

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Miodrag I. Stamenković**

**Genotipska i intragenotipska varijabilnost humanih papiloma  
virusa u tkivima karcinoma grlića materice**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE**

**Miodrag I. Stamenković**

**Genotypic and Intragenotypic Variability of Human Papilloma  
Viruses in Cervical Carcinoma Tissues**

**doctoral disertation**

**Belgrade, 2016**

Mentor:

---

Prof. dr Aleksandra Knežević

Članovi komisije:

---

1. Prof. dr Tanja Jovanović,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

2. Prof. dr Maja Stanojević,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

3. Prof. dr Vesna Milošević,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Na kraju, ponekada, javlja se nada da dolazi novi početak. Nakon sedam godina rada, uveren da ova teza predstavlja tek puku ulaznicu u svet nauke, želeo bih da se zahvalim svima koji su pomogli da ona ugleda svetlost dana. Mojoj mentorki Prof. dr Aleksandri Knežević, čiji je blag temperament i sigurnost uslovljena velikim iskustvom u oblasti koju smo istraživali, učinila da rad na tezi bude veoma prijatan, iako naporan. Prof. dr Tanji Jovanović koja je nepokolebljivom odlučnošću i mirnoćom pomogla da izađemo iz trenutaka krize. Članovima komisije čije su preporuke učinile ovu tezu boljom. Kolektivu Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, a naročito laboratorijskim tehničarima Gabrijeli Pavlović i Mariji Životić, čija veština u laboratorijskom radu je jednostavno nezamenjiva.

Zahvaljujem se i dragim kolegama Prof. dr Sanji Milenković i dr Igoru Kuzmanoviću iz KBC "Zemun" i GAK " Narodni front" bez čije dobrote, strpljenja i neizmerne kolegijalnosti bi rad, koji je za nama, bio neuporedivo teži. Dr Ivani Knežević iz Svetske zdravstvene organizacije, čiji su prijateljski saveti i velika pomoć došli, kao nit spasenja, u pravom trenutku. Akademiku Prof. dr Vladimiru Kostiću, mom dragom Profesoru, od koga sam uvek mogao da očekujem prijateljski savet i razumevanje, bez čije pomoći bih sada verovatno bio tuđinac u tuđem svetu, duhovno i emotivno znatno siromašniji, daleko od Beograda, što čini svu razliku.

Hvala dobrim ljudima i kolegama iz Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije, čija je podrška, razumevanje i dobra energija bila svakodnevni podsticaj, neophodan za završetak ove teze.

Neizmernu zahvalnost dugujem roditeljima koji su me čitavog života podržavali i podsticali, vaspitavajući me i učeći ljudskim i moralnim vrednostima. Prijateljima, za razumevanje i reči utehe kada mi je bilo teško. Mom sinu Ivanu, čiji su osmeh i radoznala pitanja, snaga koja me pokreće svakog dana.



## **SAŽETAK**

### **Genotipska i intragenotipska varijabilnost humanih papiloma virusa u tkivima karcinoma grlića materice**

#### **Sažetak**

**UVOD:** Značaj infekcije humanim papiloma virusima (HPV) u razvoju različitih karcinoma kod čoveka, a naročito karcinoma grlića materice dobro je dokumentovan. Karcinom grlića materice jedan je od najznačajnijih uzroka smrtnosti žena u svetu. Genotipovi HPV udruženi sa karcinomom grlića materice označavaju se kao visoko onkogeni, a među njima su najučestaliji HPV 16 i HPV 18. U novije vreme, sve je više dokaza da pojedine linije i podlinije u okviru više genotipova HPV igraju značajnu ulogu u razvoju ovog karcinoma.

**CILJEVI:** U ovom istraživanju identifikuju se genotipovi HPV, određuje njihova učestalost u tkivima karcinoma grlića materice, kao i povezanost sa patohistološkim tipom i stadijumom karcinoma grlića materice. Takođe, ciljevi ovog istraživanja odnose se na utvrđivanje i analizu genotipske i intragenotipske varijabilnosti dobijenih HPV izolata analizom E1, L1, E6/E7 (HPV 16) gena, uz poređenje dobijene učestalosti i distribucije HPV genotipova sa učestalošću i distribucijom u drugim zemljama.

**MATERIJAL I METODOLOGIJA:** Studija je uključivala uzorke tkiva karcinoma grlića materice, fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafin, uzeti od 101 pacijentkinje starosti od 24 do 78 godina. Nakon deparafinizacije i ekstrakcije virusne DNK, primenjivan je PCR metod uz korišćenje odgovarajućih prajmera za dokazivanje L1, E1 i HPV 16 E6/7 gena. Uzorci kod kojih je detektovana HPV DNK odgovarajućih gena, sekvencirani su metodom završetka lanca. Detekcija prisustva HPV DNK i genotipizacija izvedena je i metodom protočne (*engl.*"Flow through") hibridizacije. Identifikovane sekvence, analizirane su potom filogenetskim metodama. Obrađene sekvence upotrebljavane su za utvrđivanje i poređenje genotipske i intragenotipske varijabilnosti HPV.

**REZULTATI:** Od ukupno 101 uzorka tkiva karcinoma grlića materice, devedeset jedan uzorak pripadao je patohistološkom tipu planocelularnog karcinoma (90,09%). Prisustvo

HPV E1 gena detektovano je kod 57 (56,43%) od 101, dok je HPV L1 gen detektovan kod 35 (34,65%) od ukupno 101 ispitanih uzoraka tkiva, a oba gena su detektovana kod 23 uzorka. Ukupno, HPV DNK detektovana je kod 69 od 101 uzorka tkiva karcinoma grlića materice. Metodom DNK sekvenciranja identifikovano je 44 sekvence HPV E1 gena odnosno 9 sekvenci L1 gena. Ukupno, identifikacijom sekvenci za oba gena HPV DNK utvrđeno je prisustvo 6 genotipova sa visokim onkogenim potencijalom: 16, 33, 58, 45, 18 i 53, kod ukupno 47 uzoraka tkiva karcinoma. Najveću učestalost identifikacije imao je genotip HPV 16, otkriven kod 80,85% uzoraka, a zatim genotip HPV 33 (8,51%) i HPV 58 (6,38%). Tehnikom protočne hibridizacije je kod 7 uzoraka, od ispitanih 20, potvrđeno prisustvo HPV DNK. Utvrđeno je prisustvo četiri genotipa (HPV 16, 18, 59 i 71). Primenom obe tehnike HPV genotipizacije, ukupno, je dokazano prisustvo osam genotipova HPV: 16, 18, 33, 45, 53, 58, 59 i 71. Prisustvo mešovite infekcije potvrđeno je kod 5 uzoraka (4, 95%). Većina identifikovanih genotipova utvrđena je kod pacijentkinja starijih od 40 godina i pripadala je stadijumu I po FIGO klasifikaciji. Genotip HPV16 identifikovan je u 80,43% planocelularnih i to podtipu nekaratinizirajućih karcinoma i 66,7%, adenokarcinoma. Nije pokazano postojanje statističke značajnosti između prisutnih HPV genotipova i godina starosti pacijentkinja, stadijuma bolesti i patohistološkog tipa odnosno podtipa karcinoma. Filogenetska analiza sekvenci HPV E1 i L1 izolata, potvrdila je pripadnost HPV izolata iz naše populacije određenim genotipovima i to rodu *Alphapapillomavirus* odnosno filogenetskim grupama 9, 7 i 6. Najzastupljeniji su bili genotipovi iz grupe 9. Analiza genotipske varijabilnosti identifikovanih HPV E1 i L1 izolata pokazala je nukleotidnu udaljenost između sekvenci istog genotipa od 0-1%, što ukazuje na varijabilnost nivou varijante unutar istog genotipa. 13. Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV tipa 16 na nivou E1, L1 i E6/E7 gena je pokazalo da najveći broj izolata pokazuje usklađenost sa evropskom linijom A odnosno podlinijama A1, A2, A3 i A4 sa nukleotidnom distancom manjom od 0,5%, što ukazuje na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante unutar podlinija. Pored toga, analiza nukleotidne i aminokiselinske sekvence HPV16 izolata u našoj populaciji na nivou E6/E7 gena nije pokazalo postojanje varijante HPV 16 T350G (L83V) sa izraženim onkogenim potencijalom. Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV tipa 33 na nivou E1 gena je pokazalo da svi identifikovani izolata pokazuju usklađenost sa

evropskom linijom A odnosno podlinijama A1, sa nukleotidnom distancom manjom od 0,5%, što ukazuje na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante unutar navedene podlinije. Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV tipa 58 na nivou E1 gena je pokazalo da najveći broj identifikovani izolata pokazuju usklađenost sa dve različite linije (A i C) u okviru ovog genotipa i dve podlinije u okviru linije A (A1 i A2). Nukleotidna distanca je bila manja od 0,5%, što ukazuje na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante unutar navedenih podlinija.

**ZAKLJUČCI:** Rezultati ove studije pokazuju da je prisustvo HPV DNK potvrđeno je u 68,31% ispitvanih uzoraka karcinoma grlića materice, pri čemu je veća HPV pozitivnost dokazana primenom prajmera za E1 gen. Ukupno, je dokazano prisustvo osam genotipova HPV: 16, 18, 33, 45, 53, 58, 59 i 71. Najviša učestalost je pokazana za HPV 16, zatim tip 33, dok su ostali identifikovani tipovi potvrđeni u manjem procentu. Nije pokazano postojanje statističke značajnosti između prisutnih HPV genotipova i godina starosti pacijentkinja, stadijuma bolesti i patohistološkog tipa odnosno podtipa karcinoma. Dobijeni rezultati ispitivanja učestalosti i distribucije HPV genotipova u tkivima karcinoma grlića materice, kao i filogenetska analiza genotipske i intragenotipske varijabilnosti pokazuju usklađenost rezultata u našoj populaciji sa podacima za evropske zemlje kao i zemlje u regionu.

Ključne reči: HPV, karcinom grlića materice, FIGO klasifikacija, intragenotipska varijabilnost, genotip, linija, podlinija

Naučna oblast/uža naučna oblast: Molekularna medicina/Virusologija

## **SUMMARY**

### **Summary**

**INTRODUCTION:** Important role of Human papillomaviruses (HPV) in the development of human carcinoma particularly cervical carcinoma, is well documented. Cervical carcinoma is one of the most important causes of women mortality, worldwide. HPV genotypes usually associated with cervical carcinoma, are defined as high-risk, and among them HPV16 and HPV18 are most frequent. Recently, there are more evidence that certain lineages and sublineages of HPV genotypes have important role in cervical carcinoma development.

**AIMS:** This study aims to identify the presence and distribution of HPV genotypes in cervical carcinoma tissues, as well as their association with pathohistological type and disease stage. Further aims of this study are to establish and to analyze genotypic and intragenotypic variability of HPV isolates by testing E1, L1 and HPV 16 E6/7 genes and to compare frequency and distribution of HPV genotypes with data from other countries.

**MATERIAL AND METHODOLOGY:** The study included tissue samples of cervical cancer, formalin-fixed and paraffin embedded, taken from 101 patients aged 24 to 78 years. After deparaffinization and the extraction of viral DNA, PCR method was done using primers for the detection of L1, E1 and HPV 16 E6/7 genes. The samples in which HPV DNA is detected by the corresponding gene, were sequenced by the chain termination method. HPV DNA genotyping was also performed by flow through hybridization. The identified sequences were then analyzed by phylogenetic methods to determine genotypic and intragenotypic HPV variability.

**RESULTS:** From total 101 cervical carcinoma tissue samples, ninety-one samples were planocellular carcinoma (90.09%). Fifty-seven samples (56,43%) out of total 101 were HPV E1 gene positive, and thirty-five (34,65%) were HPV L1 gene positive. Both HPV genes (E1 and L1) were detected in 23 samples. In total, HPV DNA was detected in 69 out of 101 cervical carcinoma tissue samples. Forty-four sequences of E1 gene and nine sequences of L1 gene were detected by DNA sequencing. In total, for both genes HPV DNK, six high-risk

genotypes were identified: HPV 16, 33, 58, 45, 18 and 53 in 47 tissue samples. The most frequent was HPV 16 detected in 80.85% tissue samples followed by HPV 33 (8.51%) and HPV 58 (6.38%) Out of twenty tested samples, seven were HPV DNA positive and HPV genotypes were identified by flow-through hybridization. Four HPV genotypes were determined by this method (HPV 16, 18, 59 and 71). In total, eight HPV genotypes ( HPV: 16, 18, 33, 45, 53, 58, 59 and 71) were identified by two methods used. Mixed infection was confirmed in five tissue samples (4.95%). Most of the identified genotypes was found in patients older than 40 years, belonged to stage I FIGO classification. HPV16 genotype was identified in 80.43% squamous cell carcinomas and 66.7% of adenocarcinoma. The statistical significant difference was not showed between the presence of HPV genotypes and age of the patient, disease stage and histological type or subtype of cancer. Phylogenetic analysis of HPV E1 and L1 sequences confirmed the identification of HPV isolates from our population. The isolates belong to the genus Alphapapillomavirus and phylogenetic groups 9, 7 and 6: The most common genotypes were in the group 9. The analysis of genotypic variability of identified HPV E1 and L1 isolates showed the nucleotide distance of 0-1%, within the same genotype which indicates that the isolates are variants of the same genotype. The analysis of intragenotypic variability of HPV type 16 E1, L1 and E6/E7 genes showed that the largest number of isolates demonstrates compliance with European lineage A and sublineages A1, A2, A3 and A4. The nucleotide distance was less than 0.5%, which indicates that the isolates are variants within the sublineages. In addition, analysis of the nucleotide and amino acid sequences of HPV16 E6/E7 gene isolates in our population did not show the existence of HPV 16 variants T350G (L83V) with strong oncogenic potential. The analysis of intragenotypic variability of HPV type 33 E1 gene showed that all identified isolates showed concordance with European A1 sublineage. The nucleotide distance was less than 0.5%, which indicates that the isolates are variants within the A1 sublineage. The analysis of intragenotypic variability of HPV type 58 E1 gene has shown that the largest number of identified isolates indicate compliance with two different lines (A and C) in the context of this genotype, and two sub-lines within the line A (A1 and A2). The nucleotide distance was less than 0.5%, which indicates that the isolates are variants within these sublineages.

**CONCLUSIONS:** The results of this study show that the presence of HPV DNA was confirmed in 68,31% of tested cervical cancer samples, with higher HPV positivity demonstrated by E1 gene PCR method. In total, eight HPV genotypes were identified: 16, 18, 33, 45, 53, 58, 59 and 71. The most frequent genotype was HPV 16, followed by HPV 33, while all other identified types were detected in smaller percentage. The statistical significant difference was not showed between the presence of HPV genotypes and age of the patient, disease stage and histological type or subtype of cancer. The data of prevalence and distribution of HPV genotypes in cervical cancer tissues, and phylogenetic analysis of genotypic and intragenotypic variability of HPV isolates from our population are consistent with the available data from other European countries as well as countries in the region.

Key words: HPV, cervical carcinoma, FIGO classification, Intragenotypic variability, genotype, lineage, sublineage

Scientific field: Molecular medicine/Virology

## Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Istorijat .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Opšte osobine, struktura viriona i organizacija genoma Humanih papiloma virusa.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1 Opšte osobine HPV.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2 Struktura viriona HPV.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3 Organizacija genoma HPV.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.4 Klasifikacija HPV.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Replikacija HPV.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1 Adsorpcija.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2 Penetracija i dekapidacija.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.3 Virusna transkripcija.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.3.1 Regulacija transkripcije (Cis elementi).....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.2 E2 regulatorni protein.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.3.3 Ekspresija kasnih gena.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.4 Sklapanje i izlazak virusnih čestica.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.5 Replikacija virusne DNK .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.5.1 Početno mesto replikacije DNK.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.5.2 E1 protein.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.5.3 Funkcije E2 proteina u replikaciji virusa.....</b>	<b>21</b>

1.3.5.4 Vegetativna DNK replikacija.....	22
<b>1.4 Životni ciklus HPV, transformacija i imortalizacija papiloma virusima.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Životni ciklus HPV.....	22
1.4.2. Transformacija i imortalizacija papiloma virusima.....	23
1.4.2.1 HPV E6.....	24
1.4.2.2 Protein E7.....	26
1.4.2.3 Protein E5.....	29
<b>1.5 Patogeneza HPV infekcije i imunski odgovor.....</b>	<b>30</b>
1.5.1 Patogeneza HPV infekcije.....	30
1.5.2 Imunski odgovor tokom HPV infekcije.....	33
<b>1.6 Oboljenja povezana sa HPV infekcijom.....</b>	<b>35</b>
1.6.1 Benigna oboljenja povezana sa HPV infekcijom.....	35
1.6.2 Maligna oboljenja povezana sa HPV infekcijom.....	37
<b>1.7 Dijagnoza HPV infekcije.....</b>	<b>41</b>
1.7.1 Molekularna dijagnoza HPV infekcije.....	41
<b>1.8 Terapija i prevencija HPV infekcije.....</b>	<b>51</b>
1.8.1 Terapija HPV infekcije.....	51
1.8.2 Prevencija HPV infekcije.....	53
<b>2. Ciljevi istraživanja.....</b>	<b>57</b>



<b>3. Materijal i metodologija.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Materijal.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1. 1 Pacijenti.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.2 Klinički uzorci.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2 Metodologija.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.1 Dokazivanje HPV DNK i HPV tip 16 DNK – PCR metod.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.1.1 Ekstrakcija DNK.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.1.2 PCR reakcija.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2.1.2.1 PCR za dokazivanje HPV DNK L1 gena.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.1.2.2 PCR za dokazivanje HPV DNK E1 gena.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2.1.2.3 PCR za dokazivanje HPV tip 16 DNK E6/7 gena.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.1.3 Vizualizacija produkata PCR-elektroforeza       u agaroznom gelu.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.2 DNK sekvenciranje.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.2.1 Prečišćavanje PCR produkata.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.2.2 Reakcija cikličnog sekvenciranja.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2.2.3 Prečišćavanje produkata cikličnog umnožavanja.....</b>	<b>74</b>
<b>3.2.2.4 Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru       i analiza elektroferograma.....</b>	<b>75</b>
<b>3.2.3. Dokazivanje i genotipizacija HPV DNK metodom       protočne (engl. "Flow through") hibridizacije.....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.3.1 HPV DNK PCR amplifikacija.....</b>	<b>77</b>

3.2.3.2 HPV protočna hibridizacija.....	77
3.2.4 Filogenetska analiza HPV izolata.....	79
3.2.5 Statistička obrada dobijenih rezultata.....	81
4. Rezultati.....	83
4.1 Karakteristike tkiva karcinoma grlića materice.....	85
4.2 Dokazivanje prisustva HPV u uzorcima karcinoma grlića materice.....	86
4.2.1 Prisustvo HPV DNK E1 gen u uzorcima karcinoma grlića materice.....	86
4.2.1 Prisustvo HPV DNK L1 gen u uzorcima karcinoma grlića materice.....	88
4.2.3 Uporedna analiza PCR metoda za dokazivanje HPV DNK E1 i L1 gena u uzorcima karcinoma grlića materice.....	89
4.2.4 Ukupna učestalost HPV DNK (E1 i L1 gena) u uzorcima karcinoma grlića materice.....	91
4.3 HPV genotipizacija metodom DNK sekvenciranja.....	92
4.3.1 Rezultati E1 gen HPV genotipizacije metodom DNK sekvenciranja.....	96
4.3.2 Rezultati L1 gen HPV genotipizacije metodom DNK sekvenciranja.....	97
4.3.3 Ukupna zastupljenost HPV genotipova (E1 i L1 gena) DNK sekvenciranjem.....	98
4.4 Dokazivanje i genotipizacija HPV DNK metodom protočne ( <i>engl.</i> "Flow through") hibridizacije.....	100

<b>4.5 Uporedna analiza HPV genotipizacije metodom DNK sekvenciranja metodom protočne (<i>engl.</i> "Flow through") hibridizacije.....</b>	<b>102</b>
<b>4.5.1 Ukupni rezultati HPV genotipizacije primenom obe metode.....</b>	<b>104</b>
<b>4.6 Povezanost genotipova HPV sa godinama starosti pacijentkinja, stadijumom i patohistološkim tipom karcinoma grlića materice.....</b>	<b>105</b>
<b>4.7 Genotipska varijabilnost - Filogenetska analiza HPV izolata.....</b>	<b>108</b>
<b>4.7.1 Filogenetska analiza genotipova na osnovu sekvenci HPV E1 gena.....</b>	<b>109</b>
<b>4.7.2 Filogenetska analiza genotipova na osnovu sekvenci HPV L1 gena.....</b>	<b>113</b>
<b>4.8 Intragenotipska varijabilnost - Filogenetska analiza HPV izolata....</b>	<b>114</b>
<b>4.8.1 Intragenotipska varijabilnost dobijenih HPV 16 izolata.....</b>	<b>115</b>
<b>4.8.2 Intragenotipska varijabilnost dobijenih HPV 33 i 58 izolata...</b>	<b>121</b>
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>124</b>
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>145</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>146</b>

# *1. Uvod*

Humani papilomavirusi (HPV) obuhvataju grupu DNK virusa bez omotača koji pokazuju tropizam ka epitelnim tkivima i mogu da izazivaju benigna oboljenja kože i sluzokoža. Pojedini humani papiloma virusi povezuju se razvojem epitelijalnih malignih oboljenja, posebno karcinoma grlića materice i drugih tumora urogenitalnog trakta, odnosno karcinoma gornjih disajnih puteva. Utvrđivanje povezanosti infekcije humanim papiloma virusima sa pojavom karcinoma, dovelo je do razvoja prve vakcine u prevenciji karcinoma.

## 1.1 Istorijat

Još od polovine devetnaestog veka bilo je pokušaja da se karcinom grlića materice poveže sa infektivnim uzročnikom. Kako je to bilo vreme ubrzanog razvoja bakteriologije, ovi prvi, bezuspešni pokušaji, bili su usmereni na pronalaženje bakterije uzročnika i trajali su sve do šezdesetih godina dvadesetog veka, kada se prvi put virus, *Herpes simplex virus tip 2*, pominje kao mogući uzročnik ovog oboljenja. Međutim, obimna prospektivna studija sprovedena u bivšoj Čehoslovačkoj nije potvrdila ovu pretpostavku, tako da su tokom ranih sedamdesetih godina počela istraživanja čija je pažnja bila usmerena na povezivanje infekcije Humanim papiloma virusima (HPV) sa ovim oboljenjem.

Genitalne bradavice bile su poznate još od drevnih vremena starih Grka i Rimljana. Iako nije bilo sumnje u njihovu infektivnu prirodu, do devetnaestog veka one su smatrane oblikom sifilisa ili gonoreje. Virusnu prirodu bradavica je potvrdio Ciuffo 1907. godine, tako što je pokazao da bezćelijski filtrati dobijeni iz promena prenose oboljenje (Zur Hausen, 2009; Howley i sar., 2013). Do dvadesetih godina dvadesetog veka potvrđena je bila i virusna priroda laringealnih papilomatoza i genitalnih bradavica, a 1949. godine u tkivu bradavica, elektronskom mikroskopijom, potvrđeno je prisustvo virusnih čestica (Strauss i Shaw, 1949).

Eksperimenti koji su za cilj imali dokazivanje povezanosti infekcije papilomavirusima i karcinoma grlića materice počeli su 1972. godine. Ovi eksperimenti zasnivali su se na anegdotalnim izveštajima iz medicinske literature o retkim malignim konverzijama genitalnih bradavica (šiljasti kondilomi) u planocelularni karcinom. Navedene činjenice dovele su do hipoteze da uzrok maligne alteracije može da bude virus koji je izolovan iz šiljastih kondiloma (Zur Hausen, 2009). U prilog navedenoj hipotezi bila je i pretpostavka da prisustvo koilocitotično izmenjenih ćelija u uzorcima, uzetim sa displastičnih promena grlića materice,

predstavlja citopatološku promenu kod infekcija papiloma virusima, što je i potvrđeno dokazivanjem tipičnih čestica papiloma virusa u ovim ćelijama. Tokom 1982. godine, prvi put se pojavljuju izveštaji o prisustvu DNK humanih papiloma virusa u ćelijama karcinoma grlića materice, da bi tokom naredne godine bila izolovana nepotpuno karakterisana DNK HPV 18 iz biopsija karcinoma grlića materice, kao i HPV 16 u tipičnim prekursorskim lezijama anogenitalnih karcinoma, Bowenov-ovoj papilomatozi, a već 1984. i u intraepitelijalnim neoplazijama grlića materice (Zur Hausen, 2009).

Veliki broj studija sa sličnim ciljem koje potom slede, dovode do otkrivanja značajnih činjenica kao što su pojava selektivne transkripcije E6 i E7 gena HPV u karcinomu grlića materice kao i specifične delecije koje se pojavljuju tokom integracije virusne DNK u genom domaćina (Zur Hausen, 2009). Takođe otkriće interakcije E6 proteina sa p53 proteinom i njegova sledstvena degradacija, kao i interakcija E7 sa pRb koja dovodi do blokade ovog proteina, bilo je značajno za razumevanje unutarćelijskih događaja koji rezultuju imortalizacijom i na posletku pojavom transformisanog fenotipa ćelije koja sadrži virusni genom (Zur Hausen, 2009).

## **1.2 Opšte osobine, struktura viriona i organizacija genoma Humanih papiloma virusa**

### **1.2.1 Opšte osobine HPV**

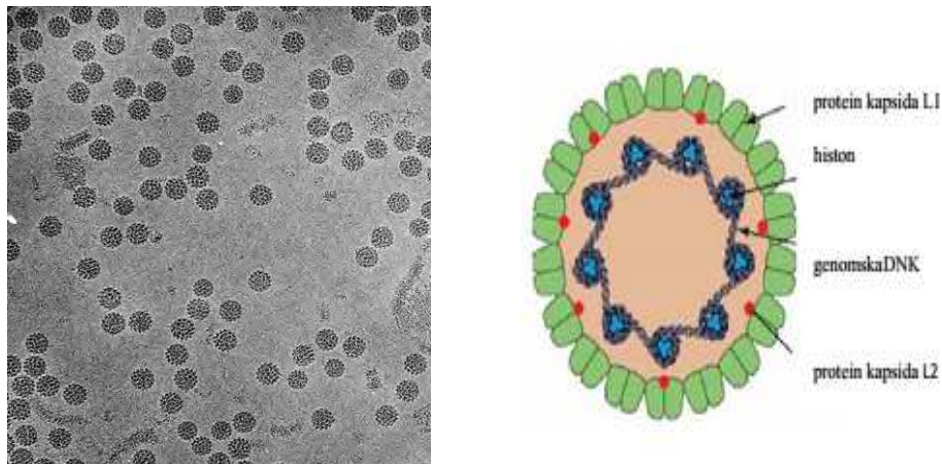
Humani papilomavirusi (HPV) su mali DNK virusi, bez omotača, sa izraženim tropizmom za epitelne ćelije. To su specijes specifični virusi koji izazivaju infekcije epitela kože i sluzokoža ljudi (Munoz i sar., 2006). Tokom evolucije, humani papiloma virusi su se adaptirali na specifične epitelne niše, pri čemu su različiti tipovi povezani sa različitim oboljenjima odnosno prevalencom različitih oboljenja kože i sluzokože (Doorbar i Quint, 2012). Dosadašnji podaci ukazuju na postojanje više od 200 HPV

genotipova odnosno identifikovani su kompletni genomi 160 HPV genotipova (International Human papilloma virus reference center).

### 1.2.2 Struktura viriona HPV

Humani papiloma virusi su sferične virusne čestice bez omotača, ikozaedarne simetrije, koji se replikuju u jedru skvamoznih epitelih ćelija. Čestice virusa imaju dijametar oko 60 nm (Slika 1.). Virusna čestica humanih papiloma virusa sadrži jedan molekul cirkularne dvolančane DNK dužine oko 8000bp, koji čini 12% od ukupne mase viriona. Nukleinska kiselina je smeštena u proteinski kapsid ikozaedarne simetrije, koji se sastoji od dva proteina L1 i L2 (Howley i sar., 2013).

Strukturne analize pokazale su da se virus sastoji od 72 pentamerne kapsomere raspoređene u rešetki ikozaedarne površine, čiji je triangulacioni broj 7 ( $T=7$ ). Kapsomere se sastoje iz pet molekula L1 proteina i jednog molekula L2 proteina. Analiza proteina unutar virusne čestice pokazala je da je virusna DNK povezana sa ćelijskim histonima kako bi se formirao hromatinu sličan kompleks.



**Slika 1. Elektronska mikrofografija i šematski prikaz HPV čestica (Howley i sar., 2013)**

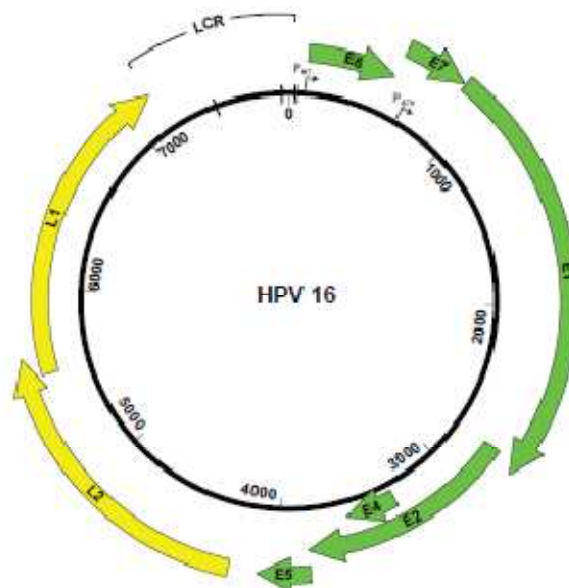


Virusu slične čestice mogu da se dobiju iz različitih papiloma virusa pomoću ekspresije samo L1 proteina u ekspresionim sistemima (ćelije različitih sisara ili drugih vrsta koje ne pripadaju sisarima). Morfologija virusu sličnih čestica koje sadrže samo L1 protein izgleda identično kao intaktne virusne čestice, na kriomikrografijama niske rezolucije (Howley i sar., 2013).

### 1.2.3 Organizacija genoma HPV

Genomi različitih tipova HPV odlikuju se visokim stepenom međusobne sličnosti (Slika 2). Jedna od osobina genoma, identična za sve papiloma viruse, je da su svi otvoreni okviri čitanja (*engl.* Open Reading Frames – ORFs) na jednom lancu virusne DNK, odnosno svi virusni geni nalaze se na jednom lancu DNK, što je i potvrđeno ispitivanjem transkripcije papilomavirusa (Howley i sar., 2013).

Virusna DNK sadrži oko deset otvorenih okvira čitanja, koji su klasifikovani kao rani (*engl.* early - E) i kasni (*engl.* late - L), što je zasnovano na njihovom položaju u virusnom genomu.



**Slika 2. Organizacija genoma HPV (Howley i sar., 2013)**

Rani region kodira virusne regulatorne proteine i sadrži do osam gena (E1 do E8, E8 gen ima samo HPV 6b što je osobina goveđih papilomavirusa) koji su odgovorni za replikaciju HPV DNK (E1 i E2), transkripciju (E2), sazrevanje i oslobađanje (izlazak) virusnih čestica (E4), transformaciju ćelija (E5, E6 i E7) i imortalizaciju (E6 i E7). Kod visoko rizičnih tipova HPV, proteini kodirani E6 i E7 genima mogu da izazovu imortalizaciju primarnih humanih keratinocita, dok se kod niskorizičnih tipova HPV to ne događa (Leto i sar., 2011; Howley i sar., 2013).

Ekspresija proteina kapsida koje kodiraju L1 i L2 geni događa se samo u ćelijama koje produkuju viruse. Položaj, veličina i funkcija određenog broja otvorenih okvira čitanja su dobro konzervirani, sekvencirani i veoma dobro proučeni. U okviru genoma papilomavirusa, nalazi se region veličine jedne kilobaze koji ne sadrži otvorene okvire čitanja, a koji je u literaturi poznat pod različitim nazivima kao što su dugi kontrolni region (*engl.* Long Control Region - LCR), uzvodni regulatorni region (*engl.* Upstream Regulatory Region - URR) ili nekodirajući region.

#### 1.2.4 Klasifikacija HPV

U prošlosti papiloma virusi su bili klasifikovani zajedno sa polioma virusima u okviru jedne familije *Papovaviridae*. To je bilo uslovljeno sličnostima papiloma i poliomavirusa kao što su genomska dvolančana cirkularna DNK, ikozaedarni kapsid sastavljen od 72 pentamere, virion bez omotača i jedro ćelije kao mesto gde se odvija virusna replikacija i sklapanje viriona. Međutim, na osnovu podataka dobijenih sekvenciranjem utvrđeno je da genom papiloma virusa nema značajnu homologiju sa genomom polioma virusa i ima jednosmernu transkripciju za razliku od polioma virusa kod kojih je transkripcija dvosmerna. Zbog navedenih razlika, papiloma virusi su izdvojeni u posebnu familiju *Papillomaviridae* prema sedmom izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa (*engl.* International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) (Bernard, 2010). Iako su papiloma virusi izolovani kod različitih sisara, ptica i reptila, najbolje proučeni su humani papiloma virusi. Do danas

izolovano je najmanje 150 tipova humanog papiloma virusa kao i 60 tipova životinjskih papiloma virusa (Doorbar i sar., 2012).

Tradicionalna klasifikacija papiloma virusa podrazumeva podelu na tipove i oslanja se na njihovu specifičnost za pojedinu vrstu (de Villiers i sar., 2004). U novije vreme, na osnovu komparativne homologije L1 ORF izvršena je filogenetska organizacija, jer iako papiloma virusi imaju sličnu organizaciju genoma, razlika među najdivergentnijim sekvencama L1 može da bude i preko 40%.

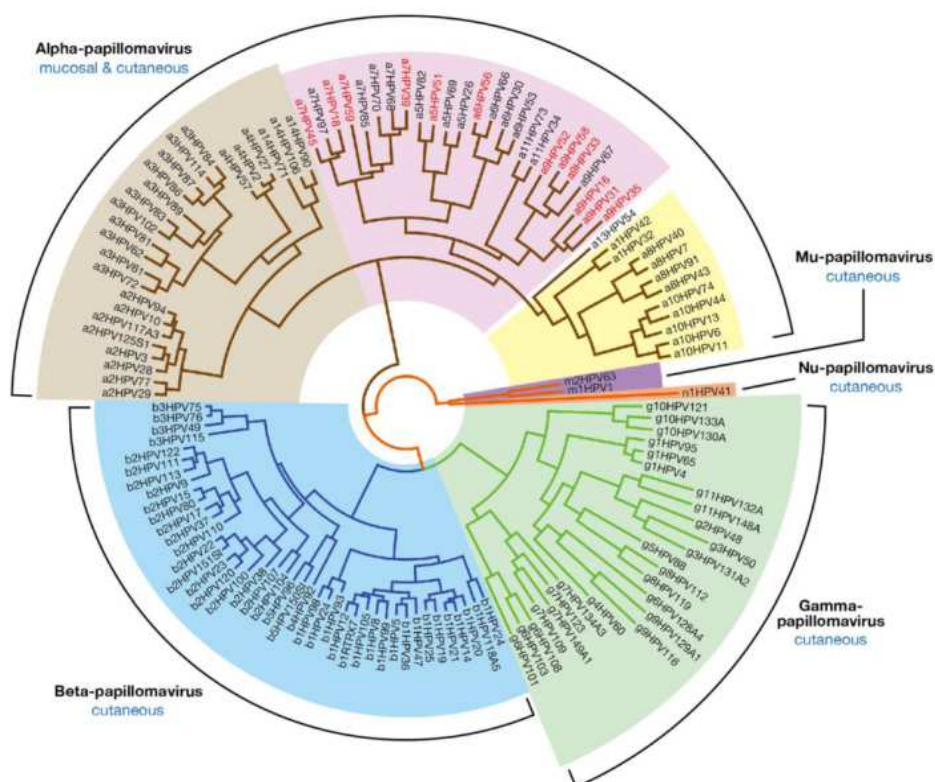
Trenutna klasifikacija, formalno predložena u osmom izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa deli papilomaviruse na sledeće kategorije: rod (*lat. genus*), vrsta (*lat. species*), tip, podtip i varijanta (Bernard, 2010). Najšira kategorija klasifikacije je rod. Papiloma virusi se dele na 29 rodova od kojih je svaki označen slovom grčkog alfabeta. U okviru određenog roda, DNK L1 svi članovi dele više od 60% identične sekvence. Genomi papiloma virusa u okviru iste vrste dele sekvencu koja je identična između od 60 do 70%, dok u okviru istog tipa dele sekvencu identičnu od 71% do 89%. Takođe, za pojedini tip HPV, definisani su podtipovi koje karakteriše identična sekvenca od 90% do 98% i varijante sa identičnom sekvencom preko 98% (Tabela 1.) (Howley i sar., 2013). Varijante HPV se klasifikuju na osnovu razlika u sekvenci DNK L1 gena koje iznose oko 1% i označavaju se kao linija (*engl. lineage*), dok se slične razlike u DNK sekvenci od 0,5 do 1,0% nazivaju podlinijom (*engl. sublineage*) (Cornet i sar., 2012) (Burk i sar., 2013) (Kukimoto i Muramatsu, 2015).

**Tabela 1. Kategorije klasifikacije papiloma virusa**

Klasifikaciona kategorija	Osobina klasifikacione kategorije
1. Rod	sekvenca identična više od 60%
2. Vrsta	sekvenca identična od 60% do 70%
3. Tip	sekvenca identična od 71% do 89%
4. Podtip	sekvenca identična 90% do 98%
5. Varijanta	sekvenca identična preko 98%

Humani papiloma virusi grupisani su u 5 rodova: Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu-, i Nu-papillomavirus (slika 3.) Humani papiloma virusi koji imaju najveći medicinski značaj, to jest povezani su sa karcinomima pripadaju rodu alfa. Tipovi koji su povezani sa karcinomom grlića materice, često označeni kao visoko onkogeni tipovi, pripadaju vrstama 5, 6, 7, 9 i 11. Humani papiloma virus tip 16 koji se najčešće nalazi u karcinomima grlića materice, pripada vrsti devet, a tip 18 sledeći po učestalosti pripada vrsti sedam (Howley i sar., 2013).

Do danas je opisano više intragenotipskih linija i podlinija HPV 16: a) linija A (ranije označavana kao Evro-azijska) sadrži podlinije A1, A2 i A3 (Evropske, EUR) i A4 (Azijska), b) linija B (Afrička 1, AFR1) sadrži podlinije B1 i B2, c) linija C (Afrička 2, AFR2) d) linija D (Severnoamerička/Azijsko-Američka) sadrži podlinije D1 (Severnoamerička, NA), D2 (Azijsko-Američka 2, AA2), i D3 (Azijsko-Američka1, AA1) (Kukimoto i Muramatsu, 2015).



**Slika 3. Klasifikacija humanih papiloma virusa (Doorbar i sar., 2012).**

Postoje snažni dokazi da pojedine varijante genotipa HPV 16 imaju različite efekte u pogledu perzistencije, progresije u prekancerozne lezije i razvoju karcinoma. Najveći broj studija ukazuje da neevropske varijante (non-E) pokazuju viši stepen patogenosti od evropske (E), odnosno da češće izazivaju perzistenciju, kao i prekancerozne lezije. Postoje i pouzdani dokazi da neevropske varijante genotipa HPV 16 povećavaju rizik od pojave karcinoma, a posebno je ovaj rizik povezan sa varijantom AA (Zuna i sar., 2009) (Schiffman i sar., 2010). Genomske varijante HPV 18 su grupisane u tri glavna ogranka: Azijsko-Američki (AA), Evropski (E) i Afrički (Af) (Arias-Pulido i sar., 2005).

Najčešći uzročnik genitalnih bradavica tip 6 pripada vrsti deset. Nasuprot najvećem broju vrsta u okviru Alfa roda, pripadnici alfa vrste 4 (HPV2, HPV27 i

HPV57) su primarno infektivni za negenitalnu kožu. Pripadnici rodova Beta, Gama, Mu i Nu takođe inficiraju delove kože izvan regiona genitalija. U okviru roda Beta nalaze se i Epidermodisplasia verruciformis (EV) vrste, jer dovode do pojave lezija kod pacijenata sa EV (Tabela 2) (Howley i sar., 2013).

**Tabela 2. Značaj pojedinih tipova i rodova HPV, njihovog tropizma i onkogenosti u humanim oboljenjima (modifikovano prema Tommasino, 2014)**

Rod	Tkivni tropizam	Tip HPV	Oboljenje (% udeo)
Alfa	mukozni visoko onkogeni	HPV16	Planocelularni karcinom (~50) Adenokarcinom grlića materice (~35) Orofarinealni karcinom (~25)
		HPV18	Planocelularni karcinom (~20) Adenokarcinom grlića materice (~35)
		HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Planocelularni karcinom (~30)
	mukozni nisko onkogeni	HPV6, 11	Benigne genitalne lezije Respiratorna papilomatoza
		HPV13, 32	oralna fokalna epitelijalna hiperplazija
	kutani benigni	HPV2, 3, 27, 57	kožne bradavice
Mu	kutani	HPV1	kožne bradavice
Beta	kutani	HPV5 i 8	Prvi beta tipovi HPV izolovani su iz planocelularnog karcinoma osoba sa EV
		HPV9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93, 96, 98-100, 104, 105, 107, 110, 111, 113, 115, 118, 120, 122, 124, 143, 145, 150-152, 159	Najverovatnije povezani sa planocelularnim karcinomom osoba sa EV imunokompromitovanih i imunokompetentnih osoba
Gama		HPV4, 48, 50, 60, 65, 88, 95, 101, 103, 108, 109, 112, 115, 116, 119, 121, 123, 126-142, 144, 146-149, 153-158, 161-170	Nepoznato

### 1.3 Replikacija HPV

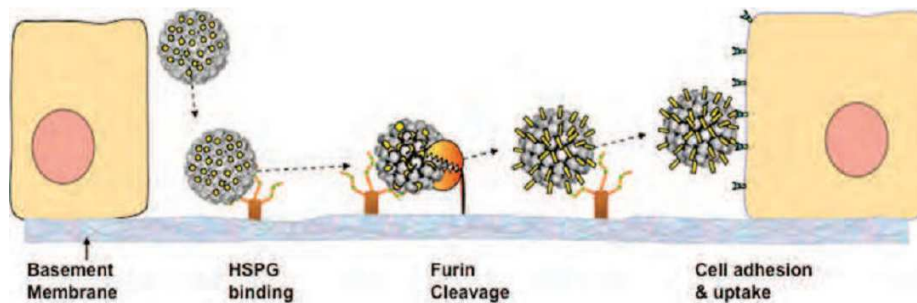
Papiloma virusi su visoko specifični za vrstu i za ćelije pločastih epitela. Pojava produktivne infekcije zavisi od prirode mesta u epitelu gde se odigrala infekcija, kao i od prisustva spoljnih faktora kao što su hormoni i citokini (Howley i sar., 2013).

Produktivna infekcija ćelija HPV može da se podeli na rani i kasni stadijum. Ovi stadijumi su povezani sa fazama diferencijacije epitelnih ćelija. Bazalne ćelije su jedine ćelije pločastog epitela koje mogu da se dele. Stoga, HPV mora da inficira bazalnu ćeliju pločastog epitela kako bi se uspostavila infekcija. Prisustvo virusne DNK u bazalnim i parabazalnim ćelijama papiloma, transkripata virusa u bazalnim ćelijama epidermisa i pojedinih ranih virusnih proteina potvrđuje navedenu tvrdnju. Ekspresija kasnih gena, sinteza proteina kapsida, sinteza vegetativne virusne DNK i formiranje viriona javlja se samo u pločastim epitelnim ćelijama u fazi terminalne diferencijacije (Howley i sar., 2013).

#### 1.3.1 Adsorpcija

Proces infekcije humanim papiloma virusima jedinstven je po tome što je tesno povezan sa životnim ciklusom ovih virusa u slojevitom pločastom epitelu. Kao što je već navedeno, kako bi se uspostavila produktivna infekcija papilomavirusima neophodno je da dođe do infekcije ćelija bazalnog epitela (Howley i sar., 2013). Smatra se da je za uspostavljanje infekcije neophodno oštećenje epitela (makroskopsko ili mikroskopsko) kako bi pristup virusa bazalnoj lamini bio moguć (Doorbar i Quint, 2012). Kako bi selektivna infekcija bazalnih keratinocita bila moguća, virioni HPV su razvili sposobnost da se prvenstveno vezuju za heparan sulfat proteoglikane (HSPGs) na bazalnoj lamini pre nego za ćelije. Dve glavne familije HSPGs su glikani i sindekani. Za infekciju HPV 11 i vezivanje virusu sličnih čestica (*engl.* virus like particle-VLP) VLP HPV16 izgleda nije neophodan specifičan HSPGs receptor. Sindekan-1 je predominantni HSPG u epitelnom tkivu, pa se pretpostavlja da

je on primarni receptor za vezivanje HPV *in vivo* zbog visokog nivoa ekspresije u ciljnim ćelijama kao i povećanje broja ovih molekula tokom zaceljivanja rane (Sapp i Day, 2009). Vezivanje za bazalnu membranu inicira konformacione promene kapsida koje omogućavaju enzimsko isecanje visoko konzerviranog N-terminalnog dela L2 peptida furinom ili proprotein konveratazama 5/6 (Slika 4.) (Howley i sar., 2013).



