

Humani papiloma virus i karcinom cerviksa – imunopatogeneza i molekularna dijagnostika

doc. dr. sc. Blaženka Grahovac, Marina Šimat, dipl. ing, prof. dr. sc. Maja Krašević

Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Infekcija humanim papiloma virusima (HPV) ključni je čimbenik u razvoju karcinoma cerviksa. Maligne promjene mogu nastati ako su ispunjeni višestruki uvjeti, koji su definirani virusnim značajkama i imunim odgovorom domaćina. Virusnu komponentu čine genotip virusa i sposobnost virusa da izbjegne imunološki odgovor domaćina, perzistencija infekcije i intenzitet infekcije, a imunogenetička konstitucija pojedinca, stanično posredovani imuni odgovor i utjecaj vanjskih čimbenika kao što su lijekovi i bolesti s imunosupresivnim djelovanjem, definiraju imunopatogenetski doprinos domaćina. Rezultati i doprinos molekularnih studija imunopatogeneze HPV-a očituju se u dva bitna smjera: prevenciji, razvojem profilaktičke i terapijske vakcine koja je već u završnim fazama kliničkih ispitivanja, i uvođenjem molekularne dijagnostike u rutinu, koja je omogućila kvalitativnu i kvantitativnu analizu virusne komponente i genotipizaciju virusa, osiguravajući informacije bitne za procjenu rizika i donošenje odluke o terapijskom postupku

Više od 450.000 novih slučajeva karcinoma cerviksa dijagnosticira se godišnje u svijetu i po broju predstavlja drugi najčešći karcinom u žena. Brojne epidemiološke i molekularne studije su pokazale da je humani papiloma virus (HPV) povezan s nastankom premalignih i malignih lezija cerviksa.

Danas je općeprihvaćeno da je HPV infekcija spolno prenosiva bolest i etiopatogenetski čimbenik karcinoma cerviksa. Porodica HPV-a sadrži više od 150 tipova, od kojih oko 30 inficira anogenitalnu regiju. Najnovije studije su pokazale da se u više od 99,7% pločastih karcinoma cerviksa može dokazati HPV.

Imunopatogeneza HPV infekcije

Papiloma virusi su mali DNA virusi koji inficiraju sluznice i kožni epitel, te uzrokuju hiperproliferacijske lezije. Infekcije uzrokovane papiloma virusima su česte u ljudi i u životinja, i u većini slučajeva infekciju slijedi aktiviranje imunološkog odgovora domaćina. Imuni sustav ima vodeću ulogu u određivanju tijeka HPV infekcije, premda je, poput drugih virusa, HPV razvio mehanizme izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina. Iako je u većini slučajeva imuni sustav sposoban eliminirati infekciju, dugotrajna perzistencija virusa može dovesti do nastanka premalignih i malignih promjena.

Papiloma virusi moduliraju imunološki odgovor domaćina na dva načina: indirektno, putem prirode životnog ciklusa virusa, i direktno, interferencijom s domaćinovim antivirusnim imunim mehanizmima, uključujući interferonski odgovor i staničnu imunost posredovanu HLA antigenima klase I.

Značajke humanog papiloma virusa. HPV pripada porodici *Papillomaviridae*. To je mali virus, sastoji se od dvolančane, kružne DNA (episoma), dužine oko 8000 parova baza, kodirajući samo 8 do 9 gena.

Na temelju homologije genoma (nukleotidnih sekvenci) HPV se dijele u genotipove i varijante. Ako se pojedini izolati HPV razlikuju za više od 10% u L1 regiji, svrstavaju se u zasebne genotipove, a ako se razlikuju od 2 do 10%, svrstavaju se u varijante istog genotipa. Do danas je izolirano više od 150 HPV genotipova, od kojih

je za oko 80 u potpunosti poznat slijed nukleotidnih sekvenci. Osobitost HPV genotipova je da različiti genotipovi inficiraju različite odjeljke epitela i sluznica. Oko 30 genotipova preferencijalno inficira sluznice anogenitalne regije i prema tipu lezija koje uzrokuju dijele se u HPV tipove “visokog rizika” s karcinogenim potencijalom i tipove “niskog rizika” koji uzrokuju benigne bradavice. U više od 90% HPV pozitivnih karcinoma cerviksa dokazano je 5 HPV genotipova: HPV16, HPV18, HPV 31, HPV33 i HPV 45 što ih svrstava u visokorizične genotipova. Ostali tipovi kao što su 35, 51, 52, 56, 58, 59, 68 i 73 nalaze se u karcinomu cerviksa sporadično, također se ubrajaju u HPV visokog rizika, ali epidemiološki ne predstavljaju značajan čimbenik.

