

Klinika za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, Zagreb;<sup>1</sup>  
Zavod za ginekološku patologiju KBC-a Zagreb, Zagreb;<sup>2</sup> Klinika za kožne i spolne bolesti KBC-a Zagreb;<sup>3</sup>  
Sveučilišna klinička bolnica Mostar<sup>4</sup>

## INFEKCIJA S VIŠE OD JEDNIM PODTIPOM HPV-a POVEZANA JE S LOŠIJOM PROGNOZOM U BOLESNICA S INVAZIVNIM KARCINOMOM VRATA MATERNICE

### MIXED HPV INFECTION IS A POOR PROGNOSTIC FACTOR FOR SURVEILLANCE OF PATIENT WITH INVASIVE CERVICAL CANCER

Joško Lešin,<sup>1</sup> Damir Babić,<sup>2</sup> Jadranka Forko-Ilić,<sup>2</sup> Mihael Skerlev,<sup>3</sup>  
Joško Zekan,<sup>1</sup> Miljenko Lugonja,<sup>4</sup> Tomislav Župić,<sup>1</sup>

Izvorni članak

**Ključne riječi:** invazivni karcinom vrata maternice, HPV podtip, Inno Lippa metoda, miješana infekcija HPV-om

**SAŽETAK.** Invazivni rak vrata maternice po učestalosti zauzima četvrto mjesto svih zloćudnih bolesti ženskog reproduktivnog sustava, a godišnje se u Hrvatskoj otkrije 14 novooboljelih na 100.000 žena. **Materijali i metode.** Prospektivno je praćeno 120 bolesnica, liječenih u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom razdoblja 1996–2002. godine zbog raka vrata maternice kliničkog stadija IB-IIIB. **Cilj.** Odrediti podtip HPV-a metodom PCR-om i Inno Lippa-om kod bolesnica liječenih zbog invazivnog karcinoma vrata maternice, s posebnim osvrtom na miješane infekcije te utvrditi povezanost podtipa HPV-a sa histološkim tipom karcinoma vrata maternice. **Rezultati.** Za analizu je preostalo 102 bolesnice, prosječne dobi 51,38 ±14,04 (26–83) godine. U vremenu praćenja (5–98 mjeseci) umrlo je 23 (22,5%) bolesnice zbog raka vrata maternice. Statistički je značajna razlika u preživljenju bolesnica u odnosu na: infekciju HPV tipom 16 (p=0,0008) i postojanju miješane infekcije HPV-om (p=0,0134). Coxovom regresijom analizirali smo sve čimbenike, statistički značajne univarijantnom analizom, i formirali model za preživljenje bolesnica s rakom vrata maternice visoke predikcije ( $\chi^2=74,222$ , df=7, p<0,0001). Statistički je neovisno značajan prediktor preživljenja infekcija miješanim tipovima HPV-a (p=0,007). **Zaključak.** Određivanje tipa HPV je potrebno kod bolesnica s karcinomom vrata maternice jer je infekcija sa više od jednim tipom HPV-a povezana s lošijom prognozom u bolesnica s invazivnim karcinomom vrata maternice.

Original paper

**Key words:** invasive cervical cancer, HPV type, Inno Lippa method, mixed HPV infection

**SUMMARY.** Invasive cervical carcinoma is the fourth of all neoplasms of female genital reproductive system and 14/100 000 women would get ill in Croatia during a year. **Material and method.** 120 patients with cervical carcinoma clinical stage IB-IIIB treated in Department of Obstetrics and Gynecology Medical School University of Zagreb, were examined prospectively during period 1996–2002. The aim of the study was to detect the HPV-type using PCR and Inno Lippa method and compare their significance as prognostic factors. **Results.** 102 patients left for the analysis, an average age was 51.38±14.04 (26–83). During the follow up of 5–98 months 23 (22.5%) patients died from cervical carcinoma. HPV type 16 infection (p=0.0008) and mixed HPV infection (p=0.0134) are connected with poor surviving. Using Cox regression model we analysed all the significant factors by univariate method and formed a model of high prediction for poor surviving ( $\chi^2=74.222$ , df=7, p<0.0001). HPV mixed infection (p=0.007) is independent predictive factors for poor surviving in patients with cervical carcinoma. **Conclusion.** HPV detection in patients with cervical carcinoma is necessary because mixed HPV infection is a poor prognostic factor for surveillance of patient with invasive cervical cancer.