**Slika 4. Model *in vivo* infekcije papiloma virusima (Howley i sar., 2013)**

Navedeni proces dovodi do ubrzavanja transfera viriona do drugog receptora na bazalnim keratinocitima koji je neophodan za penetraciju virusa i sledstveni transfer virusnog genoma do jedra ćelije. Iako je uloga  $\alpha 6$  integrina i receptora za hormone rasta, kao sekundarnih receptora u ovom procesu detaljno ispitivana, priroda ovog receptora za sada je nepoznata. U novije vreme, predložen je alternativni model adsorpcije, prema kome virioni mogu da interreaguju sa različitim receptorima za hormone rasta na površini ćelija, kao visokomolekulski kompleksi koji sadrže enzimski liziran HSPG i vezane faktore rasta (Doorbar i Quint, 2012).



### 1.3.2 Penetracija i dekapidacija

Ulazak, odnosno penetracija virusa u ćeliju odvija se endocitozom. U do sada sprovedenim studijama utvrđeno je da se penetracija kapsida u ćeliju odvija klatrin zavisnim ili klatrin nezavisnim procesom preko ranih, a potom kasnih endozoma, izuzev dve studije koje predlažu model penetracije koji zavisi od kaveolina sa prenosom viriona do endoplazmatskog retikuluma, odnosno model koji u endocitozi viriona zahteva prisustvo mikrodomena obogaćenih tetraspaninom (Howley i sar., 2013).

U proces internalizacije i prenosa viriona kroz ćeliju uključeno je više ćelijskih faktora. Za otvaranje mesta enzimskog isecanja furinom na L2 proteinu neophodno je prisustvo ciklofilina B i peptidil-prolil cis/trans izomeraze. Za inhibiciju usmeravanja kapsida ka lizozomima odgovorna su dva proteina: sorting nexin 17 i FAK-fokalna adhezionna kinaza. Dekapidacija se, barem delimično, odvija u Lamp-2 pozitivnim kasnim endozomima, posle 8 do 12 sati od vezivanja za površinu ćelije. Kompleksi L2 proteina i genoma izlaze iz kasnih endozoma. Konzervirani segment na C kraju L2 peptida sa izraženom aktivnošću oštećivanja i probijanja membrane je uključen u mehanizam endozomolize. Takođe, aktivnost transmembranske proteaze, g-sekretaze neophodna za infekciju, ima određenu ulogu u napuštanju endozoma. Kretanje kroz citoplazmu ka jedru odvija se mikrotubulima uz pomoć motornog proteina dineina. Kako je za infekciju, barem in vitro, neophodan uslov ćelijska deoba, pretpostavlja se da je za ulazak kompleksa L2-genom, u jedro ćelije, neophodno da postoji poremećaj integriteta membrane jedra koji se događa tokom mitoze (Howley i sar., 2013).

### 1.3.3 Virusna transkripcija

Transkripcija papilomavirusa je složena, jer podrazumeva učešće više promotora, višestruke obrasce obrade transkripata i sintezu različitih iRNK u različitim ćelijama. Tako na primer kod HPV 31, protein P<sub>97</sub> predstavlja glavni promotor aktivan u

nediferentovanim ćelijama koji usmerava ekspresiju E6 i E7 uz neke druge produkte ranih gena, analogan je proteinima P<sub>97</sub> HPV16 i P<sub>105</sub> HPV18. Posle diferencijacije imortalizovanih keratinocita u kojima se nalazi epizomalna DNK HPV 31 aktiviraju se kasni promotori zavisni od diferencijacije, P<sub>670</sub> za HPV 16 i P<sub>742</sub> za HPV31 koji upravljaju ekspresijom produkata kasnih gena, kao što su L1 i L2 i povećanom ekspresijom E1 gena. Takođe, postoje razlike u transkripciji i ekspresiji E6 i E7 gena kod visoko- odnosno nisko onkogenih tipova HPV. Kod visoko onkogenih tipova HPV jedan promotor (P<sub>97</sub> za HPV16 i HPV31 ili P<sub>105</sub> za HPV18) upravlja sintezom iRNK za E6 ili E7 kao intaktnom ili pojavom "splajsova" (*engl.* splicing) u E6 genu. Nasuprot ovome, kod nisko onkogenih tipova kao što su HPV6 i HPV 11, E6 i E7 geni se eksprimiraju pod kontrolom dva nezavisna promotora (Howley i sar., 2013).

#### 1.3.3.1 Regulacija transkripcije (Cis elementi)

Proces transkripcije zavisi od faze diferencijacije epitelnih ćelija, kao i od ćelijske transkripcije, "splajsovanja" (*engl.* splicing), kao i drugih faktora koji utiču na proces obrade RNK. Dugi kontrolni region (*engl.* Long Control Region - LCR) sadrži pojačivačke elemente (cis elementi) koji reaguju kako na ćelijske faktore tako i na regulatorne elemente kodirane virusnom nukleinskom kiselinom. Ovi pojačivački elementi igraju značajnu ulogu u inicijalnoj ekspresiji virusnih gena i možda u održavanju virusne latencije. Utvrđen je određen broj vezujućih mesta na LCR različitih papiloma virusa koja vezuju na primer AP1, SP1, Oct-1 i YY1. Takođe, LCR sadrži i vezujuća mesta za proteine koje kodira virusna DNK kao što je E2 i početno mesto replikacije DNK koje vezuje E1 faktor replikacije (Howley i sar., 2013).

### 1.3.3.2 E2 regulatorni protein

Regulatorni protein E2 ima dobro karakterisane regulatorne funkcije, koje upravljaju virusnom transkripcijom, replikacijom virusne DNK i dugoročnim održavanjem epizoma. Prvo je otkrivena uloga E2 kao aktivatora transkripcije posredovana elementima unutar virusnog genoma koji reaguju na prisustvo ovog proteina. Dva domena ovog proteina su dobro konzervirana kod svih papilomavirusa: a) domen odgovoran za vezivanje DNK i dimerizaciju na karboksiterminalnom delu proteina i b) transaktivirajući domen koji je na aminoterminalnom kraju molekula. Ova dva domena razdvojena su regionom šarke koji nije dobro konzerviran kako u pogledu dužine tako i u pogledu amino-kiselinskog sastava (Howley i sar., 2013). Proučavanjem, na modelu goveđeg papiloma virusa identifikovane su tri vrste ovog proteina. Protein potpune dužine (E2TA) koji može da ima ulogu kao transaktivator ili represor u zavisnosti od mesta u okviru regiona promotora/pojačivača. Dve kraće forme E2 proteina koje se nazivaju E2TR i E8/E2 imaju ulogu represora zato što mogu da inhibišu ulogu transaktivatora E2TA. Ove forme sadrže domene za vezivanje DNK i dimerizaciju, ali im nedostaje transaktivirajući domen. E2TR i E8/E2 mogu da inhibišu transkripcionu i transaktivirajuću ulogu polipeptida pune dužine kompeticijom za vezna mesta na DNK, kao i stvaranjem neaktivnih heterodimera sa transaktivirajućim proteinom pune dužine. Mutacije u otvorenom okviru čitanja E2 kod BPV1 imaju plejotropne efekte, koji remete transformaciju, replikaciju i transkripciju (Doorbar i Quint, 2012; Howley i sar., 2013).

Potvrđeno je da je ekspresija ranih HPV gena pod kontrolom produkta virusnog E2 gena, koji kontroliše elemente unutar LCR osetljive na protein E2. Vezivanje proteina E2 za delove LCR rezultuje u izmeni aktivnosti promotora. Kod HPV16 i HPV18 transkripcija E6 i E7 gena je pod kontrolom ranog promotora (P<sub>97</sub>-HPV16 i P<sub>105</sub>-HPV18) koji se nalaze u LCR delu genoma. U humanim epitelnim ćelijama protein E2 pune dužine može da izazove represiju aktivnosti promotora P<sub>97</sub> i P<sub>105</sub>. Ushodno od ova dva promotora nalaze se četiri vezujuća mesta za E2 protein koja posreduju

navedenu represivnu aktivnost, a osim toga za ovu aktivnost je neophodna i transkripciona aktivnost proteina E2. Uz navedene uloge proteina E2, značajna je i njegova uloga u replikaciji DNK. Protein E2 potpune dužine ima kritičnu dopunsku ulogu za replikaciju virusne DNK, što je najbolje proučeno kod govedih papiloma virusa BPV, kod kojih je potvrđeno da E2 formira kompleks sa E1 kako bi pojačao afinitet E1 za početno mesto DNK replikacije (Doorbar i Quint, 2012; Howley i sar., 2013).

Takođe, prisustvo ovog proteina neophodno je za dugotrajno održavanje virusnog genoma u epizomalnoj formi. Ipak za perzistenciju virusnog genoma u ovoj formi nije dovoljna samo funkcija proteina E2 u replikaciji virusne DNK, već je neophodno i prisustvo cis minihromozoma koji sadrže višestruka mesta vezivanja za E2 protein. U prisustvu E2, epizomalni genomi koji sadrže vezujuća mesta za E2, udružuju se sa mitotskim hromozomima. Osim toga, protein E2 pospešuje segregaciju virusnog genoma kroz istovremenu interakciju sa kondenzovanim mitotskim hromatinom, povezujući virusni genom sa celularnim mitotskim hromozomima, što osigurava prisustvo virusnog genoma unutar jedrove ovojnice, koja se ponovo formira tokom telofaze. Prisustvo TA domena je neophodno za opisano povezivanje sa mitotskim hromozomima i održavanjem genoma u ćelijama koje se dele, a pojava specifičnih mutacija u TA domenu onemogućava povezivanje sa mitotskim hromozomima. Značajnu ulogu u ovoj ulozi proteina E2 imaju određeni ćelijski faktori kao što su Brd4, Ch1R. Pojedini HPV tipovi koji pripadaju rodu alfa-papilomavirus (HPV11, HPV16 i HPV18) pokazuju veći afinitet za vezivanje proteina E2 sa deobnim vretenom, odnosno za vezivanje na lokusima ribozomalne DNK pericentromeričnih regiona hromozoma kod HPV8 (Doorbar i Quint, 2012; Howley i sar., 2013).

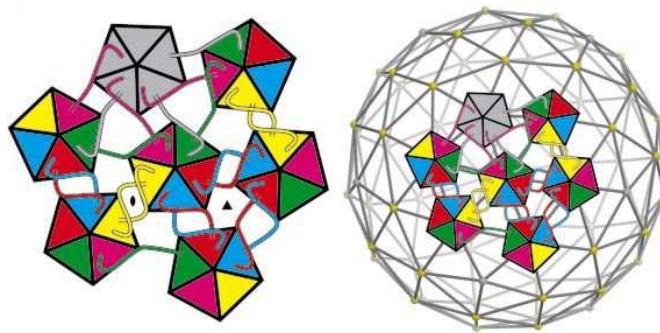
### 1.3.3.3 Ekspresija kasnih gena

Kasne virusne funkcije, kao što su sinteza vegetativne DNK, sinteza proteina kapsida i sklapanja virusnih čestica odvijaju se isključivo u diferentovanim keratinocitima. Regulacijom transkripcije kasnih gena upravlja specifični promotor koji postaje aktivan samo u terminalno diferentovanim keratinocitima. Kasni geni uključuju gene za proteine kapsida L1 i L2, kao i E4 koji se nalazi u okviru regiona koji obuhvata rane gene HPV. Promotori koji regulišu transkripciju kasnih gena se ne nalaze u LCR, već u okviru E7 gena (na primer P<sub>742</sub> kod HPV31 i P<sub>670</sub> kod HPV16). Diferencijacija keratinocita može samostalno da aktivira nizak nivo kasne transkripcije, a takođe i amplifikacija genoma može da dovede do povećanja nivoa ekspresije kasnih gena. Ekspresija kasnih gena L1 i L2 regulisana je na nivou posttranskripcije. Opisani su cis elementi odgovorni za navedenu regulaciju, koji se nalaze u 32 regiona kasne RNK, koji se ne prevode u proteine (*engl.* untranslated regions-UTRs). Ovi negativni regulatorni elementi dovode do inhibicije stabilnosti kasne iRNK. Postoje najmanje tri različita ćelijska faktora (65-kD subjedinica U2 pomoćnog faktora splajsovanja, 64-kD subjedinica faktora koji stimuliše isecanje i Elav protein sličan HuR) koji regulišu nivo RNK na nivou postranskripcije. Postoje pretpostavke, da su ovi i drugi ćelijski faktori odgovorni za jedarno zadržavanje ili nestabilnost u citoplazmi jedarnog retencionog elementa (*engl.* nuclear retention element NRE). Diferencijacija keratinocita bi potom vodila promenama navedenih ćelijskih faktora sa sledstvenim prekidom inhibicije obrade kasne iRNK (Howley i sar., 2013).

### 1.3.4 Sklapanje i izlazak virusnih čestica

Sklapanje virusne čestice odvija se u terminalno diferentovanim keratinocitima u kojima je došlo do replikacije virusnog genoma i ekspresije proteina viriona. Ulazak L1 i L2 proteina u jedro ovih ćelija posredovan je ćelijskim karioferinima (posebno Kap alfa2/beta1 heterodimer), koji mogu da spreče sklapanje nezrelog L1 u

citoplazmi. L2 protein može da poveća efikasnost reakcije sklapanja, koji se u jedru povezuje sa Hsc70 koji možda učestvuje u reakciji sklapanja, ali ga u L1/L2 kapsidu koji sadrži genom nema. Pretpostavlja se da se mehanizam enkapsidacije zasniva na sposobnosti razlikovanja veličine nukleinske kiseline. Nascentni kapsidi mogu da se nalaze u blizini bilo koje jedarne DNK u obliku nestabilne otvorene strukture. Stabilna zatvorena struktura može da se formira samo ukoliko je veličina DNK molekula oko 8 kb što odgovara virusnom genomu. Pojava zavisnosti postupka enkapsidacije od L2 proteina varira u zavisnosti od tipa papiloma virusa. Tako, enkapsidacija DNK gotovo potpuno izostaje kod ekspresije samo BVP1 L1, dok HPV16 L1 efikasno enkapsulira pseudovirusne genome ili fragmente linearne ćelijske DNK, iako su dobijene virusne čestice suštinski neinfektivne (Howley i sar., 2013). Izlaganje formiranih kapsida oksidativnoj okolini u terminalno diferentovanom slojevitom epitelu, dovodi do stabilizacije kapsida formiranjem disulfidnih veza između konzerviranih cisteinskih rezidua susednih L1 monomera. Ovaj proces sazrevanja kondenzuje kapsid i čini ga otpornijim na proteolizu. Na ovaj proces nemaju uticaja ni L2 proteini ni virusna DNK. Formirane virusne čestice sadrže 360 molekula L1 organizovanih u 72 pentamerne kapsomere i najviše 72 L2 molekula (Slika 5.) (Sapp i Day, 2009).



**Slika 5 - Mehanizam sklapanja viriona HPV-a (Modis i sar., 2002)**

Protein E4 prisutan u znatnoj količini, prema nedovoljno potvrđenim pretpostavkama, može da doprinese oslobađanju viriona u gornjim slojevima epitela, budući da se organizuje u amiloidna vlakna koja remete strukturu keratina. Papiloma virusi nisu litični, a oslobađanje virusa se događa kao posledica uobičajenog gubitka integriteta jedarne i citoplazmatske membrane tokom terminalne diferencijacije inficiranog keratinocita. Pojava kolapsa citokeratinskih filamenata posredovana E4 proteinom izgleda ima ulogu u oslobađanju virusne čestice (Doorbar i Quint, 2012).

### 1.3.5 Replikacija virusne DNK

Postoji tri različita načina replikacije kod papilomavirusa. Prvi se javlja posle infekcije u bazalnim keratinocitima, kada je broj kopija virusnog genoma nizak (50-100 kopija). O ovom načinu replikacije virusne DNK, još uvek ima veoma malo informacija. Drugi način replikacije virusne DNK odvija se u ćelijama u kojima se nukleinska kiselina održavase kao stabilni epizom u više kopija i replikuje se prosečno jednom po ćelijskom ciklusu tokom S-faze, sinhronizovano sa hromozomima domaćina. Replikacija virusnih epizoma omogućava perzistentnu infekciju u bazalnim ćelijama epiderma. Vegetativna DNK replikacija javlja se u diferentovanijim ćelijama papiloma. Ove ćelije ne prolaze kroz ćelijski ciklus i nisu sposobne da podrže sintezu ćelijske DNK. Posredstvom E6 i E7, HPV aktivira mehanizme replikacije DNK i otpočinje vegetativna sinteza virusne DNK koja produkuje genome koji će tokom procesa sklapanja biti uneseni u otvorene kapside (Howley i sar., 2013).

#### 1.3.5.1 Početno mesto replikacije DNK

Početno mesto replikacije DNK sadrži najmanje region bogat adeninom (A) i timinom (T) (*engl.* A+T rich region ATR), E1 vezujuće mesto koje uključuje region dijadne simetrije-palindrom (*engl.* region of dyad symmetry-DSR) i mesto vezivanja

E2. Replikacija DNK zavisna od početnog mesta replikacije može da se pokrene *in vitro* pomoću ćelijskih ekstrakata koji sadrže visoku koncentraciju isključivo E1 u odsustvu E2. Protein E1 je virusni faktor esencijalan za replikaciju i ima ulogu od ATP-a zavisne helikaze. Uloga proteina E2 je pomoćna u procesu virusne replikacije, aktivacija i vezivanje E1 za početno mesto replikacije je stabilizovana interakcijom sa proteinom E2 i vezivanjem E2 za mesta u blizini početnog mesta replikacije virusne DNK (Doorbar i Quint, 2012; Howley i sar., 2013).

### **1.3.5.2 E1 protein**

E1 protein je visoko konzerviran među papilomavirusima. Ovo je nuklearni fosfoprotein mase 68-kD koji se specifično vezuje za početno mesto replikacije. Sama po sebi, ova veza je slaba, a interakcija sa E2 proteinom je stabilizuje. E1 protein je aktivan u formi heksamera, ima DNK zavisnu ATP-aznu i helikaznu aktivnost koja se vezuje za C terminalni kraj molekula, a neposredno uz ovaj region je i sekvenca dužine 160 amino kiselina koja predstavlja mesto za vezivanje DNK (Fernandes i de Medeiros Fernandes, 2012). Takođe, njegovo prisustvo neophodno je za inicijaciju i elongaciju virusne DNK. Osim interakcije sa proteinom E2, potvrđeno je vezivanje E1 proteina sa ćelijskim proteinima kao što je p180 subjedinica ćelijske DNK polimeraze  $\alpha$ -primaze i tako pokreće ćelijski mehanizam DNK replikacije ka početnom mestu replikacije virusne DNK. Takođe, precizno kontrolisana, sa ćelijskim ciklusom sinhronizovana, replikacija virusnih genoma zavisi od veze E1 sa kompleksom ciklina E-Cdk2 specifičnim za S-fazu (Howley i sar., 2013).

### **1.3.5.3 Funkcije E2 proteina u replikaciji virusa**

Iako, protein E2 nije esencijalan za replikaciju zavisnu od početnog mesta *in vitro*, protein E2 značajno stimuliše sposobnost E1 da otpočne replikaciju DNK, značajno pospešuje sposobnost E1 proteina da se vezuje za početno mesto replikacije i može da smanji represiju *in vitro* replikacije virusne DNK posredovanu nukleozomom.



Kompleks E1-E2 je prekursor većeg multimernog E1 kompleksa, koji posle uklanjanja E2 izvija početno mesto replikacije i na posletku raspliće heliks DNK. Heksamerna forma E1 proteina povezana sa helikaznom i ATP-aznom aktivnošću je presudna za otpočinjanje DNK replikacije (Howley i sar., 2013).

#### **1.3.5.4 Vegetativna DNK replikacija**

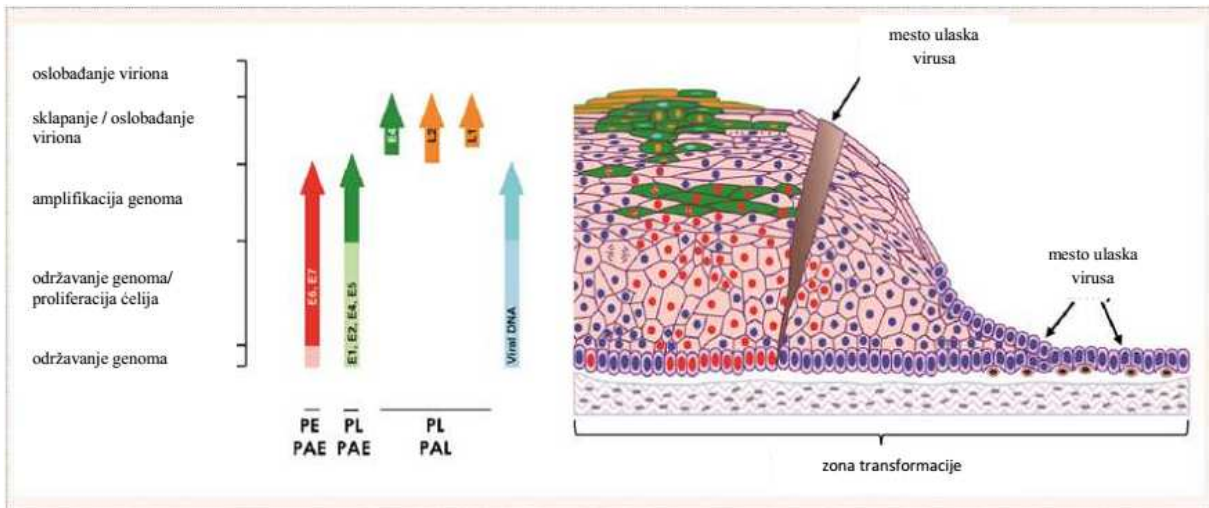
Ovaj način replikacije virusne DNK neophodan je za formiranje genoma koji će omogućiti morfogenezu virusnih čestica. Mehanizmi koji regulišu prelazak iz stanja mehanizma održavanja epizoma u vegetativnu replikaciju virusne DNK nije poznat. Ovaj prelazak možda uključuje odsustvo kontrolnih ćelijskih faktora u keratinocitima koji se diferentuju. Relativni nivoi virusnih faktora kao što su E1 ili E2 (ili njihove modifikacije) mogu da se promene u keratinocitima koji se diferentuju. Pretpostavlja se da mehanizam vegetativne replikacije može da se odvija na dvosmerni način preko  $\theta$ (teta)-strukturnih intermedijera, slično kao kod polioma virusa (Howley i sar., 2013).

### **1.4 Životni ciklus HPV, transformacija i imortalizacija inficiranih ćelija**

#### **1.4.1 Životni ciklus HPV**

Za početak HPV infekcije, neophodna je pojava mikrotraume u višeslojnom epitelu, kako bi infektivni virioni mogli da dopru do bazalne lamine. Inficirane bazalne ćelije, u kojima se virusni genom održava u obliku epizoma, formiraju rezervoar infekcije. Različiti događaji u životnom ciklusu virusa odvijaju se u različitim slojevima epitela (Slika 6.). U lezijama koje izazivaju tipovi HPV visokog rizika (kao što je HPV 16), dešava se ekspresija E6 i E7 kod ćelija u nižim slojevima koje prolaze kroz ćelijski ciklus i stimulisane su na podelu. U srednjim slojevima, proteini neophodni za amplifikaciju virusnog genoma su u povišenoj koncentraciji i iniciraju amplifikaciju virusnog genoma. U navedenim ćelijama koje su obično u S ili G2 fazi dolazi do ekspresije E4. U gornjim slojevima epitela, ćelije izlaze iz ćelijskog ciklusa, a u grupi E4

pozitivnih ćelija, ekspimiraju se L1 i L2 virusni proteini, omogućavajući stvaranje virusnih čestica. Smatra se da HPV može da inficira kolumnarne epitelne ćelije, rezervne epitelne ćelije, i ćelije skvamo-kolumnarne spojnice u cervikalnoj zoni transformacije i endocerviksu. Infekcija navedenih tipova ćelija može da bude povezana sa različitim oblicima progresije bolesti i sa pojavom adenokarcinoma (Doorbar i Quint, 2012).



**Slika 6. Životni ciklus HPV (Doorbar i Quint, 2012)**

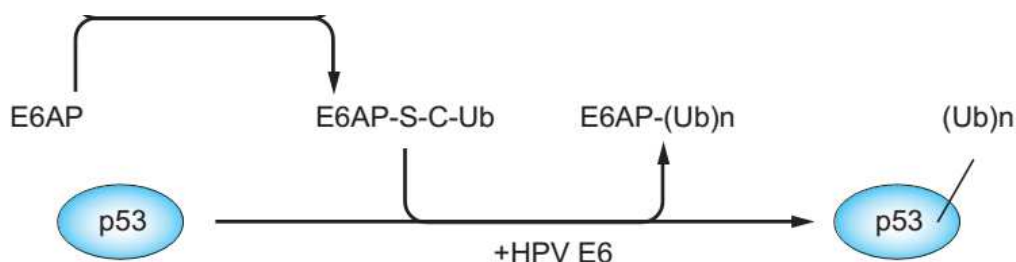
#### 1.4.2. Transformacija i imortalizacija papiloma virusima

Pojedini papiloma virusi su sposobni da izazovu ćelijsku transformaciju, što je i potvrđeno u in vitro uslovima u kulturi ćelija. Najbolje proučen iz ove grupe papiloma virusa je goveđi papiloma virus-1 (BPV1) koji transformiše ćelije nakon infekcije mišije C127 i NIH 3T3 ćelijske linije. Ispitivanja koja su izazivala imortalizaciju primarne ćelijske kulture glodara, humanih fibroblasta i/ili humanih keratinocita omogućila su uvid u proces transformacije i imortalizacije izazvan HPV. Navedena

ispitivanja pokazala su da su glavni onkogeni HPV geni E6 i E7, a proces imortalizacije u navedenim primarnim ćelijama sposobni su da izazovu samo visoko onkogeni HPV tipovi, ali ne i nisko onkogeni HPV tipovi (Howley i sar., 2013).

#### 1.4.2.1 HPV E6 gen

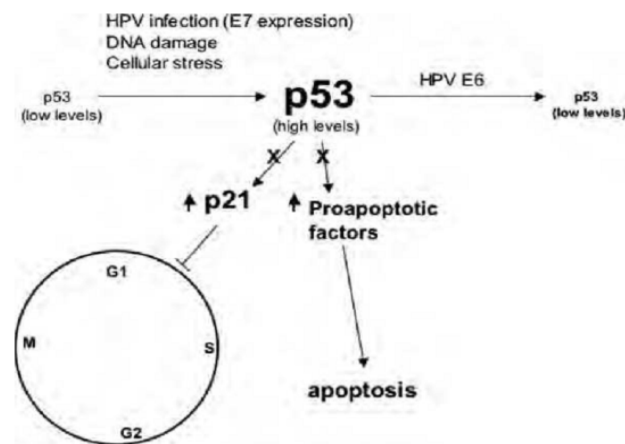
Protein HPV E6 je veličine oko 150 amino kiselina i sadrži četiri sekvence Cys-X-X-Cys koji vezuju cink. Prva otkrivena funkcija E6 visoko rizičnih tipova HPV roda alfa-papiloma virusa (na primer HPV 16 i HPV 18) u procesu transformacije bila je njegova sposobnost komplementarne aktivnosti sa E7 u imortalizaciji humanih keratinocita. Ova aktivnost objašnjenja je njegovom sposobnošću da formira kompleks sa p53, osobina koju nemaju E6 proteini nisko onkogenih HPV tipova. Posredstvom interakcije sa p53, E6 blokira ulogu p53 u transkripciji, jer izostaje aktivacija na p53 osetljivih promotora. Nivo p53 proteina je, uopšteno govoreći, nizak u HPV pozitivnim ćelijama karcinoma kao i ćelijama imortalizovanim HPV onkoproteinima, jer E6 protein visoko onkogenih HPV tipova pospešuje od ubikvitina zavisnu degradaciju p53. Nakon vezivanja E6 proteina odnosno formiranja kompleksa sa ćelijskom ubikvitin-protein ligazom E6AP, dolazi do vezivanja ubikvitina za p53 protein što za posledicu ima razgradnju p53 delovanjem 26S ćelijskog proteozoma (Slika 7.) (Howley i sar., 2013).



**Slika 7. Mehanizam degradacije p53 posredovan formiranjem kompleksa E6/E6AP (Howley i sar., 2013)**

Osim toga, poluživot p53 je drastično smanjen u ćelijama u kojima se događa ekspresija E6, a E6 sprečava porast p53 kada se ćelije izlože genotoksičnim agensima. HPV E6 poseduje i antiapoptotsku aktivnost posredovanu izmenom regulatornih funkcija p53 neophodnih za regulaciju ćelijskog ciklusa (Howley i sar., 2013).

Nivoi p53 u ćelijama koje je imortalizovao E6 ili HPV pozitivnim ćelijama karcinoma su, u proseku, dva do tri puta niži u poređenju sa normalnim ćelijama. U ćelijama koje nisu inficirane sa HPV dolazi do značajnog porasta p53, posle oštećenja DNK ili genotoksičnog stresa. Viši nivoi p53 mogu da dovedu do zastoja rasta u G1 fazi ćelijskog ciklusa ili do apoptoze, kao deo odbrambenog mehanizma ćelije, koji omogućava reparaciju nastalih oštećenja DNK ili uklanjanje ćelije. Ćelije u kojima se odvija ekspresija E6, ne pokazuju porast nivoa p53 posredovan oštećenjem DNK, ukazujući na sposobnost E6 da pospeši degradaciju p53 i spreči porast nivoa p53 iznad određenog graničnog nivoa. Povišeni nivoi p53 mogu da vode ili u apoptozu ili zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G, transkripcijom proapoptotskih gena ili p21<sup>cip1</sup>. Virusni onkoproteini mogu da poremete ovu regulatornu ulogu p53, bilo formiranjem stabilnog ali nefunkcionalnog kompleksa bilo ubikvitilacijom i pojačanom proteolizom (Slika 8.).



**Slika 8. Virusna infekcija, ekspresija E7 i agensi koji oštećuju DNK podižu nivo p53 (Howley i sar., 2013)**

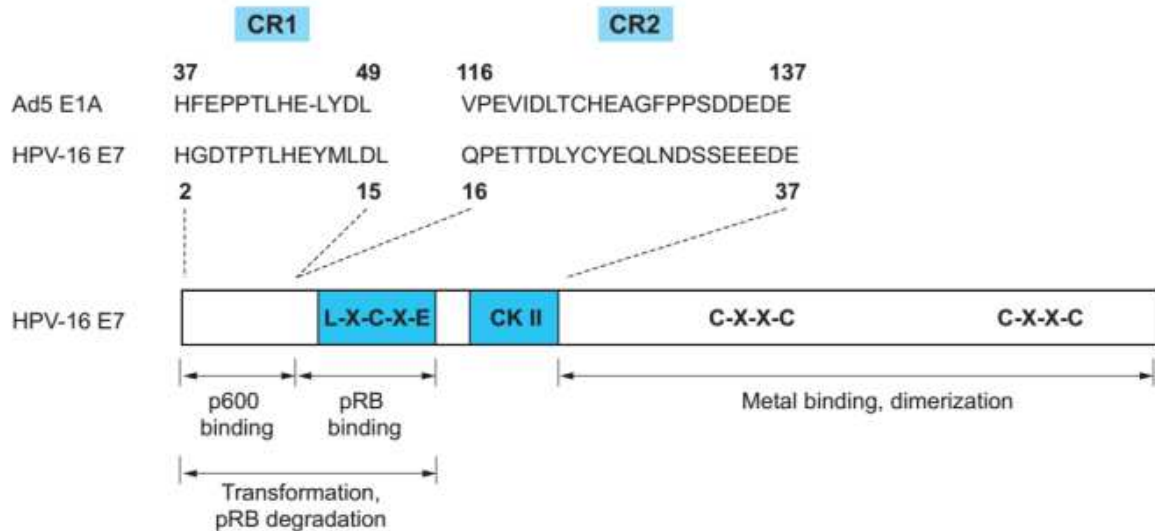
Protein E6 HPV 16 vezuje se za E6AP u okviru domena na N terminalnom kraju i usmerava E6AP da ubikvitiluje p53. Otkriveno je takođe nekoliko potencijalnih od E6 nezavisnih supstrata E6AP, uključujući humani homolog kvasničkog RAD23 proteina koji je uključen u mehanizam popravke ekscizije nukleotida, Blk kinazu iz src familije i MCM7 podjedinicu "licencing" faktora replikacije. Takođe E6 indukuje samoubikvitilaciju E6AP. Postoji pretpostavka da preusmeravanje aktivnosti E6AP prema p53 posredovano E6 proteinom utiče na pospešivanje ili inhibiciju dejstva E6AP na njegove uobičajene supstrate, što takođe može da bude jedan od mehanizama E6 proteinom posredovane transformacije ćelije. E6AP je deo različitih ćelijskih kompleksa, kao što je na primer proteazom i E6 protein postaje deo ovih ćelijskih kompleksa preko E6AP. Stoga je moguće da su i druge p53 nezavisne aktivnosti E6 proteina, posredovane E6AP putem ovih ćelijskih kompleksa (Howley i sar., 2013).

Jedna od važnijih p53 nezavisnih aktivnosti E6 HPV 16 jeste njegova sposobnost da aktivira telomeraze u keratinocitima. Takođe, E6 protein može da indukuje i nestabilnost u genomu, što je potvrđeno detekcijom translokacija i aneuploidija, kao i pojavom održavanja epizomalne replikacije tokom životnog ciklusa virusa, odnosno imortalizacijom humanih epitelnih ćelija (Klingelutz, 1996).

#### **1.4.2.2 Protein E7**

Protein E7 kod visoko onkogenih HPV tipova je mali protein veličine oko 100 amino kiselina, može da vezuje cink, a fosforiliše ga kazein kinaza II (CKII). Ovo je multifunkcionalni protein koji pokazuje određene funkcionalne i strukturne sličnosti sa E1A proteinom adeno virusa i TAg proteinom kod SV40. Strukturni region sličan za sva tri virusa je konzerviran i ima veliki značaj za proces transformacije kod sva tri virusa. Potvrđena je uloga ovog proteina u vezivanju za važne ćelijske regulatorne

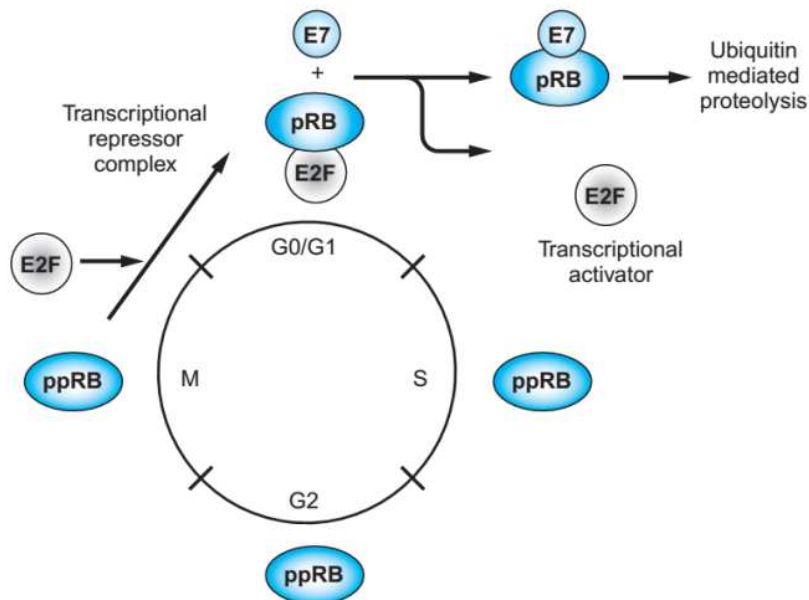
proteine, između ostalog i za produkt retinoblastoma supresornog gena pRB i povezane proteine p107 i p130 (Slika 9.).



**Slika 9. Sličnost konzerviranih regiona - CR1 i CR2 proteina Ad5 i 38 ak na N-terminalnom kraju HPV16 E7. Region CR2 sadrži mesto vezivanja pRB protein i mesto fosforilacije CKII(Howley i sar., 2013)**

Regulacija fosforilacije pRB proteina odvija se tokom ćelijskog ciklusa tako da je u fazi G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub> hipofosforilisan (aktivnošću enzima fosfataze), a u fazi S, G<sub>2</sub> i M fosforilisan (aktivnošću enzima ciklin zavisne kinaze). Aktivna forma ovog proteina je hipofosforilisani oblik koja onemogućava dalju progresiju ćelijskog ciklusa. E7 protein HPV16 vezuje se specifično za aktivnu formu ovog proteina i posledično odvaja od nje transkripcioni faktor E2F, što dovodi do nastavljanja ćelijskog ciklusa u S fazu. Sposobnost ovog virusnog proteina da napravi kompleks sa pRB, odgovorna je, barem delom, za indukciju sinteze DNK i ćelijske proliferacije (Slika 10.). Takođe, dolazi do vezivanja sa proteinima p107 i p130, uz sledstvenu degradaciju u proteazomu. Motiv LXCXE u regionu CR2 E7 proteina odgovoran je za vezivanje ova dva proteina, ali je za

njihovu degradaciju neophodna dodatna sekvenca u neposrednom aminoterminalnom kraju CR1 regionu (Howley i sar., 2013).



**Slika 10. Protein E7 ukida regulaciju ćelijskog ciklusa posredovanu proteinom pRB (Howley i sar., 2013)**

Smatra se da navedena aktivnost E7 proteina nije dovoljna da objasni mehanizme transformacije i immortalizacije u kojima učestvuje protein E7. Iako ovaj protein može da se veže za veći broj ćelijskih proteina, pojedini od njih imaju poseban značaj. Tako poseban značaj ima interakcija E7 sa od ciklina zavisnim inhibitorima kinaze (cdk), interakcija i ukidanje aktivnosti p27<sup>kip1</sup> (posreduje inhibiciju ćelijskog rasta putem TGF- $\beta$  u keratinocitima). Osim toga, HPV 16 E7 može da se poveže sa p21<sup>cip1</sup> i ukine njime posredovanu inhibiciju cdk kao i inhibiciju replikacije DNK zavisne od nuklearnog antigena proliferacije ćelija (PCNA) (Funk, 1997; Jones, 1997). Protein p21<sup>cip1</sup> se uobičajeno indukuje tokom diferencijacije keratinocita i pretpostavlja se da njegova inhibicija posredovana E7 može da bude kritičan faktor u omogućavanju replikacije DNK papiloma virusa u diferentovanim skvamoznim epitelnim ćelijama.

Prisustvo E7 proteina je neophodno za održavanje HPV epizoma u epitelnim ćelijama, a delovi sekvence koji učestvuju u ćelijskoj transformaciji takođe su značajni za funkcije bitne za životni ciklus virusa. Tako, sposobnost E7 proteina da indukuju replikaciju DNK preko odvajanja E2F faktora transkripcije i inaktivacija proteina p21<sup>cip1</sup> i p27<sup>kip1</sup> predstavlja esencijalnu komponentu u replikacionoj strategiji HPV. Protein E7 visoko onkogenih HPV tipova može da izazove nestabilnost genoma kod normalnih ćelija, a HPV 16 E7 indukuje G1 i S fazu, izaziva defekte kontrolnih tačka mitoze i razdvaja sintezu centrozoma od ciklusa deobe ćelije. Ovo dovodi do pojave multipolarnih mitozama, sa pojavom pogrešne segregacije hromozoma, aneuploidije, defekata dvolančane DNK i anafaznih mostova, što ukazuje da pored numeričkih anomalija, E7 može da indukuje i strukturne aberacije hromozoma. Pojava duplikacije centrozoma, takođe rezultuje u nestabilnosti genoma i aneuploidiji što predstavlja bitnu odliku ćelija karcinoma (Howley i sar., 2013).

#### 1.4.2.3 Protein E5

Mnogi papiloma virusi koji izazivaju isključivo epitelijalne papilome, u svom genomu imaju E5 gene koji kodiraju hidrofobne proteine. Ovi proteini kod HPV neohodni su za optimalni rast. U kulturi ćelija E5 geni različitih HPV tipova imaju umerenu transformišuću aktivnost, a kod transgenih miševa HPV 16 E5 eksprimiran u bazalnim keratinocitima može da izmeni rast i diferencijaciju stratifikovanog epitela i izazove tumore epitela. Iako mehanizmi kojima E5 protein izaziva navedene efekte nisu u potpunosti rasvetljeni, pretpostavlja se da ovaj mehanizam može da uključuje interakcije sa receptorom za epidermalni faktor rasta (EGFR) ili 16 kD subjedinicom ATP-aze, što dovodi do inhibicije acidifikacije endozoma. U najvećem broju tkiva HPV pozitivnih karcinoma ne dolazi do ekspresije E5 gena, navodi na pretpostavku da ukoliko E5 ne dovodi do proliferacije ćelija in vivo on može da ispoljava svoju funkciju u benignim papilomima, a ne u karcinomima. Moguće da ovaj protein učestvuje u



procesu nastajanja karcinoma ili drugim interakcijama virus-domaćin. Utvrđena je i uloga E5 u smanjenoj ekspresiji molekula MHC klase II (Howley i sar., 2013).

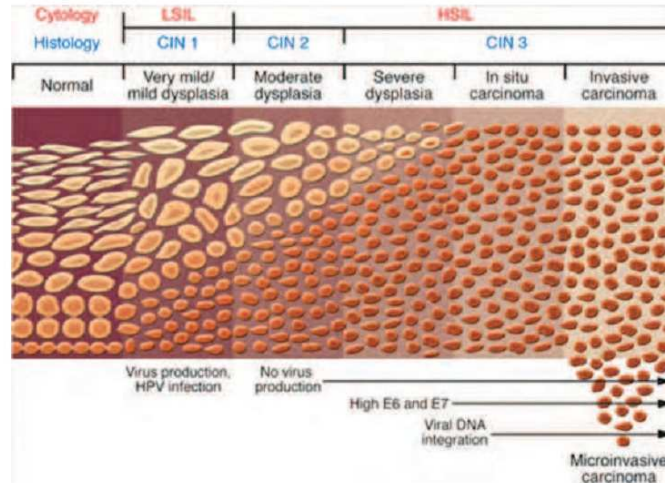
## **1.5 Patogeneza HPV infekcije i imunski odgovor**

### **1.5.1 Patogeneza HPV infekcije**

Dominantan način prenošenja humanih papiloma virusa je direktan kontakt tokom seksualnog odnosa. Drugi načini prenošenja su takođe potvrđeni, ali je njihov značaj u pojavi karcinoma grlića materice neznatan, stoga oboljena izazvana HPV pripadaju grupi seksualno prenosivih bolesti (Bosch i de Sanjose, 2007). Infekcija različitim tipovima HPV uobičajeno traje od 12 do 18 meseci i virus iz organizma eliminiše imuni sistem. Međutim, kod oko 10% žena ne dolazi do eliminacije virusa kod kojih se javlja prezistentna infekcija (Fernandes i sar., 2012). Glavna posledica perzistentne infekcije visoko onkogenim HPV tipovima je razvoj lezija koje mogu da dovedu do pojave karcinoma, te stoga perzistentna virusna infekcija predstavlja najvažniji faktor rizika za razvoj karcinoma grlića materice (Moody i Laimins, 2010).

Detalji imunog odgovora koji dovodi do eliminacije HPV infekcije su još uvek nedovoljno poznati. Iako se termin eliminacija HPV koristi kada nije moguće utvrditi prisustvo ovih virusa osetljivim metodama, prisustvo HPV možda nije u potpunosti uklonjeno (Baseman i Koutsky, 2005). Nasuprot eliminaciji HPV, rizik od karcinoma dramatično raste kod perzistentne HPV infekcije. Postepeno, dugotrajna perzistentna infekcija dovodi od pojave karcinoma, mada ona nužno ne mora da dovede do pojave karcinoma. Pojava karcinoma najčešće se javlja u takozvanoj zoni transformacije u kojoj se cilindrični epitel endocerviksa spaja sa slojevitim epitelom egzocerviksa. U inficiranim ćelijama epitela odvija se niz displastičnih promena koje dovode do pojave bazaloidnih ćelija i označavaju se kao skvamozne intraepitelijalne lezije visokog stepena (*engl.* Low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) i skvamozne intraepitelijalne lezije visokog stepena (*engl.* High-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL) (Slika 11.). Navedene promene, izuzev invazivnog karcinoma, mogu

spontano da se povuku, a regresija ovih promena praćena je potpunom eliminacijom virusa iz organizma (Baseman i Koutsky, 2005; Howley i sar., 2013).



