrste - virusi koji pokazuju između 60 do 70 % sličnosti,
4. tipove/genotipove - virusi koji pokazuju od 71% do 89% sličnosti
5. podtipove - virusi koji pokazuju od 90% do 98% sličnosti i
6. varijante - virusi koji pokazuju više od 98% sličnosti (21,24).

Na osnovu navedenih taksonomskih kriterijuma, familija *Papillomaviridae* je podeljena na dve podfamilije (*Firstpapillomavirinae* i *Secondpapillomavirinae*), 53 roda i 133 vrste (Slika 1). Do danas je definisano 52 roda i 132 vrste u podfamiliji *Firstpapillomavirinae*, a jedan rod i jedna vrsta u podfamiliji *Secondpapillomavirinae*. Rodovi podfamilije *Firstpapillomavirinae* su imenovani slovima grčkog alfabeta, od „alfa“ do „omega“, uz dodatak prefiksa „dyo“ i „treis“ za označavaje ponavljjanog naziva slova grčkog alfabeta drugi ili treći put (npr. *Deltapapillomavirus*, *Dyodeltapapillomavirus*, *Treisdeltapapillomavirus*). Rodovi unutar podfamilije *Secondpapillomavirinae* su imenovani prema semitskim abjadima. Trenutno, podfamilija *Secondpapillomavirinae* sadrži jedan rod, koji nosi prvo slovo ovog alfabeta: *Alefpapillomavirus* (18).

Filogenetska analiza, zasnovana na poređenju sekvenci gena E1, E2, L2 i L1, podržava postojeću podjelu familije *Papillomaviridae* na dve podfamilije, kao i mnoge rodove i vrste unutar *Firstpapillomavirinae*. Međutim, nisu svi rodovi i vrste podjednako potvrđeni. Možda će u bliskoj budućnosti postojati potreba da se taksonomija *Papillomaviridae* zasniva na filogenetskom stablu na osnovu E1, E2, L2 i L1 proteina za definisanje rodova i vrsta, a na osnovu homologije sekvenci L1 ORF- a, za definisanje tipova papilomavirusa (18,25).



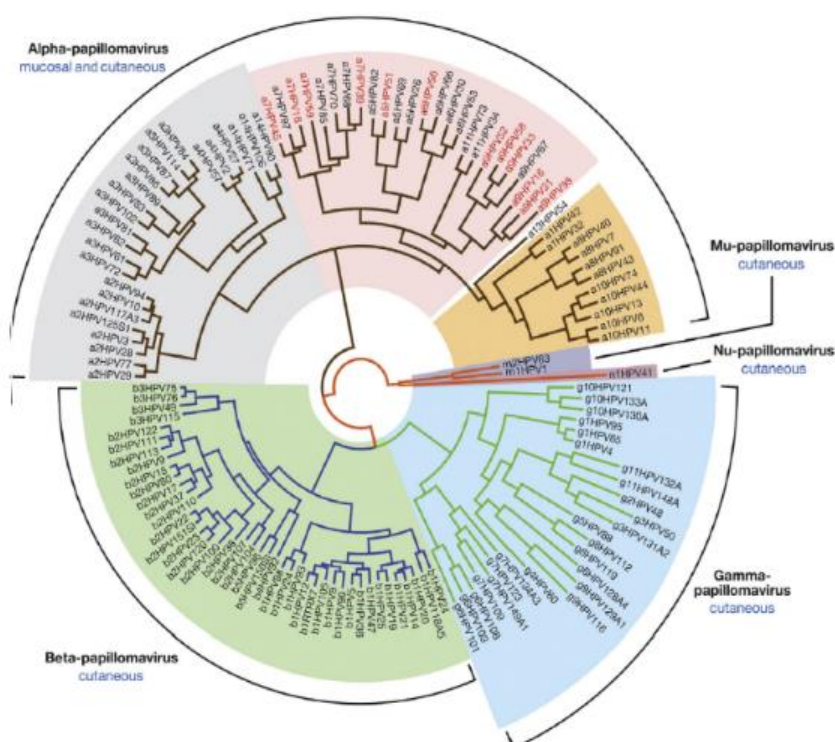
Slika 1. Filogenetsko stablo porodice *Papillomaviridae*. Izvor: Van Doorslaer K i sar, 2018 (18)

1.2. Humani papilomavirusi

Papilomavirusi koji izazivaju infekcije ljudi se nazivaju humani papilomavirusi (*Human papillomaviruses*) i smatra se da su stari koliko i ljudski rod (13,26). Za sada ne postoje dokazi o pojavi infekcija ljudi prouzrokovanih papilomavirusima drugih vrsta, niti infekcija drugih vrsta prouzrokovanih humanim genotipovima (13).

1.2.1. Klasifikacija humanih papilomavirusa

Do danas je opisano više od 200 humanih genotipova (26). HPV pripadaju podfamiliji *Firstpapillomavirinae* i klasifikovani su u pet rodova: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* i *Nupapillomavirus* (Slika 2). Shodno tropizmu koji pokazuju prema anatomskom području, opisani su kožni i mukozni HPV genotipovi. Kožni tipovi su epidermotropni i inficiraju keratinozne površine kože ruku i stopala. Mukozni tipovi inficiraju sluzokožu usta, grla, respiratornog ili anogenitalnog trakta (27).



Slika 2. Klasifikacija humanih papilomavirusa: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nupapillomavirus*
Izvor: Doorbar J i sar, 2020 (28)

Na osnovu epidemioloških podataka, više od 40 HPV genotipova je dokazano u epitelu sluzokože anogenitalnog trakta žena i to su tzv. genitalni HPV genotipovi. U zavisnosti od njihove veze sa kancerom i prekanceroznim lezijama grlića materice, tj. u odnosu na onkogeni potencijal koji posjeduju, klasifikuju se na sledeći način:

- visoko-rizični HPV (VR-HPV) genotipovi:

grupa 1 (sa onkogenim potencijalom): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59;

grupa 2A (verovatno sa onkogenim potencijalom): 68;

grupa 2B (moguće sa onkogenim potencijalom): 26, 30, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85;

- nisko-rizični HPV (NR-HPV) genotipovi sa niskim onkogenim potencijalom: 2, 6, 7, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 44, 57, 61, 62, 72, 74, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 97, 106 (28–30).

VR-HPV tipovi dovode se u vezu sa orofaringealnim (usta, tonzila, grla, laringsa) i anogenitalnim (cervikalni, analni, vulvarni, vaginani, penisa) malignim tumorima, dok su NR-HPV tipovi odgovorni za nastanak anogenitalnih i kožnih bradavica (31).

NR-HPV tipovi, kao što su HPV 6 i 11, mogu da izazovu genitalne bradavice ili benigne hiperproliferativne lezije sa veoma ograničenom tendencijom ka malignoj proliferaciji. Infekcije sa VR-HPV tipovima, ističući HPV 16 i 18, dovode se u vezu sa premalignim i malignim cervikalnim lezijama (10,32,33).

Najveći broj HPV tipova nalazi se u rodu *Alphapapillomavirus* (64 humana od ukupno 76 tipova koliko ih ima u ovom rodu), koji je grupisan u 14 virusnih vrsta (Slika 3). *Alphapapillomavirus* genus se dovodi u vezu sa infekcijama anogenitalnog trakta i oralne sluznice (34,35). HPV ovog roda pokazuju tropizam prema koži i sluzokoži, a prema onkogenom potencijalu se dele na nisko-rizične i visoko-rizične tipove (28). HPV genotipovi iste vrste karakterišu se istim onkogenim potencijalom i tkivnim tropizmom (36).

Betapapillomavirus rod je podeljen na 6 vrsta i pripada mu 46 humanih od ukupno 49 tipova koliko ih ima u ovom rodu. Pokazuju tropizam prema koži, a u odnosu na onkogeni potencijal mogu biti nisko-rizični i visoko-rizični tipovi. *Betapapillomavirus*

genus se dovodi u vezu sa inaparentnim infekcijama kože kod imunokompetentnih osoba, dok kod imunokompromitovanih perzistentne infekcije mogu da doprinesu razvoju malignih tumora kože (18,37).

Gammapapillomavirus rod ima 27 opisanih vrsta sa 68 tipova od kojih su svi humani tipovi sa tropizmom prema koži.

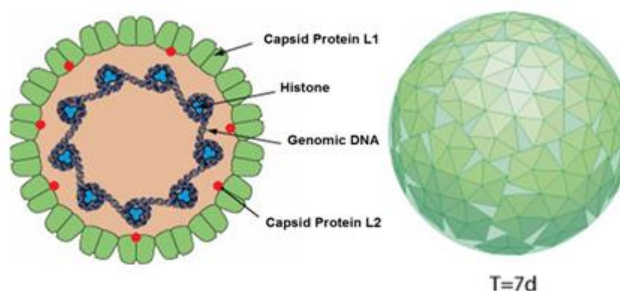
Rodovi *Mupapillomavirus* i *Nupapillomavirus* čine male grupe, sa 3, odnosno jednom vrstom, i po jednim humanim genotipom po vrsti, i svi pokazuju tropizam prema koži (18,28).

Genus + Species	Type Species	Invasive Cervical Cancer	IARC Category	Squamous Cell Carcinoma	Adeno Carcinoma	Tropism
Alpha 1	HPV32		3			mucosal
Alpha 2	HPV42					
	HPV3					cutaneous
	HPV10		3			
	HPV28		3			
	HPV77		3			
	HPV94					
	HPV117					
	HPV125					
Alpha 3	HPV81	0.01	3			mucosal
	HPV62		3			
	HPV72		3			
	HPV81		3	0.4		
	HPV83		3	0.4		
	HPV84		3			
	HPV86		3			
	HPV87		3			
	HPV89		3			
	HPV102					
	HPV114					
Alpha 4	HPV2		3			cutaneous
	HPV27		3			
	HPV57		3			
Alpha 5	HPV26	0.37	2B	0.22		
	HPV51	1.25	1	0.75	0.54	
	HPV89	0.08	2B			
	HPV82	0.07	2B	0.26		
Alpha 6	HPV30	0.37	2B			
	HPV53	0.26	2B	0.04		
	HPV56	0.84	1	1.09		
	HPV66	0.08	2B	0.19		
Alpha 7	HPV18	10.28	1	11.27	37.3	mucosal
	HPV39	1.67	1	0.82	0.54	
	HPV45	5.68	1	5.21	5.95	
	HPV59	1.08	1	1.05	2.16	
	HPV68	1.04	2A	0.37		
	HPV70		2B			
	HPV85	0.11	2B			
	HPV97					
Alpha 8	HPV7		3			cutaneous (mucosal)
	HPV40		3			
	HPV43					
	HPV91	0.01	3			
Alpha 9	HPV16	61.35	1	54.38	41.62	
	HPV31	3.65	1	3.82	0.08	
	HPV33	3.83	1	2.06	0.54	
	HPV35	1.94	1	1.27	1.08	
	HPV52	2.71	1	2.25		
	HPV58	2.22	1	1.72	0.54	
	HPV87	0.31	2B			
Alpha 10	HPV6	0.11	3	0.07		mucosal
	HPV11	0.02	3	0.07		
	HPV13		3			
	HPV44	0.01	3			
	HPV74	0.01	3			
Alpha 11	HPV34	0.07				mucosal
	HPV73	0.52	2B	0.49		
Alpha 12						
Alpha 13	HPV54					mucosal
Alpha 14	HPV71					
	HPV90		3			
	HPV106		3			

Slika 3. Klasifikacija humanih papilomavirusa *Alphapapillomavirus* roda. HPV koji pripadaju rodu *Alpha* često se klasifikuju kao NR-HPV kožni (sivo polje), NR-HPV mukozni (narandžasto polje) ili VR-HPV tipovi (ružičasto polje). VR-HPV tipovi koji su boldovani crveno, prema epidemiološkim podacima, potvrđeni su kao humani kancerogeni. Preostali VR-HPV tipovi su „verovatno“ ili „moguće“ kancerogeni. Izvor: Doorbar J i sar, 2012 (30)

1.2.2. Struktura viriona humanih papilomavirusa

HPV su mali virusi sferičnog oblika bez omotača, prečnika 52 - 55 nm (Slika 4). Građeni su od ikozaedarnog kapsida i genoma koga čini dvolančana cirkularna DNK povezana ćelijskim histonima (38).



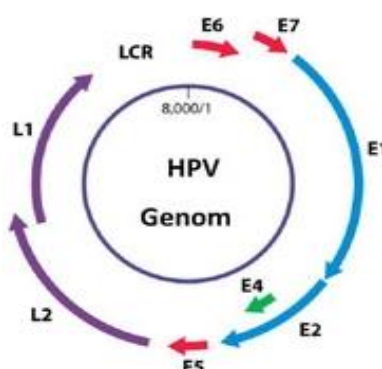
Slika 4. Struktura HPV-a. Izvor: Howley PM i sar, 2001 (38)

1.2.3. Kapsid humanih papilomavirusa

Kapsid je sastavljen od dva strukturna proteina, L1 i L2. Strukturalne analize su pokazale da se 360 kopija L1 proteina disulfidnim vezama spontano organizuje u pentamerne kapsomere, a zatim u prisustvu različitog broja molekula (oko 12 kopija po virionu) L2 proteina dolazi do organizovanja ikozaedarnog kapsida od 72 kapsomere, čiji je triangulacioni broj 7 ($T=7$) (38–40).

1.2.4. Organizacija genoma humanih papilomavirusa

Unutar kapsida smešten je genom veličine oko 8000 baznih parova i sadrži kodirajući i nekodirajući deo (Slika 5).



Slika 5. Organizacija HPV genoma. Izvor: modifikovano iz Hampson i sar, 2020 (41)

Kodirajući deo ima 8-10 ORFs, označenih kao rani (*engl.* Early - E) i kasni (*engl.* Late - L) region (42). Rani region sadrži šest ORFs: E1, E2, E4, E5, E6 i E7, koji kodiraju regulatorne proteine uključene u transkripciju, virusnu replikaciju, ekspresiju virusnih gena i ćelijsku transformaciju (37). Kasni region se sastoji od dva ORFs: L1 i L2, koji sadrže informaciju za sintezu strukturnih proteina virusnog kapsida. Gen L1 kodira veliki kapsidni protein, koji je vrlo sličan kod svih HPV genotipova, a gen L2 kodira mali kapsidni protein, koji se znatno razlikuje u pojedinim HPV genotipova (42–44). ORFs se uvek nalaze samo na jednom DNK lancu, pa se stoga geni prepisuju samo sa tog lanca (44).

Nekodirajući deo virusnog genoma je bez ORFs i označen je kao uzvodni regulatorni region (*engl.* Upstream Regulatory Region - URR) ili dugi kontrolni region (*engl.* Long Control Region - LCR). LCR se nalazi između gena L1 i E6 i ima regulatornu funkciju u transkripciji E6 i E7 gena. Kod anogenitalnih HPV tipova čini 10 % ukupnog genoma i pokazuje značajne razlike u nukleotidnom sastavu između pojedinih HPV genotipova (43).

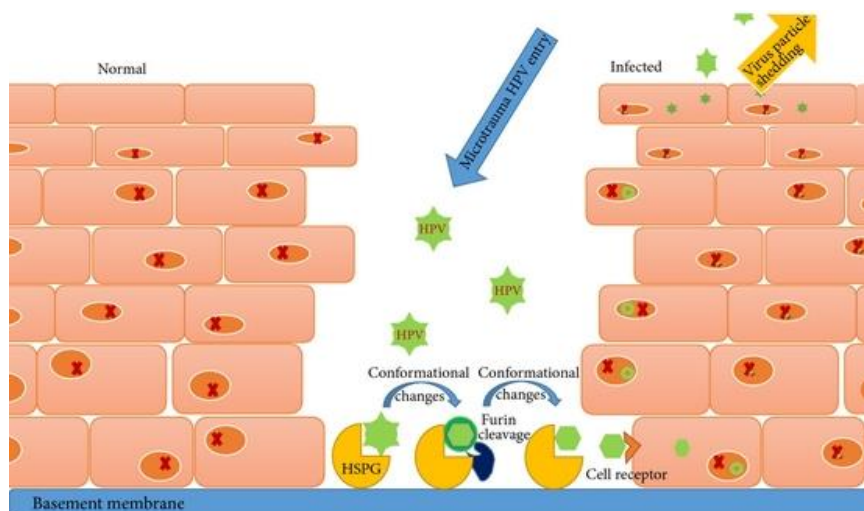
Rani promotor, *cis* pojačivači za transkripciju ranih gena, kao i mesto početka replikacije virusnog genoma, nalaze se u okviru URR. Kasni promotor (p670 kod HPV16), odgovoran za transkripciju kasnih gena, lociran je u E7 ORF- u (37,44).

1.2.5. Replikacija humanih papilomavirusa

Replikacija HPV- a započinje infekcijom bazalnih epitelih ćelija kože i mukoznih membrana. Smatra se da prisustvo mikrotrauma na koži i sluzokožama omogućava kontakt virusa i bazalnog sloja epitela. Replikativni ciklus virusa i ekspresija produkata virusnih gena precizno su regulisani migracijom inficiranih bazalnih ćelija prema površini epitela (37,38).

Adsorpcija virusa se odvija posredstvom ćelijskih receptora (Slika 6). Pretpostavlja se da ključnu ulogu u inicijalnom vezivanju humanih genotipova imaju heparan-sulfatni proteoglikani (primarni receptor) i α -integrinski receptori (mogući sekundarni receptor) smešteni na površini ćelija. Kapsidni protein virusa L1 se vezuje za heparan-sulfatni proteoglikan i dovodi do konformacijskih promena kapsida koje olakšavaju vezu kapsidnog proteina L2 sa ćelijskim receptorima. Penetracija virusa u

ćeliju domaćina se odvija relativno sporo i u slučaju genotipa HPV 16 pomoću klatrin-posredovane endocitoze. U kiseloj sredini kasnih endozoma i/ili lizozoma dolazi do dekapcidacije, nakon čega virusna DNK, oslobođena kapsida, biva unešena kroz nuklearnu poru u jedro inficirane ćelije (37,43,45).



Slika 6. Ulazak HPV-a u bazalne ćelije. Izvor: Deligeoroglou E i sar, 2013 (46)

Po ulasku virusnog genoma u jedro inficirane ćelije, ćelijski faktori se vezuju za rani promotor i aktiviraju transkripciju ranih gena virusa, koja je kontrolisana *cis* transkripcionim pojačivačima lociranim u LCR regionu. Transkripcija ranih gena je veoma složena i u zavisnosti od stepena diferencijacije inficirane ćelije vremenski i prostorno je regulisana interakcijom između različitih ćelijskih transkripcionih faktora i E2 virusnog proteina. Sa ranih HPV virusnih gena prepisuju se informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) koje su uglavnom policistronske i uključuju nekoliko ORFs. Ekspresija ranih virusnih gena je stoga i parcijalno regulisana alternativnim isecanjem policistronskih iRNK (38,47). Translacijom sa iRNK sintetišu se rani proteini virusa neophodni za replikaciju virusne DNK, regulaciju ekspresije ranih virusnih gena i transformaciju ćelija (38).

Replikacija virusne DNK se odvija u jedru inficirane epitelne ćelije, uz pomoć virusnih proteina E1 i E2. Virus za svoju replikaciju koristi ćelijske resurse: enzime, energiju i gradivne komponente. Protein E1 je direktno uključen u replikaciju, dok protein E2 ima pomoćnu ulogu u replikaciji i latenciji virusne DNK. Naime, E2 protein se vezuje za LCR i usmerava E1 protein ka početnom mestu repikacije virusne DNK. U direktnoj

interakciji, stvara se kompleks E1:E2, koji je prekursor većeg heksamernog E1 kompleksa. Po odvajanju E2 iz formiranog kompleksa, dolazi do distorzije virusne DNK sa njenim posledičnim rasplitanjem (38,48). Nakon rasplitanja virusne dvolančane DNK, proces replikacije se odvija na polukonzervativan način, tako što se jedan DNK lanac sintetiše u kontinuitetu, u 5'-3' pravcu, a drugi lanac preko kraćih Okazakijevih fragmenata, u 3'-5' pravcu (49).

Ciklus replikacije virusa ima tri faze: početna amplifikacija DNK u bazalnim ćelijama epitela uz učešće proteina E1 i E2; faza održavanja replikacije virusa, koja se javlja u proliferišućim inficiranim ćelijama; i faza amplifikacije genoma (vegetativna replikacija) praćena formiranjem novih virusa, koja se javlja kada ćelije završe svoju diferencijaciju. Faza održavanja može trajati mesecima ili godinama (35).

Tokom inicijalne infekcije bazalnih ćelija epitela, nivo replikacije virusnog genoma je veoma nizak (oko 50-200 kopija po ćeliji). O ovom procesu početne replikacije se jako malo zna (50). U ćelijama donjih delova epiderma i u fibroblastima kože, virusna DNK se uz pomoć E1 i E2 proteina nadalje održava ekstrahromozomalno, u vidu epizoma. U ovim ćelijama, virusna DNK se replikuje prosečno jedanput tokom S-faze ćelijskog ciklusa, uporedo sa ćelijskom DNK. Protein E2 igra vrlo značajnu ulogu u odvajanju novonastale virusne DNK od mitotičkih hromozoma. Tokom mitoze E2 protein je povezan sa virusnom DNK, ćelijskim centrozomima i sa deobnim vretenom i tako obezbeđuje preciznu podelu replikovanog virusnog genoma u ćerke ćelije. Ovakav način replikacije omogućava perzistenciju, odnosno latenciju virusa u inficiranim bazalnim epitelnim ćelijama (51).

U diferentovanim ćelijama epitela odigrava se tzv. vegetativna replikacija koja omogućava replikaciju virusnog genoma nezavisno od sinteze ćelijske DNK. U ovim ćelijama dolazi do intenzivne replikacije virusne DNK kada se sintetiše veliki broj kopija genoma (oko hiljadu kopija po ćeliji). Smatra se da je za vegetativnu replikaciju neophodno prisustvo svih produkata ranih virusnih gena. Mehanizmi koji dovode do prelaska virusne DNK iz epizoma u fazu vegetativne replikacije još nisu poznati. Jedna od pretpostavki je da promene u toku diferencijacije epitelih ćelija mogu stvoriti uslove za povećanje ekspresije ranih virusnih gena, pre svega E1 i E2 gena, čime se olakšava replikacija virusnog genoma (38,52).

Medutim, pokazano je da nemogućnost ekspresije kompletnog E1 gena uslovljava integraciju virusne DNK u ćelijski genom (53). U tom slučaju dolazi do nagomilavanja E6 i E7 proteina, koji dovode do inaktivacije tumor-supresorskih proteina, posle čega dolazi do nekontrolisanog rasta ćelija i stvaranja tumora. To se dešava retko, dugo godina posle infekcije, samo u pojedinih osoba i uz pomoć drugih kofaktora.

U terminalnim diferenciranim epitelnim ćelijama, omogućena je transkripcija kasnih gena, pa se sintetišu strukturni proteini: L1 i L2, koji se dalje spontano organizuju i formiraju ikozaedarni kapsid. U novoformirane kapside pakuju se virusne DNK i infektivni virioni napuštaju ćelije (38). Papiloma virusi nisu litički virusi, tako da je izlazak virusa iz jedra odnosno ćelija uslovljen migracijom inficiranih ćelija na površinu epitela. Pretpostavka je da E4 protein ima direktnu ulogu u izlasku virusa iz inficirane ćelije. Smatra se da vezivanje proteina E4 za keratinski citoskelet dovodi do kolapsa citoskeleta, čime se omogućava efikasan izlazak virusa u gornjim epitelnim slojevima (38,52).

1.2.6. Funkcija pojedinih gena/proteina humanih papilomavirusa

1.2.6.1. E1 gen/protein

Informacija za sintezu proteina E1 je sadržana u E1 genu, drugom najkonzerviranijem genu među različitim papilomavirusima (14). Ekspresija gena E1 dešava se odmah po uspostavljanju infekcije i tada se sintetiše rani protein E1 koji ima aktivnost DNK zavisne ATP-aze i DNK-helikaze, čime doprinosi inicijaciji replikacije virusnog genoma (48). Protein E1 ima tri funkcionalna domena: 1) N-terminalni, koji indukcijom fosforilacije ima regulatornu ulogu; 2) C-terminalni, deluje kao ATP-zavisna helikaza; 3) centralni domen, za koji se vezuje E2 protein, što rezultira stvaranjem kompleksa E1:E2, koji se dalje vezuje za mesto početka replikacije lokalizovanom u LCR regiji, pokreće se dvosmerno odmotavanje DNK i time se osigurava šablon za sintezu novih DNK virusa (14).

1.2.6.2. E2 gen/protein

Transkripcijom E2 ORF- a nastaju višestruki genski proizvodi putem alternativnog isecanja iRNK. Proteini nastali prepisivanjem gena E2 uključeni su u kontrolu virusne transkripcije, replikaciju virusne DNK i segregaciju virusnih genoma

(54,55). Ovi različiti tipovi E2 proteina predstavljaju glavne intragenomske regulatore (56). U lezijama koje sadrže HPV epizome, protein E2 direktno onemogućava ekspresiju ranih gena i tako reguliše broj kopija u inficiranoj ćeliji (57). Nadalje, E2 protein interreaguje sa E1 proteinom, favorizujući vezivanje E1 za mesto početka replikacije virusnog genoma, čime stimuliše replikaciju virusne DNK (58,59). Tokom mitoze ćelije, E2 je svojim karboksilnim krajem povezan sa virusnom DNK, ćelijskim centrozomima i mitotičkim vretenom, i tako doprinosi koordinaciji replikacije HPV DNK sa udvostručavanjem hromozoma ćelije domaćina omogućavajući da se virusni genomi distribuiraju u ćerke ćelije nakon citokineze. Ovo predstavlja važan uslov za održavanje DNK virusa u nediferenciranim bazalnim ćelijama (51,54,60). Veoma značajna uloga E2 proteina je i dozno zavisna sposobnost aktivacije ili represije promotora transkripcije ranih virusnih gena, čime se reguliše nivo E6 i E7 proteina (61). Kada je protein E2 prisutan u malim koncentracijama, deluje kao transkripcioni aktivator gena E6 i E7, a kada je nivo E2 visok, suprimira transkripciju ranih gena E6 i E7 (62). Integracija HPV genoma u hromozom ćelije domaćina obično remeti ekspresiju E2, jer virusni genom puca najčešće u nivou E1 i E2 gena što uzrokuje delimičnu ili potpunu deleciju tih gena. U nedostatku E2 proteina odvija se nesmetana transkripcija E6 i E7 gena, a ovaj događaj može pogodovati transformaciji ćelija (63). U kasnim fazama životnog ciklusa virusa E2 ne utiče na transkripciju, već su njegove funkcije usmerene prema amplifikaciji virusne DNK. Interakcija E2 proteina sa malim virusnim strukturnim proteinom L2 olakšava proizvodnju novih virusnih partikula (64).

1.2.6.3. E4 gen/protein

Iako E4 gen pripada ranim genima, ekspresija ovog gena je u bazalnim ćelijama epitela izuzetno niska (38). Protein E4 je prisutan isključivo u diferenciranim ćelijama inficiranog epitela i njegova uloga se ogleda u pružanju podrške virusnoj replikaciji, regulaciji kasne genske ekspresije i kontroli virusnog sazrevanja (4,65). Smatra se da se E4 protein vezuje za keratinski citoskelet uzrokujući njegov kolaps i na taj način omogućava efikasan izlazak virusa (38,65).

1.2.6.4. E5 gen/protein

Produkt E5 gena, E5 protein je mali hidrofobni transmembranski protein lokalizovan u endoplazmatskom retikulumu i Goldžijevom aparatu, ali povremeno se nalazi i u ćelijskoj membrani keratinocita (66,67). Iako uloga E5 proteina još uvek nije precizno definisana, istraživanja ukazuju da je njegova primarna aktivnost u diferenciranim ćelijama suprabazalnog sloja, gde ispoljava fuzioni i transformišući potencijal u VR-HPV infekcijama (14,43).

