



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ena Pešut

**ANALIZA PROTEINSKOG PROFILA U
STANICAMA INTRAEPITELNIH LEZIJA
VRATA MATERNICE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ena Pešut

**PROTEIN PROFILE ANALYSIS OF
CELLS FROM INTRAEPITHELIAL
CERVICAL LESIONS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu u suradnji s laboratorijem za citometriju CLIP (eng. *Childhood Leukaemia Investigation Prague*) Zavoda za dječju hematologiju i onkologiju Drugog Medicinskog fakulteta u Pragu u Češkoj te patološko-citološkim laboratorijima Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Opće bolnice Zabok pod vodstvom dr.sc. Ivana Sabola, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ŽIVOTOPIS MENTORA

Ivan Sabol diplomirao je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na studiju Molekularna Biologija 2004. godine. Dobitnik je Rektorove nagrade za akademsku godinu 2002./2003. Nakon toga započeo je raditi na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju te doktorirao na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2011. godine. Tijekom svoje karijere bavio se molekularnom virologijom i ljudskim papiloma virusom. Od 2020. do 2024. je bio voditelj znanstvenog projekta *Multifactor analysis of HPV infected cells in cervical cancer development* (HRZZ IP-2019-04-3403) te je 2021. godine postao voditelj Laboratorija za molekularnu bakteriologiju i virologiju.

Smatram da profesionalno posebnu i najveću zahvalnost dugujem dr. sc. Ivanu Sabolu! Hvala Vam na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju.

Posebna zahvala dr. sc. Ivani Šimić na iskazanoj pomoći, savjetima, prijateljstvu, osloncu te savršenoj suradnji tijekom izrade ovog istraživanja.

Zahvaljujem svim sadašnjim i bivšim članovima Laboratorija za molekularnu virologiju i bakteriologiju, a posebno Jasminki Golubić Talić, bacc. med. lab. diagn., dr. sc. Nini Milutin, dr. sc. Josipi Skelin Ilić, dr. sc. Luciji Lulić i dr.sc. Vjekoslavu Tomaiću za svu pomoć i ugodno okruženje rada.

Zahvaljujem dr. sc. Tomasu Kalini i svim njegovim suradnicima u Laboratoriju za citometriju u Pragu na odličnoj suradnji i izvrsnom obrazovanju.

Zahvaljujem patološko-citološkom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb te patološko-citološkom laboratoriju Opće bolnice Zabok na pomoći i odličnoj suradnji.

Zahvaljujem ginekološkim odjelima Opće bolnice Zabok i Specijalne bolnice Sveta Katarina na pomoći i odličnoj suradnji.

*Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima **Goranu i Sanji** te **bratu Hrvoju** koji su me potaknuli na doktorski studij, vjerovali u mene, bili najveća podrška i pružili mi najveću ljubav, prijateljstvo i sreću tijekom cijelog mog života.*

*Posebna najveća zahvala **Franku** koji je pokazao ogromno strpljenje, potporu i ljubav.*

Zahvaljujem mu što je bio moja najveća radost i utjeha koja me bodrila kroz sve probleme u životu, a posebno tijekom izrade doktorske disertacije. Hvala ti što vjeruješ u mene, čak i onda kada sama ne vjerujem u sebe. Hvala ti za najveći oslonac u životu!

Zahvaljujem se baki Kati, djedu Jozi, stricu Tomi i strini Lidiji, Dubravki, Sari, Lei, Filipu, Darku i Tanji te svim najboljim i prekrasnim prijateljima koji su me podupirali tijekom daljnjeg školovanja, poticali moju težnju prema ostvarivanju sve viših ciljeva i za sve što su učinili za mene.

I na kraju,

zahvaljujem svim kolegama i djelatnicima Instituta Ruđer Bošković koji su mi pomogli u stjecanju novog znanja i pružili priliku života.

ANALIZA PROTEINSKOG PROFILA U STANICAMA INTRAEPITELNIH LEZIJA
VRATA MATERNICE

ENA PEŠUT

Institut Ruđer Bošković

Rak vrata maternice četvrti je po učestalosti i smrtnosti u svijetu, a prethode mu prekancerozne intraepitelne lezije povezane s infekcijom ljudskim papiloma virusom. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati proteinski profil stanica ovisno o stupnju prekancerozne intraepitelne lezije i prisutnosti ljudskog papiloma virusa. U ovom istraživanju je na brisevima vrata maternice s prekanceroznim intraepitelnim lezijama utvrđena prisutnost ljudskog papiloma virusa lančanom reakcijom polimerazom, a proteinski profil masenom citometrijom i imunocitokemijom. Na biopstatima vrata maternice utvrđen je proteinski profil imunohistokemijom. Rezultati su pokazali da je masena citometrija prikladna za uspješnu analizu proteinskog profila na brisevima vrata maternice. Ekspresija proteina Ck18, Ck8, CD63, CD71, KLF4, LRIG1, E-kadherin, Nanog, p53, Ck17, MCM2, MMP7 i CD29 razlikovala se s obzirom na težinu stupnja prekancerozne lezije i prisutnost HPV-a.

(128 stranica, 38 slika, 15 tablica, 199 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: rak vrata maternice, HPV, CyTOF, SIL, CIN, LBC, protein

Mentor: dr.sc. Ivan Sabol, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači:

prof.dr.sc. Maja Matulić

izv.prof.dr.sc. Rosa Karlić

izv.prof.dr.sc. Rajko Fureš

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

PROTEIN PROFILE ANALYSIS OF CELLS FROM INTRAEPITHELIAL CERVICAL
LESIONS

ENA PEŠUT

Ruđer Bošković Institute

Cervical cancer is the fourth most common cancer in the world by incidence and mortality, and is preceded by precancerous intraepithelial lesions associated with human papillomavirus (HPV) infection. The aim of this study was to analyze the protein profile of cells depending on the stage of the precancerous intraepithelial lesion and the presence of HPV. In this study, the presence of HPV was determined on cervical swabs with precancerous intraepithelial lesions by polymerase chain reaction, and the protein profile was established by mass cytometry and immunocytochemistry. The protein profile of cervical biopsies was determined by immunohistochemistry. The results showed that mass cytometry was suitable for the successful analysis of the protein profile on cervical swabs. The expression of proteins Ck18, Ck8, CD63, CD71, KLF4, LRIG1, E-cadherin, Nanog, p53, Ck17, MCM2, MMP7, and CD29 differed with regard to the severity of the precancerous lesion and the presence of HPV.

(128 pages, 38 figures, 15 tables, 199 references, original in Croatian)

Keywords: cervical cancer, HPV, CyTOF, SIL, CIN, LBC, protein

Supervisors: Ivan Sabol, PhD, senior research associate

Reviewers:

Full professor Maja Matulić, PhD

Associate professor Rosa Karlić, PhD

Associate professor Rajko Fureš, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Osnove histologije i anatomije vrata maternice	4
2.2. Rak vrata maternice.....	7
2.2.1. Epidemiologija raka vrata maternice.....	7
2.2.2. Rizični čimbenici za nastanak RVM	9
2.2.3. Podjela raka vrata maternice	9
2.2.4. Prekancerozne promjene raka vrata maternice.....	12
2.2.5. Invazivni pločasti karcinom vrata maternice	15
2.3. HPV	16
2.3.1. Klasifikacija papiloma virusa.....	16
2.3.2. Struktura genoma	16
2.3.3. Replikacijski ciklus HPV-a	17
2.3.4. HPV i kancerogeneza	21
2.3.5. HPV i imunološki sustav	22
2.3.6. Cijepljenje protiv HPV-a.....	23
2.4. Testovi u dijagnozi raka vrata maternice i HPV-a	25
2.5. Masena citometrija	28
2.5.1. Princip i dijelovi masenog citometra.....	29
2.5.2. Prednosti i ograničenja	31
3. MATERIJALI I METODE.....	32
3.1. Popis kemikalija	32
3.2. Popis pribora i aparature	36
3.3. Popis programa za analizu podataka	38
3.4. Klinički uzorci.....	38

3.5.	Stanične linije	39
3.6.	Uzgoj staničnih linija <i>in vitro</i>	40
3.7.	Metode brojanja stanica	40
3.8.	Genotipizacija HPV	41
3.8.1.	Izolacija virusne DNA	41
3.8.2.	Lančana reakcija polimerazom	43
3.8.3.	Elektroforeza u agaroznom gelu	45
3.9.	Ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice masenom citometrijom	46
3.9.1.	Konjugacija antitijela s izotopom metala	48
3.9.2.	Titracija antitijela	49
3.9.3.	Obilježavanje pojedinačnih uzoraka paladijem (barkodiranje uzoraka)	53
3.9.4.	Površinsko i unutarstanično obilježavanje proteina te mjerenje na masenom citometru	55
3.9.5.	Analiza podataka	56
3.10.	Ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice imunocitokemijskom metodom	60
3.10.1.	Obilježavanje proteina	60
3.10.2.	Analiza podataka	62
3.11.	Ispitivanja ekspresije proteina na bioptatima vrata maternice imunohistokemijskom metodom	62
3.11.1.	Obilježavanje proteina	63
3.11.2.	Analiza podataka	64
4.	REZULTATI	66
4.1.	Prisutnost HPV-a	66
4.2.	Proteinski profil na brisevima vrata maternice masenom citometrijom	69
4.2.1.	Određivanje prisutnosti različitih stanica u cervikalnom epitelu	70

4.2.2.	Korelacija citoloških kategorija, HPV-a i proteina prilikom potrage za staničnim populacijama koje igraju ulogu u HPV prekanceroznim promjenama pomoću analize FlowSOM	74
4.3.	Ekspresija proteina na brisevima vrata maternice imunocitokemijom	84
4.3.1.	Ekspresija Ck10/13, 5 i ITGA6 na NORMAL citološkoj kategoriji brisa vrata maternice.....	84
4.3.2.	Ekspresija MMP7, E-kadherina i citokeratina 18 s obzirom na stupanj SIL-a	86
4.4.	Ekspresija proteina MMP7 i E-kadherina na bioptatima vrata maternice imunohistokemijskom metodom	87
5.	RASPRAVA	93
6.	ZAKLJUČCI.....	103
7.	POPIS LITERATURE	104
8.	ŽIVOTOPIS	120

1. UVOD

Svake godine u svijetu od raka vrata maternice (RVM) oboli više od 500 000 žena, a više od polovice tih žena umre (1). Prema procjenama GLOBOCAN-a za 2022. godinu, RVM je na četvrtom mjestu po učestalosti i smrtnosti kod žena diljem svijeta (1). Prema zadnjim dostupnim podacima Hrvatskog registra za rak, u 2021. godini u Republici Hrvatskoj (RH) je zabilježeno 268 novih slučajeva RVM-a (2).

Nastanku RVM-a prethode stanice s prekanceroznim promjenama koje se u citologiji nazivaju skvamozne intraepitelne lezije (SIL) i dijele se u dva stupnja: skvamozne intraepitelne lezije niskog stupnja (LSIL, eng. *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) i skvamozne intraepitelne lezije visokog stupnja (HSIL, eng. *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*) (3). Kasnije je uvedena i kategorija neodređene citologije, odnosno atipične skvamozne stanice (ASC, eng. *Atypical Squamous Cells*) (3). RVM i SIL povezani su s infekcijom visokorizičnim (HR, eng. *High-risk*) tipovima ljudskog papiloma virusa (HPV, eng. *Human papillomavirus*) koja se prenosi spolnim putem i odgovorna je za više od 95% slučajeva raka vrata maternice (4).

Vrat maternice pokrivaju dva biološki različita tipa epitela: ektocervikalni i endocervikalni epitel (5). Ektocervikalni epitel je građen od stratificiranog pločastog epitela, a endocervikalni od jednorednog visokog stupačastog epitela (5). Važno je reći da su u stratificiranom skvamoznom epitelu četiri različita sloja epitelnih stanica: superficijalni (površinski), intermedijarni, parabazalni i bazalni sloj stanica, a u endocervikalnom epitelu se susreću tri tipa cilindričnih stanica (sekretorne, cilijarne i rezervne stanice) te endometrijske stanice (6). Spomenuta dva biološki vrlo različita epitela se spajaju u području vanjskog cervikalnog ušća tvoreći skvamokolumnarnu granicu i nastaju procesom diferencijacije (sazrijevanja) u kojem stanice nižeg sloja epitela, mitotski aktivne bazalne stanice ektocerviksa i rezervne stanice endocerviksa sazrijevaju u stanice u višem sloju epitela (6).

Smatra se da HPV ulazi u bazalni sloj ektocerviksa kroz mikroranu, ili ako se radi o cerviksu, može biti i područje skvamokolumnarne granice (7). U normalnoj produktivnoj infekciji, zaražene bazalne stanice čine rezervoar infekcije, te u tim stanicama virusni genom se održava kao episom s malim brojem kopija (7). Dok se te stanice dijele, one proizvode stanice kćeri koje se diferenciraju i nalaze u višim slojevima epitela (7). I dalje se odvija diferencijacija, ali inficiranih stanica (7). Različiti događaji u replikacijskom ciklusu virusa odvijaju se u različitim dijelovima epitela (7).

Ako imunološki sustav domaćina ne ukloni virusnu infekciju i ona potraje nekoliko godina, to može dovesti do prekanceroznih lezija i konačno do razvoja RVM (7). SIL i RVM se mogu dijagnosticirati citološkim i histološkim metodama, dok se prisutnost HPV-a detektira molekularnim metodama (8). Kasnije su uvedene i imunokemijske metode dokazivanja proteina (8). Mogu se određivati proteini povezani s prisutnošću HPV-a ili sa staničnom proliferacijom (8).

Dosadašnja istraživanja nisu dovoljno pažnje pridavala biološkim razlikama stanica i njihovim različitim proteinskim profilima. Smatra se da je bazalni sloj epitela heterogen i sadrži stanice različitog replikacijskog potencijala i stupnja diferencijacije te bi različiti profil mogao ukazivati na različiti rizik progresije bolesti, ali i usmjeriti daljnja istraživanja u staničnoj signalizaciji i HPV interakcijama.

Cilj ove disertacije je analizirati proteinski profil stanica ovisno u stupnju prekancerozne cervikalne promjene masenom citometrijom. Proteinski će se profil povezati i s prisutnošću ljudskog papiloma virusa.

Analiziranjem proteinskog profila prekanceroznih lezija raka vrata maternice postavljaju su se sljedeće hipoteze istraživanja:

1. Postoji razlika u ispoljenim proteinima među ispitnim grupama prekanceroznih lezija koje se ispituju metodom masene citometrije.
2. Postoji razlika u ispoljenim proteinima s obzirom na prisutnost HPV-a među ispitnim grupama prekanceroznih lezija koje se ispituju metodom masene citometrije.
3. U odabranim proteinima koji su se pokazali najrelevantniji za daljnja istraživanja u kliničkom i molekularnom pristupu postoji razlika u njihovoj ekspresiji među ispitnim grupama prekanceroznih lezija koje se ispituju imunocitokemijskom i imunohistokemijskom metodom.

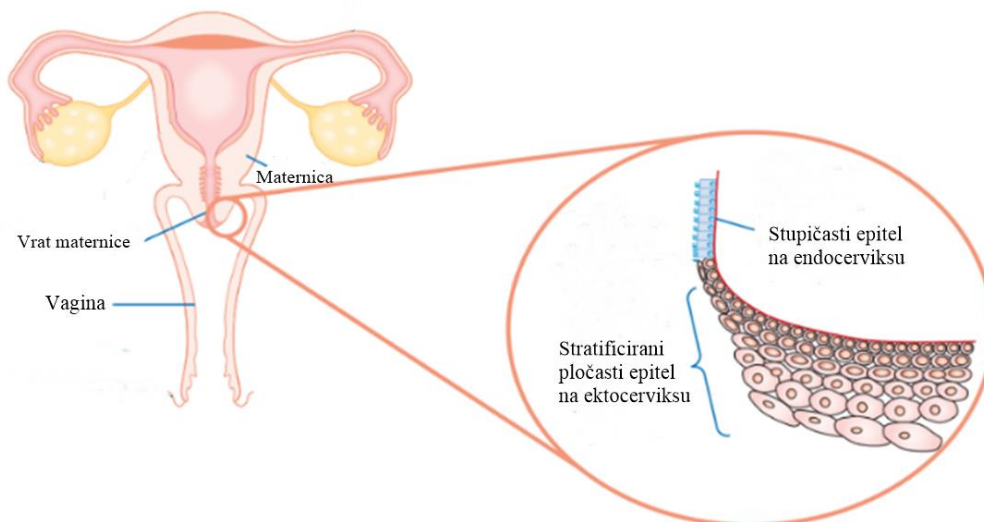
Istraživanje se provelo na tumorskim staničnim linijama, bioptatima tkiva vrata maternice te brisevima vrata maternice koji su uzeli specijalisti ginekologije sa citološkom četkicom te stavili u medij za tekućinsku citologiju (LBC, eng. *Liquid based cytology*) u ginekološkim ambulantama. Korištene eksperimentalne metode u istraživanju su detekcija HPV-a uz pomoć lančane reakcije polimerazom PCR (eng. *Polymerase chain reaction*) te ispitivanje ekspresije proteina pomoću masene citometrije, imunocitokemije i imunohistokemije. Analiza podataka se napravila pomoću programa za citometriju FlowJo™ v10 Software (BD Bioscience, SAD), Cytobank (Beckman Coulter, SAD), R (v4.1.1, SAD) te uz program Medcalc (v20.11, Belgija).

Ovim istraživanjem se uvode najsuvremenije metode u istraživanju RVM-e koje omogućuju istovremeno ispitivanje velikog broja proteina te bi moglo imati praktičnu primjenu u dijagnostici i prognozi RVM nakon daljnjih ciljanih istraživanja.