HPV je apsolutno ovisan o mehanizmima replikacije stanice domaćina koji su mu potrebni za produktivan životni ciklus. Genom virusa sastoji se od tri grupe gena: geni kontrolne regije (LCR), strukturalni geni L1 i L2, koji kodiraju proteinski zaštitni omotač oko DNA, i nestrukturalni, rani geni (*E-early genes*), koji kodiraju proteine uključene u reguliranje replikacije virusa, kontrole ekspresije gena i interakcije sa staničnim proteinima domaćina (SLIKA 1). Dva rana proteina, E6 i E7 su virusni onkogeni, koji interferiraju u niz staničnih procesa, među kojima su najznačajniji održavanje stanične proliferacije i imortalizacije stanice kao bitni koraci u karcinogenezi.

Životni ciklus humanog papiloma virusa. Epitel je karakterističan po trajnom gubitku diferenciranih, zrelih stanica i obnavljanju novim stanicama iz bazalnog sloja epitela. U tom kontekstu, da bi izbjegao eliminaciju s mrtvim stanicama, HPV se prilagodio dinamici epitelnih stanica inficirajući matične – bazalne epitelne stanice smještene iznad bazalne membrane. Infekcija se najčešće zbiva putem mikrotraume epitela, a dijelom i putem do sada neidentificiranih receptora. Tijekom infekcije bazalnih stanica HPV genom biva prenesen u jezgru, mehanizmima koji nisu poznati. Unutar jezgre HPV genom je smješten ekstrakromosomalno, u formi episoma. Broj genomskih kopija se povećava na 50-100 kopija, koje se dalje repliciraju jednom po staničnoj diobi, koristeći replikacijske mehanizme

stanice domaćina. Za vrijeme dok se zadržava u bazalnom sloju, HPV održava produkciju proteina na minimumu. Uglavnom se očituju E6 i E7 onkoproteini, uz zanemarivu količinu drugih ranih gena. Pomoću E6 i E7 proteina modificira se stanični okoliš s ciljem da pogoduje daljnjoj replikaciji virusa tijekom diferenciranja inficiranih stanica u keratinocite. E5 rani protein povisuje razinu mitogenih faktora koji povećavaju proliferaciju bazalnih stanica. Svrha ovog procesa je povećanje broja inficiranih stanica.

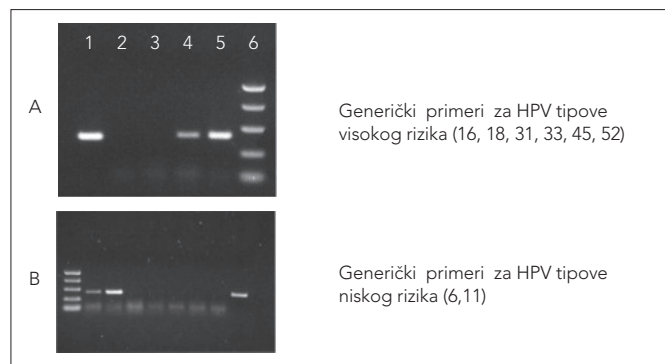
Kada je infekcija sigurno uspostavljena, HPV se širi na površinu epitela gdje se formiraju virioni i otpuštaju u okolinu. Ova zbivanja su potaknuta očitovanjem E1 i E2 proteina. E2 protein suprimira očitovanje onkogenih proteina E6 i E7, što zaustavlja proliferaciju stanica domaćina, omogućava njihovu diferencijaciju u keratinocite i premještanje u suprabazalne epitelne slojeve. Budući da je očitovanje E6 i E7 proteina reducirano, E1 se veže na dugu kontrolnu regiju (LCR) i pobuđuje DNA replikacijske mehanizme u stanici domaćina koji repliciraju HPV genom. Kada inficirani keratinociti dosegnu gornje slojeve epitela, HPV počinje očitovati E4, L1 i L2 proteine koji su potrebni za formiranje viriona. Virusne čestice se proizvode u tisućama kopija i šire neposrednim kontaktom epitela i sluznica na novog domaćina (SLIKA 2).

Molekularne osnove HPV inducirane karcinogeneze. HPV genotipovi visokog rizika (HPV-HR) su potentni induktori stanične proliferacije i imaju sposobnost imortalizacije humanih stanica – čine ih neosjetljivim na mehanizme ograničenja životnog vijeka. Najznačajniji mehanizmi indukcije karcinogeneze posredovane humanim papiloma virusima visokog rizika su interakcija virusnih onkogenih proteina E6 i E7 s tumor supresorskim proteinima p53 i pRB (retinoblastoma protein).