Onkoprotein E5 ometa višestruke signalne puteve kako bi održao proliferativno stanje i olakšao replikaciju i perzistentnost virusa u inficiranim ćelijama. Različite *in vitro* studije su pokazale da E5 protein stimuliše ćelijski rast povećavajući ekspresiju receptora epidermalnog faktora rasta (*engl.* epithelial growth factor - EGF) i inhibira ekspresiju glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I (*engl.* major histocompatibility complex class I – MHC I) (43,66). Takođe je zabeleženo da VR-HPV E5 protein indukuje fuziju ćelija, pri čemu nastaju aneuploidne i tetraploidne ćelije koje su hromozomski nestabilne. Ovi događaji prethode i favorizuju integraciju HPV genoma u ćelijski genom, što dalje dovodi do pojačane ekspresije E6 i E7 gena koja doprinosi malignoj progresiji HPV lezija (68).

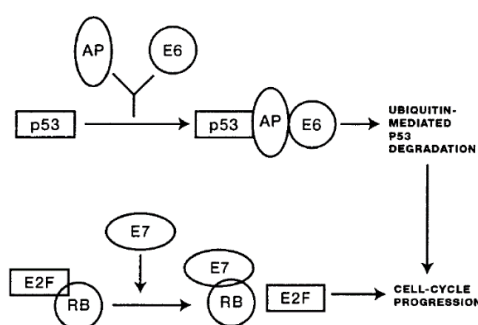
Čini se da ćelijska fuzija i deregulacija ćelijskog ciklusa, izazvane E5 proteinom, imaju važnu ulogu u transformaciji inficiranih ćelija i mogu biti kritični događaji u ranoj fazi razvoja karcinoma grlića materice (69). S obzirom da u malignim ćelijama nije potvrđeno prisustvo E5 proteina, pretpostavlja se da E5 protein ima ulogu u inicijaciji procesa karcinogeneze, ali ne i u samoj karcinogenezi (38).

1.2.6.5. E6 gen/protein

Produkt E6 gena je E6 protein, veoma značajan onkoprotein VR-HPV genotipova. E6 onkoprotein na više načina indukuje ćelijsku transformaciju, ali najvažnija je njegova interakcija sa ćelijskim tumor-supresorskim proteinom (antionkogenom) p53 (Slika 7). Protein E6 stvara kompleks sa proteinom p53 i posrednik je njegove razgradnje. Mehanizam uključuje prvobitno vezivanje E6 za ćelijsku ubikvitin ligazu - E6AP (*engl.* E6 - associated protein, E6AP), koja se na taj način aktivira, a nastali kompleks se potom vezuje za p53 i inicira ubikvitinaciju i proteozomalnu degradaciju p53. Još jedan važan

efekat E6 proteina, nezavisan od E6AP, je inhibicija transkripcije gena koji kodira p53. Uloga ćelijskog proteina p53 je da kontroliše ćelijski rast i deobu ćelije. Procesi stresni za ćeliju, kao što je oštećenje ćelijske DNK, dovode do povećanja nivoa p53 u ćeliji, što ima za posledicu sprečavanje ulaska ćelije u S fazu deobnog ciklusa i omogućavanje predaha u G1 fazi sve dok se ne poprave oštećenja na ćelijskoj DNK. Međutim, ako je oštećenje veliko, odnosno nepopravljivo, p53 indukuje apoptozu (programiranu ćelijsku smrt). U suprotnom, nizak nivo p53 čini ćeliju neosetljivom na DNK oštećenja i omogućava takvim ćelijama izbegavanje ćelijske smrti i nastavak ćelijske deobe (70,71). Gubitak p53, nastao usled dejstva E6 proteina, rezultuje i abnormalnim brojem centromera i sledstveno nastankom hromozomske nestabilnosti, što se uočava u ranim fazama kancerogeneze (70,72).

Protein E6 svoj onkogeni potencijal ispoljava vezivanjem i za brojne druge ćelijske proteine. Među njima su i proteini sa PDZ domenom za koje se smatra da su uključeni u regulaciju ćelijskog rasta i međućelijskog povezivanja. Vezivanjem za porodicu PDZ proteina, E6 protein dovodi do njihove degradacije, čime doprinosi stvaranju metastaza (70,73). Ključna funkcija E6 onkoproteina u razvoju prekanceroznih lezija visokog stepena i dalju progresiju u karcinom je njegova sposobnost da aktivira reverznu transkriptazu telomeraze i telomerazu, enzime neophodne za održavanje dužine telomeraza, što dodatno omogućava zaraženim keratinocitima da se neprestano dele, uz odsustvo apoptoze (70,72).



Slika 7. Interakcija HPV proteina E6 i E7 sa ćelijskim antionkogenima p53 i pRb. Izvor: Seo YS i sar, 1993 (56)

1.2.6.6. E7 gen/protein

Produkt E7 gena je E7 protein, takođe veoma značajan onkoprotein VR-HPV genotipova. Onkoprotein E7 interreaguje sa ćelijskim antionkogenom proteinom retinoblastoma (pRb) (Slika 7) i njemu srodnim proteinima, p107 i p130, inicirajući njihovu proteozomalnu degradaciju (71,74). Ovi ćelijski proteini su glavni regulatori ćelijskog ciklusa u diferenciranom epitelu. U toku ćelijskog ciklusa, pRb je regulisan fosforilacijom ciklin-zavisnih kinaza, tako da je u G1 fazi ciklusa hipofosforilisan, a u toku S, G2 i M faze fosforilisan. Hipofosforilisan pRB deluje kao represor ćelijskog transkripcionog faktora E2F, čija je ključna uloga aktivacija gena potrebnih za sintezu DNK i stimulacija ulaska ćelije u S fazu deobnog ciklusa (DNK sintezu). Na kraju G1 faze ćelijskog ciklusa, kada su ispunjeni svi fiziološki uslovi za ulazak ćelije u S-fazu, ciklin-zavisne kinaze fosforilišu pRb i tako ga inaktiviraju. Kada se E2F odvoji od pRb, aktivira replikaciju ćelijske DNK, a time i deobu ćelije. Vezivanje virusnog E7 proteina za pRb ima isti efekat kao i fosforilacija pRb, ali za razliku od proliferacije koja se javlja u fiziološkim uslovima, u uslovima VR-HPV infekcije efekat je nekontrolisan i pojačan, što stvara mogućnost pojave maligne transformacije (52,71,74).

U ćelijama sa eksprimiranim E7 genom, uočeno je i prisustvo DNK fokusa reparacije, što ukazuje na to da E7 protein dovodi do fragmentacije DNK molekula, a takođe i do sprečavanja njegove popravke. Smatra se da se na taj način olakšava integracija HPV genoma u genom domaćina. E7 utiče na odvajanje DNK fragmenata iz cirkularnog genoma virusa i omogućava njihovu integraciju u hromozom domaćina preko endogenih mehanizama za popravku DNK dvočlanih prekida. Ukoliko se URR HPV- a integriše u hromozom domaćina, sa ovog mesta se nastavlja replikacija virusa i ona traje sve dok se u ćeliji eksprimiraju E1 i E2 geni (55).

Postoje jaki dokazi da E7 može uzrokovati greške u duplikaciji centrozoma, nezavisno od E6 proteina, što dovodi do abnormalnosti centrozoma i genomske nestabilnosti. Eksperimenti pokazuju da E6 i E7 onkoproteini mogu kooperativno indukovati promene vezane za centrozom, što može biti rani događaj u tumorogenezi (72).

1.2.6.7. L1 gen/protein

Gen L1 je najočuvaniji gen među papilomavirusima (75,76) i na osnovu poređenja sekvenci L1 ORF- a izvršena je klasifikacija porodice *Papillomaviridae* (76,77). Gen L1 nosi informaciju za sintezu strukturnog proteina L1 (78), koji ima sposobnost da se samoorganizuje u pentamerne strukture, a one se zatim povezuju i grade kapsid papilomavirusa (79). Veliki kapsidni protein L1 sadrži glavnu determinantu potrebnu za početno vezivanje virusnih čestica za receptore na površini ćelije i stoga ima važnu ulogu u HPV infekciji (64). Visoko je imunogen i ima konformacijske epitope koji indukuju proizvodnju neutrališućih tipski specifičnih antitela (80), što ga čini metom profilaktičkih vakcina (81,82). S obzirom da je protein L1 prisutan u najdiferenciranijim slojevima epitela (83), njegova imunodetekcija se smatra glavnim dokazom produktivne HPV infekcije (84–86).

1.2.6.8. L2 gen/protein

Produkt L2 gena je L2 protein, koji predstavlja manji strukturni protein kapsida (38). Protein L2 je smešten na unutrašnjoj površini, ispod pentamera L1, u promenljivom broju kopija po svakoj kapsidi (83). Osim strukturne uloge, L2 protein doprinosi vezivanju viriona za ćelijski receptor, pogodujući njegovom preuzimanju, transportu i isporuci virusne DNK u jedro inficirane ćelije. Osim toga, L2 pomaže u pakovanju virusne DNK u kapside i zbog prisustva uobičajenog epitopa za neutralizaciju u L2 proteinima mnogih papiloma virusa može biti od ključnog značaja za stvaranje imuniteta na različite HPV tipove (64).

1.2.7. Životni ciklus humanih papilomavirusa

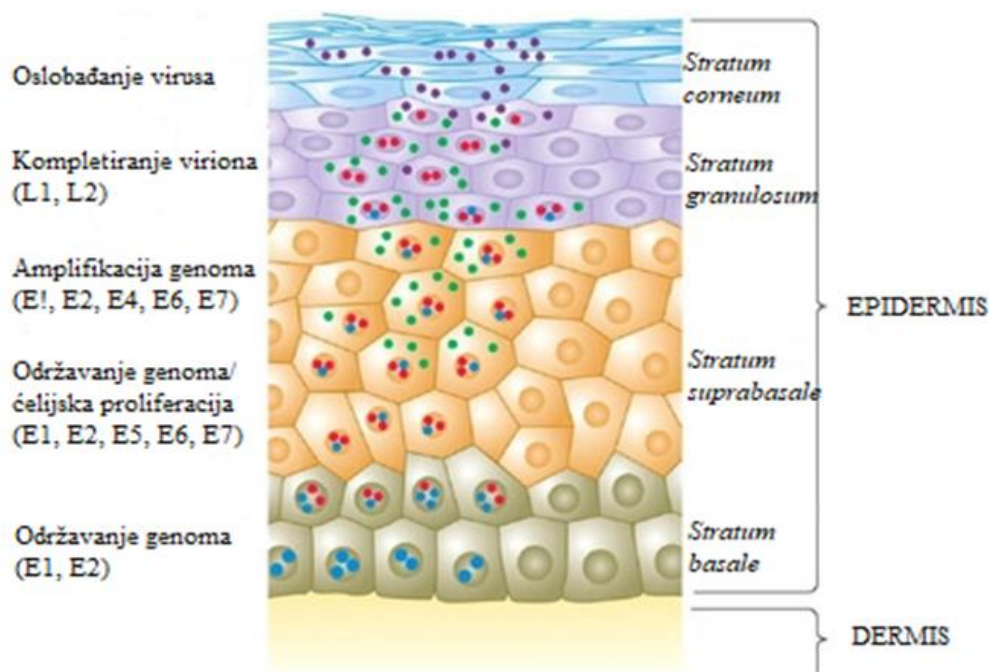
HPV su epitelotropni virusi čiji je životni ciklus vremenski i prostorno određen i zavisi od stupnja diferencijacije inficiranih epitelnih ćelija domaćina, keratinocita, kao i od prisutnosti ili odsutnosti određenih virusnih proteina (64,87).

Epitel kože i sluzokože je karakterističan po trajnom gubitku diferenciranih, zrelih ćelija i obnavljanju novim ćelijama iz bazalnog sloja. Da bi izbegao eliminaciju sa mrtvim ćelijama, HPV se prilagodio dinamici epitelnih ćelija inficirajući bazalne ćelije. Infekcija se najčešće dešava na mestima mikrotraume epitela (20,88). U grliću materice je

cervikalna transformišuća zona (TZ), lokalizovana na mestu prelaska pločasto-slojevitog (skvamoznog) epitela ektocerviksa u cilindričan epitel endocerviksa (64), najpogodnija meta za HPV infekciju, jer bazalne ćelije u njoj zadržavaju sposobnost diferencijacije i raspoređene su u manjem broju slojeva nego na drugim lokacijama (89). Bazalni sloj epitela grlića materice građen je od dva tipa ćelija. Prvi tip bazalnih ćelija su tranzitorne amplifikirajuće ćelije (*engl.* transit amplifying – TA), koje imaju sposobnost deobe i terminalne diferencijacije. TA ćelije predstavljaju i većinu ćelija suprabazalnih slojeva. Drugi tip bazalnih ćelija čine matične ćelije koje imaju neograničeni potencijal deobe, ali proliferacija se dešava veoma retko. Matične ćelije su rezervne ćelije koje omogućavaju dugoročno održavanje tkiva nadoknadom TA ćelija. Deobom matične ćelije nastaju dve ćerke ćelije, pri čemu jedna ćerka ćelija postaje TA ćelija, dok druga ostaje matična. Za sada je nejasno da li metu HPV infekcije čini jedan ili oba tipa ćelija (43). Smatra se da je infekcija matičnih ćelija pogodna za održavanje infekcije i dovodi do dugotrajnih (perzistentnih) infekcija, dok infekcija TA ćelija dovodi do kratkotrajnih infekcija, nakon čega sledi izlečenje (43,90,91). U koži matičnih ćelija ima u izobilju unutar folikula dlake, pa stoga folikuli dlake mogu predstavljati važno ulazno mesto kožnih HPV tipova (92).

Životni ciklus HPV- a započinje inicijalnom infekcijom bazalnih ćelija epitela kože i mukoznih membrana (Slika 8). Nakon adsorpcije virusa za receptore na površini bazalnih ćelija, dolazi do penetracije i dekapidacije viriona, a virusni genom biva transportovan u jedro kroz nuklearnu poru. Smatra se da HPV DNK dospeva u jedro tokom mitoze ćelije, 24h nakon početnog vezivanja virusa. Virusna DNK se dalje replikuje uporedo sa ćelijskom DNK, koristeći replikacione mehanizme ćelije domaćina. Za vreme boravka humanih papilomavirusa u bazalnom sloju (*stratum basale*), sinteza ranih virusnih proteina (E6, E7, E1 i E2) je minimalna, a HPV genom je smešten ekstrahromozomalno, u vidu epizoma, u malom broju kopija po ćeliji (Slika 6). Smatra se da su proteini E1 i E2 potrebni za održavanje virusnog genoma u epizomalnom obliku i njegovu segregaciju, a uloga i značaj E6 i E7 još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. U normalnim fiziološkim uslovima, neinficirane epitelne ćelije, nakon deobe, napuštaju bazalni sloj i migriraju u srednju (*stratum spinosum*) i površinsku epitelnu zonu (*stratum granulosum*), diferenciraju se i postepeno gube svoja jedra. Za razliku od njih, kod HPV inficiranih ćelija, E6 i E7 virusni proteini, čija ekspresija je negativnom povratnom spregom regulisana nivoom E2 proteina, menjaju ćelijsko okruženje sa ciljem da

pogoduje daljoj replikaciji virusa. Proteini E6 i E7, a delimično i protein E5, podstiču ulazak ćelija u S fazu ciklusa i time indukuju deobu ćelije i sintezu ćelijske i virusne DNK, povećavajući tako broj inficiranih ćelija. Pokazano je da E6 i E7 proteini imaju ulogu i u sprečavanju apoptoze, do koje bi sigurno došlo, zbog ove neadekvatne DNK sinteze. Ekspresija E1, E2, E4 i E5 gena na niskom nivou obezbeđuje održavanje virusnog genoma u ćelijama suprabazalnog sloja (*stratum spinosum*). Nadalje, visok nivo proteina E2 deluje represivno na ekspresiju gena E6 i E7, što zaustavlja proliferaciju epitelnih ćelija i omogućava njihovu dalju diferencijaciju. Budući da je ekspresija E6 i E7 suprimirana, E1 i E2 se vežu za virusnu DNK u području LCR i pobuđuju replikacijske mehanizme u ćeliji domaćina, koji replikuju HPV genom nezavisno od ćelijske deobe (nekoliko hiljada kopija po ćeliji). Kada zaraženi keratinociti stignu u gornje slojeve epitela (*stratum granulosum*), u njima su stvoreni uslovi za ekspresiju kasnih gena virusa i sinteze kapsidnih proteina L1 i L2. Kapsidni proteini akumuliraju se u jedru i sklapaju se virioni. Životni ciklus virusa biva kompletiran i nove virusne čestice dospevaju do površine epitela (*stratum corneum*). Uz pomoć proteina E4, koji deluje na citoskelet, virusne partikule se oslobađaju iz deskvamiranih ćelija, uz odsustvo lize i nekroze (30,52,73).



Slika 8. Životni ciklus HPV-a. Izvor: modifikovano iz Hampson JN i sar, 2020 (41)

Kompletiranje životnog ciklusa i oslobađanja virusa nakon infekcije dešava se posle ~3 nedelje, što se poklapa s vremenom potrebnim da bazalni keratinociti prođu potpunu diferencijaciju, deskvamaciju i prirodnu ćelijsku smrt (93).

1.3. Kancerogeneza indukovana humanim papilomavirusima

Perzistentna cervikalna infekcija VR-HPV tipovima je prekurzor nastanka CC, a rani virusni proteini E5, E6 i E7 su identifikovani kao onkoproteini (94).

Smatra se da je ključni događaj u procesu maligne transformacije ćelije gubitak kontrole nad ekspresijom ranih virusnih gena E6 i E7, čiju ekspresiju reguliše E2 gen, odnosno E2 protein, negativnom povratnom spregom. Smanjene ekspresije E2 gena za posledicu ima povećanje sinteze proteina E6 i E7 koji ometajući višestruke signalne puteve, dovode do potpunog gubitka kontrole proliferacije i diferencijacije inficiranih ćelija suprabazalnog sloja, čime olakšavaju replikaciju i perzistentnost virusnog genoma. Nekontrolisanoj ćelijskoj proliferaciji, odnosno deobi ćelije, pre svega doprinosi inaktivacija ćelijskih antionkogenih i supresora ćelijske deobe, p53 i pRb, usled njihovog vezivanja za rane proteine E6 i E7 (95). Protein E5 pokazuje transformišući potencijal nezavisno od E6 i E7 proteina i može dodatno doprineti malignoj progresiji i to u inicijalnoj fazi (38,70). Akumulirane citogenetske promene vremenom vode ka genomskoj nestabilnosti, što rezultira potpunom transformacijom, odnosno imortalizacijom inficirane ćelije (27,52,62,73). Kako u ćelijama TZ virus ne kompletira svoj životni ciklus, već dovodi do abortivne HPV infekcije što pogoduje daljoj progresiji ka karcinomu, TZ je najosetljivije mesto cervikalnog epitela za razvoj cervikalnog karcinoma (52).

Deregulacija ekspresije E6 i E7 gena može nastati na različite načine, ali se veruje da hromozomska integracija VR-HPV genoma predstavlja značajan događaj u patogenezi raka grlića materice povezanog s progresijom prekanceroznih lezija do IC. Iako su uočena mesta gde je verovatno da će doći do integracije, integracija je iznenadni događaj, kome prethodi pucanje cirkularnog virusnog genoma u nivou E2 gena, što rezultira njegovom inaktivacijom (96). Istraživanja ukazuju da tumorske ćelije grlića materice mogu sadržati jednu ili više integrisanih kopija HPV DNK. Međutim, integracija HPV genoma dešava se i u ćelijama koje zadržavaju epizomalnu formu, gde E2 protein, kodiran sa

epizomalnog genoma, kontroliše transkripciju integrisanog genoma. Prevazilaženje ove inhibicije transkripcije je ključni dodatni korak u daljoj progresiji takve cervikalne lezije. Shodno tome, detektovana integracija genoma virusa ne ukazuje nužno na aktivnu transkripciju integrisanog dela virusne DNK (70,94). Treba istaći i da se integracija ne dešava uvek, jer tumorske ćelije nekih ICC sadrže neintegrisan VR-HPV genom, u vidu epizoma. Stoga je moguće da je integracija virusnog genoma uslovljena HPV genotipom. Prema istraživanjima, kod ~50-80% HPV 16 pozitivnih slučajeva i kod većine HPV 18 i HPV 45 pozitivnih slučajeva CC virusni genom je integrisan. Za razliku od HPV tipova 16, 18 i 45, stepen genomske integracije je nizak kod HPV tipova 31 i 33 (94,97).

Osim integracijom, deregulacija virusne ekspresije može biti i hormonski uslovljena, jer hormoni povećavaju proliferativni kapacitet inficiranih ćelija. Zanimljivo je da LCR region HPV 16 sadrži elemente koji se mogu stimulisati estrogenom i postoje značajni dokazi o saradnji estrogena i HPV16 u razvoju raka grlića materice. Nekoliko studija je objavilo da je LCR region različito metilovan u zavisnosti od gradusa displastične lezije, što može uticati i na povećanu ekspresiju virusnih onkogeno. To može biti jedan od razloga pojave cervikalnih karcinoma koji sadrže tumorske ćelije sa genomom u vidu epizoma (96).

Iako se danas zna da perzistentna HPV infekcija, koja traje godinama, dovodi do postepene progresije ka ICC, treba naglasiti da pojava karcinoma nije uvek neizbežan ishod (32). Različiti ishodi HPV infekcije, kao i dugi period između inicijalne infekcije i razvoja karcinoma, ukazuju na postojanje i drugih faktora koji, pored HPV infekcije, imaju ulogu u razvoju karcinoma. Mehanizmi delovanja kofaktora u podsticanju razvoja karcinoma još nisu jasno definisani, ali se pretpostavlja da mogu povećavati rizik za sticanje HPV infekcije, poremetiti lokalni i/ili sistemski imunitet, kao i da mogu da podstaknu rast i proliferaciju HPV inficiranih ćelija, odnosno indukuju mutacije u inficiranom tkivu (13,28,98).

Danas je jasno da je cervikalna kancerogeneza kompleksna i da perzistentna VR-HPV infekcija predstavlja samo neophodni, ali ne i dovoljan uslov višestepenog procesa tumorogeneze. Činjenica da se pojava malignih promena dešava retko i nakon dugog vremenskog perioda od uspostavljanja HPV infekcije ukazuje da i drugi faktori mogu

uticati na tok i ishod HPV infekcije. Međutim, smatra se da najvažniju ulogu u progresiji HPV lezija ima imunski status domaćina (19,31,72).

1.4. Patogeneza infekcije humanim papilomavirusima

HPV su relativno otporni virusi i prenose se direktnim kontaktom sa inficiranom osobom, preko kože i seksualnim putem. Horizontalni prenos je najčešći, ali je moguć i vertikalni prenos, sa majke na dete (prilikom porođaja i veoma retko tokom trudnoće). Najznačajniji put prenošenja HPV infekcije je seksualni kontakt, tako da HPV infekcije pripadaju grupi seksualno prenosivih oboljenja (*engl.* sexually transmitted diseases – STD). Indirektan prenos virusa, preko kontaminiranih površina ili predmeta, je moguć i povezuje se sa transmisijom kožnih HPV tipova (13,28).

HPV infekcije su uvek lokalne, jer inicijalno počinju i završavaju se na nivou epitela kože ili sluzokože. Prema kliničkom toku, HPV infekcije mogu biti akutne i perzistentne (latentne, hronične) (73). U najvećem broju slučajeva (80%), HPV infekcije su akutne i asimptomatske i završavaju se kompletnom eliminacijom virusa iz organizma tokom 12-18 meseci, odnosno kod 90% inficiranih osoba tokom dve godine. U manjem broju slučajeva (10-20%), dolazi do uspostavljanja perzistentne infekcije, kada se virusni genom održava u zaraženim ćelijama kao epizom. Brojne studije su pokazale da dugotrajna HPV perzistencija i integracija DNK virusa u genom inficirane ćelije, dovode do postepene progresije ka ICC, mada razvoj karcinoma nije uvek neizbežan ishod perzistentne HPV infekcije (20,70,73,88,89). Prisustvo HPV DNK je potvrđeno u tkivu više od 99,7% ICC (5,7). Osim ICC, infekcije VR-HPV tipovima predstavljaju faktor rizika za razvoj i drugih humanih karcinoma mukoznih površina (penisa, vulve, vagine, anusa, usne duplje) (94,98).

Većinu ICC predstavljaju skvamozni cervikalni karcinomi, a u manjem broju adenokarcinomi i adenoskvamozni karcinomi. Cervikalne displazije (prekancerozne lezije), koje prethode ICC, mogu se klasifikovati kao cervikalne intraepitelne neoplazije (*engl.* cervical intra-epithelial neoplasia - CIN) ili kao skvamozne intraepitelne lezije (*engl.* squamous intra-epithelial lesions - SIL) (Slika 7). Cervikalne intraepitelne neoplazije mogu biti: blage (CIN1), umerene (CIN2) i ozbiljne (CIN3), a skvamozne intraepitelne lezije mogu biti niskog stepena (*engl.* low-grade - L), LSIL i visokog stepena

(engl. high-grade - H), HSIL. Displaziju gradusa CIN1, kojoj odgovaraju LSIL promene, karakterišu produktivne HPV infekcije sa niskim rizikom od progresije u malignitet. Nasuprot tome, displazija gradusa CIN2/3, kojoj odgovaraju HSIL promene, obuhvata abortivne HPV virusne infekcije kod kojih postoji deregulacija ekspresije HPV ranih gena u bazalnim epitelnim ćelijama i predstavlja visok rizik za razvoj invazivne bolesti (Slika 1). Primećeno je da oko 75% do 90% blagih displazija može spontano da se povuče. Sposobnost regresije imaju i displazije gradusa CIN2/3, odnosno HSIL (85%). Maligna transformacija je retka konsekvencija infekcija VR-HPV tipovima i manje od 10% (~3,3%) inficiranih žena sa displazijom gradusa HSIL razvije ICC (13,31,94).

1.5. Faktori rizika

Primarni put prenošenja HPV infekcije je seksualni kontakt (13,28), a rizično seksualno ponašanje, koje podrazumeva rano stupanje u seksualne odnose i veći broj seksualnih partnera tokom života, je najvažniji faktor rizika za genitalnu HPV infekciju (99).

U literaturi se navodi da su žene koje stupaju rano u seksualne odnose (pre 16. godine) u većem riziku od sticanja cervikalne HPV infekcije nego starije žene (100,101). Grlić materice u pubertetu prolazi kroz ćelijske promene u TZ koje su poznate kao ektopija (102). Tokom ektopije ćelije grlića materice su podložnije HPV infekciji i sklonije njenoj perzistenciji, koja može dovesti do nastanka cervikalnih lezija (100).

Rizik raste i sa povećanjem broja seksualnih partnera tokom života (103). Veći broj seksualnih partnera olakšava sticanje HPV infekcije, ali i drugih STD, koje dodatno doprinose razvoju cervikalnih promena kod HPV pozitivnih žena (104).

Druge seksualno prenosive bolesti dovode do hronične upale i oštećenja epitelne barijere, deluju imunomodulatorno i/ili modifikuju HPV replikaciju i transkripciju, čime povećavaju osetljivost grlića materice na HPV infekciju, olakšavaju HPV perzistenciju i razvoj cervikalnih lezija (105). U literaturi se navode bakterijske i virusne (*Chlamydia trachomatis*, mikoplazme, HSV₂, HIV) infekcije kao značajni kofaktori koji mogu imati uticaj na prirodni tok HPV infekcije (106–110).

Upotreba kondoma pri seksualnom odnosu pruža zaštitu od mnogih STD, ali delimičnu zaštitu od sticanja HPV infekcije. Autori sugerišu da pravilna i stalna upotreba kondoma smanjuje rizik od sticanja HPV infekcije, ali i povećava verovatnoću eliminacije već postojeće HPV infekcije (111,112).

