

Privatna ginekološka ordinacija, Solin, Medicinski fakultet,*
Zavod za Patologiju Kliničke bolnice,** Ginekološka poliklinika »Gynenova«,*** Split

VAŽNOST ODREĐIVANJA HPV INFEKCIJE I PROTEINA P16^{INK4a} U CERVICALNIM INTRAEPITELNIM NOVOTVORINAMA I INVAZIVNIM KARCINOMIMA CERVIXA

THE VALUE OF DETECTION OF PROTEIN P16^{INK4a} AND HPV INFECTION IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIAS AND INVASIVE CARCINOMA OF THE CERVIX

Lidija Pejковиć, Irena Jeličić,* Snježana Tomić,**
Marko Mimica,*** Irena Drmić Hoffman**

Stručni članak

Ključne riječi: HPV, p16^{INK4a}, cervikalna displazija

SAŽETAK. Cilj istraživanja. Utvrditi postoji li razlika u ekspresiji proteina p16^{INK4a} u uzorcima nepromijenjenog, metaplastičnog i atrofičnog epitela te u različitim stupnjevima epitelne displazije i invazivnom karcinomu cerviksa, te postoji li povezanost između ekspresije proteina p16^{INK4a} i infekcije humanim papiloma virusom (HPV), poglavito infekcije visoko rizičnim sojevima HPV-a. **Materijal i metode.** Imunohistokemijski je analizirana pojavnost proteina p16^{INK4a} u 50 biopsijskih uzoraka vrata maternice, od čega 10 uzoraka neneoplastičnog epitela te po 10 uzoraka različitog stupnja displazije i invazivnog karcinoma cerviksa. Na svim uzorcima prethodno je napravljeno testiranje na prisutnost HPV DNK. **Rezultati.** Ni u jednom od uzoraka vrata maternice na čijoj površini se nalazio nepromijenjeni, metaplastični, ili atrofični epitel, nije nađena ni HPV infekcija ni pozitivno bojenje na protein p16^{INK4a}. Od 10 uzoraka u kojih je postavljena dijagnoza CIN 1, u sedam je dokazana HPV infekcija, a samo su dva bila pozitivna nakon bojanja s p16^{INK4a} antitijelom. U oba ova uzorka dokazan je HPV visokog stupnja rizika (VR HPV). Od 10 uzoraka s dijagnozom CIN 2, VR HPV je dokazan u sedam i u svima je nađena pozitivna ekspresija proteina p16^{INK4a}. U dva od tih uzoraka u kojima nije dokazana HPV infekcija, nađeno je pozitivno bojenje na protein p16^{INK4a}. Analizom 10 uzoraka s dijagnozom CIN 3, VR HPV je nađen u osam i u svima je nađena pozitivna ekspresija proteina p16^{INK4a}. U jednom od dva HPV negativna uzorka nađeno je pozitivno bojenje na p16^{INK4a}. Analizom 10 uzoraka s dijagnozom invazivnog karcinoma cerviksa, u sedam u kojima je postojao VR HPV, nađeno je pozitivno bojenje na p16^{INK4a}. Pozitivno bojenje na protein nađeno je i u dva od tri negativna uzorka. **Zaključak.** Protein p16^{INK4a} se ne pojavljuje u epitelu bez displastičnih promjena, a učestalost pojavljivanja mu se povećava sa stupnjem displazije. Porastom stupnja displazije raste i učestalost infekcije HPV-om visokog stupnja rizika. Imunohistokemijska detekcija proteina p16^{INK4a} u biopsijskim uzorcima cerviksa je dobar indikator infekcije HPV-om visokog stupnja rizika, iako postoje pojedinačni uzorci u kojima je imunohistokemijski dokazan p16^{INK4a} a nije dokazana virusna infekcija. Prema rezultatima ovog istraživanja, imunohistokemijsko bojenje na protein p16^{INK4a} pokazuje svoju vrijednost u interpretaciji biopsijskih cervikalnih uzoraka. Ovo je preliminarni rad, te su prikazani rezultati dio većeg istraživanja koje slijedi.