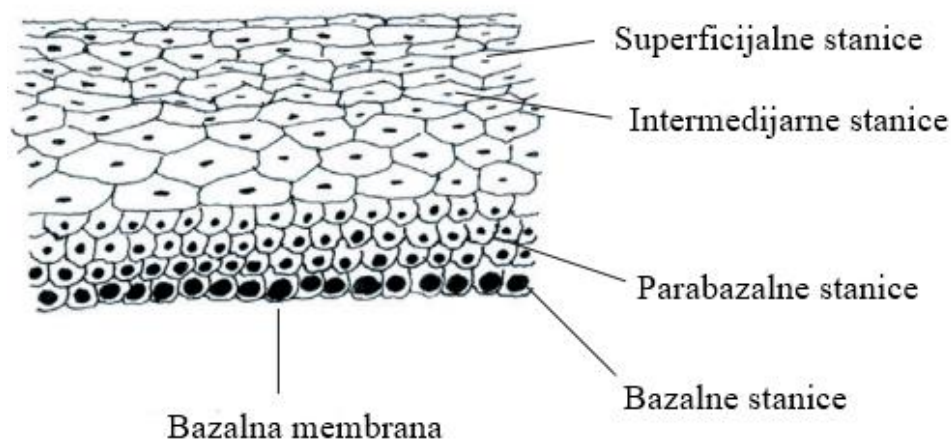
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Osnove histologije i anatomije vrata maternice

Za razumijevanje raka vrata maternice je potrebno poznavanje njegove histološke i anatomske građe (Slika 1) (9). Vrat maternice ili cerviks je fibromuskularni organ koji povezuje šupljinu maternice s vaginom (10). Kod žena odrasle dobi, cerviks je prosječno dugačak oko 3 centimetra i širok oko 2,5 centimetara te mu je oblik izdužen (5). Veličina mu može varirati tijekom života žene ovisno o reproduktivnoj dobi, menopauzi i porođajima (10). Vrat maternice dijelimo na donji dio koji se izbočuje u rodnicu (lat. *portio vaginalis*) i gornji dio koji se nalazi iznad vagine (lat. *portio supravaginalis*) (5). Cervikalnu stromu pokrivaju dva tipa epitela: ektocervikalni i endocervikalni epitel (5). Ektocervikalni epitel je građen od stratificiranog pločastog (skvamoznog) epitela i subepitelne strome, a endocervikalni od jednorednog visokog stupačastog (cilindričnog) epitela i žljezdane strome (5). Zreli pločasti epitel koji prekriva ektocerviks je stratificiran, nekeratiniziran i bogat glikogenom što ovisi o razini cirkulirajućeg estradiola tijekom života (5). U tom dijelu epitela razlikuju se četiri sloja stanica različitih veličina: bazalne (8-10 μm), parabazalne (15-25 μm), intermedijarne (30-60 μm) i superficijalne stanice (40-60 μm) (Slika 2) (6).



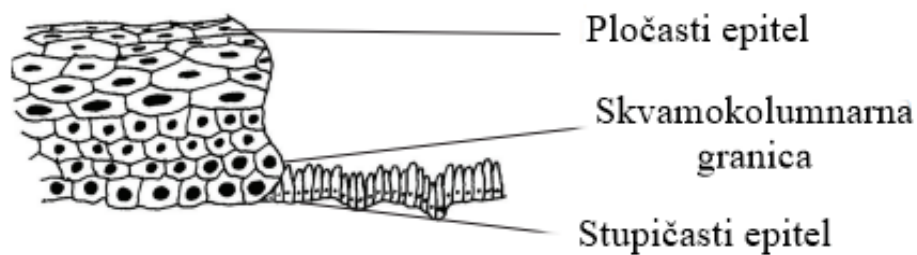
Slika 1. Histološka i anatomska građa vrata maternice. Preuzeto i prilagođeno prema Shambayati, 2011 (9).



Slika 2. Građa pločastog epitela ektocerviksa. Preuzeto i prilagođeno prema Prendiville i Sankaranarayanan, 2017 (10).

Okrugle bazalne stanice s velikom jezgrom i manjom citoplazmom su najniži sloj stanica pričvršćen na bazalnu membranu koja odvaja epitel od strome (10). Sposobne su se dalje dijeliti i sazrijevati u sljedeći sloj okruglih parabazalnih stanica s jezgrom koja zauzima polovinu stanice (10). Daljnje sazrijevanje tih stanica dovodi do intermedijarnih stanica koje su veće i poligonalnog oblika s obilnijom citoplazmom i manjom okruglom jezgrom (10). Najgornji sloj stanica čine superficialne stanice koje su izrazito velike i plosnate s malom piknotičnom jezgrom i prozirnom citoplazmom (6). U endocervikalnom epitelu se susreću tri tipa cilindričnih stanica (sekretorne, cilijarne i rezervne stanice) te endometralne stanice (6). Veličina ovih stanica varira od 8 do 25 μm (6). Stanice ovog epitela potječu od rezervnih stanica koje su nediferencirane, imaju sposobnost dijeljenja i diferencijacije u više različitih stanica ovisno o okolišnim uvjetima (9). Obično se diferenciraju u endocervikalne stanice, ali u određenim okolnostima i u pločaste epitelne stanice što se naziva pločasta metaplazija (9). Upravo ovaj proces u kojem mitotski aktivne bazalne stanice ektocerviksa i rezervne stanice endocerviksa sazrijevaju u određeni tip stanica se naziva diferencijacija ili sazrijevanje (9). Osim navedenih stanica, u području cerviksa mogu se pronaći i druge stanice poput leukocita, eritrocita i histiocita (makrofaga) ovisno o raznim fiziološkim i patološkim promjenama (6). Ektocervikalni i endocervikalni epitel spajaju se u području vanjskog cervikalnog ušća tvoreći skvamokolumnarnu granicu, čija lokacija varira ovisno o dobi, menstrualnom statusu i nekim drugim faktorima kao što su trudnoća i upotreba oralnih kontraceptiva (Slika 3) (5).

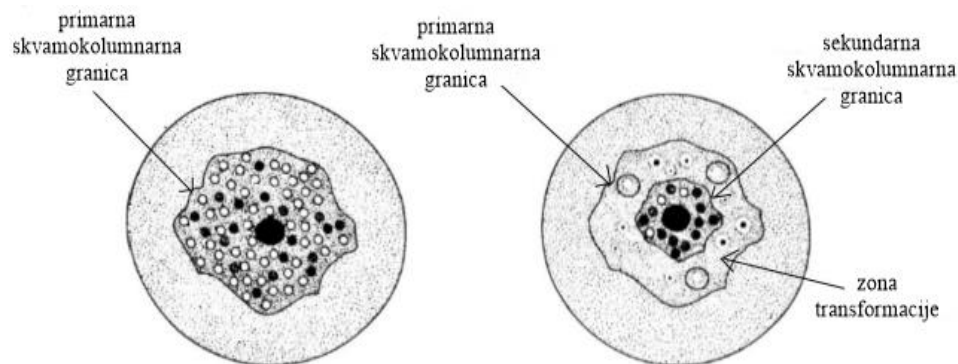
Skvamokolumnarna granica ima oblik oštre linije sa stepenicom nastalom zbog razlike u visini skvamoznog i cilindričnog epitela (10).



Slika 3. Skvamokolumnarna granica. Preuzeto i prilagođeno prema Prendiville i Sankaranarayanan, 2017 (10).

Originalna ili primarna skvamokolumnarna granica je vidljiva tijekom djetinjstva, perimenarhalno, nakon puberteta i u ranom reproduktivnom periodu te predstavlja spoj cilindričnog epitela i „originalnog“ skvamoznog epitela nastalog tijekom embriogeneze i intrauterinog života (10). Tijekom djetinjstva i perimenarhalnog razdoblja, originalna skvamokolumnarna granica nalazi se na ili blizu vanjskog ušća cerviksa, dok se nakon puberteta i tijekom reproduktivnog perioda nalazi na ektocerviksu (10). Tijekom reproduktivnog perioda do perimenopauze dolazi do metaplazije (promjene ili zamjene jedne vrste epitela drugim) zbog kisele iritacije sredine vagine i utjecaja estrogena (10). Tako se formira nova (sekundarna) skvamokolumnarna granica između novoformiranog metaplastičnog pločastog epitela i preostalog cilindričnog epitela na ektocerviksu koja se postupno pomiče prema vanjskom ušću (10). Prvi znak ovakve pločaste metaplazije je pojava i proliferacija rezervnih stanica koje se diferenciraju i prvotno stvaraju tanki epitel nezrelih pločastih stanica, a potom zreli stratificirani metaplastični epitel koji nalikuje originalnom stratificiranom pločastom epitelu što je normalna promjena u cerviksu (10). Međutim, kod vrlo malog broja žena se može razviti u atipični (displastični) epitel pod utjecajem infekcije onkogenim tipovima HPV-a koji može perzistentno inficirati bazalne nezrele pločaste metaplastične stanice i pretvoriti ih u atipične stanice s nuklearnim i citoplazmatskim abnormalnostima (10). Nekontrolirana proliferacija i širenja tih atipičnih stanica može dovesti do stvaranja abnormalnog displastičnog epitela, koji može regredirati u normalni, perzistirati kao displazija ili nakon više godina progredirati u invazivni karcinom (10). Upravo ovo područje cerviksa gdje dolazi do zamjene epitela naziva se zona transformacije čije

identificiranje je ključno jer se tu gotovo isključivo odvija proces cervikalne karcinogeneze (Slika 4) (10).

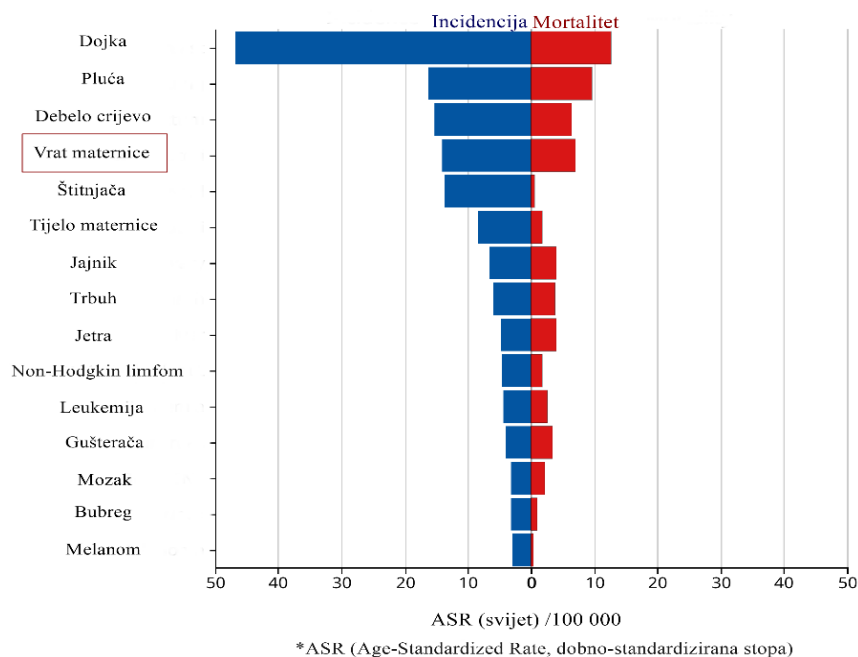


Slika 4. Prikaz zone transformacije. Preuzeto iz Ljubojević, 2001 (11).

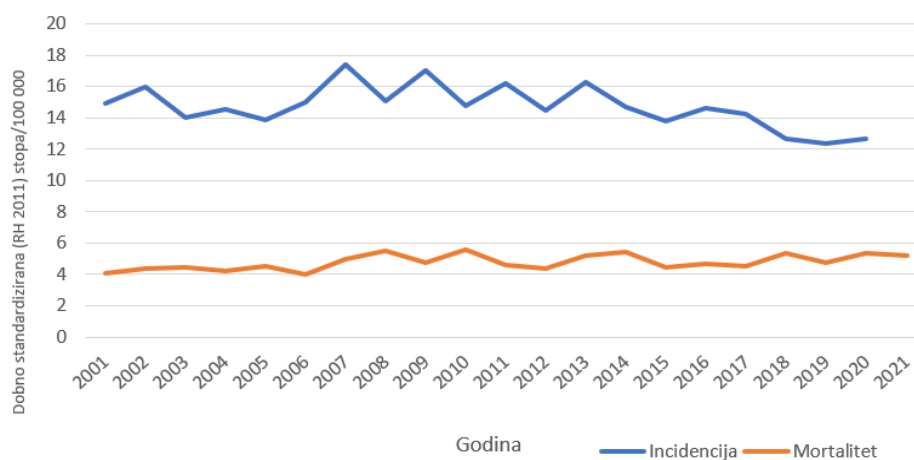
2.2. Rak vrata maternice

2.2.1. Epidemiologija raka vrata maternice

Svake godine više od 500.000 žena oboli od raka vrata maternice, a više od polovice tih slučajeva završi smrću (12). Prema procjenama GLOBOCAN-a za 2022. godinu, RVM je na četvrtom mjestu po učestalosti (6,8% svih slučajeva raka) i smrtnosti (8,1% svih smrti od raka) kod žena diljem svijeta (Slika 5) (12). Najveći udio novih slučajeva (70%) i smrti (85%) zabilježen je u zemljama u razvoju (12). Prema zadnjim dostupnim podacima Hrvatskog registra za rak, u 2021. godini u Hrvatskoj su zabilježena 268 nova slučaja RVM-a (2). U dobnim skupinama 45-49 godina (26/100 000) te 55-59 godina (25/100 000) stopa incidencije je bila najveća (2). U posljednjih evidentiranih 10 godina u Hrvatskoj bilježi se blagi trend pada standardizirane stope incidencije RVM-a, dok je mortalitet stabilan (Slika 6) (13). Prema procjenama Europske komisije za 2020. godinu, Hrvatska se nalazi na 11. mjestu od 27 zemalja Europske unije prema incidenciji i mortalitetu RVM-e (13).



Slika 5. Procijenjene dobnostandardizirane stope incidencije i mortaliteta raka u svijetu za žene svih dobi u 2022. godini. Preuzeto i prilagođeno: <https://gco.iarc.who.int/today/> (12).



Slika 6. Trend dobnostandardizirane stope incidencije i mortaliteta raka vrata maternice u Hrvatskoj, 2001.-2021. Preuzeto: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/nacionalni-dan-borbe-protiv-raka-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/> (13).

Virusi koji uzrokuju rak poznati su kao onkovirusi (14). U onkoviruse se ubraja i HPV koji uzrokuje više od 95% slučajeva raka vrata maternice (4). Osim toga, HPV uzrokuje i velik broj infekcija koje su odgovorne i za rak u drugim anatomskim područjima poput vagine, vulve, penisa, anusa, glave i vrata (8). HPV infekcija je jedna od najčešćih spolno prenosivih

infekcija (15). Smatra se da će 80% spolno aktivnih žena i muškaraca steći HPV infekciju do 45 godine života (16). Također je važno je reći da je prevalencija HPV najveća kod žena ispod 35 godina, smanjuje se s godinama, ali se nakon 45 godine opet povećava (8). Stoga je glavni direktor Svjetske Zdravstvene Organizacije (SZO) (WHO, eng. *World Health Organization*) 2018. godine pozvao na djelovanje u pravcu uklanjanja RVM kao javnozdravstvenog problema (17). Ciljevi takve globalne strategije za eliminaciju RVM-e koje bi države trebale ispuniti do 2030. godine su dostizanje 90% HPV cijepljenih djevojčica u dobi od 15 godina, 70% žena pregledanih probirnim citološkim testom do 35 godine i ponovno do 45 godine života te 90% žena s identificiranim RVM koje se liječe (17).

2.2.2. Rizični čimbenici za nastanak RVM

Jedan od glavnih čimbenika rizika za nastanak RVM je spomenuta izloženost HPV infekciji koja ovisi o ranom stupanju u spolne odnose, velikom broju spolnih partnera ili promiskuitetnom partneru (18). Osim toga, smatra se da višestruke trudnoće (više od petero djece), pušenje duhana te dugo korištenje oralne kontracepcije (5 ili više godina) povećavaju rizik za RVM (18). Ostali vrlo važni čimbenici su i koinfekcije s drugim spolnom prenosivim infekcijama (18). Najveća povezanost je pronađena s virusom ljudske imunodeficijencije (HIV, eng. *Human immunodeficiency virus*) koja pokazuje da su žene koje su izložene HIV-u najvjerojatnije i HPV pozitivne (19). Pronađene su i povezanosti s infekcijom *Chlamydia trachomatis* i virusom herpes simpleks (HSV, eng. *Herpes simplex virus*) (18). Svi su ovi čimbenici dodatno potencirani slabijim socioekonomskim statusom i obrazovanjem (20). Spomenuti čimbenici su egzogene prirode, te je važno reći da postoje i razni endogeni molekularni mehanizmi na genetičkoj i epigenetičkoj razini koji se pojavljuju u uznapređovalom stadiju RVM (20).

2.2.3. Podjela raka vrata maternice

Prema klasifikaciji SZO, rak vrata maternice se dijeli u maligne epitelne tumore, mezenhimske i lezije nalik tumoru, epitelno-mezenhimske tumore te izuzetno rijetke primarne melanome cerviksa, limfoidne i hematopoetske tumore, tumore stanica germinativnog epitela i sekundarne tumore (21). Najčešći maligni epitelni tumori su karcinomi pločastog epitela (75–90%), adenokarcinomi i adenoskvamozni karcinomi (10–25%), dok su ostali maligni epitelni tumori (bazalni adenoid, cistični adenoid, nediferencirani i neuroendokrini) rijetki (<5%) (22). Prema SZO, karcinomi pločastog epitela vrata maternice histološki se stupnjuju na temelju načina rasta i prisutnosti keratinizacije, pa se razlikuju dvije velike skupine,

keratinizirani i češći nekeratinizirani tip (21). Histološki stupanj težine bolesti temelji se na stupnju keratinizacije, citološkoj atipiji i mitotskoj aktivnosti (21). Stupanj proširenosti bolesti određuje se primarno na osnovi klasifikacije TNM koja sadrži podatke o: T – veličini tumora, N – broju i statusu limfnih čvorova i M – udaljenim metastazama (23). Stupnjevanje TNM određuje multidisciplinarni tim na osnovi kliničkih, radioloških i patohistoloških nalaza te je uz njega potrebno i navesti klasifikaciju Međunarodne organizacije za ginekologiju i porodništvo (FIGO, eng. *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique*) (24). Klasifikacija FIGO je upotpunjena 2018. godine uključanjem radiološke obrade i patohistološkog nalaza (Tablica 1) (25). Svakom slovu se pridružuje broj koji za primarni tumor opisuje veličinu ili eventualnu lokalnu invaziju, a kod regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza njihovu zahvaćenost odnosno prisutnost (24).