Epidemiološki podaci ukazuju na povezanost između hormonskog statusa i rizika od nastanka premalignih i malignih lezija na grliću materice kod žena sa HPV infekcijom. Dugotrajna upotreba oralnih kontraceptiva, kao i povišen nivo steroidnih hormona tokom trudnoće (posebno progesterona), deluju imunosupresivno, podstiču ekspresiju HPV E6 gena i stimulišu proliferaciju ćelija u TZ, čime se povećava rizik od nastanka maligne transformacije (113–115).

U prisustvu HPV infekcije, pušenje je kofaktor razvoja cervikalnih premalignih i malignih lezija. Dim cigareta sadrži mutagene i kancerogene komponente koje mogu uticati na imunski sistem, omogućiti HPV infekciji da napreduje i indukovati cervikalnu kancerogenezu (10,116–118).

1.6. Imunitet kod infekcije humanim papilomavirusima

Imunski sistem domaćina ima ključnu ulogu u određivanju ishoda HPV infekcije. U većini slučajeva dolazi do eliminacije virusa posredstvom urođenog i stečenog imunog odgovora (93,119). S obzirom da su HPV infekcije lokalizovane u epitelu kože i sluzokože, glavne ćelije urođenog imuniteta koje detektuju upalu i pokreću specifični imunski odgovor su Langerhansove ćelije (LĆ) (dendritične ćelije u skvamoznom epitelu), ćelije prirodne ubice (engl. natural killer - NK) i keratinociti. Uloga NK ćelija je da prepoznaju i eliminišu epitelne ćelije koje nemaju eksprimirane MHC molekule I klase. Inficirani keratinociti luče proinflamatorne interferone (IFN) tipa I, IFN- α i IFN- β , koji imaju antivirusna, antiproliferativna, antiangiogena i imunostimulativna svojstva, čime deluju kao most između urođenog i stečenog imuniteta aktivirajući nezrele dendritične ćelije (DĆ). Antigen prezentujuće ćelije (DĆ, LĆ) preuzimaju, obrađuju i prezentuju HPV antigene naivnim T limfocitima. Aktivacija naivnih T limfocita prouzrokuje njihovu diferencijaciju u efektorske T limfocite: citotoksične CD8⁺ T limfocite, odgovorne za eliminaciju virusom inficiranih ćelija, i pomoćne CD4⁺ T

limfocite, koji dovode do stimulacije B limfocita, čijom aktivacijom se aktiviraju plazma ćelije i sintetišu antigen specifična neutrališuća antitela (73,119).

Smatra se da je T ćelijsko prepoznavanje HPV antigena ključno za potpunu eliminaciju HPV infekcije, a da neadekvatan T ćelijski odgovor je povezan s progresijom bolesti. Uloga humoralnog imuniteta nije najjasnija. Kod nekih osoba dolazi do serokonverzije nekoliko meseci ili godina nakon inicijalne infekcije, a stvorena antitela ne obezbeđuju oporavak. Međutim, neke osobe ostaju seronegativne i pored postojanja infekcije. Sa druge strane je dokazano da su neutrališuća antitela na HPV strukturne antigene veoma značajna i efikasna kod HPV negativnih osoba kao vid prevencije HPV infekcije i njenog širenja (73,93,96,119). Regresija lezije nije praćena apoptozom ili smrću ćelija, a studije na životinjskim modelima ukazuju na mogućnost da su u lezijama aktivno inficirane ćelije zamenjene s "naizgled normalnim ćelijama". Ove "normalne" ćelije i dalje mogu sadržati virusne genome, ali bez ekspresije virusnih gena, pri čemu se životni ciklus virusa "ponovo aktivira" naknadno nakon supresije imuniteta ili možda i nakon promena hormonalnog statusa domaćina (96).

U cilju svog opstanka, HPV je razvio brojne mehanizme izbegavanja imunog odgovora domaćina putem prirode životnog ciklusa virusa i interferirajući sa domaćinovim antivirusnim imunskim mehanizmima (urođenim i stečenim). Iako je u većini slučajeva imunski sistem sposoban da eliminiše HPV infekciju, kod malog broja inficiranih se uspostavlja perzistencija virusa sa rizikom razvoja karcinoma. Danas je poznato da do razvoja perzistencije dolazi ukoliko virus uspe da izbegne imunu detekciju dovoljno dugo, čime obezbeđuje održavanje u inficiranom epitelu i širenje na druge domaćine (73,119).

HPV infekcija je lokalna infekcija, koja nije praćena viremijom i sistemskim širenjem virusa, kao ni virusom indukovanom citolizom i nekrozom tkiva. Virusna produkcija se dešava u terminalno diferentovanim keratinocitima, ćelijama koje su predodređene na smrt. Na taj način virus izbegava humoralni imunski odgovor. Niskim nivoom sinteze virusnih proteina, HPV minimalno stimuliše urođeni i ćelijski imuni sistem. U inficiranim ćelijama bazalnog epitela eksprimiraju se samo rani geni i sintetišu rani virusni proteini, koji su uglavnom smešteni u jedru inficirane ćelije i na taj način zaštićeni od nadzora antigen-prezentujućih ćelija. Osim toga, u HPV lezijama je lučenje

proinflamatornih citokina, važnih za aktivaciju antigen-prezentujućih ćelija i njihovu migraciju, minimalno. S toga je imuni odgovor slab i spor (73).

Ustanovljeno je nekoliko mehanizama imunološke evazije za VR-HPV tipove. Onkoproteini, E6 i E7, odgovorni su za stvaranje antizapaljenskog mikrookruženja koje indukuje neadekvatan imunski odgovor. E6 protein moduliše urođeni imunski odgovor na virusnu infekciju tako što menja signalne puteve inficiranih ćelija i redukuje broj LĆ neophodnih za inicijaciju T ćelijskog odgovora. Smatra se da protein E6 dovodi do izmenjene ekspresije E-kadherina na površini ćelija bazalnog i suprabazalnog sloja, što ima za posledicu nedovoljnu migraciju LĆ na mesto infekcije i odsustvo prezentacije virusnih antigena. Dokazano je da protein E7 smanjuje stvaranje interferona α i β , što za posledicu ima redukovanje MHC molekula I klase. Takođe, E5 protein inhibira ekspresiju molekula MHC I molekula na ćelijskoj membrani i time kompromituje prikazivanje virusnih antigena na površini inficiranih epitelnih ćelija tokom produktivnog životnog ciklusa virusa. Smatra se da strategije neuspele prezentacije virusnih antigena i odsustvo upale favorizuju imunološku toleranciju. Da bi se razvio karcinom, virus mora izbeći imunološku detekciju tokom dužeg vremenskog perioda. Pacijenti s karcinomom grlića materice imaju smanjen ili nepostojeći odgovor T ćelija na antigene uzročnog HPV tipa, što sugerise da perzistentnost može biti povezana s neuspehom imunološkog odgovora ili nemogućnošću prepoznavanja virusnih antigena (73,96).

Precizan sled imunskih događaja kod HPV infekcije grlića materice još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali je jasno da zavisi od imunokompetentnosti organizma domaćina, ali i od osobina virusa. Bolje razumevanje odnosa humanih papilomavirusa i imunog sistema tokom perzistencije i regresije je važno za razvoj imunoterapijskih tretmana HPV inficiranih osoba (96). Navedeni podaci ukazuju da je T ćelijski odgovor značajan za regresiju HPV infekcije, dok je humoralni imunitet značajan za prevenciju i širenje HPV infekcije (73,96,119).

1.7. HPV vakcine

CC je jedan od glavnih globalnih zdravstvenih problema žena. Uzrokuje visoku stopu smrtnosti zbog svoje kasne dijagnoze i loše prognoze. S obzirom na značaj HPV infekcije u razvoju CC, ali i drugih invazivnih karcinoma anogenitalnog trakta, najveći

broj preventivnih mera je usmeren upravo ka prevenciji HPV infekcije, kao tipične seksualno prenosive infekcije. Danas je prevencija CC usmerena ka primarnoj prevenciji, odnosno HPV vakcinaciji, kao i prema sekundarnoj prevenciji, odnosno dijagnozi VR-HPV cervikalne infekcije kroz *screening* programe. Postoje dve grupe vakcina: profilaktičke (preventivne) i terapijske HPV vakcine (31,32).

1.7.1. Profilaktičke HPV vakcine

Profilaktičke HPV vakcine imaju za cilj da stimulišu snažan humoralni imuni odgovor praćen visokim titrom antitela u serumu i na sluznici grlića materice, kao i da obezbede stvaranje memorijskih B limfocita. Prisustvo neutrališućih antitela izazvanih vakcinom na mestu infekcije HPV-om ključno je za sprečavanje virusnih čestica da inficiraju TZ gde se obično razvija CC (93).

Profilaktičke vakcine se zasnivaju na primeni virusu-sličnih čestica (*engl.* viral-like particles - VLPs) izgrađenih od L1 proteina virusa, koje stimulišu humoralni imunski odgovor. Naime, pokazano je da L1 protein, dobijen genetskim inženjeringom, ima sposobnost sklapanja u virusu slične čestice, koje su morfološki i antigenski veoma slične infektivnom virusu. Pored toga, pokazano je i da VLPs prezentuju antigenske determinante virusa koje su visoko imunogene (32,119). Epidemiološki podaci upućuju na to da se HPV tipovi 16 i 18 smatraju najagresivnijim i najfrekventnijim izolatima opisanim kod CC širom sveta, pa su s toga danas dostupne vakcine upravo fokusirane i na ove genotipove.

Do danas su odobrene tri vrste profilaktičkih rekombinantnih vakcina (Cervarix, Gardasil i Gardasil9), a nekoliko kandidatskih vakcina je u naprednim fazama kliničkog ispitivanja. Cervarix je dvovalentna HPV (2vHPV) vakcina, proizvođača GSK (GlaxoSmithKline Biologicals SA), ciljana na HPV 16 i HPV 18, glavne VR-HPV tipove odgovorne za 70% cervikalnih karcinoma. Gardasil je četvorovalentna HPV (4vHPV) vakcina kompanije Merck (Merck & Co., Inc.), koja uz HPV 16 i HPV 18 cilja i na HPV 6 i HPV 11 (odgovorne za 90% genitalnih bradavica). Gardasil9 je devetovalentna HPV (9vHPV) vakcina Mercka, sa proširenim spektrom zaštite prethodne dve vakcine, tako što dodatno cilja i na VR-HPV tipove 31, 33, 45, 52 i 58, odgovorne za oko 18% invazivnih cervikalnih karcinoma. Gardasil, Cervarix i Gardasil9 su visoko efikasne

vakcine koje je 2006, 2009 i 2014. godine odobrila američka Agencija za hranu i lekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA) sa ciljem sprečavanja HPV infekcija i bolesti povezanih sa HPV infekcijom (31).

Profilaktičke vakcine su neinfektivne i neonkogene. U program vakcinacije mogu se uključiti devojčice i dečaci, odnosno žene i muškarci, od 9 do 50 godina starosti. Vakcina se daje intramuskularno, u 3 doze tokom 6 meseci (0, 2, 6). Dosadašnja ispitivanja sugerišu da se radi o visoko imunogenim vakcinama (titar antitela veći i do 100 puta u odnosu na prirodnu infekciju). Pored toga, pokazano je da je ukupna efikasnost vakcina veća od 95% u prevenciji nastanka infekcije, pojave kondiloma, uspostavljanja perzistentne infekcije i razvoja prekanceroznih lezija i karcinoma. Međutim, treba naglasiti da primena protektivnih HPV vakcina ne sme isključiti redovne ginekološke i citološke preglede, kao ni HPV testiranje (31,120,121).

1.7.2. Terapijske HPV vakcine

Početno nastajanje i kasnija progresija CC u potpunosti zavise od dva glavna HPV onkogeni, E6 i E7, koji se eksprimiraju konstitutivno dovodeći do tumorogeneze. Budući da su E6 i E7 biomarkeri ćelija CC i oni koji pokreću progresiju raka, pokazalo se da su terapijski pristupi usmereni na E6 i E7 virusne proteine visoko efikasni u uklanjanju malignih ćelija koje se abnormalno razmnožavaju. Postoje različiti načini terapije (vakcine, imunoterapija citotoksičnim T limfocitima, fitoterapija) bazirani na deregulaciji aktivnosti E6 i E7 proteina HPV inficiranih osoba, ali se smatra da bi vakcinacija mogla biti najbolja strategija. Terapijske vakcine se zasnivaju na indukciji T ćelijskog imunog odgovora i to prvenstveno CD8⁺ T citotoksičnog odgovora usmerenog protiv E6 ili E7 proteina. Stoga su moderna klinička istraživanja fokusirana na razvoj terapijskih vakcina za lečenje premalighnih lezija i CC, čak i u uznapredovalim malignim stadijumima. Do sada su dizajnirane peptidne, proteinske, vektorske i DNK HPV terapijske vakcine, koje sadrže E6 i/ili E7 gene odnosno E6 i/ili E7 proteine. Nekoliko takvih vakcina se istražuje i trenutno su u fazi kliničkog ispitivanja (faza I/II/III) ili su ona završena: terapijske vakcine za lečenje perzistentne HPV infekcije i LSIL, vakcine za lečenje HSIL i vakcine za lečenje od CC u uznapredovalom stadijumu bolesti (95).

Treću grupu HPV vakcina čine tzv. protektivno-terapijske vakcine, koje se zasnivaju na stimulaciji i humoralnog i celularnog imuniteta, a sadrže VLP čestice zajedno sa E6 odnosno E7 proteinima. Podaci o efikasnosti ovih vakcina još uvek nisu dostupni (122).

1.8. Virusološka laboratorijska dijagnostika HPV infekcije

HPV se ne mogu kultivisati u tkivnim kulturama, niti se mogu prenositi na laboratorijske životinje. Dokazivanje virusnih antigena je brz i jednostavan postupak, ali nema dijagnostički značaj. Testovi za dokazivanje specifičnih antitela nisu dovoljno osetljivi i specifični (27,49).

Metode izbora za detekciju infekcije HPV-om su metode molekularne dijagnostike. Uz potvrđan nalaz o HPV infekciji, važno je utvrditi genotip virusa, odnosno da li se radi o infekciji sa genotipom visokog ili niskog rizika (123). Poseban značaj imaju dijagnostički testovi dizajnirani za detekciju HPV genotipova 16 i 18 (49).

Testovi koji se koriste u HPV dijagnostici moraju biti visoke specifičnosti i osetljivosti. Trenutno, dve tehnike koje se najviše koriste za detekciju genitalnih HPV genotipova u kliničkim uzorcima su tehnike ciljne amplifikacije i tehnike signalne amplifikacije (123). Uzorci za dijagnostiku cervikalnih HPV infekcija su cervikalni brisevi i biopsati cervikalnog tkiva.

Tehnike ciljne amplifikacije se zasnivaju na cikličnom umnožavanju željenog segmenta DNK, koji se odvija po principima DNK replikacije. U dijagnostici HPV infekcije se najčešće koristi tehnika lančanog umnožavanja, odnosno PCR reakcija (*engl.* Polymerase Chain Reaction - PCR) (74).

PCR metoda je zasnovana na umnožavanju ciljnog dela DNK molekula pomoću enzima DNK polimeraze. Ciljni deo DNK se određuje primenom graničnika ili prajmera, koji su komplementarni krajevima budućeg umnoženog segmenta DNK i na taj način se osigurava specifičnost testa. Osetljivost testa se postiže selektivnim umnožavanjem željenog segmenta genoma serijom ciklusa polimerizacije (prosečno 30-40 ciklusa), koji daju eksponencijalno povećanje broja kopija HPV nukleotidne sekvence prisutne u uzorku. Za potrebe HPV molekularne dijagnostike se koriste standardizovani prajmeri,

koji kao ciljni segment za umnožavanje DNK imaju L1, E1, E6 i E7 regije HPV-a. Da bi se u jednom testu mogli teoretski umnožiti gotovo svi HPV genotipovi koriste se opšti (konsenzus) prajmeri, koji odgovaraju konzerviranom delu HPV genoma u L1 ili E1 regiji. Genotipizacija dobijenog HPV-PCR produkta vrši se primenom tip specifičnih prajmera koji odgovaraju E6 i E7 delu HPV genoma (124).

Danas je u rutinskoj virusološkoj dijagnostici najraširenija metoda PCR reakcije u realnom vremenu (*engl.* Real-Time PCR), kod koje se umnožavanje i detektovanje DNK odvijaju istovremeno (74). Navedena metoda se zasniva na klasičnoj PCR reakciji uz primenu fluorescentne boje koja se vezuje za DNK (*SYBR green* metoda) ili primenu specifičnih proba za HPV DNK koje su obeležene fluorescentnom bojom (*Taqman* metoda). Intenzitet fluorescencije se meri u svakom trenutku PCR reakcije (125). Jačina fluorescencije je direktno proporcionalna količini umnožene ciljne sekvence DNK. Za potrebe laboratorijske dijagnostike HPV infekcije na tržištu su dostupni komercijalni testovi dizajnirani za visoko-rizične genotipove, među kojima su i HPV16 i 18 (20).

Tehnike signalne amplifikacije su metode kod kojih se, nakon hibridizacije, umesto ciljane DNK, umnožava samo signal koji se nalazi na probi (74). Za potrebe rutinske dijagnostike HPV infekcije grlića materice, FDA je odobrila licencu za metode koje koriste tehniku hvatanja hibrida (*engl.* Hybrid Capture - HC) i patentirane *Invader* hemijske (*engl.* proprietary *Invader* chemistry) tehnologije, koje istovremeno imaju standardizovani test i pribor za uzorkovanje cervikalnih briseva (citočetkice i epruvete sa transportnim medijumom) (20).

Smatra se da će uspešna HPV vakcinacija, uporedo sa HPV testiranjem, značajno doprineti smanjenju morbiditeta i mortaliteta povezanih sa HPV infekcijom.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Planom istraživanja precizirani su sledeći ciljevi i hipoteze:

Ciljevi:

1. Utvrditi prevalencu cervikalne HPV infekcije
2. Utvrditi učestalost cervikalne VR-HPV infekcije kod žena sa skvamoznim intraepitelnim lezijama grlića materice
3. Utvrditi značaj multiple cervikalne VR-HPV infekcije u nastanku skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice
4. Utvrditi koji su VR-HPV genotipovi dominantni u multiplim, odnosno monotipskim HPV infekcijama grlića materice
5. Ispitati postojanje faktora rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije
6. Ispitati postojanje faktora rizika za nastanak skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice

Hipoteze:

1. Postoji povezanost cervikalne VR-HPV infekcije sa nastankom skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice
2. Postoji povezanost između multiple cervikalne VR-HPV infekcije i nastanka skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice
3. Postoje određeni faktori rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije
4. Postoje određeni faktori rizika za razvoj skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je realizovano u okviru Nacionalnog naučno-istraživačkog projekta “Dijagnostički potencijal prekancerskih lezija grlića materice žena u Crnoj Gori”, u periodu od 2012. godine do 2018. godine, a sprovedeno je u:

- ginekološkoj ambulanti Kliničkog centra Crne Gore (KCCG) u Podgorici,
- Institutu za patologiju KCCG i
- Odjeljenju za molekularnu dijagnostiku Instituta za javno zdravlje Crne Gore (IJZCG) u Podgorici.

3.1. Materijal

3.1.1. Ispitanice

Studija je obuhvatila 200 žena, starosti od 19 do 74 godine, koje su se javile u ginekološku ambulantu KCCG radi daljeg ispitivanja. Kriterijum za uključivanje u studiju bila je indikovana biopsija grlića materice na osnovu rezultata citološkog ispitivanja metodom bojenja po Papanicolaou (nalaz PAP testa: IIIa, IIIb ili IV) i/ili kolposkopskog nalaza na grliću materice. Sve ispitanice su bile detaljno informisane o prirodi istraživanja, a saglasnost da učestvuju u istraživanju dale su 198 ispitanice koje su tom prilikom popunile anketni upitnik, pri čemu neke od njih nisu dale odgovor na sva postavljena pitanja.

U zavisnosti od definisanog cilja, ispitanice su bile podeljene na odgovarajuću studijsku i kontrolnu grupu.

Kako bismo utvrdili korelaciju VR-HPV infekcije sa nastankom cervikalne displazije, ispitanice (n=187) su razvrstane u dve grupe: studijsku i kontrolnu. Studijska grupa je obuhvatala žene sa prisutnim premalignim lezijama (CIN1, CIN2/CIN3 /karcinomom *in situ*, odnosno LSIL i HSIL) grlića materice i u ovoj grupi je bilo 76 žena. Kontrolnu grupu su sačinjavale žene kod kojih patohistološki nisu utvrđene cervikalne premaligne lezije i ova grupa je brojala 111 žena. Rezultati patohistološkog nalaza nedostajali su za 11 žena čiji uzorci nisu analizirani u Institutu za patologiju KCCG.

Sa ciljem da se ispita postojanje faktora rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije, ispitanice (n=198) su bile podeljene prema VR-HPV rezultatu na studijsku i kontrolnu grupu. Studijsku grupu činile su žene sa dokazanom VR-HPV infekcijom (84/198), a kontrolnu grupu žene kod kojih nije detektovana VR-HPV infekcija (114/198).

Za ispitivanje kofaktora koji koreliraju sa nastankom cervikalne displazije kod VR-HPV pozitivnih ispitanica (n=76), prema patohistološkom nalazu tkiva grlića materice izvršena je podela na dve grupe: studijsku grupu su činile žene sa displazijom (45/76), a kontrolnu grupu žene bez displazije (31/76).

3.1.2. Klinički uzorci

Uzorkovanje je vršeno u ginekološkoj ambulanti KCCG. Ispitanicama uključenim u ovu studiju prvo su uzimani cervikalni brisevi radi virusološkog ispitivanja prisustva HPV infekcije, a nakon toga odrađena je biopsija tkiva grlića materice za potrebe patohistološke analize.

Za uzorkovanje cervikalnih briseva koristili su se brisevi sa četkicom *Kito-Brush* (Kaltek, Padova, Italy). Nakon uklanjanja viška sluzi pamučnim brisom sa površine grlića materice i okolnog ektocerviksa, uzorkovanje je vršeno uvođenjem cervikalnog brisa 1,0 - 1,5 cm u cervikalni kanal, energičnim rotirajućim pokretima. Brisevi su potapani u 20 ml specijalizovanog rastvora *ThinPrep Pap Test PreservCyt® Solution* (Cytyc Corporation, Boxburgh, MA, USA) i za potrebe HPV dijagnostike transportovani na Odjeljenje za molekularnu dijagnostiku Centra za medicinsku mikrobiologiju u IJZCG. Uzorci su zamrzavani na -70°C i čuvani do konačne obrade.

Nakon uzimanja cervikalnih briseva, ispitanicama je rađena biopsija tkiva grlića materice na standardan način. Uzorci bioptiranog tkiva grlića materice su transportovani i dalje analizirani u Institutu za patologiju KCCG.

Tokom istraživanja obrađeno je:

- 198 cervikalnih briseva za virusološku dijagnostiku VR-HPV infekcije, kao i
- 187 bioptata grlića materice za patohistološku analizu.

3.2. Metode

3.2.1. Socio-epidemiološka anketa

Anketiranje pacijentkinja je sprovedeno u ginekološkoj ambulanti KCCG, tokom prikupljanja uzoraka. U istraživanju je korišćen nestandardizovani anketni upitnik¹ u cilju dobijanja sledećih podataka:

- socio-demografskih karakteristika ispitanica: životna dob, bračni status, nivo obrazovanja, socijalni status;
- seksualnih navika ispitanica: životna dob pri prvom seksualnom odnosu, ukupan broj seksualnih partnera tokom života, stalnost seksualnog partnera;
- reproduktivnih karakteristika i brige o reproduktivnom zdravlju ispitanica: životna dob u vreme menarhe, broj trudnoća, broj abortusa (spontanih i namernih), druge seksualno prenosive infekcije, vrsti kontraceptivne zaštite, pušački status.

3.2.2. Virusološka dijagnostika VR-HPV infekcija

3.2.2.1. DNK ekstrakcija

Nakon odmrzavanja, potopljeni cervikalni brisevi u 20 ml rastvora *PreservCyt Solution* su vorteksovani, a potom je po 1-10 ml uzorka (5 ml iz bistrih; 3 ml iz zamućenih) prebačeno u sterilnu plastičnu tubicu od 1,5 ml i centrifugirano 12 minuta na 1300 obrtaja u minuti. Nakon centrifugiranja, supernatant je odlivan Pasterovom pipetom (3 ml), a sediment je korišćen za izolaciju i prečišćavanje DNK primenom ekstrakcionog kita *DNA-Sorb-A* (REF K-1-1/A; Sacace Biotechnologies, Como, Italy). Ekstrakcija je rađena u laminarnoj komori po protokolu proizvođača, uz određene modifikacije. Svi reagensi neophodni za DNK ekstrakciju su pripremani prema uputstvu proizvođača i pre primene stabilizovani na sobnoj temperaturi 1-2h. DNK ekstrakcija je vršena prema sledećoj proceduri:

1. Sediment je resuspendovan u 500 µl *Transport medium*- a.
2. Sipano je 300 µl *Lysis Solution*- a u plastičnu tubicu od 1,5 ml, dodato 200 µl resuspendovanog sedimenta i vorteksovano 15 sekundi.

¹ Detaljan sadržaj upitnika videti u delu 8.1.

3. Plastična tubica 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 tubicu od 1,5 ml za DNK ekstrakciju.
4. Nakon energičnog vorteksovanja, u plastičnu tubicu sa uzorkom dodato je 20 µl *Sorbent*- a, a potom ponovo vorteksovano 5-7 sekundi i inkubirano 3 minuta na sobnoj temperaturi. Ponovljen je korak još jednom.
5. Potom je uzorak centrifugiran 30 sekundi na 5000 g, a zatim je pažljivo uklonjen supernatant.
6. U plastičnu tubicu sa uzorkom je sipano 500 µl *Washing solution*- a, energično vorteksovano i centrifugirano 30 sekundi na 10000 g, a nakon toga je supernatant pažljivo uklonjen.
7. Korak 6 je ponovljen i tuba je inkubirana sa otvorenim čepom 5 - 10 minuta na 65°C.
8. Talog je resuspendovan dodavanjem 100 µl *DNA-eluent*- a, vorteksovan, inkubiran 5 minuta na 65°C i vorteksovan periodično.
9. Plastična tubica je centrifugirana 1 minut na 12000 g.
10. U plastičnu tubicu od 0,5 ml sipan je supernatant sa izolovanom i prečišćenom DNK.
11. Dobijeni filtrat je čuvan na temperaturi od -80°C do dalje obrade.

3.2.2.2. Dokazivanje i genotipizacija HPV DNK PCR metodom

HPV infekcija grlića materice je dijagnostikovana primenom PCR metode *Multiplex Real Time*. Za kvalitativnu detekciju i genotipizaciju 12 visokorizičnih (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 i 59) HPV genotipova korišćen je *HPV High-Risk Typing Real-TM* test (Sacace Biotechnologies, Como, Italy), prema uputstvu proizvođača. Test je zasnovan na PCR amplifikaciji DNK u 4 reakcione tube po uzorku. Svaka tuba je sadržala prajmere specifične za područja po 3 HPV genotipa, a kao unutrašnja kontrola se koristio gen za humani β-globin. Zapremina od 20 µL ukupnog ekstrakta nukleinske kiseline po uzorku se koristila za 4 PCR reakcije (8 µL *Master mix*- a i 5 µL *Eluat*- a za ukupno 13 µL svake od 4 PCR smeše).

3.2.3. Patohistološka dijagnostika uzoraka tkiva grlića materice

Obrada i patohistološka analiza bioptata cervikalnog epitela je rađena u Institutu za patologiju KCCG. Uzorci biopsije su fiksirani u 4% neutralnom rastvoru formalina tokom 24h na sobnoj temperaturi. Po završenoj fiksaciji, tkivni uzorci su dehidratirani provođenjem kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 96% i 100%), prosvetljavani u ksilolu i kalupljeni u parafinu. Serijski preseki, debljine 5 μ m, sečeni su mikrotomima *Leica SM 200R, Austria* i bojeni hematoksilinom po Mayer-u i 1% eozinom, zatim prosvjetljivani i montirani na pločice sa *Canada* balzamom, nakon čega je sprovedena patohistološka morfološka analiza.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Podaci su obrađeni u statističkom programu SPSS 28.0. Atributivna obeležja posmatranja opisana su apsolutnim i relativnim brojevima, a numerička merama centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana) i merama varijabiliteta (standardna devijacija i minimalna i maksimalna vrednost).