Professional paper

Key words: HPV, p16^{INK4a}, cervical dysplasia

SUMMARY. Aim. To establish the existence of a difference between the p16^{INK4a} protein expression in the samples of unchanged, metaplastic and atrophic cervical epithelial tissue and in different levels of epithelial dysplasia and invasive cervical carcinoma, as well as to establish whether there is a connection between the p16^{INK4a} protein expression and the Human Papilloma Virus (HPV) infection, mainly from the high-risk group. **Material and methods.** The appearance of p16^{INK4a} protein in 50 biopsic samples of cervix has been analysed, out of which 10 samples have been of non-neoplastic cervical epithelial tissue, and 10 samples of each of three cervical dysplasia level, as well as of invasive cervical carcinoma. All samples were previously tested for HPV DNA. **Results.** Not one of cervical samples with unchanged, metaplastic and atrophic epithelial tissue, contained either HPV infection or a positive staining on p16^{INK4a} protein. Out of 10 samples which had CIN 1 diagnosis, 7 were proven to be HPV infected, and only 2 were positive after the colouring on p16^{INK4a}. Both of these samples were proven to contain high-risk HPV infection (HR HPV). Out of 10 samples which had CIN 2 diagnosis, 7 were proven to contain HR HPV and in all of these samples a positive p16^{INK4a} protein expression was found. In two out of three samples which were not proven to be HPV infected, there was a positive staining on p16^{INK4a} protein. Analysing the samples which had CIN 3 diagnosis, HR HPV was found in 8, and in all of these samples a positive p16^{INK4a} protein expression was found. In one out of two HPV negative samples a positive staining on p16^{INK4a} protein was found. In the analysis of 10 samples with invasive cervical carcinoma diagnosis, in 7 containing HR HPV a positive staining on p16^{INK4a} protein was found. A positive staining on p16^{INK4a} protein was also found in two out of three HPV negative samples. **Conclusion.** The p16^{INK4a} protein does not appear in the epithelial tissue without dysplasia changes, and the frequency of its appearance increases with the dysplasia grade. With the increase in the dysplasia level, the frequency of HR HPV infection gets higher. The p16^{INK4a} protein is a good virus-infection indicator, although there are

cases of this protein's appearance without the infection. According to the results of this research, immunohistochemical colouring on p16^{INK4a} protein shows its value in the cytological and bioptical cervical samples' interpretation. This is a preliminary work and displays the results of the majority of the incoming research.

Uvod

HPV je virus iz porodice Papova viridae s dvolančanom episomalnom DNK. Podtipovi se dijele u 3 skupine: sojevi niskog onkogenog rizika (6, 11, 42, 43, 44) su uglavnom izolirani iz benignih promjena kao što su kondilomi, koji rijetko maligno progrediraju. Sojevi srednjeg i visokog rizika (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58) pronađeni su u 77% skvomoznih intraepitelnih lezija (SIL) visokog stupnja (CIN 2 i CIN 3) i u 84% invazivnih lezija.¹ U epitelnim stanicama HPV izaziva karakteristične stanične promjene tj. perinuklearnu vakuolizaciju uz angularni pleomorfizam jezgara – koilocitozu. Takve se stanice smatraju tipičnim znakom HPV infekcije.²

Protein p16^{INK4a} je inhibitor ciklin-ovisne kinaze koja usporava stanični ciklus.³ Inaktivacija pRb onkoproteina HPV E7 rezultira povećanom ekspresijom p16^{INK4a}, pa detekcija povišene razine ovog proteina može predstavljati specifičan i osjetljiv biomarker za stanice s aktivnom produkcijom virusnih onkogeni. Već je 1998. godine Sano⁴ u svojem radu ukazao na značaj proučavanja proteina, a u svojim radovima su Tsuda⁵ i Wang i sur.⁶ predložili da bi bojenje na protein p16^{INK4a} trebalo postati dio standardnog protokola u obradi displazija.