## Uvod

U ginekološkoj onkologiji poseban značaj imaju karcinomi vrata maternice jer se najčešće pojavljuju u žena generativne dobi, a rana dijagnostika je kod ovih tumora najuspješnija. Godišnje se u Hrvatskoj otkrije 400 novooboljelih ili 14 na 100 000 žena.<sup>1</sup>

Poznato je još od antičkih vremena da se genitalne bradavice (condyloma accuminatum) mogu prenijeti spolnim putem. Činjenica da je karcinom vrata maternice češći u promiskuitetnih osoba, osnova je hipoteze postavljene 1842. godine o virusnoj etiologiji ovog raka.<sup>2</sup> Prošlo je više od jednog stoljeća da bi hipoteza o ulozu papilomavirusa čovjeka u nastanku raka vrata maternice postala ponovo zanimljiva.<sup>3</sup> Tek je uporaba metoda

molekularne biologije omogućila razumijevanje odnosa između HPV-a i karcinoma vrata maternice. 1985. godine započela su istraživanja bioloških funkcija, posebice načina specifičnog prepisivanja i ugrađivanja genoma HPV-a u stanice karcinoma vrata maternice.<sup>4,5</sup> Kao posljedica mikrotraume epitela virus ulazi u prićuvne-pluripotente stanice. Čini se da ove stanice posjeduju receptore za papilomaviruse čovjeka.<sup>6</sup> Ulaskom u stanicu replikacija virusa odvija se na tri načina: 1. niska razina umnožavanja neposredno nakon ulaska virusa u bazalnu stanicu oštećenog epitela; 2. latentno, minimalno umnožavanje prati diobu prićuvnih-pluripotentnih stanica (latentna zaraza); i 3. normalno umnažanje – stvaranje novih viriona u diferenciranim stanicama epitela (produktivna zaraza).

Nakon ulaska u stanicu virus se stabilizira u epizomalnom stanju i umnoži u oko 20 do 100 kopija. Replikacija epizomalne DNA u latentnoj se zarazi održava na razini koja prati diobu bazalnih i parabazalnih slojeva. S obzirom da se u latentnoj zarazi ne stvaraju kompletni virioni ne dolazi do nastanka karakterističnog citopatskog učinka te se nazočnost HPV-a može utvrditi jedino metodama molekularne biologije. U višim slojevima epitela virus umnaža svoj genom usporedno s diferencijacijom stanica domaćina. U diferenciranim stanicama, odnosno intermedijarnom i superficijalnom sloju, dolazi do ekspresije kasnih gena i korištenja specifičnih čimbenika transkripcije iz stanice domaćina koji stimuliraju stvaranje proteina kapside virusa. Taj proces omogućava stvaranje zrelog virusnog potomstva i nastanak karakterističnog citopatskog učinka HPV-a koji se može dokazati u citološkim obriscima i histopatološkim rezovima.

U svim karcinomima vrata maternice nađena je povećana ekspresija virusnih gena E6 i E7. Preotpostavlja se da ti geni imaju značajnu ulogu u nastanku ovog karcinoma, što je potvrđeno i in vitro pokusima imortalizacije stanica fibroblasta u kulturi nakon transfekcije s proteinima E6 i E7.<sup>7</sup> In vitro pokusi, međutim, pokazuju da je za transformaciju stanica nužna suradnja ovih gena s drugim staničnim genima kao što je onkogen H-ras.<sup>8</sup>

Dokazano je da E6 ima sposobnost vezanja s različitim važnim regulatornim proteinima kao što je p53.<sup>9</sup> Vezanje E6 s p53 dovodi do razgradnje p53 čime se gubi njegova uloga u kontroli gena koji kontroliraju zastoj u G1-fazi, pa se, dozvoljavanjem prolaza kroz stanični ciklus prije nego što je DNA popravljena, omogućava nakupljanje mutiranih gena.

Uloga proteina E7 u zloćudnoj promjeni ostvaruje se preko produkata tumor supresorskog gena Rb (engl. »retinoblastoma gene«), koji se nalazi na kromosomu 13q14 čovjeka, a kodira za fosfoprotein molekulske mase 110 kDa i veličine 928 aminokiselina. pRB je glavni negativni regulator staničnog ciklusa.<sup>10</sup> Tijekom G0 i G1-faze staničnog ciklusa Rb je hipofosforiliran i vezan za transkripcijski čimbenik E2F-1 koji ima važnu ulogu u ekspresiji staničnih regulatornih gena kao što je c-myc. Vezanje Rb i proteina p107 i p130 za E2F-1 onemogućava djelovanje E2F čime se sprječava ulazak stanice u S-fazu. Početak sinteze DNA i prijelaz stanice iz G1 u S-fazu zahtijeva raspad te veze, što se događa hiperfosforilacijom Rb. Visoka razina nevezanog E2F-1 stimulira ekspresiju drugih staničnih regulacijskih gena i dovodi do proliferacije. Vezanje HPV E7 za Rb i proteine p107 i p130 onemogućava njihovo vezanje s E2F-1, što uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanice. Rb inhibira i transkripciju preko inhibitora ciklin ovisne kinaze, gena p16INK4A, koji ima ulogu u staničnoj proliferaciji. Vezanje E7 s pRb omogućava prekomjernu ekspresiju p16INK4A u stanici.

