

P1 20864

Ug 34367567

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Analiza p53 gena i HPV infekcija
u karcinomima grlića materice i jajnika



Doktorska disertacija

Emina Mališić

Beograd, 2010.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ" БЕОГРАД
И. Бр. 163358



Mentor:

dr Dušanka Savić Pavićević, docent
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Radmila Janković, naučni saradnik
Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Siniša Radulović, naučni savetnik
Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Doktorska disertacija je rađena u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Zahvaljujem se:

Dr Radmili Janković, NS, dr Dušanki Savić Pavićević, doc. i dr Marini Stamenković-Radak, van. prof na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Dr Siniši Raduloviću, NSav na podršci mladim istraživačima i pozitivnoj energiji koje daje Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju.

Dr Mirjani Branković-Magić, VNS na pomoći u prvim koracima moga eksperimentalnog i naučnog rada.

Kolegama iz Laboratorije za molekularnu genetiku na prijatnoj atmosferi i spremnosti za saradnju.

Dušici Gavrilović, dipl. matematičaru-biostatističaru na pomoći oko statističke obrade rezultata.

Prof. dr Vesni Kesić i dr Ani Jovićević na saradnji i pomoći oko razjašnjavanja termina iz ginekologije i epidemiologije.

Dr Milanki Petrović Mojsilović, ginekologu-akušeru, svome lekaru i prijatelju i osobi kojoj bih volela da ovim doktoratom uzvratim deo onoga što je učinila za mene.

Svojim profesorkama Savki Milošević i Branki Dobrković, koje su mi razvile ljubav ka biologiji.

I iznad svega svojim roditeljima, prijateljima i svima koji su me voleli i dali mi snage da istrajem.

Sažetak

Uvod: Ginekološki maligniteti predstavljaju veoma raznoliku grupu kancera, među kojima su najučestaliji karcinomi grlića materice a najsmrtonosniji karcinomi jajnika.

Podaci o povezanosti p53 mutacija (*TP53* po HUGO nomenklaturi), polimorfizma kodona 72 i infekcije humanim papiloma virusima (HPV) sa kliničko-histopatološkim karakteristikama, nastankom ovih maligniteta, kao i odgovorom na antikancersku terapiju su kontradiktorni. Malo se zna o međusobnoj povezanosti *TP53* mutacija, polimorfizma kodona 72 i HPV infekcije. Zato postoji potreba za ispitivanjem pomenutih potencijalnih biomarkera ovih maligniteta.

Cilj: Ispitivanje povezanosti *TP53* mutacija, polimorfni varijanti kodona 72 i HPV infekcije sa demografskim karakteristikama, kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma grlića materice i karcinoma jajnika i karakteristikama bolesnica sa ovim karcinomima, kao i ispitivanje međusobne povezanosti pomenutih potencijalnih biomarkera i njihovog uticaja na antikancersku terapiju.

Materijal i metode: U radu su analizirana 53 uzorka karcinoma grlića materice i 54 uzorka karcinoma jajnika. Kontrolnu grupu činilo je 95 uzoraka briseva grlića materice žena sa urednim ginekološkim i normalnim Papa nalazom, kao i odsustvom prethodne istorije postojanja prekancerskih i kancerskih lezija ginekološke regije. DNK je izolovana metodom isoljavanja. Egzoni 4-8 *TP53* gena su amplifikovani lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Preliminarni skrining mutacija vršen je metodom konformacionog polimorfizma jednolančane DNK (SSCP), a automatskim sekvenciranjem DNK je potvrđivano prisustvo i utvrđivan tip mutacija. Polimorfizam kodona 72 *TP53* gena je ispitivan analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP). Prisustvo HPV infekcije je detektovano putem amplifikacije dela L1 virusnog gena. HPV16 i HPV18 tipovi u karcinomima grlića materice su detektovani amplifikacijom dela E7, odnosno E1 virusnih gena, dok je genotipizacija HPV u karcinomima jajnika vršena sekvenciranjem DNK. Za statističku obradu podataka korišćeni su Fišerov egzaktni, χ^2 , odds ratio i Log-Rank test.

Rezultati: Kod 53 uzorka karcinoma grlića materice detektovana je jedna mutacija u egzonomima 4-8 *TP53* gena (1,9%), dok je u 54 uzorka karcinoma jajnika detektovano šest (11,1%). U 3/107 (2,8%) ispitivanih karcinoma detektovana je g.14394G>A sekvencionarna varijanta u intronu 7. U karcinomima jajnika, mutacije u *TP53* genu nisu bile statistički značajno povezane sa ispitivanim kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma i karakteristikama bolesnica, ali je uočena viša zastupljenost *TP53* mutacija u karcinomima ne-seroznih u odnosu na serozni podtip, kao i u bolesnica u premenopauzi u odnosu na one u postmenopauzi.

Raspodela Arg/Arg, Arg/Pro i Pro/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena bila je: 33/53 (62,3%), 19/53 (35,8%) i 1/53 (1,9%) u karcinomima grlića materice, 25/54 (46,3%), 23/54 (42,6%) i 6/54 (11,1%) u karcinomima jajnika i 59/95 (62,1%), 29/95 (30,5%) i 7/95 (7,4%) u kontrolnoj grupi. Pokazano je da su nosioci Arg alela u povišenom riziku za nastanak karcinoma grlića materice, dok su nosioci Pro alela u višem riziku za

nastanak karcinoma jajnika. U karcinomima grlića materice pokazana je tendencija više zastupljenosti Arg/Arg genotipa od dobro ka slabo diferentovanim tumorima, dok je u karcinomima jajnika Pro/Pro genotip statistički značajno povezan sa dediferentovanim tumorima i sa ne-seroznim histološkim podtipovima. Arg/Arg genotip pokazuje tendenciju ranijeg javljanja karcinoma grlića materice, a Pro alel karcinoma jajnika.

HPV infekcija bila je prisutna u 30/48 (62,5%) karcinoma grlića materice, od čega je 28/48 (58,3%) tumora bilo inficirano sa HPV16, a 8/48 (16,7%) sa HPV18. Višestruka infekcija (HPV16 plus HPV18) bila je zastupljena u 7/48 (14,6%) karcinoma grlića materice. HPV infekcija bila je prisutna u 4/54 (7,4%) karcinoma jajnika, pri čemu su svi HPV-pozitivni tumori bili HPV16 tipa. HPV infekcija u karcinomima grlića materice je zastupljenija u dobro i umereno diferentovanim tumorima, a u karcinomima jajnika u uznapredovalim stadijumima bolesti. Odsustvo HPV infekcije pokazuje tendenciju ranijeg javljanja karcinoma grlića materice, dok je kod karcinoma jajnika suprotno.

Povezanost odgovora na radioterapiju karcinoma grlića materice u odnosu na potencijalne biomarkere nismo pratili, jer se kod samo dve od 29 bolesnica u periodu praćenja od 5 do 87 meseci (medijana 44) javio relaps bolesti. Obe bolesnice sa relapsom su bile Arg/Arg genotipa kodona 72 i HPV-pozitivnih tumora. Jedna je imala promenu u intronu 7 *TP53* gena (g.14394G>A). U karcinomima jajnika, bolesnice sa mutacijama u *TP53* genu, Arg/Arg genotipom kodona 72 i odsustvom HPV infekcije imale su bolji stepen tumorskog odgovora u toku ili po primljenoj platin-taksanskoj hemioterapiji, ali nije postojala statistički značajna razlika u vremenu bez progresije bolesti u odnosu na ispitivane biomarkere.

Međusobna povezanost mutacija u *TP53* genu, polimorfni varijanti kodona 72 i HPV infekcije nije utvrđena, izuzev višestruke infekcije koja je bila prisutna samo u Arg/Arg genotipa. Ipak, uočena je tendencija više zastupljenosti mutacija u Pro/Pro genotipu u karcinomima jajnika.

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju da je na osnovu *TP53* genskog statusa i prisustva/odsustva HPV infekcije moguće izdvojiti podgrupe žena koje imaju viši rizik za nastanak karcinoma grlića materice/jajnika, pojavu agresivnijeg fenotipa i bolji inicijalni odgovor na antikancersku terapiju. To bi doprinelo ranijem otkrivanju bolesti i/ili adekvatnijem praćenju bolesnica, kao i individualnom terapijskom pristupu.

Ključne reči: karcinom grlića materice, karcinom jajnika, *TP53* gen, polimorfizam kodona 72, HPV

Abstract

Introduction: Gynecological malignancies present a various group of cancers; among them the most frequent are carcinomas of cervix and the most aggressive are ovarian carcinomas. Conflicting data about correlation of *TP53* mutations, codon 72 polymorphism and HPV infection with clinicopathological characteristics, the origin of these malignancies and with the response to anti-cancer therapy, as well as correlation between mentioned biomarkers, are pointing out the necessity of analysis of these biomarkers.

Goal: Examination of correlation of *TP53* mutations, codon 72 polymorphic variants and HPV infection with demographic features, clinicopathological characteristics of ovarian and cervical carcinomas, patient's characteristics, as well as examination of interconnection of these biomarkers and their possible predictive values to anti-cancer therapy.

Material and methods: 53 samples of cervical carcinomas and 54 samples of ovarian carcinomas were analyzed. Control group was consisted of 95 cervical smears of gynecological healthy women with normal Papa test results and without previous history of pre- and cancer lesion of gynecological region. DNA was extracted by salting-out procedure. Exons 4-8 of *TP53* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Preliminary screening of mutations was done by single strand conformation polymorphism (SSCP) and automatic DNA sequencing was employed to confirm the presence and establish the type of mutation. Codon 72 polymorphism was assessed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP). Presence of HPV infection was detected through amplification of one part of L1 viral gene. Types HPV16 and HPV18 in cervical carcinomas were detected by amplification of one part of E7 or E1 viral gene, while HPV genotyping in ovarian carcinomas were performed by DNA sequencing. Fisher exact, χ^2 , odds ratio and Log-Rank tests were employed for statistical analysis.

Results: Analysis of exons 4-8 of *TP53* gene revealed the presence of one mutation in 53 samples of cervical carcinomas (1.9%) and six mutations in 54 samples of ovarian carcinomas (11.1%). In 3/107 (2.8%) of examined carcinomas, sequence variant g.14394G>A in intron 7 was detected. In ovarian carcinomas, correlation between *TP53* gene mutations and clinicopathological characteristics of tumors and patients did not reach statistical significance. Higher frequency of *TP53* mutations was observed in non-serous carcinomas vs. serous type and in pre menopausal patients vs. post menopausal patients.

The distribution of Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro genotypes of codon 72 of *TP53* gene was: 33/53 (62.3%), 19/53 (35.8%) and 1/53 (1.9%) in the cervical carcinomas, 25/54 (46.3%), 23/54 (42.6%) and 6/54 (11.1%) in ovarian carcinomas and 59/95 (62.1%), 29/95 (30.5%) and 7/95 (7.4%) in the control group. It was shown that carriers of the Arg allele are having an increased risk of developing cervical carcinomas, while the carriers of Pro allele are at a higher risk of developing ovarian carcinomas. In cervical carcinomas

it was shown a tendency to growing presence of the Arg/Arg genotype of the well to poorly differentiated tumors, whereas in ovarian carcinomas Pro/Pro genotype was significantly associated with poorly differentiated tumors and non-serous histological subtypes. Arg/Arg genotype showed a tendency of an earlier occurrence of cervical carcinomas, while in ovarian carcinomas the similar tendency showed Pro allele.

HPV infection was present in 30/48 (62.5%) cervical carcinomas, of which 28/48 (58.3%) tumors were infected with HPV16, and 8/48 (16.7%) with HPV18. Multiple infections (HPV16 plus HPV18) were present in 7/48 (14.6%) cervical carcinomas. HPV infection was present in 4/54 (7.4%) ovarian carcinomas, whereas all HPV-positive tumors were HPV16 type. HPV infection in cervical carcinomas is common in well and moderately differentiated tumors, whereas in ovarian carcinomas was more frequent in advanced stages of the disease. The absence of HPV infection indicates earlier occurrence of cervical carcinomas, while is the opposite case in ovarian carcinomas.

The correlation of response to radiotherapy of cervical carcinomas in relation to the potential biomarkers is not followed, because in only two of 29 patients during follow-up of 5 to 87 months (median 44) relapse of the disease were reported. Both patients with relapse were Arg/Arg genotype of codon 72 and were having HPV-positive tumors. One patient had an alteration in intron 7 of *TP53* gene (g.14394G>A). In ovarian carcinomas, patients with mutations in the *TP53* gene, Arg/Arg genotype of codon 72 and the absence of HPV infection had a better response rate during or after platinum-taxane chemotherapy, but there was no statistically significant difference in progression free interval in relation to the examined biomarkers.

Correlation between *TP53* gene mutation, polymorphic a variant of codon 72 and HPV infection was not confirmed, except multiple infection, present only within Arg/Arg genotype. However, it was shown a tendency of higher frequency of mutation within Pro/Pro genotype in ovarian carcinomas.

Conclusion: The results indicate that based on the *TP53* gene status and the presence/absence of HPV infection the subgroups of women having a higher risk for the occurrence of cervical/ovarian carcinoma, more aggressive phenotype and better initial response to anti-cancer therapy, could be distinguished. This would contribute to earlier detection of disease and/or more adequate treatment of patients, as well as individual therapeutic approach.

Key words: cervical carcinoma, ovarian carcinoma, *TP53* gene, codon 72 polymorphism, HPV

LISTA SKRAĆENICA:

- HPV** humani papiloma virusi
- LSIL** nisko-gradusna intraepitelna lezija (eng. *low-grade squamous intraepitel*)
- HSIL** visoko-gradusna intraepitelna lezija (eng. *high-grade squamous intraepitel lesion*)
- CIN** cervikalna intraepitelna neoplazija (eng. *cervical intraepithelial neoplasia*)
- FIGO** (fra. *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstretique*)
- CA125** tumor marker CA125 (eng. *cancer antigen 125*)
- MAP** protein pridružen mikrotubulama (eng. *microtubule-associated proteins*)
- wt** divlji tip (eng. *wild-type*)
- MDR** (eng. *multiple drug resistance*)
- E6-AP** (eng. *E6-associated protein*)
- PCR** lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*)
- SSCP** polimorfizam konformacije jednolančanih fragmenata DNK (eng. *single stranded conformation polymorphism*)
- IARC** (eng. *International Agency for Research on Cancer*)
- RFLP** polimorfizam dužina restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*)
- OR** (eng. *odds ratio*)
- CI** intervali poverenja (eng. *confidence interval*)
- PFI** vremena bez progresije bolesti (eng. *progression-free interval*)
- RR** stepen tumorskog odgovora (eng. *response rate*)
- CR** (eng. *complete response*)
- PR** (eng. *partial response*)
- OS** ukupno preživljavanje (*overall survival* – OS)
- DFS** preživljavanje bez znakova bolesti (*disease free survival*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KARCINOM GRLIČA MATERICE	1
1.1.1. KLASIFIKACIJA KARCINOMA GRLIČA MATERICE.....	1
1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA GRLIČA MATERICE	2
1.1.3. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA GRLIČA MATERICE	2
1.1.4. FAKTORI PROGNOZE.....	5
1.2. KARCINOM JAJNIKA.....	5
1.2.1. KLASIFIKACIJA TUMORA JAJNIKA	5
1.2.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA JAJNIKA	6
1.2.3. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA.....	6
1.2.4. FAKTORI PROGNOZE.....	8
1.2.4.1. CA125 TUMOR MARKER.....	8
1.2.5. GENETIČKE PROMENE U KARCINOMIMA JAJNIKA	9
1.2.5.1. MODEL TUMOROGENEZE JAJNIKA.....	9
1.2.6. HEMIOTERAPIJA KARCINOMA JAJNIKA	11
1.2.6.1. MEHANIZAM DELOVANJA PLATINSKIH DERIVATA I TAKSANA	11
1.3. MEHANIZMI MALIGNE TRANSFORMACIJE.....	12
1.4. P53 TUMOR-SUPRESOR: STRUKTURA I FUNKCIJA.....	12
1.4.1. STRUKTURA P53 PROTEINA	12
1.4.2. FUNKCIJE P53 PROTEINA	13
1.4.2.1. ULOGA P53 PROTEINA U KONTROLNIM TAČKAMA ĆELIJSKOG	14
CIKLUSA	14
1.4.2.2. ULOGA P53 PROTEINA U APOPTOZI.....	15
1.4.3. REGULACIJA P53 AKTIVNOSTI	17
1.4.3.1. INTERAKCIJA SA DRUGIM PROTEINIMA.....	17
1.4.3.2. POSTTRANSLACIONE MODIFIKACIJE P53	17
1.4.4. MUTACIJE U <i>TP53</i> GENU	18
1.4.5. POLIMORFIZMI <i>TP53</i> GENA.....	19
1.4.5.1. POLIMORFIZAM KODONA 72 <i>TP53</i> GENA	20
1.5. HUMANI PAPILOMA VIRUSI	22
1.5.1. KLASIFIKACIJA HPV I ORGANIZACIJA VIRUSNOG GENOMA	22
1.5.2. TOK HPV INFEKCIJE	23
1.5.3. ULOGA E6 I E7 PROTEINA U ONKOGENEZI	24
2. CILJ RADA	27
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. UZORCI.....	28
3.2. IZOLOVANJE DNK METODOM ISOLJAVANJA	29
3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNK	31
3.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE	32
3.5. ELEKTROFOREZA U AGAROSNOM GELU	35
3.6. ELEKTROFOREZA DNK U POLIAKRILAMIDNOM GELU - PAGE.....	37
3.6.1. POLIMORFIZAM KONFORMACIJE JEDNOLANČANIH FRAGMENTA DNK	38
- SSCP.....	38
3.7. AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK.....	41
3.7.1. PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA	41
3.7.2. PCR ZA SEKVENCIRANJE	42

3.7.3. PRIPREMA UZORKA ZA KAPILARNU ELEKTROFOREZU.....	43
3.7.4. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	44
3.7.5. ANALIZA SEKVENCI.....	45
3.8. ANALIZA POLIMORFIZAMA DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTATA	45
3.9. STATISTIČKA ANALIZA	46

4. REZULTATI.....	47
4.1. MUTACIJE U <i>TP53</i> GENU	47
4.1.1. MUTACIJE U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE.....	48
4.1.1.1. UČESTALOST I TIP MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA.....	48
4.1.1.2. POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA SA KLINIČKO- HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA	48
4.1.2. MUTACIJE U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA U KARCINOMIMA JAJNIKA	49
4.1.2.1. UČESTALOST I TIP MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA.....	49
4.1.2.2. POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA SA KLINIČKO- HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA.....	50
4.1.2.3. POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 <i>TP53</i> GENA SA KARAKTERISIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA	51
4.2. POLIMORFIZAM KODONA 72 <i>TP53</i> GENA	52
4.2.1. RASPODELA POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA U GRUPI BOLESNICA SA KARCINOMOM GRLIĆA MATERICE	52
4.2.2. RASPODELA POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA U GRUPI BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA	52
4.2.3. RASPODELA POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA U KONTROLNOJ GRUPI.....	53
4.2.4. UTICAJ POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA NA NASTANAK KARCINOMA GRLIĆA MATERICE	53
4.2.5. UTICAJ POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA NA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA	55
4.2.6. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE.....	56
4.2.7. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA SA KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM GRLIĆA MATERICE	57
4.2.8. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> SA KLINIČKO- HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA	57
4.2.9. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> SA KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA	59
4.3. HPV INFEKCIJA	59
4.3.1. HPV INFEKCIJA U KARCINOMA GRLIĆA MATERICE	60
4.3.1.1. UČESTALOST I TIP HPV INFEKCIJE	60
4.3.1.2. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE.....	60
4.3.1.3. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KARAKTERISIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM GRLIĆA MATERICE	61
4.3.2. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA JAJNIKA.....	61
4.3.2.1. UČESTALOST I TIP HPV INFEKCIJE	61
4.3.2.2. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA	62
4.3.2.3. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KARAKTERISIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA.....	63

4.3.3. HPV INFEKCIJA U KONTROLNOJ GRUPI.....	63
4.4. UTICAJ MUTACIJA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA RADIOTERAPIJU KARCINOMA GRLIĆA MATERICE ...	64
4.5. UTICAJ MUTACIJA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA PLATIN-TAKSANSKU HEMIOTERAPIJU KARCINOMA JAJNIKA	64
4.5.1. STEPEN TUMORSKOG ODGOVORA U ODNOSU NA PRISUSTVO/ODSUSTVO MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU, GENOTIP KODONA 72 <i>TP53</i> GENA I PRISUSTVO HPV	65
4.5.2. VREME BEZ PROGRESIJE BOLESTI U ODNOSU NA PRISUSTVO/ODSUSTVO MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU, GENOTIP KODONA 72 <i>TP53</i> GENA I PRISUSTVO HPV	66
4.6. POVEZANOST IZMEĐU MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE	68
5. DISKUSIJA.....	69
5.1. ZNAČAJ ISPITIVANJA POTENCIJALNIH MOLEKULARNIH MARKERA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMA JAJNIKA	69
5.2. UČESTALOST MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMIMA JAJNIKA	71
5.3. TIP MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMIMA JAJNIKA	75
5.4. UTICAJ POLIMORFIZMA KODONA 72 <i>TP53</i> GENA U NASTANKU KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMA JAJNIKA	80
5.5. POVEZANOST MUTACIJA I POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 <i>TP53</i> GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA I JAJNIKA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA.....	85
5.6. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE.....	87
5.7. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA JAJNIKA	89
5.8. UTICAJ MUTACIJA <i>TP53</i> GENA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA RADIOTERAPIJU KARCINOMA GRLIĆA MATERICE ...	91
5.9. UTICAJ MUTACIJA <i>TP53</i> GENA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA HEMIOTERAPIJU KARCINOMA JAJNIKA	93
5.10. POVEZANOST IZMEĐU MUTACIJA U <i>TP53</i> GENU, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE	97
6. ZAKLJUČCI.....	99
LITERATURA.....	101

1. UVOD

Ginekološki maligniteti predstavljaju veoma raznoliku grupu kancera reproduktivnog sistema i ozbiljan zdravstveni problem žena. Među malignitetima ginekološke regije najzastupljeniji su karcinomi grlića materice, a najsmrtonosniji karcinomi jajnika.

U malignim tumorima, najučestalije somatske genske promene su mutacije u p53 genu (*TP53* po HUGO nomenklaturi) koje mogu da naruše ili izmene funkciju p53 proteina i vode kancerogenezi. Polimorfizmi *TP53* gena, prvenstveno kodona 72, u poslednjih desetak godina se povezuju sa nastankom nekih tipova kancera.

Infekcija visoko-rizičnim tipovima humanih papiloma virusa (HPV) ima ključnu ulogu u razvoju karcinoma grlića materice, a pojavljuju se i podaci o eventualnom uticaju HPV infekcije u etiologiji karcinoma jajnika.

Povezanost *TP53* mutacija, polimorfizma kodona 72 i HPV infekcije sa kliničko-histopatološkim karakteristikama i prognozom ovih maligniteta, kao i odgovorom na antikancersku terapiju nije razjašnjena. Malo je i podataka o međusobnoj povezanosti *TP53* mutacija, polimorfizma kodona 72 i HPV infekcije. Sve ovo ukazuje na potrebu za ispitivanjem pomenutih potencijalnih molekularnih markera ovih maligniteta.

1.1. KARCINOM GRLIĆA MATERICE

1.1.1. KLASIFIKACIJA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

Epitelni tumori grlića materice uključuju spektar invazivnih skvamoznih i žlezdanih karcinoma i njihovih intraepitelnih prekursorskih lezija. 85-90% karcinoma grlića materice čine skvamozni ćelijski karcinomi, koji nastaju neoplastičnom transformacijom pločastog epitela. Preostalih 10-15% su adenokarcinomi, nastali transformacijom cilindričnog epitela koji pokriva unutrašnjost kanala grlića materice i žlezde (Tavassoli and Devilee, 2003). Pomenuti karcinomi nastaju iz prekursorskih lezija, koje se klasifikuju na osnovu stepena ćelijske abnormalnosti. Skvamozni ćelijski karcinomi nastaju od nisko-gradusnih i visoko-gradusnih intraepitelnih lezija (eng. *low-grade squamous intraepitel lesion* - LSIL i eng. *high-grade squamous intraepitel lesion* - HSIL) (Bethesda sistem klasifikacije, 2001), a adenokarcinomi od adenokarcinoma *in situ*. LSIL se po CIN (eng. *cervical intraepithelial neoplasia* - CIN) sistemu klasifikacije označavaju i kao CIN1, a HSIL kao CIN2/CIN3 (Burd, 2003). Glavnina LSIL-a regredira spontano, dok se 10-20% HSIL-a razvija u invazivne karcinome (Heilmann and Kreienberg, 2002).

Prilikom dijagnostike karcinoma grlića materice vrši se podela na histološke tipove, graduse tumora i FIGO stadijume. Gradusi označavaju stepen dediferenciranosti tumora (G1 - dobro diferentovan, G2 - umereno diferentovan, G3 - slabo diferentovan tumor).

FIGO (*Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstretique*) klasifikacija se odnosi na proširenost bolesti i vrši se na sledeći način:

I - karcinom grlića ograničen na matericu (širenje na telo nema značaja za stažiranje),

- II - tumor se širi van materice ali ne do zida pelvisa ili na donju trećinu vagine,
- III - tumor se širi do zida pelvisa, zahvata donju trećinu vagine, ili uzrokuje hidronefrozu ili afunkciju bubrega,
- IVA - tumor vrši invaziju mukoze bešike ili rektuma ili se širi van male karlice,
- IVB - udaljene metastaze.

1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

Karcinom grlića materice je, posle kancera dojke, drugo po učestalosti maligno oboljenje u žena. Više od 80% slučajeva ovog oboljenja se javlja u nerazvijenim zemljama sveta, gde čini 15% maligniteta u žena, sa rizikom za razvoj pre 65-te godine života od 1,5% (Parkin et al., 2005). U razvijenim zemljama, karcinom grlića materice čini oko 3,6% novodijagnostikovanih kancera, sa rizikom za razvoj pre 65-te godine života od 0,8% (Parkin et al., 2005).

Najviša incidenca karcinoma grlića materice je u podsaharskim predelima Afrike, Maleziji, Latinskoj Americi i Karibima, jugocentralnoj Aziji i jugoistočnoj Aziji (Parkin et al., 2005). Standardizovana stopa incidence varira od 10 na 100 000 po godini u industrijalizovanim zemljama do preko 40 na 100 000 po godini u zemljama u razvoju. Četiri od pet novootkrivenih slučajeva se javlja u zemljama u razvoju (Ferenczy and Franco, 2002). Veoma niska incidenca ovog maligniteta je u Kini i Zapadnoj Aziji, a najniža incidence od 0,4 na 100 000 je uočena u Ardabilu u Severoistočnom Iranu (Sadjadi et al., 2003). Standardizovana stopa incidence karcinoma grlića materice u Srbiji je 27,2 na 100 000 žena (Kesić et al., 2007).

Najveća učestalost karcinoma grlića materice je između 40 i 50 godine života (Schiffman and Castle, 2005).

1.1.3. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

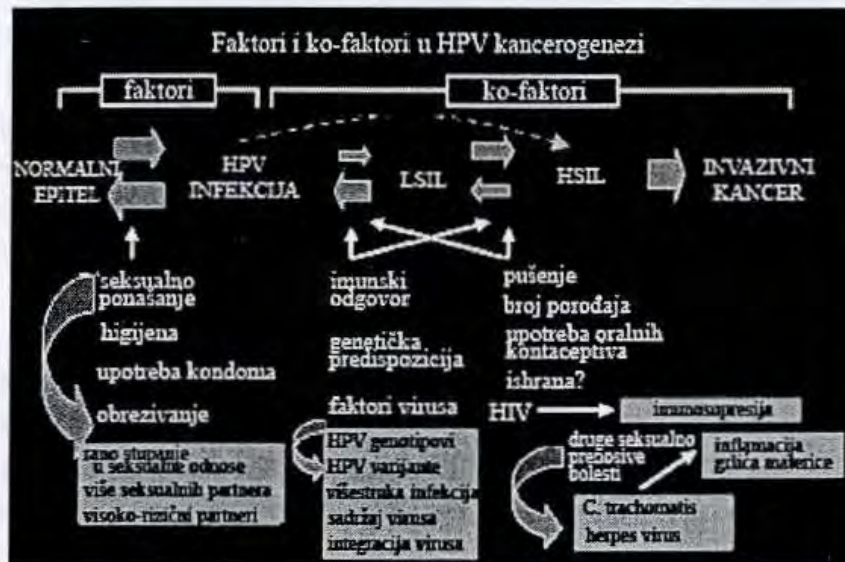
Epidemiološke studije su utvrdile više faktora koji doprinose nastanku karcinoma grlića materice:

1. Humani papiloma virusi (HPV)

Infekcija nekim od visoko-rizičnih, tzv. onkogenih tipova HPV-a je glavni faktor u nastanku karcinoma grlića materice. HPV DNK se detektuje u 99,7% karcinoma grlića materice. Od toga u 50% slučajeva je prisutna infekcija sa HPV16 tipom, a u oko 20% sa HPV18 (Roden and Wu, 2006).

HPV su najučestaliji uzročnici seksualno prenosivih bolesti, kako u žena, tako i u muškaraca (Burd, 2003). Smatra se da je 10,5% žena zaraženo sa HPV (Clifford et al., 2005), ali samo mali broj njih razvija neoplastične lezije ili eventualno kancer. Mnogi slučajevi HPV infekcija se efikasno uklanjaju imunološkim odgovorom u periodu od 8 do 12 meseci (Tommasino et al., 2003). Međutim, i u slučajevima perzistentne HPV

infekcije, postoji period latencije od nekoliko do više od 10 godina do razvoja karcinoma grlića materice (Motoyama et al., 2004). Ovo sugerše na postojanje drugih faktora i ko-faktora koji vode malignoj transformaciji (Slika 1).



Slika 1. Faktori i ko-faktori u karcinogenezi grlića materice (modifikovano prema Castellsaqué et al., 2002).

2. Seksualno ponašanje

Rizici za nastanak karcinoma grlića materice su stupanje u seksualne odnose u mladem životnom dobu (pre 16-17 godine), broj seksualnih partnera (više od 4), prethodno postojanje genitalnih bradavica, ili seksualno prenosivih bolesti, kako u nosioca rizika, tako i u njegovih seksualnih partnera (Waggoner, 2003).

3. Hormonski faktori

Među HPV pozitivnim ženama rizik za nastanak karcinoma grlića materice značajno raste sa upotrebom oralnih kontraceptiva dužom od 5 godina, kao i brojem trudnoća (Monsonego et al., 2004). Hormoni iz oralnih kontraceptiva podstiču integraciju HPV-DNK u genom epitelnih ćelija grlića materice. Eksperimentalne studije su pokazale da estradiol može stimulisati transkripciju HPV16 E6 i E7 gena u ćelijskim linijama koje sadrže integrisan HPV16 (pregled u Castellsaqué et al., 2002).

4. Pušenje

U mukozi grlića materice pušača se identifikuju kancerogeni iz cigareta, kao i policiklični aromatični hidrokarboni (Prokopczyk et al., 1997; Melikian et al., 1999). Ove komponente se vezuju za ćelijsku DNK i oštećuju je. Pored efekta metabolita iz cigareta, pušenje indukuje imunosupresiju i redukciju antioksidanata (Bosch and Muñoz, 2002), što doprinosi nastanku malignog fenotipa.

5. Druge seksualno prenosive bolesti

Izvesni herpes virusi su detektovani u nekih žena sa karcinomom grlića materice. Neke studije ukazuju da humani herpes virus 6 aktivira gene papiloma virusa (Chen et al., 1994).

Infekcija sa *Chlamydia trachomatis*, posebno serotipom G pojačava rizik za razvoj karcinoma grlića materice (Antila et al., 2001). *Chlamydia trachomatis* inhibira apoptozu u inficiranim ćelijama blokiranjem oslobađanja citohroma c iz mitohondrija i blokadom aktivacije kaspaza (Fan et al., 1998).

Infekcija HIV-om (eng. *human immunodeficiency virus*) doprinosi pojačanom riziku za nastanak karcinoma grlića materice, verovatno usled smanjenog imunološkog odgovora (Castellsaqué et al., 2002).

6. Ishrana

Ishrana bogata β -karotenom, vitaminima A, C, E, B i folatima redukuje rizik za nastanak neoplazija grlića materice.

Vitamini C, E i karotenoidi deluju kao čistači slobodnih radikala i oksidanata, koji nastaju kao produkti normalnog metabolizma i inflamatornih procesa i mogu da dovedu do oštećenja DNK, proteina i lipida. Vitamini C i E imaju zaštitni efekat od perzistentne HPV infekcije putem pojačanja imunoloških funkcija i modulisanja inflamatornog odgovora na infekciju. Takođe, inhibiraju stvaranje DNK adukata, koji su indukovani komponentama iz cigareta i drugim hemikalijama. Antioksidanti smanjuju i replikaciju i ekspresiju gena virusa.

Folati, vitamini B6 i B12 su uključeni u sintezu i popravku DNK i DNK/RNK metilaciju koja može imati ulogu u integraciji virusne DNK i genskoj stabilnosti (pregled u Garcia-Closas et al., 2005).

7. Faktori domaćina tumora

Neke od polimorfničkih varijanti HLA (eng. *human leukocyte antigen*) gena su povezane sa povišenim rizikom za nastanak neoplastičnih promena grlića materice (Ferency and Franko, 2002).

8. Faktori virusa

HPV16 varijante imaju različit transkripcioni potencijal virusnih onkogenih i time nastanak neoplastičnih lezija (Ferency and Franko, 2002). Tako, ne-Evropske varijante (Azijska, Azijsko-Američka, Afrička 1 i Afrička 2) u poređenju sa Evropskom varijantom HPV16 imaju 2-9 puta veći rizik za nastanak HSIL-ova i karcinoma grlića materice (Hildesheim and Wang, 2002).

9. Nasledni faktori

Neke studije su ukazale na familijarno nakupljanje kancera grlića materice i potencijalnu naslednu osnovu ovog maligniteta (Hemminki et al., 1999; Magnusson et al., 2000; Zoodsma et al., 2004).

10. Genetičke promene

Pored brojnih strukturnih i numeričkih hromozomskih aberacija za karcinome grlića materice i prekursorske lezije karakteristične su i amplifikacije gena (*MYC*), povećane ekspresije (*MYC*, *ERBB2*, *EGFR*) i tačkaste mutacije (u *RAS* familiji gena) (Whang, 1997; Busmanis, 1998; Lazo, 1999).

1.1.4. FAKTORI PROGNOZE

Glavni prognostički faktor karcinoma grlića materice je FIGO stadijum. Petogodišnje preživljavanje dostiže 100% za stadijume IA, dok je za IB1 i manje IIA lezije 70-85%, za IB2 i IIB 50-70%, za III 30-50% i IV 5-15% (Waggoner, 2003). U ranim stadijumima bolesti dodatni prognostički parametri su: prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, veličina tumora, invazija krvnih i limfnih sudova (Pickel et al., 1997). Neki podtipovi adenokarcinoma imaju lošiju prognozu od skvamoznih ćelijskih karcinoma (Grisaru et al., 2001).

1.2. KARCINOM JAJNIKA

1.2.1. KLASIFIKACIJA TUMORA JAJNIKA

Tumori jajnika se dele na *benigne*, *intermedijerne* (eng. *borderline*) i *maligne*. Intermedijerni tumori obuhvataju oko 15% tumora jajnika i naziv su dobili po tome što se njihov izgled pod mikroskopom i osobine nalaze između benignih i malignih tumora. Ovi tumori se često označavaju kao karcinomi niskog malignog potencijala, jer retko metastaziraju i retko dovode do smrti (Schuijer and Berns, 2003).

Na osnovu histopatologije maligni tumori jajnika dele se u tri glavne kategorije:

1. epitelni tumori
2. tumori germinativnih ćelija
3. tumori strome seksualnog grebena.

Epitelni maligni tumori jajnika (karcinomi jajnika) čine preko 90% malignih neoplazmi jajnika (Schuijer and Berns, 2003). Široko je prihvaćeno da nastaju iz površinskog epitela jajnika ili njegovih derivata. Postoji i alternativna hipoteza po kojoj nastaju iz sekundarnog *müllerian* dukta (Dubeau, 1999). Kako je epitel koji pokriva jajnike derivat celomskog epitela, koji se razvija u *müllerian* dukt (Matias-Guiu and Prat, 1998), on često rekapitulira morfologiju epitela grlića materice, endometrijuma ili jajovoda koji embriološki vode poreklo od ove strukture (Cvetkovic, 2003). Prema tome, karcinome jajnika histološki možemo da klasifikujemo u više kategorija na osnovu prisustva tipa epitela unutar tumora i to: serozne, mucinozne, endometrioidne, svetlo ćelijske (eng. *clear cell*), prelazne (eng. *transitional*), mešovite (ako sadrže dve ili više različitih epitelnih komponenti), kao i nediferentovane karcinome (Bell, 2005).

Tumore germinativnih ćelija jajnika čini heterogena grupa neoplazmi, od kojih većina

vodi poreklo iz germinativnih ćelija koje se nalaze u jajniku. Oni čine oko 3% malignih neoplazmi jajnika u Zapadnim zemljama. U nekim Azijskim zemljama, uključujući Japan, ovi tumori čine oko 20% maligniteta jajnika. Karakteristični su za tinejdžere i mlađe žene (Tavassoli and Devilee, 2003).

Tumori strome seksualnog grebena čine oko 8% malignih tumora jajnika, i razvijaju se od ćelija vezivnog tkiva koje proizvode hormone (Tavassoli and Devilee, 2003).

Prilikom dijagnostike karcinoma jajnika vrši se podela na histološke podtipove, graduse tumora i FIGO stadijume.

FIGO klasifikacija se odnosi na proširenost bolesti i vrši se na sledeći način:

I - tumor ograničen na jajnike,

II - tumor zahvata jedan ili oba jajnika sa širenjem u pelvis,

III - tumor zahvata jedan ili oba jajnika sa mikroskopski potvrđenim peritonealnim metastazama izvan pelvisa i/ili metastazama u regionalnim limfnim čvorovima,

IV - udaljene metastaze (isključene peritonealne metastaze).

1.2.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA JAJNIKA

Kancer jajnika čini 30% svih kancera ženskog genitalnog trakta (Tavassoli and Devilee, 2003). Incidenca kancera jajnika je viša u ekonomski razvijenim zemljama Evrope i Severne Amerike, Australije i Novog Zelanda, gde ide preko 9 novootkrivenih slučajeva na 100 000 žena, sa izuzetkom Japana kao razvijene zemlje gde je 6,4 novootkrivenih slučajeva na 100 000 žena. Relativno visoka incidenca od 7,7 novootkrivenih slučajeva na 100 000 žena je i u Južnoj Americi (Parkin et al., 2005).

Standardizovana stopa incidence karcinoma jajnika u centralnoj Srbiji je 11,5 na 100 000 žena (Institut za javno zdravlje Srbije, 2009).

Rizik za razvoj kancera jajnika tokom života žene je procenjen na 1 u 70 (1,4%). Stopa razvoja raste sa godinama i dostiže vrhunac u osmoj dekadi (Schuijjer and Berns, 2003).

1.2.3. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA

Epidemiološke studije su utvrdile više faktora koji doprinose nastanku karcinoma jajnika:

1. Pozitivna porodična ili lična istorija kancera jajnika, dojke ili kolona

Naime, 5-10% svih karcinoma jajnika su naslednog karaktera, i karakterišu se specifičnim mutacijama gena u germinativnim ćelijama. Razlikujemo tri varijante naslednog karcinoma jajnika: a) mesto-specifičan karcinom jajnika čini 10-15% svih naslednih karcinoma jajnika i javlja se u familijama gde dolazi do nakupljanja samo karcinoma jajnika; b) nasledni sindrom karcinoma dojke i jajnika, u familijama gde dolazi do nakupljanja i karcinoma dojke i karcinoma jajnika (65-75% slučajeva) i c) karcinom jajnika povezan sa naslednim nepolipoznim kancerom kolona (Lynch sindrom

tip II), koji čini 10-15% slučajeva (pregled u Matias-Guiu and Prat, 1998).

Nasledni mesto-specifičan karcinom jajnika i nasledni sindrom karcinoma dojke i jajnika povezani su sa mutacijama u visoko penetrabilnim *BRCA1/BRCA2* tumor supresor genima, koje se nasleđuju na autozomno dominantan način i imaju ulogu u održavanju integriteta genoma. Životni rizik za nastanak karcinoma jajnika u nosilaca *BRCA* mutacija je 10 do 20 puta viši nego u opštoj populaciji. Nasledni karcinomi jajnika se javljaju 15 do 20 godina ranije u odnosu na srednje godine pojavljivanja sporadičnih slučajeva karcinoma jajnika i uglavnom su visoko gradusni i uznapredovali serozni karcinomi (Wenham et al., 2002).

Nasledni nepolipozni kancer kolona (Lynch sindrom tip II) je udružen sa mutacijama u genima za popravku pogrešno sparenih baza DNK, i to uglavnom u *MSH2* i *MSH1*, a manjim delom u *PMS1* i *PMS2* genima. Lynch sindrom tipa II se karakteriše ranim nastankom kancera kolona, kao i kancera endometrijuma, jajnika, gastrointestinalnog trakta i gornjih delova urinarnog trakta (Lynch et al., 1997). Rizik od nastanka karcinoma jajnika u familijama sa nasledni nepolipoznim kancerom kolona je 3,5 puta viši nego u opštoj populaciji (Matias-Guiu and Prat, 1998).

2. Starost

Rizik za nastak karcinoma jajnika raste sa godinama. Jedan od verovatnih razloga je pojačano nakupljanje somatskih genskih mutacija.

3. Endokrini faktori

Prema hipotezi neprekinutih ovulacija, predloženoj 1971. godine (Fathalla, 1971), rizik za nastanak karcinoma jajnika je u direktnoj vezi sa ovulacionim periodom u životu žene. Naime, svaka ovulacija dovodi do malih trauma i oštećenja površinskog epitela jajnika, posle koje površinski epitel prolifериše i obnavlja se. Ponavljanje ovih događaja povećava šansu za aberantnu obnovu epitela (tj. pojavu spontanih mutacija usled grešaka u DNK sintezi koje ne uklone sistemi za popravku DNK), što vodi malignoj transformaciji. Rizik za nastanak karcinoma jajnika vezan je i za visok nivo hipofiznih gonadotropina, koji rezultuje u produkciji estrogena, koji stimuliše površinski epitel jajnika da prolifериše. Trudnoća, dojenje i upotreba kontraceptivnih pilula smanjuju broj ovulacija, kao i nivo gonadotropina, a time i šansu za malignu transformaciju epitela jajnika (pregled u Modugno et al., 2003).

Androgena stimulacija epitela jajnika je jedan od faktora rizika. U postmenopauznih žena je povišen rizik za nastanak karcinoma jajnika, jer su jajnici normalno androgenični i poseduju androgene receptore (Modugno et al., 2003). Policistična oboljenja jajnika i druga stanja koja su vezana za povišenu produkciju androgena nose povećan rizik za nastanak karcinoma jajnika (Schildkraut et al., 1996). Takođe, neke studije su pokazale da je u žena sa karcinomom jajnika nivo androgena 50% viši u odnosu na kontrolnu grupu (Helzlsouer et al., 1995).

Danas je veoma popularna i hipoteza stromalne hiperaktivnosti, po kojoj neke od granulosa i *theca* ćelija koje produkuju steroidne hormone i prolifериšu tokom ovulacije, a zatim normalno podležu apoptozi, ostaju u stomi jajnika. Tako imamo višu izloženost



jajnika steroidima tokom života, a time i viši rizik za nastanak karcinoma jajnika (Modungo, 2003).

Progestini su protektivni faktori za karcinome jajnika, verovatno putem pojačane apoptoze epitelnih ćelija jajnika, čime se eliminišu ćelije sa stečenim genetičkim oštećenjima (Wenham et al., 2002).

4. Faktori spoljašnje sredine

Smatra se da izloženost industrijskim karcinogenima i radijaciji primenjenoj u dijagnostičke i terapijske svrhe ima značajnu ulogu u karcinogenezi jajnika (Schuijjer and Berns, 2003).

5. Endometriozna, pelvična inflamacija, unos masti, povećana telesna težina su još neki od faktora rizika za nastanak karcinoma ovarijuma.

Nasuprot tome, ishrana bogata retinoidima i vitaminom D, telesne vežbe i antiinflamatorni lekovi smanjuju rizik za ovo oboljenje (Modugno et al., 2003). Antiinflamatorni lekovi smanjuju proliferaciju i mitotičku aktivnost, i u isto vreme pojačavaju apoptozu u ćelijskim linijama karcinoma jajnika (Rodríguez-Burford et al., 2002).

1.2.4. FAKTORI PROGNOZE

Karcinomi jajnika su vodeći uzrok smrtnosti među ginekološkim malignitetima, pre svega zbog nedostatka adekvatnih markera za ranu detekciju bolesti. U većini slučajeva rani stadijumi ovih maligniteta su asimptomatski i preko 75% karcinoma jajnika se dijagnostikuje kada su već prisutne regionalne ili udaljene metastaze (Welsh et al., 2001). Glavni faktor prognoze bolesti je FIGO stadijum u momentu dijagnoze. Petogodišnje preživljavanje je preko 90% kod karcinoma koji su ograničeni na jajnike pri dijagnozi (FIGO stadijum I), između 60% i 80% kod onih koji su se proširili u okolne regione unutar pelvisa (FIGO stadijum II) i samo 10% do 30% kod onih kod kojih su metastaze prisutne izvan pelvisa (FIGO stadijum III i IV).

Unutar istog FIGO stadijuma prognoza se razlikuje zavisno od gradusa tumora, histopatološkog podtipa karcinoma jajnika, starosti, veličine rezidualnog tumora (kod uznapredovalih stadijuna bolesti), prisustva progesteronskih receptora (kod seroznih karcinoma prisustvo progesteronskih receptora je vezano za viši stepen diferencijacije tumora i bolji odgovor na hormonoterapiju i hemioterapiju), nivoa tumor markera CA125 itd.