Tablica 1. Klasifikacije tumora FIGO i TNM.

T KATEGORIJA	FIGO STADIJ	DEFINICIJA
TX		Primarni tumor se ne može procijeniti
T0		Nema dokaza o primarnom tumoru
T1	I	Karcinom cerviksa ograničen na maternicu (infiltrat tumora u korpus maternice treba zanemariti)
T1a	IA	Invazivni karcinom dijagnosticiran mikroskopski. Stromalna invazija s maksimalnom dubinom do 5 mm
T1a1	IA1	Izmjerena stromalna invazija <3mm u dubini
T1a2	IA2	Izmjerena stromalna invazija ≥ 3 mm i < 5mm
T1b	IB	Invazivni karcinom s izmjerenom najdubljom stromalnom invazijom ≥ 5 mm (veća od faze IA), lezija ograničena na maternični vrat
T1b1	IB1	Invazivni karcinom s dubinom stromalne invazije ≥ 5 mm i tumorom manjim od 2 cm u najvećoj dimenziji
T1b2	IB2	Invazivni karcinom koji je ≥ 2 cm i < 4 cm u najvećoj dimenziji
T1b3	IB3	Invazivni karcinom ≥ 4 cm u najvećoj dimenziji

Tablica 1. – nastavak.

T2	II	Karcinom vrata maternice proširen izvan maternice, ali ne infiltrira zdjeličnu stijenku niti donju trećinu rodnice
T2a	IIA	Tumor zahvaća gornje dvije trećine rodnice, ali bez infiltracije parametrija
T2a1	IIA1	Invazivni karcinom < 4cm u najvećoj dimenziji
T2a2	IIA2	Invazivni karcinom ≥4cm u najvećoj dimenziji
T2b	IIB	Karcinom vrata maternice koji infiltrira parametrij, ali ne do zdjeličnog zida
T3	III	Karcinom zahvaća donju trećinu rodnice i / ili se proteže do zdjelične stijenke i / ili uzrokuje hidronefroziju ili ometa funkciju bubrega i / ili zahvaća limfne čvorove zdjelice i / ili para-aortne
T3a	IIIA	Tumor koji zahvaća donju trećinu rodnice, ali se ne proteže do zdjelične stijenke
T3b	IIIB	Tumor koji se proteže na stijenku zdjelice i/ili uzrokuje hidronefroziju ili zatajenje bubrega
T3c	IIIC	Prisutne metastaze u zdjeličnim i/ili paraaortnim limfnim čvorovima, bez obzira na veličinu i opseg tumora
	IIIC1	Prisutne metastaze samo u zdjeličnim limfnim čvorovima
	IIIC2	Prisutne metastaze u paraaortnim limfnim čvorovima
T4	IV	Tumor koji se proširio izvan zdjelice ili infiltrira sluznicu mokraćnog mjehura ili rektuma (infiltrat u sluznici dokazan patohistološki biopsijom)
	IVA	Tumor infiltrira sluznicu mokraćnog mjehura ili rektuma
	IVB	Tumor se proširio na udaljene organe

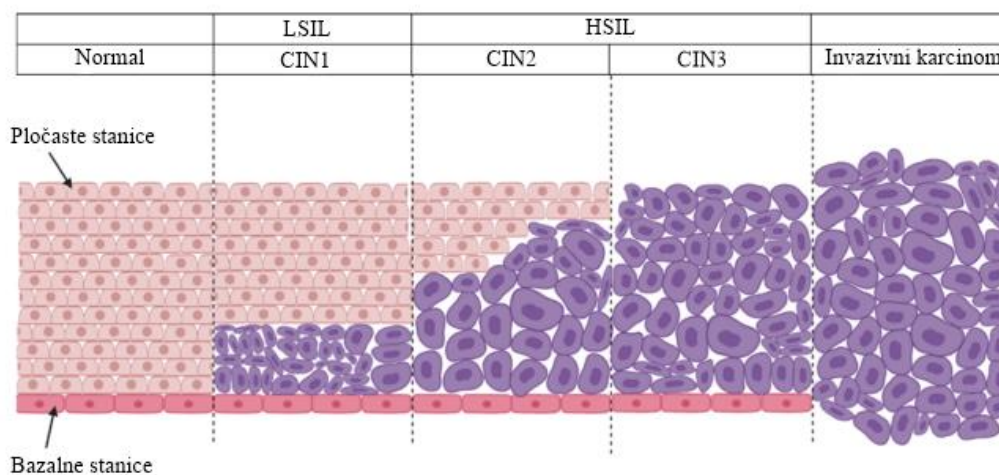
T – veličina tumora, N – broj i status limfnih čvorova, M – udaljene metastazame, I-IV– stadij tumora prema FIGO (Međunarodna organizacija za ginekologiju i porodništvo) klasifikaciji (24).

2.2.4. Prekancerozne promjene raka vrata maternice

Prve početke prekanceroznih promjena RVM-e je u svom radu opisala poznata znanstvenica i ginekologinja Lynette Denny nagrađena od strane Međunarode agencije za istraživanje raka (IARC, eng. *International Agency for Research on Cancer*) koja navodi da su prve primijećene neinvazivne epitelne abnormalnosti dobile zajednički naziv *karcinom in situ* (CIS, eng. *Carcinoma in situ*) te su pronađene u blizini invazivnih lezija vrata maternice (26,27). Nakon toga su počela nova istraživanja koja su pokazivala da se kod žena koje su biopsijom dobile dijagnozu CIS i nisu liječene se razvio rak vrata maternice nakon nekoliko godina kasnije (26). 1950-ih je postalo očito da postoji i još jedna velika skupina cervikalnih lezija koje su imale neke karakteristike CIS-a, ali u manje uznapredovanom stadiju i tada je po prvi put uveden pojam displazija (atipične stanice) (26). 1968. godine je uveden sustav klasifikacije cervikalne intraepitalne neoplazije (CIN) koja je razlikovala stupnjeve displazije (26). Stoga, patohistološke dijagnoze klasificiraju CIN u 3 stupnja: CIN1 (blaga displazija), CIN2 (umjerena displazija) i CIN3 (teška displazija) (26,28). Nakon toga 1988. je prvi put predstavljena Bethesda klasifikacija cervikalne citologije koja se i danas koristi (29). Prema Bethesda, prekancerozne lezije raka vrata maternice su kategorizirane u skvamozne intraepitelne lezije niskog stupnja (LSIL) i visokog stupnja (HSIL) (3). Kasnije je uvedena i siva zona interpretacije citoloških nalaza koja predstavlja dvosmislene abnormalnosti pločastih stanica (ASC), odnosno neodređena citologija u koju spadaju kategorije atipične skvamozne stanice neodređenog značaja (ASC-US, eng. *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) i atipične skvamozne stanice kod kojih se ne može isključiti HSIL (ASC-H, eng. *Atypical Squamous Cells-HSIL cannot be excluded*) (3). Tablica 2 sažeto prikazuje citološku i histološku podjelu prekanceroznih lezija raka vrata maternice (3,26,28). CIN1 je ekvivalentan LSIL-u, a s obzirom na poteškoće u razlikovanju citoloških pojavljivanja između CIN2 i CIN3, sustav Bethesda spojio je ove dvije grupe u HSIL (28). Slika 7 prikazuje pregled progresije raka vrata maternice u kojoj se vidi da cervikalna intraepitelna neoplazija može napredovati do invazivnog raka utjecajem perzistentne visokorizične HPV infekcije. Kod CIN1 (LSIL) displazija se pojavljuje u donjoj 1/3 ili manje epitela. CIN2/3, odnosno HSIL ima signifikantno više displazije u epitelu (28). Napredovanje tih lezija do invazivnog karcinoma je pod utjecajem raznih faktora poput tipa HPV-a, dobi žene u trenutku infekcije, imunoloških, hormonskih i genetičkih faktora (Slika 8) (9).

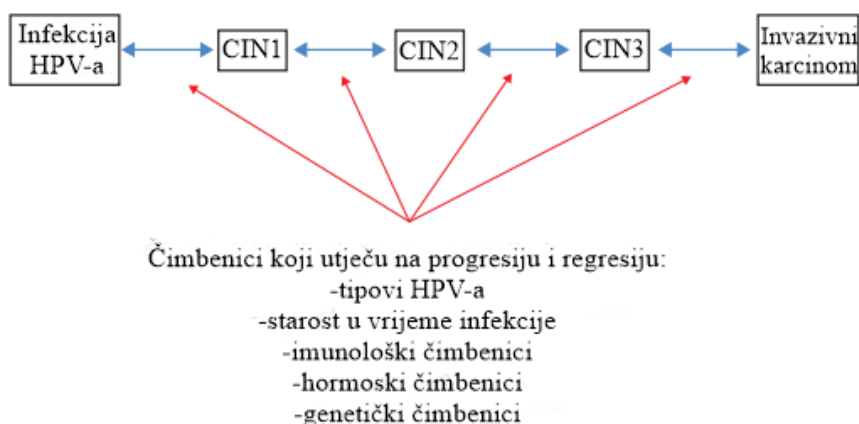
Tablica 2. Prikaz citološke i patohistološke klasifikacije prekanceroznih lezija raka vrata maternice (3,26,28).

Bethesda klasifikacija u citologiji			
NORMAL	LSIL	HSIL	
stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije i reaktivne stanične promjene poput upale	skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja	skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja	
Siva zone interpretacije u citologiji (ASC)			
ASC-US		ASC-H	
atipične skvamozne stanice neodređenog značaja		atipične skvamozne stanice- HSIL se ne može isključiti	
Sustav klasifikacije cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) u patologiji			
NORMAL	CIN1	CIN2	CIN3
tkivo bez kanceroznih promjena	blaga displazija	umjerena displazija	teška displazija



Slika 7. Pregled progresije raka vrata maternice. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja. CIN-cervikalna intraepitelna neoplazija.

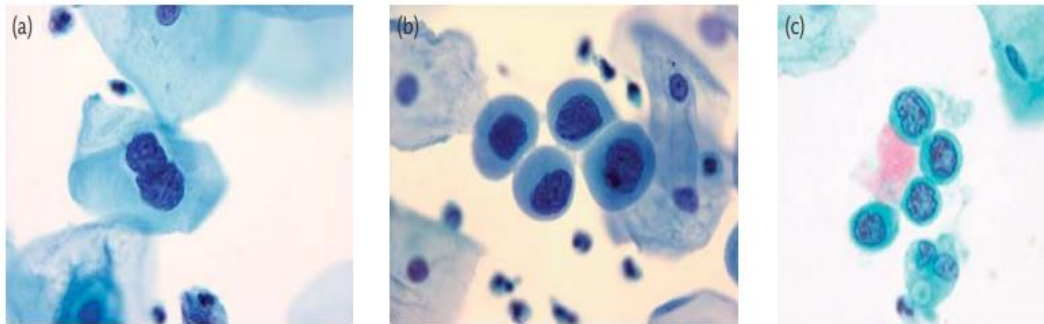
Preuzeto i prilagođeno prema Boon i sur., 2022 (28).



Slika 8. Rizični čimbenici koji utječu na progresiju i regresiju raka vrata maternice. HPV-ljudski papiloma virus. CIN-cervikalna intraepitelna neoplazija. Preuzeto i prilagođeno prema Shambayati, 2011(9).

Davnih 1900-ih, George Papanicolaou, grčki citopatolog je opisao svoju teoriju da maligne stanice, uzete iz uzorka vaginalne tekućine, imaju određene prepoznatljive karakteristike koje ih razlikuju od drugih benignih promjena (30). Karakteristike displazije i malignosti je opisao kao abnormalne veličine staničnih jezgri, gusti i fragmentirani kromatin, prisutnost više jezgri, jezgre u mitotskoj fazi, te prisutnost vakuolizirane citoplazme (30). Kako se razvijala citologija, tako su 1920-ih Papanicolaou i Babes istraživali novu metodu probira raka vrata maternice kojeg danas zovemo Papa test kako bi se pronašle prekancerone i kancerone lezije na cerviksu (31). Ovaj test pomaže u sprječavanju raka vrata maternice ili njegovom ranom otkrivanju (32). Tijekom Papa testa, ginekolog uzme četkicu za bris cerviksa i prikuplja stanice iz vrata maternice te ih stavlja na mikroskopsko stakalce (32). Nakon toga se stanice na stakalcu fiksiraju i prolaze kroz protokol za bojenje jezgre i citoplazme kako bi se dijagnosticirale razne morfološke promjene stanica (33). Upravo ova metoda omogućuje dijagnozu prethodno navedenih prekanceronih lezija u citologiji (34). Promatranjem citoloških uzoraka za Papa test fokusira se na diskariozu stanica, odnosno pojam koji je uveo Papanicolaou kako bi opisao morfološke promjene jezgre stanica te upravo stupnjevi CIN/SIL-a odgovaraju blagoj, umjerenoj i teškoj diskariozi, odnosno diskariotičnim stanicama (9). Slika 9 prikazuje primjere diskarioza (diskaritočnih stanica). Kod blage diskarioze se može vidjeti neravnomjeran kromatin, povećanje jezgre koje nije veće od polovine promjera stanice, nepravilna jezgrina membrana, hiperkromazija jezgre, više jezgri i obilna citoplazma s uglatim rubovima (9). Umjerena diskarioza ima ista obilježja, ali uz veće povećanje jezgre do dvije trećine promjera stanice i citoplazmu koja je puno manja sa

zaobljenim rubovima (9). Teška diskarioza je ozbiljno stanje s najvećom jezgrom koja zauzima od više od dvije trećine promjera stanice uz abnormalno sazrijevanje stanice (9).



Slika 9. Primjeri diskarioze (diskariotičnih stanica)

a) blaga, b) umjerena, c) teška. Preuzeto iz Shambayati, 2011 (9).

2.2.5. Invazivni pločasti karcinom vrata maternice

Kod ranog stadija invazivnog pločastog karcinoma vrata maternice, simptomi mogu biti potpuno odsutni, dok se kasniji stadij može manifestirati kao abnormalno vaginalno krvarenje, bol u zdjelici i iscjedak, opstrukcija uretre ili fistule (5). Makroskopski izgled može uključivati eritem, erozivno i minimalno uzdignuto područje na cerviksu te veće površinske nepravilnosti sluznice spolipoznim ili papilarnim izgledom (5). Konačna dijagnoza RVM je histološka, odnosno uspostavlja se na temelju analize biopsije cerviksa, ali citološke promjene su također vrlo važne te upućuju na daljnje pretrage (9). Citološke promjene koje upućuju na invazivnost karcinoma su brojne diskariotske stanice, vrlo grubi agregati jezgrinog kromatina, velike, nepravilne ili višestruke jezgrice, keratinizacija citoplazme, pleomorfizam (varijabilnost u veličini i obliku stanica, „vlaknaste stanice“) i tumorska dijateza (mješavina nekrotičnih staničnih ostataka, upalni eksudat i krv) (9). Vrlo je važna i diferencijalna dijagnoza ovog raka jer postoje razne reaktivne skvamozne promjene, poput akutne i kronične upale, promjena povezanih s terapijom zračenja, adenokarcinom, melanom, neuroendokrini karcinom koje je jako teško razlučiti i koje stvaraju morfološke promjene stanica slične onima invazivnom pločastom raku vrata maternice (5).

Kod razvitka RVM-e važno je naglasiti da se većina infekcija HPV spontano povuče bez stvaranja bilo kakvog patološkog stanja (35). U malom postotku slučajeva, postojanost virusne infekcije dovodi do razvoja CIN-a (36). CIN 2/3 još uvijek može regresirati ili evoluirati u invazivni karcinom vrata maternice (36). Ova zadnja faza povezana je s

nakupljanjem oštećenja u kromosomima stanica domaćina koja su posljedica aktivacije staničnih onkoproteina i/ili neutralizacije tumorskih supresora poput p53 (protein 53) i retinoblastoma proteina (pRB) (39).

2.3. HPV

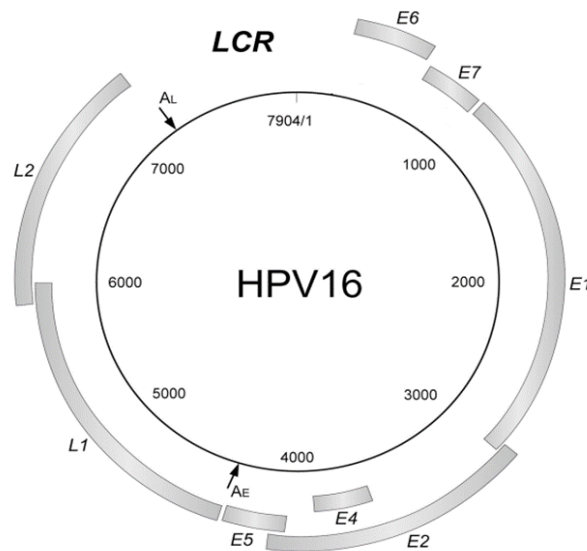
2.3.1. Klasifikacija papiloma virusa

HPV pripada porodici *Papillomaviridae* koja se sastoji od malih virusa bez ovojnice s dvolančanom deoksiribonukleinskom kiselinom (DNA, eng. deoxyribonucleic acid) (37). Svi papiloma virusi su ikozaedralne strukture i repliciraju se u jezgri skvamoznog epitela (38). Virusne čestice su približno 60 nm u promjeru (38). Njihova se klasifikacija temelji na sekvenci DNA otvorenog okvira čitanja (ORF, eng. *Open reading frame*) kapsidnog proteina L1 (L1, eng. *Late 1*) (39). L1 ORF je najočuvaniji gen unutar genoma te se novi izolati papiloma virusa prepoznaju ako se sekvenca L1 ORF razlikuje za više od 10% od najbližeg poznatog tipa papiloma virusa (40). Razlike između 2% i 10% homologije definiraju podtip, a manje od 2% varijantu (40). Porodica se dijeli na 53 roda, a oni koji inficiraju čovjeka svrstavaju se u 5 rodova: *alfa*, *beta*, *gama*, *mu* i *nu* i među njima razlikujemo one kojima je predilekcijsko mjesto sluznica, odnosno koža (39). HPV-ovi najvećeg medicinskog značaja pripadaju alfa rodu i prvenstveno inficiraju genitalne i negenitalne površine sluznice te vanjske genitalije (38). Na temelju povezanosti s rakom, genitalni tipovi HPV se mogu podijeliti na tipove niskog rizika, koji uglavnom uzrokuju genitalne bradavice te tipove visokog rizika, koji mogu uzrokovati invazivni rak (41). Najčešći visokorizični tipovi HPV-a su HPV16, 18, 21, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, i 82, a niskorizični HPV 6 i 11 (42,43). 70% slučajeva raka vrata maternice uzrokuju HPV 16 i 18 (44).