Cilj istraživanja je primjenom metoda imunohistokemije u bioptičkim uzorcima vrata maternice obojenim antitijelom na protein p16^{INK4a} utvrditi:

1. ekspresiju proteina p16^{INK4a} u nepromijenjenom, atrofičnom i metaplastičnom cervikalnom epitelu,
2. ekspresiju proteina p16^{INK4a} u bioptičkim uzorcima preinvazivnih lezija cerviksa (CIN 1, CIN 2 i CIN 3),
3. ekspresiju proteina p16^{INK4a} u bioptičkim uzorcima invazivnog karcinoma cerviksa,
4. postoji li razlika u ekspresiji proteina p16^{INK4a} u analiziranim uzorcima, i
5. postoji li povezanost između ekspresije proteina p16^{INK4a} i HPV infekcije, poglavito infekcije HPV-om iz visoko rizične skupine.

Ispitanice i metode

Analizirano je 50 bioptičkih uzoraka vrata maternice izabranih iz arhiva Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KB Split. Izabrano je 10 neneoplastičnih uzoraka, 30 uzoraka s preneoplastičnim promjenama epitela (po 10 uzoraka s dijagnozama CIN 1, CIN 2 i CIN 3) i 10 uzoraka u kojih je postavljena dijagnoza invazivnog karcinoma pločastih stanica.

Tkivo za histološku analizu fiksirano je 24 sata u 4% puferiranom formalinu. Nakon fiksacije i obrade uklapano je u parafin. Parafinski blokovi su rezani u rezove debljine 3–5 mikrometara i zatim su bojani standardnom

metodom hemalaun-eozin i imunohistokemijski primjenom monoklonskih protutijela za protein p16^{INK4a} (DAKO, Glostrup, Denmark, CINtec Tm p16^{INK4a}), prema uputi proizvođača. Pri bojenju na protein p16^{INK4a} kao pozitivna kontrola su korišteni rezovi karcinoma cerviksa. Prilikom bojenja uvijek je urađena i negativna kontrola (proveden je cijeli postupak bojenja preparata, ali je izostavljeno primarno protutijelo). Imunoreaktivnost na protein p16^{INK4a} je procjenjivana nalazom smeđe obojenosti jezgara i/ili citoplazmi.

Na svim je uzorcima uklopljenim u parafin izolirana genomna DNA. Nakon amplifikacije DNA lančanom reakcijom polimeraze provedena je detekcija visokorizičnih i niskorizičnih sojeva korištenjem standardnih reagensa PCR Human Papilloma Virus Typing Set (TaKaRa, Shiga, Japan). Analiziran je 51 bioptički uzorak vrata maternice od čega:

- četiri uzorka bez patoloških promjena,
- četiri uzorka s metaplastičnim cervikalnim epitelom,
- tri uzorka s atrofičnim cervikalnim epitelom,
- po deset uzoraka sa dijagnozom CIN 1, CIN 2 i CIN 3 i
- deset uzoraka s dijagnozom invazivnog karcinoma.

Rezultati

Raspodjela rezultata imunohistokemijskog bojenja na protein p16^{INK4a} i rezultata testiranja na HPV u ispitivanim uzorcima prikazana je u tablici 1.

Ni u jednom od uzoraka vrata maternice na čijoj se površini nalazio nepromijenjeni, metaplastični ili atro-

Tablica 1. Pojavnost HPV-a i ekspresija proteina p16^{INK4a} u analiziranim uzorcima

Table 1. Incidence of HPV and expression of protein p16^{INK4a} in analysed samples

	Neg.	HPV		p16 ^{INK4a}	
		Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
		VR*	NR**		
Nepromijenjeni epitel (n=4)	4/4 (100%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	4/4 (100%)	0/4 (0%)
Metaplastični epitel (n=4)	3/4 (75%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)	0/4 (0%)
Atrofični epitel (n=3)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)
CIN I (n=10)	3/10 (30%)	4/10 (40%)	3/10 (30%)	8/10 (80%)	2/10 (20%)
CIN II (n=10)	3/10 (30%)	7/10 (70%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	9/10 (90%)
CIN III (n=10)	2/10 (20%)	8/10 (80%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	9/10 (90%)
Invazivni karcinom (n=10)	3/10 (30%)	7/10 (70%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	9/10 (90%)

* VR: visoki rizik – high risk; ** NR: niski rizik – low risk

fični epitel nije nađena ni HPV infekcija niti pozitivno bojenje na protein p16^{INK4a}.