1.2.4.1. CA125 TUMOR MARKER

CA125 (eng. *cancer antigen 125*) je jedini klinički priznat marker za detekciju karcinoma jajnika (u kombinaciji sa transvaginalnom ultrasonografijom), detekciju ponovnog

javljanja bolesti i praćenja odgovora na hemioterapiju. Međutim, CA125 je nedovoljno senzitivna i specifična marker za dijagnozu i praćenje karcinoma jajnika.

CA125 je glikoprotein koji izlučuju maligne epitelne ćelije jajnika i u serumu preko 80% bolesnica sa uznapredovalim stadijumima bolesti pokazuje vrednost višu od normalne (35 U/ml). Međutim, u samo 50% bolesnica sa stadijumom I karcinoma jajnika CA125 ima vrednost višu od normalne, što ga čini neadekvatnim markerom za ranu detekciju bolesti. Vrednosti CA125 mogu da budu povišene i u nekim normalnim fiziološkim stanjima, benignim ginekološkim promenama, različitim patološkim stanjima i nekim drugim tipovima kancera (Partridge and Barnes, 1999; Guppy and Rustin, 2002).

Zbog svega navedenog postoji potreba za iznalaženjem novih senzitivnijih i specifičnijih markera karcinoma jajnika. Međutim, svi potencijalni *serumski markeri* (koje izlučuju epitelne ćelije jajnika) ili *tkivni markeri* su u fazi istraživanja ili evaluacije.

1.2.5. GENETIČKE PROMENE U KARCINOMIMA JAJNIKA

Analizama kariotipa maligno transformisanih epitelnih ćelija jajnika utvrđeno je da dolazi do kompleksnih translokacija, velikih delecija hromozoma, uvećanja hromozoma putem višestrukih amplifikacija pojedinih gena, kao i pojave aneuploidije (pregled u Wenham et al., 2002).

Genske promene u karcinomima jajnika su tipa tačkastih mutacija, delecija, amplifikacija, prekomerne ekspresije gena i mikrosatelitske nestabilnosti. Veliki broj genskih promena je specifičan za određeni histopatološki tip karcinoma jajnika.

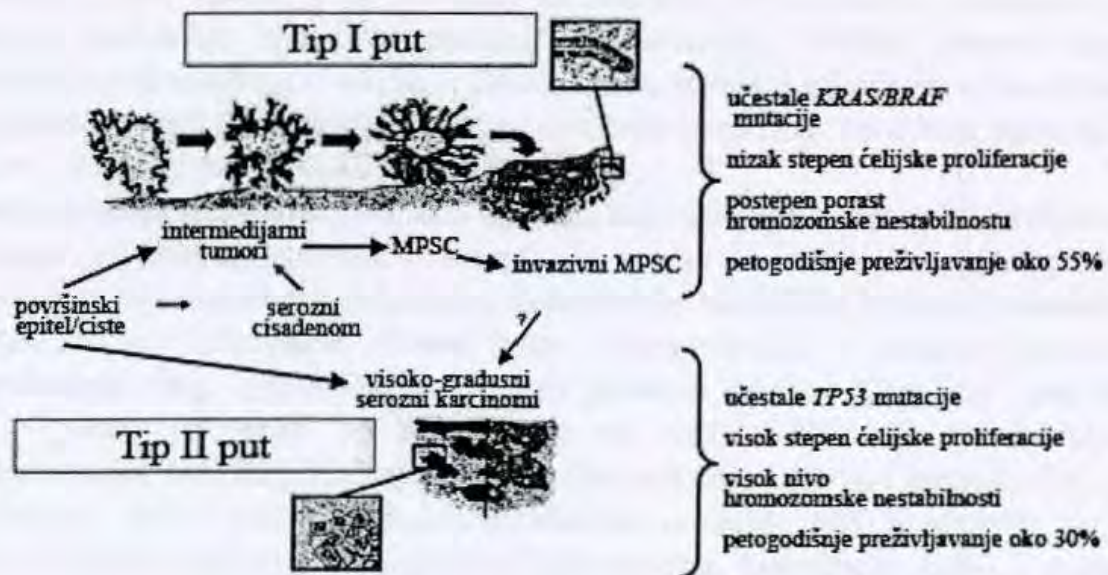
1.2.5.1. MODEL TUMOROGENEZE JAJNIKA

Na osnovu kliničkopatoloških i molekularno genetičkih analiza velike serije epitelnih tumora jajnika, predložen je model tumorogeneze ovih neoplazmi. U ovom modelu karcinomi jajnika se svrstavaju u dve glavne kategorije (tip I i II), koje su vezane za dva glavna puta tumorogeneze (Shih and Kurman, 2004). Tumori tipa I uključuju nisko-gradusne serozne karcinome, mucinozne karcinome, nisko-gradusne endometrioidne karcinome, prelazne i svetloćelijske karcinome. Tumori tipa II sačinjavaju umereno i slabo diferentovani serozni karcinomi (visoko-gradusni serozni karcinomi), visoko-gradusni endometrioidni karcinomi, nediferentovani karcinomi, i mešoviti mezodermalni tumori (karcinosarkomi) (Shih and Kurman, 2004; Bell, 2005). Tumori tipa I se razvijaju sporo i stupnjevito, sa jasno prepoznatljivim prekursorskim lezijama, od benignih tumora (cisadenoma/adenofibroma u slučaju seroznih i mucinoznih tumora i endometrioza u slučaju endometrioidnih i svetloćelijskih tumora), preko intermedijarnih tumora do karcinoma. Benigni tumori nastaju iz površinskog epitela jajnika uključujući i ciste. Tumori tipa II se razvijaju brzo, verovatno iz površinskog epitela ili cisti, bez morfološki prepoznatljivih prekursorskih lezija, pa se kaže da nastaju *de novo* (Shih and Kurman, 2004). Obzirom na visok stepen ćelijske proliferacije, na šta ukazuju visoke vrednosti Ki-

67 nuklearnog proliferativnog indexa, i brz razvoj ovih neoplazmi, možda intermedijernih stupnjevi postoje ali nisu uočljivi (Singer et al., 2002).

Tumori tipa I i tipa II, kao i podtipovi u okviru tipova odlikuju se različitim molekularno genetičkim promjenama. Nisko-gradusni serozni karcinomi se karakterišu mutacijama u *KRAS* ili *BRAF* genima; mucinozni karcinomi mutacijama u *KRAS*-u; nisko-gradusni endometrioidni karcinomi mutacijama u *CTNNB1* (kodira β -katenin) i mutacijama ili delecijama *PTEN*-a, kao i mikrosatelitskom nestabilnošću; svetloćelijski karcinomi mutacijama u *TGFbetaR2* i mikrosatelitskom nestabilnošću; dok za prelazne karcinome nisu identifikovane karakteristične molekularno genetičke promene. Visoko-gradusni serozni karcinomi i visoko-gradusni endometrioidni karcinomi se karakterišu mutacijama u *TP53* genu i visokim nivoom hromozomske nestabilnosti (eng. *chromosomal instability* - CIN). Karcinosarkomi se karakterišu mutacijama u *TP53* genu u više od 90% slučajeva. Za nediferentovane karcinome nisu ustanovljene karakteristične molekularno genetičke promene (Shih and Kurman, 2004; Bell, 2005). Tumori tipa II se u manjem procentu karakterišu i inaktivacijom *P16* gena, amplifikacijama i prekomernom ekspresijom *HER2/neu* i *AKT2* gena (Shih and Kurman, 2004).

Kako su serozni karcinomi najučestaliji maligni epitelni tumori, nisko-gradusni serozni karcinomi (invazivni mikropapilarni serozni karcinomi - invazivni MPSC) se uzimaju kao prototip tumora tipa I, a visoko-gradusni serozni karcinomi (konvencionalni serozni karcinomi) kao prototip tumora tipa II (Slika 2). Nisko-gradusni čine 25%, a visoko-gradusni 75% seroznih karcinoma (Shih and Kurman, 2004).



Slika 2. Šematski prikaz dualističkog modela razvoja seroznih karcinoma jajnika (modifikovano prema Shih and Kurman, 2004).

Model tumorogeneze jajnika, koji puteve razvoja tumora povezuje sa molekularno genetičkim promjenama omogućava razvoj dijagnostičkih testova za rano otkrivanje karcinoma jajnika i razvoj ciljnih terapija koje blokiraju ključne signalne puteve

karakteristične za određene histopatološke podtipove karcinoma jajnika i stepene diferenciranosti.

1.2.6. HEMIOTERAPIJA KARCINOMA JAJNIKA

Posle hirurškog tretmana, bolesnice sa karcinomom jajnika (izuzev onih karcinoma koji su lokalizovani unutar jajnika, i pri tome su nisko ili umereno-gradusni) podležu hemioterapiji. Zlatno pravilo prve linije postoperativne hemioterapije je kombinacija *platinskih derivata* (karboplatina ili cisplatina) u kombinaciji sa *taksanima* (paklitaksel ili docetaksel) (Sandercock et al., 2002).

Kao druga linija hemioterapije koriste se *platinski derivati i taksanini* (pojedinačno ili u kombinaciji), *antraciklini, inhibitori topoizomerase I, nukleotidni analozi, Vinca alkaloidi, alkilirajući agensi, anti-estrogeni* (Agarwal and Kaye, 2003).

1.2.6.1. MEHANIZAM DELOVANJA PLATINSKIH DERIVATA I TAKSANA

Cisplatina i njen analog karboplatina pripadaju grupi agenasa koji oštećuju DNK i imaju sličan mehanizam delovanja. Po ulasku u ćeliju podležu transformaciji i u aktivnoj formi stupaju u interakciju sa DNK, RNK, proteinima i drugim makromolekulima (Gonzalez et al., 2001). Glavni farmakološki efekt platinski derivati ostvaruju interakcijom sa DNK, formirajući DNK adukte, i to primarno intralančane DNK adukte. Formirana DNK oštećenja prepoznaju specifični proteini koji aktiviraju različite puteve signalne transdukcije koji rezultuju u inhibiciji DNK sinteze, supresiji transkripcije, interferenciji sa normalnim ćelijskim ciklusom i, ukoliko se oštećenja na DNK ne uklone, apoptozi, što je glavni citotoksični efekt cisplatine (Siddik, 2003).

Taksani pripadaju grupi antitubulinskih agenasa, koji blokiraju deobu ćelija sprečavanjem formiranja mitotičkog vretena. Taksani se vezuju i stabilizuju polimerizovane mikrotubule. Mikrotubule su esencijalne komponente mitotičkog vretena i citoskeleta i izgrađene su od tubulinskih dimera (alfa- i beta-tubulina) i proteina pridruženih mikrotubulama (eng. *microtubule-associated proteins*- MAPs) (Dumontet and Sikic, 1999). Taksani se vezuju za beta-tubulin, što vodi stabilizaciji mikrotubula od depolimerizacije, blokadi prelaska iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa, i apoptozi (i to kako p53 zavisnoj, tako i p53 nezavisnoj). Paklitaksel moduliše MAPK signalni put, što dovodi do defosforilacije proapoptotskog Bad proteina, fosforilacije Bcl-2 i indukcije apoptoze (pregled u Agrawal and Kaye, 2003).

Za platinske derivate, koji svoj terapijski odgovor ostvaruju p53 zavisnom apoptozom, za dobar terapijski odgovor je bitan divlji tip (eng. *wild-type* - wt) *TP53* gena. Nasuprot, tumori jajnika sa mutiranim *TP53* pokazuju znatno bolji terapijski odgovor na taksane od tumora sa wt *TP53* (Lavarino et al., 2000). Naime, ekspresija MAP4, koji je glavni protein pridružen mikrotubulama neneuralnih tkiva, je transkripciono reprimirana putem

wt p53. Pojačana ekspresija MAP4, koja se javlja kada je *TP53* mutiran, pojačava polimerizaciju mikrotubula i vezivanje taksana (Zhang et al., 1999).

1.3. MEHANIZMI MALIGNE TRANSFORMACIJE

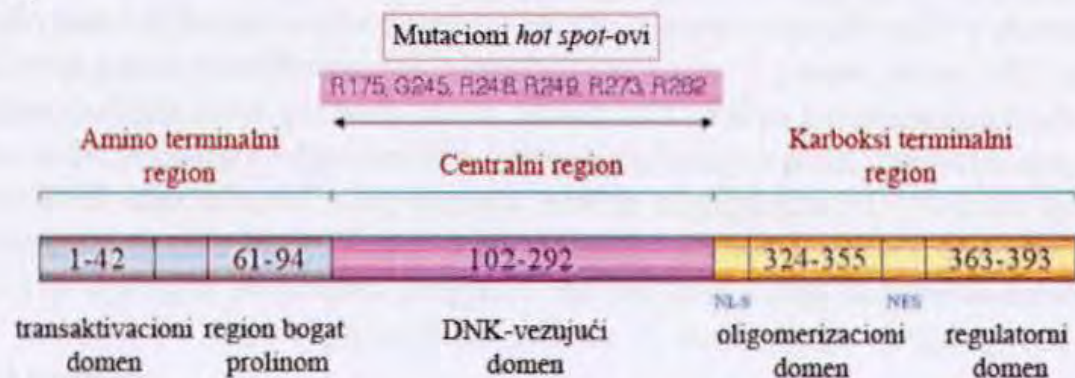
Nastanak malignog fenotipa je višestepeni proces tokom koga dolazi do nakupljanja genetičkih i/ili epigenetičkih promena koje narušavaju normalne mehanizme ćelijskog rasta i diferencijacije. Pretpostavlja se da je za malignu transformaciju neophodna pojava 5-6 specifičnih mutacija po somatskoj ćeliji. Mada, noviji podaci ukazuju da su možda i samo dve genske lezije dovoljne za razvoj maligne ćelije (Stennner-Liewen and Reed, 2003). Inicijalno transformisana ćelija klonalnom ekspanzijom dovodi do razvoja tumora. Tumorske ćelije tokom vremena mogu da steknu nove genetičke promene, kao i sposobnost invazije okolne strome, angiogeneze i metastaziranja, koje odlikuju kompletan maligni fenotip. Aktivacija protoonkogeni i inaktivacija tumor-supresora su ključni događaji u razvoju malignog fenotipa.

Razvoj kancera zavisi od genetičke konstitucije individue, geografskog okruženja i načina života. Faktori koji utiču na razvoj kancera su fizički, hemijski i biološki. Fizički i hemijski faktori su mutageni sredine koji menjaju strukturu DNK molekula. Od bioloških faktora najznačajniji su virusi (Alberts et al., 1994), i procenjuje se da je oko 15% kancera etiološki povezano sa virusnom infekcijom (Gatza et al., 2005).

1.4. P53 TUMOR-SUPRESOR: STRUKTURA I FUNKCIJA

1.4.1. STRUKTURA P53 PROTEINA

Protein p53 je jedarni fosfoprotein molekulske mase od oko 53 kDa, kodiran genom od 20 kb koji sadrži 11 egzona i nalazi se na maloj ručici hromozoma 17 kod čoveka (na poziciji 17p13) (Lamb and Crawford, 1986; Isobe et al., 1986). Wt p53 protein ima 393 aminokiselina i sastoji se od tri regiona i više domena koji imaju specifične funkcije (Slika 3):



Slika 3. Struktura p53 proteina (modifikovano prema Bai and Zhu, 2006).

1. *Amino terminalni region* (kodiran egzonima 2-4) sadrži: *transaktivacioni domen* (aminokiseline 1-42) koji uspostavlja interakcije sa komponentama transkripcione mašinerije i *region bogat prolinom* (aminokiseline 61-94) koji se sastoji od pet kopija SH3 vezujućeg motiva PXXP (gde je P prolin, a X bilo koja aminokiselina) i koji stupa u interakcije sa elementima puteva signalne transdukcije (Slee et al., 2004). Poliprolinski region je potreban za p53 zavisnu supresiju tumorskog rasta (Walker and Levine, 1996) i ima važnu ulogu u p53 posredovanoj apoptozi (Sakamuro et al., 1997).

2. *Centralni region* (kodiran egzonima 5-8) predstavlja *DNK-vezujući domen* (aminokiseline 102-292) koji se vezuje za specifične sekvence DNK koje se sastoje od dve kopije motiva od 10 bp (5'PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3') razdvojene sa 0-13 bp (El-Deiry et al., 1992).

3. *Karboksi terminalni region* (kodiran egzonima 9-11) sadrži: *oligomerizacioni domen* (aminokiseline 324-355) putem koga p53 formira funkcionalne tetramere (Cloure et al., 1994); *negativni regulatorni domen* (aminokiseline 363-393); signalne sekvence za lokalizaciju p53 u jedru (eng. *nuclear localization signal* - NLS) (Shaulsky et al., 1990) i signalna sekvence za izlazak p53 iz jedra (eng. *nuclear export signal* - NES) (Vousden, 2002). U skladu sa alosteričnim modelom regulacije p53 aktivnosti, negativni regulatorni domen interakcijom sa centralnim regionom održava p53 tetramer u neaktivnoj konformaciji (Hupp and Lane, 1994).

Protein p53 je visoko-konzervisan tokom evolucije. Poređenja sekvence p53 proteina između različitih vrsta pokazuju postojanje pet visoko-konzerviranih domena (I-V), od kojih se domen I nalazi u okviru transaktivacionog domena, a II, III, IV i V u okviru centralnog regiona (May and May, 1999). Protein p53 pokazuje i visok stepen homologije sa članovima p53 genske familije, kao što su p63 i p73 (Kaelin, 1999).

1.4.2. FUNKCIJE P53 PROTEINA

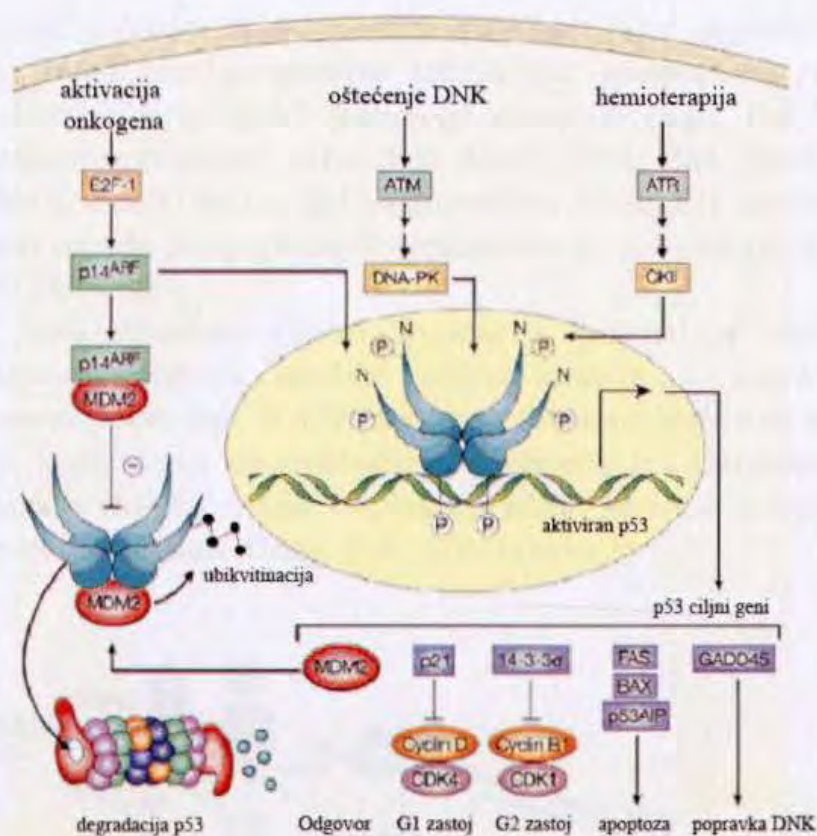
Kao *tumor-supresorni protein*, p53 je esencijalan za prevenciju neadekvatne ćelijske proliferacije i održavanje integriteta genoma po izloženosti stresogenim faktorima poput DNK oštećenja, onkogene aktivacije, hipoksije, uklanjanja ribonukleotida, mikrotubularne inhibicije, erozije telomera itd. Ovi signali vode aktivaciji i stabilizaciji p53 proteina putem postranslacionih modifikacija, a time i porastu nivoa p53 koji se akumulira u jedrima ćelija izloženih stresu. Protein p53 aktivira transkripciju ciljnih gena i izaziva različite ćelijske odgovore poput zastoja ćelijskog ciklusa, indukcije apoptoze, popravke DNK oštećenja, ćelijskog starenja, inhibicije angiogeneze itd. (Vousden and Lu, 2002; Vogelstein et al., 2000). Svoju ulogu ostvaruje i putem represije nekih gena, kao i interakcijom sa drugim proteinima (pregled u Bai and Zhu, 2006). Sa aspekta prevencije razvoja tumora, dve najznačajnije uloge p53 su u zaustavljanju ćelijskog ciklusa i indukciji apoptoze.

1.4.2.1. ULOGA P53 PROTEINA U KONTROLNIM TAČKAMA ĆELIJSKOG CIKLUSA

Različiti faktori mogu da dovedu do oštećenja DNK molekula. To mogu biti spontana hidroliza baza, patofiziološka stanja poput inflamacije, genotoksični agensi, antikancerski lekovi koji deluju na DNK preko svojih reaktivnih metabolita ili putem inkorporacije u DNK (nukleotidni analozi), kao i putem inhibicije aktivnosti DNK polimeraza ili topoizomeraza. Na oštećenja DNK ćelije reaguju na dva načina: a) DNK oštećenja se popravljaju ili tolerišu; b) ćelije koje nose DNK oštećenja podležu različitim tipovima ćelijske smrti (pre svega apoptoze, ali i nekroze, autofagije, mitotičke katastrofe itd.) (Roos and Kaina, 2006). Odgovor ćelije zavisi od jačine stresa, tipa ćelije i ćelijskog okruženja (pregled u Bálint and Vousden, 2001).

Nepopravljena DNK oštećenja imaju kao posledicu nakupljanje hromozomskih promena, genskih mutacija i dovode do patoloških stanja kao što je maligna transformacija. Zato je veoma važno pravilno funkcionisanje kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa koje sprečavaju progresiju u narednu fazu ćelijskog ciklusa dok se DNK oštećenja ne poprave putem različitih reparacionih mehanizama. Kompleksi specifičnih ciklin-zavisnih proteinskih kinaza (eng. *cyclin-dependent protein kinase* - CDK) i ciklina obezbeđuju pravilno odvijanje ćelijskog ciklusa u smislu korektnog prelaza iz jedne u drugu fazu putem fosforilacije ključnih proteina. U eukariota postoje 3 osnovne kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i to na kraju G1 faze pre ulaska u S fazu, u G2 fazi pre ulaska u mitozu i u metafazi mitoze (pregled u Alberts et al., 1994).

Aktivacijom *P21* gena p53 protein je uključen u G1 zastoj. Naime, različiti faktori stresa aktiviraju različite proteinske kinaze. Jonizujuće zračenje aktivira ATM (eng. *ataxia telangiectasia mutated*) kinazu, koja aktivira DNK zavisnu proteinsku kinazu. Lekovi koji se primenjuju u hemioterapiji i ultravioletno zračenje aktiviraju ATR (eng. *ataxia telangiectasia related*) kinazu, koja aktivira kazein kinazu II. Aberantni signali rasta, koji vode ekspresiji onkogena *RAS* i *MYC* indukuju p14^{ARF} protein. DNK zavisna proteinska kinaza i kazein kinaza II fosforilišu amino terminus p53 proteina i onemogućavaju vezivanje p53 proteina za negativni regulatorni mdm2 protein, dok se p14^{ARF} vezuje za mdm2 i inhibira njegovu aktivnost (Vogelstein et al., 2000; Bullock and Fersht, 2001). Ovo vodi povećanju nivoa p53 proteina i aktivaciji transkripcije p53 ciljnih gena (Slika 4). Među njima je *P21* gen, čiji proteinski produkt p21 inhibira ciklin D-CDK4/6 i ciklin E-CDK2- komplekse, čime je onemogućena fosforilacija Rb, a time i oslobađanje E2F faktora iz Rb-E2F kompleksa i odlazak u jedro gde bi E2F aktivirao transkripciju gena potrebnih za progresiju u S fazu (Arroyo and Raychaudhuri, 1992). Protein p21 uspostavlja interakciju i sa PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) proteinom koji je kofaktor DNK polimeraze δ , čime je onemogućena DNK replikacija (Cayrol et al., 1998).



Slika 4. Uloga p53 proteina u kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa (modifikovano prema Bullock and Fersht, 2001).

Protein p53 aktivira i transkripciju *14-3-3σ* i *GADD45* (eng. *growth arrest and DNA damage*) gena, čiji proteinski produkti interaguje sa CDK1-ciklin B kompleksom, čime doprinose održavanju G2 zastoja (Hermeking et al, 1997; Zhan et al., 1999).

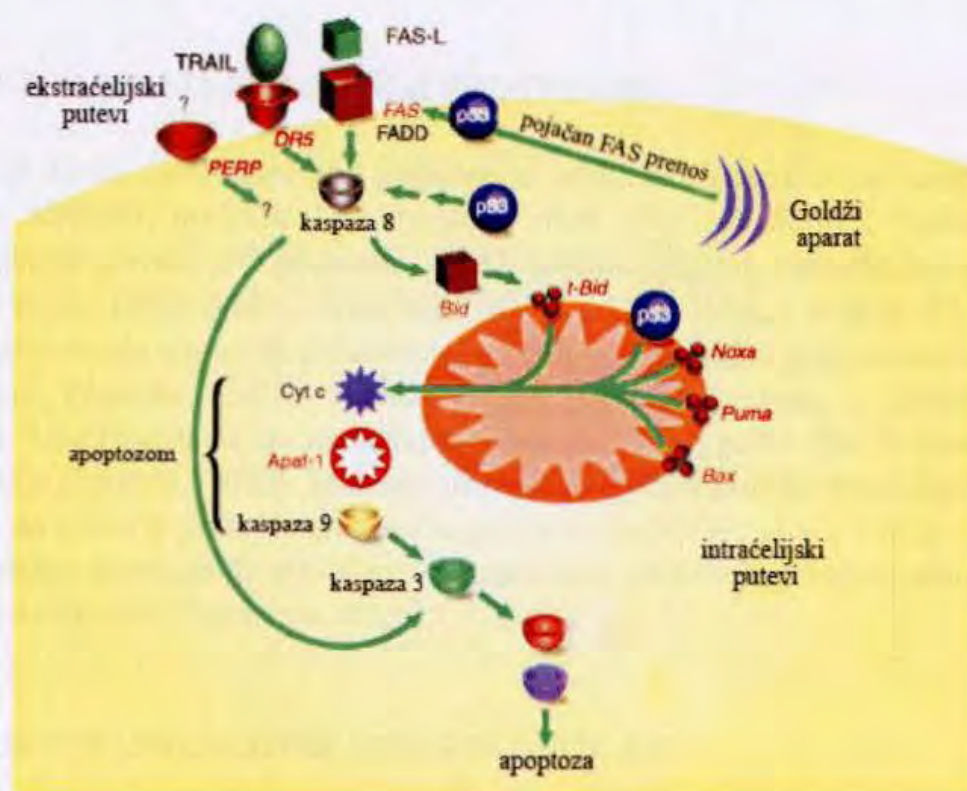
1.4.2.2. ULOGA P53 PROTEINA U APOPTOZI

Apoptoza je proces programirane ćelijske smrti svojstven višćelijskim organizmima, koji ima ključnu ulogu u normalnom razvoju, organogenezi i starenju. Kada se inicira vodi kaskadi morfoloških i biohemijskih promena koje uključuju kondenzaciju, a potom i fragmentaciju jedra i citoplazme, a time pojavu apoptotskih tela koja bivaju fagocitirana (Kerr et al., 1972). Neka oboljenja se karakterišu promenama u procesu apoptoze u smislu njene inhibicije (maligna oboljenja), ili aktivacije (autoimuna oboljenja, neurodegenerativna oboljenja) (Katoch et al., 2002).

Apoptoza može biti indukovana ekstraćelijskim i intraćelijskim signalima. Vezivanjem liganada za receptore smrti, koji pripadaju porodici TNFR (eng. *tumor necrosis factor receptor*) aktiviraju se ekstaćelijski apoptotski putevi. Najpoznatiji receptori smrti su CD95 (Fas, APO-1), TNFR1, TRAIL (eng. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) receptori DR4 i DR5. Intraćelijski signali smrti se aktiviraju različitim stresogenim

faktorima. Proteinski produkti *BCL-2* familije gena su ključni regulatori intraćelijskih puteva apoptoze. Bcl-2 familiju proteina sačinjavaju: proapoptotski proteini sa tri homologa BH domena (eng. *Bcl-2 homology domains*) (Bax, Bak, Bcl-X1 itd.); proapoptotski proteini koji sadrže samo BH3 domen (Bid, Bad, Noxa, Puma itd.) i antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-X1 itd.) sa BH1-4 domenima. Putem BH domena formiraju se homo/heterodimeri između proapoptotskih i antiapoptotski proteina (pregled u Haupt et al., 2003; Bai and Zhu, 2006).

Bez obzira na vrstu stimulusa ključni događaj u apoptozi je kaskadna reakcija proteolitičke aktivacije članova familije enzima kaspaza. U odgovoru na stres, proapoptotski proteini poput Bax, Bid, Puma, Noxa formiraju kanale na mitohondrijskoj membrani putem kojih dolazi do oslobađanja citohroma c i aktivacije kaspaze 9 u prisustvu adaptorskog molekula Apaf 1 (eng. *apoptotic protease activating factor*), a potom aktivacije ostalih kaspaza (Haupt et al., 2003) (Slika 5).



Slika 5. Ekstraćelijski i intraćelijski apoptotski putevi (modifikovano prema Haupt et al., 2003).

Protein p53 nije globalni induktor apoptoze, već samo one indukovane DNK oštećenjima. Može da aktivira apoptozu transkripcionom aktivacijom gena za Fas (O'Connor et al., 2000) i D5 receptor (Takimoto and El-Deiry, 2000); proapoptoskih gena *BAX* (Miyashita and Reed, 1995), *BID* (Sax et al., 2002), *PUMA* (eng. *p53-upregulated modulator of apoptosis*) (Nakano and Vousden, 2001), *NOXA* (Oda E et al., 2000); kao i drugih gena koji su uključeni u p53-posredovanu apoptozu poput *PIG3* (eng. *p53 inducible gene*)

(Flatt et al., 2000) i *TP53AIP1* (eng. *TP53 apoptotic-inducing protein 1*) (Oda K et al., 2000).

Protein p53 stimuliše apoptozu i na transkripciono-nezavisan način. U mitohondrijama p53 direktno vezuje kompleks Bcl-2/Bcl-XL, i tako olakšava delovanje proapoptotskih proteina i oslobađanje citohroma c (Mihara et al., 2003).

1.4.3. REGULACIJA P53 AKTIVNOSTI

U normalnim fiziološkim uslovima, wt p53 se održava u veoma niskoj koncentraciji unutar ćelija, i to uglavnom u inaktivnoj formi i ograničenog poluživota od nekoliko minuta. Pod delovanjem stresogenih stimulusa dolazi do aktivacije i produženja poluživota p53 proteina do nekoliko sati, a time i akumulacije p53 u ćelijama (pregled u Bai and Zhu, 2006).

1.4.3.1. INTERAKCIJA SA DRUGIM PROTEINIMA

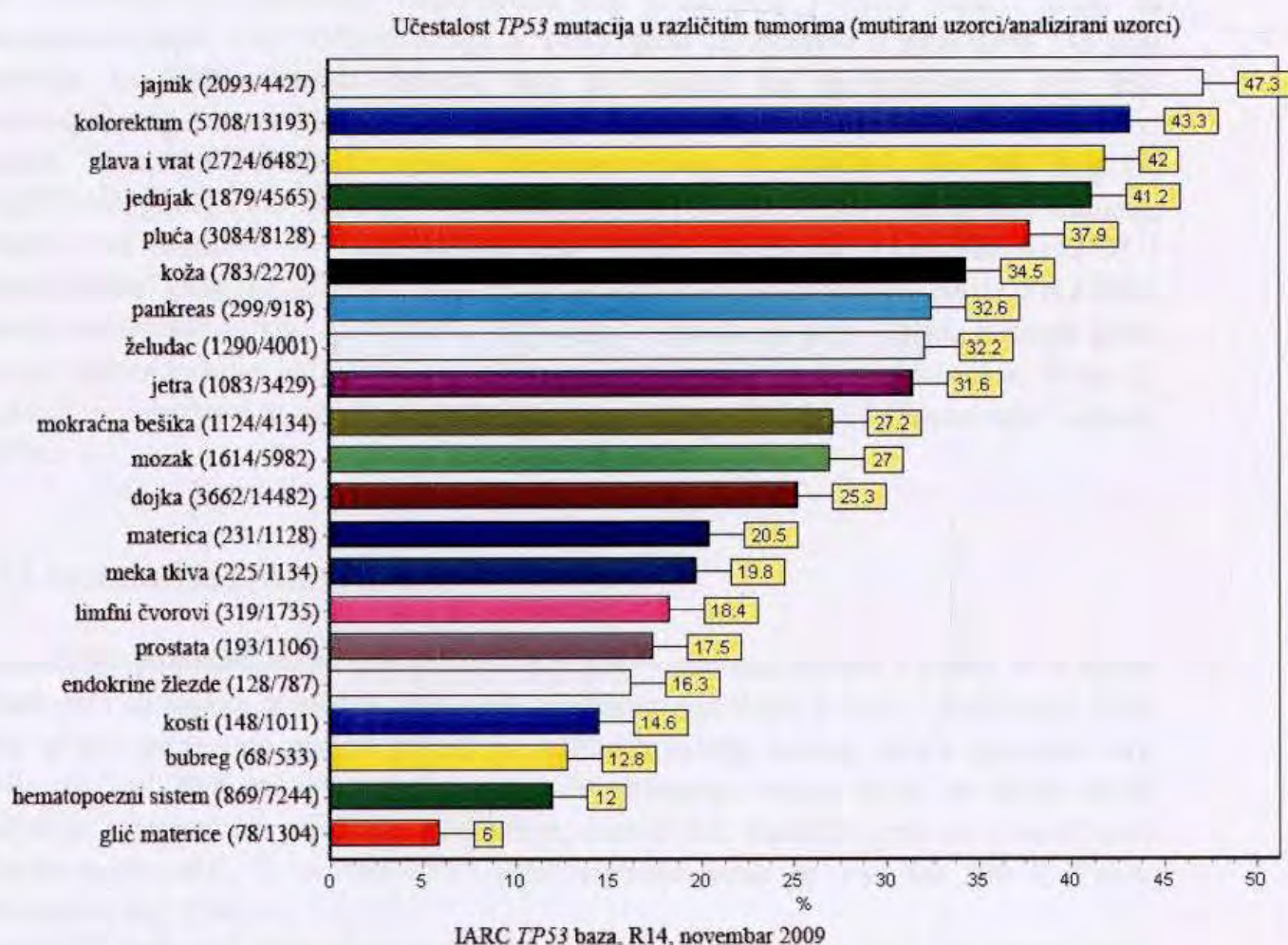
U regulaciji nivoa i aktivnosti p53 uključen je veliki broj ćelijskih i virusnih proteina. Jedan od ključnih proteina koji reguliše nivo p53 je Mdm2. Vezivanjem za transaktivacioni domen p53 proteina, Mdm2 blokira njegovu transkripcionu aktivnost (Momand et al., 1992). Mdm2 favorizuje izlazak p53 iz jedra, i svojom E3 ubikvitin-ligaznom aktivnošću stimuliše ubikvitinaciju i degradaciju p53 u proteazomima (pregled u Moll and Petrenko, 2003). Mdm2 vezuje histon deacetilazu 1 (HDAC1) koja deacetiluje lizinske ostatke na karboksi terminalnom kraju p53 i čini ih dostupnim za ubikvitinaciju (Ito et al., 2002). Sa druge strane, p53 protein aktivira transkripciju *MDM2* gena, tako da ova dva proteina čine autoregulatornu petlju (Wu et al., 1993). Ova petlja, pod delovanjem stresogenih stimulusa biva narušena, blokiranjem Mdm2 aktivnosti i/ili postranslacionim modifikacijama p53.

1.4.3.2. POSTTRANSLACIONE MODIFIKACIJE P53

Protein p53 podleže različitim postranslacionim modifikacijama, uključujući fosforilaciju, acetilaciju, ADP-ribozilaciju, ubikvitinaciju, nedilaciju, sumoilaciju itd. Fosforilacija i acetilacija su ključni mehanizmi koji vode aktivaciji, stabilizaciji i akumulaciji p53, i sprečavaju degradaciju p53. Različite kinaze fosforilišu serinske i treoninske ostatke na amino ili karboksi terminalnom regionu p53. Acetilacija obuhvata lizinske ostatke na karboksi terminalnom regionu p53 i to putem p300/CBP i PCAF (eng. *p300/CBP-associated factor*) acetilaza. Fosforilacija aminoterminalnog regiona blokira interakciju p53 sa Mdm2, dok acetilacija karboksitelterminalnog regiona inhibira ubikvitinaciju lizinskih ostataka, i tako ove proteinske modifikacije sprečavaju p53 degradaciju (pregled u Bode and Dong, 2004).

1.4.4. MUTACIJE U *TP53* GENU

Mutacije u *TP53* genu su najučestalije somatske genske promene u malignim tumorima. Prisutne su u više od 50% svih tipova malignih tumora i predstavljaju glavni mehanizam p53 inaktivacije. Maligni tumori različitih anatomskih regija se razlikuju po učestalosti *TP53* mutacija (Slika 6). U tumorima sa wt *TP53* ili niskom učestalošću *TP53* mutacija, inaktivacija p53 se indukuje drugačijim mehanizmima: inaktivacijom uzvodnih aktivatora, multiplikacijom *MDM2* gena, delecijom gena za p14^{ARF}, vezivanjem virusnih proteina itd (pregled u Vogelstein et al., 2000). Tumori bez funkcionalnog p53 imaju viši stepen proliferacije, dediferencijacije i agresivniji fenotip u odnosu na slične tumore sa wt p53. Ovi tumori su rezistentni na radioterapiju i antikancerske lekove koji deluju putem p53-zavisne apoptoze (Bullock and Fersht, 2001).



Slika 6. Učestalost *TP53* mutacija u različitim tipovima kancera (modifikovano prema <http://www-p53.iarc.fr/Statistics>).

Germinativne mutacije u *TP53* genu čine osnovu retkog Li-Fraumeni sindroma. Osobe sa ovim sindromom nasleđuju jedan mutiran i jedan wt *TP53* alel i imaju povišen rizik ka

nastanku tumora na različitim mestima i u relativno ranijem životnom dobu (pre 45 godine života). Spektar kancera u ovom sindromu uključuje karcinome dojke, sarkome mekih tkiva, osteosarkome, adrenokortikalne karcinome, tumore mozga i leukemije (Malkin et al., 1990; Li et al., 1988).

Za razliku od velikog broja drugih tumor-supresornih gena, koji su inaktivirani putem mutacija koje menjaju fazu okvira čitanja (eng. *frameshift*) ili dovode do pojave prevremenih stop kodona (eng. *nonsense*) i tako vode odsustvu sinteze ili aberantnoj sintezi skraćenih proteina, skoro 80% mutacija u *TP53* genu su mutacije koje imaju za posledicu ugradnju druge aminokiseline (eng. *missense*) i vode sintezi stabilnog proteina koji se akumulira u jedrima tumorskih ćelija. Akumulacija mutiranog p53 ima za posledice: (i) heterodimerizaciju i inhibiciju wt p53 eksprimiranog sa drugog alela putem dominantno-negativnog efekta i (ii) sticanje novih funkcija mutiranog p53 koje ga transformišu u dominantni onkogen (eng. *gain of function*) (Soussi and Lozano, 2005).

TP53 mutacije su nejednako raspoređene duž *TP53* gena i imaju različit uticaj na prognozu bolesti. Oko 95% mutacija u *TP53* genu je locirano u egzonima 5-8 koji kodiraju za DNK-vezujući domen, koji je ključan za funkcionisanje p53 kao transkripcionog faktora (Bullock and Fersht, 2001). Neki kodoni su učestalije mutirani od drugih. Mutacije u ovim "hotspots" kodonima (Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 i Arg282) čine oko 30% svih mutacija u *TP53* genu (Szymańska and Hainaut, 2003). Ove mutacije su klasifikovane kao "DNA kontaktne" (Arg248, Arg273) i "strukturalne" (Arg175, Gly245, Arg249, Arg282) (Bullock and Fersht, 2001). Prva klasa menja aminokiseline koje su direktno uključene u interakciju p53 - DNA, a druga klasa menja aminokiseline uključene u stabilizaciju tercijarne strukture proteina. Klasa II mutacija je udružena sa agresivnijim fenotipom od mutacija klase I (Soussi and Lozano, 2005).

1.4.5. POLIMORFIZMI *TP53* GENA

Genetičkim polimorfizmom (od grčkih reči: *poly* - mnogo, *morph* - oblik) se u užem smislu reči označava prisustvo više alela po nekom genskom lokusu u populaciji. SNP (eng. *single nucleotide polymorphism*) je varijacija jednog baznog para u genomu. Ove varijacije čine DNK sekvencu svake osobe jedinstvenom i mogu uticati na razvoj nekih oboljenja, odgovor na patogene, hemikalije, lekove itd. Različiti geni su u različitom stepenu polimorfni. U okviru *TP53* gena identifikovano je više od 200 SNP-ova (Whibley et al., 2009).

Preko 90% polimorfizama u okviru *TP53* gena je locirano u nekodirajućim sekvencama, od kojih je dosta izučavana insercija 16 bp u intronu 3. Neke studije su pokazale da je ova intronska varijanta povezana sa nižim nivoom p53 iRNK (Gemignani et al., 2004) i smanjenim apoptotskim potencijalom i popravkom DNK oštećenja u limfoblastoidnim ćelijskim linijama u odnosu na wt *TP53* (Wu et al., 2002). Međutim, nije jasno da li su ove promene p53 funkcije vezane za povećan rizik za nastanak nekih tipova kancera (Wang-Gohrke et al., 2002; Wu et al., 2002; Gemignani et al., 2004) i lošu prognozu

bolesti (Boldrini et al., 2008a) ili je to posledica gametske neravnoteže (eng. *linkage disequilibrium*) sa varijantama kodona 72 *TP53* gena.

Od 19 polimorfizama u egzonima *TP53* gena osam je sinonimnog karaktera (Whibley et al., 2009). Iako ovi polimorfizmi ne menjaju aminokiselinsku sekvencu, promene u baznoj sekvenci mogu modifikovati ekspresiju gena, uvijanje i funkciju proteina ili izazvati nastanak novih mesta iskrajanja introna (Candeias et al., 2008; Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Preostalih 11 egzonskih polimorfizama je ne-sinonimnog karaktera koje dovode do promene aminokiselinske sekvence p53 proteina. Ove promene mogu da menjaju sposobnost vezivanja p53 proteina za sekvence ciljnih gena, da utiču na strukturu motiva za postranslacionu modifikaciju, menjaju proteinsku stabilnost ili interakciju p53 sa drugim proteinima (pregled u Whibley et al., 2009).

Poslednjih godina rezultati nekih studija sugerišu da neki od egzonskih SNP-ova u *TP53* genu mogu imati uticaj na rizik ka nastanku kancera. Tako, Ser47 varijanta u transaktivacionom domenu, koja se pojavljuje sa učestalošću manjom od 5% u Afričkih Amerikanaca, pokazuje 2-5 puta smanjenu apoptotsku aktivnost u odnosu na varijantu Pro47. Naime, Ser47 p53 varijanta je slabiji supstrat za fosforilaciju serina na poziciji 46 putem MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinases*) i transaktivaciju proapoptotskih gena *AIP1* i *PUMA* (Li et al., 2005). Transaktivacioni eseji na kvascima su pokazali da Met270Val SNP u DNK vezujućem domenu može imati protektivnu ulogu u nastanku kancera u skladu sa činjenicom da manje zastupljena Met270 varijanta vodi pojačanoj ekspresiji *p21*, *BAX* i *NOXA* gena u odnosu na Val270; dok je Gly360Ala u karboksi terminalnom regionu blizu tetramerizacionog domena pokazuje značajno smanjenje u transaktivaciji *14-3-3 σ* i *GADD45* gena, a time verovatno i oslabljeni odgovor na oštećenja DNK (Whibley et al., 2009).

Za sada jedini SNP u *TP53* genu koji je povezan sa nastankom i/ili prognozom nekih tipova kancera, kao i različitim odgovorom na antikancersku terapiju je polimorfizam kodona 72.