2.3.2. Struktura genoma

Papiloma virusi sadrže kružni genom DNA od 5748 bp do 8607 parova baza (bp, eng. *base pairs*) (39). Primjer strukture genoma na tipu HPV16 prikazan je na Slici 10. Mogu se razdvojiti s dva poliadenilacijska signala, virusni rani i virusni kasni, u tri različite regije: uzvodno regulatorno područje (URR, eng. *Upstream regulatory region*), rana (E, eng. *Early*) i kasna (L, eng. *Late*) genska regija (41). Regija URR također je poznata kao duga kontrolna regija (LCR, eng. *Long control region*) koja ne kodira proteine te joj veličina varira između papiloma virusa (41). Svaki HPV URR sadrži mjesto početka replikacije (Ori, eng. *Origin of replication*) koje je ključno za replikaciju papiloma virusa i visoko je homologno (45). Regija URR ima 500 to 1000 bp te, osim Ori, sadrži i sekvence potrebne za održavanje genoma,

transkripcijske pojačivače i promotore (46). Unutar rane i kasne regije su: E1 i E2 koji reguliraju virusnu transkripciju i replikaciju, E5, E6 i E7 staničnu proliferaciju, E4 oslobađanje viriona, a L1 i L2 virusnu kapsidu (47). Rana regija genoma zauzima preko 50% virusnog genoma, a kasna gotovo 40% (48). Kapsida HPV-a sadrži 360 kopija L1 proteina koji su oblikovani u 72 pentamera s jednim proteinom L2 u središtu svakog (48).



Slika 10. Genom HPV16. Preuzeto iz Kajitani i sur., 2012 (49).

2.3.3. Replikacijski ciklus HPV-a

HPV inficira kožu i sluznicu te može uspostaviti produktivnu infekciju samo unutar stanica koje se aktivno dijele oslanjajući se na stanice domaćina za replikaciju genoma (48). HPV ulazi u bazalni sloj epitela kroz mikroranu ili, ako se radi o cerviksu, može biti i područje skvamokolumnarne granice (50). Prvi korak produktivne infekcije je vezanje kapsidnog proteina viriona L1 na heparan sulfatne proteoglikane u izvanstaničnom matriksu koji služe kao receptori na bazalnoj membrani (38,51). Dolazi do konformacijske promjene u virusnoj kapsidi posredovane ciklofilinom B koja izlaže N-kraj proteina L2 na površini viriona (52,53). Izloženi N-kraj se zatim cijepa furinom ili blisko srodnom proprotein konvertazom 5/6 što omogućuje vezanje na neidentificirani receptor na membrani ciljane stanice (50). Spomenuta strategija receptora može ovisiti o genotipu HPV-a, tipu stanice koju treba zaraziti ili nekoliko različitih receptorskih strategija može biti primjenjivo u jednoj infekciji (54). Nakon vezanja na stanični receptor, virion ulazi u stanicu endocitozom te dolazi do uklanjanja virusne ovojnice u zakiseljenim endosomima (55). Ciklofilin B pomaže u odvajanju L1 od

kompleksa L2/virusni genom te se L1 dalje razgrađuje u lizosomima (55). L2 ostaje povezan s virusnim genomom i posreduje u prometu DNA kroz trans-Golgijevu mrežu (48). Kretanje virusnog genoma kroz citoplazmu do jezgre vjerojatno se odvija duž mikrotubula vezikulama koje vežu L2, a prenosi ih protein dinein (38). Ulazak virusnog genoma u jezgru zahtijeva mitozu i ovaj proces je posredovan s L2 (56). Nakon ulaska u jezgru, L2 i virusni genom kolokaliziraju u jezgrinim domenama (ND10, eng. *Nuclear domain 10*) što je kritičan korak za uspostavljanje infekcije i omogućuje transkripciju virusnog genoma (56). Budući da HPV ne kodira svoju DNA polimerazu, uz stanicu domaćina za replikaciju genoma potrebni su mu i njegovi proteini E1 i E2 (57). U ranim fazama životnog ciklusa dolazi do ekspresije virusnog transkripcijskog faktora E2 što omogućuje ispravnu regulaciju virusnog ranog promotora za usmjeravanje ekspresije regulatornih proteina E6 i E7 (58). Dio DNA koji sadrži palindromska mjesta služi kao ishodište replikacije, koje je potrebno za E1 aktiviranu replikaciju virusa (59). Protein E2 veže E1, helikazu i jedini enzim kodiran genomom HPV-a, koji se zatim kao dimer heksamera veže na virusno ishodište replikacije (59,60). E2 se nakon toga odvoji uz hidrolizu adenozin trifosfata (ATP-a), a E1 odmotava virusnu DNA i započinje replikaciju replikativnim sustavom domaćina (59,60). U zaraženim bazalnim stanicama, kružni virusni genomi se repliciraju usklađeno s replikacijom stanične DNA i ravnomjerno dijele na stanice kćeri. Takve zaražene stanice su sposobne diferencirati se te nose sa sobom virusne genome na diferencijacijskom putu prema gornjim dijelovima epitela (50). Replikacija virusnog genoma javlja se jednom po S fazi staničnog ciklusa (61). Nakon uspostavljanja replikacije, slijedi faza održavanja genoma koja se sastoji od održavanja stalnog broja episomskih kopija (62). U ovoj fazi HPV genomi mogu se održavati u bazalnim epitelnim stanicama i do nekoliko desetljeća nakon početne infekcije ako je imunološki sustav domaćina ne ukloni (48). Upravo ovdje virusni proteini eksprimiraju se na niskim razinama u zaraženim bazalnim stanicama kako bi se izbjegla aktivacija lokalnog imunološkog odgovora (50). To se postiže tako što E2 transkripcijski reprimira promotor P97 inhibicijom pristupa transkripcijskih faktora promotoru i mijenjanjem konformacije kromatina što omogućava HPV-u održavanje infekcije i moguće pojave trajne (perzistentne) infekcije (50).

Nadalje, dok se u bazalnim stanicama odvija održavanje genoma, nastavak produktivne infekcije, odnosno kasna faza replikacijskog ciklusa se događa u više diferenciranim epitelnim stanicama te uključuje vegetativnu replikaciju DNA sintezu proteina kapside i sklapanje viriona (38). Važno je napomenuti da bi diferencirane stanice u normalnim uvjetima izašle iz staničnog ciklusa i više ne bi bile sposobne podržavati staničnu sintezu DNA. Mehanizam vegetativne replikacije se aktivira pomoću proteina E6 i E7 i omogućava

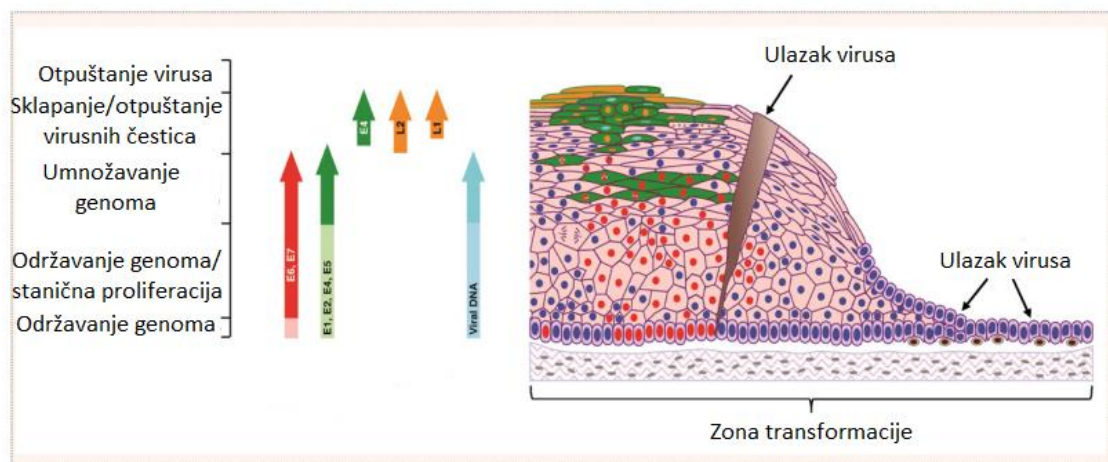
proizvodnju budućih genoma koji se pakiraju u virione, odnosno širenje infekcije prema gornjim slojevima epitela (38,50). Osim proteina E6 i E7, vegetativnu replikaciju DNA omogućuje i indukcija visokih razina proteina E4, koje ostaju visoke sve do završetka infektivnog ciklusa HPV-a u površinskim slojevima stanica (63). U daljnjem pakiranju genoma sudjeluju kapsidni proteini L1 i L2 (38).

Osim navedenih glavnih uloga virusnih proteina HPV-a, pokazalo se da pojedini proteini imaju i razne druge uloge. Na primjer, E6 je potreban za episomsko održavanje genoma, a E7 onemogućuje normalnu regulaciju kontrolne točke G1 do S-faze u keratinocitima koji bi normalno izašli iz staničnog ciklusa (50). E7 potiče stanični ciklus zaraženih stanica vezanjem pRb, regulatora staničnog ciklusa i njemu srodnih džepnih proteinima, p107 i p130 što dovodi do inhibicije ili proteasomske razgradnje pRb (56). pRb inače inhibira transkripcijski faktor E2F vezanjem na njega, ali ako je pRb inhibiran dolazi do oslobađanja E2F koji dalje aktivira brojne transkripcijske gena povezane sa staničnim ciklusom, kao što su ciklini A i E, čime se potiče prijelaz G1 u S-fazu (64). E7 također kontrolira proliferaciju stanica vezanjem proteina p21 i p27 što dovodi do povećane aktivnosti kinaza ovisnih o ciklinu 2 (CDK2, eng. *Cyclin-dependent kinase 2*) (65). E6 sudjeluje u izbjegavanju stanične apoptoze vezanjem ubikvitin ligaze, proteina povezanog s E6 (E6AP, eng. *E6-associated protein*) i p53 čime se p53 usmjerava na razgradnju (66). Također, E6 može inhibirati funkciju p53 ako ga odvoji u citoplazmu, promjeni mu konformaciju ili sudjeluje u vezanju histon acetiltransferaze čime inhibira daljnju transkripciju, a način inhibicije ovisi o tome je li HPV visokorizičan ili niskorizičan (50). Upravo ovi utjecaji na staničnu proliferaciju i apoptozu, omogućavaju da E6 i E7 sudjeluju u malignoj progresiji te budu poznati kao onkogeni (67).

HPV E4 protein se sintetizira kao fuzijski protein E1^{E4} što je rezultat transkripcije policistronske glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA, eng. *Messenger ribonucleic acid*) (68) te spomenuta njegova dominantna ekspresija unutar stanica koje se nalaze u srednjem i gornjem dijelu epitela (69) omogućuje da narušava organizaciju citokeratinskih filamenata kako bi stanice učinio krhkim i sklonijima oslobađanju viriona (50). Vrlo važna uloga mu je i povećanje umnožavanja genoma virusa zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2-fazi i aktiviranjem staničnih kinaza (50). Druge funkcije E4 uključuju poticanje apoptoze promjenom mitohondrijske funkcije i supresiju sinteze stanične DNA putem inhibicije inicijacije kromosomske replikacije (70,71).

Osim spomenutih proteina, u ciklusu je važan i E5, hidrofobni protein koji se nalazi u membrani te može stabilizirati receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR, eng. *Epidermal growth factor receptor*) i stimulirati aktivnost mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK,

eng. *Mitogen-activated protein kinase*), što sugerira da može kontrolirati putove stanične diobe (72,73). E5 može regulirati i apoptozu kroz puteve kinaza MAPK ERK (ERK 1/2, eng. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*), i protein kinaza b (PKB, eng. *Protein kinase b*) i protein p38 (74). Sudjeluje i u izbjegavanju imunološkog odgovora inhibiranjem glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC, eng. *Major histocompatibility complex*) u prezentaciji virusnih peptida (75). Važno je napomenuti da je razjašnjavanje uloga HPV virusnih proteina u njegovoj replikaciji složeno i još uvijek se istražuje zbog raznolikosti funkcija proteina, međusobnog vezanja virusnih proteina te promjena u profilima ekspresije tijekom diferencijacije epitela (50). Kako bi se bolje razumio opisani replikacijski ciklus HPV-a, na Slici 11 se sažeto prikazuje njegov tijek u cervikalnom epitelu.



Slika 11. Replikacijski ciklus HPV-a u zoni transformacije cervikalnog epitela. Smatra se da HPV infekcija počinje u bazalnoj membrani gdje se virusni genom održava kao episom s malim brojem kopija. Zaražene bazalne stanice se potom dijele, stvarajući stanice kćeri koje se kreću prema površini epitela. Različiti događaji u replikacijskom ciklusu virusa aktiviraju se tijekom različitih faza ove migracije. Stanice u nižim slojevima izražavaju E6 i E7 čime se započinje stanični ciklus i dioba (kružne stanice označene crvenim jezgrama). U srednjim slojevima su stanice obično u S ili G2 fazama staničnog ciklusa te su povišeni proteini potrebni za pojačavanje genoma, odnosno virusni E4 (prisutnost E4 označena zelenom bojom, a crvene jezgre označavaju replikacijsku kompetenciju). U gornjim slojevima epitela stanice napuštaju stanični ciklus, a u podskupu E4-pozitivnih stanica stvaraju se proteini virusa L2 i L1 (prisutnost L1 i L2 označena narančastom bojom) omogućujući pakiranje pojačanih virusnih genoma. Mjesto ekspresije različitih virusnih gena prikazano je lijevo od slike, s ključnim fazama tijekom produktivne infekcije. Preuzeto i prilagođeno prema Doorbar i sur., 2012 (7).

2.3.4. HPV i kancerogeneza

Poznato je da HPV završava svoj replikacijski ciklus samo u potpuno diferenciranom pločastom epitelu te opisana produktivna infekcija dovodi do stvaranja novih viriona (72). Međutim u kliničkom pogledu, razlikuju se još latentna i abortivna infekcija HPV-a (72). Latentna (asimptomatska) infekcija je karakterizirana prisutnošću virusnog genoma u bazalnim slojevima i razvija se unutar prva tri mjeseca ili može ostati neotkrivena godinama, dok je abortivna infekcija povezana posebno s visokorizičnim genotipovima HPV-a (72). Prijelaz s produktivne na abortivnu infekciju određen je dereguliranom ekspresijom E6 i E7 virusnih onkogeni u proliferirajućim stanicama, što dovodi do produljenog životnog vijeka zaraženih stanica (72).

Deregulacija i pojačano izražavanje virusnih onkogeni povezani su s integracijom genoma HPV u kromosom stanice domaćina te ona igra važnu ulogu u progresiji raka iako mehanizmi još uvijek nisu jasni (72). Integracija obično rezultira linearizacijom HPV genoma, a preferirano mjesto integracije većinom je E2 ORF te gubitak ovog ORF-a tijekom integracije rezultira povećanom ekspresijom transformirajućih E6 i E7 onkoproteina čije ispoljavanje E2 inače reprimira (59,78) Osim toga, integraciji pogoduju i lokusi osjetljivi na replikacijski stres i lom te transkripcijski aktivna područja otvorenog kromatina (76). Integrirana HPV DNA daje prednost selektivnom rastu stanica što se pripisuje prisutnosti poliadenilacijskog repa domaćina i gubitku apoptotičkog proteina E2, što omogućava proteinima E6 i E7 da blokiraju p53 i pRb (77). Uz njega poremećeni su i drugi proteini te se smatra da je ovakva genomski nestabilnost bitan dio stanične transformacije (77,78). Pokazalo se da pojačana ekspresija E6 i E7 rezultira poliploidijom stanice te osim njihovih spomenutih uloga u replikacijskom ciklusu imaju i druge onkogene aktivnosti (78). Na primjer, E6 djeluje na proteasomsku degradaciju proapoptotskih proteina porodice Bcl2 (Bcl2, eng. *B-cell lymphoma 2*) pojačava ekspresiju anti-apoptotskih faktora poput inhibitora apoptoze proteina i blokira interakcije proapoptotskih proteina, kao što je receptor čimbenika tumorske nekroze 1 (TNFR1, eng. *Tumor necrosis factor receptor 1*) (8). Vrlo važna uloga mu je povećanje ekspresije telomeraze transkripcijskom transaktivacijom katalitičke podjedinice reverzne transkriptaze telomeraze, što je bitan korak u besmrtnosti stanice te time ujedno i sprječava skraćivanje telomera omogućujući nastavak stanične proliferacije (8). Gubitak polarnosti stanice i indukcija hiperplazije se može postići djelovanjem E6 koji posreduje u razgradnji proteina koji sadrže PDZ domenu (strukturna domena od 80-90 aminokiselina u signalnim proteinima), a koji reguliraju strukturu citoskeleta (8). Ovi mehanizmi te utjecaj na

transkripciju i signalizaciju stanica putem G-proteina u stanicama zaraženim HPV-om omogućava E6 održavanje transformiranog fenotipa u onkogenezi HPV-a (8). Nova istraživanja o onkogenim mehanizmima E6 su široka te se stalno nadopunjavaju. Na primjer, pokazalo je da i E6 ima utjecaj na smanjenje ekspresije proteina Notch1 (eng. *Neurogenic locus notch homolog protein 1*) kroz degradaciju p53 kao odgovor na genotoksični stres te time potiče razvoj HPV-om inducirane cervikalne karcinogeneze (79). Također je pokazano da postoji poremećaj puta p16/pRb neovisno o proteinu E7, regulacijom ekspresije gena ovisnih o E2F koje potiče E6, na primjer povećanjem ekspresije mini-kromosomskog proteina održavanja 7 (MCM7, eng. *Mini-chromosome maintenance proteins 7*) i ciklina E koji dalje potiču nekontroliranu proliferaciju (80). S druge strane, E7 uz inaktivaciju članova pRb obitelji u replikacijskom ciklusu, ima brojne funkcije poput djelovanja na stanični rast kroz povezanost s histonskom deacetilazom i transkripcijskim ko-represorima (78). Nedavno je i p600 identificiran kao stanična meta za E7 koji pridonosi rastu neovisnom o sidrištu i staničnoj transformaciji (81). Nadalje, istraživanja pokazuju da E7 može pridonijeti onkogenezi izazvanoj HPV-om posredovanjem u transkripciji putem promjene strukture kromatina te poremećajem funkcija centrosoma, bilo putem p53 ili stimulacijom njihove duplikacije ili neizravno kao rezultat posljedica poremećaja u putu p53 (67,82).