**Slika 11. Progresija displastičnih promena epitelnih ćelija (Howley i sar., 2013)**

U displastičnim lezijama visokog stepena, javlja se ekspresija manjeg broja HPV gena (primarno E6 i E7 gena), koji se najintenzivnije eksprimiraju u bazalnim slojevima epitela, nasuprot njihovoj dominantnoj ekspresiji u suprabazalnim ćelijama tokom produktivne infekcije. Nivoi ekspresije E6 gena značajno su niži od nivoa ekspresije E7 gena. Ekspresija oba gena posredovana je jednim promotorom, a pojava alternativnog "splajsovanja" određuje relativni stepen ekspresije ovih gena. Progresija promena ka displaziji visokog stepena povezana je sa obrascem "splajsovanja" koji favorizuje ekspresiju E7 gena u odnosu na E6 gen. Geni E6 i E7, koji imaju veći broj funkcija, su glavni činioci koji upravljaju progresijom promena ka displaziji visokog stepena, tako što upravljaju nizom patogenetskih promena. Metilacija genoma HPV 16 dovodi do promene nivoa rizika za progresiju ka displaziji visokog stepena ili karcinomu grlića materice, pri čemu je metilacija CpG lokusa u L1, L2 i E2/E4 genima povezana sa povećanim rizikom od prekanceroznih lezija (Mirabello i sar., 2013), dok je metilacija lokusa u LCR (*engl.* long control region-LCR) povezana sa sniženjem

rizika od prekanceroznih lezija (Sun i sar., 2011). Integracija HPV DNK nehomologom rekombinacijom, predstavlja ključnu promenu koja stabilizuje visok nivo ekspresije E6/E7 i često je povezana sa lezijama težeg stepena. Pojava integracije HPV DNK najčešće se detektuje u CIN3 promenama i karcinomu. Osim toga, učestalost pojave integracije HPV DNK zavisi i od genotipa HPV, pa se integracija može da detektuje u gotovo svim karcinomima grlića materice udruženim sa HPV 18 i 45, polovini karcinoma udruženih sa HPV 16 i oko 40% karcinoma udruženih sa HPV 31 i 33 (Vinokurova i sar., 2008). Virusna DNK može da se integriše na većem broju mesta u humanom genomu, ali se najčešće događa na fragilnim mestima u genomu. U određenoj leziji integracija može da se dogodi na jednom ili više lokusa (Howley i sar., 2013). Integracija virusne DNK karakteriše se pojavom delecija velikih segmenata virusnog genoma i transkripcijom sekvence nishodno od LCR (Spangle i sar., 2012). U integriranoj formi, E6 i E7 geni ostaju intaktni, a njihova transkripcija se odvija posredstvom LCR. Oštećenja E1 i E2 gena kao i drugih nishodnih delova virusnog genoma nastala tokom procesa integracije, dovode do pojave višeg nivoa transkripcije E6 i E7 gena. Ćelijski promotorski elementi blizu mesta integracije mogu takođe doprineti povećanoj ekspresiji intaktnih virusnih gena. Ćelijske linije izvedene iz karcinoma grlića materice udruženih sa HPV 16 i HPV 18 sadrže divlje tipove p53 i pRb, za razliku od većine karcinoma koji nisu udruženi sa HPV, kod kojih su prisutne mutirane forme p53 i pRb. Ova činjenica navodi na zaključak da E6 i E7 proteini, uobičajeno prisutni u navedenim ćelijskim linijama, dovode do funkcionalne inaktivacije p53 i pRb. Osim toga, u ovim ćelijskim linijama moguće je detektovati pojavu p16 proteina, što je posledica ćelijskog odgovora na E7 zavisnu inaktivaciju pRb (Howley i sar., 2013).

Visoko onkogeni genotipovi HPV indukuju patološku duplikaciju centrozoma, što može da dovede do pojave aneuploidije i nestabilnosti genoma. Deregulacija ovog koraka mitoze zavisi od E6 i E7 proteina, pri čemu je uloga E7 proteina značajnija. Pojava aneuploidije može da bude posledica povezivanja E7 proteina sa proteinom jedarnog mitotskog aparata 1-NuMa (*engl.* nuclear mitotic apparatus protein 1).

Ispitivanjem učestalosti aneuploidije i integracije utvrđeno je da je aneuploidija značajno češća od integracije, pa je verovatno da ekspresija dereguliranih virusnih onkogeni dovodi prvo do pojave hromozomske nestabilnosti i aneuploidizacije, koju potom sledi integracija virusne DNK (Howley i sar., 2013).

Iako je infekcija humanim papiloma virusima dominantan faktor rizika u pojavi karcinoma, ne može se isključiti prisustvo drugih faktora rizika koji doprinose pojavi ovog oboljenja. Navedeni, različiti ishodi virusne infekcije, kao i dugo vreme potrebno za razvoj karcinoma posle infekcije, navelo je istraživače da ispituju mogućnost postojanja takozvanih kofaktora, koji doprinose pojavi karcinoma. Tako je potvrđeno da, trudnoća, prisustvo drugih seksualno prenosivih bolesti, primena oralnih kontraceptiva i pušenje mogu da doprinesu razvoju karcinoma. Iako mehanizam dejstva navedenih kofaktora nije poznat, pretpostavlja se da pojedini od njih dovode do povišenja rizika od HPV infekcije. Osim toga, prisustvo za duvan specifičnih karcinogeni detektovanih u višim vrednostima u sluznici grlića materice kod žena pušača izgleda ima određenu ulogu u pojavi karcinoma (Howley i sar., 2013).

### **1.5.2 Imunski odgovor tokom HPV infekcije**

Životni ciklus humanih papiloma virusa je vezan isključivo za epitel, predstavlja osnovu za razumevanje imunog odgovora, jer presudno utiče na prepoznavanje i efektorne imune mehanizme domaćina. Prisustvo virusa u ćeliji nije praćeno zapaljenjem pa izostaje pojava signala koji bi aktivirali urođenu imunost. HPV nisu litički virusi, a visok nivo replikacije i sklapanja virusnih čestica se odvija u terminalno diferencovanim keratinocitima, ćelijama u kojima se odigrao program regulisane ćelijske smrti. Iako su ovi virusi sposobni da se vežu i prodru i u druge vrste ćelija osim keratinocita, ekspresija virusnih gena i sinteza virusnih proteina se odvija isključivo u keratinocitima. Tako, nema sinteze virusnih proteina u antigen prezentujućim ćelijama. Osim toga, viremije nema ili je beznačajna, a virusna infekcija odvija se kroz mikroabrazije putem intaktne bazalne membrane, tako da su vaskularni

kanali, limfni sudovi i regionalni limfni čvorovi u kojima se inicira adaptivni imunski odgovor nepristupačni virusnim česticama (Stanley, 2009).

Pojava adaptivnog imunog odgovora je sporija u odnosu na najveći broj drugih virusa. Takođe, titri antitela koji se pojavljuju posle prirodne infekcije su niski i prosečno vreme serokonverzije prevazilazi 6 meseci, dok kod oko 30%-50 % osoba sa znacima perzistentne infekcije nema pojave antitela (Frazer, 2009). Pojava značajnijeg titra antitela na rane virusne proteine retko se detektuje, izuzev u slučaju pojave invazivnog karcinoma, kada se kod oko 50% pacijentkinja detektuje imuni odgovor na protein E6 odnosno E7 protein (Frazer, 2009; Howley i sar., 2013).

Ukoliko se u obzir uzmu faktori koji dovode do slabog humoralnog imunog odgovora, moglo bi da se pretpostavi da imuni odgovor na humane papiloma viruse može u potpunosti da izostane. Međutim, postoje mnogi dokazi koji ovakvu pretpostavku opovrgavaju. Pojava spontane regresije kožnih i ano-genitalnih bradavica i imunohistološka analiza ovog fenomena pružaju obilje podataka o imunom odgovoru na HPV. Genitalne bradavice kod kojih nije došlo do pojave regresije karakteriše mali broj prisutnih intraepitelijalnih ćelija pretežno CD8+ T ćelija i prisustvo mononuklearnih ćelija u stromi bradavice. Histološkim ispitivanjem genitalnih bradavica u regresiji, utvrđeno je prisustvo obilnog infiltrata u stromi i epitelu bradavica koga čine T ćelije (CD4+ i CD8+) kao i makrofagi. Na limfocitima eksprimiraju se markeri aktivacije, dok najveći deo citokina čine IL-12, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , a pojavljuje se i povećan broj adhezivnih molekula neophodnih za prenos (*engl. trafficking*) limfocita endotelom kapilara u bradavicu (Stanley, 2009). Najverovatnije je da adaptivni celularni imunitet ima ključnu ulogu u pojavi fenomena regresije lezija koje su izazvane HPV, kao i prevenciji reaktivacije latentne infekcije. Nije neuobičajeno da, kod višestrukih bradavica, uklanjanje jedne bradavice bude praćeno regresijom i preostalim, što ukazuje da je sistemski imunski odgovor pokrenut oslobađanjem antigena iz lečene bradavice odgovoran za regresiju. Takođe, osobe sa poremećajima T-ćelijske imunosti kao što je terapija imunosupresivnim lekovima i

HIV infekcija imaju povećan rizik od pojave perzistentne HPV infekcije, kao i povećan rizik od pojave karcinoma grlića materice (Howley i sar., 2013).

## 1.6 Oboljenja povezana sa HPV infekcijom

Humani papiloma virusi pokazuju izraziti tkivni tropizam-epiteliotropizam, a infekcije koje izazivaju mogu da budu akutne ili perzistentne. Oboljenja povezana sa HPV infekcijom mogu da se podele na benigna i maligna (Chan i sar, 2012).

### 1.6.1 Benigna oboljenja povezana sa HPV infekcijom

Benigna oboljenja povezana sa HPV infekcijom mogu prema lokalizaciji da se podele na: a) infekcije negenitalne kože; b) genitalne infekcije i c) oralne infekcije.

**a) Infekcije negenitalne kože** - pojava asimptomatske HPV infekcije kože koja može da perzistira i više godina, danas je potvrđena kao uobičajena, zahvaljujući pojavi tehnika i metoda visoke senzitivnosti za detekciju ovih virusa. Perzistencija ove infekcije nije povezana sa godinama starosti, polom, imunosupresivnom terapijom ili prethodnom pojavom bradavica (Chan i sar, 2012).

HPV izaziva benigne kožne bradavice, koje se javljaju kao ravne ili čvrste papule bez svraba. Uobičajena lokalizacija je na šakama (*verrucae palmares*) i stopalima (*verrucae plantares*), tipično se povezuje sa infekcijom tipovima HPV 1, 2 i 4 (tabela 3). Pljosnate bradavice (*verrucae planae*) su ravne promene boje kože i mogu da se nađu na licu i rukama, a izazvane su najčešće HPV tipovima 3 i 7. Pojava tzv. bradavica mesara (engl. Butchers warts) takođe je povezana sa infekcijom HPV tip 7 (McLaughlin i Shafritz, 2011).

**b) Genitalne infekcije** - infekcija HPV genitalnog trakta je jedna od najčešćih seksualno prenosivih infekcija. Često ima supklinički tok, dok su klinički manifestne lezije predstavljene šiljastim kondilomima (*condylomata accuminata*) koji su često multipli i javljaju se kao egzofitni papilomi crvene do smeđe boje. Ovo oboljenje

najčešće izazivaju HPV tipovi 6 i 11, ali i drugi tipovi (Tabela 3.) (Chan i sar, 2009; Chan i sar, 2012).

**Tabela 3. Benigne kožne HPV infekcije (modifikacija po Burd, 2003)**

Oboljenje	Tipovi HPV
Obične bradavice	2*, 1*, 7*, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 3, 10, 28
Pljosnate bradavice	3*, 10*, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Plantarne bradavice	1*, 2*, 4, 63

\* tipovi HPV sa najvećom učestalosti

**c) Oralne infekcije** - Oralna sluznica takođe je osetljiva na HPV infekciju. Ova infekcija najčešće zahvata larinks i manifestuje se kao laringealna papilomatoza, javlja se u ranom detinjstvu kao posledica vertikalne transmisije infekcije majke, odnosno kasnije tokom života kao posledica orogenitalnog kontakta. Tipovi HPV6 i 11 uobičajeno se izoluju iz promena koje se nalaze na glasnim žicama i traheji, a klinički se manifestuju stridorom i promuklošću. Lezije mogu da se prošire na pluća, nosnu i usnu šupljinu. Lečenje je teško jer često dolazi do ponovne pojave promena, pa je oboljenje poznato i kao rekurentna respiratorna papilomatoza. Hekova bolest-fokalna epitelijana hiperplazija, manifestuje se pojavom višestrukih papiloma na sluznici usne i obraza (Tabela 4) (González i sar., 2007; Feller i sar. 2011; Chan i sar, 2012).

**Tabela 4. Benigne HPV infekcije sluzokože (modifikacija po Howley i sar., 2013)**

Lokalizacija	Oboljenje	Tipovi HPV
Genitalni trakt	Subklinička infekcija	svi genitalni HPV
	Egzofitni kondilomi	6, 11
	Pljosnati kondilomi	6, 11, 16, 18, 31
Usna duplja	Fokalna epitelijalna hiperplazija	13, 32
	Infekcija sa genitalnim tipovima	6, 11, 16
	Lezije na usni	2
	Rekurentni respiratorni papilomi	6, 11

### 1.6.2 Maligna oboljenja povezana sa HPV infekcijom

Pretpostavka da humani papiloma virusi igraju značajnu ulogu u razvoju karcinoma grlića materice predložena je sredinom sedamdesetih godina dvadesetog veka. Tokom proteklih 45 godina, prikupljen je znatan broj dokaza koji potvrđuju etiološku povezanost HPV infekcije i različitih karcinoma ljudi (Zur Hausen, 2009; Grulich i sar., 2010; Chan i sar, 2012). Maligna oboljenja povezana sa HPV infekcijom obuhvataju: a) *Epidermodysplasia verruciformis*; b) nemelanomske karcinome kože; c) karcinome vulve, vagine, anusa i penisa; d) orofaringealne karcinome (karcinomi glave i vrata) i e) karcinom grlića materice.

**a) *Epidermodysplasia verruciformis* (EV)** - nasledno hronično oboljenje kože, koje se klinički manifestuje pojavom diseminovanih pljosnatih bradavica. Pojedini pacijenti oboleli od ovog oboljenja imaju mutaciju u EVER1 i EVER2 genima (Ramozi sar, 2002; Lazarczyk, 2009). Pojedini tipovi HPV koji pripadaju Beta rodu (HPV 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 25, 36, 38, 47 i 50) specifično su povezani sa EV. Oko polovina od ukupnog broja pacijenata sa EV razviju planocelularni karcinom u regionima kože izloženim suncu. Najveći broj malignih promena povezan je sa tipovima HPV 5 i 8 iako mehanizmi patogeneze navedenih tipova HPV nisu razjašnjeni (Sterling 2005; Dubina i sar., 2009; Patel i sar., 2010).

**b) Nemelanomski karcinomi kože** - U poslednje vreme, prikupljeni su dokazi koji ukazuju na moguću povezanost nemelanomskih karcinoma kože kao što su bazocelularni i planocelularni karcinom. Sumnja na virusni uzrok za pojavu planocelularnog karcinoma zasniva se na zapažanjima da incidenca ovog karcinoma raste značajno kod transplantiranih osoba na dugotrajnoj imunosupresivnoj terapiji (Chan i sar., 2012). Tipovi HPV koji su izolovani iz planocelularnih karcinoma pripadaju beta vrstama 1 i 2, ali za razliku od ano-genitalnih karcinoma nije utvrđena dominacija pojedinih tipova izolovanih iz ovih karcinoma (Forslund i sar. 2007; Patel i sar., 2008). Ipak, teško je utvrditi etiološku povezanost nemelanomskih karcinoma kože i HPV infekcije, budući da je spektar tipova HPV izolovan kod obolelih od



planocelularnog karcinoma identičan spektru HPV tipova u zdravoj populaciji. Osim navedenog, tipovi HPV 16 i 18 povezuju se sa pojavom Bowenove papilomatoze koja se manifestuje malim pljosnatim pigmentisanim papulama na spoljnim genitalijama. Ova promena histološki je *carcinoma-in-situ* koji može da se razvije u invazivni karcinom.

**c) Karcinomi vagine, vulve, anusa i penisa** - karcinom vagine je veoma redak i javlja se sa globalnom učestalošću od oko 0,3 do 0,7 na 100 000. Ograničeni podaci o ulozi HPV u pojavi ovog karcinoma zasnivaju se na proučavanju tkiva karcinoma ukalupljenih u parafin. U oko 82 - 100% vaginalnih intraepitelijalnih neoplazija gradus III, kao i u oko 64 - 91% karcinoma vagine se detektuje HPV DNK, a najčešći je HPV16 (Munoz i sar., 2006; Chao i sar. 2012). Karcinomi vulve imaju globalnu učestalost oko 0,5 do 1,5 na 100 000. Geografski obrazac javljanja ovog karcinoma se razlikuje u odnosu na karcinom grlića materice i javlja se sa višom učestalošću u nekoliko razvijenih evropskih zemalja i regiona (Škotska, Danska, Španija i Italija), dok ima nisku prevalencu u podsaharskoj Africi, jugoistočnoj Aziji i latinskoj Americi. Najveći broj karcinoma vulve su planocelularni karcinomi, a bazocelularni karcinomi se najčešće povezuju sa HPV infekcijom (tipovi 16, 31 i 33), dok se verukozni podtip karcinoma, pojedini tipovi prekanceroznih lezija i vulvarni intraepitelijalni karcinom ne povezuju sa HPV infekcijom (Chan i sar., 2012). Najveći broj karcinoma anusa je povezan sa HPV infekcijom, koji po histološkom tipu mogu da budu planocelularni, bazocelularni, adenokarcinomi ili kloakogeni karcinomi. Planocelularni karcinom je najučestaliji i među muškarcima i među ženama. (Chan i sar., 2012). U najvećem broju slučajeva, pojava ovog karcinoma povezana je sa HPV infekcijom, dok se iz tkiva karcinoma izoluje najčešće HPV 16 (Howley i sar., 2013). Karcinom penisa je veoma redak i predstavlja 0,5% od broja svih karcinoma muškaraca. Istovremena pojava karcinoma grlića materice i karcinoma penisa kod venčanih parova kao i geografska distribucija karcinoma penisa ukazuje da ova dva tipa karcinoma dele istu etiologiju (Smith i sar., 1980). Serološke studije potvrdile su ulogu tipova HPV 16 i 18 u etiologiji karcinoma penisa, dok se u 40-50% uzoraka tkiva ovih karcinoma izoluje HPV DNK (Picconi, i sar., 2000; Palefsky, 2010; Anic i sar., 2011).

**d) Orofaringealni karcinomi (karcinomi glave i vrata)** - HPV infekcija se povezuje sa pojedinim karcinomima glave i vrata. U oko 90% tkiva tumora glave i vrata pozitivnih na HPV detektuje se HPV 16. Najveći broj tumora glave i vrata povezanih sa HPV nalaze se u orofarinksu, uključujući krajnike, bazu jezika i meko nepce. Nije jasno zašto se HPV-pozitivni tumori pretežno javljaju u orofarinksu. U Sjedinjenim Američkim Državama, incidenca HPV pozitivnih orofaringealnih karcinoma, koji se javljaju u mlađoj životnoj dobi u odnosu na HPV negativne karcinome, se povećala četverostruko u periodu 1988. do 2004. godine. Oko tri četvrtine pacijenata sa ovim karcinomima su muškarci (Howley i sar., 2013). Faktori rizika za pojavu ovih karcinoma slični su kao kod anogenitalnih HPV pozitivnih karcinoma, a posebno se kao značajan faktor rizika izdvaja anogenitalni seks. Ovi karcinomi imaju znatan broj molekulskih osobina sličnih sa HPV pozitivnim anogenitalnim karcinomima, ali uprkos sličnostima nije opisana jasno definisana prekancerozna promena. Kod orofaringealnih karcinoma, uobičajena je integracija HPV DNK, prisutna je ekspresija E6 i E7, a p53 i pRb geni su divljeg tipa, za razliku od HPV negativnih orofaringealnih karcinoma koji su p16 negativni i imaju mutiran p53 gen (Lace, 2011).

**e) Karcinom grlića materice** - dosadašnja istraživanja su potvrdila etiološku vezu karcinom grlića materice sa HPV infekcijom, i ovo oboljenje ugrožava srazmerno najveći broj osoba u odnosu na ostala maligna oboljenja izazvana ili povezana sa HPV infekcijom (Chan i sar., 2012).

Prema procenama Svetske zdravstvene organizacije (SZO), karcinom grlića materice je četvrti najčešći karcinom kod žena globalno, sa 527 624 novoobolelih godišnje i 265 653 smrtna ishoda godišnje u 2012. godini (Bruni i sar., 2015a). Uprkos distribuciji ovog karcinoma širom sveta, njegova učestalost varira značajno, do 10 puta češće u pojedinim zemljama u razvoju u odnosu na razvijene zemlje (Howley i sar., 2013). Najveći broj dijagnostikovanih karcinoma pripada planocelularnom histološkom tipu (oko 85%), a ostatak čine adenokarcinomi (Bruni i sar., 2015a). Najveći broj karcinoma grlića materice javlja se u zoni transformacije grlića materice,

gde dolazi do formiranja spoja kolumnarnih ćelija epitela endocerviksa, sa stratifikovanim skvamoznim epitelom ektocerviksa. Lezije koje se tokom vremena razvijaju u karcinom uobičajeno prolaze kroz niz displastičnih promena, tokom više godina. Težina nastale lezije određena je stepenom do koga je skvamozni epitel zamenjen bazaloidnim ćelijama pri čemu je kod najtežih displazija čitav sloj ovog epitela zamenjen. Histološka klasifikacija cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) 1, 2 ili 3 odgovara blagoj, umerenoj i teškoj displaziji odnosno karcinoma *in situ*. Cervikalne displazije daju ekvivalentni nalaz u deskvamovanim ćelijama koje se mogu detektovati u Papanikolau (Pap) brisu, što se ogleda u prisustvu bazaloidnih ćelija i koilocitoze. U citološkom Bethesda sistemu ove promene se klasifikuju kao skvamozne intraepitelne lezije niskog (LSIL) (engl. low-grade) ili visokog (HSIL) (engl. high-grade) stepena. Lezije kod kojih nije moguće odrediti citološki stadijum nazivaju se atipičnim skvamoznim citološkim promenama neutvrđenog značaja (engl. atypical squamous cytology of undetermined significance - ASCUS) (Howley i sar., 2013).

Najveći broj ovih displazija ne progredira, već najčešće prolazi proces spontane regresije, pri čemu verovatnoća regresije opada sa težinom displazije. Uobičajeno, teži oblici displazije razvijaju se iz lakših oblika displazije posle nekoliko godina, iako pojedine teže displazije mogu da se razviju brzo bez prolaska kroz stadijume blaže displazije (Howley i sar., 2013).

Oko 40 HPV tipova, od čega najveći broj pripada alfa rodu, može da inficira genitalni trakt. Samo deo od ovog broja izoluje se uobičajeno u tkivu karcinoma grlića materice, a ovi tipovi se označavaju kao visoko onkogeni tipovi HPV. Tipovi koji se izoluju ređe u tkivima karcinoma grlića materice označavaju se kao nisko onkogeni tipovi. Istraživanje koje je izvedeno na 1000 uzoraka tkiva karcinoma, pokazalo je da više od 90% sadrži HPV DNK. Iako više od 20 tipova HPV može da se detektuje u ovim tumorima, četiri tipa (HPV 16, HPV 18, HPV 31 i HPV 45) i to iz roda alfa-7 (HPV 18 i 45) roda alfa-9 (HPV 16 i 31) izoluju se iz gotovo 80% karcinoma grlića materice. Nasuprot ovim tipovima, nisko onkogeni tipovi (npr. HPV 11 i 16) izolovani su u samo dva slučaja karcinoma (Howley i sar., 2013).

## 1.7 Dijagnoza HPV infekcije

Priroda i osobine HPV infekcije dugo vremena predstavljale su problem za pronalaženje adekvatnog dijagnostičkog pristupa. Izolovanje virusnih čestica klasičnim tehnikama u sistemima živih ćelija nije moguće, izuzev u specijalizovanim sistemima zasnovanim na primarnim kulturama humanih keratinocita (*engl.* "raft" culture), gde se epitelne ćelije uzgajaju na polučvrstom agaru i gde je moguća diferencijacija ovih ćelija i produktivna replikacija virusa, ali za veoma mali broj tipova HPV (uglavnom HPV11 i 31) (Dollard i sar., 1992; Chow i Broker, 1997). Takođe, iako imuni sistem igra važnu ulogu u eliminaciji virusa iz organizma, prirodna infekcija ne dovodi do snažne proizvodnje antitela. Tako, na primer samo 50-70% žena sa perzistentnom cervikalnom HPV infekcijom ima detektabilna antitela, dok najveći broj žena sa tranzitornom infekcijom nema detektabilna antitela ili ih ima samo kratko vreme. Zbog ovoga serološke metode imaju ograničenu vrednost u dijagnostici (Kirnbauer i sar, 1994; Wikström, 1995; Kobayashi i sar, 2004). Navedene osobine HPV infekcije uslovljavale su da se, do pojave molekularnih tehnika i metoda, dijagnoza zasnivala na kliničkim, citološkim ili histopatološkim metodama (kolposkopija, Papnicolau test, biopsija). Navedene metode se odlikuju relativno niskom senzitivnošću i specifičnošću uz pojavu visokog procenta lažno negativnih nalaza (Burd, 2003). Pojavom i razvojem visoko specifičnih i osetljivih tehnika molekularne biologije i njihovom primenom u dijagnostici HPV infekcije otvorila se mogućnost za uspešnu kontrolu infekcije kao i prevenciju karcinoma grlića materice (Molijn i sar., 2005).

### 1.7.1 Molekularna dijagnoza HPV infekcije

Upotreba tehnika i metoda molekularne biologije za detekciju HPV DNK ili iRNK, bilo da se radi o otkrivanju prisustva HPV DNK (*engl.* screening) odnosno određivanju za tip specifične HPV DNK (genotipizacija) predstavlja molekularnu dijagnozu HPV

infekcije. Značaj "screeninga" je prevashodno dijagnostički, dok genotipizacija ima ulogu u prognozi i određivanju adekvatne terapije (Molijn i sar., 2005).

Za molekularnu dijagnozu mogu da se, između ostalog, koriste uzorci uzeti na isti način kao za citološke tehnike. Količina uzetog uzorka kao i način transportovanja i čuvanja su kritični za uspešno izvođenje molekularnih tehnika. Posle uzimanja uzorka, oni se čuvaju u transportnom medijumu ili fiziološkom rastvoru na temperaturi od +2°C do +8°C do 72 sata ili na temperaturi od -20°C tokom dužeg vremena. Takođe, za izvođenje molekularnih tehnika mogu da se koriste i uzorci tkiva fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafin u kojima DNK, iako očuvana tokom dugo vremena, formira unakrsne veze sa proteinima i postaje fragmentisana, što može da dovede do smanjenja količine nukleinske kiseline ekstrahovane iz uzorka (Steinau i sar, 2011).

U zavisnosti od namene za koju se koriste, primenjuju se odgovarajuće molekularne tehnike (tabela 5). Tehnike i metode koje određuju tip HPV sa visokom analitičkom senzitivnošću i specifičnošću su ključne za virusološki nadzor, uključujući procenu uticaja vakcinacije na prevalencu tipova HPV u sastavu vakcine, identifikaciju novih tipova, određivanje tipova u multiplim infekcijama kao i nadzor nad pojavom novih tipova koji bi izazivali ista ili slična oboljenja u post-vakcinalnom periodu (Chan i sar 2012). Sa druge strane, primenjena u kliničkim uslovima za "screening" ili praćenje posle primenjene terapije, ispitivanja sa nižom analitičkom senzitivnošću mogu da omoguće bolju prediktivnu vrednost (Meijer i sar., 2009a; Meijer i sar, 2009b). Neophodno je razlikovati analitičku senzitivnost (najmanji broj HPV genoma koji mora da bude prisutan u uzorku kako bi se dobio pozitivan rezultat ispitivanja) od kliničke senzitivnosti (procenat žena koje imaju oboljenje, a kod kojih je rezultat ispitivanja pozitivan) (Tabela 5.) (Chan i sar 2012).

**Tabela 5. Parametri za procenu kliničkog učinka HPV testova za "screening" karcinoma grlića materice (modifikovana prema Chan i sar., 2012)**

Terminologija	Osobina koja se meri
Senzitivnost <sup>1</sup>	Proporcija (izražena u procentima) pacijentkinja sa potvrđenom bolešću (npr. CIN III ili invazivni karcinom) kod kojih će test imati POZITIVAN rezultat, npr. senzitivnost od 95% za CIN III znači da će od 100 pacijentkinja 5 imati NEGATIVAN rezultat testa (lažno negativna) i test ih neće detektovati. Na senzitivnost utiče sama priroda test i manjim delom priroda uzoraka koji se ispituju.
Specifičnost <sup>2</sup>	Proporcija (izražena u procentima) pacijentkinja sa potvrđenim odsustvom bolesti (npr. CIN II i teži oblici oboljenja) koji imaju NEGATIVAN rezultat ispitivanja, npr. specifičnost od 70% znači da će od 100 pacijentkinja bez CIN II ili težeg oblika oboljenja koje učestvuju u "screening-u" 30 imati POZITIVAN rezultat (lažno pozitivan rezultat) ispitivanja. Na specifičnost utiče sama priroda testa i manjim delom priroda uzoraka koji se ispituju.
Pozitivna prediktivna vrednost	Mogućnost (izražena u procentima) da POZITIVNA vrednost HPV testa ukazuje na prisustvo određenog oboljenja (npr. karcinoma grlića materice). U smislu "screening-a" karcinoma grlića materice deli se na prediktivnu vrednost u trenutku ispitivanja i prediktivnu vrednost u sledećih 5 ili 10 godina. Pozitivna prediktivna vrednost testa zavisi prevashodno od prevalencije oboljenja u ciljnoj populaciji. Testovi za "screening" karcinoma, uključujući HPV, u opštoj populaciji uobičajeno imaju nisku prediktivnu vrednost.
Negativna prediktivna vrednost	Mogućnost (izražena u procentima) da NEGATIVNA vrednost HPV testa ukazuje na odsustvo određenog oboljenja (npr. CIN II i teži oblici oboljenja). U smislu "screening-a" karcinoma grlića materice deli se na prediktivnu vrednost u trenutku ispitivanja i prediktivnu vrednost u sledećih 5 ili 10 godina. Pozitivna prediktivna vrednost testa zavisi prevashodno od prevalencije oboljenja u ciljnoj populaciji.

<sup>1</sup>Prikazana definicija odnosi se na kliničku senzitivnost

<sup>2</sup>Prikazana definicija odnosi se na kliničku specifičnost

Molekularne metode koje se koriste u dijagnozi HPV infekcije obuhvataju: a) tehnike hibridizacije; b) tehnike signalne amplifikacije i c) tehnike ciljne (*engl.* target) amplifikacije (Molijn i sar., 2005).

**a) Tehnike hibridizacije** - za dokazivanje HPV DNK mogu da se koriste različite tehnike hibridizacije kao što su dot spot hibridizacija, Southern blot hibridizacija, a najčešće je u upotrebi *in situ* hibridizacija, komplementarna citološkim tehnikama (Molijn i sar., 2005). Ova tehnika podrazumeva upotrebu obeleženih proba komplementarnih ciljnoj DNK koje specifično hibridizuju sa HPV DNK unutar inficirane ćelije. Za identifikaciju genotipova HPV koriste se tip specifične probe u višestrukim ispitivanjima. Uobičajeno, za obeležavanje proba koriste se enzimi kao što su alkalna fosfataza, peroksidaza, odnosno sistemi biotin-streptavidin-enzim i digoksigen-antidigoksigenat enzim, a u manjoj meri radioizotopi. Kako bi se nastali hibrid detektovao, neophodno je dodavanje specifičnog supstrata za korišćeni enzim, nakon čega nastaje bojena reakcija. U jedrima inficiranih ćelija mogu da se vide obojeni hibridi HPV DNK/proba u vidu precipitata. Tehnike hibridizacije imaju nisku senzitivnost, složene zahteve za izvođenje, te stoga nisu pogodne za obradu većeg broja uzoraka uobičajenog za "screening" ispitivanja, pa se u novije vreme sve ređe izvode (Jovanović i sar., 2004; Molijn i sar., 2005).

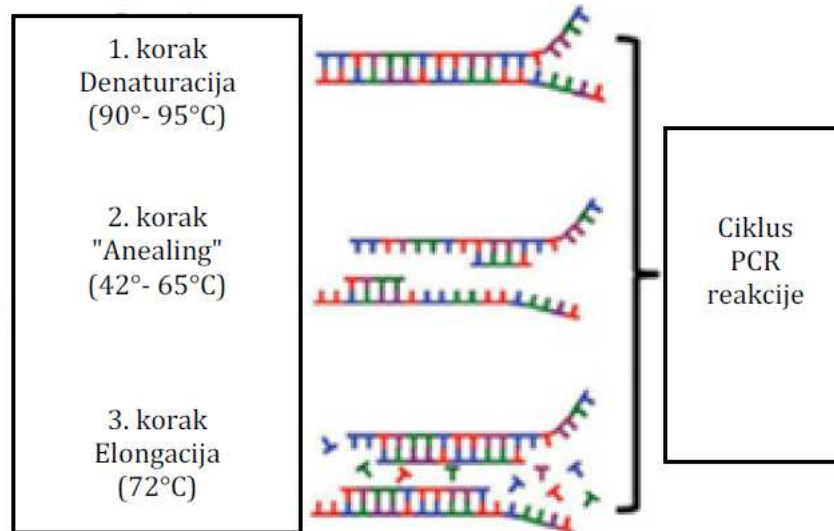
**b) Tehnike signalne amplifikacije** - U dijagnostici HPV infekcije, najčešće se od tehnika signalne amplifikacije koristi tehnika hvatanja hibrida (*engl.* Hybride Capture Assay-HC2). Ovaj metod zasnovan je na hibridizaciji u tačnoj fazi koji koristi duge sintetske RNK probe komplementarne odgovarajućim genomskim sekvencama trinaest tipova visokog onkogenog potencijala (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68) kao i pet tipova niskog onkogenog potencijala (6, 11, 42, 43 i 44), koje su kombinovane u takozvane koktele proba i koriste se u dve odvojene reakcije hibridizacije (Lörincz, 1996). Obično se u praksi koristi samo koktel koji sadrži probe za tipove visokog onkogenog potencijala. HPV DNK prisutna u uzorku hibridizuje se sa koktelom proba u rastvoru (tačnoj fazi) i formira specifične HPV DNK-RNK hibride.

Nastali hibridi se potom vezuju za antitela specifična za RNK-DNK hibride, fiksirana za bunarčice mikrotitracionih ploča. Nakon uklanjanja viška antitela i nehibridizovanih proba, imobilisani hibridi se detektuju nizom reakcija koje dovode do stvaranja proizvoda koji emituje svetlost, koja se meri luminometrom. Intenzitet svetlosti koja se emituje, srazmeran je količini ciljne DNK prisutne u uzorku i izražava se u relativnim svetlosnim jedinicama, na osnovu čega je moguće semikvantitativno određivanje broja virusnih čestica u uzorku. Ova metoda ne zahteva posebne uslove za izvođenje kako bi se izbegla unakrsna kontaminacija jer se ne oslanja na ciljnu amplifikaciju kako bi postigla visoku senzitivnost. Nekoliko studija utvrdilo je da koktel koji sadrži probe za HPV tipove visokog onkogenog potencijala pokazuje unakrsnu reaktivnost sa tipovima HPV koji nisu u sastavu koktela (Chan i sar., 2012). Osim toga, ovom metodom nije moguće ustanoviti specifičan genotip koji se nalazi u ispitivanom uzorku, a metoda ima limit detekcije (analitičku senzitivnost) od oko 5000 ekvivalenata genoma (Molijn i sar., 2005). Kao odgovor na nedostatak adekvatne metode, za „screening“ karcinoma grlića materice u zemljama u razvoju, razvijena je metoda CareHPV, veoma slična metodi hvatanja hibrida – HC2 (Arney i Bennett, 2010).

**c) Tehnike ciljne amplifikacije** - Ove tehnike se zasnivaju na umnožavanju kopija ciljne DNK sekvence, a najpoznatija i najčešće korišćena od ovih tehnika je tehnika lančanog umnožavanja (*engl.* Polymerase Chain Reaction-PCR) (Arney i Bennett, 2010). PCR tehnikom moguće je, teoretski, da se jedna kopija ciljne DNK sekvence umnoži do milion identičnih kopija tokom 30 ciklusa ove reakcije (Villa i Denny, 2006). Jedan ciklus u PCR reakciji sastoji se od 3 zasebna koraka: 1) denaturacija; 2) vezivanje prajmera (*engl.* annealing) i 3) elongacija odnosno sinteza ciljne DNK sekvence. Denaturacija se najčešće odvija na temperaturi od 95°C tokom koje se raskidaju vodonične veze između lanaca DNK (šema 1-1). Vezivanje prajmera se odvija na temperaturi od oko 55°C (42° - 65°C, u zavisnosti od dužine prajmera) (šema 1-2). Tokom koraka elongacije odvija se sinteza komplementarnih lanaca DNK u 5'-3' pravcu na temperaturi od 72°C posredovana enzimom DNK polimerazom



(termostabilna Taq polimeraza) (Šema 1. koraci 1-3) (Jovanović i sar., 2004; Arney i Bennett, 2010).



**Šema 1. Koraci reakcije lančanog umnožavanja**

Za izvođenje PCR metode u dijagnostici HPV infekcije mogu da se koriste tip specifični prajmeri, najčešće dizajnirani da detektuju E6 ili E7 regione specifične za jedan tip HPV-DNK u uzorku, ali je za obradu samo jednog uzorka neophodno izvođenje više zasebnih reakcija, pa je upotreba tip specifičnih prajmera skupa i naporna. Nasuprot tome, opšti ili tzv. konsenzus prajmeri, češće se koriste u rutinskoj dijagnostici i mogu da detektuju veći broj tipova HPV. Opšti prajmeri su dizajnirani tako da je njihova ciljna sekvenca komplementarna L1 i E1 konzerviranim regionima različitih tipova HPV. Postoje tri vrste opštih PCR prajmera. Prva vrsta je komplementarna u potpunosti specifičnom konzerviranom regionu jednog ili nekoliko tipova HPV, a razlike u komplementarnosti sa ostalim tipovima HPV kompenzuju se niskom temperaturom vezivanja. Primer ove vrste prajmera su GP5+/GP6+. Druga vrsta prajmera su izmenjeni ili degenerativni prajmeri koji sadrže jednu ili više izmena u sekvenci kako bi se kompenzovala varijabilnosti sekvence prisutne u različitim tipovima, pa temperatura vezivanja ne mora da bude niska. Primer za ovu vrstu prajmera je sistem MY09/MY11 koji predstavlja kompleksnu smešu različitih

oligonukleotida. Treća vrsta prajmera sadrži inozin koji može da se veže za bilo koji nukleotid, te se ovi prajmeri mogu da vežu za veliki broj nukleotida bez obzira na razlike u sekvenci. Primer ove vrste prajmera su SPF<sub>10</sub> i PGMY prajmeri (Molijn i sar., 2005).

Tip specifični i konsenzus prajmeri mogu da se koriste za dijagnostiku HPV infekcije u reakciji lančanog vezivanja u realnom vremenu (*engl.* Real Time PCR, qPCR), iako su konsenzus prajmeri manje pogodni za ovu reakciju od tip specifičnih. Osnova za ovu reakciju je klasični PCR u kome se koristi fluorescentna boja koja se veže za DNK (SYBR green metoda) odnosno specifične probe obeležene fluorescentnom bojom (Taqman metoda). Intenzitet fluorescencije koja se javlja tokom ove reakcije meri se u svakom trenutku i na osnovu njega moguće je odrediti količinu virusa u uzorku, odnosno broj kopija virusne DNK (*engl.* viral load) (Jovanović i sar., 2004; Molijn i sar., 2005).

Za detekciju specifične virusne iRNK, može da se koristi jedna od tehnika ciljne amplifikacije, PCR sa reverznom transkriptazom, RT-PCR (*engl.* Reverse transcriptase PCR – RT-PCR). Ova tehnika ima značaj za procenu rizika za razvoj karcinoma kao i za prognozu HPV infekcije. Razlika u odnosu na klasičnu PCR reakciju ogleda se u dodavanju jednog koraka koji podrazumeva primenu enzima reverzne transkriptaze koji sintetiše lanac komplementarne DNK (cDNK) po RNK matrici sa sledstvenom razgradnjom hibrida RNK/cDNK. Potom se na osnovu lanca cDNK sintetiše drugi lanac DNK koja se umnožava klasičnom PCR reakcijom. Najčešće se ova tehnika koristi za određivanje ekspresije E6 i E7 onkogena, jer je potvrđeno da ima klinički značaj kao i da ova tehnika može da bude specifičnija za detekciju simptomatske HPV infekcije (Jovanović i sar., 2004; Molijn i sar., 2005).

#### ♦ **Detekcija i analiza proizvoda amplifikacije**

Proizvodi PCR reakcije mogu da se detektuju primenom standardne elektroforeze u gelu. Ipak za detekciju i analizu proizvoda PCR može da se koristi više različitih

tehnika znatno više specifičnosti i senzitivnosti. Najvažnije tehnike koje se koriste u analizi proizvoda amplifikacije su sledeće:

- **RFLP (*engl. Restriction fragment length polymorphism*)** - posle završene PCR reakcije sastav dobijenih proizvoda može da se ispita primenom restrikcionih enzima (restrikcione endonukleaze) pri čemu se dobija određen broj fragmenata, koji se potom detektuju gel elektroforezom. Metoda je jednostavna, ali zahteva znatan napor pri izvođenju i zavisi od dostupnosti restrikcionih enzima koji mogu da prepoznaju specifična mesta mutacija. Iako može da se koristi za genotipizaciju više različitih tipova HPV prisutnih u različitim količinama u uzorku, u praksi je to veoma kompleksan postupak i rutinski se ne koristi (Molijn i sar., 2005).

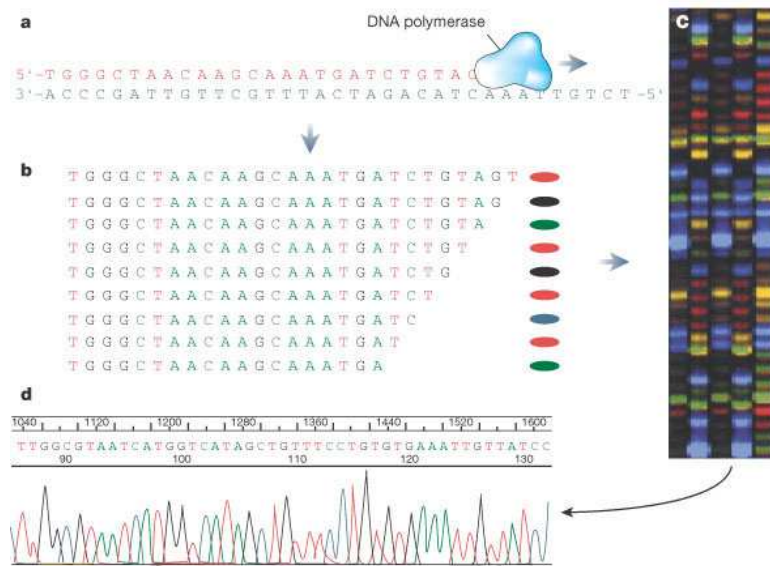
- **Southern blotting analiza** - ova tehnika sastoji se od gel elektroforeze dobijenog PCR proizvoda i potom transfera sa gela na nitroceluloznu membranu postupkom poznatijim kao "blotting". Potom se vrši hibridizacija proizvoda prenesenog na membranu sa obeleženim probama. Obzirom da je ova tehnika kompleksna i zahteva znatan napor pri izvođenju razvijene su druge tehnike hibridizacije (Molijn i sar., 2005).

- **Hibridizacija u mikrotitracionim pločama** - ova tehnika podrazumeva upotrebu biotinom obeleženog prajmera koji omogućava vezivanje stvorenog PCR proizvoda za bunarčice mikrotitracione ploče koji su obloženi streptavidinom. Nakon toga izvodi se denaturacija DNK u alkalnim uslovima i lanac DNK koji nije vezan za mikrotitracionu ploču se ispira. Označena proba se potom dodaje u mikrotitracionu ploču i odvija se reakcija hibridizacije. Detekcija stvorenih hibrida sledi posle vezivanja konjugata i reakcije sa supstratom (Molijn i sar., 2005).

- **DNK sekvenciranje** - primena ove tehnike zasniva se na određivanju sleda nukleotida koji ulaze u sastav određenog lanca nukleinske kiseline. Do sada je razvijen veći broj metoda zasnovanih na ovoj tehnici (Maxam-Gilbert ili hemijsko sekvenciranje, Sangerov metod ili metod završetka lanca, "Shotgun" sekvenciranje,

“Bridge” sekvenciranje, “Ion Torrent” sekvenciranje, sekvenciranje sintezom, sekvenciranje povezivanjem (SOLID) itd.