1.4.5.1. POLIMORFIZAM KODONA 72 *TP53* GENA

Kodon 72 u egzonu 4 *TP53* gena ima sekvencu CGC koja kodira za arginin (Arg72) ili CCC koja kodira za prolin (Pro72). Amino kiselinski ostatak 72 je smešten unutar regiona bogatog prolinom i utiče na strukturu SH3 motiva (May and May, 1999). Ove dve varijante p53 proteina se strukturno i funkcionalno razlikuju. Razlike se odnose na sposobnost vezivanja komponenti transkripcione mašinerije, aktivaciji transkripcije, indukciji apoptoze i supresiji tumorskog rasta (Thomas et al., 1999). Varijanta p53 proteina sa Arg72 je efikasnija u indukciji apoptoze od Pro72 koji indukuje viši nivo G1 zastoja (Pim and Banks, 2004). Viši apoptotski potencijal Arg72 u odnosu na Pro72 p53 varijantu može se delimično objasniti efikasnijom transaktivacijom *PUMA* i *NOXA* (Sullivan et al., 2004), kao i efikasnijim prenosom p53 iz jedra u mitohondrije, što vodi pojačanom oslobađanju citohroma c (Dumont et al., 2003). Takode, Arg72 p53 je efikasniji u supresiji *MDR1* (eng. *multiple drug resistance gene*) i indukciji

proapoptotskog gena *BAX*, dok je Pro72 p53 efikasniji u izazivanju ćelijskog zastoja i popravke DNK oštećenja putem indukcije *P21* and *GADD45* (Ueda et al., 2006). Međutim, nasuprot wt p53 sa Arg72 koji je bolji inhibitor tumorskog rasta (usled pojačane apoptotske sposobnosti), mutirani p53 sa Arg72 može pojačati tumorski rast vezivanjem za p53-homolog p73 i neutralizacijom p73-indukovane apoptoze (Marin et al., 2000). Dalje analize su pokazale da je sposobnost Arg 72 p53 mutantnih formi da vezuju i inhibiraju p73 zavisna od tipa ćelija, kao i da p53 mutantne forme koje ne vezuju i ne inhibiraju p73 mogu da izazovu rezistenciju na neke antikancerske lekove, što sugeriše da Arg72 *TP53* mutanti verovatno poseduju druge mehanizme narušavanja hemioterapijom-indukovane apoptoze (Vikhanskaya et al., 2005). Interesantna je i činjenica da u tumorima individua heterozigotnih za Arg72Pro polimorfizam *TP53* gena Arg alel je obično mutiran a Pro alel deletiran (Marin et al., 2000).

Komparativne analize sekvence *TP53* gena na primatima sugerišu da je Pro alelska varijanta predačka forma (Puente et al., 2006), mada se Arg alel *TP53* gena javlja u visokoj učestalosti (>50%) u mnogim populacijama. Postoje značajne etničke razlike u distribuciji alelskih varijanti kodona 72 *TP53* gena. U severnoj hemisferi Pro alel pokazuje gradijent porasta učestalosti idući od severa ka ekvatoru, od 17% u populaciji Laponaca u Švedskoj do 63% u populaciji Afričkih crnaca u Nigeriji (Beckman et al., 1994). Ovakva distribucija je dovela do pretpostavke da Pro alel može imati protektivnu ulogu u područjima sa visokim ultravioletnim zračenjem (Själänder et al., 1996), tj. da Pro varijanta sa smanjenim apoptotskim potencijalom, a pojačanim sposobnošću za efikasnu popravku DNK oštećenja zajedno sa pojačanom akumulacijom pigmenta neophodnih za inhibiciju prekomerne fiksacije vitamina D može u ovakvim sredinama imati selektivnu prednost (Li et al., 2005). Međutim, ovo je u kontradikciji sa visokom učestalošću Arg alela u zemljama Centralne i Južne Amerike koja je oko 70%, te neki istraživači pretpostavljaju da je distribucija polimorfničkih varijanti *TP53* gena posledica migracije *Homo sapiens* iz Afrike pre oko 100 000-150 000 godina (Ojeda et al., 2003). Poslednjih godina se razmatra i to da je evolucionarna selekcija specifičnih *TP53* alela posledica p53 posredovane kontrole ekspresije leukemija inhibitornog faktora koji je ključan za implantaciju blastocista (Hu et al., 2008).

SNP na kodonu 72 *TP53* gena se u poslednjih desetak godina intenzivno izučava kao potencijalni faktor koji doprinosi riziku za nastanak različitih neoplazmi. Razlog za ovakva istraživanja potekao je iz nagoveštaja da je p53 protein sa Arg72 podložniji degradaciji putem E6 onkoproteina visoko-rizičnih HPV-a i da individue homozigotne za Arg alel imaju povišen rizik za nastanak HPV-udruženih karcinoma (Storey et al., 1998). Za razliku od velikog broja studija o vezi između polimorfničkih varijanti kodona 72 i rizika za nastanak različitih tipova kancera, podaci o prognostičkom značaju i uticaju na odgovor na hemioterapiju su malobrojni, ali mnogo konzistentniji. Ranije pojavljivanje bolesti uočeno je kod pacijenata homozigota ili heterozigota za Pro alel (Shen et al., 2002; Gottschlich et al., 2000; Jones et al., 2004). Uočeno je i da su pacijenti sa Arg 72 p53 varijantom imali viši stepen tumorskog odgovora (eng. *response rate* - RR) i/ili bolje preživljavanje posle primljene hemioterapije i/ili radioterapije (Tommiska et al., 2005;

Xu et al., 2008; Santos et al., 2006a, Galic et al., 2007; Sreeja et al., 2008; Sullivan et al., 2004).

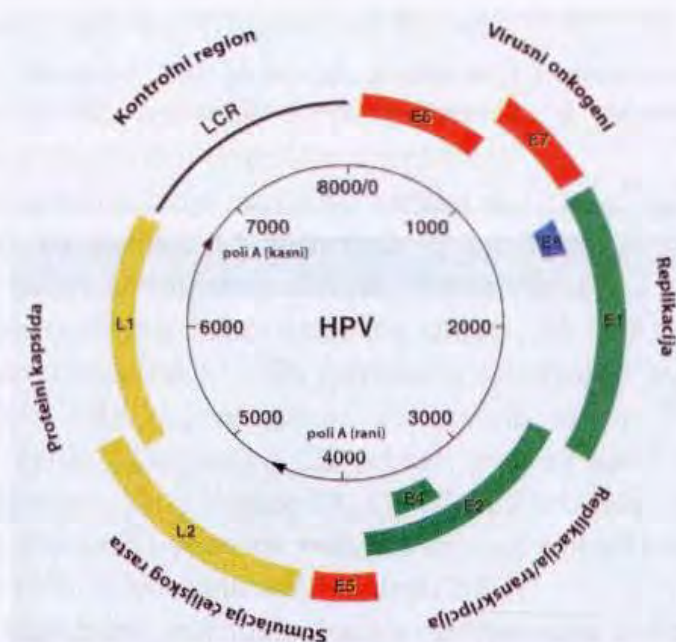
1.5. HUMANI PAPILOMA VIRUSI

1.5.1. KLASIFIKACIJA HPV I ORGANIZACIJA VIRUSNOG GENOMA

HPV pripadaju familiji *Papillomaviridae* (lat. *papilla* - bradavica, grč. *oma* - tumor). Ovu familiju čini veliki broj tipova virusa koji su široko rasprostranjeni među višim vertebratima i specifični su za vrstu i tkivo (de Villiers et al., 2004).

HPV inficiraju bazalne epitelne ćelije kože i sluzokože usta, grla, konjunktive, respiratornog trakta i anogenitalne regije (Burd, 2003). Do danas je opisano više od 100 tipova HPV od kojih oko 40 inficira anogenitalnu regiju (Woodman et al., 2007). Na osnovu malignog potencijala genitalni HPV tipovi mogu se podeliti na nisko-rizične (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, and CP6108), visoko-rizične (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82) i verovatno visoko-rizične (26, 53 i 66) (Muñoz et al., 2003). Nisko-rizični tipovi su udruženi sa pojavom genitalnih bradavica, a visoko-rizični sa pojavom prekancerskih lezija i kancera.

HPV se sastoji od ikosaedarnog kapsida unutar koga je smešten virusni genom. Kapsid je sačinjen od 72 kapsomere koje grade dva strukturna proteina: glavni protein L1 (eng. *major*), koji čini 80% virusne partikule, i manji L2 (eng. *minor*) (Prendiville and Davies, 2004). Genom HPV-a sastoji se od dvolančane kružne DNK od oko 8 000 bp, sa 8-10 otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frame* - ORF). ORF-ovi se delimično preklapaju i ograničeni su na jedan DNK lanac (Slika 7). Genom se funkcionalno može podeliti na tri regiona: kontrolni region (eng. *long control region* - LCR) ili uzvodni regulatorni region (eng. *upstream regulatory region* - URR) koji sadrži i mesto početka replikacije (pregled u Dell and Gaston, 2001); region ranih gena E1-E8 (gena koji se prvi prepisuju) i region kasnih gena L1 i L2 (gena koji se prepisuju kasnije). Rani geni kodiraju proteine uključene u regulaciju replikacije virusnog genoma, kontrolu ekspresije virusnih gena i interakciju sa proteinima inficirane ćelije, dok kasni geni kodiraju strukturne proteine kapsida. Na osnovu razlika u DNK sekvenci E6, E7 i L1 ORF-ova HPV se klasifikuju na: genotipove sa manje od 90% homologije; podtipove sa 90-98% homologije unutar tipa i varijante sa više od 98% homologije unutar podtipa (Burd, 2003).



Slika 7. Organizacija genoma HPV (modifikovano prema Prendiville and Davies, 2004).

1.5.2. TOK HPV INFEKCIJE

HPV inficiraju bazalne ćelije epitela na mestima mikrotrauma, i to prvenstveno u transformacionoj zoni gde pločasti epitel prelazi u cilindrični (von Knebel Doeberitz, 2002). Ulazak virusnih partikula u bazalne ćelije posredovan je ćelijskim površinskim receptorima - heparin sulfat proteoglikanom i alfa-6 integrinom (Giroglou et al., 2001; Evander et al., 1997). Po ulasku u ćeliju domaćina virusi se oslobađaju kapsida i virusni genomi se premeštaju u jedro gde perzistiraju u vidu ekstrahromozomskih epizoma (oko 50 kopija po ćeliji) (Fehrmann and Laimins, 2003).

Ekspresija HPV ORF-ova je regulisana sa dva glavna promotora - rani (uzvodno od E6 ORF-a) i kasni (u okviru E7 ORF-a). Većina HPV iRNK su policistranske i sadrže nekoliko ORF-ova. Ekspresija ranih gena delimično je regulisana i mehanizmom alternativne obrade transkripata. U bazalnom sloju epitela dolazi do ekspresije ranih HPV transkripata koji kodiraju za E1, E2, E6 i E7 virusne proteine (pregled u Stubenrauch and Laimins, 1999). Na početku infekcije, rani transkripti se aktiviraju primarno putem ćelijskih transkripcionih faktora koji se vezuju za sekvence u LCR. E2 dimer se vezuje za E2BS (eng. *E2 binding site*) sekvence u LCR-u koje su blisko locirane sa mestima vezivanja ćelijskih transkripcionih faktora. U niskoj koncentraciji, E2 dalje aktivira ekspresiju ranih gena, dok je sa porastom koncentracije sprečava putem blokade vezivanja ćelijskih transkripcionih faktora za LCR (Steger and Corbach, 1997).

Replikacija virusnih epizoma u bazalnom sloju epitela je sinhronizovana sa replikacijom jedarne DNK domaćina i zahteva E1 i E2 proteine, kao i replikacionu mašineriju ćelije domaćina. E1 protein u kompleksu sa E2 dimerom se vezuje za AT bogate sekvence na mestu početka replikacije u LCR (Fratini and Laimins, 1994). E1 protein poseduje ATP-

aznu i 3'→5' helikaznu aktivnost (Hughes and Romanos, 1993). Po vezivanju, E1 protein formira heksamere (Sedman and Stenlund, 1998) koji učestvuju u razdvajanju lanaca virusne dvolančane DNK, vezivanju DNK polimeraze α (Masterson et al., 1998) i okupljanju dodatnih proteina koji posreduju u replikaciji.

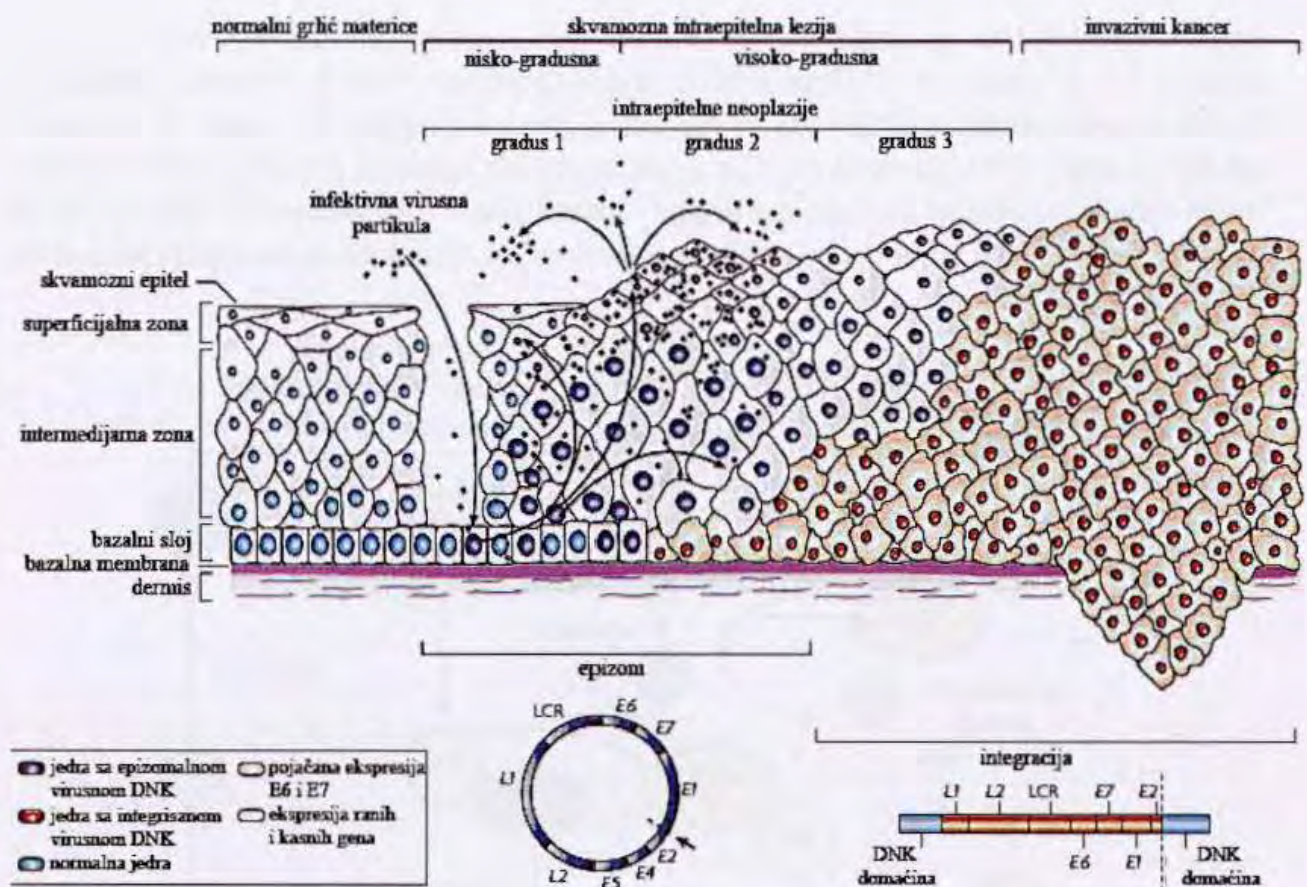
Po deobi, inficirane epitelne ćelije napuštaju bazalni sloj i migriraju ka intermedijarnoj i superficijalnoj zoni. Za razliku od normalnih epitelnih ćelija koje po odvajanju od bazalne membrane izlaze iz ćelijskog ciklusa, diferenciraju se i postepeno gube jedra, inficirane ćelije ponovo ulaze u S fazu ćelijskog ciklusa. E6 i E7 proteini pomažu ulazak u S fazu i proliferaciju inficiranih ćelija (pregled u Longworth and Laimins, 2004). Sa premeštanjem ćelija u više slojeve epitela, E2 protein blokira rani promotor i dalju ekspresiju E6 i E7 gena. Istovremeno, E2 protein aktivira kasni promotor i dolazi do porasta sinteze E1 proteina, kao i sinteze E4, E5, L1 i L2 proteina (pregled u Stubenrauch and Laimins, 1999). Porast E1 proteina vodi intenzivnoj amplifikaciji virusnih genoma i do hiljadu kopija po ćeliji (Fehrmann and Laimins, 2003).

E5 proteini su mali hidrofobni proteini locirani u membranama endozoma, Goldži aparatu i plazma membrani. Oni stimulišu proliferaciju ćelija formiranjem kompleksa sa EGFR (eng. *epidermal-growth-factor receptor*), PDGFR-beta (eng. *platelet-derived growth-factor- β receptor*) i CSF1R (eng. *colony-stimulating factor-1 receptor*) (pregled u Fehrmann and Laimins, 2003; zur Hausen, 2002). E5 protein se vezuje i za subjedinicu vakuolarne ATPaze od 16 kDa i tako inhibira acidifikaciju endozoma i degradaciju internalizovanih EGFR. Ovo rezultira vraćanjem EGFR-a na plazma membranu i prolongiranom mitogenom signalizacijom (Straight et al., 1995). L1 i L2 proteini se udružuju i formiraju virusne kapside u koje se pakuju virusni genomi. E4 protein olakšava oslobađanje virusnih partikula narušavanjem citoskeletne organizacije (Doorbar et al., 1991). Zrele virusne partikule u superficijalnoj zoni se oslobađaju deskvamacijom epitela.

Pored pomenutih virusnih proteina otkriveno je i postojanje E8 proteina koji sa delom E2 proteina reprimira virusnu replikaciju i transkripciju i veruje se da ima značajnu ulogu u održavanju virusne latencije u bazalnim ćelijama inficiranog epitela (Stubenrauch et al., 2001). E3 protein je otkriven kod samo nekoliko HPV-a i nepoznate je funkcije (Prendiville and Davies, 2004).

1.5.3. ULOGA E6 I E7 PROTEINA U ONKOGENEZI

Za razliku od nisko-rizičnih HPV-a, genomi visoko-rizičnih HPV-a se integrišu u DNK ćelije domaćina. Ovo je ključan događaj koji vodi progresiji neoplastičnih lezija ka kanceru. Kružna virusna DNK se obično otvara unutar E2 ORF-a, a deo E2 ORF-a zajedno sa E4, E5 i delom L2 ORF-a se gubi (Slika 8) (pregled u zur Hausen, 2002). Gubitak E2 vodi nekontrolisanoj i pojačanoj ekspresiji E6 i E7 proteina.



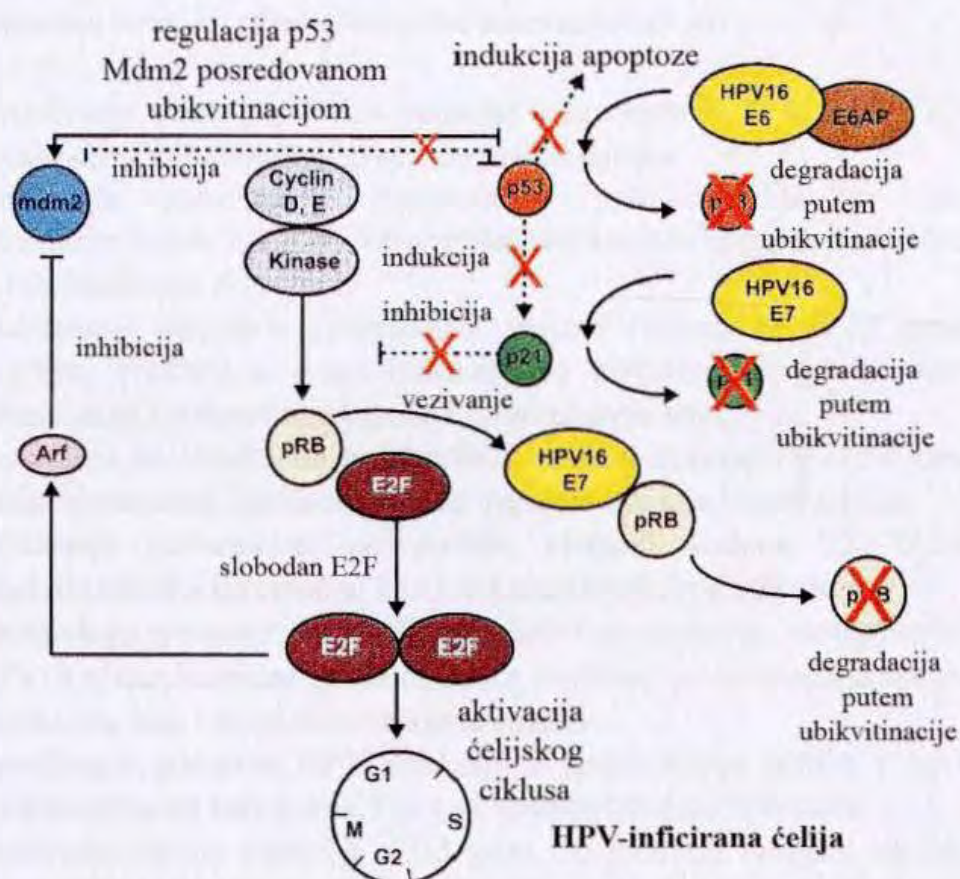
Slika 8. HPV posredovana progresija kancera grlića materice (modifikovano prema Woodman et al., 2007).

Glavna uloga E6 proteina u onkogenezi je inhibicija funkcije p53 proteina. E6 protein se vezuje za ćelijsku ubikvitin-ligazu, E6-AP (eng. *E6-associated protein*). Ovaj dimerni kompleks vezuje p53 protein i indukuje višestruku ubikvitinaciju p53 u prisustvu ubikvitinskog enzimskog kompleksa i degradaciju u proteazomima (Scheffner et al., 1993) (Slika 9). Ovo drastično smanjuje vreme poluživota p53 proteina od nekoliko sati do ispod 20 minuta i redukuje nivo p53 proteina i do polovine nivoa prisutnog u normalnim epitelnim ćelijama. Pored toga, vezivanje E6 za p53 blokira interakciju p53 sa transkripcionalnim ko-aktivatorom CBP/p300 i inhibira p53 zavisnu transkripciju (Zimmermann et al., 1999).

Pored efekta na p53 funkciju E6 protein ispoljava i druge aktivnosti. Tako, proapoptotski protein Bak podleže proteazomalnoj degradaciji putem E6 proteina (Jackson et al., 2000). E6 protein nekih tipova HPV-a vezuje komponente sistema za popravku jednolančanih DNK prekida i inhibira ih (Iftner et al., 2002). Ekspresija gena za katalitičku subjedinicu enzima telomeraza (hTERT) je aktivirana E6 proteinom (Oh et al., 2001). To dovodi do dodavanja heksamernih ponovaka na telomerne krajeve hromozoma u diferenciranim ćelijama i produženog života HPV-inficiranih ćelija.

E7 protein svoj onkogeni potencijal ostvaruje vezivanjem za članove Rb (eng. *retinoblastoma*) familije proteina i stimuliše njihovu proteazomalnu degradaciju. Ovo

vodi oslobađanju E2F transkripcijskih faktora od inhibitornog uticaja Rb, a time stimulaciju ulaska u S fazu ćelijskog ciklusa i DNK replikaciju (Slika 9). E7 proteini stimulišu i cikline S faze (cikline A i E) (Zerfass et al., 1995), a istovremeno blokiraju funkciju ciklin-zavisnih kinaznih inhibitora p21 i p27 (Funk et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996). E7 indukuju i centromernu amplifikaciju koja rezultuje abnormalnim mitozama i pojavom aneuploidije (Duensing et al., 2001).



Slika 9. Uloga E6 i E7 proteina u ćelijskoj proliferaciji (modifikovano prema Prendiville and Davies, 2004).

E6 i E7 proteini reaguju i sa nizom drugih ćelijskih proteina i narušavaju njihovu normalnu funkciju. Tako, kontinuirana i pojačana ekspresiji E6 i E7 virusnih proteina rezultira pojačanom proliferacijom, narušavanjem procesa popravke DNK oštećenja, diferencijacije i apoptoze, pojačanom genomskom nestabilnošću i hromozomskim abnormalnostima.

2. CILJ RADA

S obzirom na nerazjašnjenu povezanosti mutacija i polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i HPV infekcije sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma grlića materice i karcinoma jajnika (FIGO stadijum, histološki tip/subtip, histološki gradus) i karakteristikama bolesnica sa ovim karcinomima (status menopauze, starosna dob), kao i na međusobnu povezanost između pomenutih potencijalnih biomarkera i njihovog uticaja na antikancersku terapiju, ciljevi doktorske disertacije bili su:

- Utvrđivanje učestalosti i tipa mutacija u egzonima 4, 5, 6, 7 i 8 *TP53* gena kod bolesnica sa karcinomima grlića materice i jajnika.
- Ispitivanje povezanosti prisustva i tipa mutacija sa demografskim karakteristikama, kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma, kao i sa karakteristikama bolesnica.
- Utvrđivanje raspodele polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro) u grupi bolesnica sa karcinomima grlića materice, grupi bolesnica sa karcinomima jajnika i grupi zdravih žena.
- Ispitivanje da li neka od polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena doprinosi riziku za nastanak karcinoma grlića materice i/ili karcinoma jajnika.
- Ispitivanje povezanosti polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena sa karakteristikama karcinoma, kao i sa karakteristikama bolesnica.
- Utvrđivanje prisustva HPV infekcije, kao i procentualne zastupljenosti HPV16 i HPV18 u karcinomima grlića materice i njihove povezanosti sa karakteristikama karcinoma, kao i sa karakteristikama bolesnica.
- Utvrđivanje prisustva HPV infekcije u karcinomima jajnika i povezanosti sa karakteristikama karcinoma, kao i sa karakteristikama bolesnica.
- Ispitivanje uticaja mutacija *TP53* gena, polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i HPV infekcije na odgovor na radioterapiju karcinoma grlića materice.
- Ispitivanje uticaja mutacija *TP53* gena, polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i HPV infekcije na odgovor na hemioterapiju karcinoma jajnika.
- Ispitivanje povezanosti između mutacija *TP53* gena, polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i prisustva HPV infekcije u karcinomima grlića materice i jajnika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. UZORCI

U radu su analizirani uzorci karcinoma grlića materice 53 bolesnice i karcinoma jajnika 54 bolesnice. Karakteristike bolesnica i kliničko-histopatološke karakteristike tumora date su u Tabelama 1 i 2.

Kontrolnu grupu činilo je 95 uzoraka briseva grlića materice žena koje su došle na ginekološki pregled i citološki skrining na Institut za onkologiju i radiologiju Srbije. Kriterijumi za uključivanje bili su: uredan ginekološki nalaz sa normalnim Papa nalazom, odsustvo prethodne istorije postojanja prekancerskih i kancerskih lezija ginekološke regije. Odabir je vršen među 223 žena, koje su zadovoljavale pomenute kriterijume, metodom izbora preko tablice slučajnih brojeva (Zar, 1999): a) poklapanje po godinama unutar intervala (<40, 40-49, 50-59, >60 godina) sa grupama bolesnica, i b) isti odnos HPV inficiranih vs. HPV neinficiranih individua je u okviru svakog intervala godina kao u pomenutoj grupi od 223 žene. Opseg godina u kontrolnoj grupi je bio 25-75 sa medijanom od 54 godina.

Tabela 1. Karakteristike bolesnica i kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma grlića materice

Karakteristike	Broj pacijentkinja (n=53)
Starost (godine)	
Opseg	31-74
Medijana	48
Status menopauze	
premenopauza	29
postmenopauza	24
FIGO stadijum	
I	50
II	3
Histološki tip	
skvamozni ćelijski karcinomi	49
adenokarcinomi	4
Gradus	
G1	18
G2	23
G3	5
nije određen	7

Tabela 2. Karakteristike bolesnica i kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma jajnika

Karakteristike	Broj pacijentkinja (n=54)
Starost (godine)	
Opseg	25-81
Medijana	59
Status menopauze	
premenopauza	18
postmenopauza	36
FIGO stadijum	
I	12
II	9
III	29
IV	4
Histološki podtip	
serozni	35
mucinozni	2
endometrioidni	7
svetloćelijski	4
nediferentovani	2
neklasifikovani*	3
mešoviti	1
Gradus	
G1	19
G2	21
G3	6
nije određen	8

* neklasifikovani (eng. *not otherwise specified*, NOS)

Uzorci tumorskog tkiva su čuvani u tečnom azotu na temperaturi od -196°C.

Uzorci briseva grlića materice su po uzimanu stavljeni u fiziološki rastvor, potom vorteksovani da bi se odvojile epitelne ćelije brisa, centrifugirani na 1 700 x g 4 minuta i talog epitelnih ćelija je čuvan na - 20°C do izolacije DNK.

3.2. IZOLOVANJE DNK METODOM ISOLJAVANJA

Izolovanje DNK metodom izoljavanja je jednostavna i netoksična procedura, koja se zasniva na upotrebi visokih koncentracija soli (na primer natrijum-hlorida) koje razdvajaju DNK od proteina.

Liziranje eritrocita se postiže primenom hipotoničnog pufera koji sadrži nejonski deterdžent Triton X-100 (eng. *erythrocyte leasing buffer* – ELB). Po centrifugiranju eritrociti se uklanjaju sa supernatantom. Potom se dodaju: LLB (eng. *leukocyte leasing buffer*) koji se koristi za liziranje membrane ćelija; jonski deterdžent SDS (sodijum-dodecil sulfati,) koji degraduje membrane ćelija i jedra i denaturiše proteine; i proteinaza K koja vrši digestiju ćelijskih proteina i oslobađa DNK iz nukleoproteinskog kompleksa. Po inkubaciji, dodavanjem natrijum-hlorida i centrifugiranjem postiže se razdvajanje DNK od proteina. Po ekstrakciji DNK se precipitira apsolutnim etanolom, a DNK talog se ispira od zaostalih soli 70% etanolom.

PROCEDURA:

NEOPHODNI RASTVORI:

ELB: 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 (Tris- SIGMA, USA; HCl- MERCK, Germany);
0,3 M saharozni rastvor (MERCK, Germany)
1% Triton X-100 (SIGMA, USA)
5 mM MgCl₂ (ZORKA ŠABAC, Serbia)

LLB: 10 mM TRIS-HCl pH 8,0
400 mM NaCl (SIGMA, USA)
2 mM Na₂EDTA pH 8,0 (SIGMA, USA)

Filtriranjem sterilisati rastvore (0,2µm) i čuvati na tamnom na 2-8°C.

Merenje je vršeno na analitičkoj vagi (BJ100M Precisa, Switzerland), a podešavanje pH na pH metru (MODEL 1671, JENCO ELECTRONICS LTD.).

- Uzorak tkiva staviti u ependorfice od 1,5 mL, dodati 700 µL ELB-a i dobro izmešati laganim aspiriranjem u nastavak pipete.
- Centrifugirati 1 minut na 20 800 x g (centrifuga 5417 R, EPPENDORF, Germany). Pažljivo odliti supernatant, vodeći računa da se ne izlije i talog. Osušiti malo talog okretanjem ependorfice i oslanjanjem gornje ivice na papirnu vatu.
- Isprati sediment sa 1 mL ELB-a. Kompletno resuspendovati aspiriranjem u nastavak pipete. Centrifugirati 1 minut na 20 800 x g i odliti supernatant.
- Ćelijski talog može da bude obojen, pa u tom slučaju kada talog sadrži oko 50% eritrocita ponoviti korake ispiranja sa ELB.
- Resuspendovati talog u 300 µL LLB-a, dodati 20 µL 10% SDS-a (SERVA, Germany) i 20 µL proteinaze K (SIGMA, USA) (10 mg/mL), i snažno vorteksovati (HEIDOLPH, Germany).
- Inkubirati na 56°C oko 30 minuta u vodenom kupatilu (HAAKE SWB25, Germany) i povremeno vorteksovati. Suspenzija postepeno treba da se izbistri. Ako suspenzija nije bistra posle 30 minuta nastaviti sa inkubiranjem još 1 sat na 70°C ili preko noći na 56°C.
- Ohladiti rastvor na sobnoj temperaturi. Dodati 100 µL 6 M NaCl i izmešati intenzivno ili vorteksovati 30 sekundi.

- Centrifugirati 3 minuta na 20 800 x g, a potom pažljivo preneti supernatant koji sadrži solubilnu DNK u nove ependorvice ne dodirujući talog u kome su proteini.
- U ependorvicu dodati 1 mL hladnog (-20°C) apsolutnog etanola (MERCK, Germany) i promućkati tridesetak puta, dok se ne formiraju končići DNK.
- Centrifugirati DNK 2 minuta na 20 800 x g i odliti supernatant.
- Dodati 1 mL 70% etanola i izmućkati.
- Centrifugirati 2 minuta na 20 800 x g i odliti supernatant.
- Ukoliko je DNK talog obojen ponoviti korak ispiranja sa 70% etanolom.
- Beli talog ostaviti u termostatu (SUTJESKA, Yugoslavia) da ispari etanol.
- Resuspendovati DNK talog u 100 µL dejonizovane vode.
- DNK uzorak čuvati na -20°C do analize.

3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNK

Prinos i čistoća DNK rastvora može se odrediti spektrofotometrijskim merenjem apsorbance (A) na 260 i 280 nm. DNK ima maksimum apsorpcije na 260 nm, a proteini na 280 nm. Odnos A_{260}/A_{280} za čistu DNK je oko 1,8. Niži odnos od 1,6 ukazuje na značajno prisustvo proteinima i drugih kontaminanata i takve uzorke treba, eventualno, dodatno prečistiti.

Za proveru čistoće DNK poželjno je izmeriti i apsorbancu na 230 i 320 nm. Na 230 nm apsorbuju ugljeni hidrati, peptidi, fenol i aromatične komponente, a na 320 nm soli, tako da je poželjno da su ove vrednosti što manje.

Koncentracija izolovane DNK se određuje formulom:

$$C = \frac{A_{260} \times R \times OP \times 50}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{L},$$

gde je :

R - razblaženje

A_{260} - apsorbance na 260 nm

OP - optički put

50 - faktor za genomsku DNK (A_{260} 50 µg/mL rastvora čiste dvolančane DNK je 1 ako je OP 1cm).

Pri merenju apsorbance slepa proba se koristi za kalibraciju. Ona sadrži sve sastojke reakcione smeše izuzev uzorka čija se koncentracija određuje. Ako je DNK rastvorena u vodi slepa proba je voda.

PROCEDURA:

- DNK uzorak zagrijati preko noći ili 2 sata pre merenja u vodenom kupatilu na 37°C.
- Podesiti spektrofotometar (BioPhotometer, EPPENDORF, *Germany*) za merenje dvolančane DNK i kalibrisati kivetom sa slepom probom (200 µL dejonizovane vode).
- Napraviti 100 puta razblaženje uzorka sa dejonizovanom vodom u količini od 200µL (2 µL uzorka i 198 µL dejonizovane vode) i očitati apsorbance.

Koncentracija DNK u µg/µL, kao i odnos A_{260}/A_{280} se automatski izračunavaju. Merenje je vršeno u plastičnim kivetama za jednokratnu upotrebu.

3.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction* – PCR) je metoda za *in vitro* amplifikaciju nukleinskih kiselina. Osnovu ove metode je postavio američki molekularni biolog Karry Mullis 1983. godine. Ona se zasniva na ponovljenim procesima sinteze DNK pomoću dve suprotno orijentisane oligonukleotidne sekvence (prajmera) koje ograničavaju ciljnu sekvencu DNK i enzima termostabilne DNK polimeraze, od kojih je najčešće korišćena *Taq* polimeraza. Svaki od sintetisanih ciljnih molekula DNK služi kao matrica za sintezu novih kopija ciljnog molekula. Na ovaj način ciljna sekvencu DNK se može umnožiti i milijardu puta i time se uspešno analizirati DNK iz minimalne količine polaznog materijala.

PCR se sastoji od 25 do 45 ponovljenih ciklusa od kojih svaki ima tri koraka:

1. *Denaturacije matrice DNK* raskidanjem vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK na temperaturi od na 95°C, 30-60 sekundi.
2. *Hibridizacije prajmera sa matricom* uspostavljanjem vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici na temperaturi od 42 do 65°C, 20-60 sekundi. Temperature hibridizacije su 3-12°C iznad temperature topljenja (T_m) za dati par prajmera i moraju se empirijski odrediti.
3. *Elongacije prajmera* katalizovane termostabilnom DNK polimerazom na 72°C, 20 sekundi do 2 minuta.

Pre prvog ciklusa PCR-a izvodi se inicijalna denaturacija. Ukoliko se radi o genomskoj DNK PCR smeša se inkubira 3 do 5 minuta na 95°C.

Nakon poslednjeg ciklusa PCR izvodi se korak finalne elongacije u kome dolazi do kompletiranja parcijalno sintetisanih produkata tako što se PCR smeša inkubira 5 do 15 minuta na 72°C.

PCR proces zavisi i od velikog broja reagenasa i njihovih koncentracija u reakcionoj smeši.

Prajmeri su tipično 14 do 40 nukleotida dugi, sa GC sadržajem od 40-75%. *Prajmeri* manjih dužina nespecifično hibridizuju sa DNK. Sekvenca *prajmera* treba da je takva da se izbegne komplementarnost 3' krajeva, jer u suprotnom dolazi do njihove međusobne hibridizacije i formiranja dimera *prajmera* (eng. *primer-dimers*). *Prajmeri* ne treba da sadrže palindromske sekvence koje dovode do formiranja sekundarnih struktura. Optimalna koncentracija *prajmera* se utvrđuje empirijski, a kreće se u opsegu od 0,1 μM do 1 μM .

Optimalna koncentracija MgCl_2 u PCR reakcionoj smeši je u opsegu od 0,5 mM do 5mM. Slobodni joni magnezijuma su neophodni za aktivnost *Taq* polimeraze, a i za formiranje kompleksa sa nukleotidima koji se u takvoj formi ugrađuju u DNK lanac tokom elongacije.

Optimalna koncentracija *dezoksiribonukleotid trifosfata* (eng. *deoxyribonucleotide triphosphate* – dNTP) u PCR reakcionoj smeši iznosi od 20-200 μM i zavisi od dužine fragmenta koji se amplifikuje, koncentracije Mg^{2+} jona i koncentracije *prajmera*. Veliki višak nukleotida u PCR reakcionoj smeši smanjuje količinu PCR produkta jer uklanja slobodni magnezijum, čime se smanjuje aktivnost *Taq* polimeraze i efikasnost hibridizacije *prajmera*.

Za izvođenje PCR-a korišćen je *AmpliTaq Gold PCR Master Mix*-a (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) koji sadrži sve neophodne hemijske komponente osim matrice i *prajmera*. Komponente su prisutne u dvostrukoj koncentraciji. *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* sadrži sledeće komponente:

- *AmpliTaq Gold* DNK polimerazu (0,05 U/ μl) – rekombinantna termostabilna polimeraza kodirana modifikovanom formom gena za *Taq* polimerazu. Aktivacija ove polimeraze se dešava na visokoj temperaturi što omogućava rad na sobnoj temperaturi na kojoj je enzim neaktivan. Enzim može biti kompletno ili parcijalno aktiviran u koraku koji prethodi PCR-u inkubiranjem 5 minuta na 95°C ili postepeno tokom trajanja PCR-a,
- Pufer *GeneAmp PCR Gold* (30 mM Tris/HCl, pH 8,05, 100 mM KCl) – PCR pufer u kome je aktivnost enzima optimalna,
- dNTP-e u ekvimolarnim koncentracijama od 400mM,
- MgCl_2 – 5 mM, izvor Mg^{2+} jona,
- stabilizatore.

Količina genomske DNK u PCR reakcionoj smeši od 25 μL bila je 200 ng. Sekvence i finalne koncentracije *prajmera* u PCR reakcionoj smeši, kao i dužine dobijenih amplifikata date su u Tabeli 3, dok su temperaturni i vremenski profil PCR reakcija dati u Tabeli 4. Korišćeni *prajmeri* su firme METABION (*Germany*), a PCR aparat Mastercycler gradient (EPPENDORF, *Germany*).

Tabela 3. Sekvence i finalne koncentracije prajmera u PCR reakcionoj smeši, i dužina dobijenih amplifikata

Sekvenca prajmera (5'-3')		Finalne koncentracije (μM)	Dužina Amplifikata (bp*)
egzon 4S	ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG	0,25	296
egzon 4AS	GCA ACT GAC CGT GCA AGT CA		
egzon 5S	TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT	0,25	268
egzon 5AS	CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG		
egzon 6 S	TGG TTG CCC AGG GTC CCC AG	0,25	223
egzon 6AS	GGA GGG CCA CTG ACA ACC A		
egzon 7S	ACT GGC CTC ATC TTG GGC CT	0,25	171
egzon 7AS	TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC		
egzon 8S	TAA ATG GGA CAG GTA GGA CC	0,25	230
egzon 8AS	TCC ACC GCT TCT TGT CCT GC		
GP5+**	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	0,16	150
GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C		
β globinS	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	0,16	268
β globinAS	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC		
HPV16 E7S	CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG C	0,10	285
HPV16 E7AS	CTG AGA ACA GAT GGG GCA CAC		
HPV18 E1S	AAC AGT CCA TTA GGG GAG CGG CTG GA	0,10	187
HPV18 E1AS	TGC CGC CAT GTT CGC CAT TTG		

* – bazni par

** – GP5+/GP6+ prajmeri su tako dizajnirani da se njima amplifikuje konzervisana sekvenca L1 virusnog gena 23 tipa HPV (6, 11, 13, 16, 18, 30-35, 39, 40, 42, 45, 51-53, 56, 58, 61, 66, 68) (de Roda Husman et al., 1995).

Tabela 4. Temperaturni i vremenski profil PCR reakcija

Protokol	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija
egzon 4 <i>TP53</i> 35 ciklusa	5 min, 95°C - inicijalna denaturacija 50 s, 95°C	50 s, 55°C	1 min, 72°C	
egzoni 5-8 <i>TP53</i> 35 ciklusa	5 min, 95°C- inicijalna denaturacija 1 min, 95°C	1 min, 60°C		
GP5+/GP6+ 16 ciklusa	1 min, 94°C	2 min, 55°C do 40°C*	1,5 min, 72°C	
24 ciklusa	1 min, 94°C	2 min, 40°C	1,5 min, 72°C	4 min, 72°C
β globin, HPV16 40 ciklusa	10 min, 95°C - inicijalna denaturacija 30 s, 95°C	1 min, 55°C	2 min, 72°C	
HPV18 40 ciklusa	30 s, 94°C	1,5 min, 70°C	1 min, 72°C	2 min, 72°C

* temperatura hibridizacije je niža za 1°C u svakom narednom ciklusu – *touchdown PCR* (Evans et al., 2005).

3.5. ELEKTROFOREZA U AGARONOM GELU

Elektroforeza je metoda za razdvajanje nukleinskih kiselina i proteina. Ovi molekuli poseduju električni naboj i kroz gel pod dejstvom električne struje i u prisustvu pufera koji obezbeđuje uspostavljanje električnog polja mogu se kretati od jedne elektrode ka drugoj. Kretanje molekula zavisi od osobina molekula koji se razdvajaju (veličine, gustine naelektrisanja, konformacije,...) i od uslova pod kojim se elektroforeza vrši (veličine pora u gelu, primenjene električne struje i napona, temperature, sastava i jonske jačine pufera). Molekuli DNK poseduju negativno naelektrisanje jer su u fiziološkim uslovima fosforne grupe duž kičme DNK jonizivane. Zato će se oni u električnom polju u prisustvu blago alkalnog pufera kretati od katode ka anodi.

Elektroforeza se primenjuje u analitičke i preparativne svrhe. Podloga za elektroforezu ili gel-nosač treba da je od materijala koji ne reaguje sa uzorkom i da se molekuli koji se analiziraju na njemu ne adsorbuju. Kao podloge se koriste agarozni ili poliakrilamidni

gelovi. Elektroforezom se mogu proceniti veličine fragmenata DNK poređenjem brzina kretanja ovih fragmenata sa brzinom kretanja fragmenata DNK poznate veličine (standarda za dužinu - markera DNK).

Nakon rastvaranja, kuvanja i laganog hlađenja rastvora agaroze nastaje gel tako što se lanci agaroze povezuju vodoničnim vezama i formiraju mrežu sa porama od 100 nm do 300 nm u zavisnosti od koncentracije rastvora agaroze. Postoji više tipova agaroze koji se razlikuju po modifikacijama osnovnog lanca agaroze. Koncentracija rastvora agaroze i tip agaroze određuju rezoluciju gela, odnosno sposobnost razdvajanja molekula DNK različitih dužina. Visoko procentni rastvori agaroze formiraju gelove na kojima se dobro razdvajaju manji fragmenti DNK i obrnuto.

Za pravljenje gelova, kao i za uspostavljanje električnog polja koriste se određeni puferi. Neophodno je da se isti pufer i u istoj koncentraciji koristi i za pravljenje gela i za elektroforezu. Tris-boratni pufer (TBE) pH 8,0 se koristi za analize amplifikovanih fragmenata DNK PCR metodom.

Za praćenje toka elektroforeze koriste se boje brom-fenol plavo i ksilencijanol koje se nalaze u puferu za nalivanje uzorka (eng. *loading buffer*), koji imaju i ulogu da povećaju gustinu uzorka, čime se omogućava da DNK iz uzorka padne na dno bunarića. Pufer za nalivanje uzorka na bazi fikola daje najoštrije trake na gelu.

Za elektroforezu je potrebno primeniti odgovarajući napon, jačinu struje i vreme trajanja. U principu, fragmenti DNK putuju kroz gel u meri koja je proporcionalna primenjenom naponu (V) po dužini (cm) rastojanja između elektroda. Potrebno je podesiti i struju adekvatnog intenziteta jer prejaka struja dovodi do prekomernog grejanja pufera, topljenja gela i difuzija traka na gelu zbog bržeg propadanja puferskog sistema, dok struja suviše niskog intenziteta dovodi do difuzije molekula DNK u gelu.

Etidijum bromid (EtBr) se koristi za vizuelizaciju molekula DNK u gelu. On se umeće između baza DNK i fluorescira narandžasto-crveno (560 nm) kada se osvetli UV svetlom talasne dužine od 260 nm do 320 nm. Intenzitet fluorescentnih traka je proporcionalan količini i veličini fragmenata DNK.

Trajni zapis elektroforeze u agaroznom gelu dobija se fotografisanjem gela izloženog UV svetlu.

Elektroforezom u agaroznom gelu u ovom radu proveravana je količina i kvalitet izolovane DNK pre PCR-a, kao i prinos i specifičnost amplifikovanih produkata nakon PCR-a.