Od 10 uzoraka kod kojih je postavljena dijagnoza CIN 1, u sedam je dokazana HPV infekcija, a samo su dva bila pozitivna nakon bojanja na p16^{INK4a}. U oba ova uzorka dokazan je HPV visokog stupnja rizika.

Od 10 uzoraka s dijagnozom CIN 2, VR HPV je dokazan u sedam i u svima je nađena pozitivna ekspresija proteina p16^{INK4a}. U dva od tri uzorka u kojima nije dokazana HPV infekcija nađeno je pozitivno bojenje na protein p16^{INK4a}.

Analizom 10 uzoraka s dijagnozom CIN 3, VR HPV je nađen u osam i u svima je prisutna pozitivna ekspresija proteina p16^{INK4a}. U jednom od dva HPV negativna uzorka nađeno je pozitivno bojenje na p16^{INK4a}.

Analizom 10 uzoraka s dijagnozom invazivnog karcinoma cerviksa, u sedam je nađen VR HPV te pozitivno bojenje na p16^{INK4a}. Pozitivno bojenje na protein nađeno je i u dva od tri negativna uzorka.

Rasprava

Maligni tumori vrata maternice se u žena nalaze na trećem mjestu učestalosti odmah iza karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma⁸. Uvidom u Registar za rak Republike Hrvatske za 2000. godinu prosječna učestalost je bila 43,8 na 100000 žena, uz postojanje porasta učestalosti.⁹ Posljednja dva desetljeća sve su učestaliji izvještaji o porastu prevalencije premalignih lezija vrata maternice u mladih žena i adolescentica što povećava važnost pravodobne dijagnoze i odgovarajuće terapije.¹⁰ HPV, kao spolno prenosivi uzročnik je prepoznat kao glavni čimbenik cervikalne kancerogeneze. Naime, njegovom integracijom u genom stanice domaćina dolazi do ekspresije dva virusna onkogen, E6 i E7, koji inhibiraju aktivnost proteina p53 i pRb. Različiti karcinomi s mutacijom, delecijom ili inaktivacijom pRb pokazuju pojačanu ekspresiju p16^{INK4a}, zbog čega je prihvaćena teorija o njihovom recipročnom odnosu.¹¹ Zbog toga bi detekcijom ovoga proteina mogli dijagnosticirati intraepitelne promjene s visokim rizikom za progresiju, zbog ekspresije virusnih onkogeni i visokog stupnja genetske nestabilnosti.⁷ Ipak, postoje i istraživanja koja govore o smanjenoj ekspresiji p16^{INK4a} u odnosu na stanice nepromijenjenog epitela.⁴

Ovim istraživanjem htjeli smo ispitati pojavnost proteina p16^{INK4a} u različitim stupnjevima stanične displazije i njegovu povezanost s HPV infekcijom. Nepromijenjeni, metaplastični i atrofični epitel ne pokazuju ekspresiju p16^{INK4a}.¹² Agoff i sur.¹³ su dokazali da ekspresija p16^{INK4a} ne ovisi o stupnju upalnih promjena ni o hormonskom statusu žene. Odsutnost ovoga proteina u epitelu bez displastičnih promjena tumači se recipročnom inaktivacijom p16 i pRb, kojom aktivirani pRb inhibira transkripciju p16^{INK4a}.

U ovom radu analizirana su četiri uzorka nepromijenjenog epitela, četiri uzorka metaplastičnog epitela i tri