Protein E7 remeti kontrolu stanične proliferacije tako da inaktivira ciklin ovisne inhibitore kinaze p21CIP-1 i p27KIP-1. Inaktiviranje p21CIP-1 i p27 KIP-1 oslobađa CDK od njihovih staničnih regulatora što može dovesti

do nekontrolirane proliferacije stanica. Gubitak funkcije proteina p53 i Rb dovodi do kontinuirane replikacije i proliferacije stanica. Stimulirana je sinteza DNA bez popravka oštećene DNA, nakupljaju se genetske greške, izostavljena je programirana smrt stanice i tako dolazi do zloćudne preobrazbe.<sup>11</sup>

Zaraza HPV-om bilježi se prosječno desetak godina prije nastanka karcinoma vrata maternice.<sup>12</sup> Osim toga, samo mali broj žena zaraženih HPV-om visokog rizika razvije karcinom. Svi ti nalazi govore u prilog dodatnih događaja ili čimbenika koji su bitni za nastanak karcinoma. Stoga je identifikacija dodatnih genetskih – kromosomskih promjena vrlo važna za razumijevanje biologije ovog karcinoma. Na osnovi sposobnosti (potencijala) izazivanja zloćudne preobrazbe ovi se virusi dijele u tri grupe:

1. Niski rizik: HPV tip 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66
2. Visoki rizik: HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
3. Vjerojatno visoki rizik: 26, 53, 66<sup>12</sup>.

#### Ciljevi rada:

1. Odrediti podtip HPV-a u bolesnica liječenih zbog invazivnog karcinoma vrata maternice naše populacije.
2. Odrediti učestalost miješanih infekcija HPV-om u bolesnica s karcinomom vrata maternice naše populacije.
3. Utvrditi povezanost podtipa HPV-a s histološkim tipom karcinoma vrata maternice i s preživljenjem bolesnica.

#### Ispitanice i metode

Analizirano je 120 bolesnica, liječenih od 1996. do 2002. godine zbog karcinoma vrata maternice kliničkog stadija IB-IIIB. Bolesnice su liječene u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korišteni su epidemiološko-klinički podatci iz medicinske dokumentacije Arhiva Klinike. U promatrane epidemiološke podatke uključeno je: dob bolesnice u trenutku postavljanja dijagnoze iskazana u godinama, opstetrička anamneza iskazana kao broj poroda i broj pobačaja, određivanje menopauzalnog statusa (bolesnica je u menopauzi ako je od posljednje menstruacije do postavljanja dijagnoze) prošlo više od godinu dana.

Dijagnoza raka vrata maternice je postavljena prema sljedećem dijagnostičkom protokolu: klinički ginekološki pregled (izgled porcije i pregled parametrija), PAPA test, kolposkopija, biopsija. Iz uzorka biopsije su određeni klasični PHD parametri: histološki tip tumora, stupanj zrelosti, dubina invazije i zahvaćenost limfokapilarnih prostora. Osim ovih klasičnih parametara, iz bioptičkog uzorka odredili smo podtip HPV-a. Nalaz i genotipizacija HPV-a određena je pomoću Inno Lippa testa (PCR i reverzne hibridizacije).

## 1. Izolacija DNK iz parafinskih uzoraka

U svrhu izolacije DNK-a pripremili smo serije po tri parafinska reza. Rezovi su inkubirani u 1 mL ksilena, 5 minuta na 55°C i centrifugirani na 10000 g pet minuta na sobnoj temperaturi. Isti postupak ponovljen je još dva puta. Nakon pažljivog odstranjivanja ostatka ksilena, uzorci su kratko inkubirani po dva puta u 1mL 100% etanola te centrifugirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon odstranjivanja etanola, pelet smo kratko posušili na zraku i potom ga inkubirali preko noći u 200 µL digestijskog pufera sa svježe dodanom proteinazom K na 55°C. Proteinaza je inaktivirana 10 min na 100°C. (modificirano prema Wrightu i Manosu).<sup>13</sup>

## 2. Polimerazna lančana reakcija (PCR)

Da bi se provjerila kvaliteta i integritet izoliranog DNK-a odnosno prisutnost inhibitora, za svaki uzorak prvo se provela reakcija umnažanja specifičnim početnicima za β globin PC04 i GH20 postojećim u svim stanicama.

Koristili smo tri para početnika zajednička za većinu tipova HPV-a: degenerirane početnike My09/My11 i CPI/CPII G te Gp5/6+. Svaki smo uzorak potom proveli kroz sve reakcije s početnicima specifičnih tipova HPV-a za niski i visoki rizik.

## 3. Reverzna hibridizacija

To je metoda koja se temelji na hibridizaciji specifičnih DNK proba koje su imobilizirane na nitroceluloznim ili najlonskim trakicama. Dizajniran je set početnika (SPF 10) u svrhu umnažanja dijela L1 gena virusnog DNK-a. Produkt amplifikacije sa SPF početnicima je veličine samo 65 pb i omogućuje detekciju 25 novih tipova. Početnici SPF su obilježeni biotinom. Denaturirani biotinirani produkti PCR-a se hibridiziraju sa specifičnim oligonukleotidnim probama koje su imobilizirane kao paralelne linije na membranskim stripovima. Nakon hibridizacije i ispiranja streptavidin-konjugirana alkalna fosfataza se dodaje i veže za biotinirane hibride koji su se prethodno formirali. Inkubacija s BCIP/NBT kromogenom daje ljubičaste precipitate i rezultati se vizualno interpretiraju.