Atributivna obeležja posmatranja poređena su Hi kvadrat (χ^2) testom. Normalnost raspodele podataka testirana je *Koglmorov Smirnov*- im testom u slučaju numeričkih podataka. Sva numerička obeležja posmatranja, koja su bila neparametarska (sa raspodelom podataka različitom od normalne), testirana su *Mann Whitney* testom između posmatranih grupa ispitanica sa i bez VR-HPV infekcije, odnosno ispitanica sa i bez displazije. Za poređenje između više od dve grupe ispitanica (bez displazije, LSIL, HSIL), korišćen je *Kruskal Wallis*- ov test. U slučaju parametarskih podataka (numerička obeležja posmatranja koja su se ponašala po tipu normalne raspodele) korišćen je t test za nezavisne uzorke, odnosno u slučaju poređenja između više od dve grupe ispitanica jednofaktorska analiza varijanse. Verovatnoća prisustva VR-HPV infekcije u ispitivanim grupama izražena je kao negativna prediktivna vrednost (NPV) i pozitivna prediktivna vrednost (PPV) sa 95 % intervalom poverenja (CI). Logističkom regresionom analizom ispitivana je povezanost posmatranih faktora rizika sa pojavom VR-HPV infekcije, kao i sa pojavom displazije. Univarijantnom regresionom analizom izdvajani su prediktori pojave HPV infekcije i displazije. Multivarijantnom regresionom analizom dobijeni su

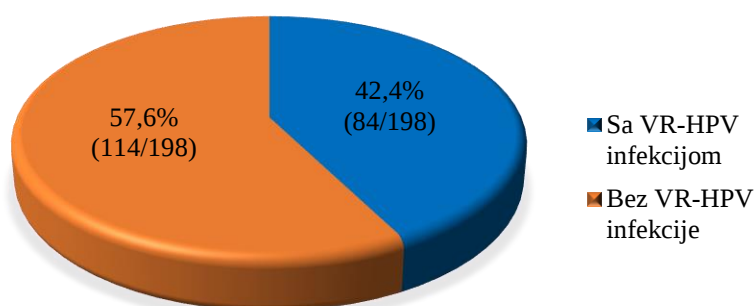
nezavisni prediktori pojave HPV infekcije i displazije. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Statistička značajnost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna.

4. REZULTATI

4.1. Cervikalna VR-HPV infekcija

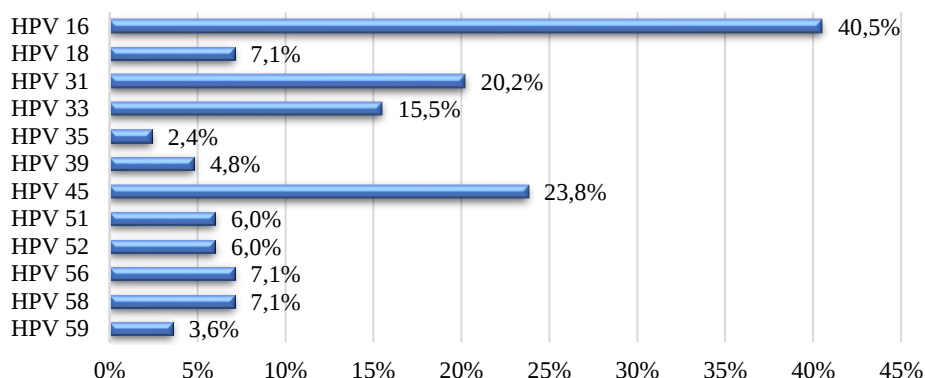
Tokom šestogodišnjeg istraživanja ispitano je 198 žena prosečne životne dobi od $42,97 \pm 10,56$ godina. Najmlađa ispitanica imala je 19, a najstarija 74 godine. Primenom dijagnostičkog testa *HPV High-Risk Typing Real-TM*, izvršeno je otkrivanje i genotipizacija 12 VR-HPV tipova. Svi testirani uzorci su bili pozitivni na β - globin gen, što ukazuje na prisustvo adekvatnog broja epitelnih ćelija u uzorcima. HPV DNK pozitivan rezultat dijagnostikovan je kod 84/198 (42,4%) ispitanica (Grafikon 1).



Grafikon 1. Zastupljenost žena sa VR-HPV infekcijom

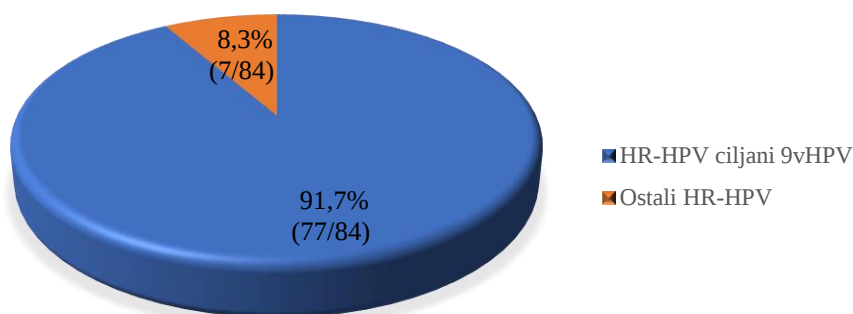
4.1.1. Distribucija cervikalnih VR-HPV genotipova

Prema rezultatima HPV DNK genotipizacije, najzastupljeniji VR-HPV tip bio je HPV 16, koji je detektovan kod 34/84 (40,5%) ispitanica. Sledeći po učestalosti bio je tip HPV 45 (20/84), zatim tip HPV 31 (20/84), a potom HPV 33 (13/84). Svi ostali VR-HPV tipovi su bili zastupljeni znatno manje (3-6/84) (Grafikon 2). HPV genotipovi: 16, 45, 31 i 33 su bili statistički značajno češće zastupljeni u odnosu na ostale genotipove (χ^2 -test, $p=0,000$).



Grafikon 2. Distribucija 12 VR-HPV genotipova među VR-HPV pozitivnim ženama

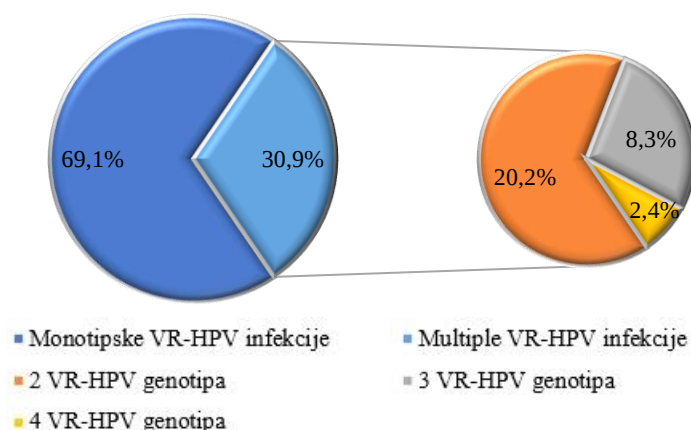
Infekcija sa najmanje 1 od 7 VR-HPV tipova (HPV tipovi: 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58) ciljanih 9vHPV vakcinom dijagnostikovana je kod 77/84 (91,7%) ispitivanih žena (Grafikon 3). Učestalost infekcija nekim od VR-HPV tipova ciljanih 9vHPV vakcinom bila je statistički značajno veća u odnosu na učestalost infekcija drugim VR-HPV tipovima (χ^2 -test, $p=0,000$).



Grafikon 3. Zastupljenost infekcija VR-HPV tipovima ciljanih 9vHPV vakcinom

4.1.2. Distribucija monotipskih i multiplih cervikalnih VR-HPV infekcija

Infekciju sa jednim VR-HPV tipom je imalo 58/84 (69,1%), a multiplu VR-HPV infekciju 26/84 (30,9%) VR-HPV pozitivnih ispitanica. Infekcija sa dva VR-HPV tipa detektovana je kod 17/84 (20,2%) pozitivnih žena, a infekcija sa tri i četiri VR-HPV tipa kod 7/84 (8,3%), odnosno 2/84 (2,4%) pozitivnih žena (Grafikon 4). Među VR-HPV pozitivnim ispitanicama statistički značajno više su bile zastupljene monotipske infekcije od multiplih infekcija (χ^2 -test, $p=0,000$).



Grafikon 4. Zastupljenost monotipskih i multiplih cervikalnih VR-HPV infekcija

Dominantni genotip u monotipskim VR-HPV infekcijama bio je HPV 16 (21,4%), a sledili su ga HPV 31 (14,3%) i HPV 45 (11,9 %) (Tabela 1). U odnosu na ostale genotipove, ova razlika se pokazala statistički značajnom (χ^2 -test, $p=0,000$).

U multiplim VR-HPV infekcijama najučestaliji je bio takođe HPV 16 (19,0%), a zatim HPV 45 (11,9%), što je bilo statistički značajno češće u poređenju sa učestalošću ostalih genotipova (χ^2 -test, $p=0,000$). HPV 35 i HPV 39 izolovani su samo kod multiplih HPV infekcija (Tabela 1).

Tabela 1. Distribucija VR-HPV genotipova u monotipskim i multiplim infekcijama

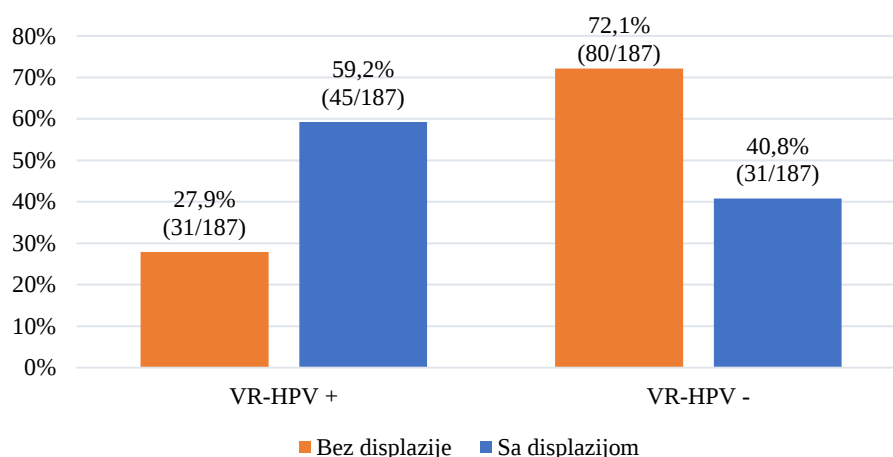
HPV genotip	Monotipske infekcije N (%) ^{a, b}	Multiple infekcije N (%) ^{a, b}
HPV 16	18 (21,4%)/ (9,1%)	16 (19,0%)/ (8,1%)
HPV 18	3 (3,6%)/ (1,5%)	3 (3,6%)/ (1,5%)
HPV 31	12 (14,3%)/ (6,1%)	5 (6,0%)/ (2,5%)
HPV 33	6 (7,1%)/ (3,0%)	7 (8,3%)/ (3,5%)
HPV 35	0 (0%)/ (0%)	2 (2,4%)/ (1,0%)
HPV 39	0 (0%)/ (0%)	4 (4,8%)/ (2,0%)
HPV 45	10 (11,9%)/ (5,1%)	10 (11,9%)/ (5,1%)
HPV 51	1 (1,2%)/ (0,5%)	4 (4,8%)/ (2,0%)
HPV 52	1 (1,2%)/ (0,5%)	4 (4,8%)/ (2,0%)
HPV 56	3 (3,6%)/ (1,5%)	3 (3,6%)/ (1,5%)
HPV 58	3 (3,6%)/ (1,5%)	3 (3,6%)/ (1,5%)
HPV 59	1 (1,2%)/ (0,5%)	2 (2,4%)/ (1,0%)
Ukupno	100%)/ (29,3%)	26 (100%)/ (13,1%)

^a procenat u odnosu na broj VR-HPV pozitivnih ispitanica/ ^b procenat u odnosu na ukupan broj ispitanica

χ^2 -test, $p<0,001$

4.1.3. Distribucija VR-HPV infekcije u odnosu na pojavu cervikalne displazije

Cervikalne displastične lezije su dokazane kod 76 od 187 žena. VR-HPV infekcija je dijagnostikovana kod 45/187 (59,2%) žena sa displazijom i kod 31/187 (27,9%) žena bez displazije (Grafikon 5). U grupi žena sa displazijom, statistički značajno su češće bile zastupljene žene sa VR-HPV infekcijom (χ^2 -test, $p=0,000$).



Grafikon 5. VR-HPV infekcija u odnosu na pojavu cervikalne displazije

Distribucija VR-HPV tipova u odnosu na pojavu cervikalne displazije prikazana je u Tabeli 2. U grupi žena sa displazijom, najzastupljeniji VR-HPV tip bio je HPV 16 (28,9%), a podjednako su bili zastupljeni HPV tipovi: 31, 33 i 45, sa učestalošću od po 11,8%. U grupi žena bez displazije, najzastupljeniji bio je HPV 45 (8,1%), a zatim HPV 16 i HPV 31 (7,2%, odnosno 6,3%). Rezultati su pokazali da su HPV 16 i HPV 33 značajno češće dijagnostikovani u studijskoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu žena (HPV 16: 28,9%, odnosno 7,2%; HPV 33: 11,8%, odnosno 3,6%).

Infekcija sa najmanje 1 od 7 VR-HPV tipova ciljanih 9vHPV vakcinom dijagnostikovana je kod 56,6% ispitanica studijske grupe i kod 24,3% ispitanica kontrolne grupe (Tabela 2). Učestalost infekcija nekim od VR-HPV tipova ciljanih 9vHPV vakcinom bila je statistički značajno veća kod žena sa cervikalnim premalignim lezijama u odnosu na grupu žena bez displazije.

Monotipska VR-HPV infekcija je dijagnostikovana kod 68,9% ispitanih žena studijske grupe i 77,4% ispitanica kontrolne grupe, a multipla VR-HPV infekcija je

detektovana kod 31,1% žena studijske grupe i 22,6% ispitanica kontrolne grupe (Tabela 2). Statističkom obradom podataka nije uočena značajna razlika u učestalosti monotipske i multiple infekcije između žena sa displazijom i žena bez displazije, ali se pokazalo da su monotipske infekcije značajno češće u analiziranim grupama nego multiple infekcije (ispitanice sa displazijom: $p=0,039$; ispitanice bez displazije: $p=0,002$).

Tabela 2. Distribucija VR-HPV genotipova u odnosu na pojavu cervikalne displazije

VR-HPV infekcija	Displazija		p
	Ne	Da	
Tip VR-HPV infekcije			
Monotipska infekcija	24 (77,4%)	31 (68,9%)	0,414
Multipla infekcija	7 (22,6%)	14 (31,1%)	
VR-HPV genotipovi:			
HPV 16	8 (7,2%)	22 (28,9%)	0,000*
HPV 18	2 (1,8%)	3 (3,9%)	0,372
HPV 31	7 (6,3%)	9 (11,8%)	0,184
HPV 33	4 (3,6%)	9 (11,8%)	0,030*
HPV 35	1 (0,9%)	0 (0%)	0,407
HPV 39	1 (0,9%)	2 (2,6%)	0,355
HPV 45	9 (8,1%)	9 (11,8%)	0,395
HPV 51	1 (0,9%)	3 (3,9%)	0,157
HPV 52	1 (0,9%)	4 (5,3%)	0,069
HPV 56	3 (2,7%)	1 (1,3%)	0,520
HPV 58	1 (0,9%)	4 (5,3%)	0,069
HPV 59	3 (2,7%)	0 (0%)	0,149
Vakcinalni HR-HPV	27 (24,3%)	43 (56,6%)	0,000*

Podaci prikazani kao N i %

* χ^2 -test, $p<0,05$

4.1.4. Distribucija VR-HPV infekcije u odnosu na tip cervikalne displazije

VR-HPV infekcija je dijagnostikovana kod 83,8% žena sa displazijom tipa HSIL, 35,9% žena sa displazijom tipa LSIL i 27,9% ispitanih žena bez displazije (Tabela 3). Žene sa HSIL displazijom cervikalnog epitela značajno su češće imale dijagnostikovanu VR-HPV infekciju u odnosu na žene sa LSIL i one bez displazije (χ^2 -test, $p=0,000$). Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti cervikalne HPV infekcije između ispitanica bez displazije i onih sa LSIL.

U sve tri grupe ispitanica (bez displazije, LSIL, HSIL) monotipska VR-HPV infekcija je bila češća u odnosu na multiplu VR-HPV infekciju (Tabela 3). U grupi žena bez displazije i u grupi sa LSIL statistički značajno više su bile zastupljene ispitanice sa monotipskom infekcijom u odnosu na multiple infekcije ($p=0,002$, odnosno $p=0,033$), dok u grupi žena sa HSIL nije uočena statistički značajna razlika u pojavi monotipskih i multiplih infekcija ($p=0,106$).

Tabela 3. Distribucija VR-HPV infekcije u odnosu na tip cervikalne displazije

VR-HPV infekcija	Patohistološki nalaz			p
	Bez displazije	LSIL	HSIL	
VR-HPV infekcija				
Bez infekcije	80 (72,1%)	25 (64,1%)	6 (16,2%)	0,000*
Sa infekcijom	31 (27,9%)	14 (35,9%)	31 (83,8%)	
Tip VR-HPV infekcije				
Monotipske infekcije	24 (77,4%)	11 (78,6%)	20 (64,5%)	0,445
Multiple infekcije	7 (22,6%)	3 (21,4%)	11 (35,5%)	
VR-HPV genotip				
HPV16	8 (7,2%)	4 (10,3%)	18 (48,6%)	0,000*
HPV18	2 (1,8%)	2 (5,1%)	1 (2,7%)	0,541
HPV31	7 (6,3%)	5 (12,8%)	4 (10,8%)	0,394
HPV33	4 (3,6%)	1 (2,6%)	8 (21,6%)	0,000*
HPV35	1 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0,709
HPV39	1 (0,9%)	1 (2,6%)	1 (2,7%)	0,651
HPV45	9 (8,1%)	2 (5,1%)	7 (18,9%)	0,087
HPV51	1 (0,9%)	1 (2,6%)	2 (5,4%)	0,255
HPV52	1 (0,9%)	1 (2,6%)	3 (8,1%)	0,063
HPV56	3 (2,7%)	1 (2,6%)	0 (0%)	0,603
HPV58	1 (0,9%)	1 (2,6%)	3 (8,1%)	0,063
HPV59	3 (2,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0,352
Vakcinalni sojevi	27 (24,3%)	12 (30,8%)	31 (83,8%)	0,000*

Podaci prikazani kao N i %

* χ^2 -test, $p<0,05$

Najzastupljeniji VR-HPV tipovi u grupi žena sa displazijom gradusa HSIL bili su HPV 16 (48,6%) i HPV 33 (21,6%), a u grupi žena sa LSIL displazijom HPV 31 (12,8%) i HPV 16 (10,3%) (Tabela 3). Međugrupnim poređenjem statistički značajna razlika uočena je u učestalosti infekcija HPV 16 i HPV 33 kod žena sa HSIL (48,6%, odnosno 21,6%) u odnosu na žene sa LSIL (10,3%, odnosno 2,6%) (HPV16; $p=0,000$ i HPV33;

$p=0,001$), kao i između žena sa HSIL i žena bez displazije cervikalnog epitela (7,2%, odnosno 3,6%) (HPV16; $p=0,000$ i HPV33; $p=0,000$). Razlika se nije pokazala statistički značajnom između ispitanica bez displazije i ispitanica sa LSIL (HPV 16; $p=0,546$ i HPV33; $p=0,756$). Analizom učestalosti ostalih VR-HPV tipova nije uočena značajna razlika u posmatranim grupama.

Infekcija VR-HPV ciljanim 9vHPV vakcinom dokazana je kod 83,8% ispitanica sa HSIL, 30,8% ispitanica sa LSIL i kod 24,3% ispitanica kontrolne grupe (Tabela 3). Uočena je statistički značajna razlika u učestalosti ovih VR-HPV tipova kod žena sa HSIL u odnosu na žena sa LSIL ($p=0,000$) i na žene kontrolne grupe ($p=0,000$). Između ispitanica bez displazije i ispitanica sa LSIL nije bilo statistički značajne razlike.

Logističkom regresionom analizom izdvajani su prediktori razlike u odnosu na nastanak cervikalne displazije kod žena sa VR-HPV infekcijom. Univarijantnom logističkom regresionom analizom, kao statistički značajni faktori za nastanak cervikalne displazije, izdvojili su se: VR-HPV infekcija, infekcija sa HPV 16 i infekcija sa HPV 33 (Tabela 4).

Tabela 4. Univarijantna logistička regresiona analiza razlike u riziku od nastanka cervikalne displazije u odnosu na VR-HPV infekciju

Faktor rizika	Model univarijantne logističke regresije	
	#Exp B (95% CI)	p
VR-HPV infekcija	3,746 (2,020-6,946)	0,000*
Tip infekcije	1,548 (0,541-4,435)	0,415
VR-HPV genotip		
HPV 16	5,245 (2,190-12,566)	0,000*
HPV 18	2,240 (0,365-13,735)	0,384
HPV 31	1,996 (0,709-5,615)	0,190
HPV 33	3,593 (1,064-12,131)	0,039*
HPV 35	1,000 (0,000-20,000)	0,863
HPV 39	2,973 (0,265-33,383)	0,377
HPV 45	1,522 (0,575-4,032)	0,398
HPV 51	4,521 (0,461-44,304)	0,195
HPV 52	6,111 (0,669-55,783)	0,109
HPV 56	0,480 (0,049-4,703)	0,528
HPV 58	6,111 (0,669-55,783)	0,109
HPV 59	0,000 (0,000-0,000)	0,999

*statistički značajna razlika ($p<0,05$)

Skraćenice: Exp B, relativni rizik; CI, interval poverenja (*engl.* Confidence Interval)

Ovi faktori su ušli u multivarijantni model logističke regresije i među njima je samo HPV 16 infekcija bila nezavisni faktor rizika za nastanak cervikalne displazije ($p=0,049$) (Tabela 5). Žene sa HPV 16 infekcijom imale su oko 2,7 puta veći rizik da razviju cervikalnu displaziju (95% CI: 1,098–7,700).

Tabela 5. Multivarijantna logistička regresiona analiza razlike u riziku od nastanka cervikalne displazije u odnosu na VR-HPV infekciju

Faktor rizika	Model multivarijantne logističke regresije	
	Exp B (95% CI)	p
VR-HPV infekcija	2,001 (0,918–4,361)	0,081
HPV 16	2,746 (1,098–7,700)	0,049*
HPV 33	2,152 (0,563–8,225)	0,262

*statistički značajna razlika ($p<0,05$); #Exp (B)

Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) za svaki od VR-HPV tipova otkrivenih u infekcijama i za VR-HPV tipove na koje cilja 9vHPV vakcina određene su poređenjem učestalosti VR-HPV tipova kod žena sa i bez displazije. Na osnovu dobijenih vrednosti (PPV i NPV), predviđa se da će se kod 61,4% (PPV) žena inficiranih VR-HPV tipovima na koje cilja 9vHPV vakcina razviti cervikalna displazija (95% CI: 49,0-72,8%), dok je kod 71,8% (NPV) žena sa infekcijom VR-HPV tipovima na koje ne cilja 9vHPV vakcina mala verovatnoća da će infekcija razviti ovo stanje (95% CI: 62,7–79,7%) (Tabela 6).

Tabela 6. Razlika u verovatnoći nastanka cervikalne displazije u odnosu na prisustvo različitih VR-HPV genotipova kao prediktora displastičnih promena

VR-HPV infekcija	NPV	PPV
HPV 16	0,656 (0,576–0,730)	0,733 (0,541–0,877)
HPV 18	0,599 (0,524–0,671)	0,600 (0,147–0,947)
HPV 31	0,608 (0,531–0,682)	0,562 (0,299–0,802)
HPV 33	0,615 (0,538–0,688)	0,692 (0,386–0,909)
HPV 35	0,591 (0,517–0,663)	0,000 (0,000–0,987)
HPV 39	0,598 (0,523–0,669)	0,667 (0,094–0,992)
HPV 45	0,604 (0,526–0,678)	0,500 (0,260–0,740)
HPV 51	0,601 (0,526–0,673)	0,750 (0,194–0,994)
HPV 52	0,604 (0,529–0,676)	0,800 (0,284–0,995)
HPV 56	0,590 (0,515–0,682)	0,250 (0,006–0,806)
HPV 58	0,604 (0,529–0,676)	0,800 (0,284–0,995)
HPV 59	0,587 (0,512–0,659)	0,000 (0,000–0,806)
Vakcinalni VR-HPV	0,718 (0,627–0,797)	0,614 (0,490–0,728)

4.2. Faktori rizika

4.2.1. Faktori rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije

Na osnovu popunjenih anonimnih upitnika, izvršena je analiza faktora rizika za nastanak cervikalne VR-HPV infekcije. Studijsku grupu činile su ispitanice sa dokazanom VR-HPV infekcijom na grliću materice, a kontrolnu grupu VR-HPV negativne žene.

Prosečna životna dob ispitanica u grupi sa VR-HPV infekcijom bila je $39,18 \pm 9,95$ godina, a u grupi bez VR-HPV infekcije $45,77 \pm 10,16$ godina (Tabela 7). Statistička obrada podataka je pokazala da postoji značajna razlika u životnoj dobi ispitanica posmatranih grupa. Ispitanice sa VR-HPV infekcijom bile su statistički značajno mlađe.

U posmatranim grupama ispitanica, zastupljenost žena u odnosu na bračni status bila je slična, pri čemu su u obe grupe bile brojnije udate žene (Tabela 7). U studijskoj grupi je bilo 67,9% udatih žena, a u kontrolnoj grupi 75,4%. Između posmatranih grupa ispitanica nije uočena statistički značajna razlika u pogledu bračnog statusa žena.

Tabela 7. Socio-demografske karakteristike ispitanica i cervikalna VR-HPV infekcija

Posmatrane karakteristike n (%) / (X $\pm$ SD (Med; min-max))	Ukupno	VR-HPV infekcija		p
		Ne	Da	
Životna dob	42,97 $\pm$ 10,56 (43; 19-74)	45,77 $\pm$ 10,16 (45,5; 22-74)	39,18$\pm$9,95 (37,0; 19-66)	^a0,000*
Bračni status				
Udata	143 (72,2%)	86 (75,4%)	57 (67,9%)	^b 0,239
Razvedena/udovica/ neudata	55 (27,8%)	28 (24,6%)	27 (32,1%)	
Nivo obrazovanja				
Osnovna škola	12 (6,6%)	6 (5,7%)	6 (7,8%)	^b 0,389
Srednja škola	108 (59,3%)	59 (56,2%)	49 (63,6%)	
Fakultetsko obrazovanje	62 (34,1%)	40 (38,1%)	22 (28,6%)	
Socijalni status				
Nizak	12 (6,1%)	5 (6,3%)	7 (5,9%)	^b 0,437
Srednji	162 (82,7%)	97 (83,8%)	65 (81,2%)	
Visok	22 (11,2%)	12 (9,9%)	10 (12,9%)	

*statistički značajna razlika (p<0,05); ^aMann Whitney test; ^bχ²-test

Distribucija ispitanica prema nivou obrazovanja pokazuje da je u posmatranim grupama bilo najviše žena sa srednješkoljskim obrazovanjem (63,6% ispitanica studijske i 56,2% ispitanica kontrolne grupe), potom žena sa fakultetskim obrazovanjem, dok je najmanje žena bilo sa osnovnom školom (Tabela 7). Statističkom obradom podataka nije uočena značajna razlika u nivou obrazovanja između ispitanica studijske i kontrolne grupe.