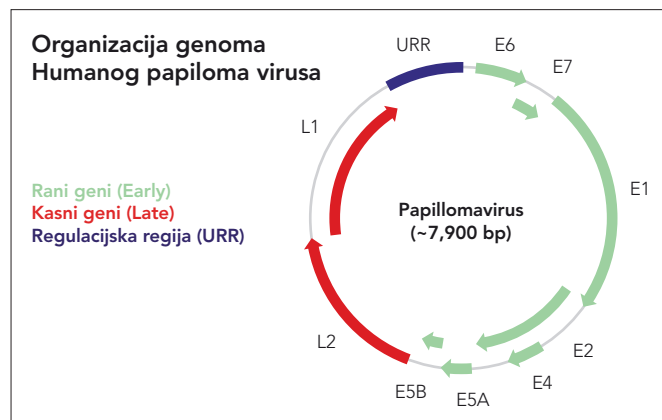
E6 protein HPV-HR stvara kompleks s p53 proteinom i posreduje njegovu razgradnju u proteolitičkom ubikvitinskom ciklusu. P53 je središnji kontrolor procesa staničnog rasta i diobe. Očitovanje p53 aktiviraju procesi stresni za stanice, kao što su DNA oštećenje, hipoksija, niska razina ribonukleozid trifosfata. Povećana ekspresija p53 proteina u stanici inducira dva glavna događanja: zaustavljanje staničnog rasta u G1 fazi staničnog ciklusa (kontrolna točka za popravak DNA) i indukciju apoptoze. Snižena ekspresija p53 proteina čini stanicu neosjetljivom na DNA oštećenja i omogućava takvim stanicama izbjegavanje apoptoze. U velikom broju tumora p53 nalazi se u mutiranom obliku, što ukazuje da promjene u ekspresiji i gubitak funkcije p53 omogućuju replikaciju oštećene DNA, uzrokuju gensku nestabilnost i očitovanje neoplastičnog fenotipa stanica.

E7 proteini HPV-a visokog rizika čine komplekse i u tom obliku interferiraju na putu djelovanja RB proteina. RB gen je član genske porodice koja uključuje P107 i P130. Zajedničko djelovanje proteina ove genske porodice očituje se u supresiji gena koji reguliraju progresiju staničnog ciklusa, staničnu diferencijaciju i apoptozu. Proteini RB porodice su u interakciji s transkripcijskim faktorom E2F koji ima ključnu ulogu u aktivaciji gena potrebnih u DNA replikaciju i stimuliranju ulaza stanice u S fazu staničnog ciklusa (DNA sintezu).

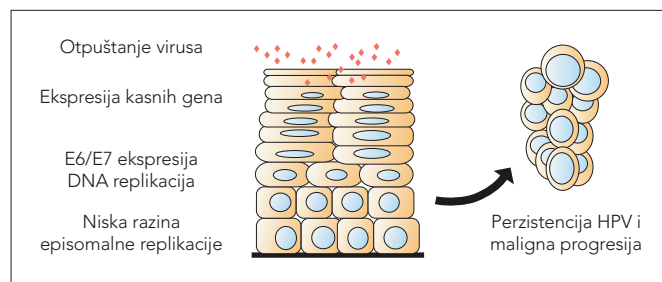
Slika 3. HPV-DNA, probir na visoki i niski rizik; Studija Rijeka 2004.



Slika 1. Shematski prikaz organizacije genoma Humanog papiloma virusa. HPV je apsolutno ovisan o mehanizmima replikacije stanice domaćina koji su mu potrebni za produktivan životni ciklus



Slika 2. Životni ciklus humanog papiloma virusa i mjesto replikacije

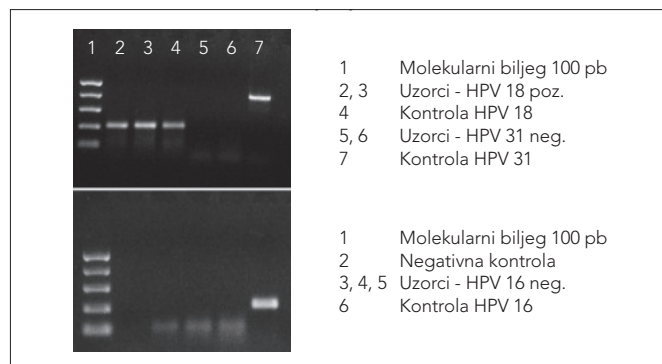


Vežući se na promotore koji imaju afinitet za E2F transkripcijski faktor, RB blokira ekspresiju gena. Kada je RB inaktiviran, npr. kada čini kompleks s E7 proteinom HPV-a, stanice su sklonije ulasku i zaostajanju u S fazi, što stimulira replikaciju DNA, a posredno i proliferaciju stanica.

Pogađajući glavni protutumorski put, E6 i E7 stvaraju nove stanične fenotipove sklone akumulaciji mutacija, otporne na protuproliferacijske signale i sigurnosne stanične mehanizme koji u normalnim uvjetima čuvaju staničnu diobu u precizno određenom redu.