Ispitanice su razvrstane po kliničkim stadijima klasifikacije *International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)*.<sup>14</sup> Nakon određivanja kliničkog stadija bolesti kod bolesnica je provedeno liječenje po tadašnjem protokolu Zavoda za ginekološku onkologiju KBC-a Zagreb.

Preživljenje smo odredili kao razdoblje od postavljenе dijagnoze do datuma posljednje kontrole u Klinici, iskazano u mjesecima. Iz studije smo isključili bolesnice koje nisu zadovoljile kriterije za postavljanje dijagnoze, kao i one bez svih promatranih epidemiološko-kliničkih podataka.

Statističkom obradom dobivenih podataka pokazali smo značenje istraživanih čimbenika, prikazano u tablicama i grafovima. Analiza vjerojatnosti preživljenja temeljena je na podacima o praćenju bolesnica od dana

postavljanja dijagnoze do smrti od osnovne bolesti (nepovoljan događaj) ili prestanka istraživanja (povoljan događaj), tzv. cenzus ispitanika.

Vjerojatnost preživljenja izračunali smo metodom životnih tablica i prikazali grafički Kaplan-Meierovim krivuljama. Statistički pokazatelji analize preživljenja temeljili su se na log-normalnoj raspodjeli podataka. Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovom radu proveli smo uz razinu sigurnosti  $p < 0.05$ .

Tablica 1. Raspodjela bolesnica s karcinomom cerviksa prema tipu HPV infekcije.

Table 1. Distribution of patients with cervical cancer in relation to HPV type of infection.

Čimbenik – Factor	N=102	%
HPV pozitivne – HPV positive	89	87,3
HPV negativne – HPV negative	13	12,7
Monoinfekcija HPV tip 16 N=82		
da – yes	70	85,4
ne – no	12	14,6
HPV miješani tip – mixed types		
da – yes	7	6,9
ne – no	95	93,1
Ukupno HPV tip 16 – Total HPV type 16		
pozitivne – positive	77	75,5
negativne – negative	25	24,5
Ukupno HPV tip 18 – Total HPV type 18		
pozitivne – positive	6	5,9
negativne – negative	96	94,1
Ukupno HPV tip 58 – Total HPV type 58		
pozitivne – positive	6	5,9
negativne – negative	96	94,1

Tablica 2. Zastupljenost HPV monoinfekcija u bolesnica s karcinomom vrata maternice.

Table 2. Distribution of HPV mono-infections in patients with cervical cancer.

HPV tip – type	Broj slučajeva Number of cases	%
neg.	13	13,7
16	70	73,7
18	4	4,2
44	2	2,1
52	2	2,1
56	1	1,1
58	3	3,2
Ukupno – Total	95	100

Tablica 3. Zastupljenost miješane HPV infekcije u bolesnica s karcinomom vrata maternice.

Table 3. Distribution of mixed HPV infection in patients with cervical cancer.

HPV tip – type	Broj slučajeva Number of cases	%
16+18	2	28,6
16+42	1	14,3
16+45	1	14,3
16+58	2	28,6
16+11+58	1	14,3
Ukupno – Total	7	100

Tablica 4. Pojavnost tipa mono HPV infekcija u odnosu na histološki tip tumora.  
Table 4. Appearance of the types of HPV infections in relation to histologic type of the tumors.

	HPV neg.	HPV tip 16	HPV tip 18	HPV tip 44	HPV tip 52	HPV tip 56	HPV tip 58
PC	9	58	1	2	2	0	2
AC	3	6	1	0	0	1	1
ASC	1	6	2	0	0	0	0
Ukupno Total	13	70	4	2	2	1	3

PC: Ca planocellulare; AC: Adenocarcinoma; ASC: Ca adenosquamosum

Tablica 5. Pojavnost miješanih HPV infekcija u odnosu na histološki tip tumora.  
Table 5. Appearance of mixed HPV infections in relation to histologic type of the tumor.

	HPV tip 16+11+58	HPV tip 16+18	HPV tip 16+42	HPV tip 16+45	HPV tip 16+58
PC	0	2	1	1	1
AC	1	0	0	0	1
Ukupno Total	1	2	1	1	2

PC: Ca planocellulare; AC: Adenocarcinoma; ASC: Ca adenosquamosum

Tablica 6. Čimbenici koji utječu na preživljenje bolesnica s rakom vrata maternice-univarijantna analiza.