Socijalni status je procenjivan na osnovu subjektivnog osećaja ispitanice da materijalni status odgovara proseku (srednji), da je iznad proseka (visok) ili ispod proseka (nizak). Ispitanice koje su se izjasnile da su srednjeg socijalnog statusa bile su dominantno zastupljene, sa više od 80% u obe analizirane grupe (Tabela 7). Socijalni status žena, između posmatranih grupa (sa i bez VR-HPV infekcije), nije se statistički značajno razlikovao.

U grupi sa VR-HPV infekcijom, prosečna životna dob ispitanica pri prvom seksualnom odnosu bila je 19,02 $\pm$ 2,62 godina, a u grupi bez VR-HPV infekcije 21,06 $\pm$ 3,43 godina (Tabela 8). Uočena je statistički značajna razlika u životnoj dobi

ispitanica pri prvom seksualnom odnosu. Ispitanice u grupi sa VR-HPV infekcijom su u vreme stupanja u prvi seksualni odnos bile značajno mlađe.

Ispitanice sa stalnim seksualnim partnerom (90,5% ispitanica studijske i 84,1% ispitanica kontrolne grupe) višestruko su bile učestalije od ispitanica bez stalnog seksualnog partnera u obe posmatrane grupe (Tabela 8). Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti ispitanica sa i bez stalnog seksualnog partnera između studijske i kontrolne grupe.

U grupi žena sa VR-HPV infekcijom, polovina ispitanica je imalo tri i više seksualnih partnera, 17,1% dva partnera, a jednog partnera imalo je 32,9% ispitanica (Tabela 8). Nakon obrade podataka pokazalo se da je značajno više bilo VR-HPV pozitivnih žena sa tri i više seksualnih partnera u odnosu na grupu ispitanica bez ove infekcije.

Tabela 8. Seksualne navike ispitanica i cervikalna VR-HPV infekcija

Posmatrane karakteristike n (%) / ((Med (IQR); (min-max)))	Ukupno	VR-HPV infekcija		p
		Ne	Da	
Prvi seksualni odnos (životna dob)	20,20±3,26 (20; 13-32)	21,06±3,43 (20,0; 15-32)	19,02±2,62 (19,0; 13-29)	0,000*
Stalni seksualni partner				
Ne	26 (13,2%)	18 (15,9%)	8 (9,5%)	0,189
Da	171 (86,8%)	95 (84,1%)	76 (90,5%)	
Broj seksualnih partnera				
1	90 (46,9%)	63 (57,3%)	27 (32,9%)	0,001*
2	35 (18,2%)	21 (19,1%)	14 (17,1%)	
≥3	67 (34,9%)	26 (23,6%)	41 (50,0%)	

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); χ^2 -test

Prosečna životna dob u vreme menarhe u obe grupe bila je 13 godina (Tabela 9).

Neku od drugih seksualno prenosivih bolesti imalo je 13,3% ispitanica studijske grupe i 6,2% ispitanica kontrolne grupe (Tabela 9). Između ispitanica sa i bez VR-HPV infekcije nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti prethodno preležanih polno prenosivih bolesti.

Podaci ukazuju da su VR-HPV negativne žene češće koristile kondom od VR-HPV pozitivnih žena (25,7%, odnosno 19,5%) (Tabela 9). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u pogledu korišćenja ovog vida kontracepcije između posmatranih grupa ispitanica.

Tabela 9. Reproduktivne karakteristike i briga o reproduktivnom zdravlju ispitanica i cervikalna VR-HPV infekcija

Posmatrane karakteristike n (%) / ((Med (IQR); (min-max)))	Ukupno	VR-HPV infekcija		p
		Ne	Da	
Menarha (životna dob)	13,47±1,96 (13; 11-19)	13,58±1,68 (13; 10-19)	13,43±1,86 (13; 8-18)	0,748
STD				
Ne	178 (90,8%)	106 (93,8%)	72 (86,7%)	0,091
Da	18 (9,2%)	7 (6,2%)	11 (13,3%)	
Upotreba kondoma				
Ne	150 (76,1%)	84 (74,3%)	66 (80,5%)	0,314
Da	45 (23,1%)	29 (25,7%)	16 (19,5%)	

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); χ^2 -test

Logističkom regresionom analizom izdvajani su prediktori razlike u odnosu na nastanak VR- HPV infekcije u posmatranoj grupi ispitanica (Tabela 10). Cilj ove analize je bio da se definišu oni parametri koji bi kod ispitanica ukazali na visok rizik mogućeg nastanka ove infekcije.

Univarijantnom logističkom regresionom analizom, kao statistički značajni faktori za nastanak VR-HPV infekcije, izdvojili su se: životna dob, životna dob pri prvom seksualnom odnosu i broj seksualnih partnera (Tabela 10).

Tabela 10. Univarijantna logistička regresiona analiza razlike između ispitanica sa i bez VR-HPV infekcije

Posmatrani faktori rizika	Univarijantna logistička regresiona analiza	
	#Exp B (95% CI)	p
Životna dob	0,936 (0,908-0,966)	0,000*
Bračni status	1,163 (0,898-1,505)	0,253
Nivo obrazovanja	0,703 (0,419-1,178)	0,181
Socijalni status	0,864 (0,434-1,722)	0,679
Životna dob pri prvom seksualnom odnosu	0,790 (0,705-0,886)	0,000*
Stalni seksualni partner	1,800 (0,742-4,365)	0,193
Broj seksualnih partnera	1,408 (1,150-1,724)	0,000*
Menarha	0,952 (0,808-1,122)	0,557
STD	2,313 (0,856-6,250)	0,098
Upotreba kondoma	0,702 (0,352-1,400)	0,315

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); #Exp (B)

Ovi faktori su ušli u multivarijantni model logističke regresije, gde su se kao statistički značajni izdvojili životna dob ispitanica i životna dob ispitanica pri prvom seksualnom odnosu (Tabela 11). Mlađe ispitanice su pod većim rizikom za sticanje VR-HPV infekcije, kao i ispitanice koje su ranije stupile u seksualne odnose.

Tabela 11. Multivarijantna logistička regresiona analiza razlike između ispitanica sa i bez cervikalne VR-HPV infekcije

Posmatrani faktori rizika	Univarijantna logistička regresiona analiza	
	#Exp B (95% CI)	p
Životna dob	0,955 (0,923-0,989)	0,010*
Životna dob pri prvom seksualnom odnosu	0,844 (0,750-0,951)	0,005*
Broj seksualnih partnera	1,191 (0,972-1,459)	0,068

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); #Exp (B)

4.2.2. Faktori rizika za nastanak cervikalne displazije kod VR-HPV pozitivnih ispitanica

Prosečna životna dob VR-HPV pozitivnih ispitanica sa displazijom bila je $38,31 \pm 9,62$ godina, a u grupi bez displazije $41,29 \pm 10,50$ godina (Tabela 12). Statistička obrada podataka je pokazala da ne postoji značajna razlika u životnoj dobi ispitanica posmatranih grupa.

U odnosu na bračni status, u obe grupe ispitanica, udate ispitanice su bile zastupljene više od razvedenih, neudatih i udovica. U studijskoj grupi je bilo 64,4% udatih žena, a u kontrolnoj grupi 71,0% (Tabela 12). Između posmatranih grupa ispitanica nije uočena statistički značajna razlika u pogledu bračnog statusa žena.

Tabela 12. Socio-demografske karakteristike ispitanica i cervikalna displazija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica

Posmatrane karakteristike n (%) / (X $\pm$ SD (Med; min-max))	Ukupno	Displazija		p
		Ne	Da	
Životna dob	39,14 $\pm$ 9,96 (37; 19-66)	41,29 $\pm$ 10,50 (43; 19-66)	38,31 $\pm$ 9,62 (36; 23-64)	^a 0,144
Bračni status				
Udata	51 (67,1%)	22 (71,0%)	29 (64,4%)	^b 0,552
Razvedena/udovica/neudata	25 (32,9%)	9 (29,0%)	16 (35,6%)	
Nivo obrazovanja				
Osnovna škola	4 (5,7%)	0 (0%)	4 (9,3%)	^b 0,240
Srednja škola	47 (67,1%)	20 (74,1%)	27 (62,8%)	
Fakultetsko obrazovanje	19 (27,1%)	7 (25,9%)	12 (27,9%)	
Socijalni status				
Nizak	7 (9,5%)	4 (12,9%)	3 (7,0%)	^b 0,623
Srednji	58 (78,4%)	24 (77,4%)	34 (79,0%)	
Visok	9 (12,1%)	3 (9,7%)	6 (14,0%)	

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); ^aMann Whitney test; ^b χ^2 -test

Distribucija ispitanica prema nivou obrazovanja pokazuje da je u posmatranim grupama bilo najviše žena sa srednješkolskim obrazovanjem (62,4% ispitanica studijske i 74,1% ispitanica kontrolne grupe), potom žena sa fakultetskim obrazovanjem, dok je najmanje žena bilo sa osnovnom školom (Tabela 12). Statistički značajna razlika nije

uočena u nivou obrazovanja između VR-HPV pozitivnih žena sa i bez cervikalne displazije.

Po pitanju socijalnog statusa, najviše su bile zastupljene ispitanice srednjeg socijalnog statusa, pri čemu su u grupi sa displazijom one činile 79,0%, a u grupi bez displazije 77,4% (Tabela 12). Socijalni status žena, između posmatranih grupa, nije se statistički značajno razlikovao.

Prosečna životna dob stupanja u prvi seksualni odnos je bila ista (19 godina) u obe analizirane grupe žena (Tabela 13).

Ispitanice sa stalnim seksualnim partnerom su činile većinu u studijskoj i kontrolnoj grupi žena (86,7%, odnosno 93,5%), bez uočene statističke značajne razlike (Tabela 13).

Učestalost ispitanica sa ≥ 3 seksualnih partnera tokom života je bila veća u grupi VR-HPV pozitivnih žena sa displazijom nego u kontrolnoj grupi (60,5%, odnosno 35,3%). Sa druge strane, učestalost ispitanica sa jednim partnerom tokom života je bila veća u kontrolnoj grupi u odnosu na studijsku grupu (45,2%, odnosno 23,3%) (Tabela 13). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u pogledu broja seksualnih partnera između posmatranih grupa ispitanica.

Tabela 13. Seksualne navike ispitanica i cervikalna displazija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica

Posmatrane karakteristike n (%) / ((Med (IQR); (min-max)))	Ukupno	Displazija		p
		Ne	Da	
Prvi seksualni odnos (životna dob)	19,02 $\pm$ 2,63 (19; 13-29)	19,37 $\pm$ 3,05 (19; 13-29)	18,77 $\pm$ 1,95 (19; 15-23)	0,522
Stalni seksualni partner				
Ne	8 (10,5%)	2 (6,5%)	6 (13,3%)	0,337
Da	68 (89,5%)	29 (93,5%)	39 (86,7%)	
Broj seksualnih partnera				
1	24 (32,4%)	14 (45,2%)	10 (23,3%)	0,082
2	13 (17,6%)	6 (19,4%)	7 (16,3%)	
≥ 3	37 (50,0%)	11 (35,5%)	26 (60,5%)	

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); χ^2 -test

Prosečna životna dob u vreme menarhe bila je 14 godina u obe analizirane grupe (Tabela 14).

U odnosu na broj trudnoća, najviše su bile zastupljene žene sa 3 ili više trudnoća (43,2% ispitanica studijske grupe i 33,3% ispitanica kontrolne grupe) (Tabela 14). Statističkom analizom nije uočena značajna razlika u broju trudnoća između VR-HPV pozitivnih ispitanica sa i bez displazije.

Raspodela učestalosti ispitanica u zavisnosti od broja abortusa bila je slična u studijskoj i kontrolnoj grupi, pri čemu su najviše bile zastupljene ispitanice bez prethodnih abortusa (61,4%, odnosno 59,3%) (Tabela 14). Između VR-HPV pozitivnih ispitanica sa i bez displazije, nije uočena statistički značajna razlika u broju abortusa.

Ispitanice bez druge polno prenosive bolesti bile su dominantno zastupljene i činile su preko 80% žena u obe analizirane grupe (Tabela 14), pa statistički značajna razlika nije dokazana.

U obe posmatrane grupe, najviše su bile zastupljene ispitanice koje su kao vid kontraceptivne zaštite koristile prekinut snošaj, a sledeće po učestalosti bile su ispitanice čiji su partneri koristili kondom. Oralne kontraceptive koristile su samo ispitanice u grupi bez displazije (Tabela 14). Vrsta kontracepcije nije se statistički značajno razlikovala između posmatranih grupa ispitanica.

Ispitanice koje su bile pušači, statistički značajno više su bile zastupljene u grupi VR-HPV pozitivnih žena sa displazijom. Više od polovina ispitanica sa displazijom (62,8%) bile su pušači a u grupi bez displazije cigarete je konzumiralo 38,7% ispitanica (Tabela 14). Uočena je statistički značajna razlika u zastupljenosti ispitanica koje su konzumirale cigarete između posmatranih grupa.

Tabela 14. Reproduktivne karakteristike i briga o reproduktivnom zdravlju ispitanica i cervikalna displazija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica

Posmatrane karakteristike n (%) / ((Med (IQR); (min-max)))	Ukupno	Displazija		p
		Ne	Da	
Menarha	13,56±1,86 (14; 10-18)	13,58±1,39 (14; 11-17)	13,56±1,94 (14; 10-18)	0,849
Broj trudnoća				
0	14 (19,7%)	7 (25,9%)	7 (15,9%)	0,644
1	10 (14,1%)	3 (11,1%)	7 (14,9%)	
2	19 (26,8%)	8 (29,6%)	11 (25,0%)	
≥3	28 (39,4%)	9 (33,3%)	19 (43,2%)	
Broj abortusa				
0	43 (60,6%)	16 (59,3%)	27 (61,4%)	0,772
1	15 (21,1%)	5 (18,5%)	10 (22,7%)	
≥2	13 (18,3%)	6 (22,2%)	7 (15,9%)	
STD				
Ne	66 (88,0%)	25 (83,3%)	41 (91,1%)	0,310
Da	9 (12,0%)	5 (16,7%)	4 (8,9%)	
Kontraceptivna zaštita				
Bez zaštite	46 (62,2%)	18 (29,6%)	28 (25,0%)	0,051
Kondom	15 (20,3%)	4 (33,3%)	11 (43,2%)	
Prekinut snošaj	9 (12,2%)	5 (59,3%)	4 (61,4%)	
Oralni kontraceptivi	4 (5,4%)	4 (18,5%)	0 (0%)	
Intrauterini kontraceptivi	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Pušački status				
Nepušač	35 (47,3%)	19 (61,3%)	16 (37,2%)	0,041*
Pušač	39 (52,7%)	12 (38,7%)	27 (62,8%)	

*statistički značajna razlika (p<0,05); χ^2 -test

Logističkom regresionom analizom ispitivana je povezanost posmatranih faktora rizika sa pojavom cervikalne displazije u grupu VR-HPV pozitivnih ispitanica (Tabela 15). Univarijantnom logističkom regresionom analizom ispitivana je povezanost svakog posmatranog faktora ponaosob sa pojavom displazije. Statistički značajna povezanost uočena je između broja seksualnih partnera i pojave displazije, kao i pušenja i pojave displazije.

Tabela 15. Univarijantna logistička regresiona razlike između VR-HPV pozitivnih ispitanica bez displazije i sa displazijom grlića materice

Posmatrani faktori rizika	Univarijantna logistička regresiona analiza	
	#Exp B (95%CI)	p
Životna dob	0,970 (0,926-1,017)	0,205
Bračni status	1,349 (0,503-3,618)	0,552
Nivo obrazovanja	0,771 (0,311-1,914)	0,576
Socijalni status	1,621 (0,582-4,515)	0,355
Životna dob pri prvom seksualnom odnosu	0,904 (0,744-1,098)	0,310
Stalni seksualni partner	0,448 (0,084-2,383)	0,347
Broj seksualnih partnera	1,825 (1,067-3,119)	0,028*
Menarha	0,992 (0,757-1,300)	0,955
Broj trudnoća	1,211 (0,797-1,840)	0,371
Broj abortusa	0,872 (0,475-1,603)	0,660
STD	0,488 (0,120-1,989)	0,317
Kontracepcija	0,608 (0,356-1,038)	0,068
Pušački status	2,672 (1,032-6,917)	0,043*

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); #Exp (B)

Multivarijantni logistički regresioni model formiran je od prediktora pojave displazije iz univarijantnog modela. Prediktori pojave cervikalne displazije kod VR-HPV pozitivnih ispitanica bili su broj partnera i pušenje.

Multivarijantnim logističkim regresionim modelom kao statistički značajn faktor, odnosno nezavisni prediktor pojave displazije unutar grupe VR-HPV pozitivnih žena, izdvojio se broj seksualnih partnera. Ispitanice sa većim brojem seksualnih partnera tokom života imale su 1,845 puta veću verovatnoću pojavljivanja cervikalne displazije (Tabela 16).

Tabela 16. Multivarijantna logistička regresiona razlike između VR-HPV pozitivnih ispitanica bez displazije i sa displazijom grlića materice

Posmatrani faktori rizika	Univarijantna logistička regresiona analiza	
	#Exp B (95%CI)	p
Broj seksualnih partnera	1,845 (1,051-3,236)	0,033*
Pušački status	2,637 (0,974-7,141)	0,056

*statistički značajna razlika ($p < 0,05$); #Exp (B)

5. DISKUSIJA

HPV infekcija je najčešća polno prenosiva bolest i pretpostavlja se da genitalnu infekciju ovim virusom tokom života stekne ~80% polno aktivnih žena i 90% muškaraca (126).

Iako je perzistentna VR-HPV infekcija najvažniji etiološki faktor u patogenezi CC, precizni patogenetski mehanizmi bolesti i pored višedecenijskih istraživanja i dalje nisu jasni (10,127). Poznato je da su najvažniji HPV genotipovi sa visokim onkogenim potencijalom HPV: 16, 18, 45 i 31, ali epidemiološke studije pokazuju da postoje i geografske varijacije u prevalenci različitih HPV genotipova, kao i varijacije u prevalenci HPV infekcije u populaciji žena u zavisnosti od životne dobi (10,127).

Karcinogeneza je složen, višestepeni proces i još uvek nema traga za odgovore na brojna pitanja. Virusom indukovana maligna transformacija ćelija je samo etapa u kompleksnom procesu nastanka tumora. Perzistentna cervikalna HPV infekcija predstavlja najznačajniju kariku u razvoju premalignih i malignih lezija grlića materice, ali za progresiju patohistoloških lezija važni su i drugi kofaktori (128). Uzimajući u obzir da prisustvo i značaj različitih faktora rizika zavise od socioloških, kulturoloških i drugih okolnosti u nekoj sredini, ova studija je bila fokusirana na ispitivanje distribucije VR-HPV infekcije i VR-HPV genotipova u cervikalnim displastičnim lezijama kod žena Crne Gore, kao i na ispitivanje faktora rizika za nastanak VR-HPV infekcije i cervikalnih premalignih lezija kod VR-HPV pozitivnih ispitanica.

Ova vrsta istraživanja je prvi put sprovedena u Crnoj Gori, a dobijeni podaci se odnose na period pre uvođenja HPV vakcine u program imunizacije. S obzirom da je Crna Gora država sa 620.029 stanovnika (po popisu iz 2011. godine) (www.monstat.org/cg/), bio je potreban dug vremenski period kako bi se sakupili uzorci žena kojima je indikovana biopsija grlića materice i identifikovale ispitanice sa patohistološki potvrđenom displazijom. Činjenica da je CC četvrti vodeći uzrok smrti od malignih bolesti među crnogorskim ženama (3), ukazuju da je neophodno intenzivirati napore na jačanju nacionalnog programa prevencije CC.

Imajući u vidu da distribucija HPV infekcije i HPV genotipova varira u različitim regijama i zemljama, postoje geografske razlike i u incidenciji i mortalitetu od CC (9).

Stoga je značajno odrediti prevalencu HPV infekcije i zastupljenost HPV genotipova. Pokazalo se da u populacijama dominiraju različiti HPV tipovi, verovatno kao rezultat slučajnog unošenja određenog tipa virusa u populaciju ili sposobnosti pojedinih HPV genotipova da se održe kao endemska infekcija određenog geografskog područja. Takođe je objavljeno da različita distribucija HPV genotipova može biti rezultat različitog imunološkog odgovora populacije (129).

5.1. Distribucija VR-HPV infekcije i VR-HPV genotipova u cervikalnim displastičnim lezijama

U našoj studiji, sa ciljem utvrđivanja prevalence HPV infekcije kod žena Crne Gore, izvršeno je HPV DNK testiranje cervikalnih briseva 198 ispitanica. Prisustvo najmanje jednog od 12 testiranih VR-HPV genotipova je utvrđeno kod 42,4% ispitanica.

Prevalenca HPV infekcije u okviru ove studije je slična prevalenciji od 44,3% utvrđenoj metodom hibridizacije *in situ* u istraživanju koje je obuhvatilo 115 žena Crne Gore 2014. godine (130), a viša u odnosu na podatak iz 2012. godine, kada je kod 189 crnogorskih žena, primenom metode enzimske restrikcije PCR produkata amplifikovanih grupno specifičnim prajmerima MY09/MY11 sa sedam različitih restrikcijskih endonukleaza, ona iznosila 20% (131). Uočene razlike u HPV prevalenciji mogu se objasniti malom veličinom uzorka, kao i različitom osetljivošću primenjenih metoda.

Prema podacima iz literature, globalna prevalenca cervikalne HPV infekcije 2011. godine bila je 32,1%, sa većom stopom infekcije u zemljama u razvoju (42,2%) nego u razvijenim zemljama (22,6%). U skoro svim evropskim zemljama HPV prevalencija je bila ispod 30%, s tim što je veća prevalencija zabeležena u istočnom delu Evrope (28,9%) u poređenju sa zemljama zapadnog dela Evrope (3,7%) (132).

U odnosu na prijavljene rezultate u drugim studijama iz regiona, prevalencija VR-HPV infekcije dobijena u okviru ovog istraživanja je nešto viša. Cervikalna infekcija najmanje jednim od 12 VR-HPV genotipova dijagnostikovana je kod 38,8% ispitanica od ukupno 1127 ispitanih žena iz Bugarske (133), a 15,5% od ukupno 541 žena iz Srbije (107). Najniži procenat registrovan je u istraživanju sprovedenom kod 199 žena sa

Kosova², u kojem je infekcija sa najmanje jednim od 14 HR-HPV genotipova dokazana kod 13,1% ispitanica (134). Prema podacima studije koja je prvi put sprovedena u Rumuniji, infekciju najmanje jednim od 15 HR-HPV tipova imalo je 29% žena od ukupno 1000 ispitanih (135). U navedenim istraživanjima prosečna životna dob ispitanica je bila slična životnoj dobi ispitanica u našoj studiji. Uočene varijacije distribucije HPV infekcije ukazuju na veliki značaj HPV istraživanja, s obzirom na postojanje kulturoloških i tradicionalnih razlika posmatrano globalno, regionalno i subregionalno.

Poznavanje distribucije HPV genotipova u periodu pre uvođenja HPV imunizacije u Crnoj Gori od velikog je epidemiološkog značaja, jer može ukazati na opravdanost sprovođenja vakcinacije i odabir vakcine. Rezultati ovog istraživanja mogu kasnije poslužiti za procenu efikasnosti sprovedene HPV vakcinacije.

U našoj studiji, najčešći genotip bio je HPV 16 (40,5%), kao što se pokazalo i u istraživanju sprovedenom 2012. godine u Crnoj Gori (36,8%) (131). Neke studije iz zemalja koje okružuju Crnu Goru, uključujući Republiku Severnu Makedoniju, Albaniju i Srbiju, pokazale su sličnu prevalenciju cervikalne HPV 16 infekcije (40,9%, 41,0%, odnosno 42,9%) (107,136,137). Prema rezultatima mnogobrojnih epidemioloških istraživanja, HPV 16 je najučestaliji HPV tip u svetu, kao i regionalno (izuzev u južnom delu Afrike). Njegova učestalost u odnosu na druge tipove varira u zavisnosti od geografskog područja (132,138). U nedavnim studijama iz 14 evropskih zemalja (uglavnom iz severnog i zapadnog dela Evrope), HPV 16 je bio najrasprostranjeniji HPV genotip, otkriven u 29,8% HPV pozitivnih cervikalnih briseva (raspon: 19-43%) (139).

Drugorangirani genotip po učestalosti u ovoj studiji bio je HPV 45, koji je detektovan kod 23,8 % VR-HPV pozitivnih ispitanica. Prema istraživanju sprovedenom u Srbiji, pokazalo se da je 15% žena imalo cervikalnu HPV 45 infekciju, što ga je činilo takođe drugim genotipom po učestalosti (107). Ovi podaci ne iznenađuju, s obzirom na činjenicu da su Srbija i Crna Gora bile u sastavu zajedničke države do 2006. godine i da su migracije stanovništva između ove dve države bile i ostale velike. Nasuprot tome, druge zemlje u Evropi su prijavile nisku učestalost ovog genotipa (2,2% u Hrvatskoj i 0,5% u Belgiji) (140,141).

² prema Rezoluciji Ujedinjenih nacija 1244 iz 1999. godine

Treći po učestalosti genotip u našoj kohorti bio je HPV 31, pronađen kod 20,2% VR-HPV pozitivnih žena. Druge studije su pokazale da je HPV 31 bio takođe jedan od najčešće dijagnostikovanih visokorizičnih genotipova u Evropi (138). U odnosu na druge HPV tipove, HPV 31 je bio drugi po učestalosti genotip u Rumuniji (135), Hrvatskoj (142), Bosni i Hercegovini (143) i na Kosovu (134) (12,3%, 12,6%, 14,3%, odnosno 15,4%), a trećerangirani u Srbiji (107) i Bugarskoj (10,7%, odnosno 12,2%) (133).

Genotip HPV 33 je bio četvrtorangirani (15,5%) i zajedno sa HPV tipovima: 16, 45 i 31, njegova zastupljenost je bila značajno veća u odnosu na preostalih 6 testiranih tipova u ovom istraživanju. U studiji sprovedenoj među ženama u Vojvodini, HPV 33 je imao nešto nižu prevalencu i bio je takođe četvrti po učestalosti od 12 VR-HPV testiranih genotipova (133).

Prevalencija HPV 18 u našoj studiji iznosila je 7,1%, što je u skladu sa rezultatima prijavljenim u drugim studijama u kojima se kretala u rasponu od 1,8% do 16,3% (144–147). Slično našim rezultatima, istraživanja sprovedena u Maroku pokazuju da su 16, 18, 31 i 45 najčešće dijagnostikovani cervikalni HR-HPV genotipovi (148–150).

HPV genotipovi: 56 i 58 su bili jednako zastupljeni kao i tip HPV 18. Preostali HPV genotipovi: 51, 52, 39, 59, 35, registrovani su u manjem procentu, ali se očekuje da će se njihova distribucija vremenom menjati zavisno od odaziva vakcinaciji.

Podaci našeg istraživanja ukazuju da su infekcije sa najmanje jednim od 7 VR-HPV genotipova (HPV 16, 45, 31, 33, 18, 52 i 58) ciljanih 9vHPV vakcinom bile značajno češće od infekcija izazvanih ostalim testiranim VR-HPV tipovima. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da profilaktička 9vHPV vakcina može potencijalno prevenirati oko 90% cervikalnih VR-HPV infekcija žena Crne Gore. U istraživanju sprovedenom među ženama u Bosni i Hercegovini, učestalost 7 visoko-rizičnih genotipova ciljanih 9vHPV vakcinom iznosila je 68% (143), što je niže od učestalosti istih HPV tipova kod žena u Crnoj Gori.