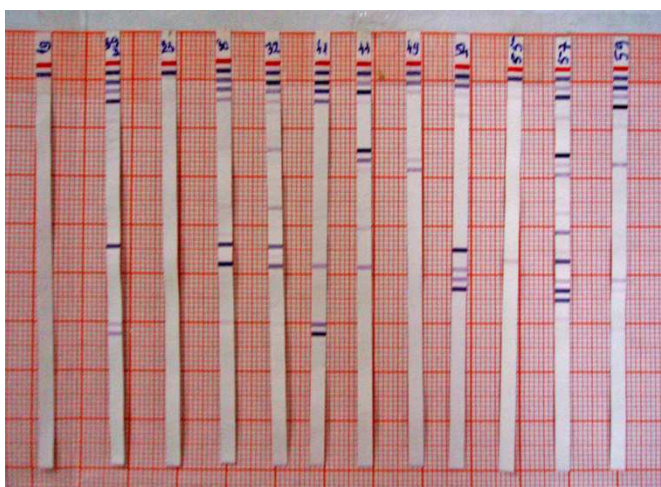
Od navedenih metoda najčešće se koristi metoda završetka lanca. Za reakciju cikličnog sekvenciranja je, izuzev materijala i reagenasa koji se koriste i u PCR reakciji, neophodna i primena didezoksiribonukleotida (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Oni su u pogledu ugradnje u nosivni sintetički lanac DNK analogni dezoksiribonukleotidima (dNTP), a jedina razlika se ogleda u činjenici da ugradnja didezoksiribonukleotida obustavlja dalju sintezu lanca nukleinske kiseline. Reakcija sekvencioniranja razlikuje se od PCR reakcije po upotrebi samo jednog prajmera, pa se tako u svakoj reakciji sintetiše i određuje sekvencu samo jednog lanca DNK molekula. Reakcija se odvija u ciklusima što za rezultat ima linearno umnožavanje ciljnog dela DNK i formiranje smeše fragmenata DNK različite dužine koja zavisi od mesta vezivanja didezoksiribonukleotida. Dobijeni fragmenti razdvajaju se elektroforezom prema dužini i moguće je razlikovanje pojedinih fragmenata koji se razlikuju za samo jedan nukleotid (slika 12.) (Jovanović i sar., 2004).



**Slika 12 . Tehnika DNK sekvenciranja metodom završetka lanca (Chial, 2008)**

Tehnika sekvenciranja je brza i fleksibilna, a osim za određivanje genotipa može da koristi i za konstruisanje filogenetskih stabala t.j. filogenetsku analizu. Ograničenja ove tehnike uglavnom se odnose na određivanje tipova HPV kod mešovutih infekcija (Molijn i sar., 2005).

- **Reverzna hibridizacija** - suština ove tehnike se ogleda u vezivanju PCR proizvoda u tačnoj fazi za višestruke oligonukleotidne probe imobilisane u čvrstoj fazi. Najčešće korišćene metode zasnovane na ovom principu su LiPA ili LBA (*engl.* Line probe assay – LiPA; Line blot assay – LBA) kod kojih su višestruke probe imobilisane kao paralelne linije na membrani. Proizvod PCR reakcije se dobija primenom prajmera označenih biotinom. Dvolančani proizvod PCR reakcije se denaturiše u alkalnim uslovima i dodaje membranama sa imobilisanim probama u hibridizacionom puferu. Posle ispiranja dodaje se streptavidin konjugat i substrat, što rezultuje pojavom bojene reakcije na membrani u linijama gde se dogodila hibridizacija (slika 13.). Primena ovih tehnika omogućava određivanje više tipova HPV u samo jednom ispitivanju i zahteva ograničenu količinu PCR proizvoda (Molijn i sar., 2005).



**Slika 13. Reverzna hibridizacija na membrani (A.Knežević, privatna kolekcija)**

## **1.8 Terapija i prevencija HPV infekcije**

Tokom prethodne decenije postignut je značajan napredak u razumevanju prirodnog toka HPV infekcije i uloge perzistentne HPV infekcije kao faktora rizika u razvoju karcinoma grlića materice i drugih anogenitalnih karcinoma. Programi primarne (vakcinacija) i sekundarne ("screening") prevencije mogu da imaju znatan uticaj u prevenciji karcinoma, ali često nisu dostupni osobama koje su izložene najvećem riziku. Stoga sve lezije koje su izazvane HPV infekcijom bilo da se radi o hroničnim ili neoplastičnim lezijama kao i invazivnom karcinomu zahtevaju adekvatnu terapiju. Iako se najveći broj postojećih terapijskih metoda odnosi na hirurške tehnike, u poslednje vreme istražuju se mogućnosti primene novije terapije koja se zasniva na poznavanju principa molekularne virusologije i molekularnih mehanizama koji se odvijaju tokom HPV infekcije i mehanizmima stimulacije imunog odgovora na infekciju kako bi došlo do eliminacije virusa i spontane regresije lezije (Stern i sar., 2012).

Međutim, pojava vakcina namenjenih prevenciji infekcije sa HPV većim brojem genotipova daje osnovu za mogućnost značajnog smanjenja učestalosti karcinoma grlića materice kod koga je dominantan faktor rizika HPV infekcija. Ipak, malo je verovatno da se potpuna eliminacija oboljenja izazvanih HPV postigne u skorijoj budućnosti, pa kombinacija mera prevencije i primena adekvatne terapije lezija, za sada predstavlja adekvatan odgovor na izazov koji predstavlja HPV infekcija i oboljenja povezana sa njom.

### **1.8.1 Terapija HPV infekcije**

U uobičajenoj terapiji neoplazija donjeg dela genitalnog trakta, koja obuhvata cervikalnu intraepitelnu neoplaziju (CIN), vaginalnu (VAIN) i vulvarnu (VIN) intraepitelnu neoplaziju, koriste se različite hirurške tehnike kao što elektrohirurška ekscizija (engl. loop electrosurgical excision procedure - LEEP), konizacija,

elektrofulgaracija, hladna koagulacija i krioterapija. Primena histerektomije nije prihvatljiva kao primarna terapija za visoke graduse CIN-a (Stern i sar., 2012).

U terapiji karcinoma grlića materice hirurške tehnike su takođe najznačajnije, posebno stoga što se u programima "screeninga" otkriva najveći broj karcinoma stadijuma 1a prema FIGO klasifikaciji koji mogu da se leče konizacijom ili radikalnom histerektomijom (Stern i sar., 2012). Uznapredovala bolest leči se uporednom primenom radioterapije i cisplatina, što omogućava bolje preživljavanje čak i kod pacijentkinja sa potvrđenim metastazama u pelvičnim i paraaortalnim limfnim čvorovima (Rose, 2003).

U poslednje vreme, razvijaju se terapijski pristupi koji se zasnivaju na molekularnim mehanizmima usmerenim na stimulaciju i modifikaciju imunog odgovora. Poznato je da stečeni imuni odgovor, a naročito T-ćelijski imuni odgovor, predstavlja zaštitu protiv oboljenja izazvanih HPV. Iako, je u slučajevima ovih oboljenja imuni odgovor kompromitovan (izostanak snažnog HPV specifičnog CD4+ i CD8+ T ćelijskog odgovora) i u lezijama su prisutne imunosupresivne ćelije, pod određenim okolnostima promena odnosa pozitivnih i negativnih faktora koji utiču na imuni odgovor može da dovede eliminacije HPV iz lezija kao i regresije lezija (Stern i sar., 2012).

Ovo je osnova za razvoj terapijskih vakcina koje su usmerene na izazivanje ili pojačavanje HPV specifičnog T ćelijskog imunog odgovora (Stern i sar., 2012). Do sada su sprovedena ispitivanja na terapijskim vakcinama zasnovanim na rekombinantnim virusnim vektorima, rekombinantnim proteinima, ogoljenoj DNK, antigenima aktiviranim dendritskim ćelijama u terapiji lezija izazvanih HPV16, bez značajnijeg kliničkog uspeha (Melief i Burg, 2008). U dve skorije studije, postignut je uspešan ishod lečenja kod oko 50% pacijentkinja sa uznapredovalim lezijama vulve izazvanim HPV16 kao posledica vakcinom indukovano imunog odgovora. Jedna od vakcina sadržavala je kombinaciju dugih sintetskih preklopljenih peptida HPV16 E6 i E7 sa adjuvansom (HPV 16SLP), a druga rekombinantni HPV16E6E7L2 fuzioni protein (Kenter i sar., 2009; Daayana i sar., 2010; Welters i sar., 2010). Efikasnost navedenih

vakcina povezana je sa indukovanjem snažnog HPV specifičnog CD4+ odgovora uključujući i aktivnost HPV 16 specifičnih CD8+ ćelija. Pacijentkinje kod kojih je uočeno odsustvo regresije lezija, imale su smanjeni sistemski imuni odgovor na ove vakcine i povećan broj supresivnih T regulatornih ćelija (Treg) u lezijama (Stern i sar., 2012).

Mogući uspeh terapije zavisiće i od pronalaženja načina da se izmeni balans efektornih i supresivnih imunskih ćelija u leziji (imunomodulatorna terapija). Uspešno lečenje lezija izazvanih visokoonkogenim tipovima HPV sa visokim brojem Treg ćelija postignuto je ciklofosamidom koji menja lokalni odnos imunskih ćelija (supresora i efektor). Konačni cilj navedenog pristupa je pronalaženje optimalne kombinacije lekova, kako bi se stvorilo pogodno mikrokruženje sa T pomoćničkim ćelijama tip 1, što bi stvorilo povoljne uslove za stvaranje imunog odgovora indukovano terapijskim vakcinama i uklanjanje nastale lezije (Stern i sar., 2012). U terapiji genitalnih i perianalnih bradavica najčešće se koristi imunomodulator Imiquimod, koji se primenjuje kao topikalni preparat. Njegov mehanizam dejstva posredovan je receptorom sličnom toll-u (TLR7), koji stimuliše mehanizme urođenog, ali i adaptivnog imunog odgovora aktivacijom tkivnih antigen prezentujućih ćelija. U lezijama kod kojih se javlja regresija uočen je imuni odgovor posredovan T1 pomoćničkim ćelijama, dok su kod lezija bez regresije prisutne Treg ćelije u povećanom broju, kako pre tako i posle terapije. Osim ovog leka, ispituju se cidofovir i fotodinamska terapija (engl. photodynamic therapy-PDT), kao i potencijalni preparati usmereni na E6 i E7 HPVgene kao što su inhibitori preoteazoma (bortezomib i lopinavir) i inhibitori histon deacetilaze -HDAC (trichostatin A) (Stern i sar., 2012).

### **1.8.2 Prevencija HPV infekcije**

Značaj koji infekcija humanim papiloma virusima ima u pojavi različitih oboljenja, a prvenstveno karcinoma grlića materice i karcinoma anogenitalne regije, kao i relativno ograničene mogućnosti za lečenje ovih oboljenja, uticali su na razvoj



različitih mera prevencije HPV infekcije (Howley i sar., 2013). Mere prevencije HPV infekcije podrazumevaju sprečavanje prenošenja i vakcinaciju.

Sprečavanje prenošenja HPV infekcije podrazumeva mere koje smanjuju rizik od izlaganja HPV virusu, kao što su seksualna apstinencija, smanjenje stepena promiskuiteta. Upotreba kondoma ima ograničenu efikasnost u sprečavanju pojave genitalne HPV infekcije, ali ne i infekcije kože u genitalnoj regiji koja nije zaštićena kondomom. Kod muškaraca je primena kondoma povezana sa manjim brojem genitalnih HPV infekcija i njihovim kraćim trajanjem. Kod žena nema smanjenja učestalosti HPV infekcije, ali dolazi do umerenog smanjenja učestalosti genitalnih bradavica, CIN2, CIN3 i cervikalnog karcinoma. Jedna od mera za sprečavanje prenošenja HPV infekcije je i cirkumcizija odraslih muškaraca, koja potvrđeno smanjuje infekciju visokoonkogenim HPV tipovima za gotovo polovinu posle dve godine. Osim navedenih mera ispituje se i upotreba karagenana u sprečavanju prenošenja HPV infekcije, složenog polisaharida iz crvenih algi (Howley i sar., 2013).

U poređenju sa navedenim merama za sprečavanje prenošenja HPV infekcije, vakcinacija je prihvatljiviji, jednostavniji i efikasniji način prevencije. Međutim, osobine humanih papiloma virusa predstavljale su prepreku za brz razvoj vakcine. Nemogućnost proizvodnje odgovarajućih količina viriona HPV, zajedno sa prisustvom onkogeno ograničila je razvoj na subjediničnu vakcinu. Ključna činjenica za razvoj vakcine bila je da L1 protein može spontano da formira virusu sličnu partikulu (*engl.* virus like particle-VLP) koja je morfološki i imunološki slična potpunim virionima (Hagensee i sar., 1993; Kirnbauer i sar, 1993). Ove virusu slične partikule su visoko imunogene i dovode do stvaranja visokog titra neutrališućih antitela specifičnih za njihov tip i konformaciju (Lowy i Schiller, 2006). U više životinjskih modela virusu slične čestice dovodile su do pojave snažnog zaštitnog imunog odgovora potvrđenog eksperimentalnim opterećivanjem inokulumom sa velikim brojem viriona homologog virusa (Christensen i sar, 1996). Zaštitni imunitet bio je tip specifični, dugotrajan i mogao je da se pasivno prenosi prenošenjem antitela klase IgG, što je ukazivalo da su

neutrališuća antitela dovoljna za zaštitu od infekcije. Ispitivanja na ljudima bila su usmerena na L1 VLP tipova HPV 16 i 18 budući da poseduju najviši onkogeni potencijal.

Uspešno sprovedena ispitivanja na ljudima dovela su do odobravanja dve vakcine protiv HPV: četvorovalentne vakcine koja sadrži L1 VLP tipova HPV 6, -11, -16 i -18 i dvovalentne vakcine koja sadrži L1 VLP tipova HPV 16 i 18. Osim razlika u aktivnoj supstanci ove dve vakcine se razlikuju i po ekspresionom sistemu u kome se proizvode, adjuvansu kao i rasporedu vakcinacije (tabela 6.) (Howley i sar., 2013).

**Tabela 6. Osobine HPV vakcina**

osobina/proizvođač	Cervarix	Gardasil
Proizvođač	GlaxoSmithKline	Merck
VLP tipovi	16, 18	6, 11, 16, 18
Doza L1 proteina	20/20 µg	20/40/40/20 µg
Ekspresioni sistem	Trichopulsia ni (Hi 5) ćelijska linija inficirana sa L1 rekombinantnim baculovirusom	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> koji eksprimira L1
Adjuvans	500 µg aluminijum hidroksid, 50 µg 3-O-deacilovani-4'-monofosforil lipid A	225 µg aluminum hidroksifosfat sulfat
raspored vakcinacije	0, 1, 6 mesec	0, 2, 6 mesec

Gardasil® (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ USA)

Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)

U ranim fazama kliničkih ispitivanja obe vakcine pokazale su zadovoljavajući stepen bezbednosti i imunogenosti (Schiller i sar, 2012). U fazi tri kliničkih ispitivanja kod mladih žena obe vakcine su bile visoko efikasne (74, 9% - 100%) u prevenciji

infekcije grlića materice i CIN lezija izazvanih tipovima u sastavu vakcine. Osim toga četverovalenta vakcina je pokazala visoku efikasnost u prevenciji genitalnih bradavica, vulvarne i vaginalne neoplazije (Kjaer i sar., 2009; Dillner i sar., 2010). Nijedna od ove dve vakcine nije pokazala značajnu efikasnost u eliminaciji postojeće infekcije i regresiji postojećih promena, pa zato i nisu odobrene za lečenje oboljenja izazvanih HPV (Hildesheim i sar., 2007).

Iako je od prvog odobrenja 2006. godine vakcina odobrena u preko 100 zemalja, do sada je vakcina uvedena u nacionalne programe vakcinacije samo oko 30 zemalja, najčešće visoko razvijenih, jer su vakcine i programi vakcinacije skupi. Nacionalni programi vakcinacije najčešće obuhvataju devojčice u adolescentnom ili preadolescentnom periodu. Australija je prva zemlja koja je postigla obuhvat vakcinacijom devojčica u adolescentskom dobu od 70% i koja je prva saopštila javnozdravstveni uticaj vakcinacije, koji se ogleda u smanjenju pojave genitalnih bradavica od 90 % kod žena i heteroseksualnih muškaraca ispod 21 godine starosti za period 2007/2008 i 2010/2011 u dva najveća centra za lečenje polno prenosivih bolesti (Howley i sar., 2013).

Tokom 2015. Godine, Evropska agencija za lekove (engl. European Medicines Agency-EMA) i Američka administracija za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration-FDA) odobrile su upotrebu devetovalentne vakcine protiv HPV, koja u svom sastavu osim tipova HPV koje sadrži četverovalentna vakcina (6, 11, 16, 18) sadrži i VLP HPV sledećih visoko onkogenih tipova (31, 33, 45, 52, and 58). Za ovu vakcinu je tokom faze 2b-3 faze kliničkog ispitivanja sprovedene na 14 215 žena potvrđena efikasnost u prevenciji infekcije i oboljenja povezanih sa HPV-31, 33, 45, 52 i 58 kao i podjednaka efikasnost u prevenciji infekcije i oboljenja povezanih sa HPV-6, 11, 16 i 18 u sastavu do sada odobrene četverovalentne vakcine.

Primena postojećih i novorazvijenih vakcina u okviru nacionalnih programa vakcinacije, uz ostale mere prevencije, kao i različitih programa "screeninga" predstavljaju osnovu za značajno smanjenje morbiditeta i mortaliteta HPV infekcije.

## *2. Ciljevi istraživanja*

Planom istraživanja predviđeni su sledeći ciljevi:

1. Identifikacija i određivanje učestalosti genotipova humanih papiloma virusa u tkivima karcinoma grlića materice i korelacija sa patohistološkim tipom i stadijumom karcinoma grlića materice.
2. Utvrđivanje i analiza genotipske varijabilnosti prisutnih HPV izolata analizom E1 i L1 gena.
3. Utvrđivanje i analiza intragenotipske varijabilnosti HPV genotipova analizom E6 i E7 gena (HPV 16).
4. Poređenje dobijenih rezultata učestalosti i distribucije HPV genotipova odnosno varijanti sa učestalošću i distibucijom u drugim evropskim zemljama.

## *3. Materijal i metodologija*

Istraživanje predviđeno temom ove doktorske disertacije sprovedeno je u periodu od januara 2011. do decembra 2015. godine. Izvođenje ovog istraživanja odobreno je odlukom Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 29/III-19 od 27.03.2015., kao i odlukama Etičkog komiteta Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ (broj 24/13-4 od 29.12.2014.), odnosno Direktora Kliničko-bolničkog centra „Zemun“ (broj 5763 od 19.12.2014).

Dizajn studije je studija preseka.

Sva laboratorijska ispitivanja izvedena su u virusološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju i Imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### **3. 1 Materijal**

#### **3. 1. 1 Pacijenti**

Istraživanje je obuhvatilo uzorke od 101 pacijentkinje iz Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ i Kliničko-bolničkog centra „Zemun“ primljenih radi hirurškog lečenja karcinoma grlića materice u periodu od 2011.-2015. godine. Prosečna starost pacijentkinja čiji su uzorci tkiva karcinoma grlića materice analizirani u ovom istraživanju bila je  $50,2 \pm 11,40$  godina, od čega je pacijentkinja starijih od 40 godina bilo 79 (78,21%), a mlađih od 40 godina bilo je 22 pacijentkinje (21,78%). Najmlađa pacijentkinja, kod koje je izvedena analiza uzorka tkiva karcinoma grlića materice uzetog tokom operacije, imala je 24 godine, a najstarija 78 godina.

Uzorci tkiva dobijeni posle izvedene radikalne histerektomije bili su analizirani u patohistološkim laboratorijama ove dve klinike radi patohistološke dijagnoze, kao i klasifikacije karcinoma zasnovanoj na sistemu SZO (Tabela 7.) (Tavassoli i Devilee, 2003).

Za klasifikaciju karcinoma korišćena je FIGO metodologija, koja obuhvata četiri stadijuma bolesti: stadijum I (karcinom je striktno ograničen na grlić materice), stadijum II (karcinom se proširio izvan grlića materice, ali ne obuhvata zidove karlice ili donju trećinu vagine), stadijum III (karcinom se proširio na zidove karlice i donju trećinu vagine) i stadijum IV (karcinom se proširio izvan karlice ili uključuje sluzokožu mokraćne bešike i/ili rektuma) (Pecorelli i sar., 2009; Pecorelli, 2009).



**Tabela 7. SZO histopatološka klasifikacija malignih epitelnih tumora grlića materice (Tavassoli i Devilee, 2003).**

Histološki tip	Histološki podtip	Varijanta podtipa
Skvamocelularni karcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keratinizujući</li> <li>- ne-keratinizujući</li> <li>- papilarni</li> <li>- verukozni</li> <li>- kondilomatozni</li> <li>- sličan limfoepiteliomu</li> <li>- skvamo-tranzicioni</li> </ul>	
Adenokarcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mucinozni</li> <li>- endometrioidni</li> <li>- svetlih ćelija (Clear-cell)</li> <li>- serozni</li> <li>- mezonefrični adenokarcinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mucinozni</li> <li>- endocervikalni</li> <li>- intestinalni</li> <li>- karcinom prstenastih ćelija</li> <li>- minimalne devijacije</li> <li>- viloglandularni</li> </ul>
Ostali epitelni tumori	<ul style="list-style-type: none"> <li>-adenoskvamozni karcinom</li> <li>- karcinom staklastih ćelija</li> <li>- adenoid cistični</li> <li>- adenoid bazalni</li> <li>- neuroendokrini</li> <li>- nediferentovani</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neuroendokrini</li> <li>- karcinoid</li> <li>- atipični karcinoid</li> <li>- sitno-ćelijski karcinom</li> <li>- neuroendokrini karcinom velikih ćelija</li> </ul>

### 3. 1. 2 Klinički uzorci

U okviru ove studije ispitivan je 101 uzorak tkiva karcinoma grlića materice fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafin, iz arhiva patohistološke laboratorije Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ i Kliničko-bolničkog centra „Zemun“. Iz odabranih blokova tkiva, uzimano je 5-10 isečaka tkiva debljine 5-10 µm koji su do dalje obrade čuvani na sobnoj temperaturi u mini-epruветama zapremine 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany). Prilikom isecanja tkiva iz sledećeg parafinskog bloka nož mikrotoma je ispiran 70% alkoholom kako bi se sprečila unakrsna kontaminacija.

### 3.2 Metodologija

Za dokazivanje prisustva HPV u uzorcima tkiva karcinoma grlića materice korišćena je reakcija lančanog umnožavanja (engl. Polymerase chain reaction – PCR) za dokazivanje HPV DNK, kao i za dokazivanje HPV tip 16 DNK. Za HPV genotipizaciju korišćen je metod direktnog DNK sekvenciranja. Pored toga, za dokazivanje HPV DNK kao i genotipizaciju korišćen je i metod protočne (engl. "Flow through") hibridizacije.

Za analizu genotipske odnosno intragenotipske varijabilnosti korišćena je filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci.

#### 3.2.1 Dokazivanje HPV DNK i HPV tip 16 DNK – PCR metod

Primenom PCR metode dokazivan je L1 i E1 gen HPV DNK, kao i E6 gen HPV tip 16 DNK. Procedura je obuhvatala: ekstrakciju DNK, PCR reakciju i gel elektroforezu za vizuelizaciju PCR produkata.

##### 3.2.1.1 Ekstrakcija DNK

Iz tkiva karcinoma grlića materice izdvajanje odnosno ekstrakcija DNK je urađena primenom komercijalnog kompleta QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), prema uputstvima proizvođača. Reagensi potrebni za izvođenje ekstrakcije DNK su pripremljeni prema uputstvu proizvođača kompleta i stabilizovani na sobnoj temperaturi tokom 1-2h. Kako bi se tokom postupka sprečila pojava kontaminacije, ekstrakcija je izvođena u biobezbednosnoj komori sa laminarnim protokom vazduha i upotrebljavani su sterilni filter nastavci različitih zapremina, kao i sterilne plastične mini-epruvete zapremine 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Procedura je obuhvatala dve faze: a) deparafinizaciju i b) ekstrakciju DNK.

**a) Deparafinizacija:**

- 1) Dodavano je 1200 $\mu$ L ksilola uz energičnu homogenizaciju na vorteks mešalici tokom 10 sekundi.
- 2) Centrifugirana je dobijena smeša na 13148 x g, 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- 3) Uklonjen je supernatant pažljivim pipetiranjem bez dodirivanja formiranog taloga.
- 4) Dodavano je 1200 $\mu$ L etanola (96-100%) i pažljivo homogenizovano na vorteks mešalici tokom 5 do 10 sekundi, kako bi se uklonio višak ksilola.
- 5) Centrifugirana je dobijena smeša na 13148 x g, 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- 6) Uklonjen je etanol pažljivim pipetiranjem bez dodirivanja formiranog taloga.
- 7) Ponavljan je postupak dodavanja etanola, homogenizacije na vorteks mešalici i centrifugiranja dva puta.
- 8) Inkubirana je otvorena mini-epruveta na 37°C od 15 do 20 minuta kako bi preostali etanol ispario.
- 9) Resuspendovan je preostali sediment u 180 $\mu$ L ATL pufera, dodavano je 20 $\mu$ L QIAGEN proteaze K i posle pažljive homogenizacije, inkubirano je preko noći do potpune lize preostalog sedimenta na temperaturi od 56°C.

**b) Ekstrakcija DNK**

- 1) Posle uklanjanja parafina uzorku tkiva dodavano je 200 $\mu$ L AL pufera uz homogenizaciju na vorteks mešalici tri puta po najmanje 5 sekundi
- 2) Inkubirano je 10 minuta na temperaturi od 70°C

- 3) Dodavano je 200 $\mu$ L etanola (96-100%) homogenizovano na vorteks mešalici i kratko centrifugirano
- 4) Dobijena smeša je pažljivo prebačena u QIAamp Mini kolonu koja se nalazi u mini-epruveti za zapremine 2mL i centrifugirana na 4293 x g tokom jednog minuta na sobnoj temperaturi
- 5) Posle centrifugiranja QIAamp Mini kolona prebačena je u novu mini-epruvetu od 2mL iz kompleta
- 6) Dodavano je 500 $\mu$ L AW1 pufera u kolonu i centrifugirano na 4293 x g tokom jednog minuta na sobnoj temperaturi
- 7) Posle centrifugiranja QIAamp Mini kolona prebačena je u novu mini-epruvetu od 2mL iz kompleta
- 8) Dodavano je 500 $\mu$ L AW2 pufera u kolonu i centrifugirano na 13 148 x g tokom jednog minuta na sobnoj temperaturi.
- 9) Posle centrifugiranja QIAamp Mini kolona prebačena je u mini-epruvetu od zapremine 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany) i dodavano je 30 $\mu$ L AE pufera stabilizovanog na sobnoj temperaturi, zatim inkubirano najmanje jedan minut na sobnoj temperaturi i centrifugirano jedan minut na 4293 x g.

Dobijeni filtrat koji sadrži ekstrahovanu DNK se koristio za reakciju lančanog umnožavanja-PCR neposredno po završetku ekstrakcije ili se do dalje obrade čuvao na temperaturi od -20°C.

### 3.2.1.2 PCR reakcija

Reagensi potrebni za reakciju lančanog umnožavanja, kao i uzorci DNK ekstrahovane iz uzoraka tkiva, odmrzavani su na temperaturi od 4°C i pre upotrebe temeljno homogenizovani na vorteks mešalici. Kako bi se tokom postupka sprečila

pojava kontaminacije, PCR je izvođen u biobezbednosnoj komori sa laminarnim protokom vazduha i upotrebljavani su sterilni filter nastavci različitih zapremina, kao i sterilne plastične mini-epruvete zapremine 0,2mL (Eppendorf, Hamburg, Germany). Za kontrolu izvedene reakcije, uz uzorke je obavezno pripremana negativna (sterilna H<sub>2</sub>O) i pozitivna kontrola (HPV DNK).

U reakciji lančanog umnožavanja korišćeni su sledeći reagensi:

- ✓ Qiagen Taq PCR Master Mix Kit - 250 U (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)
- ✓ Oligonukleotidni prajmeri (Operon Biotechnologies GmbH, Cologne, Germany)
- ✓ Molecular Biology Grade H<sub>2</sub>O (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Za amplifikaciju HPV DNK u uzorcima je korišćena PCR mašina (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) (Slika 14.).



***Slika 14. PCR mašina (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) u Virusološkoj laboratoriji Instituta za Mikrobiologiju i Imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu***

### 3.2.1.2.1 PCR za dokazivanje HPV DNK L1 gena

U ovoj reakciji korišćeni su konzensus degenerativni MY09/11 prajmeri, čiji sastav čine 24 para prajmera (Tabela 8.) (Gravitt i sar., 2000; Remmerbach i sar., 2004).

**Tabela 8. Oligonukleotidna sekvenca MY09/11prajmera (modifikacija po Gravitt i sar., 2000 Remmerbach i sar., 2004)**

Prajmer	Oligonukleotidna sekvenca (5'-3') <sup>a</sup>
MY09	CGTCC <b>M</b> ARRGGAWACTGATC
MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG

<sup>a</sup> Varijabilne nukleotidne pozicije su naznačene podebljano i predstavljaju sledeće nukleotide:

**M** = A ili C; **R** = A ili G; **W** = A ili T; **Y** = C ili T

Reakciona PCR smeša, zapremine 25µL, pripremana je prema sledećem sastavu:

- ✓ Taq PCR Master Mix            12,5µL
- ✓ MY09 prajmer                    1,25µL (konc. 1µmol)
- ✓ MY11 prajmer                    1,25µL (konc. 1µmol)
- ✓ H<sub>2</sub>O                                    5µL
- ✓ Ekstrahovana DNK              5µL

Protokol prema kome je izvođena reakcija lančanog umnožavanja sastojao se od sledećih koraka: a) početna denaturacija na 95°C - 5 minuta; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 40 puta, a odvija se u tri koraka: denaturacija DNK - 30 sekundi na 94°C, vezivanje prajmera - 30 sekundi na 58°C i ekstenzija DNK lanca - 1 minut na 72°C; c) dodatna ekstenzija DNK lanca 20 minuta na 72°C i d) završetak reakcije na 4°C (Gravitt i sar., 2000).

Po završenoj reakciji, dobijeni produkti amplifikacije odmah su analizirani, čuvani tokom kraćeg vremena na temperaturi od 4°C ili dužeg vremena na temperaturi od -20°C.

### 3.2.1.2.2 PCR za dokazivanje HPV DNK E1 gena

Za dokazivanje HPV DNK E1 gena korišćeni su konsenzus prajmeri: GP1 – 5' TGGTACAATGGGCATATGAT 3' i GP2 – 5'ATAATGGCTTTTGGAAATTTACA 3'. Navedene prajmere karakteriše niska temperatura vezivanja, na čemu se i zasniva njihova primena (Tieben i sar., 1993; Azzimonti i sar., 1999).

Reakciona PCR smeša, zapremine 25µL, pripremana je prema sledećem sastavu:

✓ Taq PCR Master Mix	12,5µl
✓ P1 prajmer	2,5µl (konc. 1µmol)
✓ P2 prajmer	2,5µl (konc. 1µmol)
✓ H <sub>2</sub> O	2,5µl
✓ Ekstrahovana DNK	5µl

Protokol prema kome je izvođena reakcija lančanog umnožavanja sastojao se od sledećih koraka: a) početna denaturacija na 85°C - 10 minuta; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 40 puta, a odvija se u tri koraka: denaturacija DNK – 1 minut na 94°C, vezivanje prajmera – 1 minut na 50°C i ekstenzija DNK lanca – 90 sekundi na 72°C; c) dodatna ekstenzija DNK lanca 10 minuta na 72°C i d) završetak reakcije na 4°C (Azzimonti i sar., 1999).

Po završenoj reakciji, dobijeni produkti amplifikacije odmah su analizirani, čuvani su tokom kraćeg vremena na temperaturi od 4°C ili dužeg vremena na temperaturi od -20°C.

### 3.2.1.2.3 PCR za dokazivanje HPV tip 16 DNK E6/7 gena

Za dokazivanje HPV tip 16 DNK E6/7 gena korišćeni su prajmeri: FW - 5` ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC 3` i REV- 5` TGC CCA TTA ACA GGT CTT CC 3` (Ferris i sar., 2005).

Reakciona PCR smeša, zapremine 25 $\mu$ L, pripremana je prema sledećem sastavu:

✓ Taq PCR Master Mix	12,5 $\mu$ l
✓ FW prajmer	2,5 $\mu$ l (konc. 1 $\mu$ mol)
✓ REV prajmer	2,5 $\mu$ l (konc. 1 $\mu$ mol)
✓ H <sub>2</sub> O	2,5 $\mu$ l
✓ Ekstrahovana DNK	5 $\mu$ l

Protokol prema kome je izvođena reakcija lančanog umnožavanja sastojao se od sledećih koraka: a) početna denaturacija na 85°C - 10 minuta; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 40 puta, a odvija se u tri koraka: denaturacija DNK - 1 minut na 94°C, vezivanje prajmera - 1 minut na 50°C i ekstenzija DNK lanca - 90 sekundi na 72°C; c) dodatna ekstenzija DNK lanca 10 minuta na 72°C i d) završetak reakcije na 4°C (Ferris i sar., 2005).

Po završenoj reakciji, dobijeni produkti amplifikacije odmah su analizirani, čuvani su tokom kraćeg vremena na temperaturi od 4°C ili dužeg vremena na temperaturi od -20°C.

### 3.2.1.3 Vizualizacija produkata PCR-elektroforeza u agaroznom gelu

Za vizuelizaciju dobijenih PCR produkata upotrebljena je elektroforeza u 1,5% agaroznom gelu. Dobijeni umnoženi ciljni fragmenti DNK identifikovani su na osnovu broja baznog parova - bp, odnosno na osnovu dužine fragmenta. Etidijum-bromid supstanca koja ima sposobnost umetanja u molekul DNK i fluorescira kada se osvetli UV zraćenjem, koristi se za vizuelizaciju dobijenih ciljnih fragmenata DNK. Za



identifikaciju dobijenih produkata PCR koristi se poređenje sa standardom DNK (*engl. ladder*) u kojoj se nalazi smeša fragmenata DNK poznatih dužina (T. Jovanović *i sar.*, 2004).

Za izvođenje ove metode vizuelizacije korišćeni su sledeći reagensi:

- ✓ Agarozna (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)
- ✓ 1x Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)
- ✓ Etidijum-bromid, vodeni rastvor - 10mg/ml (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)
- ✓ DNK Standard 100bp (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)
- ✓ 5x Pufer za punjenje – (*engl. Loading buffer*) (2,5 g saharoze, 1 ml 2,5% rastvora Bromophenol Blue, u 10ml destilovane H<sub>2</sub>O)

Za elektroforezu u agaroznom gelu, pripreman je 1,5% rastvor agaroze u TAE puferu, sa dodatim etidijum-bromidom (1µl/100ml TAE pufera). Priprema uzoraka za elektroforezu izvođena je tako što je 8µl svakog uzorka pomešano sa po 2µl 5x pufera za punjenje. Paralelno sa ispitivanim uzorcima pripreman je standard DNK, tako što je 5µl standarda pomešano sa 2µl 5x pufera za punjenje. Posle pripreme uzoraka i standarda DNK, u prethodno pripremljeni gel postavljen u sud za elektroforezu, izvedeno je pažljivo unošenje uzoraka u bunarčice gela. Elektroforeza je izvođena sa naponom od 100V tokom 45-60 minuta.

Osvetljavanjem agaroznog gela UV zračenjem po završetku elektroforeze analizirano je prisustvo ili odsustvo PCR produkata određene veličine. Veličina produkta amplifikacije za L1 gen kao i za E1 gen je 450bp, dok je za HPV tip 16 E6 gen iznosio 735bp. Poređenjem sa standardom DNK, prisustvo fragmenata određene dužine tumačeno je kao pozitivan rezultat. Uzorci kod kojih je utvrđeno pozitivno prisustvo produkata amplifikacije korišćeni su odmah za određivanje odnosno

potvrdu genotipa HPV metodom DNK sekvenciranja ili su čuvani na temperaturi od -20°C do dalje obrade.

### 3. 2. 2 DNK sekvenciranje

Za određivanje genotipova HPV odnosno potvrdu HPV tip 16 genotipa korišćena je metoda DNK sekvenciranja. Način sekvenciranja bazirao se na metodi završetka lanca primenom didezoksiribonukleotida obeleženih fluorescentnim bojama (Sanger i sar., 1977; Remmerbach i sar., 2004).

Procedura je obuhvatala prečišćavanje PCR produkata, reakciju cikličnog sekvenciranja, prečišćavanje produkata cikličnog sekvenciranja, kapilarnu elektroforezu u automatskom sekvencioneru i analiza elektroferograma.

#### 3. 2. 2. 1 Prečišćavanje PCR produkata

Pre izvođenja reakcije DNK sekvenciranja pozitivni PCR produkti L1, E1 i HPV tip 16 E6 gena prečišćeni su primenom QIAGEN MinElute PCR Purification Kita (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) prema uputstvu proizvođača:

- 1) U mikro-epruветu sa PCR produktom dodavano je 75μl PBI pufera i pažljivo promešano.
- 2) Dobijeni homogenizat je pažljivo je prebačen u MinElute kolonu sa mini-epruветom za prikupljanje filtrata i centrifugirana na 14000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.
- 3) Posle centrifugiranja, filtrat je odbacivan, a u MinElute kolonu je unošeno 750μl PE pufera i centrifugirano na 14000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.

- 4) Po završetku centrifugiranja, filtrat je odbacivan, a MinElute kolona je centrifugirana na maksimalnoj brzini od 24000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.
- 5) Potom je MinElute kolona izvađena i prebačena u čistu mini-epruvetu od 1,5ml.
- 6) Dodavano je 10 $\mu$ l EB pufera direktno na membranu i inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirano 1 minut na 14000 rpm.

Dobijeni filtrat koji je sadržavao prečišćeni PCR produkt je korišćen odmah za DNK sekvenciranje ili čuvan na temperaturi od -20°C.

### 3. 2. 2. 2 Reakcija cikličnog sekvenciranja

Reakcija cikličnog sekvenciranja rađena je za svaki DNK lanac pojedinačno odnosno u oba pravca (*engl.* "forward" i "reverse"). Korišćen je komplet Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, SAD), uz primenu istih prajmera koji su korišćeni i za PCR metodu. Kako je reakcija sekvenciranja izvođena za svaki lanac posebno pripremane su dve reakcione smeše (svaka je sadržavala po jedan prajmer) prema protokolu proizvođača.

#### a) HPV DNK sekvenciranje L1 gena

Zapremina reakcione smeše za jedan uzorak bila je 15 $\mu$ L, koju su činili sledeće komponente:

- |                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| ✓ Big Dye Terminator Mix    | 2 $\mu$ L                        |
| ✓ Big Dye Terminator pufer  | 2 $\mu$ L                        |
| ✓ MY09 ili MY11             | 1,25 $\mu$ L (konc. 1 $\mu$ mol) |
| ✓ H <sub>2</sub> O          | 6,75 $\mu$ L                     |
| ✓ Prečišćena L1 gen HPV DNK | 2 $\mu$ L                        |

Protokol prema kome je rađena reakcija cikličnog umnožavanja u PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) sastojao se od sledećih faza: a) početna denaturacija na 96°C - 1 minut; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 40 puta, a odvija se u tri koraka: denaturacija DNK – 10 sekundi na 96°C, vezivanje prajmera – 5 sekundi na 55°C i ekstenzija DNK lanca – 4 minuta na 60°C; c) završetak reakcije na 4°C.

Posle završetka reakcije, dobijeni produkti cikličnog umnožavanja su odmah prečišćeni ili su zamrzavani na -20°C najduže 3 dana.

### **b) HPV DNK sekvenciranje E1 gena**

Zapremina reakcione smeše za jedan uzorak bila je 15µL, koju su činili sledeće komponente:

✓ Big Dye Terminator Mix	2µL
✓ Big Dye Terminator pufer	2µL
✓ P1 ili P2	1,25µl (konc. 1µmol)
✓ H <sub>2</sub> O	6,75µl
✓ Prečišćena E1 gen HPV DNK	2µL

Protokol prema kome je rađena reakcija cikličnog umnožavanja u PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) sastojao se od sledećih faza: a) početna denaturacija na 96°C - 1 minut; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 40 puta, a odvija se u tri koraka: denaturacija DNK – 10 sekundi na 96°C, vezivanje prajmera – 5 sekundi na 50°C i ekstenzija DNK lanca – 4 minuta na 60°C; c) završetak reakcije na 4°C.

Posle završetka reakcije, dobijeni produkti cikličnog umnožavanja su odmah prečišćeni ili su zamrzavani na -20°C najduže 3 dana.

**c) HPV tip 16 DNK sekvenciranje E6/7 gena**

Zapremina reakcione smeše za jedan uzorak bila je 15 $\mu$ L, koju su činili sledeće komponente:

- |                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| ✓ Big Dye Terminator Mix       | 2 $\mu$ L                        |
| ✓ Big Dye Terminator pufer     | 2 $\mu$ L                        |
| ✓ FW ili REW                   | 1,25 $\mu$ l (konc. 1 $\mu$ mol) |
| ✓ H <sub>2</sub> O             | 6,75 $\mu$ l                     |
| ✓ Prečišćena E6 gen HPV 16 DNK | 2 $\mu$ L                        |

Protokol prema kome je rađena reakcija cikličnog umnožavanja u PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany) sastojao se od sledećih faza: a) početna denaturacija na 96°C - 1 minut; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 40 puta, a odvija se u tri koraka: denaturacija DNK – 10 sekundi na 96°C, vezivanje prajmera – 5 sekundi na 50°C i ekstenzija DNK lanca – 4 minuta na 60°C; c) završetak reakcije na 4°C.

Posle završetka reakcije, dobijeni produkti cikličnog umnožavanja su odmah prečišćeni ili su zamrzavani na -20°C najduže 3 dana.

**3. 2. 2. 3 Prečišćavanje produkata cikličnog umnožavanja**

Nakon reakcije cikličnog umnožavanja izvedeno je prečišćavanje dobijenih produkata ove reakcije. Dodavano je 80 $\mu$ l 75% izopropanola pažljivo i homogenizovano. Po dodavanju izopropanola, dobijeni homogenizat je inkubiran 15 minuta u mraku, a potom i centrifugiran 45 minuta na 2000 x g. Po centrifugiranju supernatant se odbacivao, a onda su se mikro-epruvete sa uzorcima postavljale u invertan položaj i ponovo centrifugirale 2 minuta na 700 x g kako bi se izopropanol u potpunosti odstranio. Na posletku, mikro-epruvete su se sušile u mraku 60 minuta. Prečišćeni uzorci upotrebljavani su odmah za analizu sekvenci ili su čuvani na temperaturi od - 20°C.

### 3.2.2.4 Kapilarna elektroforeza u automatskom sekvencioneru i analiza elektroferograma

U okviru pripreme za kapilarnu elektroforezu izvođena je denaturacija DNK. Uzorcima je dodavano 10 $\mu$ l Hi-Di TM formamida (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a potom su sprovedeni sledeći koraci denaturacije: a) 2 minuta na 95°C b) 2 minuta na 4°C. Nakon završene denaturacije uzorci su prenošeni u sekvenator ABI Prism 310 Genetic Analyser system-u (Applied Biosystems, Foster City, SAD) u kome je rađena kapilarna elektroforeza (Slika 15.).



**Slika 15. Sekvenator ABI Prism 310 Genetic Analyser**

Analiza dobijenih sekvenci izvedena je pomoću Sequence Analysis 5.1 programskog paketa (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Kako bi kvalitet sekvenciranja bio adekvatno procenjen analizirane su dobijene nukleotidne sekvence za L1, E1 i E6 gene. Pojedinačni jasno razdvojeni pikovi u elektroferogramu ukazivali su na prisustvo infekcije jednim HPV tipom. Pojava preklopljenih ili dvostrukih pikova ukazivala je na moguće prisustvo mešovite infekcije sa više HPV tipova (Remmerbach *et al.*, 2004; Molijn *et al.*, 2005)

Kako je za svaki uzorak određena sekvanca u oba pravca, dobijene su dve nukleotidne sekvence koje su uz pomoć SeqScape v2.1 programskog paketa (Applied Biosystems, Foster City, SAD) međusobno upoređivane (*engl.* alignment) a zatim su izvedene "consensus" sekvence. Potom su sekvence za svaki uzorak upoređivane sa već poznatim sekvencama pomoću BLAST (*engl.* Basic Local Alignment Search Tool – BLAST) programa (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) programa u GenBank genskoj bazi podataka (NCBI, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Kako bi se odredio HPV genotip primenjivani su sledeći kriterijumi. Najmanja dužina sekvence iznosila je 291bp, a sličnost sa poznatim tipom HPV iznosila je najmanje 95%. Kod mešovitih infekcija dominantan tip određivan je po identičnim kriterijumima. Ukoliko nije bilo moguće ustanoviti dominantan tip, kada je sličnost sa poznatim genotipom bila manja od 95%, rezultat ispitivanja tumačen je kao mešovita infekcija bez dominantnog HPV genotipa (Remmerbach *et al.*, 2004; Molijn *et al.*, 2005).

### **3.2.3. Dokazivanje i genotipizacija HPV DNK metodom protočne (*engl.* "Flow through") hibridizacije**

Za dokazivanje i genotipizaciju HPV DNK metodom protočne (*engl.* "Flow through") hibridizacije korišćen je komplet GenoFlow HPV Array Test Kit (DiagCor Bioscience, Hong Kong, Kina), namenjen za genotipizaciju 33 različita tipa HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68b, 70, 71, 72, 73, 81, 82 i 84). Ovo ispitivanje obuhvata u prvoj fazi amplifikaciju PCR metodom ekstrahovane HPV DNK i potom u drugoj fazi protočnu hibridizaciju sa tip specifičnim probama prema protokolu proizvođača. Svi potrebni reagensi u sastavu kompleta, kao i reagensi koji nisu obezbeđeni u ovom kompletu pripremljeni su, čuvani i upotrebljavani prema uputstvu proizvođača.