Ekspresija onkogeni HPV-a nužna je i dovoljna za inicijaciju cervikalne karcinogeneze, ali su mutacije genoma domaćina potrebne za malignu progresiju (72). Na primjer, stanice nakupljaju širok raspon kromosomskih abnormalnosti uključujući zaostale kromosome, anafazne mostove i multipolarne mitoze (72). Naime, nekoliko je studija pokazalo da rak vrata maternice mogu inicirati mutacije u primjerice katalitičkoj podjedinici α fosfatidilinozitol 3-kinaze (PIK3CA, eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), ključnom proteinu u putu fosfatidilinozitol 3-kinaza, (PI3K, eng. *Phosphoinositide 3-kinases*), Kirsten rat homolognom virusnom onkogenom sarkoma (KRAS, eng. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) i EGFR (83). Pokazano je i da upala pridonosi karcinogenezi putem povećanja oksidativnog oštećenja, proliferacije stanica, invazije i metastaza, inhibicije apoptoze i lučenja imunosupresora (77). Zaključno, postoje razni mehanizmi cervikalne kancerogeneze koji su još uvijek nepoznati i istražuju se.

2.3.5. HPV i imunološki sustav

Tijekom ranih faza HPV infekcije, urođeni odgovor domaćina postaje prva linija obrane od infekcije, a onda i stečena imunost (84). Vrlo je važna uloga samih bazalnih keratinocita koji se smatraju se čuvarima imunološkog sustava jer djeluju kao neprofesionalne stanice koje

prezentiraju antigen (APC, eng. *Antigen-presenting cells*) i induciraju ekspresiju citokina pomagačkih limfocita T 1 i 2, kao i citotoksičnog odgovora posredovanog citotoksičnim T limfocitima (84,85). U ženskom genitalnom traktu, keratinociti izražavaju nekoliko toll-like receptora (TLR, eng. *Toll-like receptor*) koji su sposobni prepoznati virusnu DNA, pokrećući urođene i adaptivne imunološke odgovore, koji zauzvrat potiču proizvodnju citokina i stvaraju proupalno okruženje s krajnjim ciljem uklanjanja infekcije (84,85). Prilikom uklanjanja zaraženih stanica putem mehanizma citotoksičnosti sudjeluju i molekule MHC-I koje prepoznaju prirodne stanice ubojice (NK cells, eng. *Natural killer cells*) i citotoksični T limfociti (86). NK stanice su sposobne prepoznati i eliminirati stanice zaražene HPV-om, stoga su poremećaji NK stanica povezani s povećanim HPV infekcijama i većom učestalošću raka (86). Osim navedenih, stanice koje sudjeluju još u odgovoru su Langerhansonove i dendritičke stanice te B limfociti (84). Ono što je za HPV karakteristično je razdoblje između HPV infekcije i pojave lezija koje je visoko promjenjivo i može varirati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci, što sugerira da virus učinkovito izbjegava obranu domaćina (87). Postoje razni mehanizmi izbjegavanja imunološkog odgovora koje HPV koristi, poput činjenice da se HPV antigeni ne mogu naći u krvotvornom sustavu, rani geni se ekspimiraju u malom broju kopija i samo u epitelnim bazalnim stanicama te HPV ne uzrokuje lizu stanica što smanjuje vjerojatnost pojave receptora koji izlažu virus imunološkoj reakciji (88). Vrlo važno je i da se kasna faza replikacijskog ciklusa HPV (ispoljavanje L1 i L2) događa u diferenciranim keratinocitima, stanicama predodređenim za smrt i deskvamaciju koje su daleko od mjesta imunološke aktivnosti (87).

Proteini HPV također mogu direktno sudjelovati u mehanizmima imunološkog odgovora. Na primjer, dokazano je da E5 vodi do smanjene ekspresije molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti 2 (MHC2) na staničnoj površini, dok E7 može oslabiti djelovanje urođenog imunološkog sustava kroz inhibiranje nuklearne aktivnosti proteina 48 čime se rezultira gubitak prijenosa signala posredovanog interferonom- α (IFN- α , eng. *Interferon alpha*) (89,90). Imunološka obrana organizma od HPV infekcije je vrlo komplicirana te iako postoji puno znanja u tom području, i dalje se istražuje zbog novih oblika imunoterapija koje bi se mogle primijeniti.

2.3.6. Cijepljenje protiv HPV-a

Nakon identifikacije HPV-a kao primarnog uzroka raka vrata maternice 1980-ih, uslijedio je rad na razvoju cjepiva (91). Prva istraživanja su bila na životinjskim modelima i pokazala su da bi se životinje mogle zaštititi od lezija uzrokovanih HPV-om koristeći pročišćene virione

(91). Trenutna licencirana cjepiva se temelje na česticama sličnim virusu (VLP, eng. *Virus-like particle*) koje su proizvedene od glavnog kapsidnog proteina L1 te su neinfektivne i neonkogene (91). VLP su morfološki slične autentičnom virusu i induciraju visoki titar neutralizacijskih protutijela (91). Proizvode se u stanicama bakterija, kvasca ili insekata (92). Ovakva cjepiva protiv HPV-a pružaju samo tipski ograničeni imunitet, zanemarujući neke onkogene genotipove HPV-a koji nisu toliko učestali (92). Naime, postoji i druga generacija cjepiva koja privlači veliku pažnju svojom pokrivenosti genotipova poput L2-VLP i kimerni L1-L2 VLP koji uključuju i sekvence proteina L2, odnosno sadrže tipične epitope koji mogu potaknuti raznolike odgovore unakrsno neutralizirajućih protutijela (92).

Trenutno dostupna cjepiva su proizvedena od strane dvije tvrtke: GlaxoSmithKline Biologicals i Merck & Co (91). Najstarija verzija cjepiva bila je dvovalentno cjepivo GSK (Cervarix), sastavljeno od VLP-a HPV-16 i HPV-18, dok je Merck razvio četverovalentno cjepivo (Gardasil) s VLP HPV-16, HPV-18, HPV-6 i HPV-11 (91). Druga razlika između ova dva cjepiva je što se Cervarix proizvodi u stanicama insekata pomoću rekombinantnog bakulovirusa, a Gardasil u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (91). Najnovije dostupno je devet-valentno cjepivo Gardasil 9 (Merck) koje obuhvaća još i sekvence virusa HPV 31, 33, 45, 52 i 58 i stoga ima potencijal pružiti zaštitu za oko 90% karcinoma vrata maternice u svijetu (91,92).

U lipnju 2006., Savjetodavni odbor za praksu cijepljenja (ACIP, eng. *Advisory Committee on Immunization Practices*) izdao je preporuku za standardno cijepljenje žena u dobi od 11 ili 12 godina cjepivom za HPV, s naknadnim cijepljenjem za one od 13 do 26 godina (93). Međutim, 2019. ACIP je ažurirao svoju preporuku te je sada rutinsko cijepljenje preporučeno svima do 26 godina starosti (93). Osobama koje prvu dozu cjepiva prime prije navršene 15. godine preporučuju se dvije doze s razmakom od 6-12 mjeseci dok osobama koje prvu dozu prime sa ili nakon navršene 15. godine ili imaju određena imunokompromitirajuća stanja preporučuje se cijepljenje s tri doze (93).

Važno je spomenuti da unatoč dostupnom cjepivu, RH, a i većina država još uvijek nije smanjila pojavnost RVM (94). Vodeće države koje su smanjile stopu RVM i prevalencije HPV su Australija i Škotska, a onda ih slijede i države sa 70% cijepljenih protiv HPV poput Islanda, Ujedinjenog Kraljevstva, Norveške, Španjolske i Švedske (95,96). Neke države, geografski blizu Hrvatske, postigle su značajno višu stopu procijepljenosti do 2017., poput Slovenije (46% ciljne dobi 11-12 godina), Češke (58% ciljne dobi 13 godina) i Italije (62% ciljne dobi 11 godina), dok u Hrvatskoj je relativno malo podataka o HPV-u te je oko 18,3% mladih u dobi od 18 do 25 godina cijepljeno protiv HPV-a (94-96). Najnovije studije

pokazuju da RH ima mali pomak u prevalenciji tipa HPV-a, pri čemu je smanjenje jednog od visokorizičnog tipova, HPV31 najvažnije kod kojeg je zastupljenost pala s 9,3% na 2,2%, ali prevalencija najčešćeg visokorizičnog tipa, HPV16 ostala je stabilna čime se zaključuje da su potrebni daljnji napori u prevenciji RVM (94).

2.4. Testovi u dijagnozi raka vrata maternice i HPV-a

Programi za detekciju raka vrata maternice se temelje na analizi citoloških abnormalnosti. Papa testom te su uspjeli smanjiti njegovu učestalost (97). Papa test je test probira koji omogućuje otkrivanje staničnih promjena koje ukazuju na prisutnost CIN-a ili raka te ima ograničenu osjetljivost (50-84%) (97). Drugi problem je i niska reproducibilnost, budući da ovisi o raznim čimbenicima kao što su tehnika dobivanja uzorka, odgovarajuća obrada i tumačenje, zbog čega je potrebno često ponavljati testove (97). Postoji i mogućnost prekomjernog liječenja žena sa sumnjivim citološkim abnormalnostima koje bi se kasnije pokazale normalnim, a te žene su već upućene na kolposkopije i potvrdne biopsije te liječenje (97).

Kolposkopija je također dijagnostički postupak za detekciju raka vrata maternice i podrazumijeva pregled u kojem se osvijetljenim instrumentom s povećalom gleda vrat maternice, vagina i vulva u svrhu pronalaska lezija, a biopsijom se uzima komad tkiva i potvrđuje dijagnoza patohistološkom analizom (9,98). S vremenom je vrlo važan korak u dijagnostici postala i detekcija HPV DNA, bilo umnožavanjem DNA s lančanom reakcijom polimerazom s početnicama specifičnim za vrstu virusa ili hibridizacijom s koktelom proba (97,99). Postoje mnogi komercijalno dostupni testovi za detekciju HPV i genotipizaciju, kao što je Hybrid Capture® 2 (HC2; Qiagen, Njemačka) (97,99). Glavne primjene HPV DNA testiranja je trijaža ASC-US i LSIL i praćenje žena nakon liječenja lezija HSIL-a (100,101). Za daljnju trijažu pacijenata pozitivnih na HPV, predloženo je određivanje kvantifikacije razine mRNA E6/E7 koja bi ujedno pomogla i bolje identificirati žene kojima su potrebne daljnje pretrage poput kolposkopije te praćenje sumnjivih LSIL i ASC-US lezija (102,103). Za bolju dijagnozu su predloženi i testovi detekcije proteina HPV koji uspješno mogu detektirati E6 i L1 (104). Na primjer, detekcija mRNA E6 onkoproteina HPV-16 i -18 pokazala je visoku pozitivnu prediktivnu vrijednost i visoku specifičnost za otkrivanje CIN3 (105). Ujedno, gubitak ekspresije L1, koji je dominantni kapsidni protein, također je predložen za detekciju premalignih lezija, budući da njegova izraženost ovisi o integritetu virusnog genoma (104). Studija iz 2020. godine pokazuje da su trenutno na globalnom tržištu opisana i identificirana

najmanje 254 različita testa za HPV (i 425 varijanti testa), ali nažalost nije došlo do porasta u kvaliteti testova (106).

Današnji dostupni testovi su većinom inačice starih te više od 90% nije ocijenjeno u skladu sa zahtjevima koji osiguravaju sigurnu uporabu u kliničkim uvjetima (106). Daljnja pojava lažno negativnih i nezadovoljavajućih rezultata potaknula je razvoj novih metoda ili boljih biomarkera za ranu detekciju bolesti. U posljednje vrijeme, biomarkeri su postali izuzetno popularni jer služe kao objektivni pokazatelji, omogućujući ranu detekciju i intervenciju dovodeći do poboljšanja ishoda pacijenata i smanjenja troškova (107). Jednostavno rečeno, biomarker je biološka molekula u krvi, tjelesnim tekućinama ili tkivima koja otkriva jesu li procesi, stanja ili bolesti poput raka normalni ili abnormalni (107).

Prvi biomarkeri koji su klinički postali dostupni u detekciji raka vrata maternice su proliferacijski marker Kiel 67 (Ki-67, eng. *Marker of proliferation Kiel 67*) i inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A (p16^{INK4a}, protein poznat po nazivu CDKN2A, eng. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (108). Ki-67 je protein koji se nalazi u jezgri i eksprimiran je tijekom G1, S, G2 i M faze staničnog ciklusa i može indicirati staničnu proliferaciju jer ga nema u fazi mirovanja G0 (108). Ki-67 se smatra markerom proliferacije u bazalnim stanicama, ali i u intermedijarnim i površinskim skvamoznim stanicama budući da pokazuje povezanost s različitim stupnjevima CIN-a i infekcijom HPV (109). Protein p16^{INK4a} je regulator staničnog ciklusa i tumor supresor čija je uloga inhibiranje kinaza ovisnih o ciklinu 4 i 6 koje fosforiliraju pRB (108). U stanicama zaraženim onkogenim tipovima HPV-om, onkoprotein HPV E7 stimulira napredovanje staničnog ciklusa u S fazu kroz inaktivaciju pRb i otpuštanje transkripcijskog faktora E2F, što rezultira prekomjernom ekspresijom p16^{INK4a} (109). Povećanje p16^{INK4a}, inducirano E7 HPV-om čini ovaj protein obećavajućim biomarkerom za karcinogenezu vrata maternice (109). Ovi biomarkeri su trenutno obećavajući test i koriste se u kombinaciji dvostrukim bojanjem imunohistokemijskim i imunocitokemijskim metodama zbog bolje osjetljivosti i specifičnosti (110). U literaturi navode da ovi biomarkeri smanjuju nepotrebno upućivanje na kolposkopiju, biopsiju i liječenje u usporedbi s Papa testom te da negativno bojenje nosi manji rizik za nastanak prekanceroznih lezija i može produžiti potrebu praćenja na tri godine (110). Komercijalno dostupni test se naziva CINtec® PLUS cytology, p16/Ki-67 dual staining (Roche, Švicarska) (108).

Drugi test biomarkera koji je dostupan je ProEx™ C, MCM2/TOP2a dual staining (BD Diagnostics, Sjedinjene Američke Države (SAD)) i uključuje proteine topoizomerazu 2 (TOP2) i MCM2 (108,109). Oba proteina su bitna u DNA replikaciji i igraju važne uloge tijekom S faze staničnog ciklusa, te su pretjerano izraženi u stanicama zaraženim HPV-om

kao rezultat nekontrolirane aktivacije transkripcije (109). Dvostruko bojenje MCM2/TOP2A pokazalo je povećanje osjetljivosti i specifičnosti cervikalnog probira u usporedbi s citologijom i HPV trijažom za otkrivanje CIN2 i CIN3 u slučajevima ASC-US i pokazalo se kao obećavajući marker za potvrdu HSIL-a (109). Nadalje, vrlo je korisno i u patologiji, gdje može razlikovati pravu displaziju od reaktivnih/reparativnih promjena, nezrele skvamozne metaplazije i atrofije (108).

Trenutno, ovi biomarkeri pomažu u dijagnostici, ali još uvijek nisu smanjili opterećenost citologije te prema istraživanjima biomarker se smatra korisnim ako njegov rezultat utječe na kliničko liječenje, bilo da se pacijent dalje upućuje na izravno liječenje, kolposkopiju radi histološke potvrde prekanceroznih promjena ili pojačani nadzor probirom (111). Sahasrabudde, Luhn i Wentzensen su napomenuli da je važno uzeti u obzir individualni rizik od CIN-a i raka te odabrati odgovarajuće liječenje, uzimajući u obzir dob, fizičke i financijske posljedice nepotrebnih testova i postupaka (111). Primjerice, lažno pozitivni rezultati testa mogu uzrokovati tjeskobu, pretjerano liječenje, povećati rizik od komplikacija te dodatno povećati troškove programa probira (111). Veliki je problem što se trenutačno naširoko koristi prag liječenja CIN2 ili težih lezija, unatoč činjenici da veliki postotak CIN2 lezija spontano regredira, kao i da je sve više dokaza da je CIN3 heterogena skupina za koju se procjenjuje da oko 30-50% progredira u invazivni rak tijekom dugog vremenskog razdoblja (111). Treba se prisjetiti da je cilj programa probira raka vrata maternice sprječavanje raka, a ne liječenje CIN-a stoga je nužan pronalazak novih biomarkera u probiru (111).