U našoj studiji, HPV pozitivne žene su većinom imale monotipsku infekciju, pri čemu se kao dominantni genotip izdvojio HPV 16, kako kod ispitanica sa monotipskom, tako i kod onih sa multiplom HPV infekcijom (21,4%, odnosno 19,0%). Zastupljenost testiranih VR-HPV genotipova u odnosu na tip infekcije je bila slična; među četiri

najčešća HPV tipa u obe posmatrane grupe bili su HPV: 16, 31, 33 i 45. Monotipske cervikalne HPV infekcije tipovima 16, 31 i 45 bile su značajno češće u odnosu na monotipske infekcije drugim VR-HPV tipovima, a kod multiplih infekcija HPV 16 i HPV 45 su bili značajno češći u poređenju sa ostalim testiranim VR-HPV tipovima. Koinfekciju više HPV tipova uočili smo u 31% slučajeva, pri čemu su dokazana od dva do četiri VR-HPV genotipa po uzorku. Najčešći HR-HPV tip viđen u kombinacijama bio je HPV-16. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da su dominantni VR-HPV genotipovi u monotipskim i multiplim infekcijama kod žena Crne Gore preventabilni i da opravdavaju primenu devetovalentne vakcine u našoj državi.

Slično našim rezultatima, istraživanje sprovedeno u Kini je utvrdilo da je prevalencija infekcija jednim HPV tipom veća od prevalencije dvostrukih i višestrukih HPV infekcija, a HPV16 je bio najčešće otkriven genotip u monotipskoj HPV infekciji i koinfekcijama dva tipa, a drugorangirani kod ostalih multiplih infekcija (151).

U evropskim zemljama, prevalencija multiplih VR-HPV infekcija pokazuje geografske varijacije u rasponu od oko 9% do 50% (127,152). Smatra se da je rizik od sticanja infekcije novim HPV tipom nezavisan od prethodne infekcije drugim tipovima (116). Značaj multiplih infekcija još uvek nije dovoljno proučen. Brojne studije su pokušale da definišu ulogu multiplih HPV infekcija u perzistenciji HPV-a. Neke studije su potvrdile udruženost multiple infekcije sa uspostavljanjem perzistentne infekcije, odnosno dužinom trajanja infekcije, dok su druge opovrgle ovu činjenicu (32).

Dokazano prisustvo HPV DNK u cervikalnom brisu nije nužno povezano sa postojanjem cervikalne displazije. Prirodni tok cervikalne HPV infekcije se karakteriše promenama u DNK pozitivnosti, tipovima i broju HPV genoma tokom vremena, što sve može uticati i biti rizik za nastanak i progresiju promena cervikalnog epitela (153). Pojedini HPV genotipovi u cervikalnim premalignim i malignim lezijama pokazuju različitu distribuciju, a podaci su dostupni iz malog broja studija sprovedenih u istočnom delu Evrope (154).

U našoj studiji, otkrili smo da je prevalencija cervikalne VR-HPV infekcije bila značajno češća kod žena sa displazijom nego kod žena sa normalnim patohistološkim nalazom cervikalnog bioptata (59,2%, odnosno 27,9%). Univarijantnom analizom, VR-

HPV infekcija se izdvojila kao faktor rizika za nastanak cervikalne displazije. VR-HPV pozitivne žene su bile u 3,746 (95% CI: 2,020-6,946) puta većem riziku da razviju displaziju u odnosu na one koje su bile VR-HPV negativne. Naši rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je povećan rizik od nastanka abnormalnosti cervikalnog epitela i raka grlića materice prisutan kod žena s perzistentnom HR-HPV infekcijom (155).

U odnosu na tip displazije, u našoj studiji dokazali smo da je infekcija značajno bila češća kod ispitanica sa HSIL (83,8%) u odnosu na ispitanice sa LSIL (35,9%) i kontrolnu grupu (27,9%), dok se u literaturi nalazi da se pozitivnost na HPV kod osoba sa CIN1 kreće između 50-70%, kod CIN2 ~85%, a kod CIN3 i ICC pozitivnost se penje i HPV DNK se dokazuje između 90% i 100% (138).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je svaki od analiziranih VR-HPV tipova bio više zastupljen kod žena sa cervikalnom displazijom u odnosu na žene bez displazije, izuzev HPV genotipova na koje nije usmerena 9vHPV vakcina: 35, 56 i 59. Dominantni genotip u svim patohistološkim grupama (izuzev LSIL, gde je bio drugorangirani) bio je genotip 16. Drugorangirani HPV tipovi kod žena sa displazijom bili su 31, 33 i 45, a zatim slede 52 i 58, 18 i 51, 39 i 56. Genotipovi 35 i 59 su detektovani kod malog broja ispitanica, pri čemu ni jedan nije dokazan kod žena sa displazijom.

U odnosu na tip displazije, naše istraživanje ukazuje da su genotipovi 16 i 33 visoko korelirali sa nastankom displazije, posebno kod žena sa HSIL lezijama. Univarijantnom regresionom analizom se cervikalna infekcija sa HPV 33 genotipom izdvojila kao faktor rizika za nastanak cervikalne displazije. HPV 33 pozitivne žene su bile u 3,593 (95% CI: 1,064-12,131) puta većem riziku da razviju displaziju u odnosu na one koje su bile HPV 33 negativne. Multivarijantnim modelom smo utvrdili da je HPV 16 infekcija grlića materice najjači nezavisni prediktor pojave cervikalnih prekanceroznih lezija i da su žene sa HPV 16 infekcijom imale oko 2,746 (95% CI: 1,098-7,700) puta veći rizik da razviju displaziju na grliću materice u odnosu na HPV 16 negativne. Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da HPV 16 i HPV 33 imaju značajnu ulogu u nastanku prekanceroznih lezija grlića materice kod žena u Crnoj Gori.

U skladu sa našim istraživanjem, studija koja je obuhvatila 44.102 ispitanica pokazala je da su razlike u stopi eliminacije virusa specifične za HPV genotip i povezane su sa određenim rizikom od progresije lezija grlića materice, te da su HPV 16 i HPV 33 genotipovi sa visokim malignim potencijalom, a infekcije koje izazivaju karakterišu se niskom stopom regresije, odnosno niskom stopom eliminacije virusa, što može biti objašnjenje za progresiju promena na epitelu grlića materice. Slično kao kod HPV tipova 16 i 33, stope eliminacije su niske i za HPV tipove 18 i 31 (156).

Brojne studije su izvestile da je HPV 16 dominantan genotip dokazan u prekanceroznim lezijama (107,123,142,151,157–159). Nedavno istraživanje ukazuje da je HPV 16 bio najčešći HPV genotip kod žena iz Hrvatske s histološki potvrđenim HSIL-om i ICC (142). Druga studija sprovedena u Hrvatskoj je utvrdila da se prevalenca VR-HPV infekcije povećavala sa težinom citološke dijagnoze, a žene sa HSIL gradusom imale su VR-HPV prevalenciju 80,6%. HPV 16 je bio dominantan genotip i kod žena sa HSIL bio je prisutan kod 63,8% ispitanica, a sledili su ga HPV 31 (8,6%), HPV 33 (6,9%) i HPV 18 (5,2%) (123).

Na globalnom nivou, tipovi 16 i 18 zajedno su uzročnici 25% cervikalnih displazija niskog stepena, više od 50% cervikalnih displazija visokog stepena i više od 70% svih slučajeva cervikalnog skvamoznog karcinoma i adenokarcinoma cerviksa, pri čemu je karcinom skvamoznih ćelija je tipična lezija, dok adenokarcinom predstavlja 10–15% karcinoma grlića materice, posebno u razvijenom svetu (8,11,160,161). HPV 16 infekcija je najčešći uzrok ICC, sa prevalencijom u rasponu od 47,7% u subsaharskoj Africi do 69,7% u Evropi/Severnoj Americi (162), a na drugom mestu je HPV 18. HPV 18 je češći uzrok adenokarcinoma grlića materice nego HPV16, a njegova prevalencija se kreće u rasponu od 12,6% u Centralnoj/Južnoj Americi do 25,7% u Južnoj Aziji (11,162).

Genotip HPV 31 se izdvojio kao dominantni genotip u LSIL lezijama kod ispitanica u našoj kohorti (12,8%) i bio je učestaliji kod žena sa displazijom u odnosu na žene bez displazije. Na osnovu dobijenih rezultata, predviđa se da će se kod 55% sa HPV 31 infekcijom razviti cervikalna displazija. Autori sugerišu da cervikalne infekcije HPV tipovima 31, 33 i 58 predstavljaju veći rizik za nastanak displazije CIN3 u poređenju sa drugim HPV infekcijama koje nisu izazvane genotipom 16 (163–168).

U našem istraživanju, češći pozitivan nalaz u lezijama HSIL u odnosu na LSIL i kontrolnu grupu zapažen je i kod genotipova 45, 52 i 58, ali se razlika nije pokazala značajnom. Na osnovu dobijenih PPV u našoj studiji, predviđa se da će se kod 50% HPV 45 pozitivnih žena, odnosno 80% žena sa HPV 52 ili HPV 58 infekcijom razviti cervikalna displazija. Svakako, potrebno je sprovesti istraživanje na većem uzorku i uključiti žene sa ICC kako bi dobili precizniji odnos ovih i drugih genotipova i njihovu povezanost sa nastankom cervikalne displazije i progresijom u ICC.

Slično HPV tipovima 16 i 18, smatra se i da HPV 45 ima veći potencijal za malignu transformaciju i imunološku evaziju domaćina od drugih visoko onkogenih genotipova (169). Uzimajući u obzir da je HPV 45 jedan od tri najčešće izolovana genotipa kod žena sa ICC (138), a zastupljen je u cervikalnim HPV infekcijama žena u Crnoj Gori, neophodno je pažljivo praćenje njegove distribucije na nacionalnom nivou. To je posebno važno s obzirom da je metaanaliza, koja je obuhvatila 423 studije iz 7 geografskih regiona (Afrika, Istočna Azija, Zapadna i Centralna Azija, Evropa, Severna Amerika, Južna i Centralna Amerika i Okeanija), ukazala na veći kancerogeni potencijal genotipova 16, 18 i 45 u odnosu na druge VR-HPV tipove, naglašavajući sklonost 18 i 45 ka endocervikalnim žlezdama i adenokarcinomu grlića materice (138). Autori sugerišu na značaj trijaže 16/18/45 pozitivnih žena, posebno u regijama gde se 45 registruje u značajnom udelu kod ICC u odnosu na premaligne lezije, kao što je u Africi (138,170).

Distribucija cervikalnih HPV 52 i HPV 58 varira u svetu, a njihova najveća učestalost je zapažena kod žena Istočne Azije. Prijavljeno je da 52 i 58 predstavljaju veliki rizik za progresiju displazije do gradusa CIN3, ali ne i za ICC (138).

Među našim ispitanicama, najmanje zastupljen bio je HPV 35, a zapažamo malu učestalost i HPV tipova 39, 56 i 59. Genotip HPV 35 je tipičan za region Afrike (138), a u Evropi se smatra odgovornim za 2% CC (171). Studije sprovedene u Srbiji su prijavile nizak procenat zastupljenosti HPV genotipova: 35, 39, 56 i 59 u cervikalnom brisu bez statistički značajnog uticaja na pojavu cervikalnih abnormalnosti (172,173). Prema podacima iz literature, HPV genotipovi: 39, 51, 56 i 59 se češće dijagnostikuju kod žena sa normalnim nalazom na grliću materice u odnosu na žene kod kojih je dijagnostikovao ICC, što ukazuje da njihov maligni potencijal nije tako izražen, kao i da imuni odgovor

domaćina može snažno da se suprostavi ovim infekcijama i dovede do eliminacije virusa (138).

Infekcija grlića materice sa najmanje jednim VR-HPV genotipom ciljanim 9vHPV vakcinom bila je dokazana kod 56,6% svih naših ispitanica sa displazijom i kod 83,8% žena sa displazijom gradusa HSIL. Naši rezultati su pokazali da infekcija grlića materice sa najmanje jednim od VR-HPV genotipova povezanih s vakcinom (16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58) značajno korelira sa cervikalnom displazijom, kao i sa displazijom gradusa HSIL. Na osnovu dobijenih prediktivnih vrednosti statusa VR-HPV infekcije izazvane tipovima sadržanim u 9vHPV vakcini, predviđa se da bi 9vHPV vakcina mogla da prevenira 60% slučajeva cervikalne displazije kod žena u Crnoj Gori.

Studija sprovedena u Vojvodini, koja je obuhvatila 1495 žena, izvestila je da bi upotreba 9vHPV vakcine mogla da spreči više od 84% prekanceroznih lezija grlića materice identifikovanih u studiji (174). U Kini je analizirano 2811 HPV pozitivnih žena i rezultati su pokazali da su genotipovi obuhvaćeni devetovalentnom vakcinom doprineli nastanku 85,2% CIN2 lezija, 97,9% CIN3 i 93,8% CC (175). Prema prevalenci i distribuciji HPV-a u Evropi, autori sa sigurnošću sugerišu da bi Gardasil9 vakcina mogla sprečiti do 89% ICC (31).

I u ispitivanoj i u kontrolnoj grupi, VR-HPV monotipska infekcija bila je značajno češća od multiplih infekcija, ali moguće je da bi se uočila drugačija prevalencija proširenjem spektra VR-HPV genotipova i testiranjem i na genotipove koji su neuobičajeni ili imaju nizak onkogeni potencijal. Pronašli smo povećanu incidencu multiplih HPV infekcija kod žena sa cervikalnom displazijom u poređenju sa onima bez displazije (31,1%, odnosno 22,6%); međutim, nije bilo povezanosti između multiplih infekcija i displazije. To potvrđuju i rezultati drugih studija (133,143,176,177).

Klinički značaj infekcije višestrukim HPV genotipovima nije jasan, ali neki autori smatraju da može biti povezan s progresijom bolesti (143,177–179). Za sada ne postoji konsenzus o tome da li multiple HPV infekcije povećavaju rizik od raka grlića materice više od monotipske HPV infekcije. Neka istraživanja su objavila da višestruke HPV infekcije imaju veći rizik od pojave i razvoja raka grlića materice nego pojedinačne HPV infekcije (176,180). Međutim, rezultati drugih studija pokazuju suprotno, tj. da

pojedinačne HPV infekcije imaju veći rizik od razvoja raka grlića materice u odnosu na višestruke infekcije (181,182). Ipak, smatra se da prisustvo multiple HPV infekcije povećava rizik za razvoj karcinoma, ali još uvek nije poznato da li je to posledica razlika u osetljivosti domaćina na infekciju, interakcije između više genotipova ili je posledica onkogenog potencijala svakog od prisutnih HPV genotipova (32). Možda bi istraživanje na većem uzorku dalo bolji uvid u ovu povezanost.

Rezultati ove studije daju preliminarne podatke o prevalenci i distribuciji VR-HPV genotipova u tkivu grlića materice, kao i njihovom uticaju na nastanak poremećaja cervikalnog epitela. Ograničenja ove studije su veličina uzorka i uključivanja samo 12 VR-HPV genotipova. Veća studija, s proširenim rasponom HPV genotipova, koja bi uključila i druge visokorizične, ali isto tako i niskorizične i neuobičajene genotipove, dala bi više podataka o prevalenci cervikalne HPV infekcije.

5.2. Uticaj faktora rizika na sticanje cervikalne VR-HPV infekcije i nastanak displazije na grliću materice

Mnogobrojna epidemiološka istraživanja su usmerena na razumevanje uloge faktora rizika koji utiču na dobijanje i perzistenciju HPV infekcije ili faktora koji posreduju u progresiji cervikalnih lezija (12,113,183–185). Sa ciljem da utvrdimo koji faktori su najznačajniji za sticanje cervikalne VR-HPV infekcije (ukupno 198 ispitanica) i pojavu displazije na grliću materice kod VR-HPV pozitivnih ispitanica u populaciji crnogorskih žena (ukupno 76 ispitanica), analizirali smo podatke popunjenih anonimnih upitnika.

Rezultati naše studije ukazuju da su ispitanice sa cervikalnom VR-HPV infekcijom bile značajno mlađe u odnosu na VR-HPV negativne žene. Rezultati multivarijantne logističke regresione analize su pokazali da je životna dob značajan nezavisni prediktor VR-HPV infekcije grlića materice, pri čemu su mlađe ispitanice imale 0,955 (95% CI: 0,923-0,989) puta veći rizik da steknu VR-HPV infekciju u odnosu na starije ispitanice. Objašnjenje za to je što životna dob snažno korelira sa nekim oblicima seksualnog ponašanja. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih studija koje su pokazale da je mlađa životna dob seksualno aktivnih žena faktor rizika za sticanje genitalne HPV infekcije (186,187). Naime, u ranijim istraživanjima uočeno je da je HPV

DNK prevalencija najveća kod žena mlađih od 25 godina, zatim opada u grupama žena srednjih godina, dok se kod žena životne dobi od 35–54 godine primećuje porast stope prevalencije. Pretpostavlja se da do porasta HPV prevalence u kasnijoj životnoj dobi može doći zbog reaktivacije latentne infekcije nakon imunološkog starenja ili zbog sticanja nove HPV infekcije usled promena u seksualnom ponašanju (187). U odnosu na pojavu displazije, naši rezultati su pokazali da su ispitanice sa cervikalnom displazijom bile značajno mlađe u odnosu na žene bez displazije ($38,31 \pm 9,62$ godina, odnosno $41,29 \pm 10,50$ godina). Studija sprovedena u Engleskoj je takođe objavila da su ispitanice sa cervikalnom displazijom bile mlađe od ispitanica sa normalnim patohistološkim nalazom (102).

U našem istraživanju su dominantno bile zastupljene udate žene, većinom sa srednješkoljskim nivoom obrazovanja i srednjeg materijalnog statusa, koji je prema subjektivnom osećaju ispitanica odgovarao proseku. U odnosu na spomenute sociodemografske karakteristike, nije uočena statistički značajna razlika između VR-HPV pozitivnih i VR-HPV negativnih ispitanica, kao ni značajna razlika kod žena sa detektovanom VR-HPV infekcijom u odnosu na patohistološki status.

Iako se bračni status tradicionalno dovodi u vezu sa monogamnim stilom života žena u Crnoj Gori, nije pokazano da su udate žene u manjem riziku od sticanja genitalne VR-HPV infekcije i razvoja cervikalne displazije. Ipak, globalne društvene promene doprinose većim slobodama, menjaju se seksualni stavovi, pa stoga bračni status nije garancija seksualnog zdravlja. U literaturi se mogu naći različiti rezultati u pogledu povezanosti bračnog statusa sa genitalnom VR-HPV pozitivnošću. Jedna od studija je utvrdila najveću prevalenciju HPV infekcije među razvedenim ženama, uz pretpostavku autora da razvedene žene imaju tendenciju da stiču nove seksualne partnere, čime se povećava rizik od HPV infekcije i razvoja premalignih cervikalnih lezija. S druge strane, postoje izveštaji o većoj HPV prevalenciji među osobama u braku (61%) u odnosu na one koje nisu u bračnoj zajednici (39%) (188), ali i većoj pozitivnosti među samicama nego među udatim ženama (189). Činjenica da publikovani podaci navedenih studija nisu saglasni ukazuje na značajan uticaj društvenog miljea na navike i ponašanja koja determinišu rizik za sticanje i perzistenciju HPV infekcije u populaciji u kome se istraživanje sprovodi.

Nivo obrazovanja je veoma značajan faktor i može uticati na bolje razumevanje rizika povezanih sa reproduktivnim zdravljem. Našim istraživanjem nije dokazana povezanost između nivoa obrazovanja i VR-HPV statusa ili pojave displazije, mada literatura ukazuje da je nedostatak obrazovanja povezan sa visokorizičnim seksualnim praksama i lošim stavom po pitanju zdravlja, što rezultira porastom polno prenosivih infekcija kao što je HPV (190). Naime, rezultati prethodnih studija pokazuju da su osobe bez formalnog obrazovanja (nepismene) u većem riziku od dobijanja HPV infekcije (189,191).

Opšte je prihvaćeno da su ponašanja vezana za seksualnu aktivnost glavni faktori rizika za nastanak HPV infekcije i pojavu cervikalnih abnormalnosti (113). Analiza reproduktivnog profila i seksualnih navika crnogorskih ispitanica pokazala je da su životna dob pri prvom seksualnom odnosu i broj seksualnih partnera faktori rizika povezani sa sticanjem cervikalne VR-HPV infekcije, a broj seksualnih partnera značajan kofaktor za pojavu cervikalne displazije.

U sprovedenom istraživanju, prosečna životna dob stupanja u prvi seksualni odnos u uzorku od 198 ispitanica bila je 20 godina, pri čemu su statistički značajno mlađe bile VR-HPV pozitivne ispitanice. Mlađe ispitanice su imale 0,844 (95% CI: 0,750-0,951) puta veći rizik da steknu genitalnu VR-HPV infekciju u odnosu na starije. Objašnjenje za to je što početak seksualne aktivnosti pogoduje sticanju i lakom širenju HPV infekcije (116,192). Neki biološki mehanizmi, kao što su nezrelost epitela grlića materice, neadekvatna proizvodnja zaštitne cervikalne sluzi i povećana ektopija grlića materice kod adolescenata i mlađih žena, olakšavaju cervikalnu HPV infekciju (193,194). Smatra se da rano stupanje u seksualne odnose može biti povezano i sa drugim rizičnim oblicima seksualnog ponašanja, kao što su nezaštićeni seksualni odnos, veći broj seksualnih partnera tokom života i stupanje u odnos sa promiskuitetnim partnerima (194).

Prema kliničkim studijama, prevalencija HPV infekcije među adolescentkinjama je ~30% (195). Rezultati studije sprovedene u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) su pokazali da 48 meseci nakon prvog seksualnog odnosa >50% mladih žena je imalo cervikalnu HPV infekciju; ova studija je takođe pokazala da je i nepenetrativna seksualna aktivnost bila povezana sa sticanjem HPV-a, ali mnogo ređe nego prilikom seksualnog odnosa (192). Navodi se da je starost pri prvom seksualnom odnosu važan faktor rizika

za razvoj cervikalnih patohistoloških promena zbog povećane ranjivosti grlića materice tokom adolescencije (196), ali u našoj studiji nismo dokazali korelaciju ranog stupanja u seksualne odnose sa nastankom displazije na grliću materice. Objašnjenje se može naći u činjenici da je prosečna životna dob pri stupanju u seksualne odnose u obe grupe ispitanica obuhvaćenih ovim istraživanjem bila iznad životne dobi koja se smatra rizičnom po pitanju zrelosti cervikalnog epitela.

U okviru ovog istraživanja utvrdili smo korelaciju broja seksualnih partnera sa sticanjem cervikalne VR-HPV infekcije; broj ispitanica koje su imale ≥ 3 seksualnih partnera bio je značajno veći u grupi VR-HPV pozitivnih ispitanica u odnosu na grupu koju su činile ispitanice bez dokazane infekcije. Univarijantnom analizom se broj seksualnih partnera izdvojio kao prediktor VR-HPV infekcije grlića materice; žene koje su imale ≥ 3 seksualnih partnera su bile u 1,408 (95% CI: 1,150-1,724) puta većem riziku da steknu genitalnu VR-HPV infekciju u odnosu na žene sa manjim brojem partnera. Takođe smo utvrdili da je broj seksualnih partnera najjači nezavisni prediktor pojave displazije unutar grupe VR-HPV pozitivnih žena. VR-HPV pozitivne ispitanice sa većim brojem partnera (≥ 3) imaju 1,845 (95% CI: 1,051-3,236) puta veću verovatnoću razvoja cervikalne displazije u odnosu na ispitanice sa manjim brojem partnera. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima ranijih studija koje su potvrdile da je broj seksualnih partnera jedan od najvažnijih faktora rizika za sticanje, odnosno širenje HPV infekcije (99,197–201). U istraživanju koje je obuhvatilo 467 žena u SAD- u, broj seksualnih partnera bio je značajan prediktor HPV infekcije. U poređenju sa ženama koje su imale jednog seksualnog partnera tokom celog života, žene koje su imale 6-9 i ≥ 10 partnera imale su pet puta, odnosno jedanaest puta, veću verovatnoću da steknu HPV infekciju (200). Druga studija sprovedena u Danskoj otkrila je da su žene koje su imale ≥ 3 seksualnog partnera u poređenju sa ženama koje su imale jednog partnera bile u skoro deset puta većem riziku da budu HPV DNK pozitivne (198). Mnoge studije su takođe sugerisale da veći broj seksualnih partnera predstavlja visok rizik za sticanje cervikalne HPV infekcije, ali i za nastanak abnormalnosti cervikalnog epitela i raka grlića materice (185,202–204).

U našem istraživanju, zastupljenost ispitanica sa stalnim seksualnim partnerom nije se statistički značajno razlikovala između analiziranih grupa ispitanica, u odnosu na VR-HPV status i u odnosu na patohistološki rezultat cervikalnog bioptata. Činjenica da

je među VR-HPV DNK pozitivnim crnogorskim ženama 90% imalo stalnog partnera, kao i da je 33% ispitanih žena prijavilo samo jednog partnera tokom života, ukazuje na značajnu ulogu muškaraca u širenju HPV infekcije. Brojne studije su pokazale da se detekcija HPV DNK i kod muškaraca i kod žena značajno povećava sa povećanjem broja seksualnih partnera (205,206). Studija sprovedena u SAD- u pokazala je da su žene čiji su muški seksualni partneri imali 4-10 partnerki tokom života bile u tri puta većem riziku da postanu HPV pozitivne u poređenju sa ženama čiji su muški partneri imali samo jednu partnerku (197). Objedinjena analiza Međunarodne agencije za istraživanje raka pokazala je da su žene čiji su muževi imali vanbračne veze imale približno jedan i po puta veću verovatnoću da postanu HPV pozitivne (99).

Nije bilo statistički značajne razlike u prosečnoj životnoj dobi naših ispitanica u vreme menarhe, kada se uporede kontrolna i studijska grupa, kako u odnosu na VR-HPV infekciju tako i u odnosu na prisustvo cervikalne displazije. Istraživanja sprovedena u Srbiji i Koreji takođe nisu dokazala povezanost životne dobi u vreme menarhe sa pojavom prekanceroznih lezija na grliću materice (107,158). Studije poprečnog preseka sugerišu da žene koje prvi odnos imaju ubrzo nakon menarhe su podložnije cervikalnoj HPV infekciji i stoga imaju veći rizik od nastanka cervikalne neoplazije u poređenju sa ženama koje odgađaju početak svoje seksualne aktivnosti (207,208). Međutim, longitudinalna studija, koja je bila fokusirana na istraživanje podložnosti adolescentnog grlića materice HPV infekciji, testiranjem na HPV DNK unutar 12 meseci od početka seksualne aktivnosti ispitanica, otkrila je da se rizik od incidentne HPV infekcije grlića materice povećava kako se povećava interval između menarhe i prvog snošaja (209). Oprečne tvrdnje upućuju da su neophodna dalja istraživanja na ovom polju, jer se još uvek vrlo malo zna o odnosu životne dobi u vreme menarhe sa sticanjem HPV infekcije ili nastankom histoloških promena na grliću materice (209–212).

U okviru ove studije, ispitivali smo povezanost broja trudnoća sa nastankom cervikalnih prekanceroznih lezija. I u studijskoj i u kontrolnoj grupi su najzastupljenije bile žene sa ≥ 3 trudnoća. Međutim, nismo dokazali pozitivnu korelaciju između broja trudnoća i displazije, što je u skladu sa rezultatima nekih ranijih studija (99,102,117). Za razliku od naših rezultata, studija sprovedena u Hong Kongu, koja je obuhvatila 44 219 ispitanica, pokazala je da su žene sa ≥ 3 trudnoće bile u visokom riziku da razviju

cervikalnu displaziju. Međunarodna agencija za istraživanje raka sprovela je studije koje su otkrile da je značajno veći rizik od CIN3/CIS i ICC među ženama sa visokim paritetom (115,213). Globalno posmatrano, literatura podržava povezanost između visokog pariteta i rizika od raka grlića materice (214). Smatra se da veći broj trudnoća može podstaći neoplastične promene grlića materice hormonskim uticajem (povišeni nivoi estrogena) ili lokalnim promenama tkiva tokom procesa vaginalnog porođaja, čime se TZ izlaže kancerogenim agensima (99,213,215).