HPV i imunološki odgovor. Imunološki odgovor može se podijeliti na specifični (stečeni) i nespecifični (prirođeni). Prirođeni imunitet osigurava prvi i brzi odgovor na pojavu infekcije. Osnovne komponente prirodnog imuniteta su prirodne zapreke poput epitelnog tkiva, fagociti, stanice ubojice (NK stanice), proteini komplementa, koagulacijskog sustava i citokini. Stečeni imunitet se sastoji od humoral-

Slika 4. Tipizacija HPV-a. Genotip specifična amplifikacija (SSP-PCR); Studija Rijeka 2004



nog i stanično posredovanog imuniteta. B-limfociti stvaranjem protutijela posreduju humoralni imunitet, a T-limfociti su odgovorni za stanično posredovani imunitet.

Sustav tkivne podudarnosti (HLA) ima glavnu ulogu u uspostavljanju imunog odgovora na infekciju. Geni HLA razreda I i II kodiraju proteine receptore, odgovorne za predstavljanje stranih peptida T-staničnim receptorima u procesu imunološkog prepoznavanja. Receptori HLA razreda I se nalaze na stanicama s jezgrom i predstavljaju unutarstanične peptide CD8+T stanicama, dok receptori HLA razreda II se nalaze na specijaliziranim stanicama imunog sustava – antigen prezentirajućim stanicama (APC), makrofagima, dendritičnim stanicama i Langerhansovim stanicama. Ove stanice fagocitiraju proteine. Razgrađuju ih do peptida i predstavljaju CD4+T stanicama putem molekula HLA razreda II. Općenito, i prirodni i stečeni imunološki odgovor se uspostavljaju kao odgovor na virusnu infekciju. Inficirane stanice očituju i izlučuju citokine interferon α i β , koji pripremaju stanice za obranu od virusne infekcije na dva načina. Prvo, stimuliraju povećano očitovanje HLA molekula razreda I koje predstavljaju unutarstanične virusne peptide T-stanicama i na taj način posreduju u uspostavljanju stanično imunološkog odgovora. Drugo, induciraju susjedne stanice na očitovanje brojnih enzima koji će kočiti virusnu replikaciju.

Da bi izbjegli imunološki odgovor, HPV virusi ometaju procese očitovanja molekula HLA razreda I interferirajući najčešće proteinom E5 u ciklus formiranja polipeptidnih lanaca HLA molekule.

Prirodni imunološki odgovor posredovan je NK-stanicama koje prepoznaju i eliminiraju stanice koje nemaju očitovane molekule HLA razreda I. Većina tumora i virusnih infekcija suprimiranjem ekspresije HLA molekula pokušava prikriti svoje djelovanje u zahvaćenoj stanici i funkcija NK stanica, koje stalno cirkuliraju i vrše primarni imunološki nadzor u organizmu domaćina jest da takve stanice eliminiraju.

Stečeni imunitet protiv virusnih infekcija očituje se sintezom protutijela ili citotoksičnih T-limfocita (CTL). Protutijela sprječavaju viruse da uđu u stanice, dok CTL uklanjaju infekciju ubijajući inficiranu stanicu koja izlaže virusni peptid ili tumor specifičan peptid putem molekule HLA razreda I.

Spolno prenosivi virusi poput anogenitalnih HPV-a, da bi se širili i napredovali, trebaju ostati u domaćinu tako dugo dok, tijekom spolnog kontakta, ne inficiraju novog domaćina. U cilju opstanka, HPV je razvio strategiju izbjegavanja imunog sustava, koji se očituje u dva osnovna principa:

1. Cijeli životni ciklus HPV provodi u epitelu. Na taj način nije izložen imunološkim nadzornim stanicama u cirkulaciji i izbjegava humoralni imunološki odgovor.

2. Niskom razinom sinteze virusnih proteina HPV virus održava niski stupanj stimulacije imunog sustava. Dok boravi u donjim slojevima epitela, HPV ograničava pojavljivanje gena koji kodiraju rane proteine E1, E2, E5, E6 i E7. Ovi proteini su uglavnom smješteni u jezgri, i na taj način zaštićeni od nadzora antigen prezentirajućih stanica. Dokazano je da E7 smanjuje stvaranje interferon α i β , što ima za posljedicu reduciranje očitovanja molekula HLA razreda I. Smatra se također da protein E5 interferira sa sazrijevanjem molekula HLA razreda II djelujući na procese razgradnje proteina u peptide i njihovo vezanje s HLA molekulom. Budući da se HPV uklanja lizom stanica u donjim slojevima epitela, kontakt između HPV proteina i antigen prezentirajućih stanica je uglavnom ograničen na fagocitozu umirućih keratinocita. Postoje indicacije da se na taj način, kroz spontanu fagocitozu, može uspostaviti periferna tolerancija na E7 protein.