Trenutno je puno staničnih biljega u ispitivanjima i pokušava se doprinijeti probiru raka vrata maternice. Na primjer, eksperimentalne studije na raku vrata maternice i staničnim linijama su identificirale neke pojačano regulirane mikroRNA (miRNA, eng. *microRNA*) poput miR-24, miR-127 i miR-199a i neke sa smanjenom ekspresijom poput miR-143 i miR-214 u usporedbi s normalnim tkivom (112). Ovakve promjene u ekspresiji miRNA su pronađene u prekanceroznim lezijama, pa bi potencijalno pomogle u ranom otkrivanju raka (112). Dijagnostički potencijal je pokazala i studija sa šest metiliranih gena poput JAM3 (eng. *Junctional adhesion molecule 3*) i EPB41L3 (eng. *Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3*) koji su pokazali povezanost s patohistološkim nalazom u skupinama pozitivnih na HR HPV te visoku osjetljivost i specifičnost za otkrivanje CIN2 i CIN3 (113). Osim njih, postoje i mnoga druga istraživanja o biomarkerima raka vrata maternice te je potrebno dalje istraživati ovo područje i pronaći one koji bi imali najveći doprinos probiru RVM.

2.5. Masena citometrija

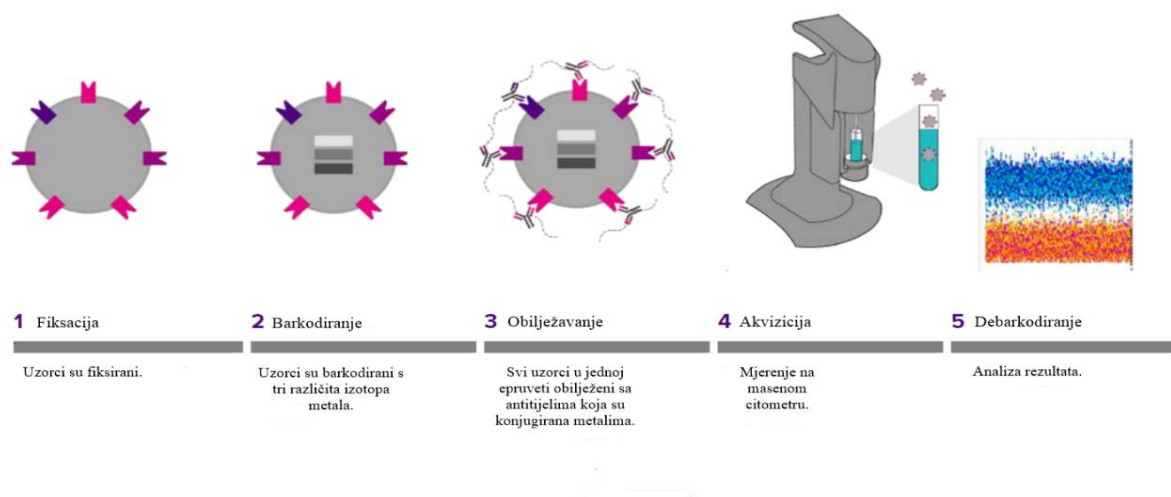
Masena citometrija je spoj dvije eksperimentalne metode: protočne citometrije i masene spektrometrije (114). Nova generacija instrumenta za masenu citometriju se naziva CyTOF (eng. *Cytometry by Time-Of-Flight*) (Slika 12) te omogućuje istovremeno mjerenje više od 40 staničnih parametara u jednoj stanici značajno povećavajući sposobnost citometrije za procjenu složenih staničnih sustava i procesa (114). Omogućuje istovremeno istraživanje različitih procesa u stanici, uključujući proliferaciju, hipoksiju, enzimsku aktivnost, ekspresiju mRNA, citokina, faktora rasta ili transkripcijskih faktora unutar specifičnih podskupova stanica (115). Temelji se na obilježavanju protutijela sa posebno odabranim metalnim izotopima, umjesto klasičnih fluorofora u protočnoj citometriji što joj daje prednost visoke rezolucije i osjetljivosti (116).



Slika 12. Prikaz CyTOF instrumenta u Laboratoriju za citometriju Drugog medicinskog fakulteta u Pragu u Češkoj.

2.5.1. Princip i dijelovi masenog citometra

Protokol obilježavanja staničnih biljega za masenu citometriju većinom uključuje korake poput fiksacije stanica, obilježavanja stanica s barkodom i miješanje uzoraka u jednu epruvetu, obilježavanje protutijelima konjugiranim s metalima od interesa, mjerenje na instrumentu i analiza podataka (Slika 13) (117).



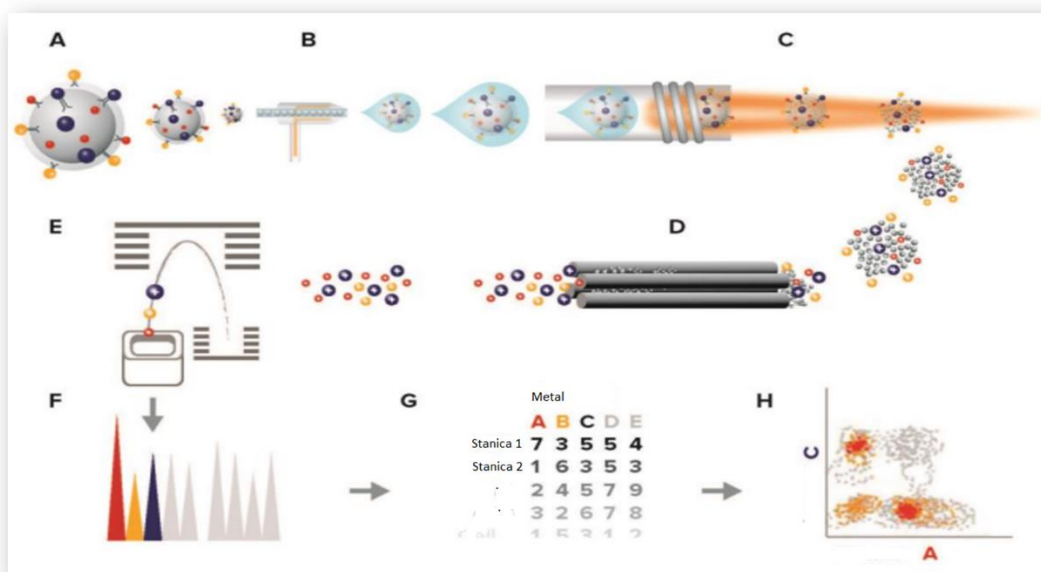
Slika 13. Ključni koraci protokola u masenoj citometriji. Preuzeto i prilagođeno prema Fludigm priručniku Cell-ID 20-Plex Pd Barcoding Kit, 2021 (117).

Karakteristična prednost masene citometrije je korak barkodiranja. Svi uzorci obilježeni su u istoj epruveti s istom mješavinom protutijela, eliminirajući varijacije, smanjena je potrošnja antitijela i povećan protok uzorka (118). Jedan primjer takvog obilježavanja je obilježavanje s tri izotopa paladija (119). Odnosno, postoji šest dostupnih izotopa paladija (Pd 102, 104, 105, 106, 108, 110), ako se svaki uzorak obilježi s tri izotopa, postoji mogućnost nastanka 20 kombinacija, odnosno istovremeno ispitivanje 20 različitih uzoraka(119).

Za obilježavanje protutijela metalima najčešće se koriste metali lantanidi koji su vezani na polimere akrilne kiseline te se tipično dva do četiri polimera vežu na svako protutijelo, pri čemu svaki polimerni lanac može nositi do 30 metalnih izotopa (118). Trenutno je dostupno i kompatibilno ukupno 37 pročišćenih, stabilnih izotopa lantanida za masenu citometriju (119).

Nakon što je detaljnije opisano čime su obilježena protutijela i uzorci u masenoj citometriji, važno je reći koji su koraci kada se spreman uzorak stavlja u instrument (Slika 14). Masena citometrija može se podijeliti u pet glavnih procesa: uvođenje uzorka i ionizacija, transport iona kroz vakuumsko sučelje i visokopropusnu ionsku optiku, odvajanje iona u analizatoru te prikupljanje i obrada podataka (120) Stanice obilježene protutijelima konjugiranim s metalom

u otopini ubrizgavaju se u nebulizator (120). Nakon toga se raspršuju i reduciraju na kapljice koje sadrže pojedinačne stanice (120). Stanice se usmjeravaju na baklju induktivno spregnute plazme (ICP, eng. *Inductively Coupled Plasma*), gdje isparavaju, atomiziraju i ioniziraju u plazmi (120). Visokopropusna ionska optika uklanja ione male mase, što rezultira ionskim oblakom koji ulazi u TOF (eng. *Time Of Flight*) analizator mase (120). Ioni se odvajaju na temelju njihove mase i ubrzavaju do detektora (120). Detektor mjeri količinu svakog izotopa za svaku pojedinačnu stanicu u uzorku, a podaci su u FCS (eng. *Flow Cytometry Standard*) formatu (120).



Slika 14. Glavni procesi u masenom citometru. Stanice obilježene antitijelima konjugiranim s metalom u otopini (A) se ubrizgavaju u nebulizator (B). Raspršuju se i reduciraju na kapljice koje sadrže pojedinačne stanice. Stanice se usmjeravaju na ICP baklju, gdje se isparavaju, atomiziraju i ioniziraju u plazmi (C). Visokopropusna optika uklanja ione male mase (D), što rezultira ionskim oblakom koji ulazi u TOF analizator mase. Ioni se odvajaju na temelju njihove mase i ubrzavaju do detektora (E) Detektor mjeri količinu svakog izotopa za svaku pojedinačnu stanicu u uzorku; podaci sugenerira se u FCS formatu (G) i analizira (H).

Preuzeto i prilagođeno prema Fluidigm priručniku Helios, a CyTOF System User Guide, 2018 (120).

2.5.2. Prednosti i ograničenja

Prednosti masene citometrije je njezina mogućnost istovremene analize više od 40 parametara te proučavanje različitih procesa kao što su, stanična smrt, proizvodnja citokina i stanična signalizacija (115). Nastaje minimalni pozadinski signal koji se stvara signalnim preklapanjem ili endogenim staničnim komponentama (115). Trošak ovakve metode se procjenjuje na 0,005 centi po jednoj izmjerenoj stanici, a omogućuje analiziranje ogromne količine podataka iz samo jednog izmjerenog eksperimenta (115). Međutim, postoje ograničenja u mjerenju masenim citometrom koja se dorađuju. Na primjer, stanice koje prođu kroz maseni citometar više se ne mogu dalje analizirati te su uništene (115). Problem je također i spor protok uzorka kroz instrument koji je u starijim verzijama masenog citometra oko 2000 događaja/sekundi (115). U literaturi se navodi i manja učinkovitost analize jer samo 30-60% stanica bude izmjereno, a i sama nemogućnost mjerenja pH i ionske koncentracije je jedan od ograničavajućih faktora (115). Osim toga, veliki problem je bio i što CyTOF ne omogućuje analiziranje morfologije stanica i tkiva. Međutim, sada je dostupan i dodatak za analizu histološkog tkiva (IMC, eng. *Imaging Mass Cytometry*) naziva Hyperion® Technology koja omogućuje analizu staničnih parametara unutar očuvane arhitekture tkiva (121). Analiziranje ovakvih podataka, koji su visoke dimenzionalnosti, zahtijeva korištenje kompleksnijih programa (115).

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje se provodilo u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu u suradnji s CLIP Laboratorijem za citometriju na Zavodu za dječju hematologiju i onkologiju Drugog medicinskog fakulteta u Pragu, Češka u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Multifactor analysis of HPV infected cells in cervical cancer development* (šifra projekta: HRZZ IP-2019-04-3403). Dio istraživanja je uključivao citološki laboratorij Klinike za ženske bolesti i porode u Kliničkom bolničkom centru Zagreb te citološki i patološki laboratorij Opće Bolnice Zabok. Ovaj projekt su odobrila etička povjerenstva Specijalne bolnice Sveta Katarina Zagreb i Opće bolnice Zabok (odluke 19/4-1 i 19/01-1619) te Bioetičko povjerenstvo Instituta Ruđer Bošković (BEP-3317/ 2-2019). Istraživanje se provelo na kliničkim uzorcima i staničnim linijama.

3.1. Popis kemikalija

- medij za tekućinsku citologiju (NOVAprep® OrangeHQ+ (Algimed Techno, LLC, Bjelorusija)
- fluorescentno obilježene kuglice koje sadrže 49 368 čestica u 50 µl (SPHERO™ AccuCount Particles, Spherotech, Inc, SAD)
- propidijum jodid (PI) (Sigma-Aldrich, SAD)
- puferirana otopina fosfatnih soli (PBS) Phosphat buffer saline pripremljena u omjeru kemikalija: 137 mM NaCl (Gram mol, RH), 2,7 mM KCl (Sigma-Aldrich, SAD), 1,4 mM KH₂PO₄ (Kemika, RH) i 4,3 mM Na₂HPO₄×7H₂O (Gram mol, RH), pH 7.4
- medij za staničnu kulturu Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM (Thermo Fisher Scientific, SAD) u kojeg su dodane navedene kemikalije: natrijev piruvat (100 mM) (Thermo Fisher Scientific, SAD), L-glutamin (300 µg/ml) (Sigma-Aldrich, SAD), Penicillin-Streptomycin (100 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, SAD) i goveđi serum Fetal Bovine Serum (FBS), 10% (v/v) (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- tripsin Trypsin-EDTA Solution (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- komplet reagensa za izolaciju DNA GenElute-E Single Spin Tissue DNA Kit (Sigma-Aldrich, SAD)
- komplet reagensa za izolaciju DNA QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Njemačka)

- Komplet reagenasa za konvencionalni PCR: Pufer 5X Green GoTaq® Flexi Buffer M891A (Promega Corporation, SAD), MgCl₂ 25mM A351H (Promega Corporation, SAD), dGTP PCR Grade, 250 µL, dATP PCR Grade, 250 µL, dTTP, PCR Grade, 250 µL, dCTP, PCR Grade, 250 µL, (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), GoTaq® G2 Hot Start Polymerase, M7408 (Promega Corporation, SAD) i GoTaq® DNA Polymerase. M830B (Promega Corporation, SAD)
- agaroz (Sigma Aldrich, Njemačka)
- interkalirajuća boja za označavanje nukleinskih kiselina u elektroforezi MidoriGreen (BioCat GmbH, Njemačka)
- marker za veličinu DNA GelPilot DNA Molecular Weight Markers 100 bp (Qiagen, Njemačka)
- pufer za otapanje agaroze TAE pripremljen sa navedenim kemikalijama: 40 mM Tris (Merck KGa, Njemačka), 20 mM octene kiseline (Gram mol, RH) i 1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma-Aldrich, SAD)
- komplet reagensa za konjugiranje antitijela teškim metalom (Maxpar Antibody Labeling User Guide, Standard BioTools Inc., SAD)
- reagens za pohranu antitijela: Antibody Stabilizator (Candor Bioscience GmbH, Njemačka)
- tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorid (TCEP, eng. *Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- komplet reagensa za barkodiranje uzoraka (CellID 20Plex, Standard BioTools Inc., SAD)
- komplet reagensa za površinsko i unutarstanično obilježavanje (Maxpar Nuclear Antigen Staining with Fresh Fix Protocol, Standard BioTools Inc., SAD).
- paraformaldehid 16% (Cell signaling Technology, SAD)
- Interkalirajuća boja za označavanje nukleinskih kiselina u masenoj citometriji Cell-ID Intercalator-Ir (Standard BioTools, SAD)
- kalibracijske kuglice za maseni citometar EQ Four Element Calibration Beads, Standard BioTools, SAD
- deionizirana voda MiliQ H₂O (Standard BioTools, SAD)
- komplet reagensa za imunocitokemiju: EnVision FLEX Mini Kit, High pH (K8023) (Agilent DAKO, SAD)
- destilirana i deionizirana voda
- apsolutni etanol (Gram mol, RH)
- medij za uklapanje BioMount Aqua (BioGnost, RH)

- hematoksin Mayer's Hematoxylin Counter Stain (Agilent - Dako, SAD)
- ksilen Bioclear (BioGnost, RH)
- citratni pufer pripremljen s navedenim kemikalijama u omjeru: 225 ml destilirane vode i 0,525 g limunske kiseline (Gram mol, RH) s dodavanjem natrijeve lužine (T.T.T., RH) do pH=6
- sljedovi početnica uključujući izvornu literaturu i proizvođača za detekciju HPV-a navedeni su u Tablici 3
- antitijela za antigene proteina, klon, proizvođač i lokacija obilježavanja istih su prikazani u Tablici 4

Tablica 3. Sljedovi početnica za detekciju HPV-a.

	Početnica	Slijed (sekvenca)	Literatura	Proizvođač
ljudski β-globin	GH20	5'CAACTTCATCCACGTTCCACC3'	Vossler, Forbes, i Adelson, 1995.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	PC04	5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'		
PGMY	PGMY11-A	5'GCACAGGGACATAACAATGG3'	Gravitt i sur. 2000.	Sigma-Aldrich, SAD
	PGMY11-B	5'GCGCAGGGCCACAATAATGG3'		
	PGMY11-C	5'GCACAGGGACATAATAATGG3'		
	PGMY11-D	5'GCCCAGGGCCACAACAATGG3'		
	PGMY11-E	5'GCTCAGGGTTTAAACAATGG3'		
	PGMY09-F	5'CGTCCCAAAGGAAACTGATC3'		
	PGMY09-G	5'CGACCTAAAGGAAACTGATC3'		
	PGMY09-H	5'CGTCCCAAAGGAAACTGATC3'		
	PGMY09-Ia	5'GCCAAGGGGAAACTGATC3'		
	PGMY09-J	5'CGTCCCAAAGGATACTGATC3'		
	PGMY09-K	5'CGTCCAAGGGGATACTGATC3'		
	PGMY09-L	5'CGACCTAAAGGGAATTGATC3'		
	PGMY09-M	5'CGACCTAGTGGAATTGATC3'		
	PGMY09-N	5'CGACCAAGGGGATATTGATC3'		
	PGMY09-Pa	5'GCCCAACGGAAACTGATC3'		
	PGMY09-Q	5'CGACCAAGGGAAACTGGTC3'		
	PGMY09-R	3'CGTCCTAAAGGAAACTGGTC3'		
		HMB01b		
LC	L1C1	5'CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT3'	Yoshikawa i sur. 1991.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	L1C2-1	5'TACCCTAAATACTCTGTATTG3'		
	L1C2-2	5'TACCCTAAATACCCTATATTG3'		
GP5/6+	GP5+	5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3'	Snijders i sur. 1990.	Sigma-Aldrich, SAD
	GP6+	5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC3'		
HPV 6/11	6/11-U E6.541	5' TACTGCTGGACAACATGC3'	Soler i sur., 1991.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	6/11-N E6.815	5' GTGCGCAGATGGGACACAC3'		
HPV31	31-U E2.3057	5' ATGGTGATGTACACAACACC3'	van den Brule i sur., 1990.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	31-N E2.3570	5' GTAGTTGCAGGACAACACTGAC3'		

Tablica 3. – nastavak.