PROCEDURA:

NEOPHODNI RASTVORI:

10XTBE:

Tris	121 g
Borna kiselina	55 g (MT TRADE, <i>Yugoslavia</i>)
EDTA	40 mL

pH 8,0 se podešava sa HCl.

Iz štoka 10xTBE pravi se 0,5xTBE.

5x pufer za nalivanje uzoraka : ksilencijanол (SIGMA, USA) 0,25% u 30% glicerolu (MT TRADE, Yugoslavia).

- Pripremiti nosač gela:
 - zalepiti lepljivu traku na obe ivice kadice za gel
 - postaviti češljeve
 - postavljanjem libele između češljeva proveriti nagib podloge.
- Napraviti 2% agarozni gel sa 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtBr u količini od 30mL:
 - 30 mL 0,5xTBE
 - 0,6 g agaroze (ICN BIOMEDICALS, Ohio)
 - 1,5 μL EtBr (10 mg/mL) (SIGMA, USA).
- Zagrejati do ključanja u erlenmajeru na magnetnoj mešalici (MSH 300, BOECO, Germany) dok se rastvor ne izbistri, a potom rashladiti do 60-65°C i razliti gel između 2 češlja u unapred pripremljen nosač.
- Ostaviti gel da polimeriše 25-30 minuta.
- Staviti nosač gela u kadicu za elektroforezu (GNA 100, PHARMACIA BIOTECH, Sweden) i sipati 0,5xTBE pufer, tako da malo prekrije gel.
- Na providnu foliju zategnutu preko petri šolje mikropipetom staviti po 1,5 μL pufera za nalivanje uzorka i 6,5 μL uzorka dodati mikropipetom na kap boje. Uzeti uzorak sa bojom i naneti u bunarić u gelu.
- Staviti poklopac na kadicu i elektrode priključiti na izvor struje za elektroforezu. Podesiti napon, struju i vreme trajanja elektroforeze na transformatoru (EPS 600, PHARMACIA BIOTECH, Sweden):
 - I = 25 mA; t= 25 min za proveru PCR produkata egzona 4-8 TP53 gena, β globina, HPV16 i HPV18;
 - I = 25 mA; t= 50 min za proveru GP5+/GP6+ PCR produkata.Uporedo sa PCR produktima koji se analiziraju nanosi se i 2 μL markera DNK pUC18 HaeIII Digest (SIGMA, USA) ili 3 μL O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder ready-to-use (FERMENTAS, Lithuania) da bi se proverila specifičnost PCR produkata kroz približno određivanje njegove dužine.
- Posmatrati razdvojene fragmente DNK u gelu po završenoj elektroforezi na UV transiluminatoru (MacroVue UV-25, HOEFER, USA).

3.6. ELEKTROFOREZA DNK U POLIAKRILAMIDNOM GELU – PAGE

Poliakrilamidni gel nastaje ko-polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida (N-N'-metilen-bis-akrilamid), koji pravi spojeve između lanaca poliakrilamida, tako da nastaje mrežasta struktura. Reakcija polimerizacije je aktivirana amonijum-persulfatom (APS-om) i tetrametiletildiaminom (TEMED-om). APS sadrži persulfatne slobodne radikale koji aktiviraju TEMED. Nespareni elektron aktiviranog TEMED-a se prenosi na akrilamidni

monomer i aktivira ga. Aktivirani akrilamidni monomer aktivira drugi akrilamidni monomer, i tako redom raste lanac poliakrilamidnih monomera. Lanci se povezuju preko bisakrilamida. Najčešće se gelovi prave da se jedan molekul bisakrilamida nalazi na oko 29 akrilamidnih monomera. Dužina poliakrilamidnih lanaca zavisi od koncentracije akrilamida (3,5% do 20%), a od nje zavisi rezolucija gela.

Prilikom pripreme poliakrilamidnih gelova potrebno je voditi računa o faktorima koji utiču na kvalitet gela. To su čistoća supstanci, količine TEMED-a i APS-a, kontaminacija određenim jonima, temperatura, koncentracija kiseonika itd.

Akrilamid i bisakrilamid se tokom vremena deaminacijom pretvaraju u akriličnu i bisakriličnu kiselinu u reakciji koja je katalizovana svetlom i alkalijama. Zato rastvor akrilamida treba da ima pH 7 ili manje i da se čuva u tamnoj boci u frižideru. Akrilična kiselina može da dovede do lokalnih pH promena u gelu što uzrokuje formiranje artefakata, promene u mobilnosti fragmenata u gelu ili do nepravilnog putovanja u takvim delovima gela (eng. *smiling effect*). „Smiling” efekat je uzrokovan i nejednakim raspoređivanjem toplote tokom elektroforeze, tako da su ivice gela hladnije od centra, gde fragmenti brže putuju zbog više temperature.

Kontaminacija određenim jonima može da ubrza ili uspori polimerizacioni proces. Prevelike količine TEMED-a i APS-a izazivaju promene pH vrednosti, dok smanjena količina ovih supstanci dovodi do formiranja dužih poliakrilamidnih lanaca, manje gustine i veće elastičnosti gelova. Zato se za pravljenje poliakrilamidnih gelova određene koncentracije treba pridržavati propisanih količina reagenasa koji aktiviraju reakciju polimerizacije.

Gelovi koji polimerizuju na 4°C su neelastični, a oni na 25°C su manje porozni i elastičniji. Reakcija polimerizacije je egzotermna i oslobođena toplota ubrzava dalju reakciju. Kiseonik iz vazduha rastvoren u gelu inhibira reakciju polimerizacije.

Po završenoj elektroforezi razdvojena DNK se može vizualizovati bojenjem EtBr ili srebrom. Pošto se EtBr ugrađuje i u sam lanac akrilamida, te on fluorescira pod UV svetlom, na ovaj način se ne mogu detektovati fragmenti koji sadrže manje od 10 ng DNK. Zato je pogodnije bojenje srebrom. Po elektroforezi gelovi se potapaju u rastvore etanola, azotne kiseline i ispiraju destilovanom vodom. Zatim se dodaje rastvor za impregnaciju gela koji se sastoji od srebro-nitrata i inkubira određeno vreme na sobnoj temperaturi i u mraku. Potom se dodaje razvijajući koji se sastoji od natrijum-bikarbonata i formaldehida, a zatim se reakcija bojenja stopira i gel fiksira rastvorom sirćetne kiseline.

3.6.1. POLIMORFIZAM KONFORMACIJE JEDNOLANČANIH FRAGMENTA DNK – SSCP

Polimorfizam konformacije jednolančanih fragmenata DNK (eng. *single stranded conformation polymorphism* – SSCP) je metoda za skrining i, u nekim slučajevima, detekciju mutacija i polimorfizama. Ova metoda je našla primenu za detekciju promena u sekvencama DNK u različitim kontekstima. Zasniva se na razlikama u mobilnosti jednolančanih fragmenata DNK u nenedenaturišućem poliakrilamidnom gelu, koja je

posledica njihove prostorne konformacije nastale intramolekulskim interakcijama zavisnim od primarne strukture DNK. Fragmenti DNK koji sadrže promenu u sekvenci zauzimaju različitu konformaciju i tokom elektroforeze različito putuju od wt fragmenata DNK. Međutim, metoda nije apsolutno senzitivna, jer jednolančani fragmenti DNK različitih sekvenci nekada zauzimaju takve prostorne konformacije da pokazuju istu mobilnost kroz poliakrilamidni gel tokom elektroforeze. To može da dovede do lažno negativnih rezultata u detekciji promena u sekvenci DNK. Osetljivost metode u detekciji promena u sekvenci DNK je do 95% ukoliko se radi o fragmentima manjim do 250 do 300 bp, a opada sa porastom dužine fragmenata DNK.

SSCP metoda je u ovom radu korišćena za skrining mutacija u egzonima od 4 do 8 *TP53* gena.

PROCEDURA:

Priprema poliakrilamidnog gela:

Neophodni rastvori:

30% štok akrilamida (odnos akrilamida i bisakrilamida 29:1):

- 29 g akrilamida (SIGMA, USA),
- 1 g bis-akrilamida (SIGMA, USA),
- dopuniti dejonizovanom vodom do 100 mL.

10% APS:

- 0,1 g APS (ACROS ORGANICS, USA),
- dopuniti dejonizovanom vodom do 1mL.

Za 50 mL 8% gela potrebno je:

- 13,3 mL 30% štoka akrilamida,
- 29 mL dejonizovane vode,
- 2,5 mL 10xTBE,
- 350 µL 10% APS,
- 20 µL TEMED (SIGMA, USA).

Priprema uzoraka za SSCP:

- 10 µL dejonizovane vode,
- 6 µL PCR amplifikata (ako je koncentracija amplifikata mala povećati količinu za 30%, količinu vode smanjiti za isto toliko),
- 3 µL pufera za nalivanje uzorka:
 - 1 mL formamida (SIGMA, USA),
 - 50 µL boje: 1% bromfenol-plavo (SIGMA, USA), 1% ksilen-cijanol u vodi,
 - 1 µL 10 M natrijum hidroksida (MT TRADE, *Yugoslavia*).

Uporedo sa PCR amplifikatima tumorske DNK pripremanju se i sekvencirani PCR amplifikati (za odgovarajuće egzone) DNK izolovane iz limfocita periferne krvi zdravih osoba, koji služe kao kontrole.

Ovako pripremljeni uzorci se denaturišu 5 minuta na 95°C, a zatim stavljaju na led da bi se sprečila njihova renaturacija.

Nalivanje poliakrilamidnog gela i PAGE:

- Sklopiti aparaturu za nalivanje gela prema uputstvima proizvođača (BIO RAD, USA) i sveže napravljen gel naliti špricom između ploča.
- Namestiti češalj između ploča vodeći računa da se ne naprave mehurići vazduha ispod zubića češlja i proveriti da gel ne curi iz sistema.
- Pustiti da gel polimerizuje na sobnoj temperaturi 30-45 minuta.
- Pažljivo izvaditi češalj i staviti ploče u sistem za elektroforezu.
- Isprati bunariće gela 0,5xTBE puferom. Napuniti rezervoare za pufer 0,5xTBE rastvorom i pripremljene uzorke naliti u bunariće.
- Zatvoriti sistem i spojiti elektrode sa transformatorom (PowerPac HC™, BIO RAD, USA). Podesiti napon, struju i vreme trajanja elektroforeze.*
- Po završetku elektroforeze rasklopiti sistem i razdvojiti ploče, pazeći da se gel ne ošteti.
- Vizuelizaciju vršiti bojenjem gela srebrom.

*Uslovi elektroforeze za SSCP za egzone 4-8 TP53 gena: U=100 V, t= 150 min, T=4°C.

Bojenje gela srebrom:

- Potopiti gel 7 minuta u 10% etanol.
- Odliti etanol, dodati 1% azotnu kiselinu (LACH-NER, Czech Republic) i inkubirati 3 minuta.
- Isprati gel 2 puta po 1 minut dejonizovanom vodom.
- Odliti vodu, dodati 0,2% rastvor srebro-nitrata napravljen neposredno pre upotrebe (CENTROHEM, Serbia) i držati 20-30 minuta u mraku.
(0,4 g AgNO₃ za 200ml rastvora).
- Isprati gel 2 puta po 1 minut dejonizovanom vodom.
- Sipati rastvor natrijum karbonata (MERCK, Germany)
(5,72 g natrijum karbonata u 200 mL dejonizovane vode, 120 µL 36-38% formaldehida (LACH-NER, Czech Republic) i sačekati da se pojave trake koje predstavljaju fragmente DNK - posle desetak minuta).
- Sipati 10% rastvor sirćetne kiseline (LACH-NER, Czech Republic) i odmah zatim isprati dejonizovanom vodom.

3.7. AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK

Automatsko sekvenciranje DNK metodom *cycle sequencing* zasniva se na modifikaciji metode za sekvenciranje DNK koju su razvili Sanger i saradnici 1977. godine i PCR-a. Sangerova metoda bazira se na osobini DNK polimeraze da može da inkorporira 2', 3' dideoksi dezoksiribonukleotid trifosfate (ddNTP) na 3' kraj rastućeg DNK lanca, čime se elongacija prekida selektivno na A, C, G ili T usled odsustva 3'-hidroksilne grupe u ddNTP-ovima.

Četiri fluorescentne boje služe kao obeleživači koji se inkorporiraju u ekstenzione produkte DNK tokom PCR-a. Bojama se obeležavaju prajmeri na 5' kraju (eng. *dye primers*) ili ddNTP-ovi na 3' kraju (eng. *dye terminators*) koji se koriste u PCR reakciji. PCR u automatskom sekvenciranju omogućava da se u sukcesivnim ciklusima denaturacije, hibridizacije i elongacije linearno amplifikuju ekstenzioni produkti. Rezultat reakcije je mešavina oligonukleotida različite dužine koji sadrže bojama obeležene ddNTP-ove na svojim 3' krajevima.

Dobijeni obeleženi fragmenti DNK se elektroforetski razdvajaju kroz kapilaru ispunjenu separacionim matriksom. Svaka od fluorescentnih boja emituje svetlost različite talasne dužine kada se ekscitira laserom što omogućava detekciju svake od četiri baze koja je u vidu ddNTP-a ugrađena u fragment DNK.

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) je instrument koji automatski analizira fluorescentno obeležene fragmente DNK tokom kapilarne elektroforeze. Pod uticajem električne struje fragmenti DNK putuju kroz kapilaru ispunjenu separacionim polimerom od katode ka anodi. Kada fragmenti dođu do detektorskog prozora u kapilari, laser ekscitira fluorescentne obeleživače. Emitovana fluorescencija iz boja se skuplja putem CCD (eng. *charge-coupled device*) kamere i čuva kao digitalni zapis u kompjuteru, nakon čega se obrađuje softverom Sequencing Analysis (APPLIED BIOSYSTEMS, USA).

3.7.1. PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA

QIAquick sistem (QIAGEN, Germany) je sistem za brzo prečišćavanje više od 10 µg fragmenata DNK iz enzimatskih reakcija i agaroznih gelova. Ovaj sistem se zasniva na adsorpciji DNK na silika-membranu u prisustvu jakih soli, dok kontaminanti prolaze kroz kolonu. Puferi za vezivanje u kitu obezbeđuju odgovarajuću koncentraciju soli i pH za adsorpciju DNK za silika membranu. Adsorpcija nukleinskih kiselina za površinu silika membrane se događa u prisustvu visoke koncentracije haotropnih soli koje modifikuju strukturu vode. Adsorpcija DNK zavisi i od pH vrednosti tako da je 95% ako je $\text{pH} \leq 7,5$ i dramatično opada na višim pH vrednostima.

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) se koristi za prečišćavanje jednolančanih i dvolančanih fragmenata DNK iz PCR-a i drugih enzimatskih reakcija. Upotrebom *QIAquick spin* kolona fragmenti veličine 100 bp-10 kb se mogu prečistiti od prajmera, nukleotida, enzima, soli i drugih nečistoća. PB pufer u ovom kitu omogućava

efikasno vezivanje jednolančanih i dvolančanih fragmenata DNK malih i do 100 bp i kvantitativno (99,5%) otklanjanje prajmera do 40 nukleotida. Tokom adsorpcije prajmeri i nečistoće, kao što su soli, neinkorporirani nukleotidi, agaroz, boje, etidijum bromid, ulja i deterdženti ne vezuju se za silika membranu, već prolaze kroz kolonu. Soli se kvantitativno ispiraju puferom PE koji sadrži etanol. Višak PE pufera uklanja se centrifugiranjem.

Efikasnost elucije zavisi od koncentracije soli i pH EB pufera (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) kojim se eluira DNK. Elucija je najefikasnija pri niskim koncentracijama soli. Maksimum elucije je između pH 7,0 i 8,5.

PROCEDURA:

Napomena:

- Pri prvoj upotrebi kita dodati 220 mL etanola (96-100%) u PE pufer i 600 μ L pH indikatora u 150 mL PB pufera (1:250).
 - Svi koraci centrifugiranja su na 17 900 x g.
-
- Dodati 5 zapremina PB pufera na jednu zapreminu PCR smeše i izmešati. pH indikator PB pufera nakon dodavanja u uzorak treba da bude žute boje. Ukoliko je narandžaste ili ljubičaste boje (pH>7,0), dodati 10 μ L 3 M Na-acetata pH 5,0 i izmešati. pH indikator u uzorku bi trebalo da se vrati u žutu boju.
 - Sipati uzorak u kolonu i centrifugirati 1 minut. Prosuti iz tubice ono što prođe kroz kolonu i vratiti kolonu u tubicu. U ovom koraku DNK se vezuje za kolonu, dok se ostale komponente smeše ispiraju.
 - Dodati 0,75 mL PE pufera i centrifugirati 1 minut. Prosuti iz tubice ono što prođe kroz kolonu, vratiti kolonu u tubicu i dodatno centrifugirati praznu kolonu 1 minut.
 - Kolonu prebaciti u čistu ependorficu od 1,5 mL.
 - Dodati 30 μ L EB pufera na sredini kolone, ostaviti da se inkubira 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugirati 1 minut, kako bi se eluirala DNK.
 - Ependorficu sa prečišćenom DNK čuvati na 4°C do analize.

3.7.2. PCR ZA SEKVENCIRANJE

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (APPLIED BIOSYSTEMS, USA) sadrži: *dye terminator-e*; dNTP-ove; *AmpliTaq* DNK Polimerazu, FS; rTth pirofosfatazu, magnezijum hlorid i pufer. *AmpliTaq* DNK Polimeraza, FS je mutantna forma *Taq* polimeraze koja sadrži tačkastu mutaciju u aktivnom mestu koja omogućava manju diskriminaciji ddNTP-ova i tačkastu mutaciju u amino terminalnom domenu koja uklanja 5'→3' nukleaznu aktivnost čime se generišu čistiji signali sa redukovanim pozadinskim šumom i gotovo bez gubitka terminatora. Termostabilna neorganska pirofosfataza ragrađuje oslobodene neorganske pirofosfate nastale nakon ugradnje dNTP-ova ili ddNTP-ova sprečavajući njihovu akumulaciju koja polimerizacionu reakciju može učiniti

reverznom. Naime, ugrađeni nukleotid monofosfati se mogu ukloniti iz ekstenzionih produkata i sa pirofosfatom opet formirati nukleotid trifosfate.

PROCEDURA:

REAGENSI:	KOLIČINA:
Ready Reaction Premix 2.5X	4 μ L
Big Dye Sequencing Buffer 5X	2 μ L
Prajmer 10 pmol/ μ l	1 μ L
DNK matrica	*
Dejonizovana voda	**

* DNK matrica se dodaje u zavisnosti od veličine PCR amplifikata i to:

VELIČINA PCR AMPLIFIKATA	KOLIČINA DNK matrice
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng

** Voda se dodaje tako da ukupna zapremina reakcione smeše bude 20 μ L.

Temperatura i vremenski profil *cycle sequencing* reakcije:

1 minut na 96°C

25 ciklusa : 10 sekundi na 96°C

5 sekundi na 50°C

4 minuta na 60°C

3.7.3. PRIPREMA UZORKA ZA KAPILARNU ELEKTROFOREZU

Pre analize ekstenzionih produkata kapilarnom elektroforezom tokom koje se vrši i automatsko očitavanje sekvence potrebno je uraditi precipitaciju ekstenzionih produkata sa etanolom i EDTA, čime se uklanjaju neinkorporirani obeleženi ddNTP-ovi koji mogu da maskiraju podatke na početku sekvence. Prečišćeni ekstenzioni produkti se rastvaraju u formamidu (HiDi Formamide, APPLIED BIOSYSTEMS, USA) koji sprečava intralančanu hibridizaciju i degradaciju ekstenzionih produkata.

PROCEDURA:

- Nakon *cycle sequencing* reakcije, u svaku od ependorfica dodati 5 μ L 125 mM EDTA i 60 μ L 95-100% etanola, izmešati okretanjem ependorfice 4 puta i inkubirati na sobnoj temperaturi 15 minuta.
- Centrifugirati na 3 800 x g 45 minuta na 4°C. Odliti supernatant tako što se odseče

poklopac ependorfice, ona se zapuši papirnom vatom, stavi naopako u centrifugu i centrifugira dok se ne dostigne 185 x g i odmah zaustaviti.

- Dodati 60 μ L 70% etanola. Centrifugirati na 2 700 x g 25 minuta na 4°C i odliti supernatant kao u prethodnom koraku.
- Osušiti talog na 90°C 1 minut u mašini za PCR držeći ependorfice otvorene.
- Dodati 25 μ L HiDi formamida svakom talogu i vorteksovati.
- Denaturisati DNK 2 minuta na 95°C, zatim staviti na led, vorteksovati, i opet staviti na led.
- Čuvati uzorke na -20°C do kapilarne elektroforeze.

3.7.4. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Za kapilarnu elektroforezu je korišćen polimer POP6 (*Performance Optimized Polymer 6*, APPLIED BIOSYSTEMS, USA). Uslovi elektroforeze za kapilaru od 47 cm su 15 kV na 50°C u trajanju od 35 minuta (*module Seq Pop6 Rapid 1ml E.md4*, APPLIED BIOSYSTEMS, USA). Vreme injeciranja uzorka je 40 sekundi pri naponu od 3 kV. U skladu sa korišćenom hemijom za obeležavanje ekstenzionih produkata (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) odabran je Dye Set/Primer (Mobility) File: DT310 POP6 {Bdv3}v2.mob (APPLIED BIOSYSTEMS, USA).

3.7.5. ANALIZA SEKVENCI

Digitalni zapisi automatskog očitavanja sekvenci tokom kapilarne elektroforeze obrađuju se putem Sequencing Analysis softvera. Dobijene sekvence se upoređuju sa referentnom sekvencom (*GenBank sequence no. X54156*) za TP53 gen upotrebom BLAST programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) čime se istražuje prisustvo mutacija ili polimorfizama u analiziranim uzorcima. Značaj uočenih promena u analiziranim uzorcima se analizira u bazi podataka za mutacije u TP53 genu - *International Agency for Research on Cancer (IARC)* (<http://www-p53.iacr.fc/>).

Tipovi HPV se određuju analizom 34 bp sekvence DNK u hipervarijabilnom regionu L1 gena nizvodno od GP5+ vezujućeg mesta, tj. poredjenjem dobijene sekvence, upotrebom BLAST programa, sa poznatim HPV genotipskim sekvencama u Gen Bank bazi podataka. Medjutim, HPV16 ima brojne sekvencione varijante, od kojih neke dele identičnu sekvencu u ovom regionu sa nekim podtipovima HPV31 i HPV33 i zahtevaju 50 bp sekvence za genotipizaciju (Lee, 2007).

3.8. ANALIZA POLIMORFIZAMA DUŽINE RESTRIKCIONIH FRAGMENTA

Restrikcioni enzimi su nukleaze koje prepoznaju i seku specifičnu sekvencu DNK. Mesta koja ove nukleaze prepoznaju označena su kao restrikciona mesta (eng. *restriction site*

polymorphisms - RSP) i specifična su za svaki enzim. Ukoliko dođe do promene sekvence DNK restrikciono mesto se može promeniti ili se može formirati novo. Naime, zamene jedne od baza u postojećem restrikcionom mestu ga menja na takav način da ga enzim neće prepoznati i digestija izostaje.

Polimorfizam dužina restrikcioniha fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism* – RFLP) je metoda koja podrazumeva amplifikaciju specifične sekvence u kojoj se odigrava promena tipa nukleotidne zamene, zatim restrikcionu digestiju amplifikovaniha fragmenata DNK i na kraju proveru veličine produkata digestije na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu.

Polimorfizam dužina restrikcioniha fragmenata je u ovom radu korišćen za detekciju polimorfizama kodona 72 *TP53* gena.

PROCEDURA:

Egzon 4 *TP53* gena se amplifikuje PCR-om po protokolu iz Tabele 4.

Prajmeri za egzon 4 *TP53* gena, kao i temperatura i vremenski profil PCR-a dati su u odeljku 3.4.

Uspešnost PCR reakcije se proverava elektroforezom u 2% agaroznom gel (odeljak 3.5.).

Smeša za restrikcionu digestiju fragmenata DNK se sastoji od:

1,5 μ L PCR smeše,

24,5 μ L dejonizovane vode,

2 μ L 10x Pufera R (FERMENTAS, *Lithuania*),

1,5 μ L *Bsh1236I* restrikcione nukleaze (FERMENTAS, *Lithuania*).

Digestija se izvodi inkubiranjem 1h i 20 minuta na 37°C, a reakcija se prekida inkubiranjem smeše 20 minuta na 65°C.

Fragmenti dobijeni digestijom se analiziraju elektroforezom u 8% nativnom poliakrilamidnom gelu.

Priprema uzoraka za PAGE:

10 μ L dejonizovane vode

6 μ L PCR amplifikata

3 μ L pufera za nalivanje (0,25% bromfenol-plavo, 0,25% ksilol-cijanolo, 20% fikol (SIGMA, USA) u vodi)

Uporedo sa uzorcima koji se analiziraju nanosi se i marker DNK pUC18 HaeIII Digest (15 μ L dejonizovane vode, 1 μ L markera i 3 μ L pufera za nalivanje), da bi se odredila približna dužina restrikcioniha fragmenata.

Bsh1236I restrikciona nukleaza seče PCR amplifikat za egzon 4 *TP53* gena od 296 bp na poziciji CG[↓]CG, tako da se dobijaju fragmenti veličine 126 i 170 bp. Arg/Arg homozigoti se vizuelizuju sa dve trake na gelu (126 bp and 170 bp), Pro/Pro homozigoti sa jednom trakom (296 bp), a Arg/Pro heterozigoti sa tri trake (126, 170 and 296 bp).

Uslovi elektroforeze su: U=100 V i t=100 min na sobnoj temperaturi.

Po elektroforezi fragmenti DNK se vizelizuju bojenjem srebrom (kao što je opisano u odeljku 3.6.1.).

3.9. STATISTIČKA ANALIZA

Ispitivanje povezanosti *TP53* mutacija, polimorfizma kodona 72 *TP53* gena i HPV infekcije sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma, kao i karakteristikama bolesnica vršeno je Fišerovim egzaktim testom (eng. *Fisher exact test*) i χ^2 testom sa Jetsovom korekcijom (eng. *Chi-square test with Yates correction*). Za ispitivanje međusobne povezanosti između *TP53* mutacija, polimorfizma kodona 72 *TP53* gena i HPV infekcije upotrebljeni su, takođe, pomenuti testovi.

Odstupanje od Hardi-Vajnbergove (eng. *Hardy-Weinberg*) ravnoteže u kontrolnoj grupi, kao i razlike u učestalostima polimorfničkih varijanti kodona 72 *TP53* gena između kontrolne grupe i grupa bolesnica određivano je χ^2 testom.

OR-om (eng. *odds ratio*) procenjivan je doprinos polimorfničkih varijanti kodona 72 *TP53* gena za nastanak karcinoma grlića materice i jajnika.

Stepen tumorskog odgovora u odnosu na prisustvo/odsustvo mutacija u *TP53* genu, genotip kodona 72 *TP53* gena i prisustvo HPV infekcije ispitivan je Fišerovim egzaktim testom. Za prikaz vremena do progresije bolesti (eng. *progression-free interval* – PFI) korišćena je Kaplan Majer-ova (eng. *Kaplan Meier*) metoda, a za njihov opis korišćene su medijane preživljavanja i 95% intervali poverenja (eng. *confidence interval* - CI). Za testiranje razlika u vremenu do progresije bolesti, u odnosu na parametre od značaja, korišćen je Log-Rank test.

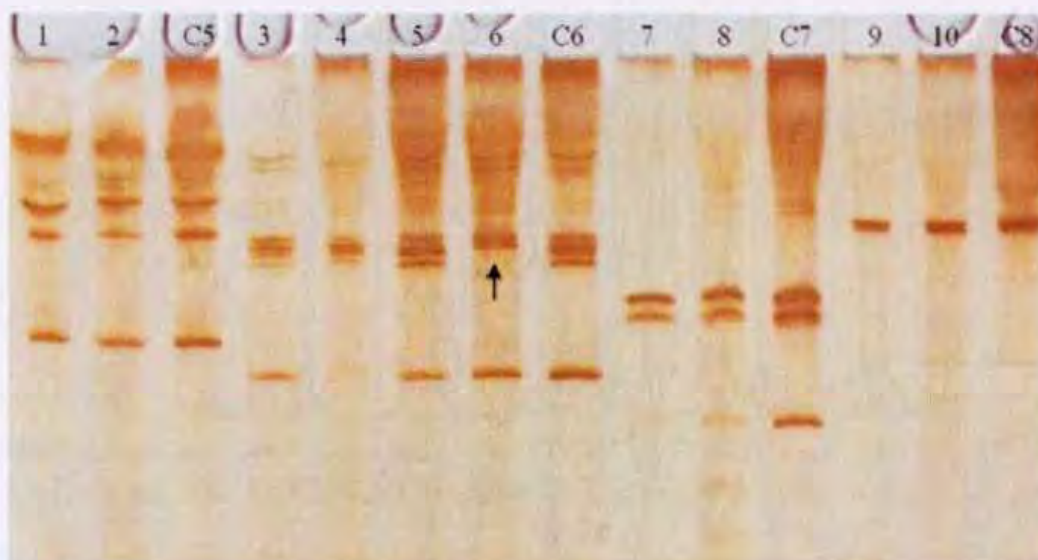
Za nivo značajnosti uzimano je $p=0,05$.

4. REZULTATI

Od ukupno 107 uzoraka karcinoma grlića materice i karcinoma jajnika, kao i 95 uzoraka briseva grlića materice, DNK je metodom izoliranja uspešno izolovana u 100% slučajeva. Kvalitet i koncentracija DNK su bili zadovoljavajući, što je proveravano spektrofotometrijskom merenjem i elektroforezom u 2% agaroznom gelu. PCR metodom su zasebno umnožavani egzoni 4, 5, 6, 7 i 8 *TP53* gena, a specifičnost i prinos PCR reakcije je proveravana u 2% agaroznom gelu.

4.1. MUTACIJE U *TP53* GENU

U ovom radu, ispitivane su mutacije u egzonima 4-8 *TP53* gena. Metoda za skrining mutacija bila je SSCP. Različit profil denaturisanih PCR produkata, po elektroforezi u 8% poliakrilamidnom gelu, u odnosu na denaturisane PCR produkte kontrolnih sekvenciranih DNK ukazalo je na prisustvo promena u sekvenci *TP53* gena (Slika 10). Automatskim DNK sekvenciranjem potvrđivano je prisustvo i utvrđivan tip mutacija. Mutacije su označene na osnovu referentne sekvence (GenBank sequence no. X54156). Sve detektovane mutacije su heterozigotnog tipa, osim ako nije drugačije naglašeno.



Slika 10. SSCP analiza egzona 5, 6, 7 i 8 *TP53* gena: kolone 1 i 2 egzon 5; kolone 3-6 egzon 6; kolone 7 i 8 egzon 7; kolone 9 i 10 egzon 8, kolone C5, C6, C7, C8 su kontrole za egzone 5, 6, 7 i 8, redom. Strelicom je označena promena u sekvenci *TP53* gena uočena u egzonu 6 (kolona 6).

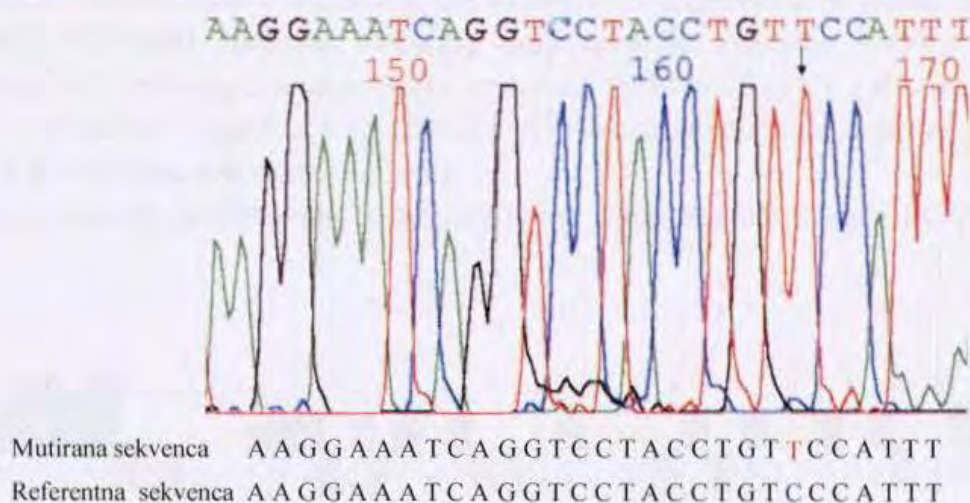
4.1.1. MUTACIJE U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE

4.1.1.1. UČESTALOST I TIP MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA

Kako su za amplifikaciju egzona 4-8 *TP53* gena korišćeni prajmeri koji su sadržali delove intronskih sekvenci, pored promena u sekvenci egzona 4-8 *TP53* gena, detektovane su i promene u sekvenci u delovima okolnih introna.

Među 53 karcinoma grlića materice, putem SSCP metode, u 5 (9,4%) slučajeva detektovane su promene u sekvenci u analiziranim delovima *TP53* gena. DNK sekvenciranje potvrdilo je u 4 (7,5%) ispitivanih karcinoma prisustvo promena u sekvenci *TP53* gena, a od toga je u samo jednom (1,9%) karcinomu detektovana mutacija u egzonu *TP53* gena.

U jednom tumoru je detektovana tačkasta mutacija koja menja značenje kodona (eng. *missense*) g.14466G>A (egzon 8) i intronska varijanta g.14612G>A (intron 8) koja za efekat ima novo mesta iskrajanja introna (eng. *false splice site*); u jednom intronska varijanta g.13009C>T (intron 4), čiji uticaj na funkciju p53 proteina nije utvrđen; i u dva tumora homozigotna intronska varijanta g.14394G>A (intron 7) koja je prvi put detektovana u ovom radu i nije prijavljena u IARC *TP53* bazi podataka (Slika 11). Sve promene su bile tipa tranzicija (G>A i C>T).



Slika 11. Genska sekvenca pokazuje promenu u intronu 7 *TP53* gena, na poziciji g.14394G>A (*GenBank sequence no.* X54156).

4.1.1.2. POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA

S obzirom da je u samo jednom tumoru detektovana egzonska mutacija u *TP53* genu zajedno sa intronskom varijantom koja za posledicu ima novo mesto iskrajanja introna i u

tri tumora intronske varijante čiji uticaj na funkciju p53 proteina nije utvrđen (odjeljak 4.1.1.1.), nije ispitivana povezanost mutacija u *TP53* genu sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma grlića materice, kao ni sa karakteristikama bolesnica sa ovim karcinomima.

4.1.2. MUTACIJE U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA U KARCINOMIMA JAJNIKA

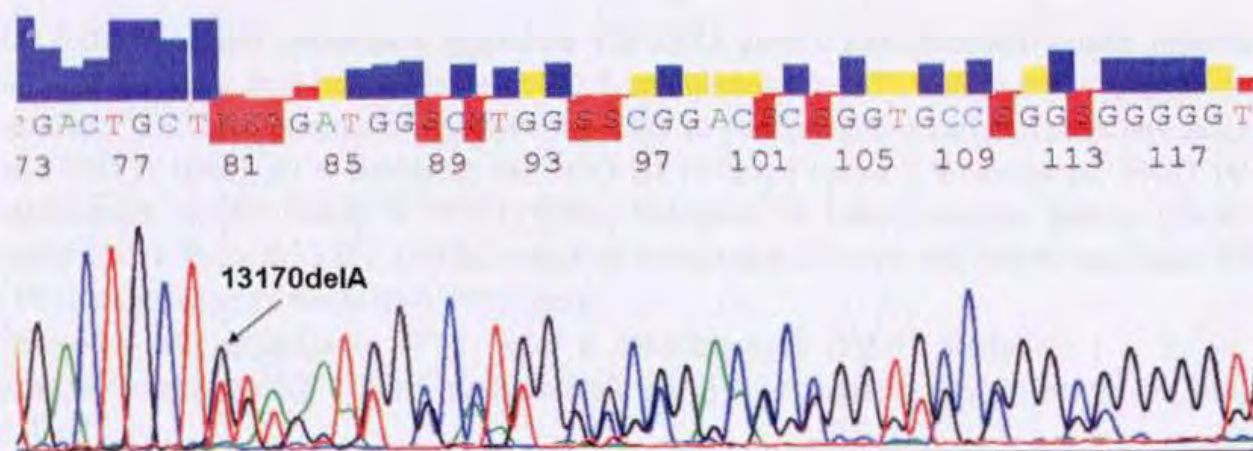
4.1.2.1. UČESTALOST I TIP MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA

Među 54 karcinoma jajnika, putem SSCP metode, u 11 (20,4%) slučajeva detektovane su promena u sekvenci u egzonima 4-8 i delovima okolnih introna *TP53* gena. DNK sekvenciranje je u 7 (13,0%) ispitivanih karcinoma potvrdilo prisustvo promena u sekvenci *TP53* gena, a od toga su u 6 (11,1%) karcinoma bile mutacije u egzonima 4-8 *TP53* gena.

Raspodela mutacija po egzonima bila je sledeća: 1/6 (16,7%) mutacija detektovana je u egzonu 4, 2/6 (33,3%) mutacija detektovane su u egzonu 5, 2/6 (33,3%) mutacija u egzonu 7 i 1/6 (16,7%) mutacija u egzonu 8.

Od 6 mutacija, 3 su bile delecije (50%), 2/6 (33,3%) tačkaste mutacije koja menjaju značenje kodona i 1/6 (16,7%) tačkasta mutacija koja uvodi stop kodon (eng. *nonsense*). Delecije su detektovane u egzonu 5 (g.13170delA i g.13180delG) (Slika 12) i egzonu 7 (g.14063_14074del), tačkaste mutacije koja menjaju značenje kodona u egzonu 7 (g.14060G>T homozigotna promena) i egzonu 8 (g.14493G>T), i tačkasta mutacija koja uvodi stop kodon u egzonu 4 (g.12082G>A). Tačkaste mutacije koja menjaju značenje kodona su bile tipa transverzija (G>T).

U jednom tumoru detektovana je homozigotna intronska varijanta g.14394G>A (intron 7).



Slika 12. Delecija u egzonu 5 *TP53* gena, na poziciji 13170 (*GenBank* sequence no. X54156).

4.1.2.2. POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA

S obzirom da je intronska varijanta g.14394G>A *TP53* gena prvi put detektovana u ovom radu i njen efekat na funkciju p53 proteina nije ispitivan, bolesnica koja je imala tumor sa ovom promenom u sekvenci *TP53* gena nije uzeta u analizu.

Prikaz raspodele mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u odnosu na FIGO stadijum bolesti, histološki podtip i gradus tumora dat je u Tabeli 5.

Tabela 5. Raspodela mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u odnosu na kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma jajnika

Tip mutacija u <i>TP53</i> genu	FIGO stadijum	Histološki podtip	Histološki gradus
g.12082G>A (egzon 4)	II	neklasifikovani	nije određen
g.13170delA (egzon 5)	III	serozni	G2
g.13180delG (egzon 5)	IV	nediferentovani	G3
g.14060G>T (egzon 7)	III	serozni	G2
g.14063_14074del (egzon7)	III	serozni	G2
g.14493G>T (egzon 8)	II	svetloćelijski	G2

4.1.2.2 a) POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA FIGO STADIJUMOM

Od 6 detektovanih mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u karcinomima jajnika nijedna nije detektovana kod bolesnica sa FIGO I stadijumom (n=12). Raspodela mutacija po ostalim FIGO stadijumima bila je: dve mutacije su detektovane u karcinomima bolesnica sa FIGO II (n=8), tri u bolesnica sa FIGO III (n=29) i jedna u bolesnice sa FIGO IV stadijumom (n=4). Dakle, u 2/20 (10,0%) bolesnica sa lokalizovanom bolesti (FIGO stadijumi I i II) i u 4/33 (12,1%) bolesnica sa uznapredovalom bolesti (FIGO stadijumi III i IV) detektovane su mutacije u *TP53* genu.

Zastupljenosti mutacija u *TP53* genu u lokalizovanoj (FIGO stadijumi I i II) vs. uznapredovalojoj bolesti (FIGO stadijumi III i IV) nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,044$; $p>0,05$)

4.1.2.2 b) POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA HISTOLOŠKIM PODTIPOVIMA TUMORA

Zastupljenost seroznog podtipa u ispitivanom uzorku karcinoma jajnika (n=53) bio je 66% (35 od 53 tumora), dok su ostali histološki podtipovi zastupljeni u 1,9% do 13,2%. Kako je serozni podtip karcinoma jajnika najzastupljeniji, razmatrana je raspodela mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u ovom histološkom podtipu u odnosu na ostala šest podtipa.

Mutacije u egzonima 4-8 *TP53* gena detektovane su u 3/35 (8,6%) karcinoma seroznog podtipa i 3/18 (16,7%) karcinoma ne-seroznog podtipa. Nema statistički značajne razlike u pojavi mutacija u *TP53* genu u seroznom vs. ne-seroznim histološkim podtipovima ($\chi^2_1=0,179$; $p>0,05$).

4.1.2.2 c) POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA HISTOLOŠKIM GRADUSOM TUMORA

Nijedan od 19 dobro diferentovanih karcinoma jajnika (G1) nije imao mutaciju u egzonima 4-8 *TP53* gena. U 4 od 21 (19,0%) umereno diferentovanih tumora (G2), jednom od 6 (16,7%) slabo diferentovanih tumora (G3) i jednom od 7 tumora čiji gradus nije određivan detektovane su mutacije u *TP53* genu.

Nema statistički značajne razlike u pojavi mutacija u *TP53* genu između G2 i G3 tumora (Fišerov egzaktni test; $p=0,697$).

4.1.2.3. POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA KARAKTERISIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA

4.1.2.3 a) POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA STATUSOM MENOPAUIZE

Mutacije u egzonima 4-8 *TP53* gena bile su prisutne u 3/18 (16,7%) bolesnica u premenopauzi i 3/35 (8,6%) bolesnica u postmenopauzi. Iako je zastupljenost *TP53* mutacija viša u bolesnica u premenopauzi u odnosu na one u postmenopauzi, ova razlika nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,179$; $p>0,05$).

4.1.2.3 b) POVEZANOST MUTACIJA U EGZONIMA 4-8 *TP53* GENA SA STAROSNOM DOBI

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u bolesnica sa mutacijama u *TP53* genu je bila 58 godina, a u bolesnica sa wt *TP53* 59 godina.

4.2. POLIMORFIZAM KODONA 72 *TP53* GENA

Bsh 1236I restrikciona endonukleaza seče PCR produkte egzona 4 *TP53* gena sa kodonom 72 za Arg, ali ne i one sa kodonom 72 za Pro. Tako dobijeni restrikcioni fragmenti razdvajani su u 8% poliakrilamidnom gelu i upoređivani sa DNK standardom za dužinu (Slika 13).



Slika 13. Analiza PCR produkta egzona 4 *TP53* gena posle digestije sa enzimom *Bsh1236I* u 8% poliakrilamidnom gelu. Kolone 1 i 5 - Arg/Pro heterozigoti; kolone 2, 4 i 6 - Arg/Arg homozigoti i kolona 3 - Pro/Pro homozigot, kolona M - DNK standard za dužinu *pUC18 HaeIII Digest*.

4.2.1. RASPODELA POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA U GRUPI BOLESNICA SA KARCINOMOM GRLIĆA MATERICE

Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u grupi bolesnica sa karcinomom grlića materice (n=53) bila je: Arg/Arg 33/53 (62,3%), Arg/Pro 19/53 (35,8%) i Pro/Pro 1/53 (1,9%). Učestalost Arg alela bila je 80,2%, a Pro alela 19,8%. Grupa bolesnica sa karcinomom grlića materice je u Hardi-Vajnbergov-oj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2_1=0,873$; $p>0,05$).

4.2.2. RASPODELA POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA U GRUPI BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA

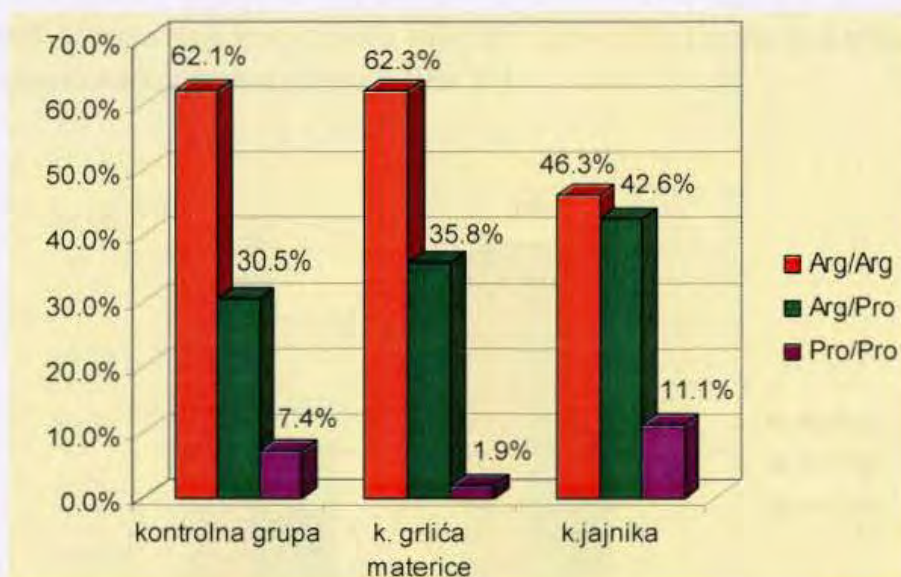
Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika (n=54) bila je: Arg/Arg 25/54 (46,3%), Arg/Pro 23/54 (42,6%) i Pro/Pro 6/54 (11,1%).

Učestalost Arg alela bila je 67,6%, a Pro alela 32,4%. Grupa bolesnica sa karcinomom jajnika je u Hardy-Vajnbergov-oj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2_1 = 0,041$; $p > 0,05$).