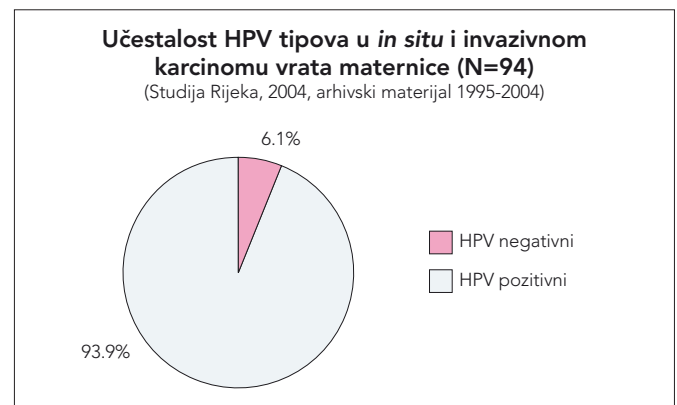
Kada HPV postaje karcinogen? U općoj populaciji HPV infekcija je vrlo proširena, ali to ne znači da će sve žene inficirane s HPV tipovima visokog rizika razviti karcinom cerviksa. Epidemiološke studije su pokazale da će se u oko 1% inficiranih razviti perzistirajuća infekcija, a u vrlo malom broju infekcija će prijeći u premalignu i malignu leziju. Osim HPV-a kao inicijatora karcinogeneze, potrebni su i drugi mehanizmi da bi se u potpunosti razvio maligni fenotip. Brojne studije su pokazale da su ti procesi vrlo kompleksni, da se

treba podudarati nekoliko nezavisnih zbivanja koja će promijeniti normalne tokove staničnog rasta i stanicu skrenuti u maligni proces. Slijed zbivanja koji su do sada naznačeni kao najznačajniji faktori rizika u HPV karcinogenezi su perzistirajuća virusna infekcija, intenzitet virusne infekcije (količina virusa), destabilizaciju genoma stanice domaćina, imunološke značajke domaćina, bolesti s imunokompromitirajućim tijekom, te utjecaji rizičnog ponašanja i okoline, kao opći faktori rizika.

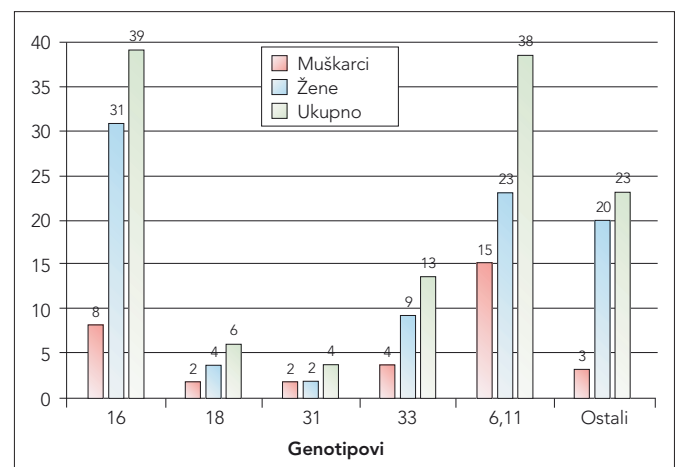
Molekularne analize HPV pozitivnih karcinoma (HPV visokog rizika) i benignih genitalnih bradavica (HPV niskog rizika) pokazale su razlike koje potječu od transformirajućih sposobnosti ovih grupa virusa. U benignim bradavicama i preneoplastičnim lezijama HPV genom se održava u episomalnoj formi (neintegrirana), dok se u karcinomima virusna DNA nalazi uglavnom integrirana u stanični genom domaćina. Ovi nalazi pokazuju da je za malignu transformaciju važna integracija virusne DNA, pri čemu značajnu ulogu imaju HPV visokog rizika. Integracija u kromosome domaćina ne zbiva se u nekoj posebnoj regiji ili kromosomu (virusna DNA je pronađena na različitim kromosomima u karcinomima), ali način integracije je klonalan, što znači da je mjesto integracije virusne DNA u svim stanicama istog tumora identično. To dokazuje da integracija virusne DNA nije slučajni događaj, nego jedan od osnovnih aktivnih pokretača maligne transformacije stanice.

Molekularne analize HPV pozitivnih karcinoma su pokazale da je virusni genom uvijek prekinut na istom mjestu – između E1 i E2 gena. Budući da je regija E2 gena odgovorna za represiju transkripcije onkogena ranih gena E6 i E7, prekidanje regije dovodi

Slika 5. Učestalost HPV-DNA u invazivnom karcinomu vrata maternice; Studija Rijeka, 2004., arhivski materijal



Slika 6. Raspodjela genotipova u skupini HPV pozitivnih ispitanika (n = 123); Poliklinika Virogena Plus, 2004.



do gubitka funkcije E2 gena i nekontrolirane ekspresije E6 i E7 proteina u mitotski aktivnim stanicama domaćina, koje dobivaju selektivnu prednost u preživljavanju i podržavaju virusnu integraciju kao uzročni mehanizam karcinogeneze.