### 3.2.3.1 HPV DNK PCR amplifikacija

Ukupna zapremina reakcione smeše koja se koristi za PCR amplifikaciju bila je 25 $\mu$ L i imala je sledeći sastav:

- ✓ HPV PCR Premix 19,25 $\mu$ L
- ✓ DNA Taq Polymerase 0,75 $\mu$ L

Pripremljenoj reakcionoj smeši dodavan je uzorak ekstrahovane DNK od 5 $\mu$ L. Amplifikacija je rađena u PCR mašini (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany), po sledećem protokolu: a) inicijalna denaturacija na temperaturi od 95°C tokom 9 minuta; b) replikacioni ciklus koji se ponavlja 43 puta, a obuhvata tri koraka: denaturacija na temperaturi od 95°C tokom 20 sekundi; vezivanje prajmera na temperaturi od 55°C tokom 30 sekundi; ekstenzija DNK lanca na temperaturi od 72°C tokom 30 sekundi; c) finalna ekstenzija DNK lanca na temperaturi od 72°C tokom 5 minuta i d) završetak reakcije na 4°C.

Kako bi se tokom postupka sprečila pojava kontaminacije, PCR je izvođen u biobezbednosnoj komori sa laminarnim protokom vazduha i upotrebljavani su sterilni filter nastavci različitih zapremina, kao i sterilne plastične mini-epruvete zapremine 0,2mL (Eppendorf, Hamburg, Germany). Uz uzorke, radi kontrole reakcije pripremana je negativna kontrola (sterilna voda), amplifikaciona kontrola koja pokazuje prisustvo inhibitora ili nedovoljnu količinu DNK u uzorku i pozitivna kontrola (koja sadrži HPV DNK).

### 3.2.3.2 HPV protočna hibridizacija

Pre početka reakcije hibridizacije, hibridizacioni rastvor je zagrevan na temperaturi od 41°C, a ostali reagensi su stabilizovani na sobnoj temperaturi. Reakciona komora uređaja DiagCor FT-PRO (DiagCor Bioscience, Hong Kong, Kina) ispirana je destilovanom vodom i zagrevana na temperaturu od 41°C. U komoru su zatim ubacivane i fiksirane prethodno označene dijagnostičke kasete (slika 16.).





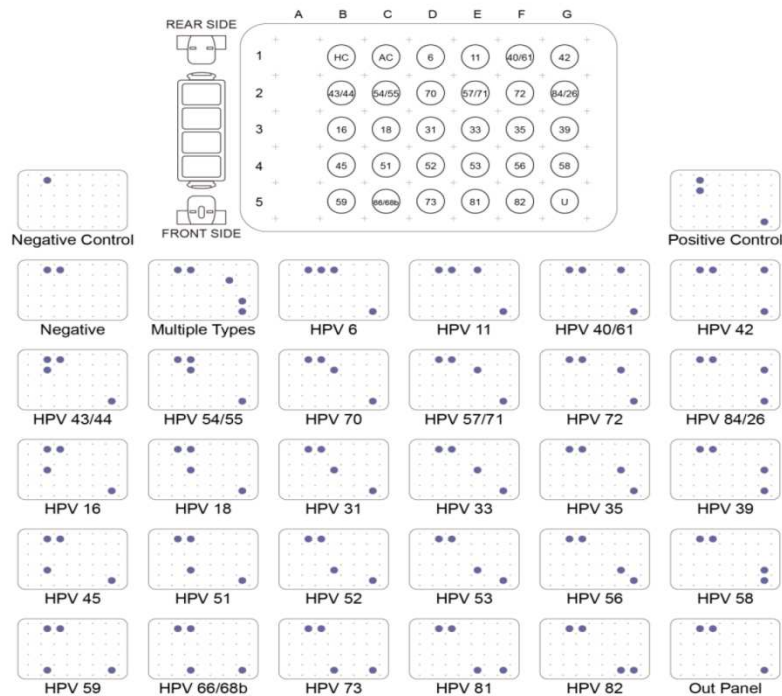
**Slika 16. Dijagnostička kasete u sastavu kompleta GenoFlow HPV Array Test Kit**

Produkti PCR su pre reakcije hibridizacije denaturisani na temperaturi od 95°C tokom 5 minuta, zatim ohlađeni na ledu tokom 2 minuta (4°C).

Kada se na displeju uređaja DiagCor FT-PRO (DiagCor Bioscience, Hong Kong, Kina) očitavala temperatura od 41°C, unošeno je pažljivo 750µL prethodno zagrejanog hibridizacionog rastvora u svaki od četiri bunarčića dijagnostičke kasete i inkubirano tokom 2 minuta, posle čega je rastvor uklanjan iz dijagnostičke kasete. Potom je 20µL denaturisanog PCR produkta homogenizovano sa 500µL zagrejanog hibridizacionog rastvora i pažljivo dodavano u odgovarajući bunarčić dijagnostičke kasete. Posle inkubiranja dijagnostičkih kasete na temperaturi od 41°C tokom 5 minuta preostala tečnost uklanjana je iz bunarčića.

Radi razvoja bojene reakcije podešavana je temperatura uređaja DiagCor FT-PRO (DiagCor Bioscience, Hong Kong, Kina) na 25°C i dodavano 1000µL rastvora za blokiranje reakcije hibridizacije. Pri temperaturi od 25°C dodavano je 500µL konjugata i inkubirano 3 minuta. Potom je uklanjana preostala tečnost i podešavana temperatura na 36°C i ispirani bunarčići dijagnostičke kasete sa 750µL rastvora A ukupno četiri puta. Zatim je dodavano 500µL rastvora za detekciju pri temperaturi od 36°C i inkubirano u mraku 5 minuta. Nakon toga je membrana ispirana sa 750µL B rastvora ukupno četiri puta i inkubirana 1 minut u mraku. Dijagnostičke kasete su izvađene iz uređaja i osušene na filter hartiji.

Prisustvo obojenog precipitata na određenim pozicijama u bunarčiću dijagnostičke kasete tumačeno je kao pozitivan rezultat (Slika 17.).



**Slika 17. Prikaz interpretacije rezultata ispitivanja GenoFlow HPV Array Test Kit**

### 3. 2. 4 Filogenetska analiza HPV izolata

Za poređenje i poravnavanje dobijenih sekvenci korišćen je MUSCLE program (Edgar, 2004). Ovo je opšti program za poravnavanje nukleotidnih sekvenci DNK ili proteinskih sekvenci. Za dalju filogenetsku analizu korišćeni je MEGA (MEGA version 6.0) softverski paket (Tamura, Stecher, i sar., 2013).

Poređenje (*engl.* multiple alignment) dobijenih sekvenci sa referentnim sekvencama preuzetim iz GenBank/EMBL/DDBJ MUSCLE programa u okviru MEGA 6.0 softverskog paketa, koji je korišćen i za određivanje nukleotidnih distanci. Navedena distanca među nukleotidima je evolutivno odstupanje na nivou nukleotida, a za njeno izračunavanje korišćen je Maximum Composite Likelihood model (Tamura, Nei i Kumar, 2004). Za konstrukciju Maximum likelihood (ML), Neighbor-joining (NJ), i Maximum parsimony (MP) filogenetskih stabala, kao i za određivanje najadekvatnijeg modela evolucije za njihovu konstrukciju, korišćen je MEGA 6.0 softverski paket uz potvrdu značaja filogenetskih odnosa "bootstrap" analizom sa 500

ponavljanja. Za grafičku prezentaciju i obradu dobijenih stabala, korišćeni su MEGA 6.0 i FigTree v.1.4.2. softverski paketi.

U filogenetskoj analizi su korišćeni HPV referentni sojevi genotipova, linija i podlinija HPV u okviru roda *Alpha-papillomavirus* (u zagradi su navedeni pristupni brojevi za NCBI bazu podataka):

**a) referentni sojevi - genotip HPV**

HPV 16 (K02718), HPV 18 (AY262282), HPV 33 (M12732), HPV 58 (D90400), HPV 45 (X74479), HPV 53 (X74482)

**b) referentni sojevi - linije i podlinije HPV**

**HPV 16**

**- linija A**

**podlinija A1**-HPV 16 (K02718), **podlinija A2**-HPV16 izolat European German 131 type (AF536179), **podlinija A3**-HPV16 izolat AS411 (HQ644236), **podlinija A4**-HPV 16 East Asian type (AF534061)

**- linija B**

**podlinija B1**-HPV 16 izolat African-1 type (AF536180), **podlinija B2**-HPV16 izolat Z109 (HQ644298)

**- linija C**

HPV16 variant (African type 2) (AF472509)

**-linija D**

**podlinija D1**-HPV16 izolat Qv00512 (HQ644257), **podlinija D2**-HPV16 izolat Qv15321A (AY686579), **podlinija D3**-HPV16 Asian-American variant (AF402678)

**HPV 33**

**-linija A**

**podlinija A1**-HPV33 (M12732), **podlinija A2**-HPV33 izolat Qv34060 (HQ537698), **podlinija A3**-HPV33 izolat LZcc12-33 (EU918766)

**-linija B**

HPV33 izolat Qv23819 (HQ537705),

**-linija C**

HPV33 izolat BF375 (KF436865)

**HPV58****-linija A**

**podlinija A1**-HPV58 (D90400), **podlinija A2**-HPV58 izolat Qv15606(HQ537752),

**podlinija A3**-HPV58 izolat Qv00961 (HQ537758)

**-linija B**

**podlinija B1**-HPV58 izolat BF134 (HQ537762), **podlinija B2**-HPV58 izolat Rw937(HQ537764)

**-linija C**

HPV58 izolat Qv13816(HQ537774)

**-linija D**

**podlinija D1**-HPV58 izolat Qv03841(HQ537768), **podlinija D2**-HPV58 izolat Rw697 (HQ537770)

**c) ostali sojevi korišćeni u filogenetskoj analizi**

HPV16 izolat CY07-118 (AJ617545), Human papillomavirus type 16 isolate Qv24898, complete genome (JP02078), Alphapapillomavirus 9 isolate IARC020237 (gb|KU053936.1)

**3.2.5 Statistička obrada dobijenih rezultata**

Za analizu dobijenih rezultata, primenjivane su sledeće statističke metode:

- metode deskriptivne statistike (srednja vrednost i standardna devijacija)
- kapa ( $\kappa$ ) statistički metod korišćen je za procenu slaganja primenjenih testova

- Fisher test tačne verovatnoće korišćen je za procenu značajnosti razlika učestalosti dihotomnog obeležja posmatranja između 2 mala nezavizana uzorka.

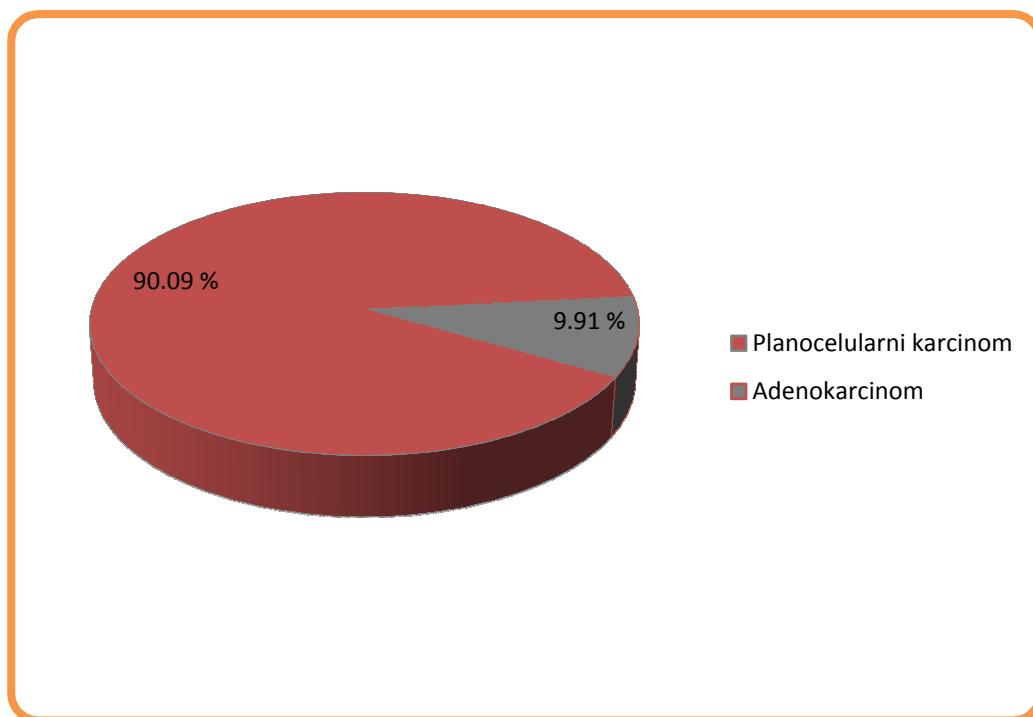
Statistička značajnost je ocenjivana za nivo značajnosti od 0,05. Za statističku analizu korišćen je SPSS 11.0 v. 23 programski paket.

## *4. Rezultati*

U periodu od 2011-2015, ispitivano je prisustvo humanog papiloma virusa (HPV), primenom različitih tehnika molekularne biologije, u 101 uzorku tkiva karcinoma grlića materice dobijenih iz arhiva patohistološke laboratorije Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ i Kliničko-bolničkog centra „Zemun“. Određivanje prisustva HPV, kao i učestalost genotipova HPV u tkivu karcinoma grlića materice je izvedeno različitim tehnikama ciljne amplifikacije, a analiza dobijenih rezultata izvršena je na različite načine.

#### 4. 1 Karakteristike tkiva karcinoma grlića materice

Od 101 uzorka tkiva karcinoma grlića materice, 91 uzorak pripadao je patohistološkom tipu planocelularnog karcinoma (90,09%), dok je 10 uzoraka pripadalo patohistološkom tipu adenokarcinoma (9,91%) (Grafikon 1.).



**Grafikon 1. Distribucija tkiva karcinoma grlića materice prema patohistološkom tipu**

Od ukupno 91 uzorka planocelularnog karcinoma, 35 uzoraka je pripadalo podtipu keratinizujućeg karcinoma, a 56 uzoraka podtipu nekeratinizujućeg karcinoma. Takođe od ukupno 10 uzoraka adenokarcinoma, tri uzorka pripadala su podtipu adenoskvamoznog karcinoma (Tabela 9.)



**Tabela 9. Distribucija uzoraka karcinoma grlića materice prema patohistološkom podtipu**

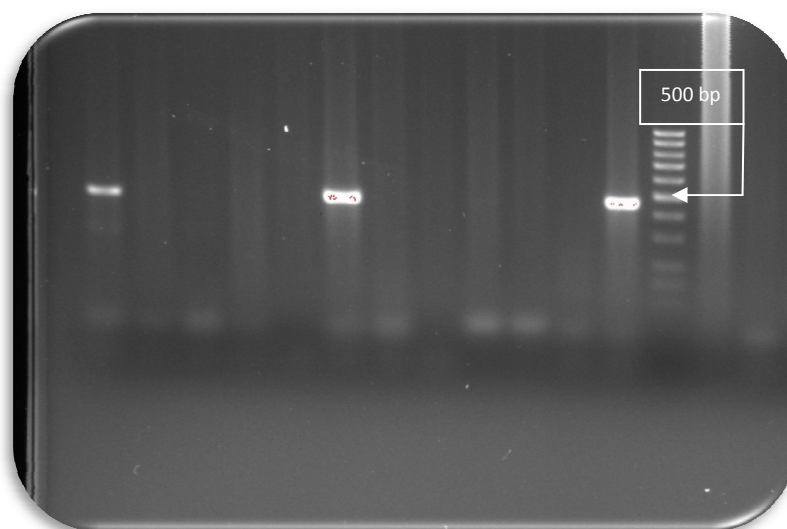
<b>Patohistološki podtip</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Planocelularni nekeratinizujući	56	55,44
Planocelularni keratinizujući	35	34,65
Adenokarcinom	7	6,93
Adenoskvamozni karcinom	3	2,97
<b>Ukupno</b>	<b>101</b>	<b>100</b>

#### 4.2 Dokazivanje prisustva HPV u uzorcima karcinoma grlića materice

Dokazivanje prisustva HPV u tkivu karcinoma grlića materice izvedeno je primenom PCR metode za detekciju E1 gena i L1 gena HPV DNK.

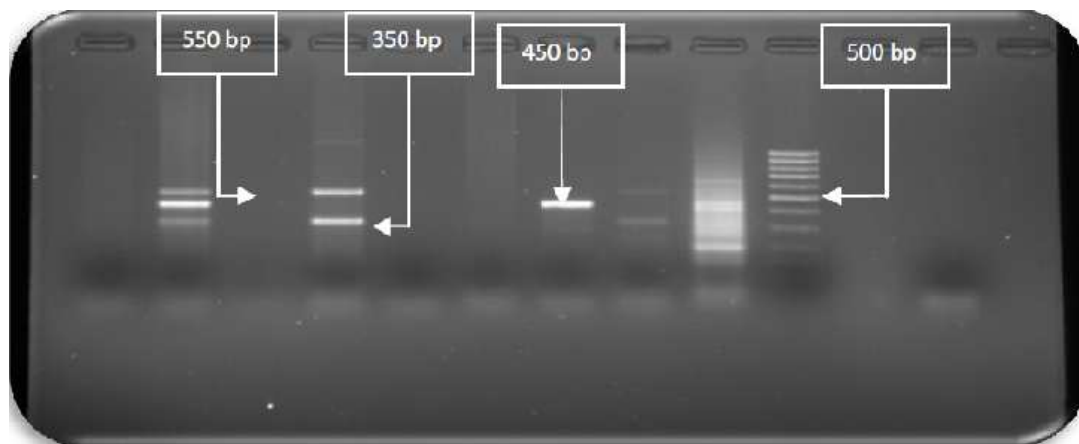
##### 4.2.1 Prisustvo HPV DNK E1 gen u uzorcima karcinoma grlića materice

Posle izvedene PCR metode za detekciju E1 gena, analiza dobijenih produkata gel elektroforezom, dokazala je prisustvo specifičnih fragmenata E1 gena veličine 450bp kod 57 (56,43%) od 101 ispitanog uzorka tkiva (Slika 18.)



**Slika 18. Gel elektroforeza za E1 gen HPV PCR (DNK Standard 100bp)**

Kod jednog broja uzoraka, utvrđena je pojava nespecifičnih produkata PCR reakcije za E1 gen, veličine oko 350bp i 550bp (Slika 19.).

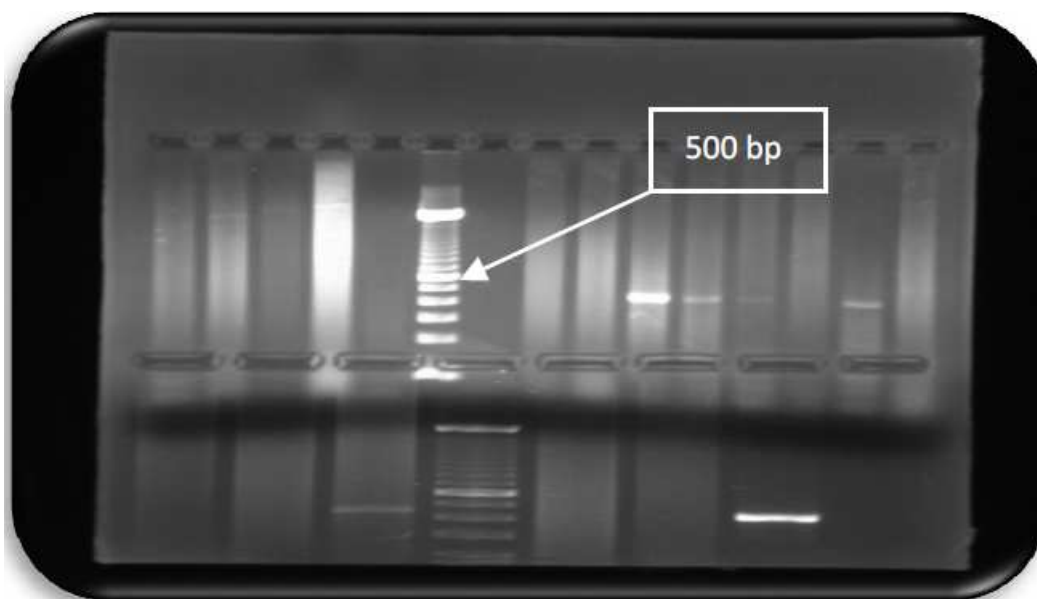


**Slika 19. Gel elektroforeza za E1 gen HPV PCR (DNK Standard 100bp) nespecifični PCR produkti veličine ~ 350bp i ~ 550bp**

Ovi produkti su bili detektovani i nakon smanjenja broja ciklusa u protokolu PCR reakcije. Paralelno sa analizom produkta PCR reakcije za E1 gen DNK sekvenciranjem analizirani su i ovi uzorci.

#### 4.2.1 Prisustvo HPV DNK L1 gen u uzorcima karcinoma grlića materice

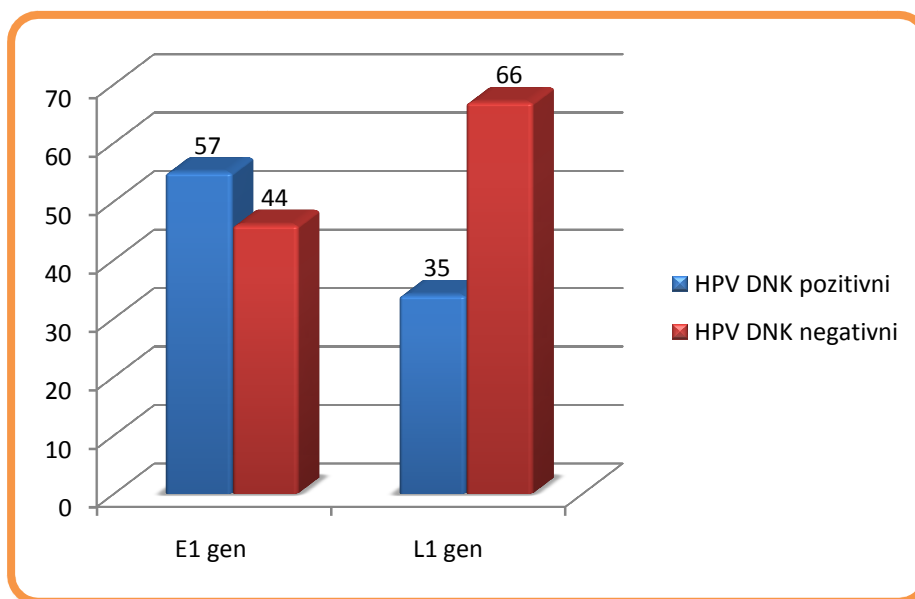
Rezultati gel elektroforeze, izvedene radi analize dobijenih produkata PCR metode za detekciju L1 gena, pokazali su prisustvo specifičnih fragmenata L1 gena veličine 450 bp kod 35 (34,65%) od ukupno 101 ispitanog uzorka tkiva karcinoma grlića materice (Slika 20.).



*Slika 20. Gel elektroforeza za L1 gen HPV PCR (DNK Standard 100bp)*

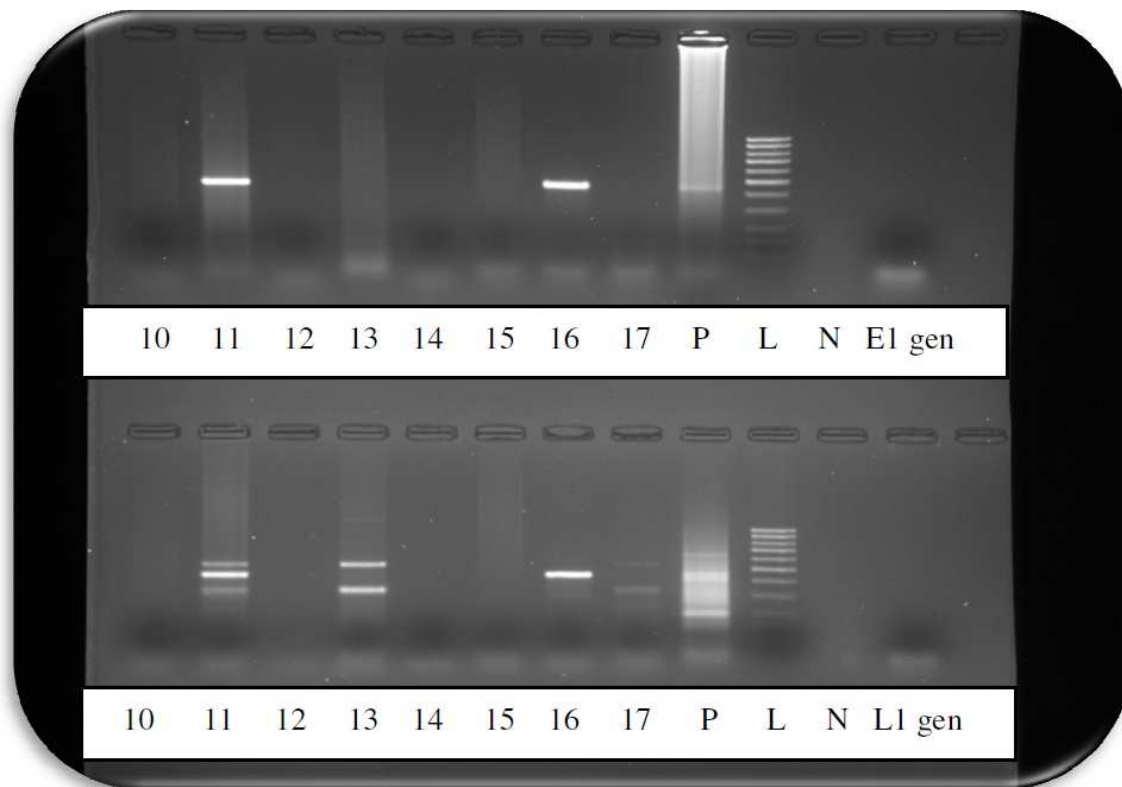
### 4.2.3 Usporedna analiza PCR metoda za dokazivanje HPV DNK E1 i L1 gena u uzorcima karcinoma grlića materice

Analizom dobijenih rezultata, primenom iste metode, ali uz korišćenje prajmera za fragmente različitih gena HPV utvrđena je različita učestalost HPV DNK u tkivima karcinoma grlića materice, odnosno HPV DNK E1 gen je češće dokazivan u odnosu na L1 gen (Grafikon 2.).



**Grafikon 2. Razlika u učestalosti HPV DNK u tkivu karcinoma primenom PCR metoda za E1 i L1 gen**

Poređenjem rezultata dobijenih PCR metodom uz korišćenje prajmera za fragment E1 gena, odnosno prajmera za fragment L1 gena utvrđeno je da je u pojedinim uzorcima detektovan samo E1 gen odnosno L1 gen, dok su pojedini uzorci bili pozitivni za oba gena (Slika 21.).



**Slika 21. Uporedna gel elektroforeza za L1 i E1 gen HPV PCR (L-DNK standard 100bp, N-negativna kontrola, P-pozitivna kontrola, 10-17 identifikacioni brojevi ispitanica)**

Analizom navedenih rezultata utvrđeno je da je kod 23 uzoraka detektovano oba gena, dok je znatno veći broj uzoraka tkiva karcinoma bio pozitivan samo na HPV E1 gen u odnosu na L1 gen (Tabela 10.).

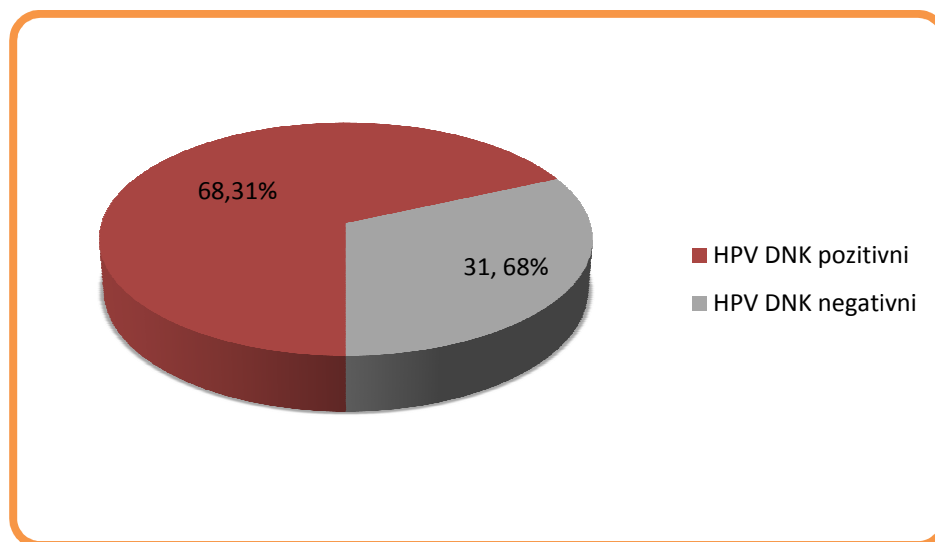
Statistička analiza je pokazala da procenat slaganja ove dve PCR metode iznosi 54,46%. U cilju procene slaganja HPV pozitivnosti, dobijena je kappa ( $\kappa$ ) vrednost od 0,124 koja ukazuje na slabo slaganje.

**Tabela 10. Učestalost HPV DNK u odnosu na L1 i E1 gen HPV PCR**

L1 gen	E1 gen		
	HPV pozitivni uzorci	HPV negativni uzorci	Ukupno:
HPV pozitivni uzorci	23	12	35
HPV negativni uzorci	34	32	66
Ukupno:	57	44	101

#### 4.2.4 Ukupna učestalost HPV DNK (E1 i L1 gena) u uzorcima karcinoma grlića materice

Prisustvo HPV DNK na osnovu dobijenih rezultata izvedene PCR metode za E1 i L1 gen uspešno dokazano je kod ukupno 69 od 101 uzorka (68,31%) (Grafikon 3.).

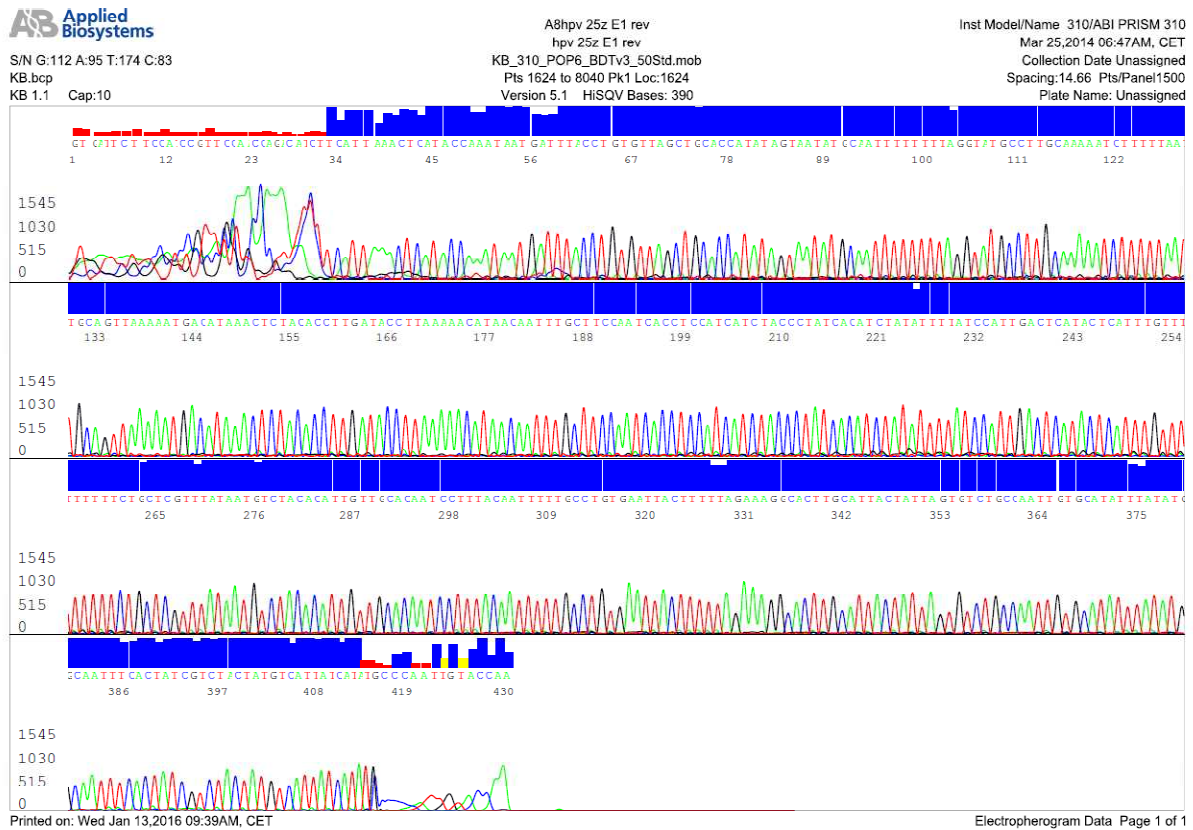
**Grafikon 3. Ukupna učestalost HPV DNK u tkivima karcinoma grlića materice**

4. Rezultati

4.3 HPV genotipizacija metodom DNK sekvenciranja

Primenom tehnike DNK sekvenciranja na ukupno 69 HPV pozitivna uzorka dobijene su 44 nukleotidne sekvence za E1 gen HPV DNK i 9 za L1 gen HPV DNK.

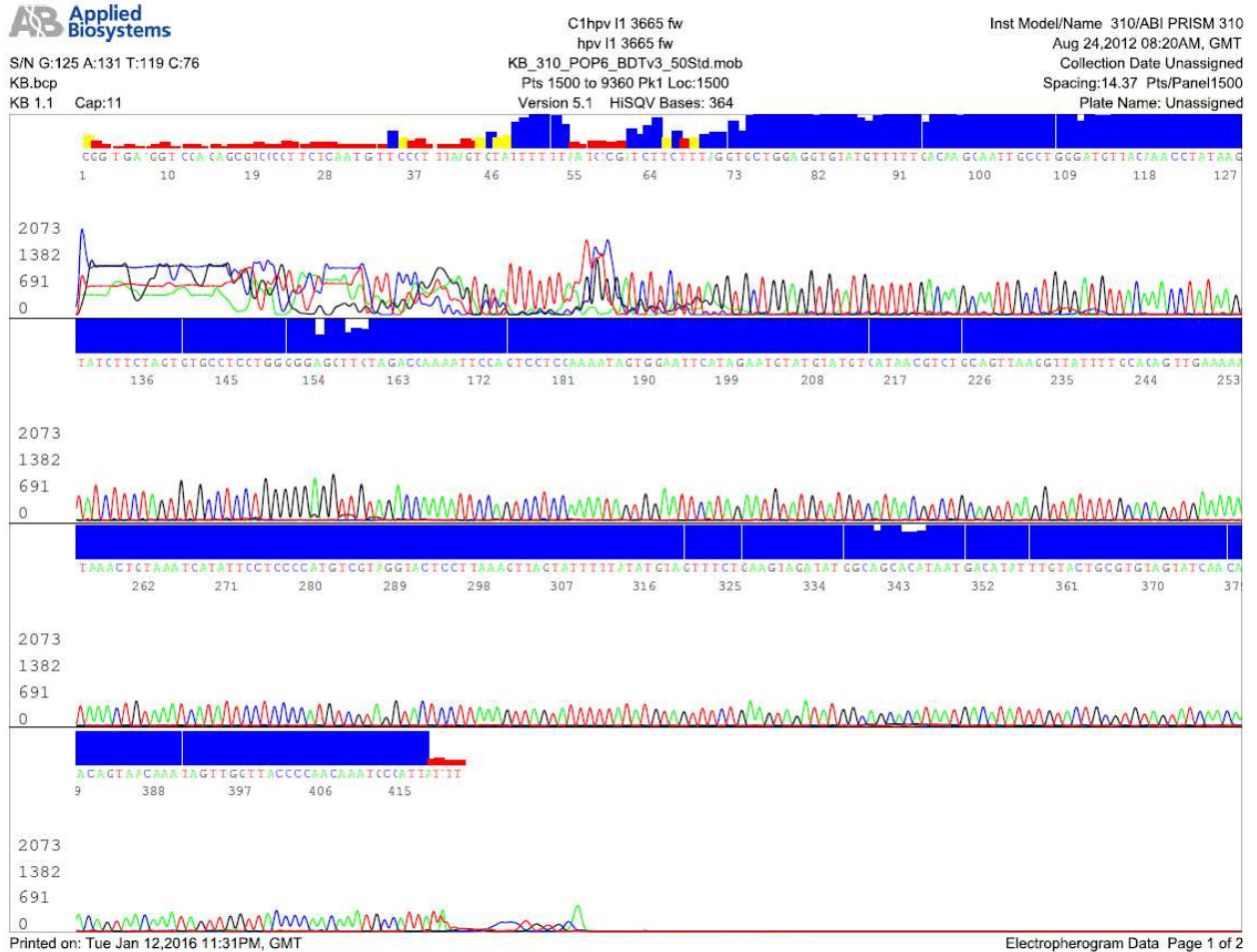
Pri analizi dobijenih elektroferograma, utvrđeno prisustvo pojedinačnih jasnih pikova sekvence E1 gena HPV DNK označavano je kao pojedinačna infekcija (Slika 22.).



**Slika 22. Primer izgleda elektroferograma dobijenom analizom produkta PCR reakcije za E1 gen HPV (uzorak br. 25 z)**

4. Rezultati

Pri analizi dobijenih elektroferograma, utvrđeno prisustvo pojedinačnih jasnih pikova sekvence L1 gena HPV DNK označavano je kao pojedinačna infekcija (Slika 23).



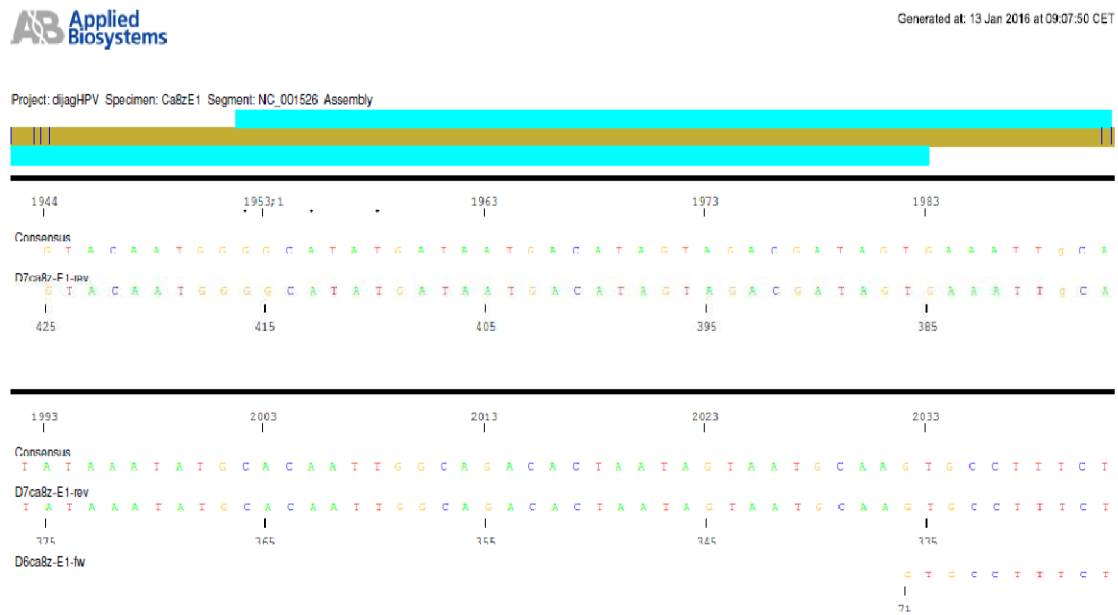
**Slika 23. Primer izgleda elektroferograma dobijenog analizom produkta PCR reakcije za L1 gen HPV (uzorak br. 3665)**

Prisustvo preklapljenih, odnosno dvoznačnih pikova u nukleotidnim sekvencama za E1 i L1 gen HPV izolata ukazivalo je na eventualno postojanje mešovite infekcije sa dva ili više tipova HPV.



4. Rezultati

Svaka dobijena sekvenca u 5' pravcu, kao i reverzno komplementarna sekvenca u 3' pravcu međusobno su upoređene i određena je konsenzus sekvenca korišćenjem SeqScape programskog paketa (Slika 24.)



**Slika 24. Upoređivanje sekvence u 5' i 3' pravcu primenom SeqScape programskog paketa (Uzorak br 8z)**

Dobijene sekvence upoređivane su sa poznatim HPV sekvencama primenom BLAST programa u genskoj bazi podataka GenBank i na osnovu dobijenih rezultata određen je genotip HPV izolata (Slika 25.).