Analizirali smo i uticaj abortusa na nastanak cervikalne displazije među ženama sa VR-HPV infekcijom. Ispitanice bez prethodnih abortusa su bile dominantno zastupljene. U odnosu na spomenuti reproduktivni faktor, nije uočena statistički značajna razlika između žena sa detektovanom VR-HPV infekcijom u odnosu na patohistološki status. Pronašli smo da uloga abortusa u cervikalnoj kancerogenezi nije potvrđena ni u drugim studijama (107,108), ali ne i u svim (210,214,216), što ukazuje na potrebu za dodatnim proučavanjem ove veze.

Tokom ovog istraživanja, podatke o drugim STD (kondilomi, genitalni herpes, hlamidijalna infekcija) ispitanica smo prikupljali iz anonimnih upitnika. Većina žena nije prijavila postojanje navedenih koinfekcija, pa stoga nismo dokazali da su druge STD značajni faktor koji bi olakšao HPV kolonizaciju i perzistenciju u epitelu cerviksa, kao ni nastanak displazije. Da smo u našoj studiji testirali ispitanice na druge virusne i bakterijske infekcije koje se svrstavaju u grupu STD dobili bi se pouzdaniji podaci o vezi tih infekcija sa cervikalnom HPV infekcijom i nastankom displazije. Istraživanje sprovedeno među korejanskim ženama takođe nije dokazalo vezu između STD i razvoja displastičnih promena na grliću materice (158). Međutim, brojni epidemiološki podaci pokazuju da koinfekcije imaju značajnu ulogu u sticanju i trajanju cervikalne HPV infekcije (110). Jedna od studija je objavila da infekcija grlića materice drugim polno prenosivim infekcijama, kao što su *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HSV i *Trichomonas vaginalis*, može povećati osetljivost na genitalnu HPV infekciju putem mikrotrauma ili upale grlića materice, a imunološkim mehanizmima doprineti perzistentnosti HPV infekcije (217).

U ovom istraživanju smo analizirali uticaj kontracepcije na pojavu displazije. Većina ispitanica studijske i kontrolne grupe nije koristila nijedan vid kontraceptivne

zaštite, što se može objasniti činjenicom da su u najvećem broju bile zastupljene udate žene i one koje su prijavile stalnog seksualnog partnera. Nijedna žena nije koristila intrauterinu zaštitu, a zastupljenost žena u odnosu na druge vidove zaštite (upotreba kondoma, oralnih kontraceptiva, prekinuti snošaj) se statistički značajno nije razlikovala između grupa u odnosu na pojavu displazije.

Upotreba kondoma od strane muških partnera pri vaginalnom odnosu je u našoj studiji posmatrana kao protektivni faktor sticanja cervikalne HPV infekcije. Iako su među ispitanicama čiji su partneri koristili ovaj vid kontraceptivne zaštite većinu činile VR-HPV DNK negativne žene, naši rezultati nisu potvrdili da upotreba kondoma sprečava prenos HPV- a između seksualnih partnera i da smanjuje rizik od pojave cervikalnih lezija.

Zaštitna uloga kondoma prepoznata je u sprečavanju sticanja nekih polno prenosivih bolesti, ali još uvek ne postoje konzistentni dokazi da kondom smanjuje rizik od genitalne HPV-DNK pozitivnosti. Autori sugerišu da kondom ne mogu sprečiti HPV infekciju (218), jer do prenosa može doći i putem nepenetrativne seksualne aktivnosti (219), ali mogu pružiti delimičnu zaštitu (111). Neke studije sugerišu da upotreba kondoma od strane muškaraca ne smanjuje rizik od prenosa genitalne HPV infekcije (192,220–224), dok druge studije potvrđuju zaštitnu ulogu upotrebe kondoma (107,158,225). Prospektivna studija, koja je bila eksplicitno dizajnirana za procenu značaja kondoma u sprečavanju HPV infekcije, sugerise da pravilna i konstantna upotreba kondoma efikasno smanjuje rizik i do 70% od prenošenja genitalne HPV infekcije (111). U literaturi se mogu naći i studije koje su prijavile paradoksalne rezultate da upotreba kondoma povećava rizik od sticanja cervikalne HPV infekcije, što je verovatno posledica nepravilne i nedosledne upotrebe kondoma, kao i zbog tendencije da se oni koriste s partnerima procenjenog većeg rizika (npr. novi partneri, povremeni partneri, seksualni radnici), ali ne i s partnerima koji su procenjeni kao sigurni (npr. stalni partneri ili supružnici) (226–228).

Brojne studije su izvestile da redovna upotreba kondoma od strane muških partnera štiti žene od razvoja HSIL- a (218,229,230) i ICC (231,232), odnosno da nekorišćenje kondoma predstavlja rizik za razvoj abnormalnosti cervikalnog epitela (216). Prospektivna studija, sprovedena u Holandiji na ženama sa CIN lezijama i

njihovim muškim partnerima, pokazala je da konstantna upotreba kondoma podstiče regresiju CIN lezija i eliminaciju HPV infekcije kod prethodno HPV pozitivnih žena i muškaraca (225,233).

Uloga oralnih kontraceptiva u nastanku abnormalnosti cervikalnog epitela kod HPV pozitivnih žena je analizirana u mnogim epidemiološkim istraživanjima. Podaci nekoliko studija ukazuju da dugotrajna upotreba oralnih kontraceptiva može biti kofaktor koji povećava rizik od CC (99,108,109,115). Međutim, postoje i studije u kojima nije uočena korelacija između upotrebe oralnih kontraceptiva i nastanka CC (234). Naše istraživanje je obuhvatilo relativno mali broj ispitanica, zbog čega nije pokazano da upotreba oralnih kontraceptiva korelira sa nastankom cervikalne displazije među crnogorskim ženama.

Dosadašnje studije pružaju dokaze da u prisustvu HPV infekcije, pušenje predstavlja kofaktor u razvoju premalignih lezija grlića materice i ICC (109,230,235–240). U našem istraživanju je pokazano da konzumiranje cigareta značajno korelira sa nastankom cervikalne displazije među crnogorskim ženama. Više od polovine VR-HPV pozitivnih ispitanica sa displazijom su bile pušači (62,8%), a većinu žena u grupi bez displazije činile su nepušači. Rezultati univarijantne analize su pokazali da je pušenje prediktor cervikalne displazije i da je rizik od nastanka displazije 2,672 (95% CI: 1,032–6,917) puta veći kod žena pušača u odnosu na one koje nikada nisu pušile. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima više studija koje su takođe dokazale kofaktorsku ulogu pušenja u nastanku cervikalnih premalignih lezija (241–245). Istraživanje sprovedeno u Koreji je pokazalo da su VR-HPV pozitivne žene pušači u 2,5 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju, odnosno skoro 3,5 puta većem riziku da razviju ICC, u odnosu na VR-HPV pozitivne žene sa normalnim patohistološkim nalazom bioptata grlića materice (158). Epidemiološke studije sugerišu da pušenje cigareta, nezavisno od seksualnih navika, može biti povezano sa visokim rizikom od razvoja premalignih i malignih lezija grlića materice. Postoje dva različita mehanizma pomoću kojih pušenje može povećati rizik od bolesti grlića materice: karcinogeni i imunološki. Dim cigarete sadrži mutagene, karcinogene i druge komponente koje mogu direktno delovati kao inicijatori i/ili promotori karcinogeneze grlića materice, jer doprinose dodatnim genetskim oštećenjima HPV inficiranih cervikalnih epitelih ćelija i time mogu ubrzati

napredovanje maligniteta (10,116,117). Sa druge strane, ove komponente mogu uticati i na supresiju imunološkog sistema, jer značajno smanjuju broj i aktivnost NK ćelija, redukuju broj Langerhansovih ćelija i smanjuju proizvodnju imunoglobulina klase IgG i IgA, omogućavajući indirektno VR-HPV infekciji da opstane i napreduje u tkivu grlića materice (118,246,247). Proizvodi dima cigareta pronađeni su u sekretima cervikalne sluzi (211) i u tkivu grlića materice žena pušača (248–251), a smatra se da dim cigarete deluje i na nepušače, kada se nađu u pušačkoj zoni (252,253). U literaturi se navodi da konzumiranje cigareta 25 i više godina predstavlja visok rizik za nastanak CIN3 promena i CC (210).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su od nacionalnog značaja, jer identifikuju faktore rizika koji koreliraju sa sticanjem genitalne VR-HPV infekcije i nastankom cervikalne displazije u populaciji žena Crne Gore. Oni pružaju osnovu za osmišljavanje i uspostavljanje edukativnih programa za očuvanje i unapređenje zdravlja i razvoj strategija sa ciljem prevencije i ranog otkrivanja cervikalne HPV infekcije i pridruženih bolesti.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti sledeće:

1. Prevalencija cervikalne VR-HPV infekcije kod testiranih žena bila je 42,4%.
2. Najzastupljeniji genotipovi među VR-HPV pozitivnim ženama bili su: HPV 16 (40,5%), HPV 45 (23,8 %), HPV 31 (20,2%) i HPV 33 (15,5%).
3. Zastupljenost cervikalne infekcije sa najmanje jednim od 7 VR-HPV genotipova (HPV 16, 45, 31, 33, 18, 52 i 58) ciljanih 9vHPV vakcinom među VR-HPV pozitivnim ženama bila je visoka (91,7%), što opravdava primenu profilaktičke 9vHPV vakcine.
4. Većina žena je imala monotipsku cervikalnu VR-HPV infekciju (69,1%), a najzastupljeniji HPV genotipovi u monotipskim infekcijama među VR-HPV pozitivnim ženama bili su 16 (21,4%), 31 (14,3%) i 45 (11,9%).
5. Dominantni genotipovi među VR-HPV pozitivnim ženama sa multiplom cervikalnom infekcijom bili su HPV 16 (19%) i HPV 45 (11,9%).
6. Cervikalna VR-HPV infekcija je bila prisutna kod 59,2% žena sa skvamoznim intraepitelnim lezijama grlića materice, a VR-HPV pozitivne žene bile su u 3,7 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na VR-HPV negativne žene.
7. Dominantan VR-HPV genotip kod žena sa skvamoznim intraepitelnim lezijama grlića materice bio je HPV 16 (28,9%).
8. Cervikalna HPV 33 infekcija se pokazala kao prediktor nastanka skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice. HPV 33 pozitivne žene su bile u 3,6 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na HPV 33 negativne žene.
9. Cervikalna HPV 16 infekcija se izdvojila kao najjači nezavisni prediktor pojave cervikalne displazije, pri čemu su HPV 16 pozitivne žene imale 2,7 puta veći rizik da razviju displaziju na grliću materice u odnosu na one koje su bile HPV 16 negativne.
10. Cervikalna VR-HPV infekcija, kao i HPV 16 i HPV 33 infekcije, visoko koreliraju sa

nastankom cervikalne displazije gradusa HSIL, što potvrđuje značajnu ulogu VR-HPV infekcije, a posebno HPV genotipova 16 i 33, u napredovanju cervikalnih premalignih lezija.

11. Infekcija grlića materice sa najmanje jednim VR-HPV genotipom ciljanim 9vHPV vakcinom bila je dokazana kod 56,6% žena sa displazijom i kod 83,8% žena sa displazijom gradusa HSIL, što se pokazalo statistički značajno. Na osnovu dobijenih prediktivnih vrednosti (PPV i NPV), predviđa se da bi 9vHPV vakcina mogla da prevenira 60% slučajeva cervikalne displazije kod ispitivane grupe žena.
12. Multipla cervikalna infekcija je dijagnostikovana kod 31,1% žena sa displazijom (21,4% sa LSIL i 35,5% sa HSIL) i kod 22,6% žena bez displazije, ali nije dokazana povezanost između multiple cervikalne VR-HPV infekcije i nastanka skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice.
13. Životna dob se izdvojila kao jedan od kofaktora koji visoko korelira sa sticanjem VR-HPV infekcije grlića materice, pri čemu su mlađe žene bile u 0,9 puta većem riziku u odnosu na starije žene.
14. Prosečna životna dob stupanja u prvi seksualni odnos bila je 20 godina, pri čemu su mlađe žene imale 0,8 puta veći rizik da steknu cervikalnu VR-HPV infekciju u odnosu na starije.
15. Žene koje su imale ≥ 3 seksualnih partnera tokom života su bile u 1,4 puta većem riziku da steknu genitalnu VR-HPV infekciju u odnosu na žene sa manjim brojem partnera.
16. Pokazalo se i da je broj seksualnih partnera nezavisni najjači prediktor pojave cervikalne displazije unutar grupe VR-HPV pozitivnih žena. VR-HPV pozitivne žene sa ≥ 3 partnera tokom života su imale 1,8 puta veću verovatnoću da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na žene sa manjim brojem seksualnih partnera.
17. Konzumiranje cigareta je značajan kofaktor za nastanak skvamoznih intraepitelnih lezija grlića materice u grupi VR-HPV pozitivnih žena. Žene pušači bile su u 2,7 puta većem riziku da razviju cervikalnu displaziju u odnosu na žene nepušače.

7. LITERATURA

1. Mu-Mu-Shwe null, Harano T, Okada S, Aye-Aye-Win null, Khin-Saw-Aye null, Hlaing-Myat-Thu null, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection among women with normal and abnormal cervical cytology in Myanmar. *Acta Med Okayama*. 2014;68(2):79–87.
2. Poljak M, Seme K, Maver PJ, Kocjan BJ, Cuschieri KS, Rogovskaya SI, et al. Human Papillomavirus Prevalence and Type-Distribution, Cervical Cancer Screening Practices and Current Status of Vaccination Implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine*. 2013 Dec;31:H59–70.
3. Strahinja RM. Institut za javno zdravlje Crne Gore. 2018 [cited 2024 Mar 18]. Maligne neoplazme u Crnoj Gori 2013. Available from: <https://www.ijzcg.me/me/registar-malignih-neoplazmi>
4. Hausen HZ. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1996 Oct;1288(2):F55–78.
5. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009 Feb;384(2):260–5.
6. Hadžisejdić I, Grce M, Grahovac B. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa: mehanizmi karcinogeneze, epidemiologija, dijagnostika i profilaksa. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*. 2010 Jun 7;46(2):112–23.
7. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*. 1976 Feb;36(2 pt 2):794.
8. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*. 2010 Nov;11(11):1048–56.
9. Krul, Van De Vijver, Schuurin, Van Kanten, Peters, Fleuren. Human papillomavirus in malignant cervical lesions in Surinam, a high-risk country,

- compared to the Netherlands, a low-risk country. *Int J Gynecol Cancer*. 1999 May;9(3):206–11.
10. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518–27.
 11. Galani E, Christodoulou C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009 Nov;15(11):977–81.
 12. Malik S, Sah R, Muhammad K, Waheed Y. Tracking HPV Infection, Associated Cancer Development, and Recent Treatment Efforts—A Comprehensive Review. *Vaccines*. 2023 Jan 1;11(1):102.
 13. Cubie HA, Cuschieri KS, Tong CYW. Papillomaviruses and polyomaviruses. In: *Medical Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2024 Feb 28]. p. 452–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702040894000603>
 14. Araldi RP, Assaf SMR, Carvalho RFD, Carvalho MACRD, Souza JMD, Magnelli RF, et al. Papillomaviruses: a systematic review. *Genet Mol Biol*. 2017 Feb 16;40(1):1–21.
 15. de Oliveira G, Eleutério J, Passos M. The extraordinary trajectory of the DST v31n1 3-6. 2019 Sep 27;
 16. Bernard HU. Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends in Microbiology*. 1994 Apr;2(4):140–3.
 17. Gottschling M, Stamatakis A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso A, Bravo IG. Multiple Evolutionary Mechanisms Drive Papillomavirus Diversification. *Molecular Biology and Evolution*. 2007 Feb 13;24(5):1242–58.
 18. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *Journal of General Virology*. 2018 Aug 1;99(8):989–90.

19. Beutner, Md, PhD KR, Tying, Md, PhD S. Human Papillomavirus and Human Disease. *The American Journal of Medicine*. 1997 May;102(5):9–15.
20. Cobo F. Human papillomavirus infections: from laboratory to clinical practice. Cambridge: Woodhead Pub; 2012. 149 p. (Woodhead Publishing series in biomedicine).
21. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005 Mar;32:1–6.
22. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *The EMBO Journal*. 1982 Feb;1(2):231–6.
23. Rebrikov DV, Bogdanova EA, Bulina ME, Luk'ianov SA. [A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtraction hybridization]. *Mol Biol (Mosk)*. 2002;36(6):1002–11.
24. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun;324(1):17–27.
25. Van Doorslaer K. Revisiting Papillomavirus Taxonomy: A Proposal for Updating the Current Classification in Line with Evolutionary Evidence. *Viruses*. 2022 Oct 21;14(10):2308.
26. Pimenoff VN, De Oliveira CM, Bravo IG. Transmission between Archaic and Modern Human Ancestors during the Evolution of the Oncogenic Human Papillomavirus 16. *Mol Biol Evol*. 2017 Jan;34(1):4–19.
27. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):1–17.
28. Doorbar J, Jenkins D, Stoler MH, Bergeron C. Biology of the Human Papillomavirus Life Cycle: The Basis for Understanding the Pathology of PreCancer and Cancer. In: *Human Papillomavirus* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2024 Feb 28]. p. 67–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128144572000052>

29. Bosch FX, De Sanjosé S. The Epidemiology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *Disease Markers*. 2007;23(4):213–27.
30. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov;30:F55–70.
31. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health*. 2021 Jan 20;8:552028.
32. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*. 2005 Mar;32:16–24.
33. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2002 Apr 1;55(4):244–65.
34. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/11-25.
35. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*. 2010 May;117(2):S5–10.
36. Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Cecilia Rodriguez A, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005 Jun;337(1):76–84.
37. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525–41.
38. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Fields virology*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa; 2001. p. 2197–229.

39. Sapp M, Volpers C, Muller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *Journal of General Virology*. 1995 Sep 1;76(9):2407–12.
40. Modis Y. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal*. 2002 Sep 16;21(18):4754–62.
41. Hampson IN, Oliver AW, Hampson L. Potential Effects of Human Papillomavirus Type Substitution, Superinfection Exclusion and Latency on the Efficacy of the Current L1 Prophylactic Vaccines. *Viruses*. 2020 Dec 24;13(1):22.
42. Zheng ZM. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006;11(1):2286.
43. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003 Aug 11;22(33):5201–7.
44. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, editors. *Principles and Practice of Clinical Virology* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2009 [cited 2024 Mar 1]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470741405>
45. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 8. edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. 836 p.
46. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, et al. HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2013;2013:1–9.
47. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology*. 1999 Dec;9(6):379–86.
48. 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 Jun;79(11):6732–40.

49. Jovanović T, Marković L. Virusologija. Beograd: Quark; 2008.
50. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011 Jun;414(2):153–63.
51. Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, Sonbuchner TM, Lin BY, Zou N, et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Mar 23;101(12):4030–5.
52. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005 Mar;32:7–15.
53. Frattini MG, Lim HB, Laimins LA. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Apr 2;93(7):3062–7.
54. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 Is Required for E2-Mediated Transcriptional Activation but Not Genome Partitioning of All Papillomaviruses. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9530–43.
55. Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology*. 2009 Feb;384(2):360–8.
56. Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *The EMBO Journal*. 1994 Nov;13(22):5451–9.
57. Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2009 May;66(10):1700–17.
58. Seo YS, Müller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B, et al. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Apr;90(7):2865–9.

-
59. Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA Replication. *Intervirology*. 1994;37(3–4):150–8.
 60. Wallace NA, Galloway DA. Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology*. 2014 Jun;26:30–42.
 61. Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. The Human Papillomavirus Type 18 (HPV18) Replication Protein E1 Is a Transcriptional Activator When Interacting with HPV18 E2. *Virology*. 1998 Mar;242(2):378–86.
 62. Hines CS, Meghoo C, Shetty S, Biburger M, Brenowitz M, Hegde RS. DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1998 Mar;276(4):809–18.
 63. Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Apr;89(7):3159–63.
 64. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*. 2010 Jun;118(1):S12–7.
 65. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):362–72.
 66. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):550–60.
 67. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol*. 1993 Oct;67(10):6170–8.
 68. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljev F, Eienkel J, Hoeckel M, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*. 2003 Jun 19;22(25):3977–84.

-
69. Gao P, Zheng J. High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Viol J*. 2010 Dec;7(1):238.
 70. Robertson ES, editor. *Cancer Associated Viruses* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2012 [cited 2024 Feb 28]. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0016-5>
 71. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. 2004 Jan;50(1–2):9–19.
 72. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*. 2017 Sep 1;131(17):2201–21.
 73. Verssimo J, De Medeiros Fernandes TAA. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. In: Vanden Broeck D, editor. *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2024 Feb 29]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedside-a-clinical-perspective/human-papillomavirus-biology-and-pathogenesis>
 74. Kocjan BJ, Poljak M. Papillomaviridae. In: Uzunović-Kamberović S, editor. *Medicinska mikrobiologija*. Zenica: Štamparija Fojnica; 2009.
 75. Bernard H, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Intl Journal of Cancer*. 2006 Mar;118(5):1071–6.
 76. Haga T, Dong J, Zhu W, Burk RD. The many unknown aspects of bovine papillomavirus diversity, infection and pathogenesis. *The Veterinary Journal*. 2013 Aug;197(2):122–3.
 77. De Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013 Oct;445(1–2):2–10.

78. Xu YF, Zhang YQ, Xu XM, Song GX. Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol.* 2006 Nov;151(11):2133–48.
79. Ribeiro-Müller L, Müller M. Prophylactic papillomavirus vaccines. *Clinics in Dermatology.* 2014 Mar;32(2):235–47.
80. Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, Christensen ND, Galloway DA. Identification of a Human Papillomavirus Type 16-Specific Epitope on the C-Terminal Arm of the Major Capsid Protein L1. *J Virol.* 2003 Nov;77(21):11625–32.
81. Villa LL. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. *International Journal of Infectious Diseases.* 2007 Dec;11:S17–25.
82. D’Andrilli G, Bovicelli A, Giordano A. HPV vaccines: State of the art. *Journal Cellular Physiology.* 2010 Sep;224(3):601–4.
83. Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, et al. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *J Virol.* 2008 Jun;82(11):5190–7.
84. Nasir L, Reid SWJ. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Research.* 1999 Jun;61(2):171–5.
85. Gil Da Costa RM, Medeiros R. Bovine papillomavirus: opening new trends for comparative pathology. *Arch Virol.* 2014 Feb;159(2):191–8.
86. Melo TC, Araldi RP, Pessoa NSD, de-Sá-Júnior PL, Carvalho RF, Beçak W, et al. *Bos taurus* papillomavirus activity in peripheral blood mononuclear cells: demonstrating a productive infection. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):16712–27.
87. Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 1997 Jan;71(1):50–8.

-
88. Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R. Endoplasmic Reticulum-Localized Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Alters Endosomal pH but Not *trans*-Golgi pH. *J Virol*. 2005 May;79(9):5839–46.
 89. Crusius K, Rodriguez I, Alonso A. [No title found]. *Virus Genes*. 2000;20(1):65–9.
 90. Egawa K. Do Human Papillomaviruses Target Epidermal Stem Cells? *Dermatology*. 2003;207(3):251–4.
 91. Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, et al. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol*. 1996 Mar;70(3):1912–22.
 92. Boxman ILA, Mulder LHC, Ter Schegget J, Russell A, Bavinck JNB, Green A. Association Between Epidermodysplasia Verruciformis-Associated Human Papillomavirus DNA in Plucked Eyebrow Hair and Solar Keratoses. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001 Nov;117(5):1108–12.
 93. Schwarz TF, Leo O. Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: Improving upon nature. *Gynecologic Oncology*. 2008 Sep;110(3):S1–10.
 94. Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease: Mucosal HPV pathogenesis. *J Pathol*. 2015 Mar;235(4):527–38.
 95. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020 Jan 21;10:3116.
 96. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*. 2015 Mar;25(S1):2–23.
 97. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Research*. 2008 Jan 1;68(1):307–13.

-
98. Bosch FX, Qiao Y, Castellsagué X. CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Intl J Gynecology & Obste* [Internet]. 2006 Nov [cited 2024 Mar 1];94(S1). Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0020-7292%2807%2960004-6>
 99. Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Clifford GM, et al. Sexual Behavior, Condom Use, and Human Papillomavirus: Pooled Analysis of the IARC Human Papillomavirus Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006 Feb 1;15(2):326–33.
 100. Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC, et al. Age-Related Changes of the Cervix Influence Human Papillomavirus Type Distribution. *Cancer Research*. 2006 Jan 15;66(2):1218–24.
 101. Dempsey AF, Mendez D. Examining Future Adolescent Human Papillomavirus Vaccine Uptake, With and Without a School Mandate. *Journal of Adolescent Health*. 2010 Sep;47(3):242-248.e6.
 102. Harris RW, Brinton LA, Cowdell RH, Skegg DC, Smith PG, Vessey MP, et al. Characteristics of women with dysplasia or carcinoma in situ of the cervix uteri. *Br J Cancer*. 1980 Sep;42(3):359–69.
 103. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk Factors for High-Risk Human Papillomavirus Infection and Cofactors for High-Grade Cervical Disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Nov;21(9):1654–63.
 104. Gomez T, Juana LS. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Pathogenesis and Epidemiology. In: Méndez Vilas A, editor. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007. p. 680–8.
 105. Adachi K, Klausner JD, Xu J, Ank B, Bristow CC, Morgado MG, et al. Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in HIV-infected Pregnant Women and

- Adverse Infant Outcomes. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2016 Aug;35(8):894–900.
106. Taku O, Brink A, Meiring TL, Phohlo K, Businge CB, Mbulawa ZZA, et al. Detection of sexually transmitted pathogens and co-infection with human papillomavirus in women residing in rural Eastern Cape, South Africa. *PeerJ*. 2021 Mar 3;9:e10793.
 107. Tasic D, Lazarevic I, Knezevic A, Tasic L, Pikula A, Perisic Z, et al. The impact of environmental and behavioural cofactors on the development of cervical disorders in HR-HPV-infected women in Serbia. *Epidemiol Infect*. 2018 Oct;146(13):1714–23.
 108. Tao L, Han L, Li X, Gao Q, Pan L, Wu L, et al. Prevalence and risk factors for cervical neoplasia: a cervical cancer screening program in Beijing. *BMC Public Health*. 2014 Dec;14(1):1185.
 109. 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 Dec;9(1):16.
 110. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital Tract Infections, Cervical Inflammation, and Antioxidant Nutrients--Assessing Their Roles as Human Papillomavirus Cofactors. *JNCI Monographs*. 2003 Jun 1;2003(31):29–34.
 111. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med*. 2006 Jun 22;354(25):2645–54.
 112. Lam JUH, Rebolj M, Dugué PA, 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 Mar;21(1):38–50.
 113. International Agency for Research on Cancer, editor. Human papillomaviruses: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22

- February 2005. Lyon: IARC; 2007. 670 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans).
114. Gariglio P, Gutiérrez J, Cortés E, Vázquez J. The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Archives of Medical Research*. 2009 Aug;40(6):449–65.
 115. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*. 2002 Mar;359(9312):1093–101.
 116. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006 Mar;24:S4–15.
 117. Gargano JW, Nisenbaum R, Lee DR, Ruffin IV MT, Steinau M, Horowitz IR, et al. Age-Group Differences in Human Papillomavirus Types and Cofactors for Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 among Women Referred to Colposcopy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2012 Jan 1;21(1):111–21.
 118. Barton SE, Jenkins D, Cuzick J, Maddox PH, Edwards R, Singer A. EFFECT OF CIGARETTE SMOKING ON CERVICAL EPITHELIAL IMMUNITY: A MECHANISM FOR NEOPLASTIC CHANGE? *The Lancet*. 1988 Sep;332(8612):652–4.
 119. Stern PL. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *Journal of Clinical Virology*. 2005 Mar;32:72–81.
 120. Shefer A, Markowitz L, Deeks S, Tam T, Irwin K, Garland SM, et al. Early Experience with Human Papillomavirus Vaccine Introduction in the United States, Canada and Australia. *Vaccine*. 2008 Aug;26:K68–75.
 121. Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 2008 Aug;26:K53–61.