Razvoj cjepiva u prevenciji HPV infekcije. Prevencija HPV infekcije moguća je primjenom cjepiva koja su u posljednjih pet godina u središtu zanimanja epidemiologa i javnog zdravstva. Nekoliko svjetski poznatih farmaceutskih kompanija paralelno razvija cjepivo, koje se uglavnom razlikuje po broju antigena pojedinih virusnih genotipova uključenih u stimulaciju humoralnog imunološkog odgovora. Uglavnom se radi o HPV genotipovima visokog rizika 16 i 18, ili o kombinaciji niskog rizika 6 i 11 i HPV 16 i 18. Osnovu cjepiva čini prazna virusna ovojnica (*virus-like particles*, VLP), koja ne može izazvati infekciju, ali djeluje kao snažan imunogen. Cjepivo se daje u injekciji, u tri doze. Preliminarne kliničke kontrolirane studije cjepiva koje sadrži antigen HPV 16 pokazale su postojanje profilaktičke zaštite tijekom 2 do 3 godine praćenja sudionica u studiji, uz dobru toleranciju cjepiva i dobar humoralni odgovor. Prevencija karcinoma cerviksa putem cijepjenja je sigurno jedno od velikih dostignuća, no primjena se ne može očekivati u vrlo bliskoj budućnosti. Naime, postavlja se nekoliko bitnih pitanja koja prije opće primjene cijepjenja protiv HPV-a treba riješiti:

- Cjepivo je antigen specifično (npr. HPV-16) i pobuđuje antigen specifičan humoralni odgovor. Je li specifičan humoralni odgovor tipa anti-HPV 16 dostatan za zaštitu od infekcije drugim HPV-tipom?
- Ako je cjepivo polivalentno (kombinacija HPV genotipova), je li dovoljno protektivno za pojedinačni genotip?
- Ako je osoba perzistentno inficirana, može li cjepivo djelovati terapeutski?
- Ako su neoplastične lezije prisutne, može li cjepivo pogodovati remisiji lezije?

Sva ova pitanja ukazuju da put do opće primjene cjepiva neće biti brz i da je od posebne važnosti za javno zdravstvo postojanje preventivnih nacionalnih programa za zaštitu ženskog zdravlja, koji se temelje na redovitom kontrolnom probiru citološkim testiranjem (Papa test) i molekularnoj dijagnostici HPV infekcije, koja će identificirati uzročnika neoplastične promjene stanica i na temelju definiranja HPV-genotipova definirati moguće rizike progresije u malignitet.

Molekularna dijagnostika

Saznanje da je HPV glavni etiološki čimbenik gotovo svih karcinoma cerviksa od posebne je važnosti za preventivnu medicinu. Sve je ujednačeniji stav u svijetu da uz citološku dijagnostiku HPV dijagnostika treba biti uključena u preventivni probir na karcinom cerviksa. Dokazivanje HPV-a u citološki nejasnim i neoplastičnim promjenama niskog stupnja trebalo bi pridonijeti postavljanju točnije dijagnoze i pomoći kliničaru u odabiru tipa i intenziteta terapijske skrbi za pacijenta.

Uz potvrđan nalaz o HPV infekciji, važno je utvrditi genotip virusa – radi li se o infekciji s genotipom visokog ili niskog rizika. Testovi koji se rabe u HPV dijagnostici moraju biti visoke specifičnosti i osjetljivosti. Ovako visoke zahtjeve mogu ispuniti dvije metode koje se danas paralelno primjenjuju u svijetu. To su molekularno biološke metode:

1. polimerazna lančana reakcija (PCR) i
2. hibridizacijska metoda -Hybrid capture (HC).

Polimerazna lančana reakcija (PCR). PCR metoda temelji se na umnožavanju dijela DNA molekule pomoću enzima DNA polimeraze. Ciljni dio molekule određuje se izborom začetnika (primera) koji omeđuju budući umnoženi fragment. Izborom začetnika osigurava se specifičnost testa, a osjetljivost se postiže cikličkim umnožavanjem istog fragmenta u prosjeku od 30 do 40 ciklusa. Teoretski od jedne ciljane DNA molekule nakon 35 ciklusa u epruveti se dobiva 2^{35} istovjetnih DNA molekula. Tako se postiže da se od mikro količina DNA materijala (5-10 virusnih genoma) dobije dovoljna količina virusnog DNA materijala koji se može dalje analizirati.