4.2.3. RASPODELA POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA U KONTROLNOJ GRUPI

Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u kontrolnoj grupi (n=95) bila je: Arg/Arg 59/95 (62,1%), Arg/Pro 29/95 (30,5%) i Pro/Pro 7/95 (7,4%). Učestalost Arg alela bila je 77,4%, a Pro alela 22,6%. Kontrolna grupa je bila u Hardy-Vajnbergov-oj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2_1 = 1,568$; $p > 0,05$).

Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u kontrolnoj grupi i grupama bolesnica prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u kontrolnoj grupi (n=95), grupi bolesnica sa karcinomom grlića materice (n=53) i grupi bolesnica sa karcinomom jajnika (n=54).

4.2.4. UTICAJ POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA NA NASTANAK KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

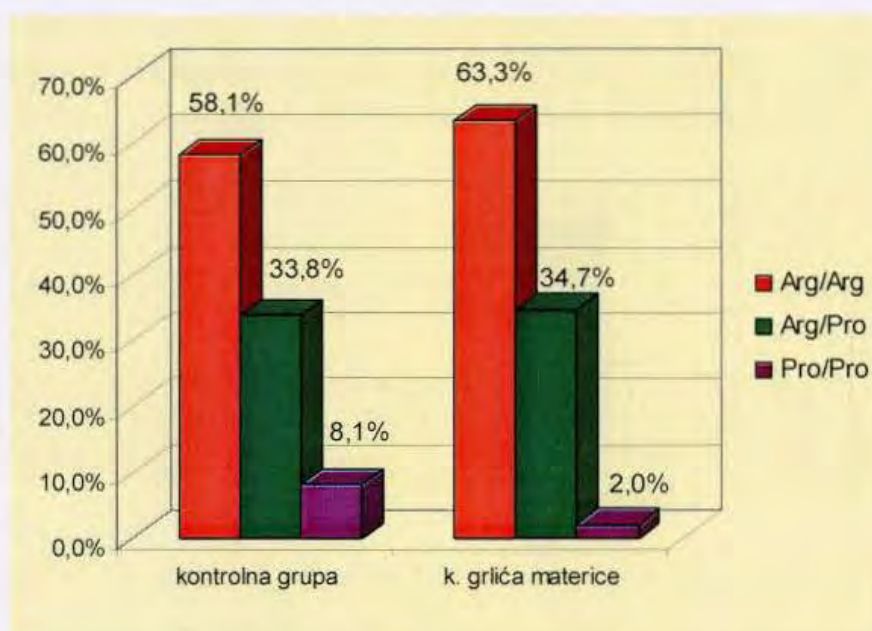
Kako je učestalost Arg alela u bolesnica sa karcinomom grlića materice (80,2%) veća u odnosu na kontrolnu grupu (77,4%), postavili smo hipotezu da su nosioci Arg alela u povišenom riziku za nastanak ovog maligniteta.

S obzirom da Arg varijanta može inhibirati ili pojačati tumorski rast, u zavisnosti da li je u okviru wt, odnosno mutiranog *TP53* gena (odjeljak 1.4.5.1.), iz analize je bio isključen tumor sa mutacijom u *TP53* genu, tumor sa intronskom varijantom čiji efekat na funkciju p53 proteina nije utvrđen, kao i tumori sa intronskom varijantom koja je prvi put detektovana u ovom radu i čiji efekat na funkciju p53 proteina nije ispitivan. Tako smo dobili grupu od 49 bolesnice. Opseg godina ove grupe bolesnica bio je 31-74, sa medijanom od 48 godina.

Iz ukupne kontrolne grupe od 95 žena, izdvojene su one koje su zadovoljavale kriterijume pomenute u odeljku 3.1. u odnosu na grupu bolesnica sa karcinomom grlića materice. Tako smo dobili grupu od 74 žena koje su činile kontrolnu grupu za ispitivanje uticaja polimorfnihi varijanti kodona 72 *TP53* gena na nastanak ovog maligniteta. Izbor je vršen preko tablice slučajnih brojeva (Zar, 1999). Opseg godina u ovoj kontrolnoj grupi je bio 25-73 sa medijanom od 49 godina.

Kontrolna grupa je bila u Hardy-Vajnbergov-oj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2_1 = 0,727$; $p > 0,05$).

Uočen je trend porasta Arg homozigota i heterozigota u bolesnica sa karcinomom grlića materice u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 15).



Slika 15. Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u kontrolnoj grupi (n=74) i u grupi bolesnica sa karcinomom grlića materice sa wt *TP53* (n=49).

Pokazan je blago povišen rizik za nastanak karcinoma grlića materice za Arg homozigote u odnosu na heterozigote *plus* Pro homozigote (OR=1,24; 95% CI 0,59-2,61), i nešto viši za nosioce Arg alela (Arg/Arg ili Arg/Pro genotip) u odnosu na Pro homozigote (OR=4,24; 95% CI 0,49-36,32).

4.2.5. UTICAJ POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA NA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA

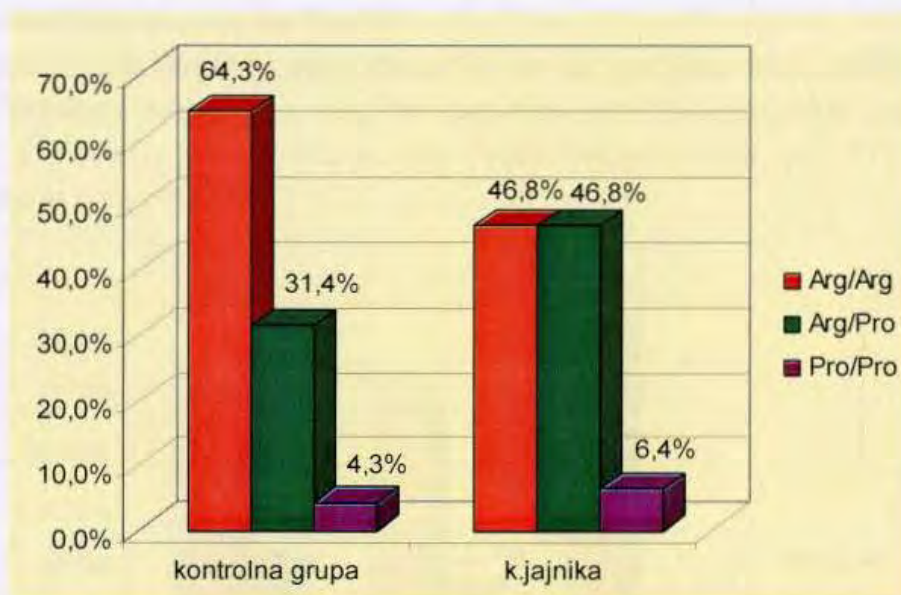
Kako je učestalost Pro alela u bolesnica sa karcinomom jajnika (32,4%) veća u odnosu na kontrolnu grupu (22,6%), postavili smo hipotezu da su nosioci Pro alela u povišenom riziku za nastanak ovog maligniteta.

S obzirom da mutirani *TP53* može uticati na razvoj tumora, iz analize su izbačeni tumori sa mutacijama u *TP53* genu, kao i pomenuti tumor sa intronskom varijantom koja je prvi put detektovana u ovom radu. Tako smo dobili grupu od 47 bolesnica. Opseg godina ove grupe bolesnica bio je 25-81, sa medijanom od 59 godina.

Na način pomenut u odeljku 4.2.4., bila je izdvojena kontrolnu grupu od 70 žena za ispitivanje uticaja polimorfnihi varijanti kodona 72 *TP53* gena na nastanak karcinoma jajnika. Opseg godina u ovoj kontrolnoj grupi je bio 30-75 sa medijanom od 59 godina.

Kontrolna grupa je bila u Hardi-Vajnbergov-oj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus ($\chi^2_1=0,021$; $p>0,05$).

Uočen je trend porasta Pro homozigota i heterozigota u bolesnica sa karcinomom jajnika u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 16).



Slika 16. Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u kontrolnoj grupi (n=70) i u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika sa wt *TP53* (n=47).

Pokazan je blago povišen rizik za nastanak karcinoma jajnika za Pro homozigote u odnosu na heterozigote *plus* Arg homozigote (OR=1,52; 95% CI 0,29-7,89), kao i za nosioce Pro alela (Arg/Pro ili Pro/Pro genotip) u odnosu na Arg homozigote (OR=2,04; 95% CI 0,96-4,34).

4.2.6. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

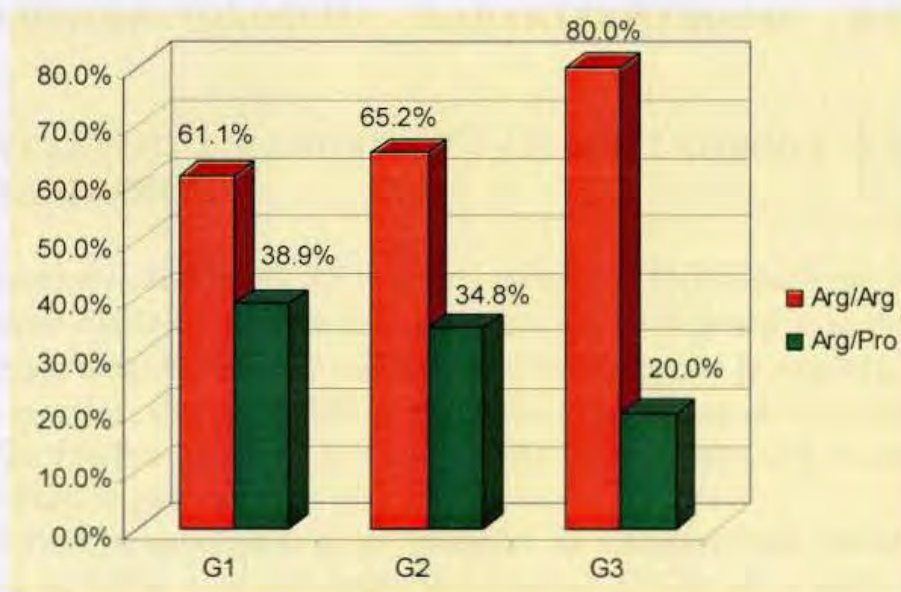
Kako je 50/53 (94,3%) karcinoma grlića materice bilo FIGO I stadijuma, nije ispitivana povezanost polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena sa kliničkim stadijumima bolesti. Takođe, nije ispitivana ni povezanost polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena sa histološkim tipom tumora, jer je 49/53 (92,5%) karcinoma grlića materice bilo skvamoznog histološkog tipa.

Od histopatoloških parametara, ispitivana je povezanost polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena sa histološkim gradusom tumora.

S obzirom da je samo jedan tumor imao Pro/Pro polimorfnu varijantu kodona 72 *TP53* gena čiji gradus nije određivan, pratili smo raspodelu Arg/Arg vs. Arg/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena unutar različitih histoloških gradusa tumora.

Od 18 dobro diferentovanih tumora (G1), 11 je bilo Arg/Arg, a 7 Arg/Pro genotipa. U okviru 23 umereno diferentovanih tumora (G2), 15 ih je bilo Arg/Arg, a 8 Arg/Pro genotipa; dok je u okviru 5 slabo diferentovanih tumora (G3), 4 bilo Arg/Arg, a jedan Arg/Pro genotipa. Kod 7 tumora gradus nije određivan. Učestalost Arg/Arg i Arg/Pro genotipova kodona 72 *TP53* gena u različitim histološkim gradusima u ispitivanoj grupi bolesnica (n=46) prikazana je na Slici 17.

Uprkos trendu porasta Arg/Arg genotipa od G1 ka G3 gradusu, nema statistički značajne razlike u učestalosti Arg/Arg vs. Arg/Pro genotipa između histoloških gradusa tumora (G1 vs. G2: $\chi^2_1=0,003$; $p>0,05$, G2 vs. G3: Fišerov egzaktni test; $p=0,473$ i G1 vs. G3: Fišerov egzaktni test; $p=0,414$).



Slika 17. Učestalost Arg/Arg i Arg/Pro genotipova kodona 72 *TP53* gena u različitim histološkim gradusima u ispitivanoj grupi bolesnica sa karcinomom grlića materice (n=46).

4.2.7. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM GRLIĆA MATERICE

4.2.7 a) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA STATUSOM MENOPAUIZE

Od 29 bolesnica sa karcinomom grlića materice, koje su bile u premenopauzi, 19 ih je bilo Arg/Arg (65,5%), 9 Arg/Pro (31,0%) i jedna Pro/Pro (3,5%) genotipa kodona 72 *TP53* gena. Od 24 bolesnica, koje su bile u postmenopauzi, 14 ih je bilo Arg/Arg (58,3%) i 10 Arg/Pro (41,7%) genotipa kodona 72 *TP53* gena.

Iako je učestalost Arg/Arg genotipa viša kod bolesnica u premenopauzi (65,5%) u odnosu na one u postmenopauzi (58,3%), ova razlika nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,064$; $p>0,05$).

4.2.7 b) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA STAROSNOM DOBI

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma grlića materice u bolesnica sa Arg/Arg genotipom kodona 72 *TP53* genu je bila 47 godina, a u bolesnica sa Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom bila je 49 godina.

4.2.8. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA

4.2.8 a) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA FIGO STADIJUMOM

Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u odnosu na FIGO stadijume bolesti bila je sledeća: u okviru FIGO I stadijuma 5/12 bolesnica bilo je Arg/Arg, 6/12 Arg/Pro i 1/12 Pro/Pro genotipa; u okviru FIGO II stadijuma 2/9 bolesnica bilo je Arg/Arg, 6/9 Arg/Pro i 1/9 Pro/Pro genotipa; u okviru FIGO III stadijuma 18/29 bolesnica bilo je Arg/Arg, 9/29 Arg/Pro i 2/29 Pro/Pro genotipa; u okviru FIGO IV stadijuma 2/4 bolesnice bile su Arg/Pro i 2/4 Pro/Pro genotipa.

Zastupljenost Pro/Pro genotipa u grupi bolesnica sa lokalizovanom bolesti (FIGO I i FIGO II) bila je 9,5%, a u uznapredovalom bolesti (FIGO III i FIGO IV) 12,1%. Učestalost Pro/Pro genotipa između uznapredovale vs. lokalizovane bolesti nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,022$; $p>0,05$).

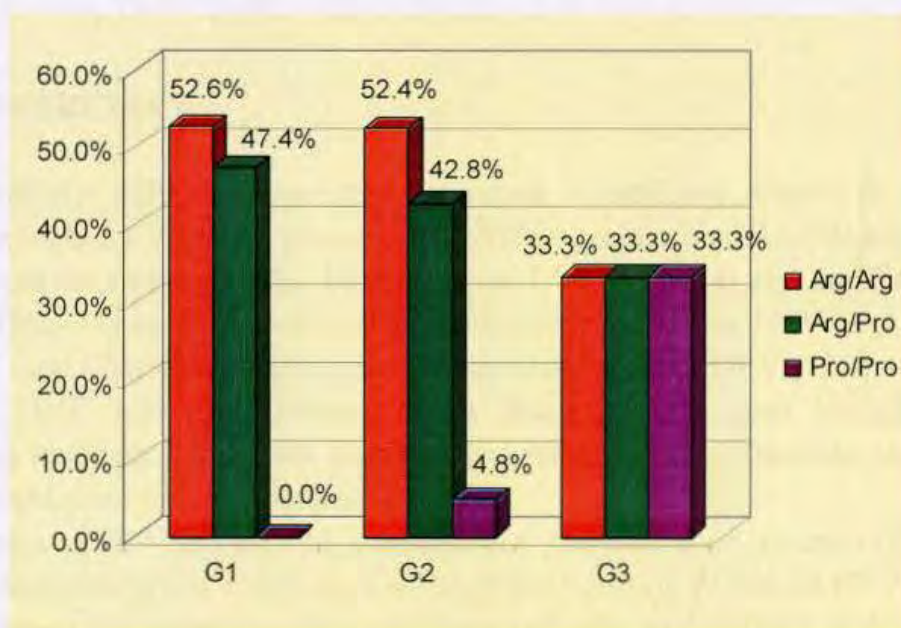
4.2.8 b) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA HISTOLOŠKIM PODTIPOM TUMORA

Među bolesnicama sa seroznim histološkim podtipom tumora, 34/35 (97,1%) su bile nosioci Arg alela, a jedna od 35 bolesnica (2,9%) je bila Pro/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena. U okviru ostalih šest histoloških podtipova, 14/19 (73,7%) su bile nosioci Arg alela, a 5/19 (26,3%) Pro/Pro genotipa. Uočena razlika u zastupljenost Pro/Pro genotipa u grupi bolesnica ne-seroznoznim vs. seroznom histološkom podtipu (26,3% vs. 2,9%) je statistički značajna ($\chi^2_1=4,692$; $p<0,05$).

4.2.8 c) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA SA HISTOLOŠKIM GRADUSOM TUMORA

Raspodela genotipova kodona 72 *TP53* gena u odnosu na histološke graduse tumora bila je sledeća: 10/19 bolesnica bilo je Arg/Arg i 9/19 Arg/Pro genotipa u okviru G1; 11/21 bolesnice bilo je Arg/Arg, 9/21 Arg/Pro i 1/21 Pro/Pro genotipa u okviru G2; 2/6 bolesnice bile su Arg/Arg, 2/6 Arg/Pro i 2/6 Pro/Pro genotipa u okviru G3. Uočava se trend porasta Pro/Pro genotipa od G1 ka G3 (od 0% do 33,3%) (Slika 18).

Pokazana je statistički značajna razlika u raspodeli Pro/Pro genotipa između G1 i G3 histoloških gradusa (G1 vs. G2: Fišerov egzakti test; $p=0,525$, G2 vs. G3: Fišerov egzakti test; $p=0,115$ i G1 vs. G3: Fišerov egzakti test; $p=0,050$).



Slika 18. Učestalost genotipova kodona 72 *TP53* gena u različitim histološkim gradusima u ispitivanoj grupi bolesnica sa karcinomom jajnika (n=46).

4.2.9. POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* SA KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA

4.2.9 a) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA STATUSOM MENOPAUIZE

Arg/Arg genotip kodona 72 *TP53* gena bio je zastupljen u 7/18 (38,8%), Arg/Pro u 10/18 (55,6%) i Pro/Pro 1/18 (5,6%) bolesnica u premenopauzi. U grupi bolesnica u postmenopauzi, Arg/Arg genotip bio je zastupljen u 18/36 (50,0%), Arg/Pro u 13/36 (36,1%) i Pro/Pro 5/36 (13,9%) slučajeva. Uočena razlika u zastupljenost Pro/Pro genotipa u grupi bolesnica u postmenopauzi vs. grupi bolesnica u premenopauzi (13,9% vs. 5,6%), nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,211$; $p>0,05$).

4.2.9 b) POVEZANOST POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA STAROSNOM DOBI

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u bolesnica sa Pro/Pro genotipom kodona 72 *TP53* genu je bila 61 godina, a u bolesnica sa Arg/Arg plus Arg/Pro genotipom bila je 59 godina. U grupi bolesnica sa Pro/Pro plus Arg/Pro u odnosu na Arg/Arg genotip medijana raspodele dijagnostikovanja bolesti je dve godine ranije (57 vs. 59).

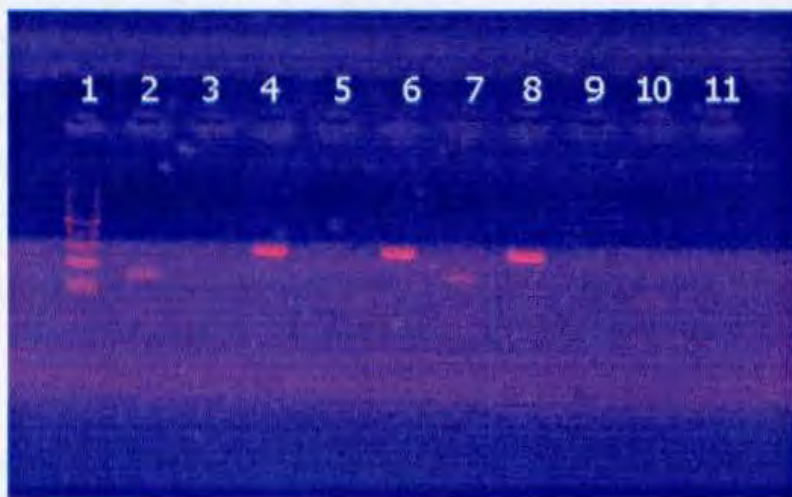
4.3. HPV INFEKCIJA

Prisustvo infekcije HPV u tumorskim uzorcima i uzorcima briseva je detektovano amplifikacijom dela L1 virusnog gena sa GP5+/GP6+ prajmerima. Amplifikacijom β globin gena je proveravan kvalitet DNK. Uzorci čija se DNK PCR-om nije amplifikovala za L1 gen, a amplifikovala se za β globinski gen interpretirani su kao HPV-negativni. Uzorci čija se DNK amplifikovala za oba gena interpretirani su kao HPV-pozitivni (Slika 19). Uzorci čija DNK nije amplifikovana ni za jedan od dva gena ukazuju na DNK neadekvatnog kvaliteta. DNK svih analiziranih uzoraka se amplifikovala za β globinski gen i analizirana je na prisustvo infekcije HPV.

Setom prajmera za HPV16 i HPV18 je analizirano prisustvo ovih virusnih tipova u HPV-pozitivnih karcinoma grlića materice. Kao pozitivna kontrola PCR-a za HPV16 korišćena je DNK izolovana iz tumorskog tkiva pozitivnog na prisustvo HPV16. Kako HeLa ćelije u svome genomu imaju ugrađen HPV18, DNK izolovana iz HeLa ćelija korišćena je kao pozitivna kontrola PCR-a za HPV18 i GP5+/GP6+.

Analizom sekvence DNK dužine 50 bp u hipervarijabilnom regionu L1 gena nizvodno od GP5+ vezujućeg mesta vršena je genotipizacija HPV u karcinomima jajnika. Kvalitet elektroferogramskih podataka ukazivao je da ne postoji višestruka infekcija, već da se

radi samo o jednom tipu HPV, koji su identifikovani upoređivanjem dobijene sekvence sa poznatim HPV genotipskim sekvencama u *Gen Bank* bazi podataka.



Slika 19. Analiza PCR amplifikata L1 HPV gena (sa prajmerima GP5+/GP6+) i β globina:

1 - DNK standard za dužinu (*O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder ready-to-use*); 2 - pozitivna kontrola (HeLa); 3 i 5 - HPV-negativni uzorci, 7 - HPV-pozitivan uzorak; 4, 6 i 8 - amplifikat β globina, 10 - kontrola bez DNK, 11 - voda.

4.3.1. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE

4.3.1.1. UČESTALOST I TIP HPV INFEKCIJE

Za ispitivanje učestalosti HPV infekcije u karcinoma grlića materice bilo je dostupno 48 tumora. Prisustvo HPV je detektovano u 30/48 (62,5%) tumora. Infekcija HPV16 bila je prisutna u 28/48 (58,3%), a HPV18 u 8/48 (16,7%) ispitivanih tumora. Višestruku infekciju (HPV16 *plus* HPV18) je imalo 7/48 (14,6%) tumora.

4.3.1.2. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

U grupi karcinoma grlića materice, koji su ispitivani na prisustvo infekcije HPV, bilo je 45/48 (93,8%) FIGO I stadijuma i 45/48 (93,8%) skvamoznog histološkog tipa, te nije ispitivana povezanost HPV infekcije sa ovim karakteristikama karcinoma.

Raspodela HPV infekcije u okviru histoloških gradusa bila je sledeća: 9/17 (52,9%) tumora G1, 15/20 (75,0%) tumora G2 i 2/5 (40,0%) tumora G3 gradusa bilo je HPV-pozitivno. Dakle, veći procenat dobro i umereno diferentovanih tumora bio je HPV-pozitivan nego HPV-negativan (52,9% vs. 47,1%; 75,0% vs. 25,0%), dok je kod slabo diferentovanih tumora obrnuto (40,0% vs. 60,0%).

Nema statistički značajne razlike u učestalosti HPV infekcije između histoloških gradusa tumora (G1 vs. G2: Fišerov egzaktni test; $p=0,146$, G2 vs. G3: Fišerov egzaktni test; $p=0,166$ i G1 vs. G3: Fišerov egzaktni test; $p=0,501$).

Unutar 28 HPV16-pozitivnih tumora, 7 je bilo i HPV18-pozitivno. Višestruku infekciju imalo je 2/9 (22,2%) G1, 5/13 (38,5%) tumora G2 i nijedan od tumora gradusa G3. Učestalost infekcije sa HPV16 vs. HPV16 plus HPV18 unutar histoloških gradusa tumora (G1 vs. G2: Fišerov egzaktni test; $p=0,373$) nije statistički značajna.

4.3.1.3. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KARAKTERISIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM GRLIĆA MATERICE

4.3.1.3 a) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA STATUSOM MENOPAUZE

Među bolesnicama u premenopauzi 17/27 (63,0%) je bilo inficirano sa HPV, a među bolesnicama u postmenopauzi 13/21 (61,9%). Razlika u pojavi HPV infekcije kod bolesnica u premenopauzi vs. onih u postmenopauzi nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,051$; $p>0,05$).

4.3.1.3 b) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA STAROSNOM DOBI

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma grlića materice u bolesnica sa HPV infekcijom je bila 49 godina, a u bolesnica bez HPV infekcije bila je 48 godina. U bolesnica sa višestrukom HPV infekcijom medijana dijagnostikovanja bolesti je bila 52 godina.

4.3.2. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA JAJNIKA

4.3.2.1. UČESTALOST I TIP HPV INFEKCIJE

Infekcija HPV je detektovana u 4/54 (7,4%) karcinoma jajnika. Svi HPV-pozitivni tumori bili su inficirani sa tipom HPV16. Kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma, kao i bolesnica sa karcinomima jajnika u kojih je detektovana infekcija HPV date su u Tabeli 6.

Tabela 6. Kliničko-histopatološke karakteristike HPV-pozitivnih karcinoma jajnika, kao i bolesnica sa ovim karcinomima

Tip HPV	FIGO stadijum	histološki podtip	histološki gradus	status menopauze	starosna dob	TP53 polimorfizam kodona 72
HPV16	II	endometrioidni	nije određen	pre	41	Arg/Pro
HPV16	IV	serozni	G1	pre	54	Arg/Pro
HPV16	III	mucinozni	G2	post	59	Arg/Arg
HPV16	III	serozni	G2	post	67	Arg/Arg

4.3.2.2. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA

4.3.2.2 a) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA FIGO STADIJUMOM

U grupi bolesnica sa FIGO I stadijumom bolesti ni u jednom od 12 tumora nije detektovano prisustvo HPV infekcije. Raspodela HPV infekcije po ostalim FIGO stadijumima bila je: 1/9 bolesnica FIGO II stadijuma, 2/29 bolesnica FIGO III stadijuma i 1/4 bolesnice FIGO IV stadijuma je posedovala infekciju HPV.

Dakle, u 1/21 bolesnica (4,8%) sa lokalizovanom bolesti (FIGO stadijumi I i II) i u 3/33 (9,1%) bolesnica sa uznapređovalom bolesti (FIGO stadijumi III i IV) detektovana je infekcija HPV. Zastupljenost HPV infekcije u grupi bolesnica sa lokalizovanom vs. uznapređovaloj bolesti nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,004$; $p>0,05$).

4.3.2.2 b) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA SA HISTOLOŠKIM PODTIPOM TUMORA

HPV infekcija je bila prisutna u 2/35 (5,7%) tumora seroznog i 2/19 (10,5%) tumora ne-seroznog histološkog tipa. Nema statističke značajnosti u pojavi infekcije HPV između seroznih vs. ne-seroznih tumora ($\chi^2_1=0,010$; $p>0,05$).

4.3.2.2 c) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA HISTOLOŠKIM GRADUSOM TUMORA

U jednom od karcinoma jajnika koji je bio inficiran sa HPV histološki gradus nije određivan. U jednom od 19 tumora (5,3%) gradusa G1 i dva od 21 tumora (9,5%)

gradusa G2 detektovana je HPV infekcija. Zastupljenost HPV infekcije između dobro i umereno diferentovanih tumora nije statistički značajna (Fišerov egzaktni test; $p=0,538$).

4.3.2.3. POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA KARAKTERISIKAMA BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA

4.3.2.3 a) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA STATUSOM MENOPAUZE

HPV infekcija bila je prisutna u 2/18 (11,1%) bolesnica u premenopauzi i 2/36 (5,6%) bolesnica u postmenopauzi. Nema statističke značajnosti u pojavi infekcije HPV između ove dve grupe bolesnica ($\chi^2_1=0,034$; $p>0,05$).

4.3.2.3 b) POVEZANOST HPV INFEKCIJE SA STAROSNOM DOBI

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u bolesnica sa HPV infekcijom je bila 57 godina, a u bolesnica bez HPV infekcije bila je 59 godina.

4.3.3. HPV INFEKCIJA U KONTROLNOJ GRUPI

Infekcija HPV je bila prisutna u 38/95 (40,0%) žena u kontrolnoj grupi (Tabela 7). Gledano po intervalima godina zastupljenost HPV infekcije bila je:

- u grupi sa manje od 40 godina - u 6/12 (50,0%),
- u grupi od 40-49 godina - u 10/27 (37,0%),
- u grupi od 50-59 godina - u 9/24 (37,5%),
- u grupi sa ili više od 60 godina - u 13/32 (40,6%) žena.

Tabela 7. Karakteristike kontrolne grupe

Starost (godine)	HPV-negativne	HPV-pozitivne
<40	6	6
40-49	17	10
50-59	15	9
≥60	19	13
Ukupan broj	57	38

4.4. UTICAJ MUTACIJA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA RADIOTERAPIJU KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

Iz ispitivane grupe od 53 bolesnice sa karcinomom grlića materice izdvojene su bolesnice koju su po hirurškoj intervenciji bile tretirane radioterapijom (n=29). Za ostale bolesnice podaci o daljem postoperativnom tretmanu nisu bili dostupni. Radioterapija se sastojala od transkutanog zračenja u dozi od po 40-45 Gy (u 20-25 seansi) i intrakavitane brahiterapije od 30 Gy u 4 ili 5 seansi. Jedna bolesnica je tretirana samo intrakavitarnom brahiterapijom, dok su dve od 29 bolesnice tretirane kombinacijom radioterapije i karboplatine.

U periodu praćenja od 5 do 87 meseci (sa medijanom od 44 meseci) kod samo dve bolesnice se javio relaps bolesti. Kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma i karakteristike bolesnica sa relapsom bolesti date su u Tabeli 8.

Tabela 8. Kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma i karakteristike bolesnica sa relapsom bolesti

bolesnice	FIGO stadijum	histološki tip tumora	histološki gradus	status menopauze	Promene u sekvenci <i>TP53</i> gena	<i>TP53</i> polimorfizam kodona 72	HPV infekcija
1	II	skvamozni	nije određen	pre	nema	Arg/Arg	prisutna*
2	I	skvamozni	G2	pre	g.14394G>A (intron7)	Arg/Arg	prisutna*

* HPV16-pozitivni i HPV18-negativni tumori

4.5. UTICAJ MUTACIJA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA PLATIN-TAKSANSKU HEMIOTERAPIJU KARCINOMA JAJNIKA

Iz ispitivane grupe od 54 bolesnice sa karcinomom jajnika izdvojene su bolesnica koje su po hirurškoj intervenciji primile adjuvantnu platin-taksansku hemioterapiju (n=26), koja se sastojala od kombinacije karboplatine i paklitaksela u 6 ciklusa. Ostale bolesnice su bile podvrgnute drugim hemioterapeutskim tretmanima ili podaci o daljem eventualnom postoperativnom tretmanu nisu bili dostupni.

S obzirom da p53 može biti inaktiviran i na proteinskom nivou interakcijom sa E6 proteinom visoko-rizičnih tipova HPV, iz analize odgovora na platin-taksansku hemioterapiju isključene su 4 bolesnice čiji su tumori bili inficirani sa HPV. Nijedna od bolesnica sa HPV infekcijom nije posedovala mutacije u *TP53* genu. Od preostale 22 bolesnice, pet bolesnica (22,7%) je posedovalo mutacije u *TP53* genu, a 17/22 (77,3%) je

imalo wt *TP53*. Među HPV-negativnim bolesnicama koje nisu posedovale mutacije u *TP53* genu, 6/17 (35,3%) je bilo Arg/Arg, 10/17 (58,8%) Arg/Pro i 1/17 (5,9%) Pro/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena.

Među bolesnicama sa wt *TP53* genom 4/21 (19,0%) je bilo HPV-pozitivnih, a 17/21 (81,0%) HPV-negativnih.

Odgovor na hemioterapiju je praćen na osnovu stepena tumorskog odgovora (RR) i vremena bez progresije bolesti (PFI).

4.5.1. STEPEN TUMORSKOG ODGOVORA U ODNOSU NA PRISUSTVO/ODSUSTVO MUTACIJA U *TP53* GENU, GENOTIP KODONA 72 *TP53* GENA I PRISUSTVO HPV

Tok bolesti praćen je kliničkim pregledima, merenjem serumskog nivoa CA125, radiografskim, ultrasonografskim i CT pregledima. Za bolesnice koje su u toku ili po primljenoj terapiji izgubile vidljive znake bolesti kaže se da su kompletno odgovorile na hemioterapiju (eng. *complete response* – CR), dok za one kod kojih je redukcija tumorske mase bila za 30% ili više kaže se da su delimično odgovorile na terapiju (eng. *partial response* - PR). Za one bolesnice kod kojih nije bilo promena ili je redukcija tumorske mase bila manja od 30% kaže se da imaju stabilnu bolest (eng. *stable disease* - SD). Kod ostalih bolesnica je došlo do širenja bolesti (eng. *progressive disease* – PD). Stepenn tumorskog odgovora (RR) se meri kao procenat bolesnica koje su u toku ili po primljenoj hemioterapiji imale CR ili PR.

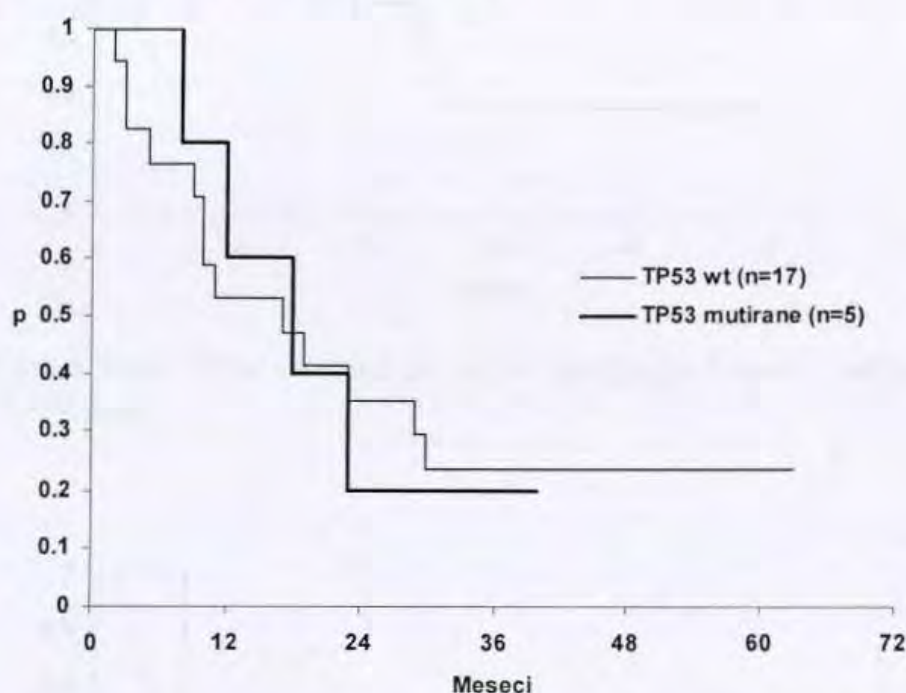
Među HPV-negativnim bolesnicama, sve bolesnice sa mutacijama u *TP53* genu (n=5) su imale CR ili PR, a 14/17 bolesnica bez mutacija u *TP53* genu je imalo CR ili PR u toku ili po primljenoj hemioterapiji. Ipak, ova razlika u odgovoru na hemioterapiju (100% vs. 82,4%) nije statistički značajna (Fišerov egzaktni test; p=0,442). CR je imalo 4/5 (80,0%) bolesnica sa mutacijama i 8/17 (47,1%) bolesnica bez mutacija u *TP53* genu. Razlika u CR između ove dve grupe bolesnica (mutirane vs. wt *TP53*) nije statistički značajna (Fišerov egzaktni test; p=0,218).

U grupi HPV-negativnih bolesnica sa wt *TP53* genom, sve bolesnice sa Arg/Arg genotipom kodona 72 *TP53* gena su odgovorile na hemioterapiju, dok je u grupi bolesnica sa Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom njih 8/11 odgovorilo na hemioterapiju. Ipak, ova razlika u odgovoru na hemioterapiju (100% vs. 72,7%) nije statistički značajna (Fišerov egzaktni test; p=0,243). CR je imalo 3/6 (50,0%) bolesnica sa Arg/Arg i 5/11 (45,4%) bolesnica sa Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom.

U grupu bolesnica bez mutacija u *TP53* genu (n=21), 2/4 (50%) bolesnice čiji tumori su bili inficirani HPV je odgovorilo na hemioterapiju, a među HPV-negativnim bolesnicama 14/17 (82,4%) je odgovorilo na hemioterapiju. Razlika u RR između ovih grupa bolesnica (HPV-negativnih vs. HPV-pozitivnih) nije statistički značajna (Fišerov egzaktni test; p=0,229). CR je imalo 2/4 (50%) HPV-pozitivnih i 8/17 (47,0%) HPV-negativnih bolesnica.

4.5.2. VREME BEZ PROGRESIJE BOLESTI U ODNOSU NA PRISUSTVO/ODSUSTVO MUTACIJA U *TP53* GENU, GENOTIP KODONA 72 *TP53* GENA I PRISUSTVO HPV

U grupi HPV-negativnih bolesnica (n=22) upoređivan je vremenski interval bez progresije bolesti (PFI) u bolesnica sa mutacijama u *TP53* genu u odnosu na grupu bolesnica bez mutacija u *TP53* genu. Nema statistički značajne razlike u vremenu do pojave progresije bolesti između ove dve grupe bolesnica (*TP53* mutirane vs. *TP53* wt) (Slika 20) (Log-Rank test; $\chi^2_1=0,001$; $p>0,05$). Medijana vremena do pojave progresije bolesti u grupi bolesnica sa mutacijama u *TP53* genu bila je 18 (95%CI >12 meseci), a u grupi *TP53* wt 17 meseci (95%CI >10 meseci).

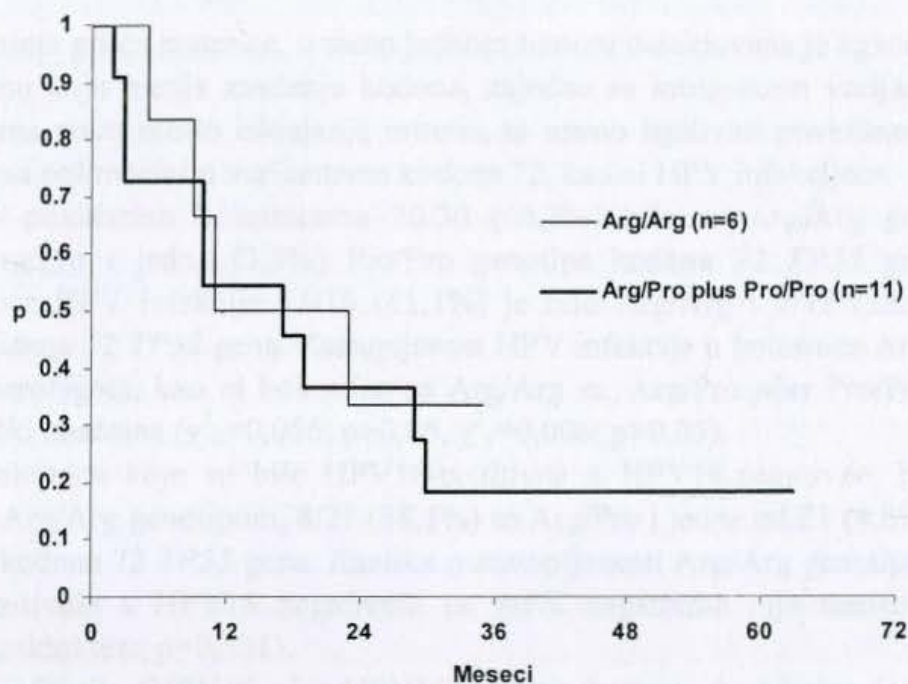


Slika 20. Kaplan Meier krive vremena do pojave progresije bolesti u odnosu na prisustvo/odsustvo mutacija u *TP53* genu.

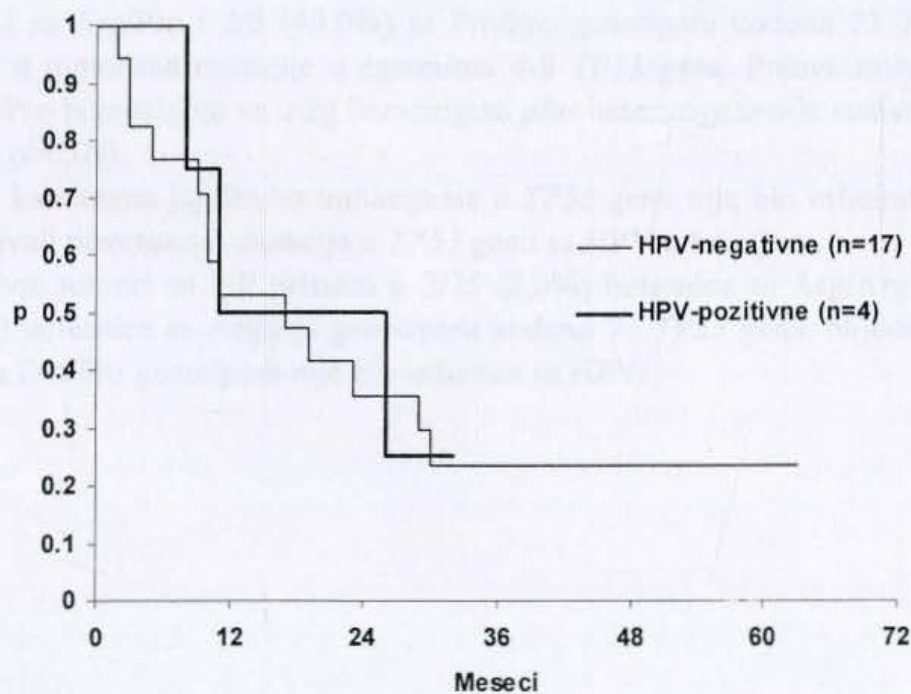
U grupi HPV-negativnih bolesnica sa wt *TP53* genom (n=17) upoređivan je PFI kod onih sa Arg/Arg vs. Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena (Slika 21). Nema statistički značajne razlike u vremenu do pojave progresije bolesti između ove dve grupe bolesnica (Log-Rank test; $\chi^2_1=0,246$; $p>0,05$). Medijane vremena do pojave progresije bolesti u obe grupe bile su 17 meseci, a 95%CI medijana su se razlikovali: u grupi bolesnica sa Arg/Arg >9 meseci, a u grupi Arg/Pro plus Pro/Pro >10 meseci.

U grupu bolesnica bez mutacija u *TP53* genu (n=21) upoređivan je PFI kod bolesnica sa HPV infekcijom u odnosu na one bez HPV infekcije (Slika 22). Nema statistički značajne razlike u vremenu do pojave progresije bolesti između ove dve grupe bolesnica (Log-Rank test; $\chi^2_1=0,027$; $p>0,05$). Medijana vremena do pojave progresije bolesti u grupi

HPV-pozitivnih bolesnica bila je 18,5 (95%CI >8 meseci), a u grupi HPV-negativnih bolesnica bila je 17 meseci (95%CI >10 meseci).



Slika 21. Kaplan Meier krive vremena do pojave progresije bolesti u odnosu na genotip kodona 72 TP53 gena.



Slika 22. Kaplan Meier krive vremena do pojave progresije bolesti u odnosu na prisustvo/odsustvo HPV infekcije.

4.6. POVEZANOST IZMEĐU MUTACIJA U *TP53* GENU, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE

U karcinomima grlića materice, u samo jednom tumoru detektovana je egzonska mutacija u *TP53* genu koja menja značenje kodona, zajedno sa intronskom varijantom koja za posledicu ima novo mesto iskrajanja introna, te nismo ispitivali povezanost mutacija u *TP53* genu sa polimorfnim varijantama kodona 72, kao ni HPV infekcijom.

Među HPV-pozitivnim bolesnicama 20/30 (66,7%) bile su Arg/Arg genotipa, 9/30 (30,0%) Arg/Pro i jedna (3,3%) Pro/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena. U grupi bolesnica bez HPV infekcije 11/18 (61,1%) je bilo Arg/Arg i 7/18 (38,9%) Arg/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena. Zastupljenost HPV infekcije u bolesnica Arg homizigota vs. Arg heterozigota, kao ni bolesnica sa Arg/Arg vs. Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom nije statistički značajna ($\chi^2_1=0,056$; $p>0,05$, $\chi^2_1=0,006$; $p>0,05$).

U grupi bolesnica koje su bile HPV16-pozitivne a HPV18-negativne, bilo je 12/21 (57,1%) sa Arg/Arg genotipom, 8/21 (38,1%) sa Arg/Pro i jedna od 21 (4,8%) sa Pro/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena. Razlika u zastupljenosti Arg/Arg genotipa u bolesnica HPV16 pozitivnih a HPV18 negativnih vs. HPV negativnih nije statistički značajna (Fišerov egzaktni test; $p=0,531$).

Višestruka infekcija (HPV16 plus HPV18) uočena je samo kod bolesnica sa Arg/Arg genotipom.