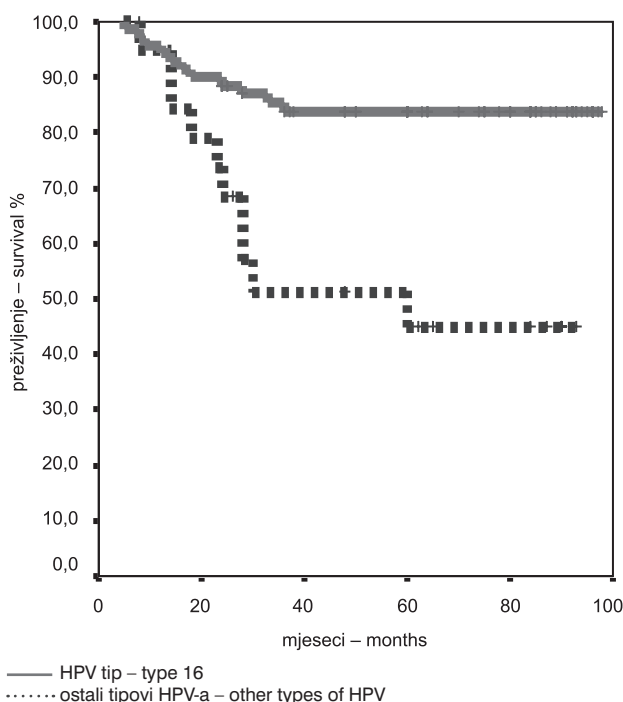
Table 6. Factors influencing survival of the patients with cervical cancer – univariant analysis.

Čimbenik Factor	Univarijantni rezultat (p) Univariant result (p)
Dob – Age ≥ 60	6,31 0,012
Menopauza – Menopausis	0,23 0,634
Klinički stadij IB/IIB Clinical stage	26,01 <0,0001
Histološki tip – Histologic type	
PC/AC	0,09 0,7677
AC/ASC	0,25 0,6142
PC/ASC	0,13 0,7135
Stupanj zrelosti tumora Tumor's maturity grade	
I/II	1,37 0,2413
II/III	0,56 0,4556
I/III	0,04 0,8432
Invazija limfnih kapilara Invasion of lymphatic capillaries	4,16 0,0414
HPV tip 16 pos.	11,28 0,0008
HPV miješani tip HPV mixed type	6,12 0,0134
HPV neg.	0,40 0,5259

PC: Ca planocellulare; AC: Adenocarcinoma; ASC: Ca adenosquamosum

## Rezultati

U studiji su nakon isključivanja po principima prikazanim u materijalima i metodama preostale 102 bolesnice s rakom vrata maternice kliničkog stadija IB do IIB koje su liječene u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb u razdoblju od 1996. do 2002. godine. Prosječna životna dob ispitanica bila je  $51,38 \pm 14,04$  u rasponu od 26 do 83 godine. U bolesnica je prosječan broj poroda bio  $2,2 \pm 1,2$  (0–7), prosječan broj pobačaja

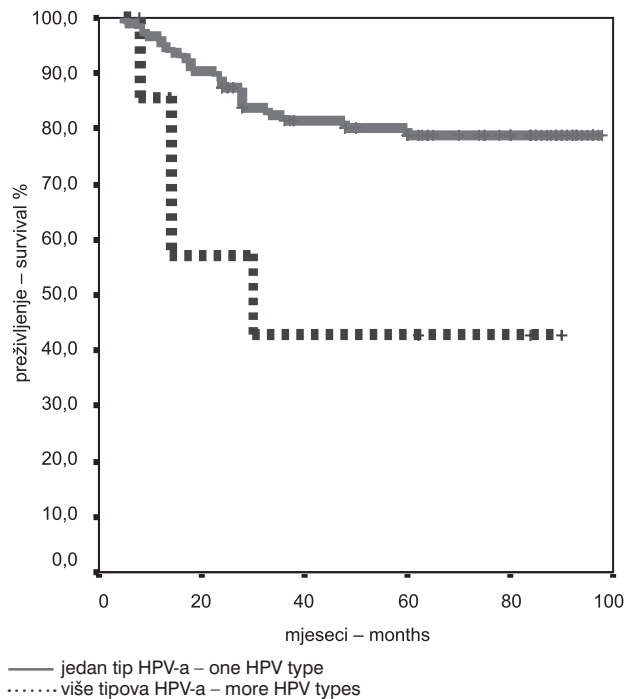


Slika 1. Preživljenja bolesnica u odnosu na infekciju HPV tip 16.  
Figure 1. Survival of patients in relation to the HPV type 16 infection.

$1 \pm 1,4$  (0–10), a u trenutku postavljanja dijagnoze njih 65 (63,7%) je bilo u menopauzi.

U vremenu praćenja 5–98 ( $58,37 \pm 29,65$ ) mjeseci umrle su zbog raka vrata maternice 23 (22,5%) bolesnice.

Učestalost pojedinih istraživanih čimbenika i podtipova HPV-a prikazana je u tablicama 1–3, a na tablicama 4–6 prikazana je učestalost pojedinih podtipova u odnosu na histološki tip raka.



Slika 2. Preživljenje bolesnica u odnosu na infekciju miješanim tipom HPV-a.

Figure 2. Survival of patients in relation to the mixed type of HPV infection.

Univarijantnom analizom pokazali smo kako je statistički značajna razlika za preživljenje bolesnica s karcinomom vrata maternice bila dob >60 godina, klinički stadij, invazija u limfokapilarne prostore, infekcija HPV-podtipom 16 i miješana infekcija HPV-om (slike 1 i 2).