U specijaliziranim laboratorijima za molekularnu dijagnostiku koristi se nekoliko standardiziranih tipova začetnika, koji kao ciljnu regiju za umnožavanje DNA imaju L1, E6 i E7 regije humanog papiloma virusa.

Da bi se u jednom testu mogli teoretski umnožiti gotovo svi HPV genotipovi, koriste se tzv. generički začetnici koji odgovaraju konzerviranom dijelu HPV-genoma u L1 regiji (začetnici MY09/MY11, GP5+/GP6+, SP10). Genotipizacija dobivenog HPV-PCR produkta (amplikona) može se načiniti na nekoliko načina:

1. hibridizacijom genotip specifičnim oligonukleotidom
2. cijepanjem amplikona s restrikcijskim enzimima (RFLP) i
3. umnožavanjem virusne DNA s genotip-specifičnim začetnicima (SSP-PCR).

Ove metode se mogu s jednakim uspjehom primjenjivati, bio početni materijal obrisak cerviksa ili arhivski materijal iz parafinskih kocki. Na **SLIC3** prikazani su rezultati PCR analize uzoraka izoliranih iz parafinskih kocki, umnoženih generičkim začetnicima za HPV genotipove visokog i niskog rizika.

Na **SLIC4** je primjer genotip specifičnog umnožavanja, sa začetnicima specifičnim za HPV genotip 16, 18 i 31.

Metoda hibridizacije (Hybride Capture, HC II). Metoda hibridizacije (*Hybride Capture*, HC) primarno je razvijena za rutinski probir i dokazivanje HPV-a u obriscima cerviksa. To je jedina metoda s licencom Američke agencije za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration* – FDA) koja istovremeno ima standardiziran test i pribor za uzimanje obrisa cerviksa (citočestice i epruvete s transportnim materijalom). Princip HC metode je hibridizacija virusne DNA s kolekcijom RNA proba za HPV visokog rizika (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56) i niskog rizika (6, 11, 42, 43, 44) u tekućem mediju, u formatu mikrotitar pločica. Nastali DNA-RNA hibrid veže se na specifično DNA-RNA antitijelo kojim su obložene jažice mikrotitar pločice (*hybride capture*). Detekcija DNA-RNA hibrida se provodi pomoću sekundarnog antitijela koje prepoznaje kompleks DNA-RNA i koje aktivira detekcijski kompleks alkalne fosfataze i kemiluminiscentnog supstrata. Intenzitet kemiluminiscencije se mjeri pomoću luminometra i intenzitet odgovara količini virusne DNA u uzorku. Prednosti ove metode su standardizacija cijelog postupka, što je važno kada se radi o dijagnostici, i relativno lako izvođenje testa, koji ne zahtijeva osoblje specijalizirano za molekularno-biološke metode. Informacija kliničaru je na razini kako je test deklariran, a to je probir na HPV genotip visokog ili niskog rizika. Ako su zahtjevi kliničara specifičniji, a odluka o terapiji zahtjevnija, kliničar će zatražiti određivanje pojedinačnog HPV genotipa. U tom slučaju genotipizacija se treba provesti jednom od PCR metoda. Nedostaci HCII metode su razina osjetljivosti testa koja je ispod osjetljivosti generičkog PCR-a (niža oko 100 puta) i nemogućnost HPV genotipizacije, koja postaje sve značajnija zbog epidemioloških pokazatelja i izbora optimalnih HPV antigena koji će u budućnosti činiti cjepivo protiv HPV-a.

Prikaz studija o prevalenciji HPV-a. Tijekom 2004. godine napravljene su dvije studije prevalencije HPV u Hrvatskoj. Obje studije koristile su PCR metode generičkog umnožavanja pomoću standardiziranih začetnika, već navedenih u tekstu, a zatim je napravljena HPV genotipizacija pomoću genotip specifičnih začetnika. Oko 30% uzoraka paralelno je genotipizirano i metodom INNO Lipa, firme Innogenetics, koja se temelji na generičkom umnožavanju HPV-DNA i reverznoj hibridizaciji na podlogama na koje su vezane genotip specifične probe.

U studiji Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci analizirani su arhivski uzorci histološki potvrđenih karcinoma cerviksa (54 karcinoma pločastog epitela, prikupljenih od 2001. do 2004. godine i 40 adenokarcinoma prikupljenih od 1995. do 2004. godine). Rezultati su prikazani na **SLIC5**.

Od ukupno 94 analizirana karcinoma u samo 6 nije dokazana HPV-DNA. U 93,9% HPV-pozitivnih (N= 88) karcinoma cerviksa dokazani su genotipovi visokog rizika i to 16, 18, 31, 33 i dva puta u

miješanoj infekciji, uz genotip 16 i genotipovi 52 i 74.