S obzirom na nepoznat uticaj intronske varijante 14394G>A na funkciju p53 proteina, tumor sa ovom promenom koja je uočena u bolesnice sa Pro/Pro genotipom kodona 72 nismo uzimali u ispitivanje povezanosti mutacija u *TP53* genu sa polimorfnim varijantama kodona 72 u karcinomima jajnika. Tako, 3/25 (12,0%) bolesnica sa Arg/Arg, 1/23 (4,3%) sa Arg/Pro i 2/5 (40,0%) sa Pro/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena su posedovale u tumorima mutacije u egzonima 4-8 *TP53* gena. Pojava mutacija u *TP53* genu u Pro/Pro homozigota vs. Arg homozigota plus heterozigota nije statistički značajna ($\chi^2_1=1,919$; $p>0,05$).

Nijedan od karcinoma jajnika sa mutacijama u *TP53* genu nije bio inficiran sa HPV, te nismo ispitivali povezanost mutacija u *TP53* genu sa HPV infekcijom.

HPV-pozitivni tumori su bili prisutni u 2/25 (8,0%) bolesnica sa Arg/Arg genotipom i 2/23 (8,7%) bolesnice sa Arg/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena. Nijedan od tumora bolesnica sa Pro/Pro genotipom nije bio inficiran sa HPV.

5. DISKUSIJA

5.1. ZNAČAJ ISPITIVANJA POTENCIJALNIH MOLEKULARNIH MARKERA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMA JAJNIKA

Maligne tumore ginekološke regije čini veoma raznolika grupa kancera ženskog reproduktivnog sistema, što je u skladu sa činjenicom da ženski reproduktivni sistem uključuje veoma kompleksan skup tkiva, od kojih su neka jedinstvena u organizmu. Među malignitetima ginekološke regije najzastupljeniji su karcinomi grlića materice, a najsmrtonosniji karcinomi jajnika. Zato je bilo interesantno opredeliti se u istraživanjima za maligne tumore na ove dve lokacije.

Karcinom grlića materice predstavlja ozbiljan zdravstveni problem u nerazvijenim i manje razvijenim zemljama sveta, gde se registruje više od 80% slučajeva ovog oboljenja. To je i najučestaliji tip kancera u žena u nekim nerazvijenim delovima sveta i to prvenstveno u podsaharskim predelima Afrike, Maleziji, Karibima i Centralnoj Americi i jugocentralnoj Aziji (Parkin et al., 2005). U nekim nerazvijenim zemljama je i glavni uzrok smrtnosti žena u reproduktivnom periodu (Mandic and Vujkov, 2004).

U razvijenim zemljama Evrope i sveta incidenca i mortalitet karcinoma grlića materice su u dramatičnom padu, u skladu sa razvojem efikasnih skrining programa.

Incidenca ovog maligniteta u Srbiji je među najvišima u Evropi. Po podacima iz 2002. godine standardizovana stopa incidence karcinoma grlića materice u Srbiji je bila 27,2 na 100 000 žena, a mortaliteta 7,2 na 100 000 žena. Sličnu stopu incidence pokazuju zemlje u regionu (Rumunija, Albanija, Bosna i Hercegovina), ali je stopa mortaliteta viša u ovim zemljama što ukazuje na bolje zbrinjavanje bolesnica sa karcinomom grlića materice u Srbiji (Kesić et al., 2007). Stopa incidence u Srbiji je oko tri puta viša u odnosu na zemlje Evropske unije (8,1 na 100 000), a oko šest puta viša u odnosu na Finsku (4,5 na 100000) koja je na dnu lestvice po incidenci ovog maligniteta u Evropi (Ferlay et al., 2004). U nekim delovima Istočne Srbije i regionu Beograda stopa incidence dostiže 32,5–38,1 na 100 000 (Kesić et al., 2007) i bliska je onoj u Maleziji, Karibima i Južnoj Africi (Parkin et al., 2005).

Socio-ekonomski status i neadekvatna edukacija stanovništva su glavni uzrok visoke incidence i mortaliteta u nerazvijenim i manje razvijenim delovima sveta. Danas su dobro poznati faktori rizika i uzročnici ovog maligniteta i razvijene su visoko pouzdane metode za ranu detekciju bolesti (citološke metode, kolposkopija i detekcija onkogenih tipova HPV). Takođe, efikasnim tretmanima procenat izlečenja u ranim stadijumima je vrlo visok. Poslednjih godina je postignut veliki napredak u hirurškim tehnikama, radioterapiji i adjuvantnoj hemioterapiji karcinoma grlića materice.

Ipak, uprkos postojanju mera za prevenciju i ranu detekciju ovog oboljenja, u velikom broju slučajeva u nerazvijenim i manje razvijenim delovima sveta se bolest detektuje u uznapredovalim stadijumima, kada su rezultati tretmana bitno lošiji, a cena lečenja znatno viša u odnosu na rane stadijume bolesti. Problem je što su rani stadijumi karcinoma grlića materice uglavnom asimptomatski, i ukoliko ne postoji periodični skrining često prolaze nezapaženo.

Iako se danas znaju faktori (infekcija HPV) i kofaktori odgovorni za nastanak ovog oboljenja, nema jasne veze između genetičkih faktora i nastanka ovog oboljenja. Takođe, ostaje i pitanje zašto neki tumori istog histološkog tipa i stadijuma progrediraju brže i imaju slabiji odgovor na antikancersku terapiju.

Nasuprot karcinomu grlića materice, koji je predominantno zastupljeni u nerazvijenim i manje razvijenim zemljama sveta, karcinomi jajnika su najzastupljeniji u visoko razvijenim zemljama Evrope i Severne Amerike. Standardizovana stopa incidence karcinoma jajnika u centralnoj Srbiji je 11,5 na 100 000 žena, a standardizovana stopa mortaliteta je 4,6 na 100 000 žena (Institut za javno zdravlje Srbije, 2009). Stopa incidence karcinoma jajnika u Srbiji je bliska onoj u Zapadnoj Evropi (11,3 na 100 000) (Parkin et al., 2005).

Karcinomi jajnika su vodeći uzrok smrtnosti među ginekološkim malignitetima, pre svega zbog nedostatka adekvatnih markera za ranu detekciju bolesti. U većini slučajeva rani stadijumi ovih maligniteta su asimptomatski. Preko 75% ovih maligniteta se dijagnostikuje kada su već prisutne regionalne ili udaljene metastaze. Dok je petogodišnje preživljavanje u ranim stadijumima bolesti oko 90%, preživljavanje u istom vremenskom periodu kada su prisutne udaljene metastaze je manje od 20% (Welsh et al., 2001).

Postoji više faktora koji otežavaju izučavanje ranih stadijuma karcinoma jajnika: jajnici su smešteni duboko u regionu pelvisa što u mnogome otežava uzimanje uzorka za histopatološku analizu; rani stadijumi bolesti su asimptomatski; za razliku od većine ostalih ginekoloških maligniteta, za neke histopatološke tipove karcinoma jajnika ne zna se da li uopšte postoje prekancerozne lezije dostupne ranoj detekciji; mada se veruje da karcinom jajnika nastaje malignom transformacijom epitelnih ćelija, tačno poreklo se ne zna; nedostatak animalnih modela koji spontano razvijaju karcinom jajnika.

CA125, glikoprotein koji sekretuju maligne epitelne ćelije jajnika, je jedini klinički priznat marker za detekciju karcinoma jajnika (u kombinaciji sa transvaginalnom ultrasonografijom). Međutim, u samo 50% bolesnica sa stadijumom I karcinoma jajnika CA125 ima vrednost višu od normalne (35 U/ml), što ga čini nedovoljno senzitivnim markerom za ranu detekciju bolesti. Vrednosti CA125 mogu da budu povišene i u nekim normalnim fiziološkim stanjima (trudnoća, menstruacija, ovulacija), benignim ginekološkim promenama (benigne ciste jajnika, endometrioze), različitim patološkim stanjima (oboljenja jetre, pankreatitis, peritonitis, perikarditis, inflamatorne bolesti pelvisa, inflamacija pleure) i nekim tipovima kancera (kancer endometrijuma, pankreasa, jetre, dojke, kolona) (Partridge and Barnes, 1999; Guppy and Rustin, 2002), te je CA125 i nedovoljno specifičan marker. Zato postoji potreba za nalaženjem novih biomarkera ovog oboljenja.

Problem kod karcinoma jajnika je i taj što uprkos senzitivnosti na prvu liniju hemioterapije, relaps bolesti se unutar dve godine javlja u više od 70% slučajeva (Tammela et al., 2004). Zbog toga je potrebno poznavanje molekularno genetičkih promena u karcinomima jajnika i uvođenje novih hemioterapeutskih agenasa koji bi blokirali ključne signalne puteve kancerogeneze jajnika.

Opređelili smo se za izučavanje promena u *TP53* genu, jer je njegov proteinski produkt ključni regulator širokog opsega ćelijskih procesa uključujući kontrolu ćelijskog ciklusa, popravku DNK oštećenja, apoptozu, ćelijsko starenje, angiogenezu itd. Gubitak p53 funkcije je jedan od faktora koji vodi nastanku malignog fenotipa.

Poslednjih desetak godina se pojavljuju nagoveštaji o uticaju polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena na nastanak nekih tipova kancera, tok bolesti i odgovor na antikancersku terapiju. Zato smo se u analizi *TP53* gena pored detekcije mutacija, odlučili i za detekciju polimorfnih varijanti kodona 72 u grupama bolesnica. Povezanost *TP53* mutacija i polimorfnih varijanti kodona 72 sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma grlića materice i jajnika i tokom bolesti, kao i odgovorom na radioterapiju i/ili hemioterapiju nije razjašnjena.

Infekcija HPV ima ključnu ulogu u razvoju karcinoma grlića materice. Oko 99% karcinoma grlića materice sadrži neki od visoko-rizičnih tipova HPV. Malo je podataka o tome da li su neki genotipovi, poput neke od polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena, podložniji HPV infekciji. Takođe, malo se zna o uticaju HPV infekcije na tok bolesti i odgovor na antikancersku terapiju. Nije jasno ni da li su određeni HPV tipovi asociirani sa agresivnijim kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma i/ili tokom bolesti. Pojavljuju se i podaci o ulozi HPV u etiologiji karcinoma jajnika.

Malo se zna o međusobnoj povezanost mutacija i polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena i HPV infekciji. Zato je ova doktorska disertacija za cilj istraživanja imala ispitivanje navedenih potencijalnih markera i pokušaj odgovora na neka od nabrojanih pitanja.

Pored toga, izučavanje kontrolne grupe zdravih žena je dalo podatke o učestalosti polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena i procentualnoj zastupljenosti HPV infekcije u ginekološki zdravih žena u Srbiji, kojih do sada nema u literaturi.

5.2. UČESTALOST MUTACIJA U *TP53* GENU U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMIMA JAJNIKA

Tokom karcinogeneze p53 može da se izmeni na genskom ili proteinskom nivou. Mutacije, gubici velikih segmenata hromozoma ili utišavanje *TP53* gena hipermetilacijom promotorskog regiona su promene na genskom nivou. Postranslacione modifikacije, kao i funkcionalna inaktivacija p53 interakcijom sa onkogenim virusnim proteinima su promene na proteinskom nivou.

Glavni mehanizam p53 inaktivacije u tumorima su genske mutacije. U malom broju tumora, poput karcinomima povezanih sa HPV infekcijom, glavni mehanizam inaktivacije p53 je na proteinskom nivou. E6 onkoprotein visoko-rizičnih HPV se vezuje za ćelijsku ubikvitin-ligazu, E6-AP. Ovaj dimerni kompleks vezuje p53 protein i indukuje višestruku ubikvitinaciju p53 u prisustvu ubikvitinskog enzimskog kompleksa i degradaciju u proteazomima (Scheffner et al., 1993). Pored toga, vezivanje E6 za p53 blokira interakciju p53 sa transkripcionalnim ko-aktivatorom CBP/p300 i inhibira p53 zavisnu transkripciju (Zimmermann et al., 1999).

Mutacije u *TP53* genu su najučestalije somatske genske promene u malignim tumorima - prisutne u više od 50% svih tipova malignih tumora. Kako je, skoro 95% mutacija u *TP53* genu locirano u DNK-vezujućem domenu (Bullock and Fersht, 2001), koji je ključan za biološku funkciju p53 kao transkripcionog faktora, opredelili smo se za detekciju mutacija u egzonima od 5-8 koji kodiraju ovaj domen. U istraživanje je bila uključena i detekcija mutacija u egzonu 4 zbog značaja ovog dela transaktivacionog domena *TP53* gena u indukciji apoptoze.

Analizom 53 uzoraka karcinoma grlića materice, SSCP metodom, dobijena je učestalost promena od 9,4% u sekvenci egzona 4-8 *TP53* gena i delova okolnih introna. DNK sekvenciranje potvrdilo je u 7,5% analiziranih tumora prisustvo promena u sekvenci *TP53* gena, a u 1,9% analiziranih tumora prisustvo mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena. Ova niska učestalost *TP53* mutacija je u skladu sa podacima iz literature. Naime, za razliku od velikog broja drugih tipova kancera u kojima je *TP53* gen često mutiran, u karcinomima grlića materice učestalost *TP53* mutacija je niska. Dr Lu i Feki (2006) su objavili rad koji se zasnivao na rezultatima studije koja je obuhvatala pretraživanje relevantnih članaka od 1991. do marta 2004. godine u *Medline* bazi podataka, podataka Svetske Zdravstvene (WHO) i IARC *TP53* baze podataka. Deo studije koji se odnosio na učestalost mutacija u *TP53* genu u karcinomima grlića materice prikazan je u Tabeli 9. Podaci su dobijeni na osnovu sekvenciranja *TP53* gena, a metode za preliminarni skrining mutacija su bile različite.

Tabela 9. Učestalost mutacija u *TP53* genu u karcinomima grlića materice zasnovana na sekvenciranju *TP53* gena. Metode za preliminarni skrining promena u sekvenci *TP53* gena bile su: SSCP; DGGE (eng. *denaturing gradient gel electrophoresis*); CDGE (eng. *constant denaturant gel electrophoresis*); Yeast (eng. *yeast function study*) (Lu and Feki, 2006)

Referenca	Zemlja	Metoda za preliminarni skrining	Broj bolesnica	Učestalost mutacija
Borresen et al., 1992	V. Britanija	CDGE*	92	2,17
Fujita et al., 1992	Japan	SSCP (egzoni 5-8)	36**	5,56**
Crook al., 1992	V. Britanija	nepoznato*	28	10,71
Paquette et al., 1993	SAD	SSCP (egzoni 5-8)	45**	4,44**
Helland et al., 1993	Norveška	CDGE*	92	2,17
Kesis et al., 1993	SAD	SSCP (egzoni 5-8)	35**	2,86**

* Nisu dostupni podaci koji deo *TP53* gena je analiziran. ** Izmenjeno i dopunjeno.

Tabela 9. Nastavak

Busby-Earle et al., 1994	V. Britanija	DGGE (kodoni 128-153, 155-185, 237-253, 265-301)	47	2,13
Miwa et al., 1995	Japan	SSCP (egzoni 2-11)	47**	4,26**
Ikenberg et al., 1995	Nemačka	SSCP (egzoni 5-8)	43	4,65
Kim and Kim, 1995	Koreja	SSCP (egzoni 5-9)	64	12,5**
Milde-Langosch et al., 1995	Nemačka	DGGE*	51	7,8
Kim et al., 1997	Koreja	SSCP (egzoni 4-9)	136	1,47
Ngan et al., 1997	Hong-Kong	SSCP (egzoni 2-11)	100	2,00
Helland et al., 1998	Norveška	CDGE (egzoni 5-8)	19	42,11
Tenti et al. 1998	Italija	DGGE (egzoni 5-8)	74	13,51
Gostout et al. 1998	SAD	nepoznato (egzoni 5-9)	25	4,00
Munirajan et al., 1998**	Indija	SSCP (egzoni 5-8)	43	9
Limpaiboon et al., 2000	Tajland	SSCP (egzoni 5-8)	17	11,76
Pinheiro and Villa, 2001	Brazil	SSCP (egzoni 5-8)	122	3,28
Harima et al., 2001	Japan	SSCP (egzoni 5-8)	65	10,77
Denk et al., 2001	Nemačka	Yeast	18	5,56
Ishikawa et al., 2001	Japan	SSCP (egzoni 2-11)	52	26,9

U 13 studija SSCP je bila metoda odabira za preliminarni skrining promena u sekvenci *TP53* gena. U 15 od 22 studija učestalost *TP53* mutacija u karcinomima grlića materice je bila manja od 10%. Samo dve studije pokazale su visoku učestalost *TP53* mutacija (26,9 i 42,1%) (Lu and Feki, 2006).

Procenat promena u sekvenci u egzonima 4-8 *TP53* gena i delovima okolnih introna, dobijenih SSCP metodom, u 54 uzoraka karcinoma jajnika bio je 20,4%. Sekvenciranje DNK je potvrđeno prisustvo promena u sekvenci *TP53* gena u 13,0%, a mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u 11,1% tumora.

Kod karcinoma jajnika procenat mutacija u *TP53* genu je u opsegu od 0-80% zavisno od histopatološkog podtipa karcinoma jajnika, puta tumorogeneze i stadijuma bolesti (Shih and Kurman, 2004). Među adenokarcinomima, karcinomi jajnika su morfološki najheterogeniji. Morfološki definisani podtipovi karcinoma jajnika su različita oboljenja, sa različitim faktorima rizika, molekularnim promenama tokom onkogeneze, različitim metastatskim potencijalom, odgovorom na hemioterapiju i prognozom bolesti (Köbel et al., 2008).

Mali procenat mutacija u *TP53* genu u analiziranom uzorku karcinoma jajnika može da se delimično objasni modelom tumorogeneze jajnika. U skladu sa modelom tumorogeneze jajnika, karcinomi jajnika se dele u dve grupe- tip I i tip II. Tumori tipa I se razvijaju sporo, uglavnom su ograničeni na jajnike u momentu dijagnoze i razvijaju se iz prepoznatljivih prekursorskih lezija. Nisko-gradusni serozni karcinomi, mucinozni karcinomi, nisko-gradusni endometrioidni karcinomi, prelazni i svetloćelijski karcinomi pripadaju tumorima tipa I. Ovi karcinomi odlikuju se mutacijama u genima *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *CTNNB1* i *TGFbetaRII* (Shih and Kurman, 2004; Bell, 2005).

Tumori tipa II su visoko agresivni, razvijaju se brzo, bez vidljivih prekursorskih lezija i u momentu dijagnoze glavnina bolesnica sa ovih tumorima je u uznapređovalom stadijumu bolesti. Umereno i slabo diferentovani serozni karcinomi (visoko-gradusni serozni karcinomi), visoko-gradusni endometrioidni karcinomi, nediferentovani karcinomi i karcinosarkomi pripadaju tumorima tipa II. Oni se karakterišu mutacijama u *TP53* genu i visokim nivoom hromozomske nestabilnosti. Procenat *TP53* mutacija u ovim karcinomima je izrazito visok i to kod visoko gradusnih seroznih karcinomama od 50-80% (Shih and Kurman, 2004), a kod visoko gradusnih endometrioidnih karcinoma i preko 60% (Bell, 2005). Veruje se da su *TP53* mutacije rani događaj u patogenezi ovih tumora.

Kod tumora tipa I, mogu se javiti mutacije u *TP53* genu, ali u malom procentu. *TP53* mutacije u ovim tumorima se javljaju u kasnijim stadijumima, pa se veruje da su uključene u progresiju tumorogeneze, pre nego inicijaciju (pregled u Singer et al., 2005). Mutacije u egzonima *TP53* gena u analiziranom uzorku detektovane su u tri serozna visoko-gradusna karcinoma, jednom nediferentovanom karcinomu, jednom svetloćelijskom i jednom neklasifikovanom karcinomu. Dakle, 4/6 (66,7%) mutacija je detektovano u tumorima tipa II.

Manje od polovine analiziranog uzorka (19 visoko-gradusnih seroznih, 2 nediferentovana i jedan visoko-gradusni endometrioidni karcinom), tj. 22/54 (40,7%) čine tumori tipa II.

Kod ovih karcinoma, teorijski, u 50-80% se očekuje prisustvo *TP53* mutacija. Za jedan serozni i jedan endometriodni tumor nepoznatog gradusa, nije bilo definisano kome tipu tumora pripadaju.

U ispitivanim uzorcima kako karcinoma grlića materice, tako i jajnika, učestalost mutacija dobijena sekvenciranjem DNK je različita i manja od one dobijene SSCP metodom. Osetljivost SSCP metode u skriningu mutacija je 80-90%, gde uglavnom ne budu uočene promene na krajevima framenata DNK koji se analiziraju. Takođe, ne može se isključiti da neke od potencijalnih promena u sekvenci *TP53* gena uočene SSCP metodom možda predstavljaju intronske promene pri krajevima mesta vezivanja prajmera koje nisu mogle da se uoče na elektroferogramu. Zbog toga, promena u sekvenci *TP53* gena uočene SSCP metodom koje nisu potvrđene DNK sekvenciranjem zahtevaju dizajniranje novih prajmera koji bi zahvatili šire intronske sekvence.

5.3. TIP MUTACIJA U *TP53* GENU U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMIMA JAJNIKA

Oko 80% mutacija u egzonima *TP53* gena su mutacije koje menjaju značenje kodona (Soussi and Lozano, 2005). Ostatak su mutacije koje stvaraju stop kodon, dovode do promene faze okvira čitanja (insercije i delecije) i mutacije koje ne menjaju značenje kodona - tihe (eng. *silent*). Tip mutacija ima različit efekat na funkciju p53 proteina. Mutacije koje menjaju značenje kodona rezultuju izmenom neke od amino kiselina, i ovako izmenjeni gen kodira za p53 protein koji je povećane stabilnosti i produženog poluživota u odnosu na wt. Tihe mutacije dovode do promene baznog sastava DNK, ali ne i do promene aminokiselinske sekvence, ali mogu uticati na ekspresiju gena, uvijanje i funkciju proteina ili izazvati nastanak novih mesta iskrajanja introna. Geni sa mutacijama koje stvaraju stop kodon i delecijama kodiraju za skraćene proteine koji su izgubili neku od važnih ili sve p53 funkcije.

Za razliku od velikog broja drugih tumor-supresornih gena, koji su uglavnom izmenjeni mutacijama koje stvaraju stop kodon ili koje dovode do promene faze okvira čitanja, u slučaju *TP53* gena selekcionirani pritisak je išao u pravcu akumulacije mutiranog *TP53* (Soussi and Lozano, 2005). Ovo vodi transformaciji *TP53* u dominantni onkogen i sticanju novih funkcija p53 proteina koji mu daje selektivnu prednost u nastanku i progresiji tumora, kao i heterodimerizaciju i inhibiciju wt p53 eksprimiranog sa drugog alela putem dominantno-negativnog efekta.

Glavnina mutacija u *TP53* genu je locirana u centralnom domenu *TP53*, koji je ključan za funkciju p53 kao transkripcionog faktora. Ipak, neki kodoni su učestalije mutirani od drugih. Mutacije u "hotspot" kodonima (Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 i Arg282) čine oko 30% svih mutacija u *TP53* genu. Ove mutacije su klasifikovane kao "DNA kontaktne" (Arg248, Arg273) i "strukturne" (Arg175, Gly245, Arg249, Arg282) (Bullock and Fersht, 2001). Prva klasa menja aminokiseline koje su direktno uključene u protein-DNA interakciju, a druga klasa menja aminokiseline uključene u stabilizaciju

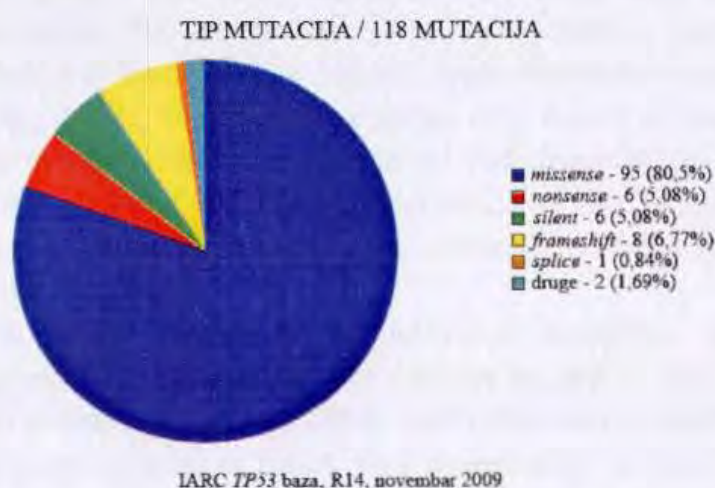
tercijarne structure proteina. Učestalost pomenutih tipova *TP53* mutacija, kao i distribucija među "hotspot" kodonima se razlikuje među tumorskim lokacijama.

U ovom radu, u karcinomima grlića materice, detektovano je: a) jedna mutacija koja menja značenje kodona g.14466G>A (egzon 8) i b) tri intronske varijante *TP53* gena: g.13009C>T (intron 4), g.14394G>A (intron 7) i g.14612G>A (intron 8). Sve oznake mutacija su u odnosu na referentnu sekvencu broj X54156 (*GenBank*). U istom tumoru nađena je i mutacija koja menja značenje kodona g.14466G>A u egzonu 8 i intronska varijanta g.14612G>A (intron 8), koja za efekat ima novo mesta iskrajanja introna. Jedan tumor imao je intronsku varijantu g.13009C>T (intron 4) čiji uticaj na funkciju p53 proteina nije utvrđen, dok su dva tumora imala intronsku varijantu g.14394G>A (intron 7), koja je prvi put detektovana u ovom radu i nije prijavljena u IARC *TP53* bazi.

U karcinomima jajnika, raspodela mutacija po egzonima bila je sledeća: 1/6 mutacija detektovana je u egzonu 4 (g.12082G>A), 2/6 mutacija detektovane su u egzonu 5 (g.13170delA i g.13180delG), 2/6 mutacija u egzonu 7 (g.14060G>T i g.14063_14074del) i 1/6 mutacija u egzonu 8 (g.14493G>T). Sve mutacije osim g.14060G>T su heterozigotnog tipa. U jednom tumoru detektovana je g.14394G>A intronska varijanta (intron 7).

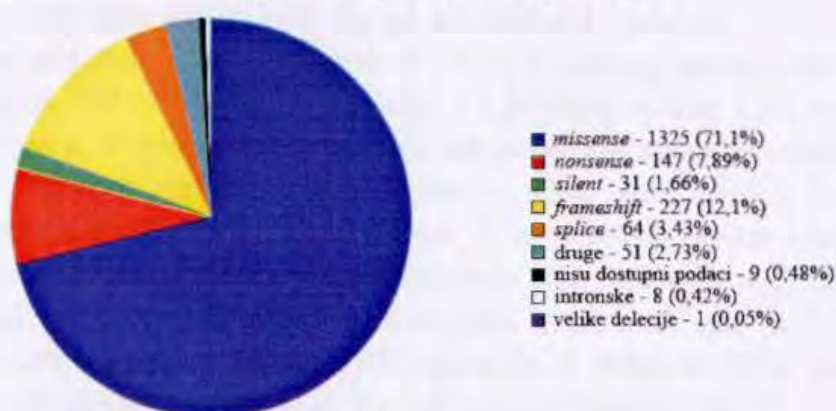
Neke studije ukazuju da su mutacija u *TP53* genu predominantno locirane u egzonu 5, a najmanje u egzonu 6 (IARC *TP53* baza, R10, 2005), kako je zapaženo i u ovom radu. Pokazano je da različiti krajevi sveta imaju različitu raspodelu mutacija u egzonima 5-8 *TP53* gena. Tako, u Japanu i Koreji je zapažena visoka učestalost *TP53* mutacija u egzonu 7, a niska u egzonu 8 u poređenju sa zemljama Zapadne Evrope i Sjedinjenim Američkim državama (Dansonka-Mieszkowska et al., 2006).

Distribucije tipova mutacija na osnovu njihovog efekta na funkciju p53 proteina u karcinomima grlića materice i jajnika, sumirane u IARC *TP53* bazi podataka (R14, 2009), prikazane su na Slikama 23 i 24.



Slika 23. Tip mutacija u *TP53* genu u karcinomima grlića materice (modifikovno prema <http://www-p53.iarc.fr/Graph.asp>).

TIP MUTACIJA / 1863 MUTACIJA



IARC *TP53* baza, R14, novembar 2009

Slika 24. Tip mutacija u *TP53* genu u karcinomima jajnika (modifikovano prema <http://www-p53.iarc.fr/Graph.asp>).

S obzirom da je u karcinomima koji su povezani sa infekcijom HPV glavni mehanizam inaktivacije p53 na proteinskom nivou, malo je podataka o spektru *TP53* mutacija u HPV inficiranim karcinomima grlića materice u različitim geografskim regionima (svega je 118 mutacija prijavljeno u IARC *TP53* bazi, R14, 2009).

Poređenjem spektra *TP53* mutacija u karcinomima jajnika u različitim regionima sveta, prijavljenih u IARC *TP53* bazi (ukupno 1863 mutacija, R14, 2009), uočava se da su tranzicije više zastupljene nego transverzije, sa G>A kao najučestalijom tranzicijom.

Interesantno je da polovina od ukupnog broja detektovanih mutacija u ovom radu (3/6) u egzonima 4-8 *TP53* gena u karcinomima jajnika su mutacije koje menjaju fazu okvira čitanja, i to tipa delecija. Dve od tri delecije su detektovane u egzonu 5. Neki autori sugerišu da su delecije u karcinomima jajnika predominantne u egzonu 5 *TP53* gena (Angelopoulou et al., 1998). Mutacija koja stvara stop kodon je tipa tranzicija (G>A), dok mutacije koje menjaju značenje kodona su tipa transverzija (G>T). Ovo može ukazivati da su pomenuti tipovi mutacija karakterističan za naše geografsko područje. Ali obzirom se radi o malom broju mutacija, ne možemo izvesti ovakav zaključak bez ispitivanja veće grupe bolesnika.

Naime, mutacije u genima su posledica delovanja mutagena spoljašnje sredine i endogenih mehanizama. Neki od endogenih faktora su greške koje se javljaju tokom replikacije DNK ili popravke oštećenja DNK, kao i deaminacija metilovanog citozina u CpG ostrvcima, koja ga prevodi u timin. Ova deaminacija je pojačana putem azotnih oksida i česta je u tumorima koji su povezani sa hroničnim inflamacijom, poput kolorektalnog kancera i kancera želuca. Neki od najpoznatijih primera veze između mutagena sredine i nastanka kancera su: kancer jetre i hronična infekcija virusom

hepatitisa, kao i izloženost aflatoksinima; ne-melanomni kancer kože i izloženost UV radijaciji; kancer pluća i izloženost kancerogenima iz duvana.

U nekim delovima sveta, kao što su pod-saharski predeli Afrike i jugoistočna Azija, izloženost aflatoksinu B1 i hepatitis B virusu su razlog veoma visoke incidence kancera jetre (40 na 100 000). *TP53* mutacije su prisutne u oko 50% kancera jetre u ovim delovima sveta, sa visokom učestalošću mutacije koja menja značenje kodona 249, AGG u AGT, koja vodi zameni arginina serinom. Ova mutacija čini 26% od svih opisanih mutacija u *TP53* genu u kancerima jetre. U *in vitro* sistemima i ćelijskim kulturama je pokazano da metaboliti aflatoksina indukuju ovu mutaciju u *TP53* genu. U zemljama Zapadne Evrope i Sjedinjenim Američkim državama, gde je alkohol važan faktor nastanka kancera jetre, ovaj tip *TP53* mutacije je redak, a *TP53* mutacije su prisutne u oko 30% kancera jetre (pregled u Szymańska and Hainaut, 2003).

U ne-melanomnom kanceru kože, oko 56% mutacija u *TP53* genu su C>T tranzicije, uključujući CC>TT tranzicije (6%) koje nisu detektovane u drugim tumorima. Ovo je posledica neefikasne popravke fotoprodukata, nastalih UV zračenjem. U kancera pluća pušača, oko 30% mutacija u *TP53* genu su G>T tansverzije, i to predominantno u kodonima 157, 158, 245, 248 i 273. Ovaj tip mutacija u *TP53* genu u kancera pluća nepušača čini 12%, a u kancera koji nisu povezani sa izloženošću kancerogenima iz duvana oko 9% svih mutacija u *TP53* genu. U duvanu se nalaze mnogi agensi koji potencijalno mogu da indukuju ovakve promene u DNK, poput agenasa oksidativnog stresa, nitrozoamina, aromatičnih amina i policikličnih aromatičnih hidrokarbona (pregled u Szymańska and Hainaut, 2003).

Neke studije sugerišu da različita raspodela *TP53* mutacija po egzonima, različit spektar *TP53* mutacija i različita raspodela po "hotspot" kodonima u karcinomima jajnika u različitim krajevima sveta ukazuju na različite mutagene sredine koje dovode do specifičnih promena u sekvenci *TP53* gena u karcinomima jajnika u određenim geografskim područjima (Dansonka-Mieszkowska et al., 2006).

Interesantno je da je među promenama u sekvenci *TP53* gena u analiziranim grupama bolesnica u ovom radu, koje su potvrđene sekvenciranjem, G→A nukleotidna supstitucija na poziciji g.14394 u intonu 7 detektovana u tri slučaja: FIGO I skvamoznom karcinomu grlića materice gradusa 1, FIGO I skvamoznom karcinomu grlića materice gradusa 2 i FIGO II mucinoznom karcinomu jajnika nepoznatog gradusa. Ova promena nije prijavljena u IARC *TP53* mutacionoj bazi podataka. Interesantno je da se g.14394G>A homozigotna intronska varijanta detektovana u 3/107 (2,8%) tumora ispitivanih ginekoloških regija.

Postoje podaci o povezanosti između intronskih varijanti i razvoja nekih tipova kancera i/ili progresiji bolesti. Podaci o varijantama sekvence u intronu 7 *TP53* gena su malobrojni i slabo izučavani. Neke intronske varijante u *TP53* genu su više ispitivane, kao duplikacija 16 bp u intronu 3, *MspI* restrikciono mesto i g.13964G>C u intronu 6. Jedna studija slučajeva i kontrola (eng. *case-control study*) je istraživala da li genotip kodona 72 *TP53* gena, duplikacija 16 bp u intronu 3 i intron 6 *MspI* RFLP utiču na rizik za nastanak kancera dojke u žena u Nemačkoj. Autori su utvrdili da je duplikacija 16 bp u

intronu 3 udružena sa povišenim rizikom za nastanak kancera dojke do 50 godine u žena sa pozitivnom porodičnom istorijom kancera dojke (Wang-Gohrke et al., 2002). Druga studija je pokazala da su sva tri pomenuta polimorfizma (jedan egzonski i dva intronska) bila povezana sa povišenim rizikom za nastanak kancera pluća, dok limfoblastoidne ćelijske linije sa wt alelima na sva tri lokusa su imala viši apoptotski indeks i kapacitet popravke DNK oštećenja (Wu et al., 2002). Kod kolorektalnih kancera, jedna epidemiološka studija je sugerisala ulogu duplikacije 16 bp u intronu 3 u povišenom riziku za nastanak ovog oboljenja (Gemignani et al., 2004).

Podaci o varijanti sekvence g.13964G>C u intronu 6 *TP53* gena su kontradiktorni. Jedna studija je pokazala da germinativna g.13964G>C varijanta predstavlja visoko-rizičnu mutaciju udruženu sa familijarnim kancerom dojke (Lehman et al., 2000), dok druga studija to nije potvrdila (Marsh et al., 2001). Grupa autora iz Turske takođe nije našla udruženost ove intronske varijante i povišenog rizika za kancer kolona (Buyru et al., 2005).

Mali je broj studija o vezi između intronskih varijanti i prognoze bolesti. Italijanska grupa autora sugerisala je da osobe obolele od nesitnoćelijskog karcinoma pluća sa duplikacijom u intronu 3 imaju značajno lošiju prognozu (Boldrini et al., 2008a). Ipak, nije jasno da li je insercija 16 bp u intronu 3 vezana za povećan rizik za nastanak nekih tipova kancera i lošu prognozu bolesti ili je to posledica gametske neravnoteže sa varijantama kodona 72 *TP53* gena.

Nije jasno kako promene u sekvenci introna *TP53* gena doprinose tumorogenezi. Neke od pretpostavki su da je to posledica mogućeg uticaja na funkciju p53 proteina putem pojačane učestalosti mutacija u sekvenci okolne DNK, pojave novih mesta obrade primarnih RNK transkripata, izmenjene transkripcione stabilnosti ili tkivno-specifične ekspresije (pregled u Mattick, 1994; Lozano and Levine, 1991).

Podaci o funkcijama introna, poslednjih godina su pomerili granicu između introna i egzona. Kada su 1977. godine otkriveni introni, nazivani su „DNK otpadom“ (eng. „junk DNA“), nepoznate biološke funkcije. Kasnije, ova predstava o intronima je izmenjena. Do danas je poznato nekoliko funkcija introna. Neki introni strukturno stabilizuju pre-iRNK i štite je od degradacije, kontrolišu ekspresiju egzona i pojačavaju sintezu proteina. Introni mogu da kontrolišu gensku aktivnost u različitim stadijumima razvića i u odgovoru na trenutne biološke potrebe. Takođe, neki introni funkcionišu kao kontrolne sekvence u procesu inaktivacije X hromozoma, neophodne za doznu kompenzaciju u žena. Neki podaci ukazuju da introni mogu biti uključeni u pakovanje DNK u hromozome. Introni doprinose genetičkoj varijabilnosti putem njihove uloge u razmeni delova homologih hromozoma tokom mejoza (eng. *crossing-over*) i ako su vezani za retropozonske elemente pomeranjem DNK iz jednog dela genoma u drugi, na način sličan funkcionisanju retrovirusa. Promenjeni obrasci obrade iRNK čine da neki introni ili njihovi delovi postanu deo funkcionalne iRNK (Bergman, 2001).

S obzirom na učestalosti g.14394G>A intronske varijante od 2,8% u grupi ispitivanih bolesnica, možemo pretpostaviti da je ovo polimorfna varijanta karakteristična za našu populaciju. U tu svrhu, treba prvo ispitati da li se radi o germinativnoj varijanti kod bolesnica čiji tumori imaju ovu promenu. Ako se to potvrdi, ispitivanjem šire populacije

zdravih žena ustanovili bismo da li je g.14394G>A polimorfna varijanta karakteristična za populaciju u Srbiji. Takođe, dalje studije na genskom i proteinskom nivou g.14394G>A intronske varijante *TP53* gena su neophodne u određivanju funkcionalnih posledica ove varijante i njenog potencijalnog efekta na rizik ka razvoju nekih tipova kancera i/ili progresiji bolesti.

5.4. UTICAJ POLIMORFIZMA KODONA 72 *TP53* GENA U NASTANKU KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I KARCINOMA JAJNIKA

TP53 mutacije su najviše izučavane genske promene u malignim tumorima, o čemu govori i podatak da je u IARC *TP53* bazi do 2009. godine prijavljeno 26 597 somatskih i 535 germinativnih mutacija. Nasuprot, *TP53* polimorfizmi su slabo izučavani.

Od kada su Storey i saradnici 1998. godine nagovestili da individue sa Arg/Arg u odnosu na Arg/Pro genotip kodona 72 imaju viši rizik za nastanak HPV-udruženih karcinoma, intenzivna istraživanja su vršena u različitim krajevima sveta o vezi polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i nastanka različitih tipova kancera.

Najviše je izučavana veza između polimorfizma kodona 72 *TP53* gena i rizika za nastanak karcinoma grlića materice, dok su studije za ostale tumorske lokacije malobrojne i kontradiktorne.

Neke studije su pokazale vezu između Arg72 p53 varijante i višeg rizika za nastanak kancera dojke (Buyru et al., 2003; Aoki et al., 2009), jajnika (Pegoraro et al., 2003; Agorastos et al., 2004), prostate (Henner et al., 2001), larinksa (Sourvinos et al., 2001), jednjaka (Yang, 2008), želuca (Shen et al., 2004), mokraćne bešike (Soulitzis et al., 2002), pluća (Buyru et al., 2008), kože (Dokianakis et al., 2000). Ima i studija sa oprečnim rezultatima, tj. da je Pro72 p53 varijanta udružena sa rizikom za nastanak određenih tipova kancera, kao što je kancer štitne žlezde (Granja et al., 2004), nazofarinksa (Sousa et al., 2006; Zhuo et al., 2009), dojke (Kazemi et al., 2009; Zhang et al., 2010), jajnika (Wang et al., 2004; Santos et al., 2006b), endometrijuma (Roh et al., 2004), prostate (Suzuki et al., 2003), jednjaka (Lee et al., 2000; Shao et al., 2008), želuca (Yi and Lee, 2006; Zhou et al., 2007), pluća (Sreeja et al., 2008; Li et al., 2009), kože (Chen et al., 2003), jetre (Ezzikouri et al., 2007).

Studije o vezi polimorfni varijanti kodona 72 i rizika za nastanak karcinoma grlića materice su nekonzistentne, pri čemu veliki broj ovih studija nije uspeo da potvrdi prvobitni nalaz Storey-a i saradnika (1998). Ove razlike potiču od malog uzorka, kao i neadekvatno formirane kontrolne grupe. Smatra se da studije sa manje od 200 slučajeva treba obazrivo interpretirati, a da jedino velike, pažljivo dizajnirane studije slučajeva i kontrola sa hiljadama uzoraka daju jasne rezultate (Whibley et al. 2009). Meta-analize su pokazale da je glavni uzrok heterogenosti među rezultatima odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi (Koushik et al., 2004). Ovo odstupanje može da ukaže da kontrolna grupa nije reprezentativni uzorak populacije iz koje je izdvojena, tako da genotipska distribucija ne odražava onu koja je prisutna u populaciji. Ili je

odstupanje posledica etničke mešanosti populacije ako postoje etničke/rasne razlike u učestalosti genotipova u odnosu na neko polimorfno mesto, kao što je to slučaj sa *TP53* kodon 72 polimorfizmom.

Meta-regresione analize su pokušale da razjasne i uticaj drugih eventualnih izvora heterogenosti, kao što su izvor DNK, metod za genotipizaciju i HPV status. Pokazano je da nema značajnih razlika kada je izvor DNK bila krv u odnosu na tumorsko tkivo u grupi bolesnica, što je u skladu sa činjenicom da je gubitak heterozigotnosti redak događaj u neoplazijama grlića materice (Koushik et al., 2004), kao i da nema značajnih razlika alel specifičnog PCR-a u odnosu na druge metode za genotipizaciju (Koushik et al., 2004; Sousa et al., 2007). Kada su za grupu bolesnica odabrane samo one koje su bile HPV16 i/ili HPV18 pozitivne pokazana je statistički značajna razlika kod skvamoznih karcinoma, gde je srednji OR bio dva puta viši, što sugeriše da možda postoji genotipska predispozicija za izvesne HPV tipove. Predispozicija Arg forme p53 proteina ka E6 posredovanoj degradaciji demonstrirana je samo za HPV tipove 16 i 18 (Storey et al., 1998). Iako je logična ekstrapolacija ovog nalaza na ostale visoko-rizične HPV tipove, moguće je da E6 onkoprotein drugih HPV tipova ima manje izraženu razliku ka Arg u odnosu na Pro p53 proteinsku varijantu. Rezultati Storey-a i saradnika su sugerisali da je E6 posredovana degradacija p53 blago povišena za HPV18 u odnosu na HPV16. Otuda je i viši zbirni OR za adenokarcinome koji su uglavnom udruženi sa HPV18 u odnosu na skvamozne karcinome koji su mnogo češće udruženi sa HPV16 infekcijom (Koushik et al., 2004). Razlike u HPV varijantama mogu da doprinesu razlikama u predispoziciji Arg varijante p53 ka nastanku karcinoma grlića materice. Tako, ne-Evropska HPV16 varijanta u odnosu na Evropsku ima viši onkogeni potencijal u skladu sa dugotrajnijom latentnom infekcijom i višim transkripcionim potencijalom (Ferenczy and Franko, 2002). Protivrečnostima o vezi između *TP53* polimorfnih varijanti i rizika za nastanak nekih tipova kancera može da bude i uzrok nedostak određivanja *TP53* mutacionog statusa tumora, usled činjenice da Arg72 varijanta može da bude inhibitor ili aktivator tumorskog rasta zavisno da li se radi o wt ili mutiranom p53 proteinu (Pietsch et al., 2006). Polimorfizam uzvodnih aktivatora ili represora ili nizvodnih efektoru p53 može da dovede do individualnih razlika u riziku za nastanak kancera zajedno sa polimorfizmom *TP53* gena.

Meta-analize, koje su pokušale da sumiraju rezultate iz različitih krajeva sveta, pokazale su blago povišen rizik za karcinome grlića materice za Arg homozigote u odnosu na heterozigote (OR 1,2; 95% CI 1,1–1,3) (Jee et al., 2004), (OR 1,22; 95% CI 1,08–1,39) (Klug et al., 2009). U odnosu na histološki tip, uočen je blago viši rizik za adenokarcinome (OR 1,7; 95% CI 1,0 –2,7) u odnosu na skvamozne ćelijske karcinome (OR 1,5; 95% CI, 1,2–1,9) (Koushik et al., 2004). Za Evropu je pokazano da Arg homozigoti u odnosu na heterozigote ili Pro homozigote imaju viši blago povišen rizik za nastanak invazivnih karcinoma grlića materice (Sousa et al., 2007). Za razliku od karcinoma grlića materice, veza između Arg/Arg genotipa i višeg rizika za nastanak skvamoznih intraepitelnih lezija nije pokazana u meta-analizama (Koushik et al., 2004; Sousa et al., 2007). Ovo vodi pretpostavci da *TP53* kodon 72 polimorfizam ima ulogu u progresiji, pre nego inicijaciji kanceroznih lezija.