**BLAST** <sup>®</sup> » **blastn suite** » **RID-PURRDTUY015**

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

**Uzorak 3665**

**RID** [PURRDTUY015](#) (Expires on 06-26 00:25 am)

**Query ID** |cl|Query\_27745  
**Description** None  
**Molecule type** nucleic acid  
**Query Length** 431

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human papillomavirus type 16 strain SRB121AK E1 protein (E1) gene, partial cds	797	797	100%	0.0	100%	<a href="#">EU779733.1</a>
Human papillomavirus type 16 strain SRB038AK E1 protein (E1) gene, partial cds	791	791	100%	0.0	99%	<a href="#">EU779711.1</a>

**Alignments**

Human papillomavirus type 16 strain SRB121AK E1 protein (E1) gene, partial cds  
Sequence ID: [gb|EU779733.1|](#) Length: 447 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 431

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
797 bits(431)	0.0()	431/431(100%)	0/431(0%)	Plus/Plus	

Features:

---

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Human papillomavirus type 16 strain SRB121AK E1 protein (E1) gene, partial cds  
Sequence ID: [gb|EU779733.1|](#) Length: 447 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 431 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
797 bits(431)	0.0	431/431(100%)	0/431(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   TGGTACAATGGGCATATGATAATGACATAGTAGACGATAGTGAAATTGCATATAAATATG 60
Sbjct 1   TGGTACAATGGGCATATGATAATGACATAGTAGACGATAGTGAAATTGCATATAAATATG 60
Query 61  CACAATTGGCAGACACTAATAGTAATGCAAGTGCCTTTCTAAAAAGTAATTCACAGGCAA 120
Sbjct 61  CACAATTGGCAGACACTAATAGTAATGCAAGTGCCTTTCTAAAAAGTAATTCACAGGCAA 120
Query 121 AAATTGTAAGGATTGTGCAACAATGTGTAGACATTATAAACGAGCAGAAAAAAAAAAAAAAA 180
Sbjct 121 AAATTGTAAGGATTGTGCAACAATGTGTAGACATTATAAACGAGCAGAAAAAAAAAAAAAAA 180
Query 181  TGAGTATGAGTCAATGGATAAAATATAGATGTGATAGGGTAGATGATGGAGGTGATTGGA 240
Sbjct 181  TGAGTATGAGTCAATGGATAAAATATAGATGTGATAGGGTAGATGATGGAGGTGATTGGA 240
Query 241  AGCAAATTGTTATGTTTTAAAGGTATCAAGGTGTAGAGTTTATGTCATTTTTAACTGCAT 300
Sbjct 241  AGCAAATTGTTATGTTTTAAAGGTATCAAGGTGTAGAGTTTATGTCATTTTTAACTGCAT 300
Query 301  TAAAAAGATTTTTGCAAGGCATACCTAAAAAAAAATTGCATATTACTATATGGTGCAGCTA 360
Sbjct 301  TAAAAAGATTTTTGCAAGGCATACCTAAAAAAAAATTGCATATTACTATATGGTGCAGCTA 360
Query 361  ACACAGGTAATCATTATTGGTATGAGTTTAAATGAAATTTCTGCAAGGGTCTGTAATAT 420
Sbjct 361  ACACAGGTAATCATTATTGGTATGAGTTTAAATGAAATTTCTGCAAGGGTCTGTAATAT 420
Query 421  GTTTTGTAAT 431
Sbjct 421  GTTTTGTAAT 431