## Rasprava

Invazivni karcinom vrata maternice po učestalosti zauzima treće mjesto svih zloćudnih bolesti ženskog reproduktivnog sustava, iza karcinoma jajnika i endometrija.

Karcinom pločastih stanica čini 75–85% svih karcinoma vrata maternice; incidencija adenokarcinoma je u stalnom porastu i na njega danas otpada 15–25% svih karcinoma vrata maternice. Za preživljavanje i prognozu bitni su: klinički stadij bolesti, veličina tumora, histološki tip i stupanj zrelosti te stanje limfnih čvorova. Dodatni čimbenici prognoze su: analiza plovidije stanica (analiza protočnom citometrijom) te ekspresija HER-2 neu antigena.<sup>15–21</sup> Danas je gotovo sigurno da onkogeni čimbenici koji izazivaju nastanak atipičnih stanica i mogući razvoj do karcinoma prenose spolnim putem. Nastojanje kliničara i patologa je što točnije odrediti proširenost tumora, kako bi se odabrao najbolji i najpoštedniji zahvat, a bez povećanja rizika od kasnije progresije bolesti. Način liječenja mora uvijek biti što poštedniji jer je osim izlječenja od primarne bolesti bitno osigurati što veću kvalitetu života. Na temelju kliničkog stadija odlučuje se o načinu liječenja tumora vrata maternice.

Raku vrata maternice prethode dobro definirane premaligne promjene nazvane cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN). Na osnovi patohistološke klasifikacije, ovisno o debljini zahvaćenog epitela, dijele se na tri stupnja. Ukoliko se ne liječe ove lezije mogu spontano regresirati, ali i napredovati prema invazivnom karcinomu. Rak vrata maternice kao i lezije koje mu prethode uzročno je u čovjeka povezan s infekcijom papiloma virusom (HPV). Genotipovi HPV-a visokog rizika kodiraju za dva tipa onkoproteina E 6 i E 7 koji se vežu na tumor supresorske gene p53 i Rb. Vežanje E 6 za p53 dovodi do njegove razgradnje ubikvitinskim putem, čime se ovaj protein inaktivira. Činjenica da samo mali broj žena inficiranih HPV-om oboli od raka vrata maternice nakon dugog razdoblja latencije, pokazuje da samo virus nije dostatan za izazivanje zloćudne preobrazbe.<sup>22–25</sup>

Napredovanje iz premalignih lezija u invazivni karcinom povezano je s aktivacijom onkogeni i inaktivacijom tumor supresorskih gena. Gubitak heterozigotnosti specifičnih kromosoma ukazuje na deleciju jednog alela u određenom tumor supresorskom genu, čiji je preostali alel često inaktiviran mutacijom.<sup>25–29</sup>

S obzirom da se na osnovi morfoloških promjena ne može predvidjeti ponašanje lezija koje prethode invazivnom karcinomu, nužno je istraživanje potencijalnih molekularnih biljega, koji će omogućiti razumijevanje patogeneze ovog karcinoma i otkrivanje lezija koje imaju veći rizik zloćudne preobrazbe.

Prateći studije koje dolaze iz različitih država Internacionalna udruga za istraživanje karcinoma je izvještala da je najučestaliji visokorizični HPV tip koji inficira cerviks HPV 16 (53%), HPV 18 (15%), HPV 45 (9%), HPV 31 (6%), HPV 33 (3%). 175 izvješća iz različitih krajeva svijeta govore da je HPV 16 najučestaliji dok pojavnost ostalih visokorizičnih tipova ovisi o geografskom položaju, demografskim kretanjima, kliničko-patološkim čimbenicima, a ovisi i o metodama detekcije.<sup>30</sup>

Metodom Inno Lipa testom koja je kombinacija PCR i reverzne hibridizacije izolirali smo više tipova koji se nisu mogli detektirati klasičnom PCR metodom. Prednost ove metode je u tome što smo mogli utvrditi i višestruke infekcije.

U radu smo proveli istraživanje na 102 pripravka DNK dobivenih iz arhivskih uzoraka tkiva vrata maternice, fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin, dobivenih biopsijom prije liječenja. 13 uzoraka (12,7%) su HPV DNA negativni. U ostalih 89 (87,3%) detektirali smo 9 različitih tipova HPV-a metodom PCR-a i Inno Lipa-e. Raspodjela tumor pozitivnih uzoraka i tip HPV-a prikazani su u tablici 9. HPV 16 je u našem uzorku najčešći tip s učestalošću 75,5%. Drugi po učestalosti je HPV 18 i HPV 58 (5,9%), a učestalost ostalih je 1–3%. HPV infekcija u premalignim lezijama i u cervikalnom karcinomu je u nizu objavljenih radova između 48 i 100%. Naši rezultati su slični (87,3%). Objavljeni rezultati o HPV 16 kao najčešćem tipu

između 44 i 84% prate naši rezultati od 75%.<sup>31</sup> Iza njega slijedi HPV 18 s pojavnosću 2–39%.<sup>32</sup> Naši rezultati bliži su donjoj granici. HPV 16 i HPV 18 čine u našoj studiji oko 80% svih HPV tipova. To ukazuje na postojanost povezanosti između njih i etiologije ranog invazivnog cervikalnog karcinoma.