Preliminarna studija provedena u Poliklinici Virogena Plus u Zagrebu, 2004. godine, u skupini HPV-pozitivnih ispitanika (89 žena i 34 muškarca: obrisci cerviksa kod žena i obrisci vanjskog spolovila i uretre kod muškaraca) pokazala je distribuciju HPV genotipova visokog i niskog rizika (SLIKA 6). U 69,1% ispitanika utvrđeni su HPV-genotipovi visokog rizika, dok je 30,9% ispitanika imalo HPV-genotipove niskog rizika.^{6, 11} U skupini visokog rizika 23 ispitanika (20 žena i 3 muškarca) bila su inficirana genotipom koji nije pripadao grupi 6, 11, 16, 18, 31 i 33 i nije postojećom metodom mogao biti identificiran.

Ove studije, kao i prethodna studija M. Grce i suradnika (2001), pokazuje su da je u Hrvatskoj prevalencija HPV infekcije visoka, da dominiraju HPV genotipovi visokog rizika i da je HPV 16 najučestaliji genotip. Također je ukazano na potrebu definiranja stava o HPV testiranju muškaraca, bilo kao partnera inficiranih žena ili u dijagnostičkoj proceduri identifikacije uzroka neoplastičnih promjena u analnoj i urogenitalnoj regiji.

HPV infekcija i sve posljedice koje donosi jest javnozdravstveni problem koji se više ne smije zanemarivati i prepustiti sporadičnim intervencijama. Po ugledu na razvijene zemlje u svijetu, potreban je konsenzus struke, javnog zdravstva i politike, koji će na temelju relevantnih podataka donijeti nacionalni program otkrivanja, dijagnostike, prevencije i terapije HPV infekcije.

Zaključak

Epidemiološke i molekularno biološke studije značajno su doprinijele znanju o prirodi HPV infekcije. Činjenica da je HPV glavni etiološki čimbenik gotovo svih karcinoma cerviksa od posebne je važnosti u preventivnoj medicini. HPV dijagnostika pomoću visokoosjetljivih molekularno-bioloških metoda može unaprijediti probir na karcinom cerviksa i osigurati važne informacije za dijagnozu, procjenu rizika i poboljšanje skrbi za pacijenta s premalignim i malignim promjenama na cerviksu. **M**

LITERATURA

- Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):1-17.
- Milde-Langosch K, Riethdorf S, Löning T. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch* 2000; 20:227-33.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta analysis. *British Journal of Cancer* 2003; 88:63-73.
- Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of "high risk" human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* 2003; 28(3):337-48.
- Hausen H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(9):690-8.
- Hausen H. Cervical Carcinoma and Human Papillomavirus: On the Road to Preventing a Major Human Cancer. *Journal of National Cancer Institute* 2001; 93(4):252-3.
- Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002; 78:225-8.
- Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *Journal of Pathology* 2001; 193:295-302.
- Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Ardens MJ, Moore C, Gillkison G, McGoogan E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. Original article, 2003: 68-72.
- Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. Distribution of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Variants in Squamous Cell Carcinomas and Adenocarcinomas of the Cervix. *Cancer Research* 2003; 63:7215-20.
- O'Brien PM, Campo MS. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? *Trends in Microbiology* 2003; 11(7): 300-5.
- Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 2004; 92(3):873-80.
- De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Fleuren GJ. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* 2004; 114(6):1016.
- Liu S, Semenciw R, Mao Y. Cervical cancer: the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. *CMAJ* 2001; 164(8):1151-2.
- Jacobs MV, Snijders PJF, Van den Brule AJC, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Walboomers JMM. A General Primer GP5+/GP6+-Mediated PCR- Enzyme Immunoassay Method for Rapid Detection of 14 High-Risk and 6 Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes in Cervikal Scrapings. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(3):791-5.
- Biswas C, Kell B, Mant C, Jewers RJ, Cason J, Muir P, Raju KS, Best JM. Detection of Human Papillomavirus Type 16 Early-Gene Transcription by Reverse Transcription-PCR Is Associated with Abnormal Cervical Cytology. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(6):1560-4.
- Perons C, Kletter B, Jelley R, Jalal H, Quint W, Tedder R. Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA by SPF 10 and MY09/11 Primers in Cervikal Cells taken from Women Attending a Colposcopy Clinic. *Journal of Medical Virology* 2002; 67(2): 246-52.
- Dybikowska A, Licznarski P, Podhajska A. HPV detection in cervical cancer patients in northern Poland. *Oncology Reports* 2002; 9(4):871-4.
- Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of "high risk" human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progressions. *Indian Academy of Sciences* 2003; 28(3):337-48.
- Galloway DA. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *The Lancet Infectious Diseases* 2003; 3(8): 469-75.
- Grce M, Husnjak K, Božikov J, Magdić L, Zlacki M, Lukač J, Fističić I, Šikanić-Dugić N, Pavelić K. Evaluation of genital human papillomavirus by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* 2001; 21(1B):579-84.