uzorka atrofičnog epitela. U samo jednom uzorku je detektiran NR HPV dok su drugi uzorci bili HPV negativni. Sukladno ranijim istraživanjima u ni jednom uzorku imunohistokemijski nije nađena ekspresija proteina p16^{INK4a}. Međutim, povećanjem stupnja epitelne displazije od CIN 1 do CIN 3, abnormalnosti p16/CDK4/pRb regulatornog kompleksa postaju zbog povećane učestalosti perzistentne infekcije VR HPV-om sve izraženije. Da bi razjasnili povezanost VR HPV infekcije i p16^{INK4a} ekspresije Kleas i sur.¹² su imunohistokemijski obradili 296 biopsijskih uzoraka različitog stupnja patoloških promjena. Protein p16^{INK4a} je eksprimiran u svim uzorcima koji su bili povezani s VR HPV infekcijom: CIN 3 (n=60), CIN 2 (n=32) i CIN 1 (n=47). Protein se nije pojavljivao u uzorcima koji su bili inficirani LR HPV-om (n=7), u uzorcima s upalnim promjenama (n=48) i u uzorcima s nepromijenjenim epitelom (n=42). Važnost detekcije VR HPV-a pokazuje i istraživanje Wang i sur.⁶ koji su tijekom pet godina pratili žene koje su u promjenama CIN 1 povezanim s VR HPV-om imale imunohistokemijski dokazan protein p16^{INK4a}. Kroz navedeno razdoblje u 44% žena je uočena progresija promjena u CIN 2 ili CIN 3. Na temelju rezultata ovih studija, protein p16^{INK4a} je specifičan biomarker za identifikaciju displastičnog cervikalnog epitela u cervikalnim razmazima i biopsijskim uzorcima.^{3,7,14,15} U našem istraživanju od deset uzoraka s dijagnozom CIN 1 samo su dva bila p16^{INK4a} pozitivna, dok je od uzoraka CIN 3 devet uzoraka bilo pozitivno. Svi pozitivni uzorci su bili VR HPV pozitivni.

Zanimljivo je da pet HPV negativnih uzoraka različitog stupnja displazije pokazuje ekspresiju proteina p16^{INK4a}. Mogući je razlog greška uzorka, tj. nepostojanje displastičnog epitela u dubljim rezovima biopsijskih uzoraka cerviksa (lažno negativan rezultat). Drugi bi razlog mogao biti da aktivacija ovog proteina osim virusnim onkogenima vjerojatno može biti pokrenuta i molekularnim mehanizmima. Protein p16^{INK4a} nam može pomoći u razlikovanju atrofičnog, metaplastičnog i displastičnog epitela. Naime, PAPA-test je značajno smanjio incidenciju i smrtnost od karcinoma vrata maternice, zbog dijagnoze predkliničkih promjena kada je izlječenje 95–100%.^{17–19} Ipak, u određenom broju slučajeva razlikovanje je displastičnih i neneoplastičnih stanica subjektivno otežano što otežava posao neiskusnim citolozima i citoskrinerima.^{10,20,21}

S obzirom da epitel bez displastičnih promjena ne pokazuje ekspresiju p16^{INK4a}, uvođenje imunohistokemijskog bojenja na protein p16^{INK4a} uvelike bi olakšalo postavljanje dijagnoze u dvojbim citološkim i patohistološkim uzorcima.^{16,22} Ujedno bi smanjilo pojavnost lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata čime bi se izbjegli nepotrebni dijagnostički i terapijski zahvati.

Rezultati ove studije ukazuju i na važnost određivanja proteina p16^{INK4a} u displastičnim promjenama stanica vrata maternice,^{6,23} koji bi mogao biti jedan od važnih biljega i pokazatelja biološkog potencijala promjena epitela.²⁴

Zaključak

Nepromijenjeni, metaplastični i atrofični epitel ne pokazuje ekspresiju proteina p16^{INK4a}.

Porastom stupnja displazije povećava se ekspresija proteina p16^{INK4a}, što govori u prilog njegovoj ulozi kao biološkog markera u detekciji displastično promijenjenog epitela. Udio VR HPV pozitivnih uzoraka se povećava porastom stupnja displazije: CIN 1 (40%), CIN 2 (70%), CIN 3 (80%) što potvrđuje ulogu VR HPV-a u cervikalnoj kancerogenezi.

Nalaz pozitivne ekspresije proteina p16^{INK4a} u preneoplastičnim cervikalnim lezijama i uzorcima invazivnog karcinoma cerviksa u nekoliko uzoraka bez VR HPV infekcije, upućuje na mogućnost aktivacije ovog gena i nekim drugim molekularnim mehanizmima osim virusnim onkogenima.