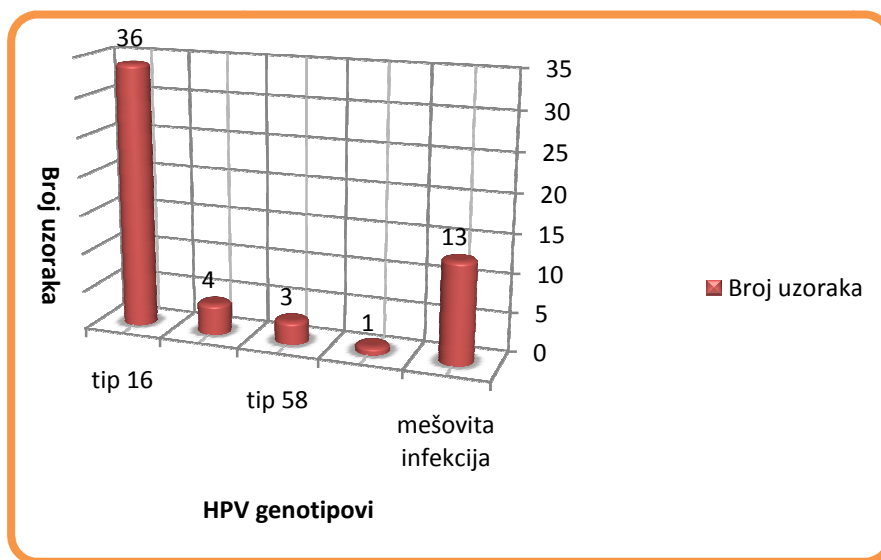
```

**Slika 25. Primer upoređivanja dobijenih sekvenci HPV E1 gena sa poznatim sekvencama HPV E1 gena primenom BLAST programa (uzorak br. 3665)**

### 4.3.1 Rezultati E1 gen HPV genotipizacije metodom DNK sekvenciranja

Sekvenciranje E1 gena HPV uspešno je izvedeno kod 44 od 57 uzoraka, kod kojih je PCR metodom dokazana HPV DNK.

Sekvenciranjem E1 gena HPV DNK pozitivnih uzoraka dokazano je prisustvo 4 genotipa i to HPV 16, 33, 45 i 58. Pokazano je da je najčešći visoko onkogeni genotip 16 (81,81%), a zatim genotip 33 (9,09%), dok su genotipovi 58 i 45 detektovani kod 6,81% odnosno 2,27% uzoraka, respektivno. Prisustvo mešovite infekcije, kod koje nije bilo moguće utvrditi dominantni genotip otkriveno je kod 29,54% ispitivanih uzoraka (Grafikon 4.).



**Grafikon 4. Rezultati sekvenciranja E1 gena HPV DNK**

Na osnovu analize dobijenih rezultata DNK sekvenciranja nespecifičnih produkata PCR reakcije za E1 gen HPV DNK, utvrđeno je da su dobijene sekvence najbližnije humano DNK odnosno hromozomu 16 (Slika 26.).

4. Rezultati

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

AC135950.1	Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2413I9, complete sequence	300	300	34%	4e-78 98%
AC009033.10	Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-140I24, complete sequence	300	300	34%	4e-78 98%

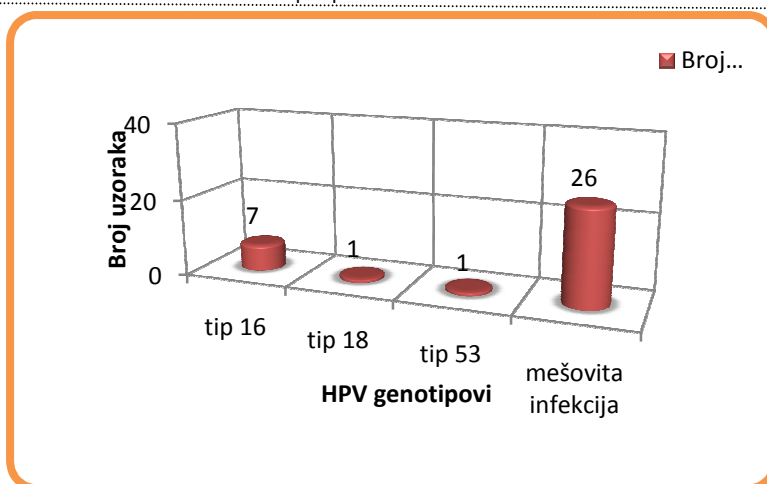
```
>gb|AC135950.1| Homo sapiens chromosome 16 clone CTD-2413I9, complete sequence
Length=99018
Score = 300 bits (162), Expect = 4e-78
Identities = 166/168 (98%), Gaps = 0/168 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 319 AACCATCCACCTCTCCCCATCCTCATGGCACCATCCTGGACTGAACTACCATATTGCCTC 378
          |||
Sbjct 44612 AACCATCCACCTCTCCCCATCCTCATGGCACCATCCTGGACTGAGCTACCATATTGCCTC 44671
Query 379 TTGCCITGGACTACTCCAGGGCCCCCTGTGTTCTTTCTTCTGTCCATCATCCATTCTCTA 438
          |||
Sbjct 44672 TTGCCITGGACTACTCCAGGGCCCCCTGTGTTCTTTCTTCTGTCCATCATCCATTCTCTA 44731
Query 439 CTTCCGAGCCAGAGAGGTTGTGAAAGAGTCACATGAGCTCTAACATAC 486
          |||
Sbjct 44732 CTTCCGAGCCAGAGAGGTTGTGAAAGAGTCAGATGAGCTCTAACATAC 44779
```

*Slika 26. Poređenje sekvenci nespecifičnih produkata PCR reakcije za E1 gen*

4.3.2 Rezultati L1 gen HPV genotipizacije metodom DNK sekvenciranja

Sekvenciranje L1 gena HPV bilo uspešno kod 9 od 35 HPV pozitivna uzorka PCR metodom. Dokazano je prisustvo tri visoko onkogeno HPV genotipa i to 16, 18 i 53.

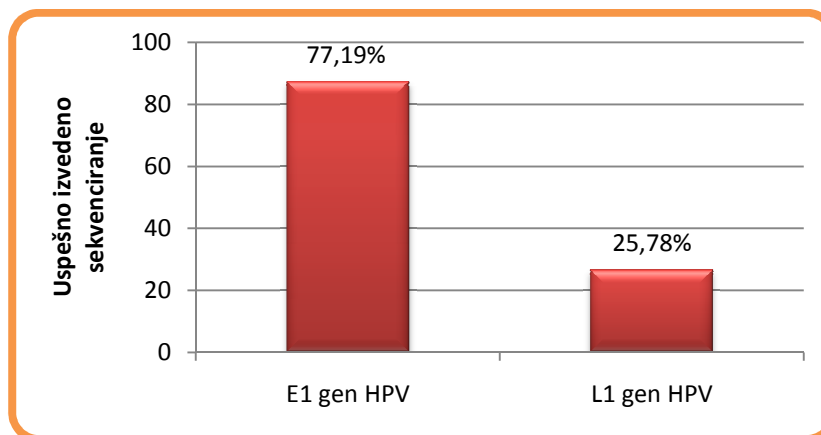
Sekvenciranjem L1 gena HPV DNK pozitivnih uzoraka pokazano je da je najčešći visoko onkogeni genotip 16 (20,0%), dok su genotipovi 18 i 53 detektovani u po jednom od uzoraka tkiva karcinoma grlića materice (2,85%). Kod 26 (74,28%) ispitivanih uzoraka nije bilo moguće utvrditi genotip zbog prisustva preklapajućih pikova u elektroferogramu (Grafikon 5.).



**Grafikon 5. Rezultati sekvenciranja L1 gena HPV DNK**

#### 4.3.3 Ukupna zastupljenost HPV genotipova (E1 i L1 gena) DNK sekvenciranjem

Sekvenciranje E1 gena HPV uspešno je izvedeno kod 44 od 57 uzoraka, kod kojih je detektovana HPV DNK PCR metodom, dok je sekvenciranje L1 gena HPV bilo uspešno kod 9 od 35 PCR HPV pozitivna uzorka (Grafikon 6.).



**Grafikon 6. Procenat uspešnosti sekvenciranja E1 i L1 gena HPV DNK**

## 4. Rezultati

Ukupni rezultati sekvenciranja za oba gena HPV DNK pokazali su prisustvo 6 genotipova sa visokim onkogenim potencijalom: 16, 33, 58, 45, 18 i 53, kod ukupno 47 uzoraka tkiva karcinoma. Kod jednog ispitivanog uzorka tkiva karcinoma grlića materice, uporednom analizom tipova HPV određenih na osnovu analiziranih sekvenci za E1 i L1 gen, utvrđeno je prisustvo mešovite infekcije.

Na osnovu analize dobijenih rezultata DNK sekvenciranja utvrđeno je da je najčešći genotip HPV 16, otkriven kod 38 uzorka tkiva cervikalnog karcinoma (80,85%). Genotipovi HPV 33 i HPV 58 su identifikovani kod 8,51% i 6,38% uzoraka, respektivno, dok su svi ostali otkriveni tipovi u oko 2% svih uzoraka (Tabela 11.).

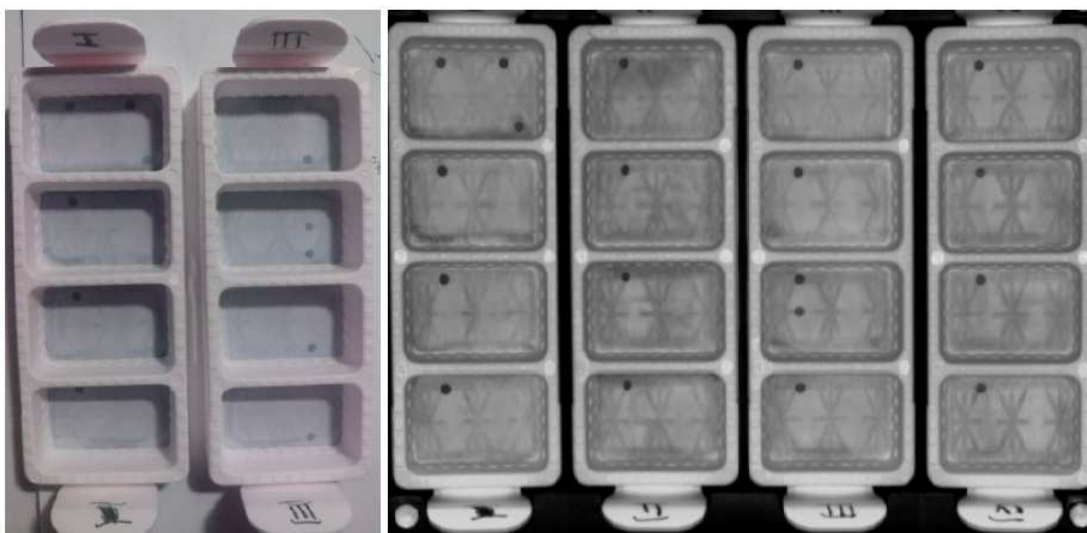
**Tabela 11. Distribucija genotipova HPV u tkivima karcinoma grlića materice**

HPV tip	Filogenetska grupa	n	%
16	Alpha-papillomavirus 9	38	80,85
33	Alpha-papillomavirus 9	4	8,51
58	Alpha-papillomavirus 9	3	6,38
45	Alpha-papillomavirus 7	1	2,12
18	Alpha-papillomavirus 7	1	2,12
53	Alpha-papillomavirus 6	1	2,12
Total		47*	100,00

\* jedan uzorak sa mešovitom infekcijom HPV 16 i HPV 53

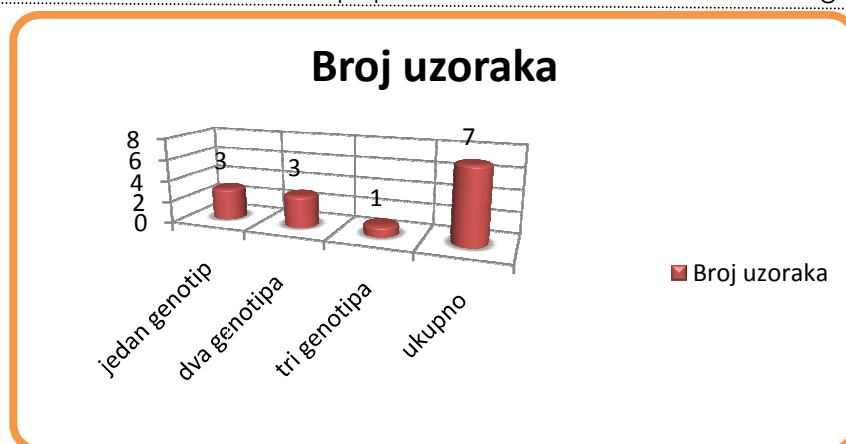
#### 4.4 Dokazivanje i genotipizacija HPV DNK metodom protočne (engl. "Flow through") hibridizacije

Kako je na raspolaganju bio ograničen broj kompleta "GenoFlow HPV array test kit (R2-M)" urađena je protočna hibridizacija za 20 uzoraka izolovane DNK, od kojih je primenom PCR metode detektovana HPV DNK kod 13 uzoraka samo za E1 gen, odnosno kod 6 uzoraka za oba ispitivana gena, dok kod jednog uzorka primenom PCR metode nije detektovana HPV DNK (Slika 27.).



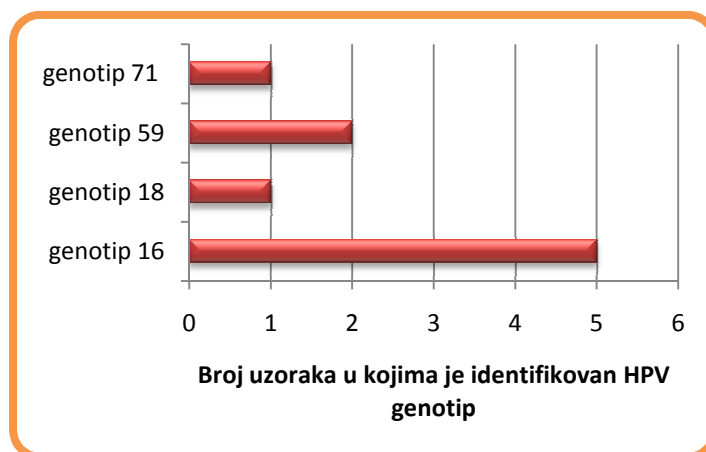
*Slika 27. Izgled dokazivanja i genotipizacije HPV DNK metodom protočne hibridizacije*

Od ukupno ispitivanih 20 uzoraka izolovane DNK, za 7 uzoraka (35,0%) potvrđeno je prisustvo DNK metodom protočne hibridizacije. U pojedinim uzorcima dokazano je prisustvo više od jednog HPV genotipa, što ukazuje na prisustvo mešovite infekcije (Grafikon 7.).



**Grafikon 7. Distribucija uzoraka HPV DNK prema broju tipova određenih metodom protočne hibridizacije**

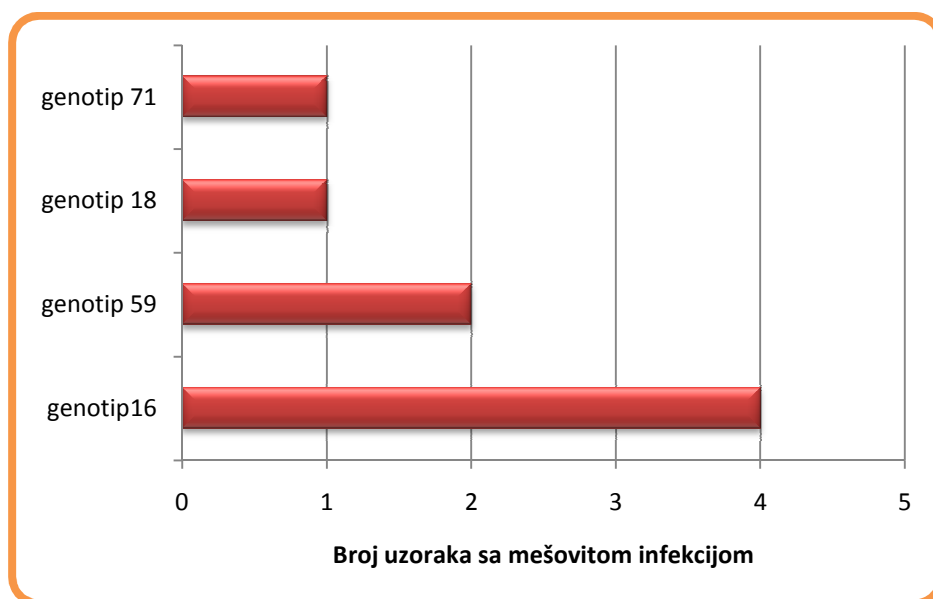
Rezultati genotipizacije metodom protočne hibridizacije pokazali su prisustvo četiri genotipa HPV, bez obzira da li se radilo o pojedinačnoj ili mešovitoj infekciji, od čega tri genotipa visokog onkogenog potencijala (HPV 16, 18, 59) i jednog genotipa niskog onkogenog potencijala (HPV 71) (Grafikon 8.).



**Grafikon 8. Genotipovi HPV identifikovani metodom protočne hibridizacije**



Mešovita infekcija dokazana je kod 4 od 7 (57,14%) analiziranih HPV DNK pozitivnih uzoraka. U odnosu na učestalost pojedinih genotipova HPV kod uzoraka sa detektovanom mešovitom infekcijom, najčešće je identifikovan genotip 16, zatim genotip 59, dok su genotipovi 71 i 18 identifikovani u po jednom HPV DNK pozitivnom uzorku (Grafikon 9.).



**Grafikon 9. Zastupljenost HPV tipova kod uzoraka sa mešovitom infekcijom**

#### **4.5 Uporedna analiza HPV genotipizacije metodom DNK sekvenciranja metodom protočne (engl. "Flow through") hibridizacije**

Na osnovu poređenja rezultata PCR metode sa rezultatima metode protočne hibridizacije, utvrđeno je da se, osim za jedan uzorak, radilo o uzorcima kod kojih je dokazana pozitivnost E1 gena PCR metodom.

4. Rezultati

Od dva ispitivana uzorka kod kojih je metodom protočne hibridizacije utvrđeno prisustvo mešovite infekcije, kod jednog metodom sekvenciranja DNK nije dobijen rezultat genotipizacije, a kod jednog prisustvo HPV DNK nije ni detektovano PCR metodom (Tabela 12.).

Uspešna identifikacija genotipova HPV izvedena je kod 7 uzoraka, primenom obe metode. Kod tri ispitana uzorka metodom protočne hibridizacije potvrđeno je prisustvo jednog genotipa HPV utvrđeno primenom DNK sekvenciranja. Takođe, za dva ispitana uzorka prisustvo mešovite infekcije utvrđeno DNK sekvenciranjem, potvrđeno je metodom protočne hibridizacije (Tabela 12.).

**Tabela 12. Uporedna analiza rezultata genotipizacije HPV DNK sekvenciranjem i protočnom hibridizacijom**

<i>Evidencioni broj uzorka</i>	<i>PCR HPV E1</i>	<i>PCR HPV L1</i>	<i>Genotipizacija E1 gen</i>	<i>Diagcore GenoFlow HPV Array</i>
11324	P	N	tip 16	tip 16
1Z	P	N	tip16 mešovita	tipovi 59/71
2Z	P	N	tip16	tipovi 16/18
5Z	P	N	tip 16	tip 16
7Z	P	N	mešovita	tip 16
36Z	P	N	tip 16-mešovita	tipovi 16/59
29Z	N	N	/	tipovi 16/59

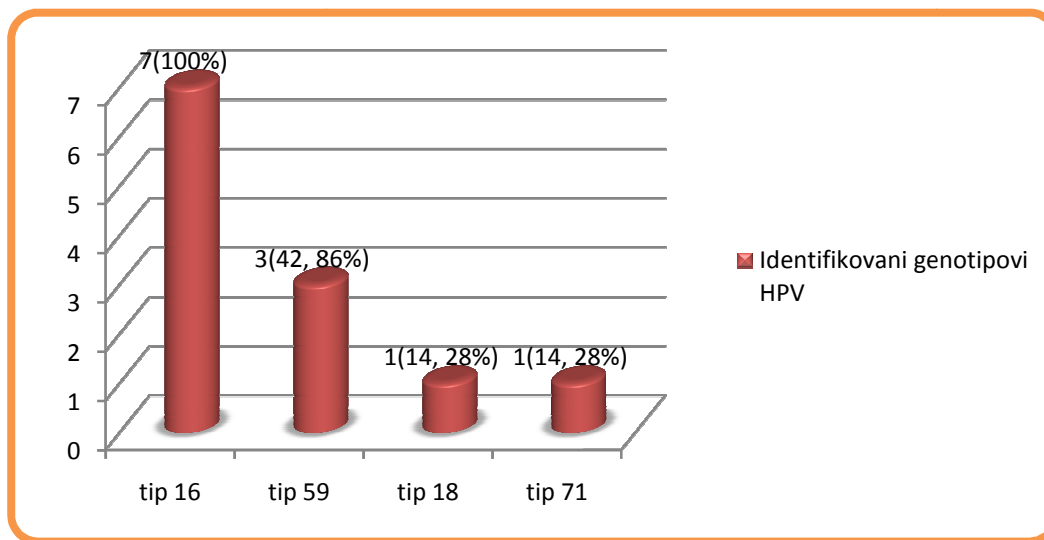
P - pozitivan rezultat PCR metode

N -negativan rezultat PCR metode

/-negativan rezultat DNK sekvenciranja

4. Rezultati

Primenom obe metode genotipizacije utvrđeno je prisustvo četiri genotipa HPV HPV (16, 59, 18, 71) u ispitivanim uzorcima tkiva karcinoma grlića materice. Najzastupljeniji je bio HPV 16, prisutan u svim uzorcima u kojima je izvedena uspešna genotipizacija, zatim po učestalosti sledi HPV 59, dok su ostala dva tipa dokazana u manjem broju uzoraka (Grafikon 10.).



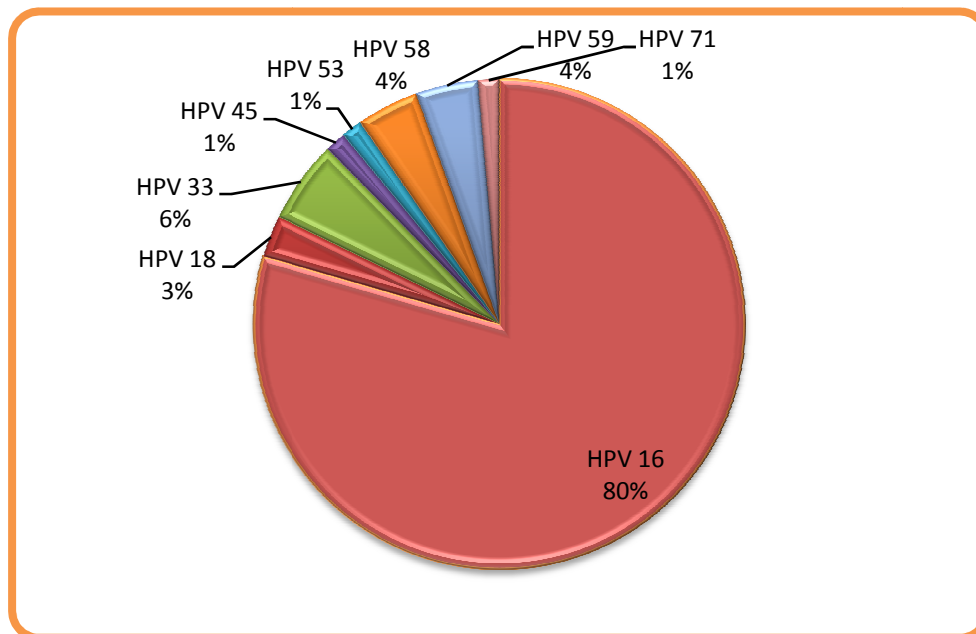
**Grafikon 10. Učestalost HPV genotipova identifikovanih metodom DNK sekvenciranja i protočne hibridizacije**

Rezultati genotipizacije primenom obe metode su se samo razlikovali kod jednog uzroka, gde je sekvenciranje pokazalo prisustvo tipa 16 a hibridizacija prisustvo HPV tipova 59 i 71.

**4.5.1 Ukupni rezultati HPV genotipizacije primenom obe metode**

Od ukupno 101 uzorka primenom obe tehnike identifikacije genotipa HPV (DNK sekvenciranje i protočna hibridizacija), HPV genotipizacija je urađena kod 49 uzoraka tkiva karcinoma.

Ukupno je dokazano prisustvo osam genotipova HPV: 16, 18, 33, 45, 53, 58, 59 i 71 (Grafikon 11.). Sedam HPV genotipova pripada grupi visoko onkogenih tipova, dok samo HPV 71 pripada grupi nisko onkogenih genotipova. Prisustvo mešovite infekcije potvrđeno je primenom obe metode kod 5 uzoraka (4,95%).



**Grafikon 11. Genotipovi HPV identifikovani metodom DNK sekvenciranja i protočne hibridizacije**

#### **4.6 Povezanost genotipova HPV sa godinama starosti pacijentkinja, stadijumom i patohistološkim tipom karcinoma grlića materice**

Od ukupno ispitanog 101 uzorka tkiva karcinoma grlića materice fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafinu HPV genotipovi su određeni kod 49 uzoraka.

Prema godinama starosti, pacijentkinje su grupisane na pacijentkinje  $\leq 40$  i starije od 40 godina, pri čemu je većina ispitivanih uzoraka (79,59%) bila od pacijentkinja starijih od 40 godina. Iako je veći broj HPV genotipova sa visokim onkogenim potencijalom određen u starosnoj grupi preko 40 godina, statistički značajna povezanost distribucije HPV genotipova i godina starosti nije potvrđena (Tabela 13.).

Stadijum oboljenja utvrđen je za sve uzorke kod kojih je određen genotip HPV, pri čemu je najviše uzoraka pripadalo Stadijumu I prema FIGO klasifikaciji (32 od 49). Statistički značajna povezanost između distribucije HPV genotipova sa visokim onkogenim potencijalom i stadijuma oboljenja nije utvrđena (Tabela 13.).

Genotipovi HPV sa visokoonkogenim potencijalom identifikovani su kod 46 uzoraka planocelularnog i 3 uzorka adenokarcinoma. HPV 16 identifikovan je u 80,43% planocelularnih i 66,7% adenokarcinoma. Drugi genotipovi sa visokim onkogenim potencijalom dokazani su u većem procentu u tkivima planocelularnog karcinoma, ali statistička povezanost između distribucije visoko onkogenih genotipova HPV sa histološkim tipom karcinoma grlića materice nije utvrđena (Tabela 13.).

Dalja podela karcinoma grlića materice, izvršena je prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), na nekeratinizujuće i keratinizujuće planocelularne, adenokarcinome i adenoskvamozne karcinome. Najveći broj uzoraka kod kojih su identifikovani genotipovi HPV sa visokim onkogenim potencijalom pripadao je grupi nekeratinizujućih planocelularnih karcinoma (28 od 49).

Najčešće identifikovani HPV genotip bio je HPV 16 u svim navedenim histološkim grupama karcinoma grlića materice, izuzev adenoskvamoznog karcinoma. Drugi HPV genotipovi identifikovani su uglavnom u grupi nekeratinizujućih planocelularnih karcinoma (Tabela 13.). Statistička analiza nije pokazala značajnu povezanost između distribucije HPV genotipova visokog onkogenog potencijala i histoloških tipova karcinoma grlića materice (Tabela 14.).

**Tabela 13. Distribucija HPV genotipova visokog onkogenog potencijala i filogenetskih grupa prema starosti pacijenata, stadijumu i histološkom tipu karcinoma grlića materice**

Genotipovi				Filogenetska klasifikacija			
Osobine	n	Tip 16	Ostali	Alphapapillomavirus	Alphapapillomavirus 7	Alphapapillomavirus 9	
				6 (53)*	(18+45+59)*	(16+58+33)*	
<b>Total</b>	49	39	10	1	6	47	
<b>Stadijum</b>							
I	32	26	6	1	3	31	
II	17	13	4	0	3	16	
				p=0,721			p=0,776
<b>Starost</b>							
≤40	10	8	2	1	2	13	
>40	39	31	8	0	4	34	
				p=1,000			p=0,409
<b>Histologija</b>							
Planocelularni	46	37	9	1	6	44	
Adenokarcinom	3	2	1	0	0	3	
				p=1,000			p=1,000
<b>Histologija</b>							
Keratinizujući	18	15	3	1	3	17	
Nekeratinizujući	28	22	6	0	3	27	
Adenokarcinom	2	2	0	0	0	2	
Adenoskvamozni	1	0	1	0	0	1	
				p=1,000			p=0,500
				p=0,333			p=1,000

\* pet uzoraka sa mešovitom infekcijom

**Tabela 14. Distribucija HPV genotipova po histološkom tipu karcinoma grlića materice**

Histološki tip	Genotipovi HPV visokog onkogenog potencijala						
	16	33	58	45	18	53	59
Keratinizujuć	16	0	1	0	1	1	2
Nekeratinizujuć	22	3	2	1	1	0	1
Adenokarcinom	2	0	0	0	0	0	0
Adenoskvamozni karcinom	0	1	0	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>40</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

Osim toga, šest HPV genotipova visokog onkogenog potencijala identifikovanih u ovom istraživanju, statifikovani su u sledeće filogenetske kategorije, tzv. klaster: *Alphapapillomavirus* 6 (tip 53), *Alphapapillomavirus* 7 (tipovi 18, 45 i 59) i *Alphapapillomavirus* 9 (tipovi 16, 33 i 58). Genotipovi HPV koji pripadaju klasteru 9 bili su najučestaliji u uzorcima karcinoma grlića materice (47 od 49), kao i u grupi nekeratinizujućih planocelularnih karcinoma (Tabela 13.). Statistički značajna povezanost filogenetskih klastera, starosti pacijentkinja, stadijuma bolesti i histološkog tipa karcinoma grlića materice nije potvrđena (Tabela 13.).

#### 4.7 Genotipska varijabilnost - Filogenetska analiza HPV izolata

Filogenetska analiza je izvedena za 44 HPV izolata E1 gena, 9 HPV L1 gena i 3 E6 gena HPV 16. Konstrukcija filogenetskih stabala izvedena je pomoću MEGA 6.0 programskog paketa, zasnovano na sekvenciranim regijama gena E1 od 384 bp, L1 gena od 406 bp i E6 gena od 574 bp, u koja su uključeni i referentni HPV sojevi.

Filogenetska stabla konstruisana su upotrebom Maximum likelihood, (ML) Neighbor-joining (NJ) i maximum parsimony (MP) metoda. Primena sva tri navedena metoda dala je usaglašene rezultate grananja stabala. Potvrda značaja filogenetskih odnosa izvedena je butstrep (engl. bootstrap) analizom sa 500 ponavljanja.

#### **4.7.1 Filogenetska analiza genotipova na osnovu sekvenci HPV E1 gena**

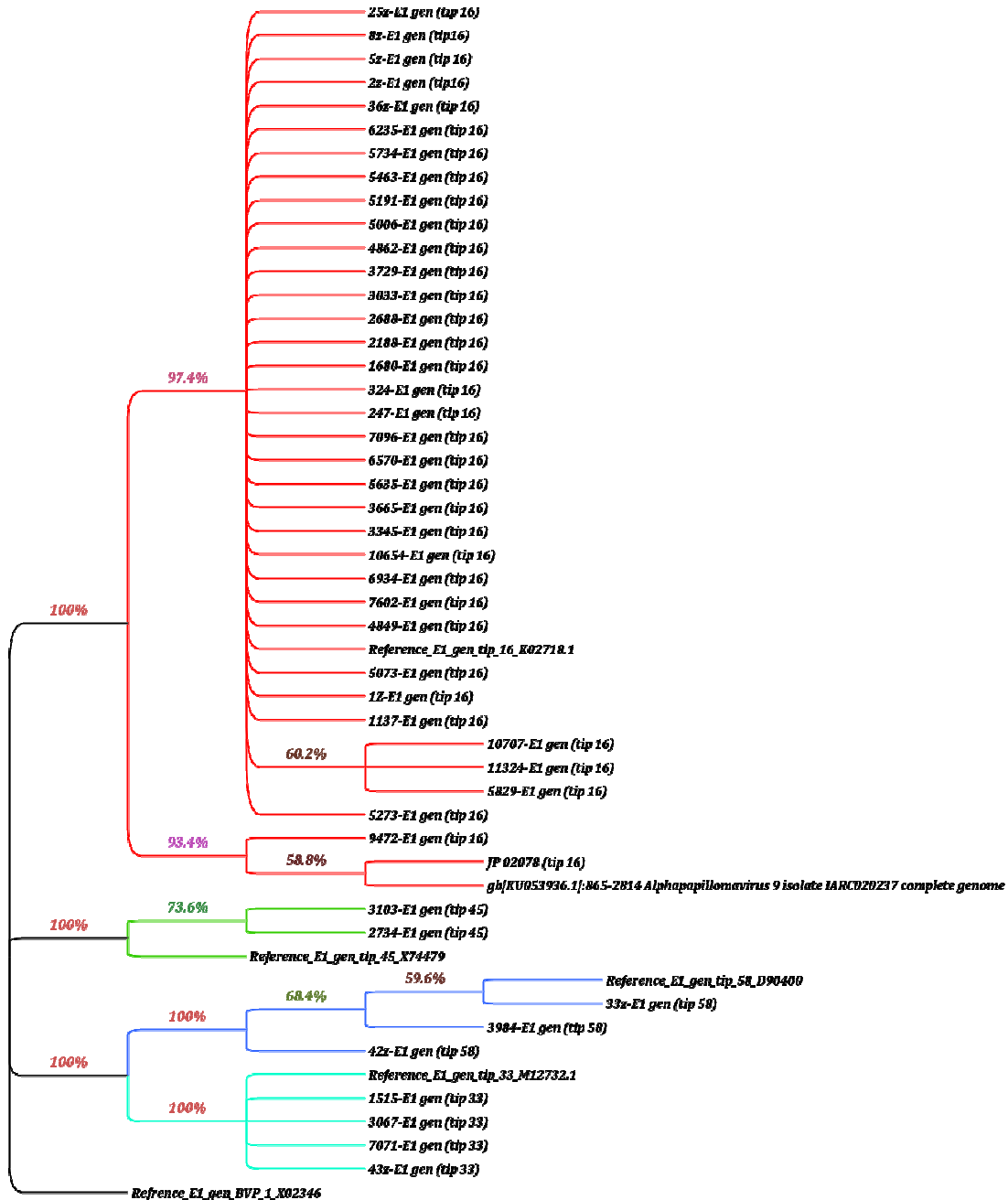
Korišćenjem programa MEGA 6.0 utvrđeno je da je najadekvatniji model za konstrukciju filogenetskog stabla identifikovanih HPV E1 sekvenci bio T92+I.

Filogenetska analiza HPV E1 izolata pokazala je da svi identifikovani HPV genotipovi u ispitivanoj populaciji žena pripadaju rodu *Alpha-papillomavirus*.

Na osnovu filogenetske analize HPV E1 sekvenci potvrđena je pripadnost identifikovanih HPV E1 izolata odgovarajućim HPV genotipovima sa visokim butstrep vrednostima i to filogenetskoj grupi 9 (HPV genotipovi 16, 33, 58) kao i filogenetskoj grupi 7 (HPV genotip 45) (Slika 26.).

Analizom genske udaljenosti je pokazano da su nukleotidne distance bile u okviru očekivanog raspona među genotipovima i u okviru istog tipa. Nukleotidna udaljenost između sekvenci istog genotipa je bila na nivou varijante i iznosila je od 0-1% (Tabela 15. i 16.). Najveća nukleotidna udaljenost utvrđena za uzorak broj 9472, koji se zajedno sa izolatima JP02078 i gb|KU053936.1, izdvojio kao zasebna grana HPV tipa 16 na filogenetskom stablu (Slika 28.).





Slika 28. ML Filogenetsko stablo HPV E1 izolata u odnosu na referentne HPV genotipove iz roda Alpha-papillomavirus (brojevi unutar stabla označavaju butstrep vrednosti, navedene su vrednosti veće od 50%)

**Tabela 15. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih HPV E1 izolata genotipa HPV 16 u odnosu na referentni genotip K02718.1**

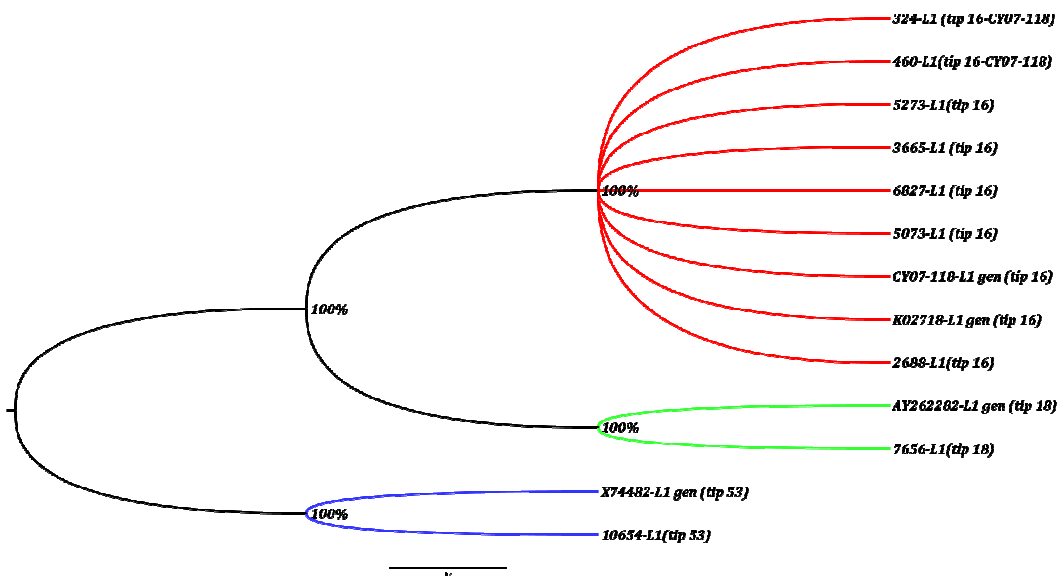
K02718.1-(tip16)-Referentni genotip	5073	4849	9472	7602	6934	11324	10654	10707	3345	
	0,00	0,00	0,0215	0,00	0,00	0,0053	0,00	0,0026	0,00	
	3665	5273	5635	5829	6570	7096	247	324	1137	
	0,00	0,0026	0,00	0,0026	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0026	
	1680	2188	2688	3033	3729	4862	5006	5191	5463	
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	5734	6235	36z	2z	5z	25z	8z	10694	JP02078	gb KU05393 6.1
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0188	0,0215

**Tabela 16. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih HPV E1 izolata genotipova HPV 33, HPV 58 i HPV 45 u odnosu na referentni genotip**

	M12732.1- (tip33)	1515 -(tip33)	3067-(tip33)	7071-(tip33)	43z-(tip33)	D90400- (tip58)	3984- (tip58)	33z-(tip58)	42z-(tip58)	X74479- (tip45)	3103- (tip45)	2734-(tip45)
M12732.1- (tip33)												
1515 -(tip33)	0,00											
3067-(tip33)	0,00	0,00										
7071- (tip33)	0,00	0,00	0,00									
43z- (tip33)	0,00	0,00	0,00	0,00								
D90400- (tip58)	11,28	11,28	11,28	11,28	11,28							
3984- (tip58)	11,28	11,28	11,28	11,28	11,28	0,0026						
33z-(tip58)	11,28	11,28	11,28	11,28	11,28	0,00	0,0026					
42z-(tip58)	11,28	11,28	11,28	11,28	11,28	0,0026	0,0053	0,0026				
X74479- (tip45)	24,67	24,67	24,67	24,67	24,67	24,33	24,31	24,32	24,31			
3103- (tip45)	24,69	24,69	24,69	24,69	24,69	24,33	24,32	24,33	24,32	0,0026		
2734-(tip45)	24,69	24,69	24,69	24,69	24,69	24,33	24,32	24,33	24,32	0,0026	0,00	

#### 4.7.2 Filogenetska analiza genotipova na osnovu sekvenci HPV L1 gena

Filogenetskom analizom HPV L1 sekvenci potvrđena je pripadnost identifikovanih HPV L1 izolata odgovarajućim HPV genotipovima sa visokim butstrep vrednostima i to filogenetskoj grupi 9 (HPV genotip 16), filogenetskoj grupi 6 (HPV genotip 53), kao i filogenetskoj grupi 7 (HPV genotip 18) (Slika 29.).



**Slika 29. ML Filogenetsko stablo HPV L1 izolata u odnosu na referentne HPV genotipove iz roda Alpha-papillomavirus-najadekvatniji model za konstrukciju stabla bio je T92- (brojevi unutar stabla označavaju butstrep vrednosti, navedene su vrednosti veće od 60)**

Na osnovu analize genske udaljenosti pokazano je da su nukleotidne distance u okviru očekivanog raspona za HPV genotipove 16, 18 i 53, dok su među genotipovima utvrđene nukleotidne udaljenosti bile na nivou varijante i iznosile su između 0-1% (Tabela 17a i 17b).

**Tabela 17 a. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih HPV L1 izolata genotipova HPV 16, u odnosu na referentni genotip**

	K02718- (HPV16)	CY07-118- (HPV16)	5073	6827	3665	5273	324	460	2688
K02718-(HPV16)									
CY07-118-(HPV16)	0.00								
5073	0.00	0.00							
6827	0.00	0.00	0.00						
3665	0.00	0.00	0.00	0.00					
5273	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
324 - (CY07-118)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
460 - (CY07-118)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
2688	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

**Tabela 17 b. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih HPV L1 izolata genotipova HPV 53 i HPV 18 u odnosu na referentni genotip**

		X74482 (HPV 53)	7656 (HPV 18)	10654 (HPV 53)
AY262282-(HPV 18)				
X74482-(HPV 53)	0.4653			
7656-(HPV 18)	0.0000	0.4653		
10654-(HPV 53)	0.4653	0.0000	0.4653	

#### 4.8 Intragenotipska varijabilnost - Filogenetska analiza HPV izolata

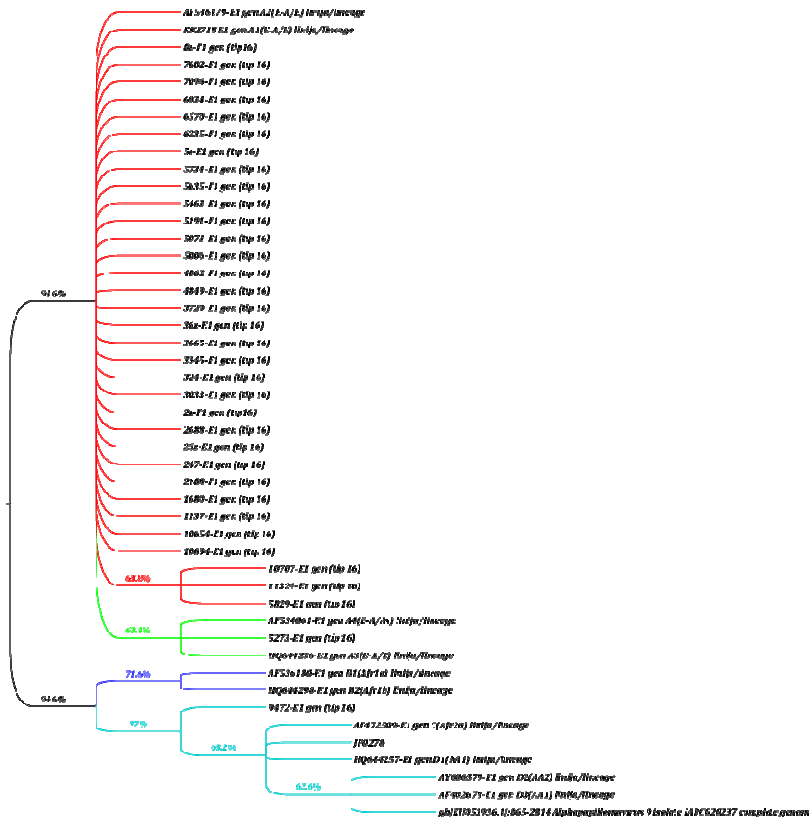
U cilju utvrđivanja intragenotipske varijabilnosti urađena je filogenetska analiza dobijenih izolata HPV tip 16 (E1, L1 i E6/E7 gena), tipa 33 i 58 (E1 gen), pri čemu je utvrđeno da je najadekvatniji model za konstrukciju filogenetskog stabla bio T92. Na

osnovu identifikovanih HPV izolata konstruisana su filogenetska stabla sa ustanovljenim geografskim linijama i podlinijama iz literature.

#### 4.8.1 Intragenotipska varijabilnost dobijenih HPV 16 izolata

##### a) Filogenetska analiza HPV 16 E1 izolata

Filogenetska analiza dobijenih HPV 16 E1 izolata je pokazala da je najveći broj analiziranih izolata pokazao je usklađenost sa A1 i A2 evropskim podlinijama, pri čemu su se izolati 11324, 10707 i 5829 su se izdvajali kao zasebna grana (Slika 30.).



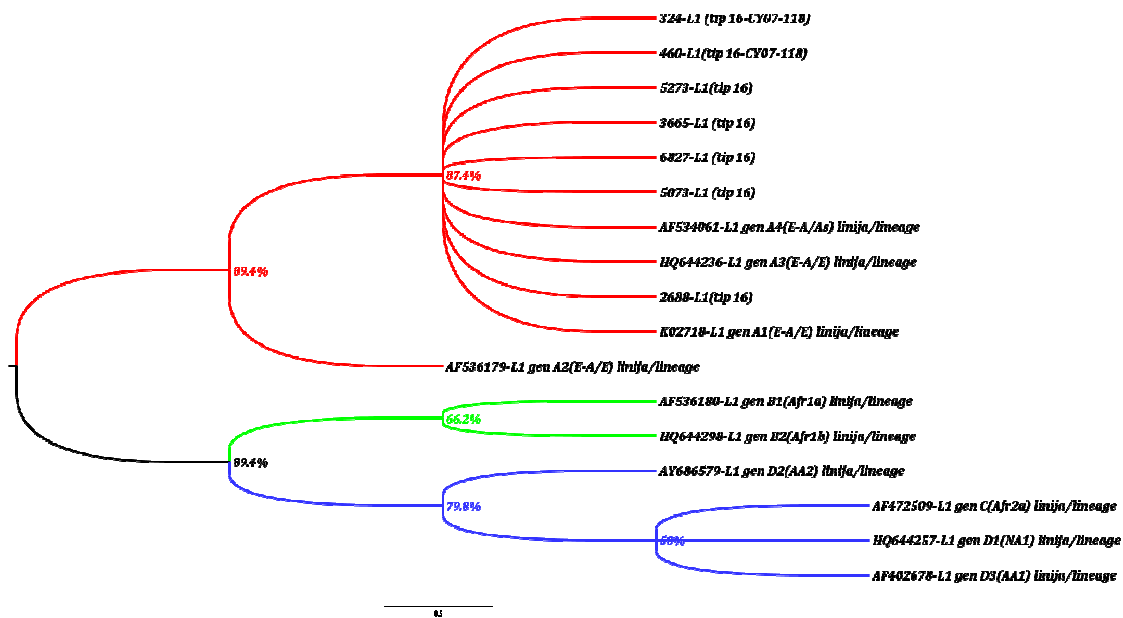
**Slika 30. ML Filogenetsko stablo HPV 16 E1 izolata u odnosu na referentne HPV genotipove linija i podlinija (brojevi unutar stabla označavaju butstrep vrednosti, navedene su vrednosti veće od 60)**

Izolat 5273 pokazao usklađenost sa A3 i A4 evro-azijskim podlinijama. Izolat 9472 se izdvojio kao zasebna grana sa najvećom sličnosti sa afričkom linijom C (Slika 28.).

Na osnovu analize genske udaljenosti utvrđeno je da su nukleotidne distance bile u okviru očekivanog za podlinije i unutar pojedine linije i kretale su se od 0-0,5%. (Tabela 18. data u prilogu).

## B) Filogenetska analiza HPV 16 L1 izolata

Urađena je i filogenetska analiza dobijenih HPV 16 L1 izolata i konstruisana su filogenetska stabla sa ustanovljenim geografskim linijama i podlinijama iz literature (Slika 31.)



**Slika 31. ML Filogenetsko stablo HPV L1 izolata u odnosu na referentne HPV genotipove linija i podlinija-najadekvatniji model za konstrukciju stabla bio je T92-(brojevi unutar stabla označavaju butstrep vrednosti, navedene su vrednosti veće od 60)**

Svi analizirani izolati pokazali su usklađenost sa A1, A3 i A4 podlinijama, HPV 16 evro-azijske linije A. Na osnovu analize nukleotidne udaljenosti, dobijene su vrednosti koje su ukazivale na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante sa nukleotidnom distancom manjom od 0,5% (Tabela 19.).

**Tabela 19. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih izolata HPV L1 gena genotipa HPV 16, u odnosu na referentne podlinije A4 i A3 HPV 16**

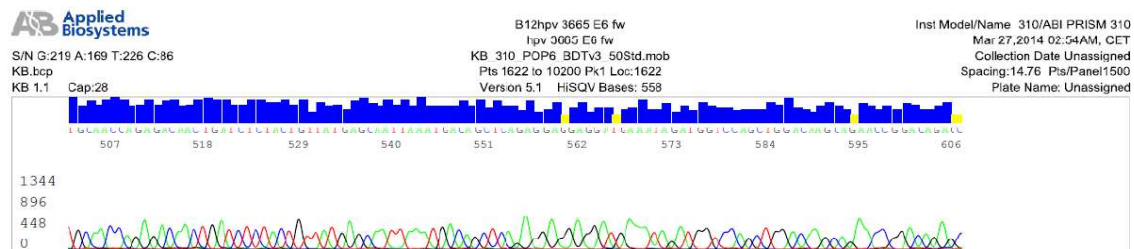
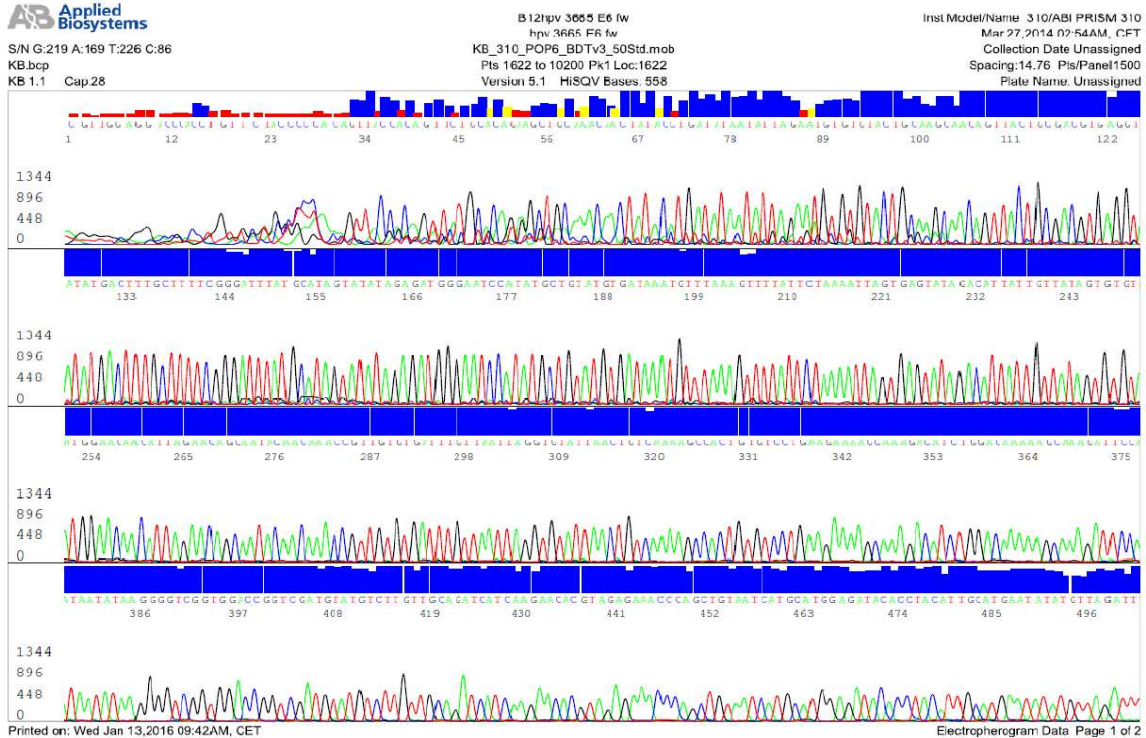
	HQ644236-A3(E-A/E) linija	AF534061-A4(E-A/As) linija	5073	6827	3665	5273	324	460	2688
HQ644236-A3(E-A/E) linija									
AF534061-A4(E-A/As) linija	0,0024								
5073	0,0024	0,0000							
6827	0,0024	0,0000	0,0000						
3665	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000					
5273	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000				
324	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000			
460	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		
2688	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	

### C) Filogenetska analiza HPV 16 E6/E7 izolata

Uzorci kod kojih je metodom DNK sekvenciranja određen genotip 16 HPV, dodatno su obrađivani PCR metodom za detekciju E6/E7 gena veličine 735bp. Ovom metodom, dobijeno je 6 (17,65%) pozitivnih od ukupno 36 uzoraka kod kojih je metodom DNK sekvenciranja potvrđen genotip 16 HPV.



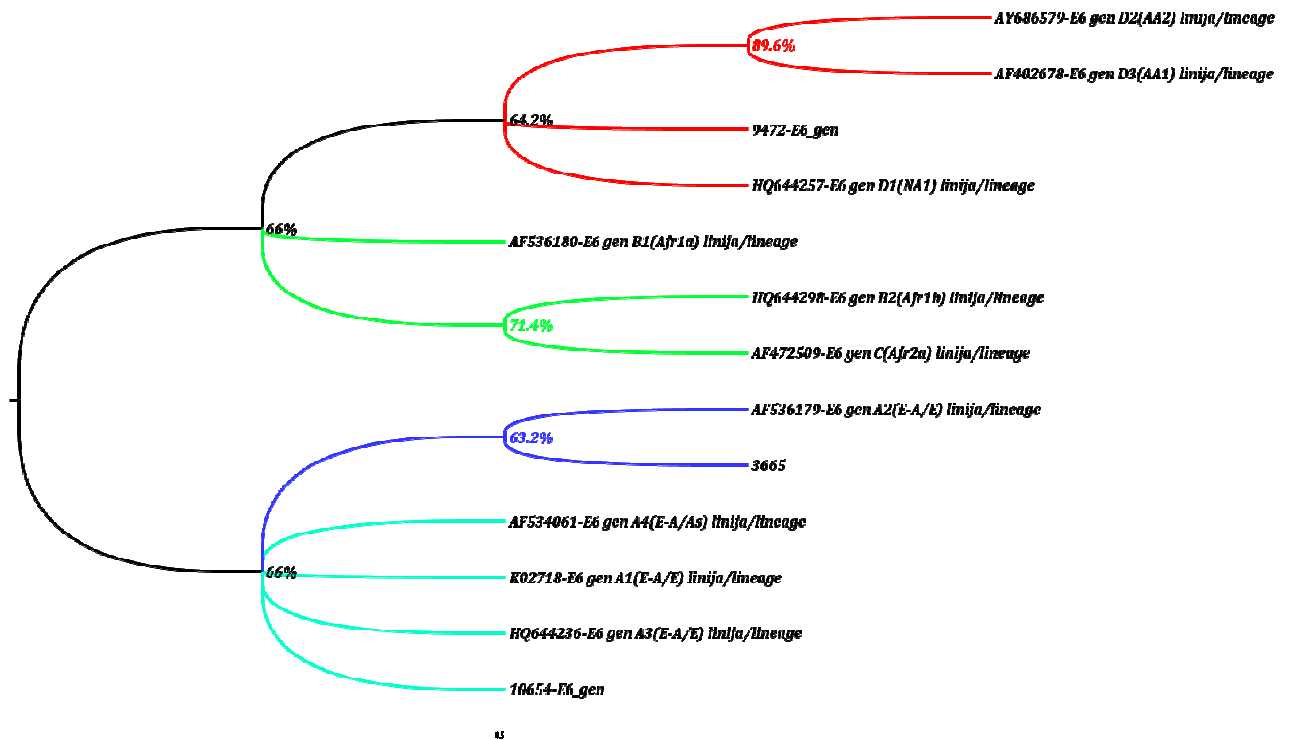
Uzorci kod kojih je dokazan E6/E7 gen HPV 16 DNK su analizirani metodom DNK sekvenciranja i dobijeni rezultati su predstavljeni u vidu elektroferograma (Slika 32.).



**Slika br. 32. Primer izgleda elektroferograma dobijenog analizom produkta PCR reakcije specifične za E6/E7 gen HPV 16 (uzorak br. 3665)**

Sekvence E6/E7 gena su određene za 3 od ukupno šest PCR E6/E7 pozitivnih uzoraka, i upotrebljene su za konstrukciju filogenetskog stabla. Filogenetska analiza ispitivanih izolata pokazala je usklađenost izolata 3665 i 10654 sa evropskom linijom

A, odnosno sa podlinijom A2 i A3, respektivno, dok je izolat 9472 pokazao usklađenost sa podlinijom D1 severnoameričko/azijsko-američke linije D (Slika 33.).



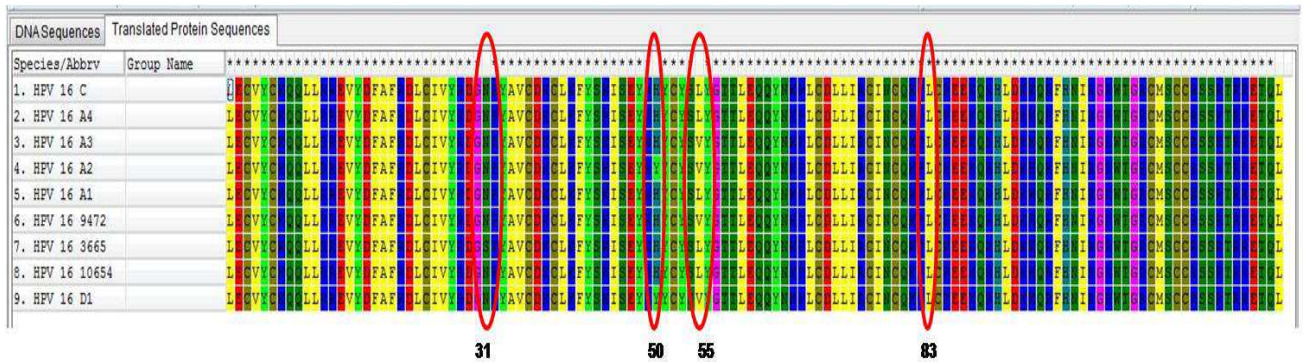
**Slika br. 33 ML Filogenetsko stablo HPV E6/7 izolata u odnosu na referentne HPV genotipove linija i podlinija-najadekvatniji model za konstrukciju stabla bio je T92- (brojevi unutar stabla označavaju butstrep vrednosti, navedene su vrednosti veće od 60)**

Na osnovu analize nukleotidne udaljenosti, dobijene su vrednosti od 0-0,5%, koje su ukazivale varijabilnost na nivou varijante (Tabela 20.).

**Tabela 20. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih HPV izolata E6 gena genotipa HPV 16, u odnosu na referentne linije i podlinije HPV 16 (najniže vrednosti označene su sivom bojom)**

	K02718-A1(E-A/E) linija	AF536179- A2(E-A/E) linija	HQ644257- D1(NA1) linija	9472	10654	3665
K02718-A1(E-A/E) linija						
AF536179- A2(E-A/E) linija	0,0018					
HQ644257- D1(NA1) linija	0,0070	0,0053				
9472	0,0070	0,0053	0,0000			
10654	0,0000	0,0018	0,0070	0,0070		
3665	0,0018	0,0000	0,0053	0,0053	0,0018	

Analizom proteinskih sekvenci HPV16 E6/E7 gena dobijenih izolata, utvrđeno je postojanje razlika u aminokiselinskoj sekvenci na pozicijama 31, 50, 55 (Slika br. 34).



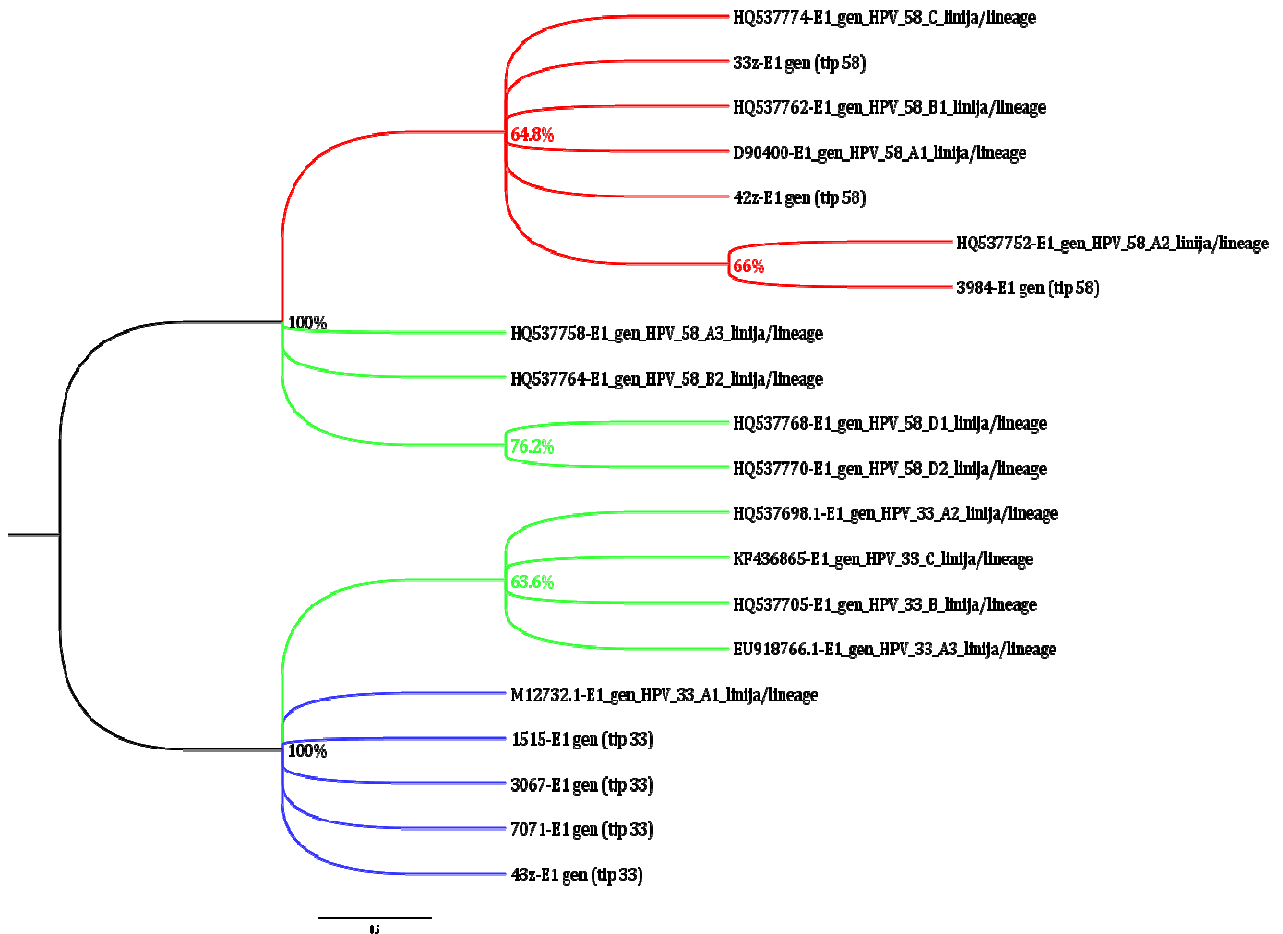
**Slika br. 34. Varijabilnost identifikovanih aminokiselinskih sekvenci E6/7 proteina**

Izolat 3665 je imao zamenu N31S (asparagin/serin) koja se razlikovala u odnosu na sve ostale izolate kao i geografske podlinije. Izolat 9472 je imao zamenu L55V (leucin/valin), što je slično evropskim linijama A2 i A3, kao i američkoj liniji D1. Dobijeni izolati u ovom istraživanju nisu imali zamenu L83V (leucin/valin), odnosno T350G.

#### 4.8.2 Intragenotipska varijabilnost dobijenih HPV 33 i 58 izolata

Izvedena je filogenetska analiza za izolate sa genotipovima HPV 33 i HPV 58 i to na nivou E1 gena.

Svi izolati HPV 33 pokazali su usklađenost sa evropskom podlinijom A1 HPV 33. Kod izolata HPV 58 utvrđena je usklađenost sa dve različite linije u okviru ovog genotipa i dve podlinije u okviru linije A, genotipa HPV 58, najzastupljenije u svetu. Izolat 4z bio je usklađen sa podlinijom A1, izolat 3984 bio je usklađen sa podlinijom A2, dok je izolat 33z bio usklađen sa linijom C genotipa HPV 58 (Slika br. 35).



**Slika br. 35. ML Filogenetsko stablo HPV 33 i HPV58 E1 izolata u odnosu na referentne HPV genotipove linija i podlinija (brojevi unutar stabla označavaju butstrep vrednosti, navedene su vrednosti veće od 60)**

Na osnovu analize genske udaljenosti utvrđeno je da su nukleotidne distance bile u na nivou varijante (nukleotidna distanca 0-0,5%) u okviru podlinije i unutar pojedine linije genotipova HPV 33 i HPV 58 (Tabela 21.).

**Tabela 21. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih izolata HPV E1gena genotipa HPV 33 i HPV 58 u odnosu na referentne linije i podlinije**

	M12732.1-HPV 33 A1 linija	D90400-HPV 58 A1 linija	HQ537752-HPV 58 A2 linija	HQ537774-HPV 58 C linija	1515-(HPV 33)	3067-(HPV 33)	7071-(HPV 33)	43z-(HPV 33)	3984-(HPV 58)	33z-(HPV 58)	42z-(HPV 58)
M12732.1-HPV 33 A1 linija											
D90400-HPV 58 A1 linija	8.72										
HQ537752-HPV 58 A2 linija	8.73	0.0024									
HQ537774-HPV 58 C linija	8.72	0.0000	0.0024								
1515-(HPV 33)	0.00	8.72	8.7339	8.72							
3067-(HPV 33)	0.00	8.72	8.7339	8.72	0.00						
7071-(HPV 33)	0.00	8.72	8.7339	8.72	0.00	0.00					
43z-(HPV 33)	0.00	8.72	8.7339	8.72	0.00	0.00	0.00				
3984-(HPV 58)	8.73	0.0024	0.0000	0.0024	8.73	8.73	8.73	8.73			
33z-(HPV 58)	8.72	0.0000	0.0024	0.0000	8.72	8.72	8.72	8.72	0.0024		
42z-(HPV 58)	8.72	0.0024	0.0049	0.0024	8.72	8.72	8.72	8.72	0.0049	0.0024	

## *5. Diskusija*

Različita oboljenja koja izazivaju Humani papiloma virusi (HPV), kao što su genitalne bradavice bile su poznate još od drevnih vremena starih Grka i Rimljana. Ipak, pokušaji da se karcinom grlića materice poveže sa infektivnim uzročnikom javljaju se tek polovinom devetnaestog veka. Kako je ovo bilo vreme ubrzanog razvoja bakteriologije, prvi bezuspešni pokušaji, odnosili su se na utvrđivanje bakterijskog uzročnika ovog oboljenja. Tek šezdesetih godina dvadesetog veka se prvi put virus, *Herpes simplex virus tip 2*, ispituje se kao potencijalni uzročnik ove vrste karcinoma, ali ova hipoteza nije potvrđena.. Tokom sedamdesetih godina dvadesetog veka javlja se hipoteza da uzrok maligne alteracije može da bude HPV, koji je izolovan iz šiljastih kondiloma (Zur Hausen, 2009). Od tada, zahvaljujući razvoju tehnika molekularne biologije, prikupljen je veliki broj dokaza koji potvrđuje presudnu ulogu HPV u razvoju ove vrste karcinoma, ali i drugih benignih i malignih tumora čoveka.



Karcinom grlića materice je po učestalosti, prema procenama Svetske zdravstvene organizacije (SZO), četvrti najčešći karcinom kod žena u svetu, sa 527.624 novoobolelih godišnje i 265.653 smrtna ishoda godišnje u 2012. godini. Standardizovana stopa incidencije prema starosti, u svetu iznosi prosečno 14,0 na 100.000, odnosno u zemljama u razvoju 15,7, dok u razvijenim zemljama iznosi 9,9 (Bruni i sar., 2015a)( Bruni i sar., 2015b). U zemljama regiona, standardizovane stope učestalosti prema starosti su u Sloveniji 10,5 na 100.00 žena, Hrvatskoj 14,3, Grčkoj 6,7 i Italiji, 10,5 na 100.000 žena. U Mađarskoj, stopa učestalosti je veća i iznosi 22,5 na 100.000 žena, a veoma visoka incidenca je zabeležena je u Bugarskoj od 32,8 na 100.000 žena (Bruni i sar., 2015b)( Bruni i sar., 2015c)( Bruni i sar., 2015d)(Bruni i sar., 2015e)( Bruni i sar., 2015f)(Bruni i sar., 2015g).

Značaj karcinoma grlića materice u Srbiji je veliki, obzirom da je ovaj karcinom, prema proceni SZO četvrti najčešći karcinom kod žena u Srbiji, a drugi najčešći uzrok smrti kod žena starosti od 15-44 godine starosti. Godišnje se otkrije 1501 novoobolela pacijentkinja i 609 smrtnih ishoda (Bruni i sar., 2015h). Incidenca karcinoma grlića materice, jedna je od najviših u Evropi sa standardizovanim stopom od 23,8 na 100.000 (Bruni i sar., 2015h). Prema podacima iz Registra za rak u Centralnoj Srbii, od 2003. do 2009. godine stope incidence bile su od 21,6 do 27,1 na 100.000 žena (Registar za rak u Centralnoj Srbiji, 2013). Noviji podaci za 2013. godinu pokazuju standardizovanu stopu učestalosti prema starosti od 20,3 na 100.000 (Registar za rak u Centralnoj Srbiji, 2015).

Veći broj dosadašnjih istraživanja je potvrdio etiološku vezu karcinoma grlića materice sa HPV infekcijom, pri čemu ovo oboljenje ugrožava srazmerno najveći broj osoba u odnosu na ostala maligna oboljenja izazvana ili povezana sa HPV infekcijom, pa samim tim ima najveći značaj (Chan i sar., 2012). Najveći broj karcinoma grlića materice javlja se u zoni transformacije grlića materice, gde dolazi do formiranja spoja kolumnarnih ćelija epitela endocerviksa, sa stratifikovanim skvamoznim epitelom ektocerviksa (Howley i sar., 2013).

Lezije koje se tokom vremena razvijaju u karcinom uobičajeno prolaze kroz niz displastičnih promena, tokom više godina. Težina nastale lezije određena je stepenom do koga je skvamozni epitel zamenjen bazaloidnim ćelijama pri čemu je kod najtežih displazija čitav sloj ovog epitela zamenjen. Histološka klasifikacija cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) 1, 2 ili 3 odgovara blagoj, umerenoj i teškoj displaziji odnosno karcinoma *in situ*. Najveći broj ovih displazija ne progredira, već najčešće prolazi proces spontane regresije, pri čemu verovatnoća regresije opada sa težinom displazije. Uobičajeno, teži oblici displazije razvijaju se iz lakših oblika displazije posle nekoliko godina, iako pojedine teže displazije mogu da se razviju brzo bez prolaska kroz stadijume blaže displazije (Howley i sar., 2013).

Okolo 40 HPV tipova, od čega najveći broj pripada alfa rodu, može da inficira genitalni trakt. Samo deo od ovog broja izoluje se uobičajeno u tkivu karcinoma grlića materice, a ovi tipovi se označavaju kao visoko onkogeni tipovi HPV. Tipovi koji se izoluju ređe u tkivima karcinoma grlića materice označavaju se kao nisko onkogeni tipovi. Istraživanje koje je izvedeno na 1000 uzoraka tkiva karcinoma, pokazalo je da više od 90% sadrži HPV DNK. Iako više od 20 tipova HPV se dokazuje u ovim tumorima, četiri tipa (HPV 16, HPV 18, HPV 31 i HPV 45) i to iz roda alfa-9 (HPV 16 i 31) i roda alfa-7 (HPV 18 i 45) izoluju se iz gotovo 80% karcinoma grlića materice. Nasuprot ovim tipovima, nisko onkogeni tipovi (npr. HPV 11 i 16) izolovani su u samo dva slučaja karcinoma (Howley i sar., 2013).

Uzorci tkiva karcinoma grlića materice fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafinu (*engl.* formalin-fixed, parafin-embedded; FFPE) predstavljaju veoma važan izvor za ispitivanje uloge HPV infekcije u patogenezi cervikalnog karcinoma primenom tehnika molekularne biologije i koriste se u brojnim istraživanjima (Bryan i sar., 2006) (Guan i sar., 2012).

Iako bi teorijski u svim uzorcima karcinoma grlića materice trebalo da se dokaže prisustvo HPV infekcije, u pojedinim studijama se ukazuje na nemogućnost dokazivanja HPV DNK u tkivima karcinoma (Bryan i sar., 2006).

Nedavna meta-analiza pokazala je da uspešnost detekcije HPV DNK u tkivima karcinoma grlića materice ukalupljenim u parafinu iznosi između 89% i 90%, u svetu i na nivou Evrope (Guan i sar., 2012). Smatra se da veličina PCR produkata utiče na senzitivnost PCR metode, posebno u ovim uzorcima (Gravitt i sar., 2000)(Bonin i sar., 2003)(Steinau i sar., 2010). Pa tako, Jančar i sar. (2009) su u nedavnom istraživanju sprovedenom u Sloveniji dokazali HPV DNK u 94,2%, tkiva karcinoma grlića materice uz upotrebu GP5+/GP6+ prajmera koji ograničavaju PCR produkt veličine 150bp. Van Muyden i sar. (1999) su, pomoću seta prajmera SPF1 i SPF2 koji su omogućavali dobijanje PCR produkta veličine 65bp, na uzorku od 159 tkiva karcinoma grlića materice žena u Rusiji, potvrdili uspešnost detekcije HPV DNK čak u 100% ispitanih uzoraka.

Pored toga, ukazuje se i da vrsta prajmera koji se koriste za dokazivanje HPV DNK takođe mogu uticati na uspešnost dokazivanja HPV infekcije u tkivima karcinoma grlića materice (Molijn i sar., 2005)(Villa i Denny, 2006). U cilju dokazivanja velikog broja HPV tipova, koji se razlikuju u nukleotidnim sekvencama, postoji veći broj konsenzus prajmera čija se primena zasniva na niskoj temperaturi vezivanja prajmera, na primeni inozina ili primene degenerativnih prajmera (Molijn i sar., 2005). U brojnim studijama poređene su PCR metode sa različitim vrstama prajmera za L1 gen, kao i metode sa prajmerima za L1 i E1 gen, utvrđene su razlike u detekciji HPV DNK. Procenat slaganja poređenih metoda za utvrđivanje prevalencije HPV infekcije je u najvećem broju slučajeva, bio je veoma dobar. Ipak, utvrđeno je nešto slabije slaganje na nivou HPV pozitivnosti, odnosno pojave pozitivnih nalaza samo sa jednom vrstom prajmera (Villa i Denny, 2006)(Clifford i sar., 2006).

Isto tako, pokazano je da prisustvo parafina, fragmentacija izolovane DNK, kao unakrsno vezivanje nukleinske kiseline sa proteinima nakon izlaganja formaldehidu može uticati na smanjenje prinosa DNK nakon izolovanja i smanjiti efikasnost amplifikacije u toku PCR reakcije (Karlsen i sar., 1996)(Daniel i sar., 2000)(Villa i Denny, 2006)( Lee i sar., 2007).

Primenom PCR metode, Steinau i sar. (2011) su ispitivali efikasnost različitih tehnika ekstrakcije HPV DNK iz 150 uzoraka tkiva karcinoma grlića materice, pomoću prajmera koji su omogućavali dobijanje PCR produkta veličine 175bp u okviru L1 gena, pri čemu je detekcija HPV DNK bila uspešna u 77,58% - 87,07% ispitanih uzoraka.

Smatra se da je moguće podceniti ukupnu prevalencu HPV ukoliko se koristi samo jedan metod detekcije te je u cilju povećavanja senzitivnosti HPV detekcije koristiti PCR metodu sa više setova prajmera za isti gen ili za različite gene, ili koristiti više različitih tehnika za dokazivanje HPV DNK (PCR, Nested PCR, tehnika hvatanja hibrida, reverzna hibridizacija) (Baay i sar., 1996)( Molijn i sar., 2005)( Fontaine i sar., 2007).

U ovom istraživanju za određivanje prisustva i učestalosti HPV infekcije u tkivima karcinoma grlića materice korišćen je PCR metod uz primenu dve grupe prajmera i to: konsenzus degenerativni MY09/MY11 prajmeri za L1 gen i GP1/GP2 prajmeri sa niskom temperaturom vezivanja za E1 gen HPV DNK. Veličina PCR produkata za oba gena je iznosila 450bp.

Od ukupno 101 uzorka tkiva karcinoma grlića materice testiranih u ovom istraživanju, HPV DNK je dokazana u 68,31% uzoraka primenom obe PCR reakcije. Međutim, uočena je razlika u HPV pozitivnosti primenom prajmera za E1 gen koji pripadaju grupi prajmera sa niskom temperaturom vezivanja u odnosu na degenerativne prajmere za L1 gen. Pa tako, HPV DNK E1 gen je dokazana u 56,43% ispitivanih uzoraka tkiva, dok je HPV DNK L1 gen dokazana u 34,65% uzoraka. U

odnosu na HPV pozitivnost, primenom oba seta prajmera prisustvo HPV DNK detektovano je kod 23 uzorka, dok je 34 uzorka bilo pozitivno primenom samo prajmera za E1 gen, odnosno kod 12 žena HPV infekcija je dokazana primenom samo prajmera za L1 gen. Primenom statističke analize utvrđen je visoki procenat slaganja ove dve PCR metode, kao i slabo slaganje na nivou HPV pozitivnosti.

Dobijene razlike u HPV pozitivnosti primenom PCR metode sa dve grupe prajmera, kao i nešto niži ukupni procenat dokazivanja HPV DNK u uzorcima tkiva karcinoma grlića materice u ovom istraživanju su u skladu sa prethodno navedenim podacima iz literature i mogu se objasniti razlikama u prinosu izolovane DNK, kvalitetu uzoraka tkiva (početna količina tkiva odnosno DNK, degradacija DNK), vrstama primenjenih prajmera, kao i veličinom DNK fragmenata od 450bp koji se koristio za PCR amplifikaciju u obe metode.

Treba navesti i da je tokom analize elektroforezom dobijenih PCR produkata HPV E1 gena, utvrđeno je prisustvo nespecifičnih produkata dužine 350 i 550 bp. Sprovedena dodatna analiza prisutnih nespecifičnih produkata DNK sekvenciranjem, dokazala je nespecifičnost, odnosno utvrđeno je da se radi o produktima nastalim vezivanjem konsenzus prajmera za E1 gen za hromozom 16 humane DNK. Pojavu navedenih nespecifičnih produkata, moguće je objasniti niskom temperaturom (50°C) vezivanja prajmera tokom potvrđivanja prisustva HPV DNK u ispitivanom uzorku.

Do danas je u potpunosti izvršena karakterizacija preko 160 tipova humanih papiloma virusa, a oko 60 ovih tipova dominantno se dokazuju u mukoznom epitelnom tkivu i spadaju u rod *Alphapapillomavirus* (alpha-PV). HPV izolati koji pripadaju Alpha-PV uključeni su u razvoj kako benignih (npr. šiljasti kondilomi, respiratorna papilomatoza) tako i malignih (npr. karcinomi grlića materice, glave i vrata) promena, te tako imaju najveći medicinski značaj u odnosu na ostale rodove (Chan i sar, 2012)(Howley i sar., 2013).

Među ovim oboljenjima, karcinom grlića materice jeste jedan od najčešćih uzroka smrtnosti od karcinoma kod žena (Burk, 2013)(Bruni i sar., 2015a). Pojedini tipovi HPV češće se mogu izolovati iz tkiva karcinoma grlića materice, pa je na osnovu ovog suštinski epidemiološkog zapažanja, izveden zaključak da je njihov onkogeni potencijal značajno veći u odnosu na druge tipove u okviru Alpha-PV kao i ostale rodove (Munoz i sar., 2003)(Kukimoto i Muramatsu, 2015).

Prema onkogenom potencijalu oko 15 genotipova se klasifikuju kao visookonkogeni tipovi (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82), dok se 12 HPV genotipova svrstava u nisko onkogene (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108). Za tri HPV tipa se pretpostavlja da pripadaju grupi visoko onkogenih (26, 53 i 66), a kod nekoliko genotipova onkogeni potencijal još uvek nije definisan (tipovi 34, 57 i 83) (Munoz i sar., 2003)(Kukimoto i Muramatsu, 2015). Genotipovi koji su povezani sa karcinomom grlića materice, pripadaju vrstama (klasterima) 5, 6, 7, 9 i 11 u okviru Alpha-PV (Howley i sar., 2013).

Za određivanje genotipa određenog HPV izolata, moguće je koristiti više različitih tehnika molekularne biologije, kao što su tehnike signalne amplifikacije (tehnika hvatanja hibrida), tehnike ciljne amplifikacije (tip specifični PCR, PCR-RFLP), tehnike kod kojih je kombinovana ciljna amplifikacija sa tehnikama hibridizacije (Southern blot, reverzna hibridizacija, microarray tehnika, hibridizacija u mikrotitracionim pločama) i DNK sekvenciranje (Molijn i sar., 2005).

Smatra se da je jedina tehnika koja omogućava određivanje svih genotipova i varijanti HPV prisutnih u određenom uzorku, od svih navedenih, DNK sekvenciranje. Osim toga, DNK sekvenciranje omogućava identifikaciju novih HPV tipova kao i filogenetsku analizu. Za pouzdanu identifikaciju određenog genotipa HPV, potrebno je da dužina nukleotidne sekvence bude najmanje 291bp, uz sličnost sa poznatim HPV genotipom više od 95% (Iftner i Villa, 2003)(Molijn i sar., 2005).

U odnosu na ostale navedene tehnike, nedostatak DNK sekvenciranja uočava se kod procene prisustva istovremene infekcije sa dva ili više HPV tipa ili tzv. mešovite HPV infekcije u uzorku. Samo ukoliko je jedan genotip HPV prisutan u većoj količini u odnosu na druge tehnikom DNK sekvenciranja moguće je identifikovati tzv. dominantan genotip. Međutim, ako je infekcija bez dominantnog tipa, nije moguće dobiti pouzdane rezultate, odnosno odrediti prisutne HPV tipove (Molijn i sar., 2005)(Villa i Denny, 2006).

U okviru ovoga istraživanja u cilju identifikacije HPV genotipova korišćena je tehnika DNK sekvenciranja uz primenu istih setova prajmera (za E1 i L1 gen HPV DNK) za dokazivanje HPV infekcije u tkivu karcinoma grlića materice.

Ukupni rezultati DNK sekvenciranja, pokazali su prisustvo šest visoko onkogenih genotipova HPV (16, 18, 33, 45, 53, 58) kod ukupno 47 uzoraka tkiva karcinoma, dok u 42,69% ispitanih uzoraka zbog prisustva preklapajućih pikova na elektroferogramu nije bilo moguće identifikovati prisutan HPV genotip. Ovakav izgled elektroferograma može ukazivati na eventualno postojanje mešovite infekcije, što je i potvrđeno u jednom uzorku gde je E1 genotipizacijom dokazan tip 16 a L1 genotipizacijom tip 53.

Slično kao i u PCR metodi, uspešnost DNK sekvenciranja za E1 gen je bila veća u odnosu na L1 gen. Pa tako, sekvenciranje E1 gena je bilo uspešno kod 73,52% HPV DNK E1 pozitivnih uzoraka, dok je sekvenciranje L1 gena bilo uspešno kod 23,63% HPV DNK L1 pozitivnih uzoraka. Ovakvu razliku, moguće je, takođe objasniti dizajnom korišćenih prajmera. Prajmeri za E1 gen dizajnirani su prema genotipu 16, a vezivanje za više tipova HPV moguće je zahvaljujući niskoj temperaturi vezivanja ovih prajmera. Nasuprot ovome, degenerativni prajmeri za L1 gen sastoje se od smeše 24 prajmera koju karakterišu različiti nukleotidi na više pozicija, što omogućava vezivanje za sekvencu više tipova HPV sa sličnog nukleotidnom sekvencom.

Kako bi se postigla bolja karakterizacija HPV genotipova prisutnih u različitim tipovima kliničkih uzoraka, a pogotovo mešovite infekcije sa više različitih HPV

genotipova, sve češće se osim DNK sekvenciranja, za genotipizaciju koriste i različite metode zasnovane na principima tehnike hibridizacije, kao što su reverzna hibridizacija, hibridizacija u mikrotitracionim pločama i microarray analiza. Poređenja različitih metoda hibridizacije (npr. GenoFlow HPV array test kit, HybriMax i sl.) sa različitim komercijalnim metodama (npr. Linear Array, Hybrid Capture II i sl.) pokazala su pouzdanost, efikasnost i visoku specifičnost i senzitivnost u genotipizaciji HPV DNK (Wong i sar. 2012; Tao i sar., 2012).

Imajući u vidu navedeno, u ovom istraživanju je za genotipizaciju korišćen i komercijalni test protočne hibridizacije (GenoFlow HPV Array Test Kit) za dokazivanje 33 različita tipa HPV, a dobijeni rezultati poređeni su sa rezultatima DNK sekvenciranja.

Metodom protočne hibridizacije urađena je genotipizacija kod 20 uzoraka izolovane DNK, kod kojih je primenom PCR metode detektovana HPV DNK bilo za L1 gen ili E1 gen, odnosno oba ispitivana HPV gena i u jednom uzorku nije dokazana HPV DNK PCR metodom. Ovom metodom pored HPV tipa 16 i 18, identifikovani su i visoko onkogeni tip 59 kao i nisko onkogeni tip 71. Pored toga, kod 4 uzorka je dokazana mešovita infekcija sa dva odnosno tri HPV genotipa.

Ukupno primenom obe tehnike identifikacije genotipa HPV (DNK sekvenciranje i protočna hibridizacija) dokazano je prisustvo osam genotipova HPV i to sedam visoko onkogenih tipova (16, 18, 33, 45, 53, 58 i 59) i jedan nisko onkogeni HPV 71. Mešovita infekcija je potvrđena primenom obe metode kod 5 uzoraka (4,95%).

Brojne studije sprovedene širom sveta, pokazale su povezanost petnaest visoko onkogenih tipova HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82) sa razvojem karcinoma grlića materice. Najčešće izolovani genotipovi HPV koji se dokazuju u ovim karcinomima su HPV 16 i 18. Prevalenca ova dva HPV tipa je veoma slična u svim geografskim regionima sveta i iznosi od 70-76% (Bruni i sar., 2015a).

Prosečna učestalost genotipova HPV 16/18 u karcinomima grlića materice u



Evropi iznosi 73,4% sa najvišom prevalencom od 84,8% utvrđenom u Istočnoevropskom regionu (Bruni i sar., 2015b).

U skladu sa navedenim podacima su i dobijeni rezultati u ovom istraživanju, da su ova dva HPV genotipa dokazana u 83% tkiva karcinoma grlića materice. Pored toga, ovi rezultati su veoma slični i sa prevalencom HPV 16 i 18 u tkivima karcinoma grlića materice u zemljama regiona, kao što su Hrvatska (82,9%), Bugarska (80,3%) i Slovenija (77,7%)(Bruni i sar., 2015b).

Prema podacima kojima raspolaže Svetska zdravstvena organizacija u Evropi prevalenca HPV tipova 16 i 18 iznosi 58,4% i 15,0%, respektivno (Bruni i sar., 2015b). Rezultati meta-analize pokazuju da je u centralnoj i istočnoj Evropi, prisustvo HPV 16 utvrđeno prosečno u 59,6% (interval od 30,9% do 79,6%), dok se HPV 18 dokazuje u 16,9% karcinoma grlića materice (interval od 0% do 44,4%). Drugi visoko onkogeni tipovi HPV koji se najčešće detektuju u ovom regionu su HPV 31, HPV 33 i HPV 45, dok je prevalenca ostalih HPV tipova, kao što su 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 značajno niža (Poljak i sar., 2013).

Rezultati ovoga istraživanja su u tkivima karcinoma grlića materice žena u našoj populaciji pokazali visoku učestalost HPV tipa 16 (80%), dok je tip 18 dokazan u 3% ispitivanih uzoraka. Takođe, pokazana je veća učestalost HPV tipa 33 (6%) u odnosu na zemlje sveta (3,8%), kao i zemlje regiona Sloveniju (4,6%) i Italiju (2,5%). Slično tome, dobijena je nešto veća učestalost tipa 58 (4%) u odnosu na zemlje sveta (3,8%), kao i zemlje regiona Sloveniju (1,1%) i Italiju (3,5%) (Bruni i sar., 2015a) (Jančar i sar., 2009)(Rossi i sar., 2012). Ova razlika delimično može da se objasni relativno malim uzorkom ispitanih tkiva karcinoma grlića materice u ovom istraživanju.

Značaj mešovite infekcije još uvek nije definisan. Smatra se da je prisustvo mešovite infekcije udruženo sa uspostavljanjem perzistentne infekcije, odnosno da uslovljava duže trajanje infekcije, ali i interakcije između više genotipova. Brojne

studije koje su pokazale da se u tkivima karcinoma grlića materice dokazuje uglavnom prisustvo samo jednog HPV genotipa. Ipak u manjem broju studija je pokazano da se u manjem procentu dokazuje istovremeno prisustvo dva ili više HPV genotipova (Baseman i Koutsky, 2005). U studiji sprovedenoj u Sloveniji utvrđena je veoma niska učestalost mešovitih infekcija od 1,8% (Jančar i sar., 2009). Istraživanje u Italiji je pokazalo učestalost mešovitih infekcija od 19,9% u tkivima invazivnog karcinoma grlića materice (Sideri i sar., 2009).

Međutim, drugo istraživanje u Italiji je pokazalo učestalost mešovitih infekcija od 7,7% kod planocelularnih karcinoma, dok je kod adenokarcinoma oko 20% (Carozzi i sar., 2010). Veća učestalost mešovitih infekcija kod adenokarcinoma pokazana je i u studiji u Koreji (An i sar., 2005).

U okviru ovoga istraživanja kod 5 uzoraka planocelularnih karcinoma (4,95%) je potvrđeno prisustvo mešovite infekcije sa dva ili tri HPV genotipa. S obzirom da je mešovita infekcija pre svega dokazana primenom metode protočne hibridizacije, kao i da je veći broj genotipova identifikovan primenom dve različite metode, ovakav nalaz ukazuje na značaj primene više tehnika kako u pogledu dokazivanja HPV DNK u uzorcima tkiva karcinoma grlića materice tako i identifikacije prisutnih genotipova HPV, odnosno u detekciji mešovitih infekcija.

U centralnoj i istočnoj Evropi dijagnoza karcinoma grlića materice se postavlja kod žena prosečne starosti 50,2 godina, a većina žena kod kojih se ovaj karcinom dijagnostikuje su starije od 40 godina. Ipak, u različitim istraživanjima sprovedenim u ovom regionu značajna povezanost godina starosti pacijentkinja u učestalosti visoko onkogenih tipova HPV nije pokazana (van Muyden i sar., 1999)(Jančar i sar., 2009)(Poljak i sar., 2013). Rezultati ovog istraživanja takođe su pokazali da se najveći broj karcinoma grlića materice u našoj populaciji, dijagnostikuje kod žena preko 40 godina starosti (79,59%). Iako je u okviru ove starosne grupe identifikovan veći broj visoko onkogenih tipova HPV, statistički značajna povezanost nije utvrđena.