U periodu od prve publikacije Storey i saradnika 1998. do 2006. godine, pretraživanjem različitih baza podataka (*PubMed, Embase, Current contents*), ustanovljeno je da je više od 80 studija urađeno o vezi *TP53* kodon 72 polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma grlića materice (Klug et al., 2009). U *PubMed* bazi podataka 27 studija na tu temu je publikovano analiziranjem Evropskih populacija u periodu od 1998. do 2005. godine, i one su obuhvatile samo 13 Evropskih zemalja. Od toga 7 studija je bilo vezano za Italiju, a po 4 za Veliku Britaniju i Švedsku. Glavnina studija nije pokazala statistički značajnu razliku u raspodeli Arg/Arg genotipa između žena sa skvamoznim intraepitelnim lezijama ili invazivnim karcinomima grlića materice i kontrolne grupe, kao ni vezu Arg/Arg genotipa sa razvojem ovog maligniteta. Studije koje su ukazale na viši rizik ka nastanku ovog maligniteta kod Arg/Arg nosioca poticale su iz 4 zemlje i to Velike Britanije, Švedske, Italije i Grčke. Individualne meta-analize za zemlje sa više od jedne publikovane studije pokazale su da jedino Italija i Velika Britanija imaju statistički značajan rezultat i to za invazivne karcinome grlića materice, dok to nije pokazano za skvamozne intraepitelne lezije (Sousa et al., 2007).

Iz meta-analiza vidi se da su brojne studije analizirale Evropske populacije, a manje ih je za populacije Azije, Severne i Južne Amerike, i svega nekoliko za Afriku (Koushik et al., 2004; Jee et al., 2004; Sousa et al., 2007; Klug et al., 2009). Pri ovome treba imati u vidu da Evropska populacija čini 11% ukupne svetske populacije, pri čemu samo Rusija doprinosi sa 2%, a za tu zemlju nemamo podataka o udruženosti *TP53* kodon 72 polimorfizma i nastanka neoplazija grlića materice. Takođe, za više od dve trećine Evropskih zemalja nemamo ovaj podatak. Azija doprinosi 60% svetskoj populaciji, pri čemu Kina i Indija čine 20%, odnosno 17%. Tako da, pored navedenih izvora heterogenosti rezultata, zaključke iz meta-analiza treba uzimati sa izvesnom rezervom (Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat, 2009).

Vežu između polimorfizma kodona 72 *TP53* gena i rizika ka nastanku karcinoma grlića materice rasvetlile bi dodatne studije u pacijenata sa jasno definisanim tipovima tumora (skvamozni vs. adenokarcinomi); razlike u postojanju različitih HPV tipova, podtipova i varijanti; detaljnije izučavanje populacija sa različitim genetičkim poreklom, a sličnih geografskih prostora (Ojeda et al., 2003), kao i određivanje mutacionog statusa *TP53* gena u tumorskim tkivima.

Za razliku od brojnih studija o vezi između Arg/Arg p53 i rizika za nastanak karcinoma grlića materice (koje su ovu asocijaciju potvrdile ili ne), studije o vezi polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i nastanka karcinoma jajnika su malobrojne i kontradiktorne. Tako su neke studije nagovestile da je Arg/Arg genotip ili Arg alel verovatni faktor rizika za nastanak ovih neoplazmi (Agorastos et al., 2004; Pegoraro et al., 2003), dok drugi autori ukazuju da je Pro alel faktor rizika za nastanak ovih neoplazmi (Wang et al., 2004; Santos et al., 2006b).

U ovom radu pokušali smo da otklonimo sve potencijalne uzroke heterogenosti rezultata. Odabir kontrolne grupe bio je takav da je postojalo poklapanje po godinama unutar intervala (<40, 40-49, 50-59, >60 godina) sa grupama bolesnica, i isti odnos HPV

inficiranih vs. HPV neinficiranih individua je u okviru svakog intervala godina bio kao u celokupnoj grupi iz koje je vršen odabir (odjeljak 3.1.). Kontrolne grupe (kako za karcinome grlića materice, tako i za karcinome jajnika) bile su u Hardi-Vajbergovoj ravnoteži u odnosu na ispitivani genski lokus, te su zaista predstavljale reprezentativni uzorak populacije iz koje su izdvojene. Takođe, uzeli smo uzorke tumora koji su bili wt *TP53*, u skladu sa činjenicom da mutirani *TP53* sa Arg72 varijantom može da bude aktivator tumorskog rasta.

Rezultati ove studije su pokazali da su nosioci Arg alela u povišenom riziku za nastanak karcinoma grlića materice (Arg/Arg vs. Arg/Pro plus Pro/Pro: OR=1,24; 95% CI 0,59-2,61 i Arg/Arg plus Arg/Pro vs. Pro/Pro: OR=4,24; 95% CI 0,49-36,32), dok su nosioci Pro alela kodona 72 *TP53* gena u povišenom riziku za nastanak karcinoma jajnika (Pro/Pro vs. Arg/Pro plus Arg/Arg: OR=1,52; 95% CI 0,29-7,89 i Pro/Pro plus Arg/Pro vs. Arg/Arg: OR=2,04; 95% CI 0,96-4,34). Ipak, ovde se radilo o relativno malom uzorku (49 karcinoma grlića materice i 47 karcinoma jajnika i njima pridruženih kontrolnih grupa od 74, odnosno 70 briseva grlića materice), te rezultate treba uzimati preliminarno. Ispitivanjem većih grupa bolesnica, kao i kontrola, mogli bismo da donesemo pouzdanije tvrdnje o vezi polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i rizika za nastanak pomenutih maligniteta ginekološke regije.

Kao posredan rezultat ispitivanja polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena i rizika za nastanak pomenutih maligniteta dobili smo i učestalost Arg (77,4%) i Pro alela *TP53* gena (22,6%) u populaciji u Srbiji. Ova učestalost je slična onoj u nekim Evropskim zemljama (Tabela 10).

Tabela 10. *TP53* polimorfizam u različitim populacijama (učestalosti: A₁(P)- Pro alela, A₂(A)- Arg alela, PP- Pro/Pro, AP- Arg/Pro, AA- Arg/Arg genotipa) (Ojeda et al., 2003)

Zemlja	N	A ₁ (P)	A ₂ (A)	PP	AP	AA	Referenca
Finska	171	0,243	0,757	0,053	0,380	0,567	Beckman et al., 1994
Norveška	225	0,258	0,742	0,060	0,400	0,540	Helland et al., 1998
Švedska	626	0,307	0,693	0,111	0,390	0,500	Josefsson et al., 1998
Švedska	188	0,310	0,690	0,090	0,440	0,470	Andersson et al., 2001
Velika Britanija	246	0,222	0,778	0,069	0,305	0,626	Rosenthal et al., 1998
Velika Britanija	250	0,246	0,754	0,060	0,372	0,568	Lanham et al., 1998
Velika Britanija	41	0,342	0,658	0,049	0,585	0,366	Storey et al., 1998

Tabela 10. nastavak

Holandija	158	0,240	0,759	0,060	0,370	0,570	Hayes et al., 1998
Poljska	52	0,153	0,847	0,038	0,231	0,731	Dybikowska et al., 2000
Češka	172	0,288	0,712	0,110	0,355	0,535	Tachezy et al., 1999
Španija	90	0,320	0,680	0,102	0,435	0,463	Beckman et al., 1994
Japan	110	0,404	0,595	0,180	0,460	0,360	Minaguchi et al., 1998
Kina	68	0,449	0,551	0,120	0,660	0,220	Ngan et al., 1999
Indija	131	0,505	0,495	0,150	0,710	0,140	Saranath et al., 2002
Indija	71	0,542	0,458	0,296	0,493	0,211	Beckman et al., 1994
Nigerija	122	0,631	0,369	0,385	0,492	0,123	Beckman et al., 1994
Južna Afrika	340	0,690	0,310	0,470	0,440	0,090	Pegoraro et al., 2002
SAD	245	0,282	0,718	0,082	0,400	0,518	Hildesheim et al., 1998
Kosta Rika	123	0,309	0,691	0,065	0,488	0,447	Hildesheim et al., 1998
Peru	127	0,303	0,697	0,126	0,354	0,520	Klug et al., 2001
Čile	53	0,302	0,698	0,075	0,453	0,472	Ojeda et al., 2003
Čileanski domoroci	25	0,240	0,760	0,080	0,320	0,600	Ojeda et al., 2003

Takođe, kao posredan rezultat, dobili smo i učestalost HPV infekcije u kontrolnoj grupi od 40,0%. Ovo je prilično visoka učestalost u odnosu na prosečnu učestalost HPV infekcije u grupi citološki normalnih žena u Evropi i različitim krajevima sveta (Clifford et al., 2005; de Sanjosé et al., 2007). Ipak, neke studije su pokazale visoku učestalost HPV infekcije u grupi citološki normalnih žena i to 39% i 51% (Ferrera et al., 1999; Táborá et al., 2009). Razlog ovome je verovatno trenutni socio-ekonomski status i neadekvatna edukacija žena u Srbiji.

5.5. POVEZANOST MUTACIJA I POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 *TP53* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA GRLIĆA MATERICE I JAJNIKA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNICA

Mutacije *TP53* gena su često asocirane sa kasnijim tumorskim stadijumima, lošom prognozom bolesti i rezistencijom na antikancersku terapiju koja deluje putem p53-zavisne apoptoze.

U ovom radu ispitivali smo raspodelu mutacija u *TP53* genu i polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena među kliničkim (FIGO stadijum) i histopatološkim karakteristikama karcinoma (histološki tip/podtip tumora, histološki gradus tumora), kao i karakteristikama bolesnica (status menopauze, starosna dob).

U karcinomima grlića materice nije ispitivana povezanost mutacija u *TP53* genu sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma, kao ni sa karakteristikama bolesnica sa ovim karcinomima s obzirom da je u samo jednom tumoru detektovana egzonska mutaciju u *TP53* genu i u tri tumora intronske varijante čiji uticaj na funkciju p53 proteina nije utvrđen.

Veliki broj studija o povezanosti promena u *TP53* genu i karakteristika karcinoma grlića materice se zasniva na imunohistohemijskim metodama. Tako, neki autori ukazuju da ekspresija p53 raste sa porastom stadijumima bolesti i da predstavlja kasni događaj u kancerogenezi (Bremer et al., 1995), dok su drugi prekomernu ekspresiju p53 detektovali u ranim stadijumima (Ngan et al., 2001). Razlika u ekspresiji p53 se ne razlikuje između histoloških gradusa tumora (Horn et al., 2001).

Iako *TP53* gen izmenjen mutacijom koja menja značenje kodona kodira za protein produženog poluživota koji može da se detektuje imunohistohemijski, prekomerna ekspresija p53 proteina ne mora da ukazuje na postojanje mutacije u *TP53* genu. Prekomerna ekspresija p53 proteina može da bude rezultat akumulacije normalnog p53 proteina u odgovoru na DNK oštećenja koja vode zaustavljanju ćelijskog ciklusa i apoptozi, proteinskog uvijanja normalnog p53 i tehničkih faktora. Sa druge strane, neki tipovi mutacija poput mutacija koje stvaraju stop kodon i delecija, koje vode sintezi nepotpunog p53 proteina, ne mogu da se detektuju imunohistohemijski.

U ispitivanim karcinomima jajnika (n=53), zastupljenost *TP53* mutacija unutar kliničkih, kao i histopatoloških karakteristika bolesti nije statistički značajna. Učestalost *TP53* mutacija u tumorima bolesnica sa uznapredovalom bolesti (FIGO stadijumi III/IV) (12,1%) je bila približna onoj u lokalizovanom bolesti (FIGO stadijumi I/II) (10,0%). Neki autori ukazuju na višu učestalost mutacija u *TP53* genu u kasnim (III/IV) u odnosu na rane stadijume bolesti (I/II), i to 49% vs. 31% (Feki and Irminger-Finger, 2004). U nekim studijama je pokazano da je zastupljenost *TP53* mutacija statistički značajno viša u kasnim u odnosu na rane stadijume bolesti (Fallows et al., 2001; Reles et al., 2001), što bi ukazivalo da su one kasni događaj u kancerogenezi i da doprinose agresivnijem fenotipu i napredovanju tumora, ali ima i studija koje nisu pokazale vezu između mutacija u *TP53* genu i FIGO stadijuma bolesti (Guan et al., 1998).

U odnosu na histološke podtipove karcinoma jajnika, uočena je viša zastupljenost *TP53* mutacija u ne-seroznim (16,7%) vs. seroznim karcinomima (8,6%). Druge studije nisu pokazale značajnu razliku u zastupljenosti mutacija u *TP53* genu u različitim histološkim podtipovima karcinoma jajnika (Fallows et al., 2001) ili je razlika u zastupljenosti *TP53* mutacija u seroznim karcinomima bila značajno viša u odnosu na ne-serozne karcinome, ali samo u ranim stadijumima bolesti (Leitao et al., 2004).

Nijedan od dobro diferentovanih karcinoma jajnika nije imao mutaciju u *TP53* genu, dok je učestalost detektovanih *TP53* mutacija bila slična u umereno diferentovanim (19,0%) i slabo diferentovanim tumorima (16,7%). Ima studija koje su pokazale statistički značajno višu učestalost *TP53* mutacija u slabo diferentovanim u odnosu na dobro diferentovane karcinome (Reles et al., 2001; Wang et al., 2004).

Zastupljenost *TP53* mutacija bila je viša u bolesnica u premenopauzi u odnosu na one u postmenopauzi (16,7% vs. 8,6%), ali ova razlika nije statistički značajna. Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u bolesnica sa mutacijama u *TP53* genu je bila približna vrednosti medijane u bolesnica sa wt *TP53* (58 vs. 59 godina). Ovo ukazuje da mutacije u *TP53* genu ne doprinose ranijem javljanju bolesti, ali obzirom da se radi o svega 6 bolesnica sa mutacijama nasuprot 47 bolesnica bez mutacija u *TP53* genu, ispitivanje bi trebalo izvršiti na većem uzorku karcinoma jajnika. U nekim studijama je pokazano da bolesnice sa mutacijama u *TP53* genu imaju statistički značajno višu medijanu raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u odnosu na bolesnice sa wt *TP53* genom (Reles et al., 2001).

S obzirom na mali broj detektovanih mutacija (n=6) u ispitivanom uzorku karcinoma jajnika nismo ispitivali povezanost tipa mutacija sa karakteristikama karcinoma, kao ni prognozom bolesti. Neke studije ukazuju da, sa kliničkog aspekta, mutacije u *TP53* genu imaju različit uticaj na agresivnost tumora i prognozu bolesti. U kanceru dojke je pokazano da su mutacije u kodonima koji kodiraju za aminokiseline koje stabilizuju tercijsku strukturu p53 proteina povezane sa kraćim preživljavanjem, dok bolesnice sa mutacijama u kodonima koji kodiraju za aminokiseline koje su uključene u protein-DNK interakciju imaju slično preživljavanje kao one sa wt *TP53* genom. Mutacije u egzonu 4 su povezane sa lošijom prognozom, verovatno usled uticaja ovog dela p53 proteina u apoptozi. Bazne zamene koje menjaju značenje kodona ili stvaraju stop kodon pokazuju značajno lošiju prognozu u odnosu na delecije ili insercije. Transverzije su povezane sa lošijom prognozom u odnosu na tranzicije. Mutacije u evolutivno očuvanim regionima *TP53* gena su manje agresivne od mutacije u nekonzerviranim regionima (Powell et al., 2000). U karcinomima jajnika, nasuprot, mutacije u konzerviranim regionima *TP53* gena su povezane sa agresivnijim fenotipom od mutacija u nekonzerviranim regionima (Reles et al., 2001).

Većina studija o polimorfizmu kodona 72 *TP53* gena je bazirana na studijama slučajeva i kontrola, radi određivanja uticaja polimorfničkih varijanti u nastanku različitih tipova kancera. Podaci o povezanosti polimorfničkih varijanti kodona 72 *TP53* gena sa kliničko-histopatološkim karakteristikama kancera i tokom bolesti su malobrojni.

Kako je ispitivana grupa karcinoma grlića materice bila relativno uniformna u odnosu na klinički stadijum bolesti i histološki tip tumora (94,3% karcinoma je bilo FIGO I stadijuma i 92,5% skvamoznog histološkog tipa), od kliničko-histopatoloških karakteristika ispitivana je samo povezanost polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena sa histološkim gradusom tumora. Uočen je trend porasta Arg/Arg genotipa od dobro ka slabo diferentovanim tumorima.

U karcinomima jajnika, zastupljenost Pro/Pro genotipa u grupi bolesnica sa uznapređovalom bolesti (FIGO III i IV) u odnosu na one sa lokalizovanom bolesti (FIGO I i II) bila je slična (12,1% vs. 9,5%). Međutim, statistički značajno viša zastupljenost Pro/Pro genotipa uočava se u ne-seroznim u odnosu na serozni histološki podtip karcinoma (26,3% vs. 2,9%). Takođe, trend porasta Pro/Pro genotipa sa višim histološkim gradusima (od 0% u G1, 4,8% u G2 do 33,3% u G3) je statistički značajan. Drugi autori, u karcinomima jajnika, nisu ustanovili povezanost između učestalost genotipa kodona 72 *TP53* gena i kliničkih stadijuma bolesti, histoloških podtipova tumora, kao ni stepena diferentovanosti tumora (Høgdall et al., 2002; Wang et al., 2004). Među bolesnicama sa karcinomom grlića materice, koje su bile u premenopauzi, 65,5% je bilo Arg/Arg, 31,0% Arg/Pro i 3,5% Pro/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena. Među bolesnicama koje su bile u postmenopauzi, 58,3% je bilo Arg/Arg i 41,7% Arg/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena. Ova razlika u zastupljenosti različitih genotipova kodona 72 nije statistički značajna.

Uočena razlika u zastupljenost Pro/Pro genotipa u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika u posmenopauzi vs. grupi bolesnica u premenopauzi (13,9% vs. 5,6%) nije statistički značajna. Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma grlića materice u bolesnica sa Arg/Arg genotipom je bila dve godine ranije u odnosu na bolesnice sa Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena (47 vs. 49 godina). Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u bolesnica sa sa Arg/Arg plus Arg/Pro genotipom u odnosu na bolesnice sa Pro/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena je bila dve godine ranije (59 vs. 61). Međutim, u grupi bolesnica sa Pro/Pro plus Arg/Pro u odnosu na Arg/Arg genotip medijana raspodele dijagnostikovanja bolesti je dve godine ranije (57 vs. 59). Drugi autori ukazuju da Pro alel doprinosi ranijem javljanju kancera. Medijana raspodele dijagnostikovanja je bila 6 godina ranije za skvamozne karcinome glave i vrata kod Pro/Pro vs. Arg/Pro nosioca (Shen et al., 2002); 10,3 godina ranije za karcinome larinksa kod Pro/Pro vs. heterozigota ili homozigota za Arg alel (Gottschlich et al., 2000) i 13 godina ranije za ne-polipozne kolorektaktalne karcinome za pacijente sa Arg/Pro vs. Arg/Arg genotipom (Jones et al., 2004).

5.6. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA GRLIĆA MATERICE

Danas je jasno da je infekcija visoko-rizičnim tipovima HPV glavni faktor u nastanku karcinoma grlića materice. Ovaj podatak je doveo do intenzivnog istraživanja na polju profilaktičkih i terapijskih vakcina. Testiranje prisustva visoko-rizičnih tipova HPV u epitelnim ćelijama grlića materice ima tendenciju da sa Papa analizom postane osnova

skrining programa u razvijenim zemljama sveta, čiji je cilj prevencija pojave i smanjenje smrtnosti od karcinoma grlića materice putem detekcije i tretiranja skvamoznih intaepitelnih lezija. Naime, osetljivost Papa testa u otkrivanju intaepitelnih lezija je 50-60% (Monsonog et al., 2004), dok osetljivost Papa i HPV testa zajedno dostiže vrednosti od skoro 100%, a specifičnost od 92% (Mayrand et al., 2007).

Uprkos svemu navedenom, ostalo je dosta nerazjašnjenih podataka o vezi između HPV infekcije i genetičkih faktora domaćina, toku bolesti i odgovoru na antikancersku terapiju.

Prisustvo HPV u ispitivanom uzorku karcinoma grlića materice (n=48) je detektovano u 62,5% tumora. Iako neki podaci ukazuju da je HPV infekcija prisutna u preko 99% uzoraka karcinoma grlića materice (Walboomers et al., 1999), ima radova u kojima je ovaj procenat manji. Vrednosti za učestalost HPV infekcije variraju u zavisnosti od veličine uzorka, histološkog tipa tumora i primenjene metodologije za detekciju HPV. Povezanost između infekcije HPV i adenokarcinoma je manje izražena u odnosu na skvamozni histološki tip. Neki radovi ukazuju da je HPV infekcija u adenokarcinomima zavisna od starosti bolesnica. Pokazano je da u bolesnica mlađih od 40 godina HPV infekcija prisutna u 89%, a u bolesnica od 60 godina i starijih u svega 43% adenokarcinoma (Andersson et al., 2001). Od ukupnog broja dijagnostikovanih karcinoma grlića materice 85-90% je skvamoznog tipa, a 10-15% su adenokarcinomi. U zavisnosti od tipa i veličine uzorka ove vrednosti variraju. U ispitivanoj grupi karcinoma u ovoj studiji bilo je 93,8% karcinoma skvamoznih histološkog tipa, a 6,2% adenokarcinoma.

Metode za detekciju HPV imaju različitu osetljivost, tj. detektuju različit broj kopija HPV u uzorku. Tako PCR metode mogu da detektuju od 10 do 1000 virusnih kopija po brisu, dok neke druge metode poput HC (eng. *hybride capture*) koja se zasniva na DNK-RNK hibridizaciji od 10^4 - 10^5 virusnih kopija po brisu (Snijders et al., 2003). U ovom radu, prisustvo HPV infekcije je detektovano PCR metodom putem amplifikacije dela L1 virusnog gena korišćenjem GP5+/GP6+ prajmera koji su tako dizajnirani da se njima amplifikuje konzervisana sekvenca L1 virusnog gena 23 tipa HPV (6, 11, 13, 16, 18, 30-35, 39, 40, 42, 45, 51-53, 56, 58, 61, 66, 68) (de Roda Husman et al., 1995). Harima i saradnici (2002) su PCR metodom sa konsenzus prajmerima, koji su amplifikovali delove E6 i E7 virusnih gena HPV tipova 6, 16, 18, 31, 33, 35, 52, 56, 58 i 59, detektovali prisustvo HPV infekcije u 76% (64/84) karcinoma grlića materice, od kojih je 94,0% bilo skvamoznog tipa. Wong i saradnici (2000) su amplifikacijom dela L1 virusnog gena korišćenjem MY09/MY11 prajmera detektovali HPV u 76% (55/72) karcinoma grlića materice, od kojih je 86,1% bilo skvamoznog tipa.

U ispitivanom uzorku u ovom radu, HPV16 infekcija je bila prisutna u 58,3%, a HPV18 u 16,7% tumora. Ovo je u skladu sa podacima iz literature, po kojima je infekcija sa HPV16 prisutna u oko 50%, a sa HPV18 u 15-20% skvamoznih karcinoma grlića materice, kojih je u ispitivanom uzorku bilo 93,8%. Nasuprot, u adenokarcinomima predominantan je HPV18. Tako su Andersson i saradnici (2001) u 52% adenokarcinoma detektovali HPV18, dok je HPV 16 bio zastupljen u 33% tumora. Bosch i saradnici

(1995) su detektovali HPV18 u 51% adenokarcinoma

Višestruku infekciju (HPV16 *plus* HPV18) je imalo 14,6% tumora. Sličan procenat višestruke infekcije detektovan je i u drugim radovima. Tako je 14% ispitivanih tumora iz Indonezije bilo inficirano sa više tipova HPV (Schellekens et al., 2004), a u Indiji 18% karcinoma je bilo sa višestrukom infekcijom (Peedicayil et al., 2006). Procenat višestruke infekcije u studiji koja je sumirala 516 uzoraka inazivnih karcinoma grlića materice iz 15 centara u Francuskoj bio je 22% (Prétet et al., 2008).

U ovom radu ispitivali smo samo povezanost HPV infekcije sa histološkim gradusom karcinoma grlića materice, s obzirom da su karcinomi bili skoro uniformni u odnosu na FIGO stadijum (93,8% FIGO I stadijuma) i histološki tip (93,8% je bilo skvamoznog histološkog tipa). Uočeno je da su slabo diferentovani tumori manje inficirani sa HPV (odnos HPV-pozitivnih vs. HPV-negativnih bio je 40,0% vs. 60,0%) u odnosu na dobro i umereno diferentovane (odnos HPV-pozitivnih vs. HPV-negativnih bio je 52,9% vs. 47,1% u G1 i 75,0% vs. 25,0% u G2). Ova razlika, iako nije bila statistički značajna, može da ukazuje da su HPV-negativni tumori agresivnijeg ponašanja, što je u skladu sa nagoveštajima nekih autora (Riou et al., 1990). U drugim studijama nije pokazana povezanost između HPV infekcije i FIGO stadijuma, histološkog tipa i gradusa tumora (Liu JH et al., 2003; Harima et al., 2002).

Vezano za karakteristike bolesnica, procenat HPV infekcije u bolesnica u premenopauzi bio je približan onima u postmenopauzi (63,0% vs. 61,9%). Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma u bolesnica sa HPV infekcijom je bila je približna onima bez HPV infekcije (49 vs. 48 godina), dok je medijana za bolesnice sa višestrukom infekcijom bila 52 godine. Druge studije nisu pokazale povezanost HPV infekcije sa starosnom dobi (Harima et al., 2002).

Nije jasno da li su određeni HPV tipovi povezani sa agresivnijim karakteristikama bolesti. Neki autori ukazuju da HPV 18 može da bude udružen sa agresivnijim formama karcinoma grlića materice (Kurman et al., 1988). Da infekcija sa više tipova HPV daje ovim tumorima agresivnije karakteristike, pokazuje i činjenica da u HSIL broj kopija HPV16 je viši u HSIL koje imaju i neki drugi tip HPV u odnosu na one lezije koji su zaražene samo sa HPV16 (Weissenborn et al., 2003). Broj integrisanih u odnosu na epizomalne forme HPV16 kod invazivne bolesti je viši u tumorima sa HPV16 *plus* HPV18 u odnosu na one sa samo HPV16 infekcijom (Park et al., 1997).

5.7. HPV INFEKCIJA U KARCINOMIMA JAJNIKA

Pored uticaja HPV infekcije na nastanak karcinoma anogenitalne i orofaringealne regije (pregled u zur Hausen, 2009), ima studija koje sugerišu da ona ima uticaja i na razvoj kancera jednjaka (pregled u Syrjänen, 2002), pluća (pregled u Rezazadeh et al., 2009), kolorektuma (Lee et al., 2001; Bodaghi et al., 2005a; Damin et al., 2007; Salepci et al., 2009), dojke (Damin et al., 2004; Gumus et al., 2006; Heng et al., 2009; de León et al., 2009), kože (Iftner et al., 2003; Shahmahmoudi et al., 2007), prostate (Al Moustafa,

2008), mokraćne bešike (De Gaetani et al., 1999; Barghi et al., 2005).

Podaci o ulozi HPV u patogenezi kancera jajnika su malobrojni i kontraverzni. Kaufman i saradnici su 1987 godine prvi nagovestili postojanje infekcije HPV u kanceru jajnika (Kaufman et al., 1987). To je podstaklo istraživače iz različitih krajeva sveta na analizu prisustva i potencijalni uticaj HPV u razvoju kancera jajnika. Neke studije su potvrdile prisustvo HPV u maligno transformisanom tkivu jajnika (Lai et al., 1992; Lai et al., 1994; Ip et al., 2002; Wu et al., 2003; Yang et al., 2003; Kuscu et al., 2005; Atalay et al., 2007; Giordano et al., 2008), dok druge nisu (Leake et al., 1989; Beckmann et al., 1991; Runnebaum et al., 1995; Trottier et al., 1995; Anttila et al., 1999; Chen et al., 1999; Quirk et al., 2006).

Uzrok ove različitosti može poticati od veličine uzorka, tehnologije kojom je detektovano prisustvo HPV, kao i etničke pripadnosti. Broj bolesnica u čijim je tumorima analizirano prisustvo HPV u pomenutim studijama varirao je od 12 (Leake et al., 1989) do 98 (Anttila et al., 1999). Metode koje su se koristile za detekciju HPV bile su PCR (Beckmann et al., 1991; Lai et al., 1994; Runnebaum et al., 1995; Trottier et al., 1995; Anttila et al., 1999; Chen et al., 1999; Ip et al., 2002; Quirk et al., 2006; Atalay et al., 2007; Giordano et al., 2008), *in situ* hibridizacija (Wu et al., 2003; Kuscu et al., 2005), Southern blot hibridizacija (Leake et al., 1989, Lai et al., 1992), ili PCR u realnom vremenu (Yang et al., 2003). Tipizacija HPV rađena je PCR metodom (Chen et al., 1999; Ip et al., 2002; Quirk et al., 2006;) i sekvenciranjem (Atalay et al., 2007).

U ovom radu prisustvo HPV infekcije nađeno je u 7,4% ispitivanih karcinomom jajnika (n=54). U svim HPV inficiranim tumorima detektovano je prisustvo HPV16 tipa. Istim metodološkim pristupom jedna studija u Turskoj je u uzorku od 94 karcinoma jajnika HPV detektovala u 8,5% slučajeva, od čega u 6,4% je bila prisutna infekcija sa HPV16, a u 2,1% sa HPV33 (Atalay et al., 2007). Nasuprot, studija u Finskoj, u uzorku 98 karcinoma jajnika nije pokazala prisustvo HPV ni u jednom karcinomu jajnika (Anttila et al., 1999).

Neki autori su poredili prisustvo HPV u normalnom ili benigno izmenjenom tkivu jajnika u odnosu na maligno transformisano (Wu et al., 2003; Kuscu et al., 2005). Wu i saradnici (2003) su našli i statistički značajnu razliku u distribuciji HPV16 u benigno izmenjenom u odnosu na maligno tkivo jajnika, što ukazuje na značaj HPV u nastanku malignog fenotipa.

Prisustvo visoko-rizičnih tipova HPV u jednoj studiji nađeno je u seroznom histološkom podtipu i uznapredovalim stadijumima bolesti (FIGO III i IV) (Atalay et al., 2007), dok u drugim nije ustanovljena povezanost visoko-rizičnih HPV sa histoloskim podtipom i/ili stadijumom bolesti (Ip et al., 2002, Wu et al., 2003). U uzorku bolesnica sa karcinomom jajnika u Srbiji HPV su detektovani u dva serozna (FIGO III i FIGO IV), jednom mucinoznom (FIGO III) i jednom endometrioidnom tumoru (FIGO II). HPV infekcija je bila zastupljenija u FIGO III/IV stadijumima u odnosu na FIGO I/II (9,1% vs. 4,8%), kao i u ne-seroznim vs. seroznom histološkom podtipu karcinoma (10,5% vs. 5,7%). Ipak, ove razlika nisu bile statistički značajne.

HPV infekcija je bila zastupljenija u umereno diferentovanim u odnosu na dobro

diferentovane tumore (9,5% vs. 5,3%). Međutim, nijedan od slabo diferentovanih tumora nije bio inficiran sa HPV. Ovo bi moglo da ukazuje da su HPV inficirani tumori povezani sa agresivnijim karakteristikama tumora. Ali, s obzirom na svega četiri HPV inficirana tumora u grupi bolesnica sa karcinomom jajnika, ova ispitivanja treba proširiti na veću grupu karcinoma.

HPV infekcija je bila prisutna skoro duplo više u bolesnica u premenopauzi u odnosu na one u postmenopauzi (11,1% vs. 5,6%). Ipak, ova razlika nije statistički značajna. Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma jajnika u bolesnica sa HPV infekcijom je bila 57 godina, a u bolesnica bez HPV infekcije bila je 59 godina. Ovo ukazuje na ranije javljanje bolesti u HPV inficiranih žena, ali s obzirom na mali broj HPV inficiranih tumora ne možemo izvesti ovakav zaključak.

Pored nerazjašnjene povezanosti prisustva HPV u seroznim vs. ostalim histološkim podtipovima karcinoma jajnika, uznapredovalim vs. lokalizovanoj bolesti itd., postavlja se i pitanje prenosa HPV u tkivo jajnika. Postoji više pretpostavki o tome kako HPV dospevaju u jajnik. Kako se endometrijum i jajovodi nastavljaju sa kanalom grlića materice, pretpostavlja se da je ovo jedan od puteva prenosa, kao i da je infekcija olakšana narušavanjem korteksa jajnika tokom ovulacije. Uočeno je da spermatozoidi mogu da vezuju HPV i absorbuju virusnu DNK (Pérez-Andino et al., 2009; Chan et al., 1996), te se smatra da oni na svom putu ka peritonealnoj duplji i jajnicima mogu da budu prenosioci infekcije. Neki nalazi ukazuju da HPV mogu da se prenose i putem mononuklearnih ćelija krvi (Bodaghi et al., 2005b).

Iz svega navedenog vidi se da je ovo je polje koje zahteva dalja istraživanja na velikom broju uzoraka i u populacijama različite etničke pripadnosti.

5.8. UTICAJ MUTACIJA *TP53* GENA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA RADIOTERAPIJU KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

Radikalna histerektomija sa disekcijom pelvičnih limfnih čvorova je uobičajeni hirurški zahvat kod karcinoma grlića materice. Postoperativna radioterapija i hemioterapija derivatima platine sprovodi se u FIGO stadijumima IA2 do IIA ako je u momentu primarne hirurške intervencije prisutna neka od visoko-rizičnih odlika za dalji tok bolesti (pozitivnost limfnih čvorova, tumor veći od 4cm u prečniku, visokogradusni tumori G3 i G4, invazija krvnih i limfnih sudova itd.). Za više FIGO stadijume pomenuta postoperativna terapija je obavezna.

Rezistentnost na radioterapiju je jedan od glavnih problema daljeg toka bolesti. Tumori iste histološke grupe i stadijuma razvoja su nekada veoma različiti u odgovoru na radioterapiju. Apoptoza je osnovni mehanizam mnogih terapijskih pristupa, uključujući zračenje. Putem oligonukleotidne i cDNK *microarray* tehnologije su identifikovani geni koji pokazuju različitu bazalnu ekspresiju (povećanu/smanjenu) u ćelijskim linijama karcinoma grlića materice u poređenju sa normalnim tkivom grlića materice. Proteinski

produkti mnogih od ovih gena pozitivno ili negativno utiču na apoptozu (Liu SS et al., 2003).

U velikom broju različitih tipova tumora prisustvo mutacija u *TP53* genu je vezano za rezistenciju na radioterapiju. U karcinomima grlića materice rezultati su kontroverzni. Lu i Feki (2006) su sumirali rezultate različitih studija u periodu od 1991. do 2004. godine pretraživanjem *Medline* baze podataka, podataka WHO, i podataka *TP53* IARC baze podataka (prikazano u Tabeli 11). U pet od osam radova je pokazano da je prisustvo p53 povezano sa rezistencijom na radioterapiju, dok u ostale tri studije nije uočena veza između p53 i rezistentnosti na radioterapiju.

Table 11. Povezanost promena u sekvenci *TP53* gena sa odgovorom na radioterapiju u karcinomima grlića materice, bazirane na imunohistochemijskim podacima

Reference	Broj bolesnica	Učestalost p53 (%)	p53 i radioterapija
Niibe et al., 1999	21	6,6 (pre RT) 13,9 (posle RT)	povezani
Oka et al., 2000	202	52,1	povezani
Mukherjee et al., 2001	78	34	povezani
Jain et al., 2003	76	53,9	povezani
Rajkumar et al., 1998	40	10	povezani
Ebara et al., 1996	46	63	nema povezanosti
Nakano et al., 1998	64	84,6	nema povezanosti
Hove MG et al., 1999	22	11 sa relapsom 45,5 11 bez relapsa 54,5	nema povezanosti

Podaci osam navedenih studija zasnivaju se na imunohistochemijskoj analizi. Ipak, imunohistochemijska detekcija p53 proteina nije uvek povezana sa prisustvom mutacija u *TP53* genu (odjeljak 5.5). Tako da, ustanovljavanje veze između mutacija u *TP53* genu i odgovora na radioterapiju zahteva kombinaciju imunohistochemijskih analiza i analiza genske sekvence, kao i veći broj studija.

Očekivalo bi se da HPV infekcija u karcinomima grlića materice predstavlja važan faktor u odgovoru na radioterapiju usled inaktivacije p53 proteina delovanjem E6 proteina visoko-rizičnih tipova HPV. Interesantno je da su rezultati nekih radova pokazali da HPV-pozitivne bolesnice sa karcinomom grlića materice imaju statistički značajno duže ukupno preživljavanje (*overall survival* – OS) i preživljavanje bez znakova bolesti (*disease free survival* – DFS) po primljenoj radioterapiji nego HPV-negativne bolesnice (Harima et al., 2002). Riou i saradnici (1990) su utvrdili da HPV- negativne bolesnice sa ranim stadijumima karcinomom grlića materice imaju 2,6 puta viši rizik za pojavu

relapsa i 4,5 puta viši rizik za pojavu udaljenih metastaza u odnosu na HPV-pozitivne bolesnice. Autori su postavili hipotezu da HPV-negativni karcinomi grlića materice predstavljaju biološki različitu grupu tumora sa lošijom prognozom u odnosu na HPV-pozitivne tumore. Tumori bez HPV mogu da sadrže veći broj mutacija u genima koji kodiraju za proteine koji regulišu ćelijski ciklus i da zato budu rezistentni na terapiju. Sa druge strane, u HPV-pozitivnim ćelijskim linijama karcinoma grlića materice, je pokazano da genotoksični tretman dovodi do redukovane ekspresije virusnih E6 i E7 proteina i porasta apoptotskog odgovora (Butz et al., 1996). U skladu sa time, moguće je da radijacija vodi smanjenoj ekspresiji E6/E7 proteina i time smanjenom kapacitetu degradacije p53/Rb proteina, što obezbeđuju HPV-pozitivnim kancerima bolji odgovor na terapiju. I u drugih karcinomima povezanih sa HPV infekcijom, poput karcinoma različitih regija glave i vrata, pokazano je bolje preživljavanje po primljenoj radioterapiji u pacijenata sa HPV-pozitivnim tumorima (Mellin et al., 2000; Lindel et al., 2001).

Studije o povezanosti genotipova kodona 72 *TP53* gena i odgovora na radioterapiju su malobrojne i kontradiktorne. Tako je kod oralnih kancera Arg/Arg genotip povezan sa progresijom bolesti, kraćim OS i DFS (Tu et al., 2008), a u kancera mokraćne bešike Arg/Arg genotip kodona 72 zajedno sa određenim polimorfnim varijantama *MDM2* gena je povezan sa višom stopom preživljavanja po primljenoj hemio-radioterapiju (Shinohara et al., 2009).

Podaci o postoperativnom radioterapijskom tretmanu i toku bolesti bili su dostupni za 29 od 53 bolesnica sa karcinomom grlića materice. U ovom radu nismo pratili povezanost odgovora na radioterapiju u odnosu na potencijalne markere (mutacije u *TP53* genu, polimorfne varijante kodona 72 i HPV infekciju) jer se kod samo dve od 29 bolesnica u periodu praćenja od 5 do 87 meseci (sa medijanom od 44 meseci) javio relaps bolesti. Obe bolesnice sa relapsom su bile Arg/Arg genotipa kodona 72 i HPV-pozitivnih tumora. Jedna je imala promenu u intronu 7 *TP53* gena (g.14394G>A).

5.9. UTICAJ MUTACIJA *TP53* GENA, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE NA ODGOVOR NA HEMIOTERAPIJU KARCINOMA JAJNIKA

Standardna prva linija postoperativne hemioterapije karcinoma jajnika je upotreba platinskih derivata u kombinaciji sa taksanima. Mada se i danas u mnogim zemljama upotrebljava kombinacija platinskih derivata i ciklofosfamida (Piccart et al., 2000). Karcinomi jajnika su inicijalno vrlo senzitivni na hemioterapiju. Nažalost, uprkos senzitivnosti na prvu liniju hemioterapije, relaps bolesti se unutar dve godine javlja u više od 70% slučajeva.

Glavni citotoksični efekat platinskih derivata, koji pripadaju grupi DNK oštećujućih agenasa, se ostvaruje indukcijom p53 zavisne apoptoze. Zbog toga je za dobar terapijski odgovor na platinske derivate bitan wt *TP53* gen. Taksani pripadaju grupi antitubulinskih

agenasa, koji se vezuju i stabilizuju polimerizovane mikrotubule i blokiraju deobu ćelija sprečavanjem formiranja mitotičkog vretena. Ovo vodi blokadi prelaska iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa i apoptozi (i to kako p53 zavisnoj, tako i p53 nezavisnoj). Kada je *TP53* mutiran, pojačana je ekspresija MAP4 (koji je transkripciono reprimiran putem wt p53), polimerizacija mikrotubula i vezivanje taksana. Zato tumori jajnika sa mutiranim *TP53* pokazuju znatno bolji terapijski odgovor na taksane od tumora sa wt *TP53*.

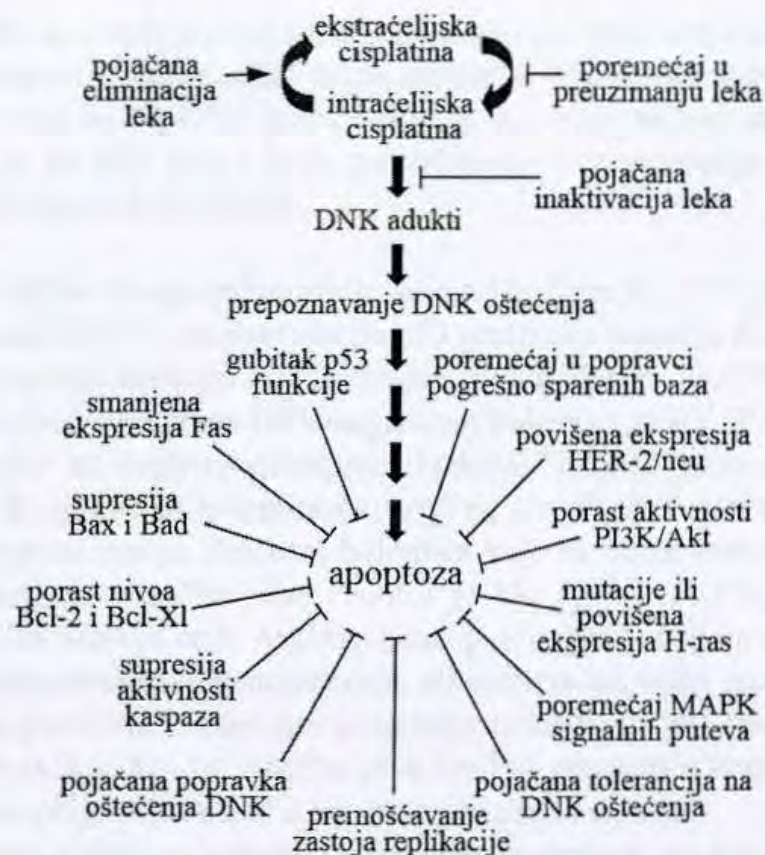
Međutim, iako bi *TP53* status trebalo da bude dobar prediktor terapijskog odgovora na platinske i/ili taksanima bazirane derivate, veza između mutacionog statusa *TP53* gena i odgovora na platin-taksansku hemioterapiju nije razjašnjena. Pored toga, hemioterapijskom odgovoru na pomenute agense doprinosi i niz drugih faktora.

Pokazano je da 83% pacijentkinja sa karcinomom jajnika sa mutacijom u *TP53* genu ne odgovara na platinom zasnovanu terapiju, ali i da 16% pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su odgovorile na ovaj vid terapije ima mutaciju u *TP53* genu (Kigawa et al., 2001).

Pored mutacija u *TP53* genu, p53 funkcija može da bude narušena amplifikacijom *MDM2* gena, delecijom gena za P14^{ARF} itd. p53 signalni putevi mogu da budu narušeni i promenama u genima nizvodno od *TP53*. Takođe, u nedostatku p53 funkcije, p73 može da indukuje apoptozu u ćelijama izloženim cisplatinu (Siddik, 2003).

Rezistenciji na cisplatinu, pored gubitka p53 funkcije, doprinosi redukcija unošenja cisplatine u ćeliju, pojačana inaktivacija cisplatine, gubitak prepoznavanja DNK adukata, pojačana popravka DNK adukata, prekomerna ekspresija *BCL-2*, interferencija sa aktivacijom kaspaza itd (Slika 25). Danas, je čak pokazano da tumorske ćelije izložene cisplatinu (zavisno od doze cisplatine i energetske i metaboličkih uslova u ćeliji) mogu umirati i nekrozom (Gonzalez et. al., 2001), koja ima različite morfološke i biohemijske karakteristike u odnosu na apoptozu. Takođe, i za druge DNK oštećujuće agense koji svoje terapijsko delovanje ostvaruju putem p53 zavisne apoptoze (kao sto su npr. ciklofosfamidi), važi da *TP53* status nije siguran pokazatelj terapijskog odgovora.

Pored wt *TP53* gena, rezistenciji na paklitaksel doprinosi amplifikacija i/ili prekomerna ekspresija *MDR* gena koji kodira za p glikoproteinsku pumpu koja je odgovorna za izbacivanje leka iz citoplazme (Coukos et al., 1998); izmena u strukturi beta-tubulina; prekomerna ekspresija antiapoptotskih gena koji doprinose preživljavanju ćelija sa oštećenjima (Zhang et al., 1999) itd.



Slika 25. Mehanizmi koji su uključeni u inhibiciju apoptotskih signala u cisplatinarezistentnim tumorskim ćelijama (modifikovano prema Siddik, 2003).