-
122. Rosales R. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers. *WJCO*. 2014;5(5):1002.
 123. Grahovac M, Racić I, Hadzisejdić I, Dorić A, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus among Croatian women attending regular gynecological visit. *Coll Antropol*. 2007 Apr;31 Suppl 2:73–7.
 124. Koidl C, Bozic M, Hadzisejdic I, Grahovac M, Grahovac B, Kranewitter W, et al. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008 Aug;199(2):144.e1-144.e6.
 125. Jovanović T, Čupić M, Stanojević M, Knežević A, Lazarević I. *Osnove molekularne virusologije*. Beograd: Quark; 2006.
 126. Petca A, Borislavski A, Zvanca M, Petca RC, Sandru F, Dumitrascu M. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Oct 13;20(6):1–1.
 127. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1995 Jun 7;87(11):796–802.
 128. Colgrove J. The Ethics and Politics of Compulsory HPV Vaccination. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2389–91.
 129. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR–DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus–type specificity. *Nat Genet*. 1994 Feb;6(2):157–62.
 130. Mijovic G, Jovanovic T, Kuljic-Kapulica N, Jokmanovic N, Bujko M, Golubovic M. Frequency and risk factors of cervical human papilloma virus infection in women in Montenegro. *Arch biol sci (Beogr)*. 2014;66(4):1653–8.
 131. Vujošević D, Vuksanović V, Poljak M, Jokmanović N. Human Papillomavirus Genotype Spectrum in Studied Group of Montenegrin Women. *Acta Med (Hradec Kralove, Czech Repub)*. 2012;55(3):130–2.

-
132. Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Mar;285(3):771–7.
 133. Kovachev S, Slavov V, Slavova K. Prevalence of human papillomavirus infection in women in some cities and regions of Bulgaria. *Journal of Medical Virology*. 2013 Sep;85(9):1577–84.
 134. Zejnullahu Raçi P, Hošnjak L, Poljak M, Lepej SŽ, Vince A. Pre-vaccination prevalence of high-risk human papillomaviruses (HPV) in women from Kosovo and their related sociodemographic characteristics. *Ginekol Pol*. 2018 Sep 28;89(9):485–94.
 135. Moga MA, Irimie M, Oanta A, Pascu A, Burtea V. Type-specific Prevalence of Human Papillomavirus by Cervical Cytology among Women in Brasov, Romania. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014 Aug 30;15(16):6887–92.
 136. Dabeski D, Dabeski A, Antovska V, Trajanova M, Todorovska I, Sima A. Human papillomavirus infections in women with and without squamous cell abnormalities of the uterine cervix. *Scripta Medica*. 2019;50(2):69–76.
 137. Filipi K, Tedeschini A, Paolini F, Celicu S, Morici S, Kota M, et al. Genital human papillomavirus infection and genotype prevalence among albanian women: A cross-sectional study. *Journal of Medical Virology*. 2010 Jul;82(7):1192–6.
 138. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, De Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Intl Journal of Cancer*. 2012 Nov 15;131(10):2349–59.
 139. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *European Journal of Cancer*. 2009 Oct;45(15):2632–9.
 140. Sabol I, Milutin Gašperov N, Matovina M, Božinović K, Grubišić G, Fistonić I, et al. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. Tornesello ML, editor. *PLoS ONE*. 2017 Jul 10;12(7):e0180480.

141. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C. Prevaccination Distribution of Human Papillomavirus Types in Women Attending at Cervical Cancer Screening in Belgium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009 Jan 1;18(1):321–30.
142. Karadža M, Židovec Lepej S, Planinić A, Grgić I, Ćorušić A, Planinić P, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with high-grade cervical intraepithelial lesions and cervical carcinoma and analysis of human papillomavirus-16 genomic variants. *Croat Med J*. 2021 Feb;62(1):68–79.
143. Salimović-Bešić I, Hukić M. Potential coverage of circulating HPV types by current and developing vaccines in a group of women in Bosnia and Herzegovina with abnormal Pap smears. *Epidemiol Infect*. 2015 Sep;143(12):2604–12.
144. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011 Apr 1;203(7):910–20.
145. Levi JE, Kleter B, Quint WGV, Fink MCS, Canto CLM, Matsubara R, et al. High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3341–5.
146. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. No Evidence for Synergy Between Human Papillomavirus Genotypes for the Risk of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions in a Large Population-Based Study. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014 Mar 15;209(6):855–64.
147. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM, ALTS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study) Group. A 2-Year Prospective Study of Human Papillomavirus Persistence among Women with a Cytological Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *J INFECT DIS*. 2007 Jun;195(11):1582–9.

148. Amrani M. Molecular detection of human papillomavirus in 594 uterine cervix samples from Moroccan women (147 biopsies and 447 swabs). *Journal of Clinical Virology*. 2003 Aug;27(3):286–95.
149. Alhamany Z, El Mzibri M, Kharbach A, Malihy A, Abouqal R, Jaddi H, et al. Prevalence of human papillomavirus genotype among Moroccan women during a local screening program. *J Infect Dev Ctries*. 2010 Sep 14;4(11):732–9.
150. Rogua H, Ferrera L, El Mansouri N, Kassidi F, Aksim M, Aghrouch M, et al. Human Papillomavirus genotypes distribution and associated risk factors among women living in Southern Morocco. *Heliyon*. 2023 Nov;9(11):e22497.
151. Wang X, Song Y, Wei X, Wang G, Sun R, Wang M, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes among women attending gynecology clinics in northern Henan Province of China. *Virol J*. 2022 Dec;19(1):6.
152. Forslund O, Antonsson A, Edlund K, Van Den Brule AJC, Hansson B, Meijer ChrisJLM, et al. Population-based type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in middle-aged Swedish Women. *Journal of Medical Virology*. 2002 Apr;66(4):535–41.
153. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Sep 20;87(18):1365–71.
154. Wagner M, Bennetts L, Patel H, Welner S, De Sanjose S, Weiss TW. Global availability of data on HPV genotype-distribution in cervical, vulvar and vaginal disease and genotype-specific prevalence and incidence of HPV infection in females. *Infect Agents Cancer*. 2015 Dec;10(1):13.
155. Souho T, El Fatemi H, Karim S, El Rhazi K, Bouchikhi C, Banani A, et al. Distribution of Carcinogenic Human Papillomavirus Genotypes and Association to Cervical Lesions among Women in Fez (Morocco). Consolaro MEL, editor. *PLoS ONE*. 2016 Jan 5;11(1):e0146246.

156. on behalf of the POBASCAM Study Group, Bulkman NWJ, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MCG, Van Kemenade FJ, et al. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer*. 2007 May;96(9):1419–24.
157. Cobo F, Concha A, Ortiz M. Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution in Females with Abnormal Cervical Cytology. A Correlation with Histological Study. *TOVJ*. 2009 Sep 8;3(1):60–6.
158. Kim J, Kim BK, Lee CH, Seo SS, Park SY, Roh JW. Human Papillomavirus Genotypes and Cofactors Causing Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer in Korean Women: *International Journal of Gynecological Cancer*. 2012 Oct;1.
159. Krashias G, Koptides D, Christodoulou C. HPV prevalence and type distribution in Cypriot women with cervical cytological abnormalities. *BMC Infect Dis*. 2017 Dec;17(1):346.
160. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12–9.
161. Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, Zafrani B, De La Rochefordière A, Clough K, et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *JCO*. 1998 Aug;16(8):2613–9.
162. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan;88(1):63–73.
163. Schiffman M, Glass AG, Wentzensen N, Rush BB, Castle PE, Scott DR, et al. A Long-term Prospective Study of Type-Specific Human Papillomavirus Infection and Risk of Cervical Neoplasia Among 20,000 Women in the Portland Kaiser Cohort Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2011 Jul 1;20(7):1398–409.

164. Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term Absolute Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 or Worse Following Human Papillomavirus Infection: Role of Persistence. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2010 Oct 6;102(19):1478–88.
165. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Hansson BG, et al. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: A population-based prospective study. *Br J Cancer*. 2007 Jul;97(1):129–32.
166. Chen HC, Schiffman M, Lin CY, Pan MH, You SL, Chuang LC, et al. Persistence of Type-Specific Human Papillomavirus Infection and Increased Long-term Risk of Cervical Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2011 Sep 21;103(18):1387–96.
167. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: A prospective cohort study. *Intl Journal of Cancer*. 2011 Jun 15;128(12):2898–910.
168. Söderlund-Strand A, Eklund C, Kemetli L, Grillner L, Törnberg S, Dillner J, et al. Genotyping of human papillomavirus in triaging of low-grade cervical cytology. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011 Aug;205(2):145.e1-145.e6.
169. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jul;89(1):101–5.
170. Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, et al. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Intl Journal of Cancer*. 2013 Feb 15;132(4):854–67.
171. De Sanjosé S, Alemany L, Ordi J, Tous S, Alejo M, Bigby SM, et al. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *European Journal of Cancer*. 2013 Nov;49(16):3450–61.

-
172. Kovacevic G, Nikolic N, Jovanovic-Galovic A, Hrnjakovic-Cvjetkovic I, Vuleta D, Patric A, et al. Frequency of twelve carcinogenic human papilloma virus types among women from the South Backa region, Vojvodina, Serbia. *Turk J Med Sci*. 2016;46:97–104.
173. Nikolic N, Basica B, Mandic A, Surla N, Gusman V, Medic D, et al. E6/E7 mRNA Expression of the Most Prevalent High-Risk HPV Genotypes in Cervical Samples from Serbian Women. *Diagnostics*. 2023 Feb 28;13(5):917.
174. Kovacevic G, Milosevic V, Nikolic N, Patric A, Dopudj N, Radovanov J, et al. The prevalence of 30 HPV genotypes detected by EUROArray HPV in cervical samples among unvaccinated women from Vojvodina province, Serbia. Angeletti PC, editor. *PLoS ONE*. 2021 Apr 14;16(4):e0249134.
175. Song F, Yan P, Huang X, Wang C, Du H, Qu X, et al. Roles of extended human papillomavirus genotyping and multiple infections in early detection of cervical precancer and cancer and HPV vaccination. *BMC Cancer*. 2022 Dec;22(1):42.
176. Liu Y, Ang Q, Wu H, Xu J, Chen D, Zhao H, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and precancerous cervical lesions in a screening population in Beijing, China: analysis of results from China's top 3 hospital, 2009–2019. *Virology*. 2020 Dec;17(1):104.
177. Balbi G, Napolitano A, Giordano F, Capuano S, Manganaro MA, Di Martino L, et al. Role of the association of high-risk HPV identified by real-time PCR in cervical preneoplastic lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012;33(5):467–71.
178. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011 Jun;17(6):941–6.
179. Cuschieri KS. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *Journal of Clinical Pathology*. 2004 Jan 1;57(1):68–72.

180. Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM, Joste NE, et al. Role of HPV Genotype, Multiple Infections, and Viral Load on the Risk of High-Grade Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2019 Nov 1;28(11):1816–24.
181. Bruno MT, Scalia G, Cassaro N, Boemi S. Multiple HPV 16 infection with two strains: a possible marker of neoplastic progression. *BMC Cancer*. 2020 Dec;20(1):444.
182. Li M, Du X, Lu M, Zhang W, Sun Z, Li L, et al. Prevalence characteristics of single and multiple HPV infections in women with cervical cancer and precancerous lesions in Beijing, China. *Journal of Medical Virology*. 2019 Mar;91(3):473–81.
183. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical Carcinoma and Sexual Behavior: Collaborative Reanalysis of Individual Data on 15,461 Women with Cervical Carcinoma and 29,164 Women without Cervical Carcinoma from 21 Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009 Apr 1;18(4):1060–9.
184. Chu D, Liu T, Yao Y. Implications of viral infections and oncogenesis in uterine cervical carcinoma etiology and pathogenesis. *Front Microbiol*. 2023 May 24;14:1194431.
185. Liu ZC, Liu WD, Liu YH, Ye XH, Chen SD. Multiple Sexual Partners as a Potential Independent Risk Factor for Cervical Cancer: a Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015 May 18;16(9):3893–900.
186. Dunne EF, Markowitz LE. Emerging Infections: Genital Human Papillomavirus Infection. *CLIN INFECT DIS*. 2006 Sep;43(5):624–9.
187. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007 Jul;7(7):453–9.

188. Akarolo-Anthony SN, Famooto AO, Dareng EO, Olaniyan OB, Offiong R, Wheeler CM, et al. Age-specific prevalence of human papilloma virus infection among Nigerian women. *BMC Public Health*. 2014 Dec;14(1):656.
189. Thomas JO, Herrero R, Omigbodun AA, Ojemakinde K, Ajayi IO, Fawole A, et al. Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan, Nigeria: a population-based study. *Br J Cancer*. 2004 Feb;90(3):638–45.
190. Esere MO. Effect of Sex Education Programme on at-risk sexual behaviour of school-going adolescents in Ilorin, Nigeria. *Afr Health Sci*. 2008 Jun;8(2):120–5.
191. Kennedy NT, Ikechukwu D, Goddy B. Risk factors and distribution of oncogenic strains of human papilloma virus in women presenting for cervical cancer screening in Port Harcourt, Nigeria. *Pan Afr Med J [Internet]*. 2016 [cited 2024 Feb 29];23. Available from: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/23/85/full/>
192. Winer RL. Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students. *American Journal of Epidemiology*. 2003 Feb 1;157(3):218–26.
193. Nejo YT, Olaleye DO, Odaibo GN. Prevalence and Risk Factors for Genital Human Papillomavirus Infections Among Women in Southwest Nigeria. *Arch Basic Appl Med*. 2018 Feb;6(1):105–12.
194. Kahn JA, Rosenthal SL, Succop PA, Ho GYF, Burk RD. Mediators of the Association Between Age of First Sexual Intercourse and Subsequent Human Papillomavirus Infection. *Pediatrics*. 2002 Jan 1;109(1):e5–e5.
195. Revzina NV, DiClemente RJ. Prevalence and incidence of human papillomavirus infection in women in the USA: a systematic review. *Int J STD AIDS*. 2005 Aug 1;16(8):528–37.
196. Coppleson M, Reid B. The etiology of squamous carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1968 Sep;32(3):432–6.
197. Burk RD, Ho GYF, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual Behavior and Partner Characteristics Are the Predominant Risk Factors for Genital Human

- Papillomavirus Infection in Young Women. *Journal of Infectious Diseases*. 1996 Oct 1;174(4):679–89.
198. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Feb;10(2):101–6.
 199. Karlsson R, Jonsson M, Edlund K, Evander M, Gustavsson Å, Bodén E, et al. Lifetime Number of Partners As the Only Independent Risk Factor for Human Papillomavirus Infection: A Population-Based Study. *Sexually Transmitted Diseases*. 1995 Mar;22(2):119–27.
 200. Ley C, Bauer HM, Reingold A, Schiffman MH, Chambers JC, Tashiro CJ, et al. ARTICLES: Determinants of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1991 Jul 17;83(14):997–1003.
 201. Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, et al. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997 Oct;6(10):799–805.
 202. Renschmidt C, Kaufmann AM, Hagemann I, Vartazarova E, Wichmann O, Deleré Y. Risk Factors for Cervical Human Papillomavirus Infection and High-Grade Intraepithelial Lesion in Women Aged 20 to 31 Years in Germany. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Mar;23(3):519–26.
 203. Clements AE, Raker CA, Cooper AS, Boardman LA. Prevalence and patient characteristics associated with CIN 3 in adolescents. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011 Feb;204(2):128.e1-128.e7.
 204. Cooper D, Hoffman M, Carrara H, Rosenberg L, Kelly J, Stander I, et al. Determinants of sexual activity and its relation to cervical cancer risk among South African Women. *BMC Public Health*. 2007 Dec;7(1):341.

205. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, De Sanjose S, Ghaffari AM, Gonzalez LC, et al. Male Sexual Behavior and Human Papillomavirus DNA: Key Risk Factors for Cervical Cancer in Spain. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1996 Aug 7;88(15):1060–7.
206. Munoz N, Castellsague X, Bosch FX, Tafur L, Sanjose SD, Aristizabal N, et al. Difficulty in Elucidating the Male Role in Cervical Cancer in Colombia, a High-Risk Area for the Disease. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1996 Aug 7;88(15):1068–75.
207. Shew ML, Fortenberry JD, Miles P, Amortegui AJ. Interval between menarche and first sexual intercourse, related to risk of human papillomavirus infection. *The Journal of Pediatrics*. 1994 Oct;125(4):661–6.
208. Kahn JA, Rosenthal SL, Succop PA, Ho GYF, Burk RD. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *The Journal of Pediatrics*. 2002 Nov;141(5):718–23.
209. Collins SI, Mazloomzadeh S, Winter H, Rollason TP, Blomfield P, Young LS, et al. Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: A longitudinal study. *Intl Journal of Cancer*. 2005 Apr 10;114(3):498–500.
210. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case–control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2000 Dec;83(11):1565–72.
211. Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ, et al. Determinants of Genital Human Papillomavirus Detection in a US Population. *J INFECT DIS*. 2001 Jun;183(11):1554–64.
212. Meulen JT, Eberhardt HC, Luande J, Mgaya HN, Chang-Claude J, Mtiro H, et al. Human papillomavirus (HPV) infection, hiv infection and cervical cancer in Tanzania, East Africa. *Intl Journal of Cancer*. 1992 Jun 19;51(4):515–21.

213. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Intl Journal of Cancer*. 2006 Sep;119(5):1108–24.
214. Roura E, Travier N, Waterboer T, De Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. Burk RD, editor. *PLoS ONE*. 2016 Jan 25;11(1):e0147029.
215. Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegnee A. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Br J Cancer*. 1996 Aug;74(3):488–90.
216. Wong HYM, Loke AY, Chan NHL. Risk Factors for Cervical Abnormalities Among Hong Kong Chinese Women: A Large-Scale Community-Based Cervical Screening Program. *Journal of Women's Health*. 2011 Jan;20(1):53–9.
217. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, et al. Association of Chlamydia trachomatis with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. *American Journal of Epidemiology*. 2005 Oct 1;162(7):668–75.
218. Manhart LE, Koutsky LA. Do Condoms Prevent Genital HPV Infection, External Genital Warts, or Cervical Neoplasia?: A Meta-Analysis. *Sexually Transmitted Diseases*. 2002 Nov;29(11):725–35.
219. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sexually Transmitted Infections*. 1999 Oct 1;75(5):317–9.
220. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12;338(7):423–8.

221. Davidson M, Schnitzer PG, Bulkow LR, Parkinson AJ, Schloss ML, Fitzgerald MA, et al. The Prevalence of Cervical Infection with Human Papillomaviruses and Cervical Dysplasia in Alaska Native Women. *Journal of Infectious Diseases*. 1994 Apr 1;169(4):792–800.
222. Jamison JH, Kaplan DW, Hamman R, Eagar R, Beach R, Douglas JM. Spectrum of Genital Human Papillomavirus Infection in a Female Adolescent Population: Sexually Transmitted Diseases. 1995 Jul;22(4):236–43.
223. Young TK, McNICOL P, Beauvais J. Factors Associated With Human Papillomavirus Infection Detected by Polymerase Chain Reaction Among Urban Canadian Aboriginal and Non-Aboriginal Women: Sexually Transmitted Diseases. 1997 May;24(5):293–8.
224. Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Van Den Brule AJC. Human Papillomavirus Infection in Danish Female Sex Workers: Decreasing Prevalence With Age Despite Continuously High Sexual Activity. *Sexually Transmitted Diseases*. 2000 Sep;27(8):438–45.
225. Hogewoning CJA, Bleeker MCG, Van Den Brule AJC, Voorhorst FJ, Snijders PJF, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: A randomized clinical trial. *Intl Journal of Cancer*. 2003 Dec 10;107(5):811–6.
226. Aral SO, Peterman TA. A Stratified Approach to Untangling the Behavioral/Biomedical Outcomes Conundrum: Sexually Transmitted Diseases. 2002 Sep;29(9):530–2.
227. Macaluso M, Demand MJ, Artz LM, Hook EW. Partner type and condom use: AIDS. 2000 Mar;14(5):537–46.
228. Warner L. Condom Effectiveness for Reducing Transmission of Gonorrhea and Chlamydia: The Importance of Assessing Partner Infection Status. *American Journal of Epidemiology*. 2004 Feb 1;159(3):242–51.

229. Wang PD, Lin RS. Risk Factors for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Taiwan. *Gynecologic Oncology*. 1996 Jul;62(1):10–8.
230. Ho GYF, Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M, et al. HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 1998 Oct 29;78(3):281–5.
231. Thomas DB, Ray RM, Pardthaisong T, Chutivongse S, Koetsawang S, Silpisornosol S, et al. Prostitution, Condom Use, and Invasive Squamous Cell Cervical Cancer in Thailand. *American Journal of Epidemiology*. 1996 Apr 15;143(8):779–86.
232. Kjaer SK, De Villiers E, Dahl C, Engholm G, Bock JE, Vestergaard BF, et al. Case-control study of risk factors for cervical neoplasia in Denmark. I: Role of the “male factor” in women with one lifetime sexual partner. *Intl Journal of Cancer*. 1991 Apr 22;48(1):39–44.
233. Bleeker MCG, Hogewoning CJA, Voorhorst FJ, Van Den Brule AJC, Snijders PJF, Starink TM, et al. Condom use promotes regression of human papillomavirus–associated penile lesions in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Intl Journal of Cancer*. 2003 Dec 10;107(5):804–10.
234. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer*. 2013 Jan;108(1):234–9.
235. Holly EA, Petrakis NL, Friend NF, Sarles DL, Lee RE, Flander LB. Mutagenic mucus in the cervix of smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Jun;76(6):983–6.
236. Cuzick J, De Stavola B, Russell M, Thomas B. Vitamin A, vitamin E and the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*. 1990 Oct;62(4):651–2.
237. Winkelstein W. SMOKING AND CERVICAL CANCER—CURRENT STATUS: A REVIEW. *American Journal of Epidemiology*. 1990 Jun;131(6):945–57.
238. Phillips AN, Smith GD. Smoking and human papillomavirus infection. Causal link not proved. *BMJ*. 1993 May 8;306(6887):1268–9.

239. Krüger-Kjær S, Van Den Brule AJC, Svare EI, Engholm G, Sherman ME, Poll PA, et al. Different risk factor patterns for high-grade and low-grade intraepithelial lesions on the cervix among HPV-positive and HPV-negative young women. *Int J Cancer*. 1998 May 29;76(5):613–9.
240. Olsen AO, Dillner J, Skrondal A, Magnus P. Combined effect of smoking and human papillomavirus type 16 infection in cervical carcinogenesis. *Epidemiology*. 1998 May;9(3):346–9.
241. Miranda PM, Silva NNT, Pitol BCV, Silva IDCG, Lima-Filho JL, Carvalho RF, et al. Persistence or Clearance of Human Papillomavirus Infections in Women in Ouro Preto, Brazil. *BioMed Research International*. 2013;2013:1–6.
242. Sammarco ML, Del Riccio I, Tamburro M, Grasso GM, Ripabelli G. Type-specific persistence and associated risk factors of human papillomavirus infections in women living in central Italy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013 Jun;168(2):222–6.
243. 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 Jul 15;135(2):453–66.
244. Schmeink CE, Massuger LFAG, Lenselink CH, Quint WGV, Witte BI, Berkhof J, et al. Prospective follow-up of 2,065 young unscreened women to study human papillomavirus incidence and clearance. *Intl Journal of Cancer*. 2013 Jul;133(1):172–81.
245. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100(Pt E):1–538.
246. Ferson M, Edwards A, Lind A, Milton GW, Hersey P. Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Intl Journal of Cancer*. 1979 May 15;23(5):603–9.

247. Poppe WAJ, Peeters R, Drijkoningen M, Ide PS, Daenens P, Lauweryns JM, et al. Cervical Cotinine and Macrophage Langerhans Cell Density in the Normal Human Uterine Cervix. *Gynecol Obstet Invest.* 1996;41(4):253–9.
248. Sasson IM, Haley NJ, Hoffmann D, Wynder EL, Hellberg D, Nilsson S. Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke constituents in cervical mucus. *N Engl J Med.* 1985 Jan 31;312(5):315–6.
249. Schiffman MH, Haley NJ, Felton JS, Andrews AW, Kaslow RA, Lancaster WD, et al. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Res.* 1987 Jul 15;47(14):3886–8.
250. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol.* 1988 Apr;158(4):910–3.
251. McCann MF, Irwin DE, Walton LA, Hulka BS, Morton JL, Axelrad CM. Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992;1(2):125–9.
252. Tsai H, Tsai Y, Yang S, Wu K, Chuang H, Wu T, et al. Lifetime cigarette smoke and second-hand smoke and cervical intraepithelial neoplasm—A community-based case–control study☆. *Gynecologic Oncology.* 2007 Apr;105(1):181–8.
253. Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman CBJ. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *European Journal of Cancer.* 2010 Jan;46(2):405–11.

8. PRILOZI

Prilog 1.

Upitnik sprovedenog istraživanja

1. Godina rođenja: _____
2. Školska sprema:
 - a) osnovna
 - b) srednja
 - c) viša
 - d) visoka
3. U kojoj godini života ste dobili prvu menstruaciju? _____
4. Koliko godina ste imali prilikom prvog seksualnog odnosa? _____
5. Broj trudnoća: _____
6. Broj pobačaja: _____
7. Da li imate stalnog seksualnog partnera:
 - a) da
 - b) ne
8. Koliko seksualnih partnera ste imali tokom života? _____
9. Da li ste do sada imali neku seksualno prenosivu bolest (kondilomi, genitalni herpes, hlamidija)?
 - a) da
 - b) ne
10. Koju vrstu zaštite koristite prilikom seksualnih odnosa?
 - a) ne koristim zaštitu
 - b) prezervativ
 - c) prekinuti seksualni odnos
 - d) kontraceptivne tablete
 - e) spiralu
11. Da li ste pušač?
 - a) da
 - b) ne
12. Kako procenjujete Vaše imovinsko stanje?
 - a) loše (lošije nego u većine)
 - b) srednje (kao u većine)
 - c) dobro (bolje nego u većine)

BIOGRAFIJA AUTORA

Milena Lopičić rođena je 12.11.1972. godine u Vrnjačkoj Banji (Srbija). Osnovnu školu je završila u selu Vrba, a gimnaziju (smer prirodno-matematički saradnik) u Kraljevu sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je 1991. godine i diplomirala je 2000. godine sa prosečnom ocenom 8,83.

Pripravnički staž obavila je u Gradskoj bolnici na Zvezdari (Beograd, Srbija), a nakon toga je 2001. godine radni angažman započela u Domu zdravlja u Podgorici. Rešenjem Ministarstva zdravlja, 2002. godine dobija specijalizaciju i od tada do danas radi u Centru za medicinsku mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Crne Gore.

Specijalizaciju iz mikrobiologije sa parazitologijom, dodeljenu 2002. godine, završila je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2008. godine sa ocenom 4.

Predavala je u Srednjoj medicinskoj školi predmete: hematologija i mikrobiologija sa parazitologijom tokom školske 2003/2004. godine. Od 2011. do 2018. godine bila je angažovana kao stručni saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Podgorici (predmet Mikrobiologija i imunologija).

Doktorske studije upisala je školske 2011/2012. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore.

Autor je jednog, a koautor sedam naučnih radova objavljenih u časopisima koji se nalaze u međunarodnim citatnim bazama, kao i više radova objavljenih u domaćim časopisima i prezentovanih na domaćim i međunarodnim kongresima.

Jedan je od autora nacionalne smernice dobre kliničke prakse, „Laboratorijska doagnostika u kliničkoj bakteriologiji“, čiji je izdavač Ministarstvo zdravlja Crne Gore.

Do sada je bila učesnik jednog nacionalnog i sedam međunarodnih naučno-istraživačkih projekata.

Sa ciljem usavršavanja iz oblasti rezistencije bakterija na antibiotike, bila je u dve studijske posete, u Zagrebu (Hrvatska) i Berlinu (Nemačka).

Udata je i majka troje dece.

Izjava o autorstvu

Potpisana: dr Milena Lopičić

Broj indeksa/upisa: 5/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Uloga faktora rizika i infekcije humanim papilomavirusima u nastanku
skvamoznih cervikalnih intraepitelnih lezija**

- 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 Podgorici, 20.03.2024.