Klasifikacija namenjena identifikaciji stadijuma karcinoma grlića materice, koristi se kako bi se procenila težina i progresija ovog oboljenja (FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2014). U ovom istraživanju najveći broj pacijentkinja pripadao je stadijumu I (65,3%) prema ovoj klasifikaciji. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između učestalosti visoko onkogenih tipova HPV i stadijuma bolesti. Slični rezultati dobijeni su i u studiji sprovedenoj na tkivima karcinoma grlića materice kod žena u Rusiji kao i u svetu (van Muyden i sar., 1999)(Bruni i sar., 2015a).

Planocelularni karcinom je u zemljama sveta najčešći patohistološki tip karcinoma grlića materice (80-85%), a potom slede adenokarcinom (10-15%) i mali neuroendokrini tumor (Bruni i sar., 2015 a). U novije vreme, zabeležen je porast broja adenokarcinoma, posebno kod mlađih žena (de Freitas i sar, 2012). U centralnoj i istočnoj Evropi, najveći broj karcinoma grlića materice pripadaju patohistološkom tipu planocelularnog (89%) i adenokarcinoma (11%) (Poljak i sar., 2013).

Slični rezultati su dobijeni i u ovom istraživanju, gde je od 101 ispitivanog uzorka tkiva karcinoma grlića materice, 91 uzorak pripadao je patohistološkom tipu planocelularnog karcinoma (90,09%), dok je 10 uzoraka pripadalo patohistološkom tipu adenokarcinoma (9,91%).

Od ukupno 91 uzorka planocelularnog karcinoma, 34,65% uzoraka je pripadalo podtipu keratinizujućeg karcinoma, a 55,44% uzoraka podtipu nekeratinizujućeg karcinoma. Od ukupno 10 uzoraka adenokarcinoma, 2,97% uzoraka pripadala su podtipu adenoskvamoznog karcinoma. Slična učestalost patohistoloških tipova i podtipova karcinoma grlića materice je pokazana u studiji u Italiji, gde su planocelularni karcinomi su činili 88,5% ispitanih uzoraka, dok je adenokarcinoma bilo 9,6% a adenoskvamoznih karcinoma 1% (Rossi i sar., 2012). Nešto veća učestalost adenokarcinoma odnosno adenoskvamoznih karcinoma pokazana u studiji u Sloveniji u kojoj su planocelularni karcinomi su činili 77,8% uzoraka, dok je adenokarcinoma bilo 17,3%. Od ovog broja adenoskvamozni karcinomi činili su 7,4%

(Jancar i sar., 2009). Ispitivanje koje je sproveo Van Muyden i sar. (1999) u Rusiji, utvrdilo je učestalost od 59,11% uzoraka nekeratinizujućih planocelularnih karcinoma, 11,94% uzoraka keratinizujućih planocelularnih karcinoma, kao i 16,98% adenokarcinoma, odnosno 11,94 % adenoskvamoznih karcinoma.

Rezultati meta-analitičke studije pokazali su da stopa detekcije HPV 16 u palnocelularnim karcinomima iznosi 59,3%, dok u adenokarcinomima iznosi 36,8%. Tip 18 se dokazuje gotovo podjednako u oba patohistološka tipa (36,3% u planocelularnim odnosno 36,8% u adenokarcinomima) (Tornesello i sar., 2011).

Iako su rezultati ovog istraživanja pokazali veću učestalost HPV tipa 16 u tkivima planocelularnog i adenokarcinoma (80,43% i 66,7%), kao i nisku stopu učestalosti tipa 18 u oba tipa karcinoma, nije pokazana statistički značajna povezanost učestalosti visoko onkogenih HPV genotipova i histološkog tipa odnosno podtipa karcinoma grlića materice. Razlog za ovakav rezultat može biti relativno mali uzorak ispitanih tkiva karcinoma, posebno adenokarcinoma u ovom istraživanju.

Visoko onkogeni tipovi HPV koji su povezani sa karcinomom grlića materice pripadaju filogenetski srodnim vrstama 5, 6, 7, 9 i 11 roda Alphapapillomavirus (Alpha-PV), pri čemu najveći broj ovih tipova pripada filogenetskom klasteru 9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 i 67) (zur Hausen, 1996)( Bouvard i sar., 2009)( Tomassino, 2014). U okviru rezultata ove studije, takođe je utvrđeno, da su se visoko onkogeni tipovi HPV koji pripadaju klasteru 9 najčešće dokazani u ispitivanim uzorcima cervikalnog karcinoma. Međutim, statistička analiza dobijenih podataka nije pokazala značajnu povezanost filogenetskih klastera HPV sa starošću pacijentkinja, stadijumom i histološkim tipom karcinoma grlića materice.

Iako papiloma virusi čine heterogenu grupu virusa, njihov genom je, kao i kod ostalih DNK virusa relativno stabilan. Ipak, kako su papilomavirusi izrazito specijes specifični, oni zajedno sa svojim domaćinom, nužno prolaze evolutivne promene, posredovane različitim mehanizmima. Navedeni mehanizmi obuhvataju mutacije,

duplikacije gena, reorganizaciju genoma i rekombinacije, pri čemu se za utvrđivanje odnosa između gena mogu da koriste isključivo mutacije (tačkaste mutacije, insercije i delecije), primenom različitih filogenetskih metoda. U brojnim studijama, sprovedenim do danas, potvrđeno je da se promene genoma papiloma virusa kao što su rekombinacije i mutacije izrazito retke (De Villiers i sar., 2004)(Bernard, 2005).

Klasifikacija papiloma virusa, formalno predložena u osmom izveštaju Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa utvrđuje podelu papilomavirusa na sledeće kategorije: rod (*lat. genus*), vrsta (*lat. species*), tip, podtip i varijanta. Najšira kategorija klasifikacije je rod (Bernard, 2010).

Prema ovoj podeli do sada je utvrđeno 29 rodova papiloma virusa, kojih je svaki označen slovom grčkog alfabeta (Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu-, i Nu-papillomavirus). Svi članovi koji pripadaju određenom rodu, imaju do 60% identičnu sekvencu DNK L1 gena. Genomi papiloma virusa u okviru iste vrste dele sekvencu koja je identična između od 60 do 70%, dok u okviru istog tipa dele sekvencu identičnu od 71% do 89%. Takođe, za pojedini tip HPV, definisani su podtipovi koje karakteriše identična sekvenca od 90% do 98% i varijante sa identičnom sekvencom preko 98% (Howley i sar., 2013). Varijante HPV se klasifikuju na osnovu razlika u nukleotidnoj sekvenci DNK genoma koje iznose oko 1% i označavaju se kao linija (*engl. lineage*), dok se slične razlike u DNK sekvenci od 0, 5 do 1, 0% nazivaju podlinijom (*engl. sublineage*) (Cornet i sar, 2012)(Burk i sar., 2013)(Kukimoto i Muramatsu, 2015).

Do danas izolovano je preko 200 tipova humanog papiloma virusa kao i 60 tipova životinjskih papiloma virusa (Doorbar i Quint, 2012). Najveći medicinski značaj koji je posledica povezanosti sa karcinomima grlića materice imaju humani papilomavirusi koji pripadaju rodu alfa. Tipovi koji su povezani sa karcinomom grlića materice, često označeni kao visoko onkogeni tipovi, pripadaju vrstama 5, 6, 7, 9 i 11. Humani papiloma virus tip 16 koji se najčešće nalazi u karcinomima grlića materice, pripada vrsti devet, a tip 18 sledeći po učestalosti pripada vrsti sedam (Howley i sar., 2013).

U ovom istraživanju, filogenetskom analizom sekvenci HPV izolata, potvrđena je pripadnost HPV izolata iz naše populacije određenim genotipovima i utvrđeno je da svi dobijeni HPV genotipovi pripadaju rodu *Alphapapillomavirus*. Takođe, filogenetskom analizom ispitivanih sekvenci potvrđena je pripadnost identifikovanih sekvenci određenim HPV vrstama i to: *Alphapapillomavirus* 6 (HPV 53), *Alphapapillomavirus* 7 (HPV 18, HPV 45), *Alphapapillomavirus* 9 (HPV 16, HPV58, HPV 33), što je u skladu sa podacima opisanim u literaturi o geografskoj distribuciji HPV genotipova u Evropi.

U cilju utvrđivanja genotipske varijabilnosti konstruisana su filogenetska stabla identifikovanih sekvenci HPV na nivou E1 i L1 gena, sa ustanovljenim referentnim sekvencama za pojedine genotipove i drugim izolatima dostupnim u genskoj bazi podataka.

Filogenetska analiza HPV E1 izolata pokazala je da svi identifikovani HPV genotipovi u ispitivanoj populaciji žena pripadaju rodu *Alpha-papillomavirus*. Takođe, potvrđena je pripadnost identifikovanih HPV E1 izolata odgovarajućim HPV genotipovima sa visokim butstrep vrednostima i to filogenetskoj grupi 9 (HPV genotipovi 16, 33, 58) kao i filogenetskoj grupi 7 (HPV genotip 45). Nukleotidna udaljenost između sekvenci istog genotipa je bila na nivou varijante i iznosila je od 0-1%. Najveća nukleotidna udaljenost utvrđena za uzorak broj 9472 koji se izdvojio kao zasebna grana HPV tipa 16 na filogenetskom stablu.

Slični rezultati su dobijeni i filogenetskom analizom HPV L1 sekvenci koji su takođe potvrdili pripadnost identifikovanih HPV L1 izolata odgovarajućim HPV genotipovima, kao i filogenetskoj grupi 9 (HPV genotip 16), filogenetskoj grupi 6 (HPV genotip 53), kao i filogenetskoj grupi 7 (HPV genotip 18). Analizom genske udaljenosti pokazano je da su nukleotidne distance među genotipovima bile na nivou varijante i iznosile su između 0-1%.

Dobijeni rezultati genotipske varijabilnosti koji su pokazali da je varijabilnost HPV izolata E1 gena odnosno L1 gena u našoj populaciji na nivou varijante unutar genotipova što je u skladu sa navedenim podacima iz literature.

U novije vreme se sve češće govori o značaju intragenotipske varijabilnosti HPV izolata. Navodi se da se intratipske varijante mogu razlikovati u biološkim i etiološkim karakteristikama i time uticati na onkogeni potencijal u razvoju karcinoma grlića materice. Razlike u nukleotidnim sekvencama HPV varijanti mogu usloviti promene u aminokiselinskoj sekvenci čime mogu promeniti onkogeni potencijal. Pored toga, ove razlike u nukleotidnim sekvencama mogu uticati na različitu incidencu cervikalnog karcinoma u svetu (de Freitas i sar., 2012).

Veliki značaj se ukazuje i na to da promene u aminokiselinskim sekvencama posebno na nivou virusnog kapsida mogu uticati i na efikasnost vakcinacije u prevenciji HPV infekcije (Perez i sar., 2014).

U okviru pojedinih genotipova HPV je opisano više intragenotipskih linija i podlinija HPV 16: a) linija A (ranije označavana kao Evro-azijska) sadrži podlinije A1, A2 i A3 (Evropske, EUR) i A4 (Azijska), b) linija B (Afrička 1, AFR1) sadrži podlinije B1 i B2, c) linija C (Afrička 2, AFR2) d) linija D (Severnoamerička/Azijsko-Američka) sadrži podlinije D1 (Severnoamerička, NA), D2 (Azijsko-Američka 2, AA2), i D3 (Azijsko-Američka1, AA1) (Kukimoto i Muramatsu, 2015).

Postoje snažni dokazi da pojedine varijante genotipa HPV 16 imaju različite efekte u pogledu perzistencije, progresije u prekancerozne lezije i razvoju karcinoma (Zuna i sar., 2009)(Schiffman i sar., 2010). Najveći broj studija ukazuje da neevropske varijante (non-E) pokazuju viši stepen patogenosti od evropske (E), odnosno da češće izazivaju perzistenciju, kao i prekancerozne lezije. Postoje i pouzdani dokazi da neevropske varijante genotipa HPV 16 povećavaju rizik od pojave karcinoma, a posebno je ovaj rizik povezan sa varijantom AA (Zuna i sar., 2009)(Schiffman i sar., 2010).

Genomske varijante HPV 18 su grupisane u tri glavna ogranka: Azijsko-Američki (AA), Evropski (E) i Afrički (Af) (Arias-Pulido i sar., 2005)(Perez i sar., 2014). HPV33 varijante grade dihotoomno filogenetsko stablo gde je jedna grana predstavljena sa A1 podlinijom, dok drugu granu čine podlinije A2 i A3 i linije B i C (Chen i sar., 2011). HPV58 varijante su grupisane u linije A sa podlinijama A1, A2 i A3, liniju B sa podlinijama B1 i B2, liniju C i liniju D sa podlinijama D1 i D2 (Chan i sar., 2011). Za navedene linije i podlinije HPV tipova 18, 33 i 58 još uvek nema pouzdanih podataka o ulozi pojedinih linija odnosno podlinija u patogenezi karcinoma grlića materice. (Arias-Pulido i sar., 2005)(Chen i sar., 2011)(Chan i sar., 2011)(Perez i sar., 2014).

U cilju utvrđivanja intragenotipske varijabilnosti HPV 16 izolata, izvedena je filogenetska analiza na nivou E1, L1 i E6/7 gena HPV16 DNK, pri čemu je konstruisano filogenetsko stablo sa ustanovljenim referentnim linijama odnosno podlinijama.

Dobijeni rezultati filogenetske analize identifikovanih sekvenci E1 gena HPV 16 izolata, potvrdili su da najveći broj izolata pokazuje usklađenost sa sekvencom podlinije A1 u okviru evropske linije A, pri čemu su se četiri izolata izdvajala kao zasebna grana na filogenetskom stablu. Samo jedan izolat je pokazao najveću sličnost sa sekvencama podlinija A3 i A4, evro-azijske linije. Jedan izolat (9472) je pokazao najveću usklađenost sa afričkom linijom C. Analizom genetičke udaljenosti identifikovanih sekvenci E1 gena HPV 16, utvrđeno je da su nukleotidne distance na nivou varijante podlinije i unutar pojedine linije.

Svi analizirani izolati L1 gena HPV 16, pokazali su usklađenost sa A1, A3 i A4 podlinijama, evro-azijske linije A HPV 16. Na osnovu analize nukleotidne udaljenosti, dobijene su vrednosti koje su ukazivale na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante podlinije i unutar pojedine linije.

Uzorci kod kojih je metodom DNK sekvenciranja određen genotip 16 HPV, ispitivani su PCR metodom za detekciju E6/7 gena veličine 735bp. Ovom metodom, dobijeno je 6 (17,65%) pozitivnih od ukupno 36 uzoraka kod kojih je metodom DNK



sekvenciranja potvrđen genotip 16 HPV. Potom su E6/7 pozitivni uzorci dodatno ispitivani metodom DNK sekvenciranja i za 3 uzorka od 6 PCR pozitivnih određena je sekvenca DNK.

Dobijene sekvence E6/7 gena korišćene su za filogenetsku analizu, koja je izvedena sa konstrukcijom filogenetskog stabla sa referentnim linijama i podlinijama HPV 16. Nakon filogenetske analize ispitivanih izolata, utvrđena je usklađenost dva izolata sa podlinijom A2 i podlinijom A3, respektivno, evropske linije A, dok je jedan izolat pokazao usklađenost sa podlinijom D1 (NA1), severnoameričko/azijsko-američke linije D.

Dobijeni rezultati intragenotipske varijabilnosti HPV 16 izolata u našoj populaciji su veoma slični dostupnim podacima iz zemalja regiona. Pa tako, u studiji koju su sproveli Bokal i sar. (2010) na izolatima HPV DNK dobijenim iz tkiva karcinoma žena u Sloveniji, utvrđeno je da je najveći broj ispitanih izolata HPV 16 pripadao evroazijskoj liniji, dok je manji broj izolata pripadao afričkoj Afr2, odnosno C liniji i Azijsko-američkoj odnosno D liniji. U istraživanju sprovedenom u Italiji svi ispitivani izolati HPV 16 pripadali su evroazijskoj liniji (Fрати i sar., 2011). Rezultati obimnije studije sprovedene u Grčkoj pokazali da izolati HPV 16 žena u ovoj zemlji pripadaju u najvećem broju evro-azijskoj liniji, a znatno manji broj izolata pripadao je afričkim i azijsko-američkim linijama (Ntova i sar., 2012).

Epidemiološke studije su pokazale udruženost progresije skvamoznih intraepitelijalnih lezija teškog stepena ka invazivnom karcinomu i prisustva HPV 16 varijante sa supstitucijom na nivou E6 gena T350G, koja dovodi do zamene leucina na poziciji 83 u valin (L83V) (Tornesello i sar.)( 2011; de Freitas i sar., 2012).

Analiza nukleotidne i aminokiselinske sekvence HPV16 izolata u našoj populaciji na nivou E6/E7 gena nije pokazalo postojanje navedene varijante, što se može objasniti malim brojem ispitanih izolata.

Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV 33 izolata primenom filogenetske analize pokazalo je usklađenost svih HPV 33 izolata sa podlinijom A1 u okviru evropske linije A. Nukleotidna udaljenost je ukazivala na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante podlinije i unutar pojedine linije.

Genotip 33 se u svetu dokazuje u oko 5% karcinoma grlića materice. Distribucija HPV 33 linija u svetu je veoma geografski kao i etnički specifična. Pa tako podlinija A je prisutna svuda u svetu, gde u Evropi dominiraju podlinija A1 i A2. Linija A3 je specifična za Aziju/Okeaniju, dok je linija B karakteristična za Afriku. Linija C se takodje uglavnom dokazuje u Africi (Chen i sar., 2011). Dobijeni rezultati u okviru ovoga istraživanja su u skladu sa navedenim podacima iz literature.

Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV 58 izolata primenom filogenetske analize pokazalo je da su izolati HPV 58 dokazani u ovom istraživanju bili usklađeni sa dve različite linije (A i C) u okviru ovog genotipa i dve podlinije u okviru linije A (A1 i A2), genotipa HPV 58.

Iako HPV 58 pripada tek trećoj grupi HPV genotipova koji se povezuju sa karcinomom grlića materice ovaj genotip karakteriše se značajnom geografskom varijabilnošću. U meta-analizi utvrđeno je da je HPV 58 povezan sa 3,3% karcinoma grlića materice u svetu i 5,6% ovih karcinoma u Aziji (Munoz i sar., 2004.). U studiji koju je sproveo Chen i sar. (2011) uvrđeno je da linija A najprevalentnija kako u svetu, tako i u pojedinim regionima sveta, dok je linija C identifikovana u 9,2% ispitanih izolata sa nešto većom prevalencom ove linije u Africi nego u ostalim regionima. Delimična usaglašenost naše studije sa navedenim rezultatima za HPV 58 opisanim u literaturi može da se objasni relativno malim uzorkom ispitanim u našoj studiji.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju, karakterišu humane papiloma viruse u tkivima karcinoma grlića materice u pogledu identifikacije i određivanja učestalosti genotipova ovih virusa, njihove korelacije sa patohistološkim tipom i stadijumom

karcinoma, kao i utvrđivanja i analize genotipske i intragenotipske varijabilnosti HPV genotipova identifikovanih u tkivima karcinoma grlića materice. Dobijeni rezultati o osobenostima HPV u tkivima karcinoma grlića materice, kao i drugih do sada izvedenih i budućih istraživanja, mogu da se koriste pri formulisanju nacionalnih preporuka u prevenciji karcinoma grlića materice.

## *6. Zaključci*

Na osnovu postavljenih ciljeva, a prema dobijenim rezultatima ovog istraživanja moguće je zaključiti sledeće:

1. Prisustvo HPV DNK potvrđeno je u 68,31% ispitivanih uzoraka tkiva karcinoma grlića materice
2. Rezultati PCR metoda za dokazivanje L1 i E1 gena HPV DNK su pokazali veću HPV pozitivnost primenom prajmera za E1 gen u odnosu na L1 gen (56,43% vs. 34,65%). Statistička analiza je pokazala visoki procenat slaganja ove dve PCR metode, ali slabo slaganje na nivou HPV pozitivnosti.
3. Metodom DNK sekvenciranja za oba gena HPV DNK utvrđeno je prisustvo šest visoko onkogenih genotipova HPV (16, 18, 33, 45, 53, 58) kod ukupno 47 uzoraka tkiva karcinoma grlića materice. Uspešnost DNK sekvencirana za E1 gen je bila veća u odnosu na L1 gen (73,52% vs. 23,63%). Kod jednog uzorka je potvrđena mešovita infekcija (E1 tip16 i L1 tip 53).
4. U odnosu na učestalost HPV genotipova, najviša učestalost je metodom DNK sekvenciranja pokazana za HPV 16 (80,85%), zatim za tip 33 (8,51%) i tip 58 (6,38%), dok su ostali identifikovani tipovi potvrđeni u manje od 2% ispitivanih uzoraka.
5. Metodom protočne hibridizacije dokazano je prisustvo četiri HPV genotipa, i to tri genotipa visokog onkogenog potencijala (HPV 16, 18, 59) i jednog genotipa niskog onkogenog potencijala (HPV 71). Mešovita infekcija dokazana je kod 4 od 7 analiziranih HPV DNK pozitivnih uzoraka i to kod 3 uzorka sa 2 HPV tipa i jednog uzorka sa tri tipa.
6. U odnosu na učestalost HPV genotipova, najviša učestalost je metodom protočne hibridizacije pokazana za HPV 16 (7/7), zatim za tip 59 (3/7), dok su tipovi 18 i 71 dokazani u po jednom uzorku.
7. Ukupno primenom obe tehnike identifikacije genotipa HPV (DNK sekvenciranje i protočna hibridizacija) dokazano je prisustvo osam genotipova HPV i to sedam visoko onkogenih tipova (16, 18, 33, 45, 53, 58 i 59) i jedan nisko onkogeni HPV 71. Mešovita infekcija je potvrđena primenom obe metode kod 5 uzoraka (4,95%).

8. U odnosu na učestalost HPV genotipova, primenom obe metode genotipizacije, najviša učestalost je pokazana za HPV 16 (80%), zatim tip 33 (6%), tip 58 (4%) i tip 59 (4%), dok je tip 18 dokazan u 3% ispitivanih uzoraka. Ostali identifikovani tipovi potvrđeni u manje od 2% ispitivanih uzoraka.
9. Većina ispitivanih uzoraka karcinoma grlića materice (79,59%) je bila od pacijentkinja starijih od 40 godina, pri čemu je najviše uzoraka pripadalo stadijumu I prema FIGO klasifikaciji (32 od 49). Nije pokazano postojanje statističke značajnosti između prisutnih HPV genotipova i godina starosti pacijentkinja odnosno stadijuma bolesti.
10. Najčešće identifikovani HPV genotip u svim ispitivanim patohistološkim grupama karcinoma grlića materice izuzev u grupi adenoskvamoznog karcinoma je bio HPV 16 koji je dokazan u 80,43% planocelularnih i 66,7% adenokarcinoma. Nije pokazano postojanje statističke značajnosti između učestalosti HPV genotipova i patohistološkog tipa odnosno podtipa karcinoma grlića materice.
11. Filogenetska analiza sekvenci HPV E1 i L1 izolata, potvrdila je pripadnost HPV izolata iz naše populacije određenim genotipovima i to rodu *Alphapapillomavirus* odnosno filogenetskim grupama 9, 7 i 6. Najzastupljeniji su bili genotipovi iz grupe 9.
12. Analiza genotipske varijabilnosti identifikovanih HPV E1 i L1 izolata pokazala je nukleotidnu udaljenost između sekvenci istog genotipa od 0-1%, što ukazuje na varijabilnost nivou varijante unutar istog genotipa.
13. Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV tipa 16 na nivou E1, L1 i E6/E7 gena je pokazalo da najveći broj izolata pokazuje usklađenost sa evropskom linijom A odnosno podlinijama A1, A2, A3 i A4 sa nukleotidnom distancom manjom od 0,5%, što ukazuje na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante unutar podlinija.
14. Analiza nukleotidne i aminokiselinske sekvence HPV16 izolata u našoj populaciji na nivou E6/E7 gena nije pokazalo postojanje varijante HPV 16 T350G (L83V) sa izraženim onkogenim potencijalom.

15. Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV tipa 33 na nivou E1 gena je pokazalo da svi identifikovani izolata pokazuju usklađenost sa evropskom linijom A odnosno podlinijama A1, sa nukleotidnom distancom manjom od 0,5%, što ukazuje na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante unutar navedene podlinije.

16. Ispitivanje intragenotipske varijabilnosti HPV tipa 58 na nivou E1 gena je pokazalo da da najveći broj identifikovani izolata pokazuju usklađenost sa dve različite linije (A i C) u okviru ovog genotipa i dve podlinije u okviru linije A (A1 i A2). Nukleotidna distanca je bila manja od 0,5%, što ukazuje na varijabilnost analiziranih izolata na nivou varijante unutar navedenih podlinija.

17. Dobijeni rezultati ispitivanja učestalosti i distribucije HPV genotipova u tkivima karcinoma grlića materice, kao i ispitivanja genotipske i intragenotipske varijabilnosti pokazuju usklađenost rezultata u našoj populaciji sa podacima za evropske zemlje kao i zemlje u regionu.

## *7. Literatura*



**Literatura**

An HJ, Kim KR, Kim IS, *i sar.* Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study. *Mod Pathol.* 2005; 18(4):528–534.

Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. *Prev Med.* 2011; 53S1:S36–S41.

Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martinez N, *i sar.* Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology.* 2005; 338(1):22–34.

Arney A, Bennett KM. Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus, *Lab Med.* 2010; 41(9):523-530.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections, *Journal of Clinical Virology.* 2005; 32S:S16–S24.

Baay MF, Quint WG, Koudstaal J *i sar.* Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(3): 745–747.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32S:S1-S6.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010; 401(1):70-79.

Bokal EV, Kocjan BJ, Poljak M, Bogovac Z, Jancar N. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010; 36(6):1204–13.

Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 2003; 56(3):184–186.

Bosch XF, de Sanjose S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers.* 2007; 23(4): 213–227.

Bouvard V, Baan R, Straif K, *i sar.* A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009; 10(4): 321–322.

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in the Europe. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Serbia. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Slovenia. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Croatia. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Greece. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Italy. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, *i sar.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Bulgaria. Summary Report 2015-04-08. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). [cited 05-May-2016].

Bryan JT, Taddeo F, Skulsky D, *i sar.* Detection of specific human papillomavirus types in paraffin-embedded sections of cervical carcinomas. *J Med Virol.* 2006; 78(1):117-124.

Burd EM. Human papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1):1-17.

Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology.* 2013; 445(1-2):232-43.

Cancer Registry Of Central Serbia 2011. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut"; 2013.

Cancer Registry of Central Serbia. Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic - Batut”, Belgrade, 2015.

Carozzi FM, Tornesello ML, Burroni E *i sar.* Prevalence of human papillomavirus types in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(9):2389–2400.

Chan P, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 2012; 49(4): 117–136.

Chan PK, Luk AC, Luk TN *i sar.* Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. *J Clin Virol.* 2009; 44:111–114.

Chan PKS, Luk ACS, Park JS *i sar.* Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. *J Infect Dis.* 2011; 203(11):1565–73.

Chao A, Chen TC, Hsueh C, Huang CC, Yang JE, Hsueh S *i sar.* Human papillomavirus in vaginal intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2012; 131(3):E259–E268.

Chial, H. (2008) DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project. *Nature Education.* 2008; 1(1):219.

Chow LT, Broker TR. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. *Clin Dermatol.* 1997;15(2):217–227.

Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Han R, Kreider JW. Immunization with virus-like particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomaviruses. *J Virol*. 1996; 70(2):960–965.

Clifford G.M., Gallus S., Herrero R *i sar*. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005; 366:991-998.

Cornet I, Gheit T, Franceschi S *i sar*. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012; 86(12):6855–6861.

Daayana S, Elkord E, Winters U *i sar*. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*. 2010; 102(7):1129–1136.

Daniel RW, Ahdieh L, Hayden D, Cu-Uvin S, Shah KV. Intra-laboratory reproducibility of human papillomavirus identification in cervical specimens by a polymerase chain reaction-based assay. *J Clin Virol* 2000; 19:187-193.

Fрати E, Bianchi S, Colzani D, Zappa A, Orlando G, Tanzi E. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). *Infect Genet Evol*. 2011;11(8):2119–24.

de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol*. 2012;126(2):304-311

Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM *i sar.* Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Off. Genes Dev.* 1992;6(7):1131–1142.

Doorbar J., Quint W, The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses, *Vaccine.* 2012; 30S5: F55–F70.

Dubina M, Goldenberg G. Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol.* 2009;31(6):561–573.

Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–1797.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324(1): 17–27.

Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Marnewick JC, Meyerov R, Lemmer J. HPV-associated oral warts. *SADJ.* 2011;66(2):82–85.

Fernandes JV, de Medeiros Fernandes TAA. Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis, Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective, *Dr. Davy Vanden Broeck* (Ed.), 2012.

Ferris RL, Martinez I, Sirianni N *i sar.* Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): A natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer.* 2005;41(5):807–815.

FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2014;125(2): 97–98.

Fontaine V, Mascaux C, Ewyn C *i sar.* Evaluation of Combined General Primer-Mediated PCR Sequencing and Type-Specific PCR Strategies for Determination of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cell Specimens. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:928-934.

Forslund O, Iftner T, Andersson K *i sar.* Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis.* 2007;196(6):876–883.

Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship. *Virology.* 2009; 384(2): 410–414.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and pcna-dependent DNA replication p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997; 11(16):2090–2100.

FUTURE I/II Study Group, Dillner J, Kjaer SK *i sar.* Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial. *BMJ.* 2010; 341:c3493.

González JV, Gutiérrez RA, Keszler A *i sar.* Human papillomavirus in oral lesions. *Medicina (B Aires)* 2007; 67(4):363–368.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ *i sar.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):357–361.

Grulich AE, Jin F, Conway EL, Stein AN, Hocking J. Cancers attributable to human papillomavirus infection. *Sex Health.* 2010; 7(3):244–252.

Guan P, Howell-Jones R, Li N *i sar.* Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer.* 2012; 131(10):2349-2359.

Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 1993; 67(1):315–322.

Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S *i sar.* Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA.* 2007; 298(7):743–753.

Howley P M, Schiller JT, Lowy DR. Papillomaviruses. U Fields Virology. Knipe DM, Howley PM. Eds. 1662-1704. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2013.

Iftner T, Villa LL. Human Papillomavirus Technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31):80-8.

Jančar N, Kocjan BJ, Poljak M, Lunar MM, Bokal EV. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical cancer in Slovenia, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 145(2):184-8.

Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21(Cip1)-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997; 11(16):2101–2111.



Jovanović J, Čupić M, Stanojević M, Knežević A, Lazarević I. Osnovi molekularne virusologije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Quark, Beograd, 2005

Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women, *N Engl J Med*. 2015;372(8):711-723

Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, i sar. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal detection of Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2095-2100.

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR i sar. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*. 2009; 361(19):1838–1847.

Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Apr 6;86(7):494-499.

Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H i sar. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*. 1993;67(12):6929–6936.

Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE i sar. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(10):868–878.

Klingelhutz A, Foster S, McDougall J. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996; 380(6569):79-82

Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K *i sar.* Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res.* 2004;64(18):6766-6774.

Kukimoto I, Muramatsu M. Genetic variations of human papillomavirus type 16: Implications for cervical carcinogenesis. *Jpn J Infect Dis.* 2015;68(3):169-175.

Lace MJ, Anson JR, Klusmann JP *i sar.* Human papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol.* 2011;85(4):1645-1654.

Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(2):348-370.

Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. *Infectious Agents and Cancer.* 2007; 2:1-11.

Leto MD, Santos Júnior GF, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol.* 2011;86(2):306-317.

Lörincz AT. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res* 1996;22(6):629-636.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1167-1173.

McLaughlin JS, Shafritz AB. Cutaneous warts. *J Hand Surg Am.* 2011 Feb;36(2):343-344.

Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, Hesselink AT, Snijders PJ. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J Clin Virol.* 2009;46S3:S1-S4.

Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE *i sar.* Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009;124:516-520.

Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(5):351-60.

Mirabello L, Schiffman M, Ghosh A, *i sar.* Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2013; 132(6):1412-1422.

Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32S1:S43-51.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):550-60.

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

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S *i sar.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.

Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X *i sar.* Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111:278-85.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Cervical Cancer. V 3.2013. dostupno na [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cervical.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cervical.pdf).

Ntova CK, Kottaridi C, Chranioti A *i sar.* Genetic variability and phylogeny of high risk HPV type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 gene in Greek women. *Int J Mol Sci.* 2012;13(1):1-17.

Palefsky JM. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *J Adolesc Health.* 2010;46S4:S12-19.

Patel AS, Karagas MR, Perry AE, Nelson HH. Exposure profiles and human papillomavirus infection in skin cancer: an analysis of 25 genus beta-types in a population-based study. *J Invest Dermatol.* 2008;128(12):2888-2893.

Patel T, Morrison LK, Rady P, Tyring S. Epidermodysplasia verruciformis and susceptibility to HPV. *Dis Markers.* 2010;29(3-4):199-206

Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009 ;105(2):107-108.

Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009 ;105(2):103-104.

Picconi MA, Eiján AM, Distéfano AL *i sar.* Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol.* 2000;61(1):65-69.

Poljak M, Seme K, Maver PJ *i sar.* Human Papillomavirus Prevalence and Type-Distribution, Cervical Cancer Screening Practices and Current Status of Vaccination Implementation in Central and Eastern Europe. *Vaccine.* 2013;31 S7:H59-70.

Rambaut, A. "[http://tree.bio.ed.ac.uk/software/.](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/)" [http://tree.bio.ed.ac.uk/.](http://tree.bio.ed.ac.uk/) 05 12, 2012.<http://tree.bio.ed.ac.uk/download.html?name=figtree&id=89&num=2> (accessed 05 06, 2016).

Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet.* 2002;32(4):579-581.

Rose PG. Combined-modality therapy of locally advanced cervical cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21S10:211s-217s.

Rossi PG, Sideri M, Carozzi FM *i sar.* HPV type distribution in invasive cervical cancers in Italy: pooled analysis of three large studies. *Infectious Agents and Cancer* 2012; 7:26

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-5467.

Sapp M, Day PM. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*. 2009; 384(2): 400-409.

Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, i sar. A population-based prospective study of carcinogenic human papilloma virus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*. 2010;70(8):3159–3169.

Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus, *Vaccine*. 2012; 30S5: F123–F138.

Sideri M, Cristoforoni P, Casadio C, i sar. Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive cervical cancer in Italy: A representative, single institution case series. *Vaccine*. 2009;27S1:30–33.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B i sar. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121:621–32.

Smith PG, Kinlen LJ, White GC, Adelstein AM, Fox AJ. Mortality of wives of men dying with cancer of the penis. *Br J Cancer* 1980;41(3):422–428.

Smits HL, Bollen LJM, Tjong-A-Hung SP. Intermethod Variation in detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Smears. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:2631-2636.

Spangle JM, Ghosh-Choudhury N, Munger K. Activation of cap dependent translation by mucosal human papillomavirus E6 proteins is dependent on the integrity of the LXXLL binding motif. *J Virol*. 2012; 86(14): 7466–7472.

Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res.* 2009;130(3):266-276.

Steinau M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA Extraction for HPV Genotyping in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn.* 2011;13(4):377-381.

Sterling JC. Human papillomaviruses and skin cancer. *J Clin Virol.* 2005;32S1:S67-71.

Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN i sar. Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease, *Vaccine.* 2012;30S5:F71-82.

Strauss, M.J., Shaw, E.W i sar. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949 Oct;72(1):46-50.

Sun C, Reimers LL, Burk RD. Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol.* 2011; 121(1):59–63.

Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ;101(30):11030-11035.

Tao P, Zheng W, Wang Y, Bian ML. Sensitive HPV genotyping based on the flow-through hybridization and gene chip. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012.

Todorova I, Ganchev G, Shikova E. Human papillomavirus prevalence in invasive cervical carcinomas in Bulgaria. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1121-1123.

Tomassino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*.2014; 26: 13–21.

Tornesello ML, Losito S, Benincasa G i sar. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2011 Apr;121(1):32-42.

Tavassoli FA, Devilee P. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press*: Lyon 2003.

van Muyden RC, ter Harmsel BW, Smedts FM i sar. Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women: A prognostic study. *Cancer*. 1999;85(9):2011-2016.

Villa LL, Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynecol Obstet*. 2006; 94S1:S71-S80.

Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, i sar. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*. 2008; 68(1):307–313.

Virus International Humanpapilloma reference center -

[<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>]. Stockholm. [ažurirano 15.02.2015.].  
dostupno na -[<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>]



Welters MJ, Kenter GG, de Vos van Steenwijk PJ *i sar.* Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(26):11895-11899

Wikström A, van Doornum GJ, Quint WG, Schiller JT, Dillner J. Identification of human papillomavirus seroconversions. *J Gen Virol* 1995;76(Pt3):529–539

Wong OGW, Lo CK, Chow JNK *i sar.* Comparison of the genoflow human papillomavirus (HPV) test and the linear array assay for HPV screening in an Asian population. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1691–1697.

Yamada T, Manos MM, Peto J *i sar.* Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997;71(3):2463–2472.

Zuna RE, Moore WE, Shanesmith R *i sar.* Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int J Cancer.* 2009;125(11):2609–2613.

zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288(2):F55–F78.

Zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 2009; 384(2):260-265

**Skraćenice korišćene u tekstu**

ASCUS - engl. atypical squamous cytology of undetermined significance

ATP - adenzin-trifosfat

ATR - engl. A+T rich region

BPV1 - goveđi (bovini) papiloma virus-1

CIN- cervikalna intraepitelna neoplazija

CKII - kazein kinaza II

CTL - citotoksični T limfociti

ddNTP - didezoksiribonukleotidi

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DSR - engl. region of dyad symmetry

E gen- engl. "early" gen

EMA - engl. European Medicines Agency

EV- Epidermodisplasia verruciformis

FAK - fokalna adhezijska kinaza

FDA - engl. Food and Drug Administration

HC2 - engl. Hybrid Capture Assay

HPV - Humani papiloma virusi

HSIL - engl. High-grade squamous intraepithelial lesion

HSPG - heparan sulfat proteoglikani

ICTV - engl. International Committee on Taxonomy of Viruses

iRNK - informacijska ribonukleinska kiselina

L gen- engl. "late" gen

LBA - *engl.* Line blot assay

LCR - *engl.* Long Control Region

LEEP - *engl.* loop electrosurgical excision procedure

LiPA - *engl.* Line probe assay

LSIL - *engl.* Low-grade squamous intraepithelial lesion

MHC - *engl.* Major histocompatibility complex

NRE - *engl.* nuclear retention element

NuMa - *engl.* nuclear mitotic apparatus protein 1

ORF - *engl.* Open Reading Frame

PCNA - *engl.* nuklearni antigen proliferacije ćelija

PCR - *engl.* Polymerase Chain Reaction

PDT - *engl.* photodynamic therapy

qPCR - *engl.* Real Time PCR

RFLP - *engl.* Restriction fragment length polymorphism

RNK - ribonukleinska kiselina

RT-PCR - *engl.* Reverse transcriptase PCR

SZO - Svetska zdravstvene organizacija

TLR - receptor sličan toll-u

Treg - T regulatorne ćelije

URR - *engl.* Upstream Regulatory Region

UTR - *engl.* untranslated region

VAIN - vaginalna intraepitelna neoplazija

VIN - vulvarna intraepitelna neoplazija

VLP - *engl.* virus like particle

VLP - *engl.* virus like particle

**Spisak simbola kojima se skraćeno označavaju aminokiseline:**

Aminokiselina	Simbol (1 slovo)	Simbol (3 slova)
Glicin	G	Gly
Alanin	A	Ala
Serin	S	Ser
Prolin	P	Pro
Valin	V	Val
Treonin	T	Thr
Cistein	C	Cys
Leucin	L	Leu
Izoleucin	I	Ile
Asparagin	N	Asn
Asparatinska kiselina	D	Asp
Glutamin	Q	Gln
Lizin	K	Lys
Glutaminska kiselina	E	Glu
Metionin	M	Met
Histidin	H	His
Fenilalanin	F	Phe
Arginin	R	Arg
Tirozin	Y	Tyr
Triptofan	W	Trp

Prilog 1.

*Tabela 18. Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih izolata HPV E1gena genotipa HPV 16 u odnosu na referentne linije i podlinije*

	K02718 -A1	HQ644 236-A3	AF536 179-A2	AF534 061-A4	AF472 509-C	9472	8z	7602	7096	6934	6570	6235	5z	5829	5734	5635	5463
K02718-A1(E-A/E)																	
HQ644236-A3(E-A/E)	0.0053																
AF536179-A2(E-A/E)	0.0000	0.0053															
AF534061-A4(E-A/As)	0.0106	0.0106	0.0106														
AF472509-C(Afr2a)	0.0189	0.0246	0.0189	0.0302													
9472-E1_gen_(tip_16)	0.0217	0.0274	0.0217	0.0274	0.0026												
8z-E1_gen_(tip16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217											
7602-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000										
7096-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000									
6934-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000								
6570-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000							
6235-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000						
5z-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
5829-E1_gen_(tip_16)	0.0026	0.0080	0.0026	0.0134	0.0218	0.0246	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026				
5734-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026			
5635-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000		
5463-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0053	0.0000	0.0106	0.0189	0.0217	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0000	0.0000	



*Tabela 18 (nastavak). Nukleotidne distance (% nukleotidne sličnosti) identifikovanih izolata HPV E1gena genotipa HPV 16 u odnosu na referentne linije i podlinije*

	K02718-	HQ644236	AF536179-	AF534061-	AF472509-	3033	2z	2688	25z	247	2188	1680	1137	11324	10707	10694	10654
K02718-A1																	
HQ644236-A3	0.0052																
AF536179- A2	0.0000	0.0052															
AF534061- A4	0.0105	0.0105	0.0105														
AF472509- C(Afr2a)	0.0214	0.0270	0.0214	0.0325													
3033-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214												
2z-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000											
2688	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000										
25z-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000									
247-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000								
2188-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000							
1680-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000						
1137-	0.0026	0.0079	0.0026	0.0132	0.0241	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026					
11324-	0.0053	0.0106	0.0053	0.0160	0.0271	0.0053	0.0053	0.0053	0.0053	0.0053	0.0053	0.0053	0.0079				
10707-	0.0026	0.0079	0.0026	0.0132	0.0242	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0052	0.0026			
10694-	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0053	0.0026		
10654-E1_gen_(tip_16)	0.0000	0.0052	0.0000	0.0105	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026	0.0053	0.0026	0.0000	

## **Biografija**

Miodrag Stamenković rođen je 14.02.1976. u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i VI beogradsku gimnaziju.

Medicinski fakultet univerziteta u Beogradu je završio u martu 2002. godine sa prosečnom ocenom 9, 51. Specijalistički ispit iz Mikrobiologije sa parazitologijom položilo je u oktobru 2008. godine sa odličnim uspehom. Doktorske studije studijskog programa Molekularna medicina upisao je školske 2009./2010 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Tokom 2002 godine učestvovao je na projektu "Istraživanje genetske osnove neuroloških bolesti: genotipsko-fenotipske korelacije" koji je vodio Akademik Prof.dr Vladimir Kostić. Od novembra 2003. godine zaposlen je u mikrobiološkoj laboratoriji Zavoda za farmaciju Srbije (danas Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije-ALIMS). Od septembra 2007. godine radi u farmaceutskom sektoru ALIMS, gde radi procenu dokumentacije o kvalitetu vakcina i bioloških lekova. Od aprila 2016. radi u sektoru za efikasnost i bezbednost leka, gde radi procenu pretkliničke i kliničke dokumentacije o leku. Tokom specijalizacije iz mikrobiologije sa parazitologijom, 2006. i 2007. godine radio je kao stručni konsultant na Odeljenju za parazitologiju sa mikologijom (Institut za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu). Od aprila 2014. godine nalazi se na spisku eksperata Ministarstva zdravlja Republike Srbije, za postupke utvrđivanja usaglašenosti proizvodnje lekova (vaccine) sa Smernicama Dobre Proizvođačke Prakse. U julu 2014. imenovan je za spoljnjeg asesora u postupku izdavanja CEP sertifikata za sterilne aktivne supstance u evropskoj upravi za kvalitet lekova (European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare) Saveta Evrope.

Autor je više publikacija iz oblasti mikrobiologije, od čega tri objavljena *in extenso* u časopisima međunarodnog značaja.



## Izjava o autorstvu

Potpisani-a \_\_\_\_\_ Miodrag Stamenković \_\_\_\_\_

broj upisa \_\_\_\_\_ MM-12/09 \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Genotipska i intragenotipska varijabilnost humanih papiloma virusa

---

u tkivima karcinoma grlića materice"

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/~~la~~ autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_ 05.07.2016. \_\_\_\_\_



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Miodrag Stamenković

Broj upisa MM-12/09

Studijski program molekularna medicina

Naslov rada "Genotipska i intragenotipska varijabilnost humanih papiloma virusa u tkivima karcinoma grlića materice"

Mentor Prof. dr Aleksandra Knežević

Potpisani Miodrag Stamenković

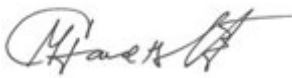
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 05.07.2016.



## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

"Genotipska i intragenotipska varijabilnost humanih papiloma virusa u tkivima karcinoma grlića materice"

koja je moje autorsko delo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

**3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 05.07.2016.



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.