Ukoliko rezultati većeg istraživanja potvrde ove naše preliminarne rezultate, uvođenje imunohistokemijskog bojenja na protein p16^{INK4a} u citološke i patohistološke laboratorije moglo bi postati dio standardnog protokola u obradi i interpretaciji citoloških i biopsijskih cervikalnih uzoraka.

Literatura

1. Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus epidemiology, transmission, and pathogenesis. Clin Lab Med 2000;20:235–55.
2. Robbins L. Osnove patologije. V izd. Zagreb: Školska knjiga Zagreb 2000;612–5.
3. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. Am J Obstet Gynecol 2004;190:668–73.
4. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K et al. Expression status of p16 protein is associated with HPV oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol 1998;153:1741–8.
5. Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue Yamamoto K. Relationship between typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. Gynecol Oncol 2003;91:476–85.
6. Wang SS, Trunk M, Shiffman M. Validation of p16^{INK4a} as a marker of oncogenic human papilloma virus infection in cervical biopsies from a population based cohort in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13:1355–60.
7. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A et al. P16^{INK4a} is a useful marker for the diagnosis of a adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. Am J Surg Pathol 2003;27:187–93.
8. Dražančić A, Strnad M, Audy-Jurković S, Tomljanović M, Jukić S, Veček N. Pojavnost i prevencija raka ženskih spolnih organa u Hrvatskoj. U: Eljuga D, Dražančić A. (ur.). Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus 1998;13–50.
9. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. www.hzjz.hr
10. Šarčević B, Ilijaš M. Teškoće u dijagnozi prekanceroza i karcinoma vrata maternice. U: Eljuga D, Dražančić A. (ur.). Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus 1998;123–30.
11. Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L et al. Reciprocal Rb inactivation and p16 expression in primary lung cancers and cell lines. Cancer Res 1995;55:505–9.
12. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16^{INK4a} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the uteri. Int J Cancer 2001;92:276–84.
13. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NG, Kontsky LA. P^{16INK4a} expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of HR HPV types. Mod Pathol 2003;16:665–73.
14. Nakashima R, Fujita M, Enomoto T et al. Alteration p16 p15 genes in human uterine tumours. Br J Cancer 1999;80:458–67.
15. Lopes A, Pearson SE, Mor-Yosef S, Ireland D, Monaghan JM. Is it time for a reconsideration of the criteria for cone biopsy? Br J Obstet Gynaecol 1989;96:1345–7.
16. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN. Molecular genetic correlates of p16cdk4 and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol 1998;57:122–30.
17. Audy-Jurković S, Ivić J. Citodijagnostika epitelnih atipija vrata maternice. U: Dražančić A i sur. (ur.). Porodništvo. II. izd. Zagreb: Školska knjiga 1999;388–94.
18. Eljuga D, Navratil R, Hodžić D. Važnost sprječavanja i ranog otkrivanja raka vrata maternice. U: Eljuga D, Dražančić A i sur. (ur.). Prevencija i dijagnostika tumora ženskih spolnih organa. Zagreb: Nakladni zavod Globus 1998;61–5.
19. Koutski L. Epidemiology of genital human papilloma infection. Am J Med 1997;102:3–8.
20. Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Mahovlić V, Ljubojević N, Veček N, Gall K. HPV DNK in situ hibridizacija u obriscima vrata maternice. I. Materijal i metode. Gynaecol Perinatol 1993;2:45–50.
21. Crum MD, Nouvo GJ. Genital papillomavirus and related neoplasms. New York. Raven Press 1991.
22. Di Paulo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. Oncogene 1989;7:395–9.
23. Singer Z, Đorđević E, Feicher G, Vrabec B. Istraživanje tipova deoksiribonukleinske kiseline humanih papilomavirusa u populaciji Zagreba. Gynaecol Perinatol 1992;1(suppl.1.):40–2.
24. Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. Virus Res 2002; 89:241–8.

Članak primljen 17. 09. 2007; prihvaćen 20. 12. 2007.

Adresa autorice: Dr. Lidija Pejković, dr. med., Privatna ginekološka ordinacija, Petra Krešimira IV./34, 21 210 Solin