Prema našem istraživanju u najvećem broju tumora u kojima je HPV DNA pozitivan pronašli smo infekciju samo jednim tipom HPV-a (93,1%). U samo 7 slučajeva pronašli smo miješanu infekciju (6,9%). U radu Graflunda i sur.<sup>32</sup> učestalost miješanih infekcija bila je 23,6%.

Skupina naših bolesnica s miješanom infekcijom imala je statistički značajno lošiju prognozu od onih inficiranih jednim tipom HPV-a. U studiji Pilcha i sur.<sup>33</sup> kao i kod Graflunda i sur.<sup>32</sup> pokazano je da je infekcija tipom HPV 16 i 18 povezana s češćim zahvaćanjem limfnih čvorova, limfokapilarnih prostora i širenja u parametrije, odnosno da imaju lošiju prognozu. Girardi i sur. nalaze lošiju prognozu bolesnica s HPV 16 pozitivnim karcinomom cerviksa. Međutim, suprotno njima neki autori ne nalaze povezanost HPV-statusa i lošije prognoze.<sup>31–33</sup> Do sada je bila uvriježena činjenica da je HPV 18 povezan s adeno komponentom dok je HPV 16 češći kod planocelularnog histološkog tipa. Međutim, mnogi radovi to demantiraju.<sup>32,33</sup> U našoj studiji HPV 18 našli smo u jednom slučaju planocelularnog karcinoma, jednom kod adenokarcinoma i u dva slučaja adenokvazoznog karcinoma.

## Literatura

- Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Služba za epidemiologiju: Incidencija raka u Hrvatskoj/Cancer incidence in Croatia. Bilteni 1-25. Zagreb, 1983–2002.
- Rigoni-Stern D. Fatti statistici relativi alle malattie cancerose. *G Serv Prog Pathol Therap* 1842;2:507–517.
- zur Hausen H. Condyloma acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36:794.
- Schwarz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W i sur. Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111–4.
- Yee C, Krishnan-Hewlett Z, Baker CC et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985;119:361–6.
- Evander M, Frazer IH, Payne E i sur. Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71:2449–56.
- Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M et al. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987;61:1061–6.
- Schneider JF, McGlennen RC, LaBresh KV et al. Rhesus papillomavirus type 1 cooperates with activated ras in transforming primary epithelial rat cells independent of dexamethasone. *J Virol* 1991;65:3354–8.
- Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA et al. The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5086–5090.
- Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:702–706.
- Howley PM. Papillomaviridae and their replication. U: Fields BN, Kriple DM (ur.). *Fundamental virology*. New York: Raven Press, 1990, str.1625–1650.
- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissman L, Chaper I. HPV in etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24(Suppl.3):S1–7.
- Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis M (ed). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990:153.
- FIGO stageings and classification of cancer of the cervix. *J Epidemiol Biostat*. 2001;6(1):42.
- Di Saia PJ, Creasman WT. *Clinical Gynecologic Oncology*. 6th ed. St.Louis: Mosby 2002:53–110.
- Shingleton HM, Orr JW. *Cancer of the Cervix*. 1-st ed. Philadelphia: Lipincott Co, 1995.
- Markman M, Belinson JL. *Expert Consultation in Gynecological Cancers*. 1-st ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1997:379–477.
- Burghardt E, Baltezer J, Tulusan AH, Haas J. Results of surgical treatment of early cervical cancer. 6-th Congress of the European Society for Gynecologic and Obstetric Investigation, Madonna di Campiglio (Italy), April 7–13, 2002.
- Šamija M, Krajina Z, Purišić A. *Radioterapija*. 1. izd., Zagreb: Nakladni zavod Globus 1996:11–177.
- Ćorušić A, Babic D, Ilic-Forko J et al. Analysis of some prognostic parameters in patients with invasive cervical carcinoma in relation to the modality of treatment. U: Pecorelli S, Atlante G, Benedetti-Panici P, Mancuso S (eds). *International Gynecologic Cancer Society, Bologna: Monduzzi* 1999:367–70.
- Jukic S. *Patologija ženskog spolnog sustava*. 3. izd; Zagreb: AGM; 1999:85–101.
- Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998;17:2943–2954.
- Grieder CW. Telomerase activation: one step on the road to cancer? *Trends Genet* 1999;15:109–112.
- Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. The human papilloma virus 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988;53:539–547.
- Smotkin D, Wettstein FO. The major human papillomavirus protein in cervical cancer is a cytoplasmatic phosphoprotein. *J Virol* 1987;61:1686–9.
- McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* 1993;67:3142–50.
- Davies R, Hicks R, Crook T et al. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1993; 67:2521–2528.
- Nevins JR. Transcriptional regulation. A closer look at E2F. *Nature* 1992;358:375–6.
- Münger K, Phelps WC, Bub B et al. The E6 and E7 gene of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for

transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63:4417–21.