HPV16	16-U E6.548	5'CCCAGCTGTAATCATGCATGGAGA3'	Soler i sur., 1991.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	16-N E7.801	5'GTGTGCCCATTAACAGGTCTTCCA3'		
HPV18	18-U E6.540	5'CGACAGGAACGACTCCAACGA3'	Soler i sur., 1991.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	18-N E7.741	5' GCTGGTAAATGTTGATGATTAACT3'		
HPV33	33-U E1.2415	5' ATGATAGATGATGTAACGCC3'	van den Brule i sur., 1990.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	33-N E2.2870	5' GCACACTCCATGCGTATCAG3'		
HPV45	45R E6.232	5' ACCTCTGTGCGTTCCAATGT3'	Sotlar i sur. 2004.	Macrogen, Inc., Južna Koreja
	45F E6.82	5' GTGGAAAAGTGCATTACAGG3'		
HPV52	52-U	5' GCAGAACAAGCCACAAGCAA3'	Walboomers i sur. 1999.	Sigma-Aldrich, SAD
	52-N	5' TAGAGTACGAAGGTCCGTCG3'		
HPV58	58-U	5'ACACAAACGAACCGTGGTGC3'	Walboomers i sur. 1999.	Sigma-Aldrich, SAD
	58-N	5' CGAGGATGAAATAGGCTTGG3'		

HPV-ljudski papiloma virus, PGMY, LC i GP5+/GP6+ -tri seta konsenzusnih početnica koji detektiraju širok spektar genotipova HPV-a, HPV16/18/33/6/22/31/45/52/58-tip specifične početnice za detekciju tipova HPV-a (122–130).

Tablica 4. Popis antitijela za antigene proteina.

Antigen proteina	Klon	Proizvođač	Obilježavanje	
CD29 (eng. <i>Cluster of differentiation 29</i> , klaster diferencijacije, integrin β 1)	TS2/16	Standard biotools, SAD	Površinsko obilježavanje	
CD324 (eng. <i>Cluster of differentiation 324</i> , klaster diferencijacije, E-kadherin)	24E10			
CD49f (eng. <i>Cluster of differentiation 49f</i> , klaster diferencijacije, ITGA6, integrin α 6)	GoH3			
CD71 (eng. <i>Cluster of differentiation 71</i> , klaster diferencijacije, transferinski receptor 1)	OKT-9			
p53	7F5			
β -katenin	D10A8			
CD63 (eng. <i>Cluster of differentiation 63</i> , klaster diferencijacije)	H5C6			
KLF4 (eng. <i>Krüppel-like factor 4</i>)	D1F2			
OCT3/4 (eng. <i>Octamer-binding transcription factor 3/4</i>)	40/Oct-3			
Nanog	N31-355			
Ki-67 (eng. <i>Marker of proliferation Kiel 67</i> , proliferacijski marker Kiel 67)	B56			Unutarstanično obilježavanje
c-Myc p67 (eng. <i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i>)	9E10			
p63- α	D2K8X			

Tablica 4. – nastavak.

Ck7 (Citokeratin 7)	D1E4	Cell Signaling Technology, SAD	Unutarstanično obilježavanje
Ck17 (Citokeratin 17)	D12E5		
Ck18 (Citokeratin 18)	DC10		
Ck5 (Citokeratin 5)	D4U8Q	EXBIO, Češka	
Ck8 (Citokeratin 8)	C-51		
Ck10 (Citokeratin 10)	VIK-10		
Ck19 (Citokeratin 19)	BA-17		
Ck14 (Citokeratin 14)	RCK107	Merck Millipore, SAD	
SRY-box2 (SOX2, eng. <i>Sex determining region Y-box 2</i>)	GT1876	GeneTex, SAD	
GLI1 (eng. <i>GLI family zinc finger protein 1</i>)	polyclonal	Novus Biologicals, SAD	
LRIG1 (eng. <i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1</i>)	789211	Sigma-Aldrich, SAD	
Ck10/13 (Citokeratin 10/13)	DE-K13		
AGR2 (eng. <i>Anterior gradient homolog 2, anteriorni gradijentni homolog 2</i>)	D9V2F		
MCM2 (eng. <i>Mini-chromosome maintenance proteins 2, mini-kromosomski protein održavanja 2</i>)	D7G11	Cell Signaling Technology, SAD	
MMP7 (eng. <i>Matrix metalloproteinase 7, matriks metaloproteinaza</i>)	polyclonal		
p16 INK4A (eng. <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, protein poznat po nazivu CDKN2A, inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A</i>)	D7C1M		

3.2. Popis pribora i aparature

- Cervex-brush® (Rovers Medical Devices, Nizozemska)
- centrifuge: 5403, 5415 C i 5415 R (Eppendorf, Njemačka)
- mješalica Heidolph™ Reax Top Vortex Mixer (Heidolph, Njemačka)
- epruvete različitih volumena 0,5, 1 ml (SARSTEDT AG & Co, Njemačka), 2 ml (Eppendorf, Njemačka), 5 ml (Greiner Bio-One, Austrija) i 15 ml, 50 ml (Deltalab, Španjolska)
- epruvete s filterom veličina 3kDa i 50 kDa Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore, SAD)
- protočni citometar FACSCalibur (BD Bioscience, SAD)
- automatski brojač stanica CellDrop FL Fluorescence Cell Counter (DeNovix Inc., SAD)
- boce za uzgoj stanica Nunc EasYFlask 75 cm² (Thermo Fisher Scientific, SAD)

- kabinet za rad u čistom i kabinet za rad u sterilnom (Klimaoprema d.d., RH)
- Inkubator za uzgajanje stanica BB-16 D (Heraeus Group, Njemačka)
- termomikser Thermomixer comfort (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina NanoPhotometer® N60 (Implen GmbH, Njemačka)
- uređaj za konvencionalnu lančanu reakciju polimerazom (PCR, eng. *Polymerase chain reaction*) Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- uređaj za vizualizaciju agaroznih gelova Alliance 4.7 Fluorescence and Chemiluminescence Systems (Uvitec Ltd, Velika Britanija)
- kadice za gel Sub-Cell GT Cell (Bio-RAD, SAD)
- staklena tikvica
- izvor struje PowerPRO 300 Power Supply, 300V, 700mA, 150W (Clever Scientific, Velika Britanija)
- mikrovalna pećnica R-2020 (SHARP, Japan)
- maseni citometar Helios™, a CyTOF (Standard biotools, SAD)
- sterilni filteri za stanice Flowmi Cell Strainer 70 μM (SP Bel-Art, SAD) i pluriStrainer Mini 70 μM (pluriSelect, Njemačka)
- kutijica za postepeno smrzavanje uzoraka Corning® CoolCell® Containers (Corning, SAD)
- VitroGnost pokrovna stakla 24x50 mm (BioGnost, RH)
- VitroGnost Plus Ultra adhezivna predmetna stakla (BioGnost, RH)
- marker Liquid Blocker (BioGnost, RH)
- plastične posudice za bojanje mikroskopskih stakalaca u imunohistokemiji
- fluorescentni mikroskop Olympus BX51 (Tokyo, Japan) s pripadajućim programom za prijenos preparata OLYMPUS stream Essentials 2.4
- centrifuga Medifuge™ Small Benchtop Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- citocentrifuga Cyto-Tek® 2500 (Sakura Finetek, SAD)
- komorice za citocentrifugu Cyto-Tek® Chamber Kit 1 mL (Sakura Finetek, SAD)
- mikroton i vodena kupelj za rezanje tkiva uklopljenog u parafin pfm Slide 2002 (Novoglas, Švicarska)
- električna pećnica (Thermo Electron Corporation, SAD)

3.3. Popis programa za analizu podataka

- FlowJo™ (v10) Software (BD Bioscience, SAD)
- Cytobank (Beckman Coulter Inc., SAD)
- R (v4.1.1.) s paketima CATALYST, CytoBatchNorm i CYTUTILS, (Posit PBC, SAD)
- MedCalc Software (v20.11, MedCalc Software Ltd, Belgija)
- CyTOF® Software (Standard biotools, SAD)

3.4. Klinički uzorci

Klinički uzorci prikupljeni su od žena koje su dolazile na rutinske i oportunističke ginekološke preglede u Specijalnu bolnicu Sveta Katarina Zagreb i Opće bolnicu Zabok, nakon što su etička povjerenstva odobrila primjenu protokola istraživanja. Pacijentice uključene u istraživanje su dolazile u rasponu od lipnja 2020. do prosinca 2023. Sve su pacijentice potpisale obrasce za informirani pristanak u vrijeme prikupljanja uzorka i podaci su anonimni. Prikupljeni su osnovni klinički i demografski parametri te podaci o povijesti pušenja, prethodnim trudnoćama, pobačajima, obiteljskoj i osobnoj povijesti raka, korištenju lijekova i cijepljenu protiv HPV-a. Ukupan broj žena koji je sudjelovao u ovom istraživanju je bio 321 u rasponu od 18-70 godina. Prilikom posjeta prvi bris vrata maternice uzet je za citološku dijagnostiku i rutinsko bolničko zbrinjavanje bolesnika. Za ovo istraživanje, drugi cervikalni citološki uzorak bris vrata maternice je dobiven s četkicom Cervex-brush® i fiksiran u NOVAprep® OrangeHQ+ mediju (Slika 15). Citološkom analizom su se brisevi vrata maternice klasificirali i grupirali prema Bethesdinoj klasifikaciji u normalne epitelne stanice bez promjene/negativne na prekancerozne intraepitelne lezije (NORMAL), atipične skvamozne stanice (ASC), skvamozne intraepitelne lezije niskog stupnja (LSIL) i skvamozne intraepitelne lezije visokog stupnja (HSIL). Konačni uključeni skup briseva vrata maternice korištenih za masenu citometriju i imunocitokemiju se odabrao na temelju citološke kategorije i prisutnosti HPV-a. Kriteriji za isključenje uzoraka su bili: neadekvatno uzorkovanje, <500 000 stanica za citometriju, velika količina prisutnih eritrocita (krv) i upalnih stanica. Metode koje su pri tom odabiru korištene su brojenje stanica protočnim citometrom i genotipizacija HPV.



Slika 15. Citološka četkica Cervex-brush® i posuda sa medijem za tekućinsku citologiju NOVAprep® OrangeHQ+.

Osim citoloških briseva vrata maternice, za potrebe istraživanja prikupljena su i tkiva uklopljena u parafin i fiksirana formalinom dobivena biopsijom vrata maternice istih pacijentica obrađenih u Općoj bolnici Zabok. Na biopsiju vrata maternice su bile pozvane pacijentice koje su imale abnormalne rezultate citološke dijagnostike u sklopu rutinske bolničke obrade. Patolog je kategorizirao histološke uzorke tkiva prema klasifikaciji CIN u one koje imaju normalne promjene na vratu maternice (NORMAL) i one koje imaju cervikalnu intraepitelnu neoplaziju (CIN) u tri stupnja (CIN1, 2, 3) prema težini. Konačni ukupni broj bioptata vrata maternice korištenih za imunohistokemiju je bio 26. Zbog manjka kliničkih uzoraka, brisevi i bioptati vrata maternice koji su korišteni u istraživanju nisu podudarni i nisu bili uvijek porijeklom od istih pacijentica.

3.5. Stanične linije

U istraživanju su se koristile tumorske stanične linije uzgojene *in vitro*: HeLa (stanična linija cervikalnog adenokarcinoma, ATCC CCL-2), CaSki (stanična linija cervikalnog epidermoidnog karcinoma, ATCC CRL 1550), Jurkat (stanična linija limfocita T dobivena iz akutne leukemije T stanica, ATCC TIB-152) i MCF-7 (stanična linija adenokarcinoma dojke, ECACC 86012803) koje su predstavljale pozitivne i negativne kontrole za proteine od interesa.

3.6. Uzgoj staničnih linija *in vitro*

Stanične linije su uzgojene mediju za staničnu kulturu u bocama za uzgoj stanica u inkubatoru u uvjetima 37°C i 5% CO₂ uz visoku vlažnost atmosfere (95%). Uslijedilo je uklanjanje medija, ispiranje stanica PBS-om i dodatak tripsina s ciljem odvajanja stanica od podloge za rast. U slučaju da stanična linija raste u suspenziji, tripsin se nije koristio. Otprilike 40x10⁶ stanica svake stanične linije uzgojeno je i fiksirano u otopini NOVAprep® OrangeHQ+ za citologiju.

3.7. Metode brojanja stanica

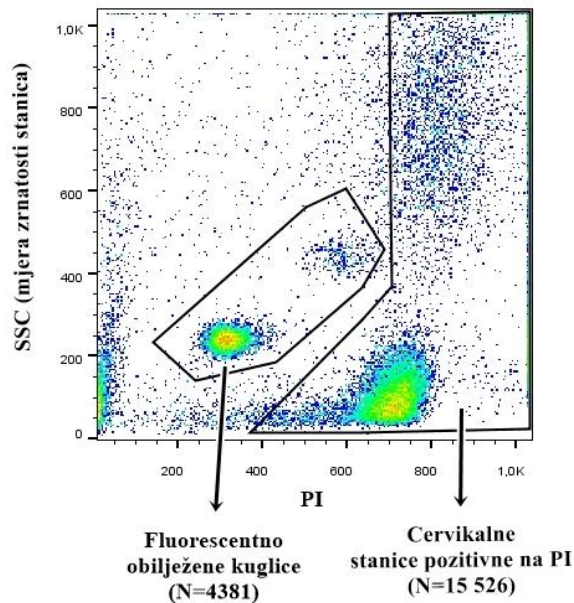
Za brojanje stanica kliničkih uzoraka brisa vrata maternice i staničnih linija korištene su dvije metode ovisno radi li se o staničnoj liniji ili o kliničkom uzorku brisa vrata maternice. Stanice koje potječu iz staničnih linija su brojane na automatskom brojaču stanica (CellDrop FL Fluorescence Cell Counter), dok je za briseve vrata maternice korišten protokol sa fluorescentno obilježenim kuglicama. Prvi korak je bio dobro promiješati fluorescentno obilježene kuglice 15 minuta na miješalici te označiti novu čistu epruvetu rednim brojem uzorka. Nakon toga se pipetiranjem, uzelo 50 µl stanične suspenzije kliničkog uzorka koja je prethodno promiješana i dodalo u epruvetu. Na isti način se dodalo i 50 µl fluorescentno obilježenih kuglica te promiješalo. Potom se dodalo 800 µl pufera PBS i 200 µl propidij jodida (PI) koncentracije 50 µg/ml. Propidij jodid je fluorescentna crvena boja koja se ugrađuje u dvostruki lanac molekule DNA i njezin intenzitet emisijskog spektra je razmjernan količini ugrađene boje koja je pak proporcionalna količini DNA u stanici. Pripremljena suspenzija kuglica i kliničkog uzorka se mjerila na brzini Medium na protočnom citometru FACSCalibur tri minute. U tri minute dobio se određeni broj cervikalnih stanica brisa vrata maternice koje su pozitivne na PI te određeni broj fluorescentno obilježenih kuglica. Nakon toga podaci su se obradili u programu FlowJo te se prema formuli odredio broj stanica u uzorku. Primjer određivanja broja stanica u kliničkom uzorku brisa vrata maternice prikazan je na Slici 16.

Formula za određivanje broja stanica je:

Koncentracija stanica u 1 µl = broj stanica pozitivnih na PI / broj izmjerenih fluorescentnih kuglica x broj kuglica u 1 µl*

Broj kuglica u 1 µl = broj kuglica u 50 µl/50 µl = 49 368*/50 = 987,3

*broj kuglica u 50 µl je naveden na bočici u kojoj se nalaze kuglice



Slika 16. Primjer određivanja broja stanica u kliničkom uzorku brisa vrata maternice. Na x osi prikazan je PI (propidij jodid), dok je na y osi mjera zrnatosti stanica (SSC, eng. *Side scatter*). U prikazanom primjeru je u tri minute izmjereno 4381 fluorescentno obilježenih kuglica i 15 526 cervikalnih stanica pozitivnih na PI. Kada su se ti izmjereni brojevi stavili u Formulu za određivanje broja stanica, dobila se koncentracija stanica u 1 μ l što je u ovom primjeru 3498 stanica/ μ l.

3.8. Genotipizacija HPV

3.8.1. Izolacija virusne DNA

Deoksiribonukleinska kiselina iz uzoraka brisa vrata maternice izolirala se pomoću dva protokola: GenElute-E Single Spin Tissue DNA Kit i QIAamp® DNA Mini kit.