Kako infekcija visoko-rizičnim tipovima HPV vodi degradaciji p53 proteina, a u ispitivanom uzorku su svi HPV-inficirani karcinomi jajnika bili HPV16-pozitivni, da bismo pratili efekat mutacija u *TP53* genu na odgovor na cisplatin-taksansku hemioterapiju uzeli smo u razmatranje samo bolesnice čiji su tumori bili bez prisustva HPV. Među HPV-negativnim bolesnicama, sve bolesnice sa mutacijama u *TP53* genu su imale kompletan ili parcijalan odgovor na hemioterapiju, dok je u grupi bolesnica bez mutacija u *TP53* genu njih 82,4% parcijalno ili kompletno odgovorilo na hemioterapiju. Kompletan odgovor je imalo 80,0% bolesnica sa mutacijama i 47,1% bolesnica bez mutacija u *TP53* genu. Ovo ukazuje da su mutacije u *TP53* genu potencijalno povezane sa boljom regresijom bolesti po primljenoj platin-taksanskoj hemioterapiji. Kako razlika u RR i CR između ove dve grupe bolesnica (mutirane vs. wt *TP53*) nije bila statistički značajna i kako se radilo o relativno malom uzorku (5 vs. 17 bolesnica) ove rezultate treba uzeti preliminarno. Vreme bez progresije bolesti nije se značajno razlikovalo u bolesnica sa mutacijama u odnosu na one bez mutacija u *TP53* genu. Medijane vremena do pojave progresije bolesti bile su 18 vs. 17 meseci.

Rezultati jedne Italijanske studije su u grupi od 48 bolesnica sa karcinomom jajnika, takođe, pokazali da je veći procenat bolesnica sa mutiranim *TP53* odgovorilo na cisplatin-taksansku hemioterapiju u odnosu na bolesnice sa wt *TP53* i ovaj procenat je bio sličan našim rezultatima (86,0% vs. 47,0%). Analiza ukupnog preživljavanja nije

pokazala statistički značajnu razliku između bolesnica sa mutiranim i wt *TP53* (Lavarino et al., 2000). Nasuprot tome, rezultati druge studije na 46 seroznih karcinoma jajnika su pokazali da bolesnice sa wt *TP53* imaju bolji CR u odnosu na one sa mutiranim *TP53* genom (90,0% vs. 60,8%), kao i bolje preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje (Gadducci et al., 2006).

Da bismo pratili efekat uticaja polimorfni varijanti kodona 72 *TP53* gena nezavisno od potencijalnog uticaja HPV16 na degradaciju p53 proteina i mutacija u *TP53* genu koje u Arg alela mogu pojačati tumorski rast za razliku od Arg alela sa wt *TP53* koje inhibiraju tumorski rast, odabrali smo grupu HPV-negativnih bolesnica sa wt *TP53* genom. U ovoj grupi sve bolesnice sa Arg/Arg genotipom kodona 72 *TP53* gena su odgovorile na hemioterapiju, dok je u grupi bolesnica sa Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom njih 72,7% odgovorilo na hemioterapiju. Procenat bolesnica koje su imale kompletan odgovor sa Arg/Arg genotipom vs. Arg/Pro plus Pro/Pro je bio sličan (50,0% vs. 45,4%). Ovi rezultati bi mogli da ukazuju da je Arg/Arg genotip povezan sa boljom regresijom bolesti po primljenoj platin-taksanskoj hemioterapiji, ali obzirom na malu grupu (6 vs. 11) ova istraživanja treba proširiti. Vreme bez progresije bolesti nije se značajno razlikovalo između bolesnica sa Arg/Arg vs. Arg/Pro plus Pro/Pro genotipom kodona 72. Medijana vremena do pojave progresije bolesti u obe grupe bila je 17 meseci.

Gadducci i saradnici (2006) su pokazali da Pro/Pro homozigoti u odnosu na heterozigote imaju bolji kompletan odgovor (87,5% vs. 25,0%) i da Pro homozigoti u odnosu na Arg homozigote imaju bolje preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje. Međutim, u odnosu na prognozu i odgovor na cisplatin-paklitaksel baziranu hemioterapiju, neki autori su pokazali da je Arg/Arg genotip povezan sa boljom prognozom od Arg/Pro ili Pro/Pro genotipa kodona 72 *TP53* gena verovatno u skladu sa višom indukcijom apoptoze (Santos et al., 2006a). U skladu sa time su i rezultati koji pokazuju da bolesnice sa karcinomom jajnika sa Pro/Pro genotipom imaju smanjeno ukupno preživljavanje u odnosu na bolesnice sa jednim ili dva Arg alela (Galic et al., 2007). I u ostalim tumorskim lokacijama poput kancera dojke (Tommiska et al., 2005; Xu et al., 2008), pluća (Sreeja et al., 2008; Boldrini et al., 2008b), glave i vrata (Sullivan et al., 2004) osobe sa Arg 72 p53 varijantom su imale viši stepen tumorskog odgovora i/ili bolje preživljavanje posle primljene hemioterapije i/ili radioterapije.

U grupu bolesnica bez mutacija u *TP53* genu 82,4% bolesnica bez HPV infekcije i 50% bolesnice čiji tumori su bili inficirani HPV je odgovorilo na hemioterapiju. Procenat bolesnica bez i sa HPV infekcijom koje su imale kompletan odgovor je bio sličan (47,0% vs. 50,0%). I ovde se radilo o malom uzorku (17 vs. 4), pa eventualni negativan uticaj HPV infekcije na odgovor na cisplatin-taksansku terapiju treba dalje ispitivati. Vreme bez progresije bolesti nije se značajno razlikovalo između bolesnica sa HPV infekcijom u odnosu na one bez HPV infekcije. Medijane vremena do pojave progresije bolesti bile su 18,5 vs. 17 meseci.

S obzirom da se RR razlikuje u bolesnica sa *TP53* mutacijama vs. *TP53* wt, Arg/Arg vs. Arg/Pro plus Pro/Pro genotip kodona 72 i odsustvo HPV infekcije vs. prisustvo HPV

infekcije, ali da se PFI u odnosu na ove parametre ne razlikuju, to bi značilo da su pomenuti biomarkeri povezani sa boljim inicijalnim odgovorom na platin-taksansku hemioterapiju ali da se ovaj efekat sa vremenom gubi.

Ako bi se ispitivanjem uzorka šireg obima ustanovilo da je neki od ovih markera prediktor dobrog odgovora na platin-taksansku hemioterapiju, njihovim testiranjem mogli bismo da izdvojimo podgrupe bolesnica u odnosu na ove biomarkere i da individualizujemo terapijski pristup.

Treba imati u vidu da danas u skladu sa poznavanjem modela tumorogeneze jajnika, testiranjem i drugih genskih promena, poput *KRAS* mutacija, treba eventualno uvoditi i druge antikancerske lekove koji blokiraju specifične signalne puteve (poput npr. farnezil-transferaznih inhibitora koji blokiraju *KRAS* signalne puteve itd.) čija evaluacija zahteva nova istraživanja.

5.10. POVEZANOST IZMEĐU MUTACIJA U *TP53* GENU, POLIMORFNIH VARIJANTI KODONA 72 I HPV INFEKCIJE

Povezanost između *TP53* mutacija i polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena nije razjašnjena. Rezultati različitih studija se razlikuju i ukazuju da je ova povezanost možda tkivno-specifična. Neki radovi ukazuju da su mutacije u *TP53* genu u seroznim karcinomima jajnika više zastupljene u okviru Arg/Arg u odnosu na Arg/Pro i Pro/Pro genotip kodona 72 (Gadducci et al., 2006). U drugim radovima detektovano je statistički značajno više mutacija u Pro alelu *TP53* gena u odnosu na Arg alel (Wang et al., 2004). Ova grupa autora ističe da su mutacije u Pro alelu uglavnom delecije, insercije, one koje stvaraju stop kodon ili intronske varijante koje dovode do novih mesta iskrajanja introna. Dakle, promene u sekvenci DNK koje dovode do gubitka ili pojave skraćenog p53 proteina. Takođe je uočeno da je gubitak Arg alela u karcinomima jajnika učestaliji od gubitka Pro alela (Wang et al., 2004).

U ispitivanom uzorku karcinoma jajnika više mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena je bilo zastupljeno u tumorima bolesnica sa Pro/Pro genotipom (40,0%) u odnosu na Arg/Arg i Arg/Pro (12,0% i 4,3%). Od detektovanih mutacija u Pro alelu ispitivanih karcinoma jedna je bila delecija, jedna koja menja značenje kodona i jedna intronska varijanta g.14394G>A u intronu 7. Kako zastupljenost *TP53* mutacija nije statistički značajno viša u Pro/Pro genotipa, to bi značilo da Pro/Pro genotip predstavlja nezavistan faktor koji doprinosi agresivnijem fenotipu karcinoma jajnika, ali s obzirom da se radilo o malom broju mutacija (n=6) u ispitivanom uzorku od 54 bolesnice, ovu tvrdnju treba uzeti preliminarno.

Nedostatak podataka u literaturi o vezi između mutacija u *TP53* genu i polimorfnih varijanti kodona 72 u karcinomima grlića materice je verovatno posledica malog broja *TP53* mutacija u ovim tumorima. U ispitivanom uzorku karcinoma grlića materice, u samo jednom tumoru detektovali smo egzonsku mutaciju u *TP53* genu koja menja značenje kodona, zajedno sa intronskom varijantom koja za posledicu ima novo mesta

iskrajanja introna i u tri tumora intronske varijante čiji uticaj na ekspresiju *TP53* gena, i eventualno funkciju p53 proteina nije poznat, te nismo ispitivali povezanost mutacija u *TP53* genu sa polimorfnim varijantama kodona 72, kao ni HPV infekcijom.

Podaci o vezi između mutacija u *TP53* genu i prisustva HPV infekcije su kontroverzni. Neki autori ukazuju da je statistički značajno viši procenat *TP53* mutacija zastupljen u HPV-negativnim karcinomima grlića materice (Helland et al., 1998; Harima et al., 2002), dok su drugi mutacije u *TP53* genu detektovali u statistički značajno većem procentu u tumorima koji su bili zaraženi sa HPV (Ishikawa et al., 2001). Postavlja se pitanje da li je u ćelijama u kojima je detektovana HPV DNK i mutacije u *TP53* genu inicijalni događaj pojava *TP53* mutacija ili infekcija HPV. U svakom slučaju, u HPV inficiranih tumora mutacije u *TP53* genu mogu dati prednost u proliferaciji i sticanju metastatskog potencijala (Crook et al., 1992) i doprinositi agresivnijem fenotipu ovih karcinoma (Kozomora et al., 2007).

HPV infekciju nismo detektovali ni u jednom od ispitivanih karcinoma jajnika koji su imali mutacije u *TP53* genu. Nedostatak podataka o vezi između HPV infekcije i *TP53* mutacija u karcinomima jajnika je verovatno posledica činjenice da je HPV infekcija u ovim karcinomima retka i da se tek poslednjih godina dovodi u eventualnu vezu sa nastankom ovih karcinoma.

Povezanost polimorfizma kodona 72 *TP53* gena i infekcije HPV je slabo izučavana. U ispitivanoj grupi bolesnica sa karcinomom grlića materice sa Arg/Arg genotipom kodona 72 približan procenat je bio onih koje su bile inficirani sa HPV u odnosu na one bez HPV infekcije (66,7% vs. 61,1%). Slično je i za Arg/Pro i Pro/Pro genotip (30,0% vs. 38,9% i 3,3% vs. 0%). Međutim, višestruku HPV infekciju (HPV16 plus HPV18) smo detektovali samo u karcinomima bolesnica sa Arg/Arg genotipom. Wong i saradnici (2000) nisu utvrdili povezanost *TP53* polimorfizma kodona 72 ni sa jednim od tipova HPV.

U ispitivanoj grupi bolesnica sa karcinomima jajnika HPV-pozitivni tumori su bili prisutni u 8,0% bolesnica sa Arg/Arg genotipom i 8,7% bolesnice sa Arg/Pro genotipom kodona 72 *TP53* gena. U nijednom od tumora sa Pro/Pro genotipom nije bila prisutna HPV infekcija. Ovde se radilo o jako malom broju HPV inficiranih tumora (n=4), pa statistička povezanost između HPV infekcije i polimorfnih varijanti kodona 72 *TP53* gena nije ispitivana. Međutim, u studiji Li i saradnika (2002) nađena je statistički značajna razlika u raspodeli Arg/Arg homozigota u HPV-pozitivnim u odnosu na HPV-negativne karcinome jajnika.

Ispitivanje biomarkera zauzima važno mesto u molekularnoj onkologiji. Definisanje biomarkera, karakterističnih za određene vrste kancera, značajno je za ranu detekciju bolesti i/ili adekvatnije praćenje i individualni terapijski pristup obolelim osobama. Biološki procesi koji dovode do neoplastične transformacije su veoma složeni, mogu da budu tkivno-specifični i uključuju interakciju velikog broja biomarkera, zbog čega je neophodno ispitivanje velikog broja genetičkih markera i njihove međusobne povezanosti u svakoj specifičnoj vrsti kancera.

6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata doktorske disertacije možemo da iznesemo sledeće zaključke:

- Učestalost mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u karcinomima grlića materice je 1,9%, što je u skladu sa podacima iz literature.
- Učestalost mutacija u egzonima 4-8 *TP53* gena u karcinomima jajnika je 11,1%, što se delimično može objasniti modelom tumorigeneze jajnika. Polovina detektovanih mutacija u *TP53* genu u karcinomima jajnika su tipa delecija.
- U 2,8% ispitivanih karcinoma detektovana je g.14394G>A varijanta u intronu 7 koja je prvi put otkrivena u ovom radu i potencijalan je polimorfizam karakterističan za našu populaciju.
- U karcinomima jajnika mutacije u *TP53* genu nisu statistički značajno povezane sa kliničko-histopatološkim karakteristikama tumora, kao ni karakteristikama bolesnica, ali je uočena viša zastupljenost *TP53* mutacija u karcinomima ne-seroznih u odnosu na serozni podtip, kao i u žena u premenopauzi u odnosu na one u postmenopauzi.
- Učestalost Arg alela *TP53* gena je viša u bolesnica sa karcinomima grlića materice (80,2%) nego u kontrolnoj grupi (77,4%). Vrednosti OR ukazuju da su nosioci Arg alela kodona 72 *TP53* gena u povišenom riziku za nastanak karcinoma grlića materice.
- Uočena je tendencija više zastupljenosti Arg/Arg genotipa od dobro ka slabo diferentovanim tumorima. Arg/Arg genotip pokazuje tendenciju ranijeg javljanja bolesti.
- Učestalost Pro alela *TP53* je viša u bolesnica sa karcinomima jajnika (32,4%) nego u kontrolnoj grupi (22,6%). Vrednosti OR pokazuju da su nosioci Pro alela u višem riziku za nastanak karcinoma jajnika.
- Pro/Pro genotip je statistički značajno povezan sa dediferentovanim tumorima i sa ne-seroznim histološkim podtipovima. Pro alel pokazuje tendenciju ranijeg javljanja bolesti.
- Učestalost HPV infekcije u karcinomima grlića materice je bila 62,5% (od čega je 58,3% tumora bilo inficirano sa HPV16, a 16,7% sa HPV18). Višestruka infekcija (HPV16 plus HPV18) bila je zastupljena u 14,6% karcinoma.
- Učestalost HPV infekcije u karcinomima jajnika bila je 7,4%. Svi HPV-pozitivni tumori bili su HPV16 tipa.
- HPV infekcija u karcinomima grlića materice je zastupljenija u dobro i umereno diferentovanim tumorima, a u karcinomima jajnika u uznapredovalim stadijumima bolesti. Odsustvo HPV infekcije pokazuje tendenciju ranijeg javljanja karcinoma grlića materice, dok je kod karcinoma jajnika suprotno.
- Dve bolesnice sa relapsom karcinoma grlića materice su bile Arg/Arg genotipa kodona 72 i HPV-pozitivnih tumora. Jedna je imala promenu u intronu 7 *TP53* gena (g.14394G>A).
- Bolesnice sa mutacijama u *TP53* genu, Arg/Arg genotipom kodona 72 i

- odsustvom HPV infekcije pokazuju bolji inicijalni odgovor na platin-taksansku hemioterapiju, mada se ovaj efekat sa vremenom gubi.
- Međusobna povezanost mutacija u *TP53* genu, polimorfnih varijanti kodona 72 i HPV infekcije nije utvrđena, izuzev višestruke infekcije koja je bila prisutna samo u okviru Arg/Arg genotipa. Ipak, postoji tendencija javljanja mutacija u Pro/Pro genotipa u karcinomima jajnika.

Opšti zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju da je na osnovu *TP53* genskog statusa i prisustva/odsustva HPV infekcije moguće izdvojiti podgrupe žena koje imaju viši rizik za nastanak karcinoma grlića materice/jajnika, pojavu agresivnijeg fenotipa i bolji inicijalni odgovor na antikancersku terapiju. To bi doprinelo ranijem otkrivanju bolesti i/ili adekvatnijem praćenju bolesnica, kao i individualnom terapijskom pristupu.

LITERATURA

- Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:502-16. Review.
- Agorastos T, Masouridou S, Lambropoulos AF, Chrisafi S, Miliaras D, Pantazis K, et al. P53 codon 72 polymorphism and correlation with ovarian and endometrial cancer in Greek women. *Eur J Cancer Prev*. 2004; 13:277-80.
- Al Moustafa AE. Involvement of human papillomavirus infections in prostate cancer progression. *Med Hypotheses*. 2008; 71:209-11.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell, Chapter 24: Cancer, Third edition, Garland Publishing Inc., New York – London, 1994.
- Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvärd C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2001; 37:246-50.
- Angelopoulou K, Levesque MA, Katsaros D, Shipman R, Diamandis EP. Exon 5 of the p53 gene is a target for deletions in ovarian cancer. *Clin Chem*. 1998; 44:72-7.
- Antila T, Saikku P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I, Jellum E, et al. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk of development of cervical squamous carcinoma. *JAMA*. 2001; 285:47-51.
- Anttila M, Syrjänen S, Ji H, Saarikoski S, Syrjänen K. Failure to demonstrate human papillomavirus DNA in epithelial ovarian cancer by general primer PCR. *Gynecol Oncol*. 1999; 72:337-41.
- Aoki MN, da Silva do Amaral Herrera AC, Amarante MK, do Val Carneiro JL, Fungaro MH, Watanabe MA. CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development. *Int J Mol Med*. 2009; 23:429-35.
- Arroyo M, Raychaudhuri P. Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20:5947-54.
- Atalay F, Taskiran C, Taner MZ, Pak I, Or M, Tuncer S. Detection of human papillomavirus DNA and genotyping in patients with epithelial ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007; 33:823-8.
- Bai L, Zhu W-G. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol* 2006; 2:141-153. Review.
- Bálint EE, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer*. 2001; 85:1813-23.
- Barghi MR, Hajimohammadmehdiarbab A, Moghaddam SM, Kazemi B. Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma. *BMC Infect Dis*. 2005; 5:102.
- Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 1994; 44:266-70.

- Beckmann AM, Sherman KJ, Saran L, Weiss NS. Genital-type human papillomavirus infection is not associated with surface epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1991; 43:247-51.
- Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol.* 2005; 18 Suppl 2:S19-32. Review.
- Bergman J. The Functions of Introns: From Junk DNA to Designed DNA. *Perspectives on Science and Christian Faith* 2001; 53:170-8.
- Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol.* 2005b; 43:5428-34.
- Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Da Costa M, Palefsky JM, Zheng ZM. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005a; 11:2862-7.
- Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:793-805. Review.
- Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, Fontanini G. Prognostic impact of p53 Pro72 homozygous genotype in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep.* 2008b; 19:771-3.
- Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, et al. Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. *Cancer Invest* 2008a; 26:168-72.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:796-802.
- Bosch FX, Muñoz N. The virus etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 2002; 89:183-90. Review.
- Bremer GL, Tieboschb AT, van der Putten HW, de Haan J, Arends JW. p53 tumor suppressor gene protein expression in cervical cancer: relationship to prognosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995; 63:55-9
- Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:68-76. Review.
- Burd ME. Human papillomavirus and cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:1-17. Review.
- Busmanis I. Biomarkers in carcinoma of the cervix: emphasis on tissue-related factors and their potential prognostic factors. *Ann Acad Med Singapore.* 1998; 27:671-5. Review.
- Butz K, Geisen C, Ullmann A, Spitkovsky D, Hoppe-Seyler F. Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis. *Int J Cancer.* 1996; 68:506-13.
- Buyru N, Altinisik J, Isin M, Dalay N. p53 codon 72 polymorphism and HPV status in lung cancer. *Med Sci Monit.* 2008; 14:CR493-7.
- Buyru N, Tezol A, Dalay N. p53 intronic G13964C variant in colon cancer and its association with HPV. *Anticancer Res.* 2005; 25:2767-9.
- Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep.* 2003; 10:711-4.

- Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ, Daskalogianni C, Maslon MM, Naski N, et al. p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:1098-105.
- Castellsaqué X, Bosh FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002; 89:191-9. Review.
- Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene.* 1998; 16:311-20.
- Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH, King A. Evidence for ease of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1996; 13:516-9.
- Chen M, Popescu N, Woodworth C, Berneman Z, Corbellino M, Lusso P, et al. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol.* 1994; 68:1173-8.
- Chen TR, Chan PJ, Seraj IM, King A. Absence of human papillomavirus E6-E7 transforming genes from HPV 16 and 18 in malignant ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1999; 72:180-2.
- Chen YC, Xu L, Guo YL, Su HJ, Hsueh YM, Smith TJ, et al. Genetic polymorphism in p53 codon 72 and skin cancer in southwestern Taiwan. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2003; 38:201-11.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005; 366:991-8.
- Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E, Gronenborn AM. High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science.* 1994; 265:386-91.
- Coukos G, Rubin SC. Chemotherapy resistance in ovarian cancer: new molecular perspective. *Obstet Gynecol.* 1998; 91:784-91. Review.
- Crook T, Wrede D, Tidy JA, Mason WP, Evans DJ, Vousden KH. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet.* 1992; 339:1070-3.
- Cvetkovic D. Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 68:1-7. Review.
- Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 84:131-7.
- Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007; 33:569-74.
- Dansonka-Mieszkowska A, Ludwig AH, Kraszewska E, Kupryjańczyk J. Geographical variations in TP53 mutational spectrum in ovarian carcinomas. *Ann Hum Genet.* 2006; 70:594-604.

- De Gaetani C, Ferrari G, Righi E, Bettelli S, Migaldi M, Ferrari P, Trentini GP. Detection of human papillomavirus DNA in urinary bladder carcinoma by in situ hybridisation. *J Clin Pathol*. 1999; 52:103-6.
- de León DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, et al. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer*. 2009; 9:26.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995; 76:1057-62.
- de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7:453-9.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324:17-27. Review.
- Dell G, Gaston K. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58:1923-42. Review.
- Dokianakis DN, Koumantaki E, Billiri K, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Int J Mol Med*. 2000; 5:405-9.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; 352:824-7.
- Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does emperor have no clothes?. *Gynecol Oncol* 1999; 72:437-42. Review.
- Duensing S, Duensing A, Crum CP, Münger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res*. 2001; 61:2356-60.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003; 33:357-65.
- Dumontet C, Sikic BI. Mechanism of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transporter, and cell death. *J Clin Oncol*. 1999; 17:1061-70. Review.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1992; 1:45-9.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997; 71:2449-56.
- Evans MF, Adamson CS, Simmons-Arnold L, Cooper K. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Clin Pathol*. 2005; 5:10.

- Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Benazzouz M, El Kihal L, Afifi R, et al. The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatol Res.* 2007; 37:748-54.
- Fallows S, Price J, Atkinson RJ, Johnston PG, Hickey I, Russell SE. P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J Pathol.* 2001; 194:68-75.
- Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, et al. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *Exp Med.* 1998; 187:487-496.
- Fathalla MF. Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia?. *Lancet.* 1971; 2:163.
- Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 2003; 22:5201-7. Review.
- Feki A, Irminger-Finger I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 52:103-116. Review.
- Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002; 3:11-16. Review.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No.5. version 2.0, IARC Press, Lyon, 2004.
- Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM, et al. Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int J Cancer.* 1999; 82:799-803.
- Flatt PM, Polyak K, Tang LJ, Scatena CD, Westfall MD, Rubinstein LA, et al. p53-dependent expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest. *Cancer Lett.* 2000; 156:63-72.
- Frattoni MG, Laimins LA. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology.* 1994; 204:799-804.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997; 11:2090-100.
- Gadducci A, Di Cristofano C, Zavaglia M, Giusti L, Menicagli M, Cosio S. P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel- plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Res.* 2006; 26:687-93.
- Galic V, Willner J, Wollan M et al. Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46:239-47.
- Garcia-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, González CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer.* 2005; 117:629-37. Review.
- Gatza ML, Chandhasin C, Ducu RI, Marriott SJ. Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation. *Environ Mol Mutagen.* 2005; 45:304-25. Review.

- Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. 2004; 23:1954-6.
- Giordano G, D'Adda T, Gnetti L, Froio E, Merisio C, Melpignano M. Role of human papillomavirus in the development of epithelial ovarian neoplasms in Italian women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008; 34:210-7.
- Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001; 75:1565-70.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Peres JM. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. *Mol Pharmacol*. 2001; 657-63. Review.
- Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, et al. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res*. 2000; 20:2613-6.
- Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpção LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett*. 2004; 210:151-7.
- Grisaru D, Covens A, Chapman B, Shaw P, Colgan T, Murphy J, et al. Does histology influence prognosis in patients with early-stage cervical carcinoma? *Cancer*. 2001; 92:2999-3004.
- Guan X, Lang J, Bian M. Detection and sequence analysis of the p53 gene mutation in epithelial ovarian cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998; 33:165-7.
- Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006; 25:515-21.
- Guppy AE, Rustin GJ. CA125 response: can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer? *Oncologist*. 2002; 7:437-43.
- Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ohnishi T. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 52:1345-51.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. 2003; 116:4077-85.
- Heilmann V, Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Curr Womens Health Rep*. 2002; 2:27-33. Review.
- Helland A, Karlsen F, Due EU, Holm R, Kristensen G, Børresen-Dale A. Mutations in the TP53 gene and protein expression of p53, MDM 2 and p21/WAF-1 in primary cervical carcinomas with no or low human papillomavirus load. *Br J Cancer*. 1998; 78:69-72.
- Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Gordon GB, Longcope C, Bush TL, Hoffman SC et al. Serum gonadotropins and steroid hormones and development of ovarian cancer. *JAMA* 1995; 274:1926-30.
- Hemminki K, Dong C, Vaittinen P. Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component? *Int J Cancer*. 1999; 82:775-81.
- Heng B, Glenn WK, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br J Cancer*. 2009; 101:1345-50.

- Henner WD, Evans AJ, Hough KM, Harris EL, Lowe BA, Beer TM. Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate*. 2001; 49:263-6.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*. 1997; 1:3-11.
- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*. 2002; 89:229-40. Review.
- Høgdall EV, Høgdall CK, Christensen L, Glud E, Blaakaer J, Bock JE. Distribution of p53 codon 72 polymorphisms in ovarian tumour patients and their prognostic significance in ovarian cancer patients. *Anticancer Res*. 2002; 22:1859-64.
- Horn LC, Fischer U, Hänel C, Kuhn H, Raptis G, Bilek K. p53 in surgically treated and pathologically staged cervical cancer: correlation with local tumor progression, but not with lymphatic spread. *Pathol Res Pract*. 2001; 197:605-9.
- Hu W, Feng Z, Atwal GS, Levine AJ. p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle*. 2008; 7:848-52. Review.
- Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21:5817-23.
- Hupp TR, Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol*. 1994; 4:865-75.
- Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, Iftner T. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res*. 2003; 63:7515-9.
- Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J*. 2002; 21:4741-8.
- Institut za javno zdravlje Srbije. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji 2005. Registar za rak u centralnoj Srbiji, Beograd 2009.
- Ip SM, Wong LC, Xu CM, Cheung AN, Tsang PC, Ngan HY. Detection of human papillomavirus DNA in malignant lesions from Chinese women with carcinomas of the upper genital tract. *Gynecol Oncol*. 2002; 87:104-11.
- Ishikawa H, Mitsuhashi N, Sakurai H, Maebayashi K, Niibe H. The effects of p53 status and human papillomavirus infection on the clinical outcome of patients with stage IIIB cervical carcinoma treated with radiation therapy alone. *Cancer*. 2001; 91:80-9.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986; 320:84-5.
- Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao TP. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J*. 2002; 21:6236-45.
- Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*. 2000; 14:3065-73.
- Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004; 85:301-8.

- Jones JS, Chi X, Gu X, Lynch PM, Amos CI, Frazier ML. p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:5845-9.
- Kaelin WG Jr. The p53 gene family. *Oncogene*. 1999; 18:7701-5.
- Katoch B, Sebastian S, Sahdev S, Padh H, Hasnain SE, Begum R. Programmed cell death and its clinical implications. *Indian J Exp Biol*. 2002; 40:513-24. Review.
- Kaufman RH, Bornstein J, Gordon AN, Adam E, Kaplan AL, Adler-Storthz K. Detection of human papillomavirus DNA in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1987; 27:340-9.
- Kazemi M, Salehi Z, Chakosari RJ. TP53 codon 72 polymorphism and breast cancer in northern Iran. *Oncol Res*. 2009; 18:25-30.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57. Review.
- Kesić V, Jovićević-Bekić A, Vujnović M. Cervical cancer screening in Serbia. *Coll Antropol* 2007; 31 Suppl 2:31-6.
- Kigawa J, Sato S, Shimada M, Takahashi M, Itamochi H, Kanamori Y, et al. p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer. *Hum Cell* 2001; 14:165-71. Review.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007; 315:525-8.
- Klug SJ, Rensing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SM et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol*. 2009; 10:772-84.
- Köbel M, Huntsman D, Gilks CB. Critical molecular abnormalities in high-grade serous carcinoma of the ovary. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e22.
- Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13:11-22.
- Kozomara RJ, Brankovic-Magic MV, Jovic NR, Stosic SM, Magic ZM. Prognostic significance of TP53 mutations in oral squamous cell carcinoma with human papilloma virus infection. *Int J Biol Markers*. 2007; 22:252-7.
- Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD, Reid R, Jenson AB, Temple GF, Lorincz AT. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol*. 1988; 159:293-6.
- Kuscu E, Ozdemir BH, Erkanli S, Haberal A. HPV and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005; 26:642-5.
- Lai CH, Hsueh S, Lin CY, Huang MY, You GB, Chang HC, Pao CC. Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. *Int J Gynecol Pathol*. 1992; 11:210-5.
- Lai CH, Wang CY, Lin CY, Pao CC. Detection of human papillomavirus RNA in ovarian and endometrial carcinomas by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest*. 1994; 38:276-80.
- Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol*. 1986; 6:1379-85.

Lancet. 2005; 366:991-8.

Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G, et al. p53 gene status and response to platinum/paclitaxel based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*. 2000; 18:3936-45.

Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer*. 1999; 80:2008-18. Review.

Leake JF, Woodruff JD, Searle C, Daniel R, Shah KV, Currie JL. Human papillomavirus and epithelial ovarian neoplasia. *Gynecol Oncol*. 1989; 34:268-73.

Lee JM, Lee YC, Yang SY, Shi WL, Lee CJ, Luh SP, et al. Genetic polymorphisms of p53 and GSTP1, but not NAT2, are associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*. 2000; 89:458-64.

Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. *Infect Agent Cancer*. 2007; 2:11.

Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect*. 2001; 34:87-91.

Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, Bishop LR, Gumbs AA, Krishnan S, et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res*. 2000; 60:1062-9.

Leitao MM, Soslow RA, Baergen RN, Olvera N, Arroyo C, Boyd J. Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 93:301-306.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*. 1988; 48:5358-62.

Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, et al. p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer*. 2002; 95:2571-6.

Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J Biol Chem*. 2005; 280:24245-51.

Li Y, Qiu LX, Shen XK, Lv XJ, Qian XP, Song Y. A meta-analysis of TP53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk: evidence from 15,857 subjects. *Lung Cancer*. 2009; 66:15-21.

Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001; 92:805-13.

Liu JH, Huang X, Liao GW, Li JD, Li YF, Li MD. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical cancer in Chinese and Australian patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003; 83:748-52.

Liu SS, Yin Cheung AN, Ngan HY. Differential gene expression in cervical cancer cell lines before and after ionizing radiation. *Int J Oncol*. 2003; 22:1091-7.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68:362-72. Review.

Lozano G, Levine AJ. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. *Mol Carcinog*. 1991; 4:3-9.

- Lu X, Feki A. Phenotypic features with p53 alterations related to HPV and prognostic evaluation in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006; 16:708-17.
- Lynch HT, Lemon SJ, Karr B, Franklin B, Lynch JF, Watson P, et al. Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6:987-91.
- Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer*. 2000; 88:698-701.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990; 250:1233-8.
- Mandic A, Vujkov T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Ann Oncol*. 2004; 15:197-200.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*. 2000; 25:47-54.
- Marsh A, Spurdle AB, Turner BC, Fereday S, Thorne H, Pupo GM, et al. The intronic G13964C variant in p53 is not a high-risk mutation in familial breast cancer in Australia. *Breast Cancer Res* 2001; 3:346-9.
- Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol*. 1998; 72:7407-19.
- Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchows Arch*. 1998; 433:103-11. Review.
- Mattick JS. Introns: evolution and function. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4:823-31.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999; 18:7621-36.
- Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357:1579-88.
- Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B, El-Bayoumy K, Hoffmann D, Wang X, Waggoner S. Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett*. 1999; 146:127-34.
- Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*. 2000; 89:300-4.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003; 11:577-90.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995; 80:293-9.
- Modugno F. Ovarian cancer and high-risk women -implication for prevention, screening, and early detection. *Gynecol Oncol* 2003; 91:15-31. Review.

- Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 2003; 1:1001-8. Review.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992; 69:1237-45.
- Monsonogo J, Bosh FX, Coursaget P, Cox JT, Franko E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer.* 2004; 108:329-33.
- Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL, Maruo T. The role of human papilloma virus in molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50:9-19. Review.
- Munirajan AK, Kannan K, Bhuvaramurthy V, Ishida I, Fujinaga K, Tsuchida N, Shanmugam G. The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of uterine cervix from India. *Gynecol Oncol.* 1998; 69:205-9.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518-27.
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001; 7:683-94.
- Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Cheng DK, Ng TY, Wong LC. Abnormal expression of pan-ras, c-myc and tp53 in squamous cell carcinoma of cervix: correlation with HPV and prognosis. *Oncol Rep.* 2001; 8:557-61.
- O'Connor L, Harris AW, Strasser A. CD95 (Fas/APO-1) and p53 signal apoptosis independently in diverse cell types. *Cancer Res.* 2000; 60:1217-20.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000; 288:1053-8.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 2000; 102:849-62.
- Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol.* 2001; 75:5559-66.
- Ojeda JM, Ampuero S, Rojas P, Prado R, Allende JE, Barton SA et al. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer. *Biol Res* 2003; 36:279-83.
- Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ, Namkoong SE. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol.* 1997; 65:121-9.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
- Partridge EE, Barnes MN. Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin.* 1999; 49:297-320.

- Peedicayil A, Abraham P, Sathish N, John S, Shah K, Sridharan G, Gravitt P. Human papillomavirus genotypes associated with cervical neoplasia in India. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:1591-5.
- Pegoraro RJ, Moodley M, Rom L, Chetty R, Moodley J. P53 codon 72 polymorphism and BRCA 1 and 2 mutations in ovarian epithelial malignancies in black South Africans. *Int J Gynecol Cancer*. 2003; 13:444-9.
- Pérez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One*. 2009; 4:e5847.
- Piccart MJ, Du Bois A, Gore ME, Neijt JP, Pecorelli S, Pujade-Lauraine E. A new standard of care for treatment of ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36:10-12.
- Pickel H, Haas J, Lahousen M. Prognostic factors in cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997; 71:209-13.
- Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*. 2006; 25:1602-11. Review.
- Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004; 108:196-9.
- Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat. World Population Prospects: The 2008 Revision. New York: United Nations, 2009.
- Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6:443-51.
- Prendiville W, Davies P. HPV handbook. 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Taylor & Francis, United Kingdom, 2004.
- Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer*. 2008; 122:428-32.
- Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89:868-73.
- Puente XS, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Bertranpetit J, King M-C, López-Otín C. Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes. *BMC Genomics*. 2006; 7:15.
- Quirk JT, Kupinski JM, DiCioccio RA. Analysis of ovarian tumors for the presence of human papillomavirus DNA. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006; 32:202-5.
- Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:2984-97.
- Rezazadeh A, Laber DA, Ghim SJ, Jenson AB, Kloecker G. The role of human papilloma virus in lung cancer: a review of the evidence. *Am J Med Sci*. 2009; 338:64-7. Review.
- Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet*. 1990; 335:1171-4.

- Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 753-63. Review.
- Rodríguez-Burford C, Barnes MN, Oelschlager DK, Myers RB, Talley LI, Partridge EE, Grizzle WE. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) on ovarian carcinoma cell lines: preclinical evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:202-9.
- Roh JW, Kim JW, Park NH, Song YS, Park IA, Park SY, et al. p53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2004; 93:499-505.
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006; 12:440-50. Review.
- Runnebaum IB, Maier S, Tong XW, Rosenthal HE, Möbus VJ, Kieback DG, Kreienberg R. Human papillomavirus integration is not associated with advanced epithelial ovarian cancer in German patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4:573-5.
- Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraei M, Sotoudeh M et al. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. *Int J Cancer*. 2003; 107:113-8.
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E et al. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*. 1997; 15:887-98.
- Salepci T, Yazici H, Dane F, Topuz E, Dalay N, Onat H, et al. Detection of human papillomavirus DNA by polymerase chain reaction and southern blot hybridization in colorectal cancer patients. *J BUON*. 2009; 14:495-9.
- Sandercock J, Parmar MK, Torri V, Qian W. First-line treatment for advanced ovarian cancer: paclitaxel, platinum and the evidence. *Br J Cancer*. 2002; 87:815-24. Review.
- Santos AM, Sousa H, Pinto D et al. Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2006b; 42:958-963.
- Santos AM, Sousa H, Portela C, Pereira D, Pinto D, Catarino R, et al. TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006a; 340:256-62.
- Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*. 2002; 4:842-9.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75:495-505.
- Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecol Oncol*. 2004; 93:49-53.
- Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med*. 2005; 353:2101-4.
- Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol*. 1996; 88:554-9.
- Schuijjer M, Berns EM. TP53 and Ovarian Cancer. *Hum Mutat*. 2003; 21:285-91.

- Sedman J, Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol.* 1998; 72:6893-7.
- Shahmahmoudi S, Mahmoodi M, Azad TM, Rad KS, Tabatabaie H, Sarijlou M, et al. Prevalence of mucosal types of human papillomavirus in skin lesions in north part of Iran. *Cancer Lett.* 2007; 247:72-6.
- Shao Y, Tan W, Zhang S. P53 gene codon 72 polymorphism and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case/control study in a Chinese population. *Dis Esophagus.* 2008; 21:139-43.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 1990; 10:6565-77.
- Shen H, Solari A, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Wang L, et al. P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Rep.* 2004; 11:1115-20.
- Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett.* 2002; 183:123-30.
- Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian Tumorigenesis. A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *Am J Pathol.* 2004; 164:1511-8. Review.
- Shinohara A, Sakano S, Hinoda Y, Nishijima J, Kawai Y, Misumi T. Association of TP53 and MDM2 polymorphisms with survival in bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Cancer Sci.* 2009; 100:2376-82.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22:7265-79. Review.
- Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih IeM. Diverse Tumorigenic Pathways In Ovarian Serous Carcinoma. *Am J Pathol.* 2002; 160:1223-8.
- Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, et al. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model for ovarian carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29:218-24.
- Själänder A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered.* 1996; 46:41-8.
- Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene.* 2004; 23:2809-18. Review.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol.* 2003; 201:1-6.
- Soulitzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett.* 2002; 179:175-83.
- Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA. p53 Codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. *Oral Oncol.* 2001; 37:572-8.

- Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Vasconcelos A, Lopes C, et al. Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev.* 2006; 15:362-6.
- Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med.* 2007; 20:731-41.
- Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:834-42. Review.
- Sreeja L, Syamala V, Raveendran PB, Santhi S, Madhavan J, Ankathil R. p53 Arg72Pro polymorphism predicts survival outcome in lung cancer patients in Indian population. *Cancer Invest.* 2008; 26:41-6.
- Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 1997; 71:50-8.
- Stenner-Liewen F, Reed JC. Apoptosis and cancer: basic mechanisms and therapeutic opportunities in postgenomic era. *Cancer Res.* 2003; 63:263-8.
- Storey A, Thomas M, Kalita A et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393:229-34.
- Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol.* 1995; 69:3185-92.
- Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9:379-86. Review.
- Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2001; 75:4139-49.
- Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiant G, Attard L, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2004; 23:3328-37.
- Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Takei T, Nakazato H, et al. p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in Japanese. *J Biomed Sci.* 2003; 10:430-5.
- Syrjänen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55:721-8. Review.
- Szymańska K, Hainaut P. TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50:231-8. Review.
- Tábora N, Bakkers JM, Quint WG, Massuger LF, Matute JA, Melchers WJ, Ferrera A. Human papillomavirus infection in Honduran women with normal cytology. *Cancer Causes Control.* 2009; 20:1663-70.
- Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene.* 2000; 19:1735-43.
- Tammela J, Odunsi K. Gene expression and prognostic significance in ovarian cancer. *Minerva Ginecol.* 2004; 56:495-502. Review.
- Tavassolli FA, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female

- Genital Organs, Chapter 2. IACR Press, Lyon, 2003.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:1092-100.
- Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2003; 21:307-12. Review.
- Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallila J, et al. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5098-103.
- Trottier AM, Provencher D, Mes-Masson AM, Vauclair R, Coutlée F. Absence of human papillomavirus sequences in ovarian pathologies. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1011-3.
- Tu HF, Chen HW, Kao SY, Lin SC, Liu CJ, Chang KW. MDM2 SNP 309 and p53 codon 72 polymorphisms are associated with the outcome of oral carcinoma patients receiving postoperative irradiation. *Radiother Oncol.* 2008; 87:243-52.
- Ueda M, Terai Y, Kanda K et al. Germline polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 100:173-8.
- Vikhanskaya F, Siddique MM, Kei Lee M, Brogginì M, Sabapathy K. Evaluation of the combined effect of p53 codon 72 polymorphism and hotspot mutations in response to anticancer drugs. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:4348-56.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408:307-10. Review.
- von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infection. *Eur J Cancer.* 2002; 38:2229-42. Review.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:594-604. Review.
- Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1602:47-59. Review.
- Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet.* 2003; 361:2217-25. Review.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189:12-9.
- Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:15335-40.
- Wang Y, Kringen P, Kristensen GB, Holm R, Baekelandt MM, Olivier M, et al. Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Hum Mutat.* 2004; 24:21-34.
- Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang-Claude J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age 50 years. *Pharmacogenetics* 2002; 12:269-72.
- Weissenborn SJ, Funke AM, Hellmich M, Mallmann P, Fuchs PG, Pfister HJ, Wieland U. Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-

- positive women with high-grade cervical lesions are strongly elevated. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2763-7.
- Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapisoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ et al. Analysis of gene expression profile in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:1176-81.
- Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A. Molecular aspect of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002; 16:483-97. Review.
- Whang JD, Lee JH. Molecular Genetics of Gynecologic Cancer. *J Korean Med Sci.* 1997; 12:383-9. Review.
- Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:95-107. Review.
- Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Hampton GM, Wang VW. p53 polymorphism and human papillomavirus infection in Hong Kong women with cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2000; 50:60-3.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:11-22. Review.
- Wu QJ, Guo M, Lu ZM, Li T, Qiao HZ, Ke Y. Detection of human papillomavirus-16 in ovarian malignancy. *Br J Cancer.* 2003; 89:672-5.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993; 7:1126-32.
- Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, et al.. p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94:681-90.
- Xu Y, Yao L, Zhao A, Ouyang T, Li J, Wang T, et al. Effect of p53 codon 72 genotype on breast cancer survival depends on p53 gene status. *Int J Cancer.* 2008; 122:2761-6.
- Yang HJ, Liu VW, Tsang PC, Yip AM, Ng TY, Cheung AN, Ngan HY. Comparison of human papillomavirus DNA levels in gynecological cancers: implication for cancer development. *Tumour Biol.* 2003; 24:310-6.
- Yang W, Zhang Y, Tian X, Ning T, Ke Y. p53 Codon 72 polymorphism and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog.* 2008; 47:100-4.
- Yi SY, Lee WJ. A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:6536-9.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis.* 4th Edition. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1999.
- Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1995; 69:6389-99.
- Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996; 13:2323-30.

- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*. 1999; 18:2892-900.
- Zhang CC, Yang JM, Bash-Babula J, White E, Murphy M, Levine AJ et al. DNK damage increases sensitivity to *Vinca* alkaloids and decrease sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res*. 1999; 59:3663-70.
- Zhang Z, Wang M, Wu D, Wang M, Tong N, Tian Y, Zhang Z. P53 codon 72 polymorphism contributes to breast cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120:509-17.
- Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, et al. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int J Cancer*. 2007; 121:1481-6.
- Zhuo XL, Cai L, Xiang ZL, Zhuo WL, Wang Y, Zhang XY. TP53 codon 72 polymorphism contributes to nasopharyngeal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Arch Med Res*. 2009; 40:299-305.
- Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol*. 1999; 73:6209-19.
- Zoodsma M, Sijmons RH, de Vries EG, van der Zee AG. Familial Cervical Cancer: Case Reports, Review and Clinical Implications. *Heredit Cancer Clin Pract*. 2004; 2: 99-105.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:342-50. Review.
- zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009; 384:260-5.



Прилог 1.

Изјава о ауторству

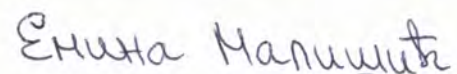
Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Анализа p53 гена и HPV инфекција у карциномима грлића материце и јајника

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 30.12.2013.



Емина Малишић

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Analiza p53 gena i HPV infekcija u karcinomima grlića materice i jajnika

која је моје ауторско дело.

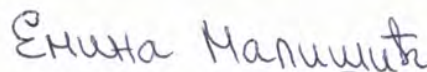
Сагласан сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, 30.12.2013.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.