30. Lo KWK, Cheung TH, Chung TKH et al. Clinical and prognostic significance of human papilloma virus in Chinese population of cervical cancer. *Gyn Obstet Investigation* 2001; 51:202–7.

31. Bar JK, Harlozinska A, Sedlaczek P et al. Relations between the expression of p53, c-erbB-2, Ki-67 and HPV infection in cervical carcinomas and cervical dysplasia. *Anticancer Res* 2001;21:1001–6.

32. Graflund M, Sorbe B, Sigurdardottir S et al. HPV-DNA, vascular space invasion, and their impact on the clinical outcome in early stage cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2004; 14:896–902.

33. Pilch H, Gunzel S, Schafer U et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 year experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11:39–48.

*Članak primljen:* 31. 03. 2010.; *prihvaćen:* 27. 07. 2010.

*Adresa autora:* Dr. sc. Joško Lešin, Klinika za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, Petrova 13, 10000 Zagreb, e-mail: anita.horvatin@mef.hr

\* \* \*

**VIJESTI  
NEWS**

## XXXII ALPE ADRIA MEETING OF PERINATAL MEDICINE

Bassano del Grappa, Italia, October 15–16, 2010

### Friday 15<sup>th</sup> October Morning. Topic 1 – Excessive weight in Perinatology

**Introductory Lectures.** Excessive Weight in Perinatal Medicine. **Josip Djelmiš** – Croatia

Pediatric aspects of excessive birth weight (4000 g or above). **H. Orvos** – Hungary.

**Obstetric lectures:** Maternal weight and pregnancy outcome. **M Ivanišević**. Croatia • Mode of delivery and complications in macrosomic babies retrospective analysis from 2005 to 2009. **M. Ballon**. Austria • Outcome of pregnancy and delivery in women with high BMI. **B. Šajina-Stritar**. Slovenia • Obesity: Risk factor for complications during pregnancy. **T. Bitó**. Hungary • Fetal Overgrowth. **G. D'Ottavio**. Italy.

**Pediatric lectures:** Effects of maternal overweight/obesity on neonatal outcome. **E. Juretić**. Croatia • Macrosomia and the risk for neonatal hypoglycaemia. **T. Freidl**. Austria • Newborns in women with high BMI. **H. Mole**. Slovenia • Macrosomic infants in our neonatal department – A macro dilemma? **Z. Gyurkovits**. Hungary. • Metabolic disorders in macrosomic neonates. **P. Brovedani**. Italy.

### Friday Afternoon – Free communications session (14,30–17,30)

**Special Lectures.** The Late Preterm and Early Term Deliveries – A Matter of Concern? **G. Mandruzzato**

Preterm labor: The role of infection. **M. T. Gervasi**

### Saturday 16<sup>th</sup> October Morning. Topic 2. PROM and PPRM

**Introductory Lectures.** PROM & PPRM. **G. Kavšek**. Slovenia

Neonatal consequences of PPRM and the fetal inflammatory response syndrome.

**B. Recsh**. Austria

**Obstetric lectures:** Pregnancy and delivery in pregnant patients with PROM **Invited** and PPRM. **S. Škrablin**. Croatia • Preterm Premature Rupture of Membranes 24–34 weeks of gestation: Management and Analysis of the cases at the Department of Obstetrics, Medical University Graz between 2003 – 2009. **M. Bauer**. Austria – Management and outcome of pregnancy in PPRM before 32 weeks. **A. Trojnar-Bregar**. Slovenia. • Consequences of PPRM. **Mészáros Gyula**. Hungary – PROM at term. To wait or not to wait. **Y. Meir**, Italy.

**Pediatric Lectures:** Effects of PROM and PPRM on early neonatal outcome, **Gverić-Ahmetašević S**. Croatia • Preterm neonates with periventricular leucencephalomalacia after premature rupture of the membranes at the NICU Graz. **G. Pichler**. Austria. • Neutrophil defensins, interleukin-6 and lipopolysaccharide binding protein as markers of chorioamnionitis, fetal inflammation and neonatal infection after PPRM. **M. Lucovnik**. Slovenia • The manifestation and outcome of neonatal infections originating from premature rupture of the membranes. **M. Katona**. Hungary. • PPRM Chorioamnion inflammatory scores and neonatal respiratory outcome. **V. Zanardo**. Italy.

**Informations.** *RegistraRetio* is free of charge. **Official language** is English. **The program** will be sent after request by mail to the following address: ogn@aslbasano.it.

**Local Organizing Committee:** Yoram Meir, Cocco Andrea, De Toni Anna, Falconi Gabriele, Perin Daniela, Tinelli Rafaele. **Secretary:** Elena Mancin. Operative Unit of Obstetrics and Gynaecology. San Bassano Hospital. Via dei Lotti, 40. 36061 Bassano del Grappa VI. Tel. +39-0424-888502; Fax. +39-0424-888501; E-mail: ogn@aslbasano.it