Postupak izolacije DNA različitim protokolima:

a) GenElute-E Single Spin Tissue DNA Kit (Sigma-Aldrich, SAD)

Prvi korak je bio uzeti 1 ml uzorka brisa vrata maternice iz LBC otopine u epruvetu od 2 ml, centrifugirati ga na 2000 g 5 minuta te izliti supernatant. Nakon toga se na talog stanica dodao 1 ml PBS-a za ispiranje, epruveta se centrifugirala na 2000 g, 5 min i izlio se supernatant. Na talog se dodalo 90 μ l pufera Tissue Lysis Buffer i 5 μ l proteaze SmartLyse Protease mix-a. Epruveta s uzorkom se dalje inkubirala 30 minuta na 60°C na maksimalnoj brzini na termomikseru. Dok traje inkubacija se pripremala kolona. Prvo se promiješala 3 sekunde te se ostavila da odstoji na sobnoj temperaturi 10-20 minuta u epruveti od 2 ml. Nakon toga se malo odvrnuo čep na koloni i pokidao kraj te

se takva vratila ponovno u epruvetu od 2 l. Dalje se centrifugirala 1 minutu na 1000 g te se odbacila epruveta od 2 ml sa supernatantom. Kolona se nakon toga stavila u 1,5 ml epruvetu. Nakon što je inkubacija uzorka bila gotova, dodalo se 1 μ l RNase A Tissue, promiješalo te inkubiralo 2 minute na sobnoj temperaturi. Dodalo se 10 μ l Clearing solution T i promiješalo. Slijedilo je centrifugiranje 2 minute na maksimalnoj brzini što je 16 000 g. Supernatant ovakvog liziranog uzorka prebacio se (maksimalno 100 μ l) u kolonu tako da se ne diraju filteri. Nakon toga se kolona centrifugirala 1 minutu na 1000 g da se skupi sva DNA koja se nalazila u eluatu.

b) QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Njemačka)

Prvi korak je bio uzeti 1 ml uzorka brisa vrata maternice iz LBC otopine u epruvetu od 2 ml, centrifugirati ga na 2000 h 5 minuta te izliti supernatant. Nakon toga se na talog stanica dodao 1 ml PBS-a za ispiranje, epruveta se centrifugirala na 2000 g, 5 min i izlio se supernatant. Na talog se dodalo 180 μ l pufera Buffer ATL i 20 μ l proteaze Proteinase K. Epruveta sa uzorkom se dalje inkubirala preko noći na 37°C na maksimalnoj brzini na termomikseru. Idući dan se dodalo 200 μ l pufera Buffer AL te promiješalo 15 sekundi. Nakon toga se epruveta dalje inkubirala na 70°C 10 minuta. Dalje se dodalo 200 μ l 96% etanola te promiješalo 15 sekundi. Uzorak iz epruvete se prebacio na membransku kolonu QIAamp Mini spin column koje se nalazi u epruveti za skupljanje od 2 ml. Kolona se centrifugirala na 6000 g 1 minutu. Ostatak supernatanta i epruveta za skupljanje su se bacili. Kolona se stavila u novu takvu epruvetu, dodalo se 500 μ l pufera AW1 te se centrifugiralo na 6000 g 1 minutu. Ostatak supernatanta i epruveta za skupljanje su se bacili. Postupak se ponovio opet, ali u ovom slučaju sa puferom AW2 i na najjačoj centrifugi (16 000 g) 3 minute. Kolona se nakon toga stavila u novu epruvetu od 1,5 ml, isprala sa 100 μ l destilirane vode na 6000 g 1 minutu. Postupak se ponovio s 50 μ l destilirane vode. Nakon toga se kolona bacila i supernatant koji je ostao u epruveti od 1,5 ml je DNA u destiliranoj vodi.

Koncentracija DNA se odredila pomoću nanofotometra. Sve koncentracije veće od 0,05 μ g/ μ l su se razrijedile na tu koncentraciju i dalje analizirale putem lančane reakcije polimerazom (PCR-a).

3.8.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR) za detekciju HPV-a provedena je s tri seta konsenzusnih početnica: PGMY, LC i GP5+/GP6+ koji detektiraju širok spektar genotipova HPV-a. Tip specifične početnice za tipove HPV16, HPV18, HPV33, HPV6/11, HPV31, HPV45, HPV52, HPV58 korištene su u tri multipleks i jednoj zasebnoj PCR reakciji. Kao interna kontrola kvalitete izolirane DNA i odsutnosti PCR inhibitora korištena je PCR amplifikacija s početnicama PC04/GH20 za ljudski β -globin gen u multipleks reakciji s PGMY početnicama. Svaka reakcija umnožavanja provedena je u ukupnom volumenu od 20 μ l. Reakcijske smjese sadržavale su sterilnu vodu, pufer (5X Green GoTaq® Flexi Buffer i 100 ng svake DNA. Sljedovi početnica uključujući izvorne reference i proizvođača navedeni su ranije u tablici 3 (vidi Materijali i metode). Sve reakcije PCR sadržavale su pozitivne kontrole uključujući DNA stanične linije CaSki, HeLa ili/i prethodno pozitivne uzorke provjerene kao kontrole i markere veličine, dok su negativne kontrole PCR sadržavale sve PCR reagense bez DNA.

Reagensi (sastojci), uvjeti i broj ciklusa denaturacije, sparivanje početnica i sinteze komplementarnog lanca (produljivanje) za svaki PCR:

a) Reakcija PCR s konsenzusnim skupom početnica PGMY

DNA je umnožena s konsenzusnim skupom početnica PGMY te PC04 i GH20, početnicama specifičnim za ljudski beta-globin gen. Smjesa PCR sadržavala je 3 mM $MgCl_2$, 0,1 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq Hot Start DNA polimeraze, 1,8 μ M svake početnice PGMY i 50 mM PC04 i GH20 početnica. Umnožavanje DNA provedeno je prema sljedećem protokolu: početna denaturacija na 95 °C tijekom 9 minuta i 40 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95 °C tijekom 1 minute, sparivanje početnica na 55 °C tijekom 1 minute, produljenje komplementarnog lanca na 72 °C tijekom 1 minute, s konačnim produljenjem na 72 °C tijekom 5 minuta.

b) Reakcija PCR s konsenzusnim početnicama L1C1/L1C2-1/L1C2-2

Smjesa PCR za konsenzusne početnice L1C1/L1C2-1/L1C2-2 sadržavala je 2,5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq DNA polimeraze, 0,5 μ M početnica L1C1 i 0,25 μ M L1C2-1 i L1C2-2. Uvjeti umnožavanja DNA bili su: početna denaturacija na 95°C tijekom 10 minuta i 30 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95°C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica na 53°C

tijekom 30 sekundi, produljenje komplementarnog lanca na 72°C tijekom 30 sekundi, i konačno produljenje na 72°C tijekom 7 min.

c) Reakcija PCR s konsenzusnim početnicama GP5+/GP6+

Smjesa PCR za konsenzusne početnice GP5+/GP6+ sadržavala je 2,5 mM MgCl₂, 0,05 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq DNA polimeraze i 0,5 μM svake početnice GP5+/GP6+. Umnožavanje DNA provedeno je prema sljedećem protokolu: početna denaturacija na 95°C tijekom 9 minuta i 45 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95°C tijekom 1 minute, sparivanje početnica na 50°C tijekom 2 minute, produljenje komplementarnog lanca na 72 °C tijekom 90 s, a konačno produljenje na 72 °C tijekom 4 minute.

d) Reakcija PCR s višestrukim početnicama za HPV16/18/33

Smjesa PCR za tipove HPV16, HPV18 i HPV33 sadržavala je 1,625 mM MgCl₂, 0,15 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq Hot Start DNA polimeraze, 0,15 μM svake početnice HPV16, HPV18 i HPV33. Uvjeti umnožavanja DNA bili su: početna denaturacija na 95°C tijekom 5 minuta i 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95°C tijekom 60 sekundi, sparivanje početnica na 58°C tijekom 45 sekundi, produljenje komplementarnog lanca 72°C tijekom 1 minute, s konačnim produljenjem na 72°C tijekom 7 min.

e) Reakcija PCR s višestrukim početnicama HPV6/11/31

Smjesa PCR za tipove HPV6/11 i HPV 31 sadržavala je 2,5 mM MgCl₂, 0,10 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq Hot Start DNA polimeraze, 0,15 μM svake početnice HPV6/11 i HPV31. Uvjeti umnožavanja DNA bili su: početna denaturacija na 95°C tijekom 5 minuta i 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95°C tijekom 60 sekundi, sparivanje početnica na 65°C tijekom 45 sekundi, produljenje komplementarnog lanca na 72°C tijekom 1 minute, s konačnim produljenjem na 72°C tijekom 7 min.

f) Reakcija PCR s višestrukim početnicama HPV45/58

Smjesa PCR za tipove HPV45 i HPV 58 sadržavala je 2,5 mM MgCl₂, 0,15 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq Hot Start DNA polimeraze, 0,2 μM svake početnice HPV45 i HPV58 . Uvjeti umnožavanja DNA bili su: početna

denaturacija na 95°C tijekom 5 minuta i 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95°C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica na 57,5°C tijekom 30 sekundi, produljenje komplementarnog lanca na 72°C tijekom 30 sekundi, s konačnim produljenjem na 72°C tijekom 7 min.

g) Reakcija PCR s početnicama HPV52

Smjesa PCR za tip HPV52 specifičnih početnica sadržavala je 1,5 mM MgCl₂, 0,10 mM svakog dNTP-a (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 0,2 U GoTaq Hot Start DNA polimeraze, 0,15 μM svake HPV52 početnice. Uvjeti umnožavanja DNA bili su: početna denaturacija na 95°C tijekom 5 minuta i 35 ciklusa koji su uključivali denaturaciju na 95°C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica na 57,5°C tijekom 30 sekundi, produljenje komplementarnog lanca na 72°C tijekom 30 sekundi, s konačnim produljenjem na 72°C tijekom 7 min.

3.8.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Za vizualizaciju umnoženih PCR produkta su pripremljeni 2% agarozni gelovi. U staklenu tikvicu se dodalo 1,5 g agaroze i 75 ml prethodno razrijeđenog TAE pufera. Agaroz je rastaljena zagrijavanjem do vrenja u mikrovalnoj pećnici, nakon čega je ohlađena pod mlazom vode na otprilike 50°C. Nakon toga se dodalo 1,5 μl interkalirajuće boje MidoriGreen u ohlađenu agarozu, sve sam promiješalo i izlilo u nosač za gel. Nosač s gelom se pokrio aluminijskom folijom i ostavio na sobnoj temperaturi da polimerizira najmanje 30 minuta. Nakon što se gel polimerizirao, 20 μl PCR produkta se prenio pipetom u jažice gela. Elektroforeza na gelu je izvedena tijekom 15-25 minuta, pri naponu od 130 V i jakosti struje 120 mA. Rezultati su se vizualizirali ultraljubičastim (UV, eng. *Ultraviolet*) zračenjem i fotografirali uređajem Alliance 4.7 Fluorescence and Chemiluminescence Systems. Za određivanje veličine produkta PCR reakcije korišten je marker veličine 100 bp. Veličine produkta su bile: 260 bp za ljudski beta globin, 450 bp za PGMY, 301 bp za HPV6/11, 514 bp za HPV31, 253 bp za HPV16, 201 bp za HPV18, 455 bp za HPV33, 229 bp za HPV52, 150 za HPV45, 110 bp za HPV58, 250 bp za LC i 142 bp za GP5+/6+. Uzorak se smatrao adekvatnim ukoliko je amplifikacija gena β-globina bila uspješna, a uzorci su se klasificirali pozitivnim na HPV X ako su bili amplificirali pomoću početnica za PGMY, GP ili LC PCR koji otkrivaju široki spektar tipova HPV-a. Pomoću specifičnih početnica napravljena je genotipizacija virusa da se detektiraju i najčešći tipovi HPV-a, te u tom slučaju se uzorak

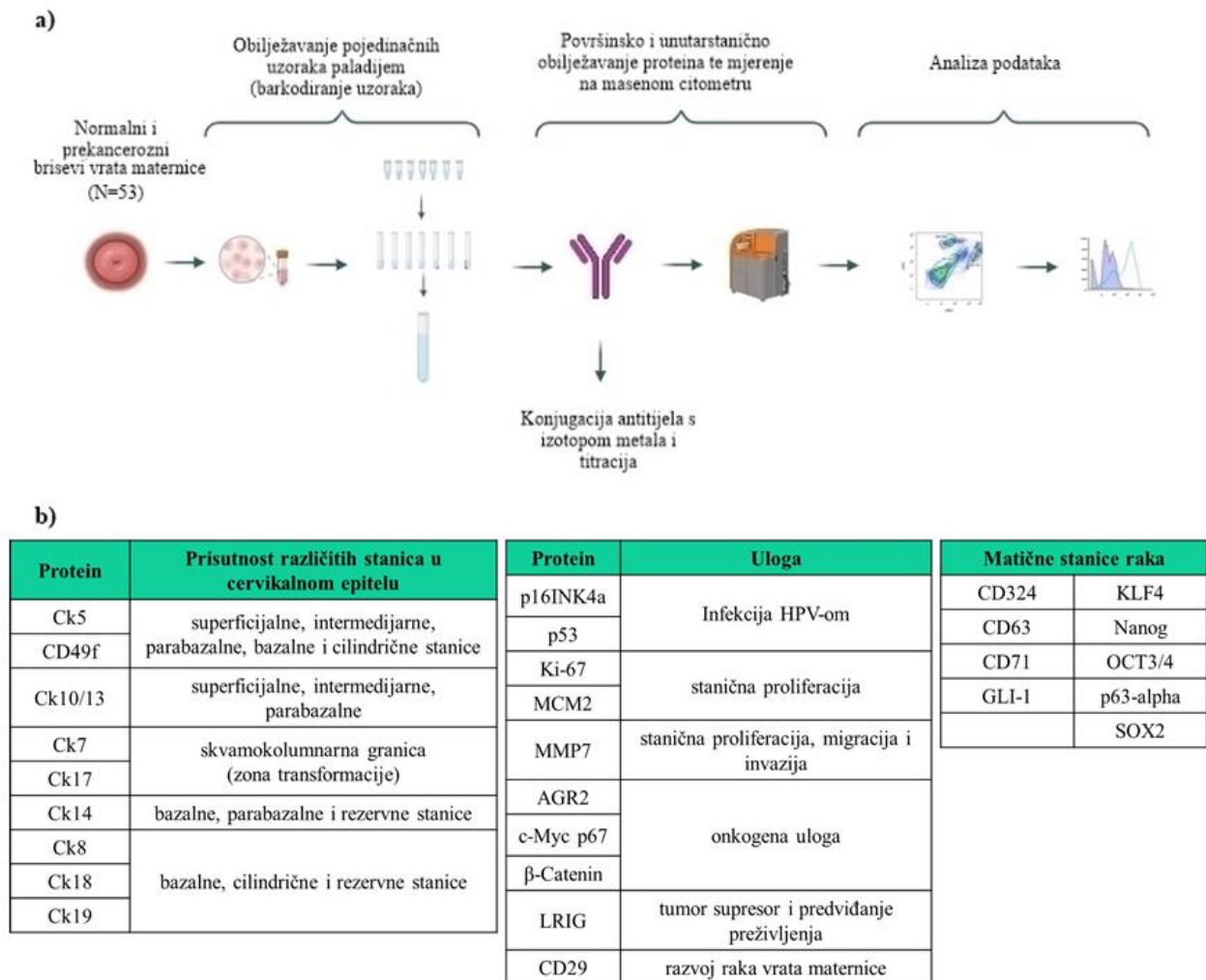
smatrao pozitivan specifično na tipove HPV 6/11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 ili je X (nepoznat HPV tip).

3.9. Ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice masenom citometrijom

Nakon uzgoja staničnih linija koje su predstavljale pozitivne i negativne kontrole za proteine od interesa, brojenja stanica u brisevima vrata maternice i staničnim linijama te HPV genotipizacije, idući korak je bio ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice masenom citometrijom (Slika 17a). Konačni skup kliničkih uzoraka briseva vrata maternice koji su ispitani masenom citometrijom sastojao se od: 10 uzoraka bez citoloških abnormalnosti i HPV-a (NORMAL), 10 uzoraka bez citoloških abnormalnosti, ali imaju prisutan HPV (NORMAL HPV+), 10 uzoraka atipičnih skvamoznih stanica (ASC), 10 uzoraka sa prekanceroznom lezijom niskog stupnja (LSIL) te 13 uzoraka s prekanceroznom lezijom visokog stupnja (HSIL). Svaki je pokus sadržavao pozitivnu kontrolu, negativnu kontrolu i 5 kliničkih uzoraka. Odabranih 53 uzoraka je raspoređeno u 11 odvojenih pokusa distribuiranih u 2 pokusa za NORMAL (N=10), 2 za NORMAL HPV+ (N=10), 2 za LSIL (N=10), 2 za ASC-US (N=10) i 3 za HSIL (N=15). Dva HSIL uzorka su rezultirala premalim brojem stanica i ponovno su analizirana u trećem pokusu citološke kategorije HSIL te je u daljnju analizu odabran onaj uzorak s većim brojem stanica. Pripremljene su suspenzije pojedinačnih stanica te je ukupan broj stanica u jednom pokusu za obilježavanje proteina bio 3 milijuna stanica. Otprilike u jednom pokusu je bilo sadržano $0,5 \times 10^6$ stanica svakog kliničkog uzorka (N=5), $0,2 \times 10^6$ stanica negativne kontrole Jurkat (N=1) i $0,3 \times 10^6$ stanica pozitivne kontrole ($0,1 \times 10^6$ svake stanične linije: MCF7, HeLa, CaSki) (N=1).). Nakon toga idući korak je bio obilježavanje pojedinačnih uzoraka paladijem, odnosno barkodiranje uzoraka te površinsko i unutarstanično obilježavanje 29 proteina i mjerenje na masenom citometru. Zadnji korak je bila analiza dobivenih podataka.

Korak koji je prethodio analizi briseva vrata maternice uzoraka je bio odabir proteina koji će se ispitivati te priprema antitijela na antigene tih proteina. Priprema antitijela podrazumijeva da je svako odabrano antitijelo obilježeno (konjugirano) određenim izotopom teškog metala i da je količina antitijela potrebna za pokuse optimizirana titracijom na pozitivnim i negativnim kontrolama, u ovom slučaju staničnim linijama. Konačni panel proteina dizajniran je prema literaturi i podijeljen je na one proteine koji imaju ulogu u određivanju prisutnosti različitih

stanica u cervikalnom epitelu, infekciji HPV-a, staničnoj proliferaciji, cervikalnoj karcinogenezi i one koji predstavljaju matične stanice raka (Slika 17b) (131–151).



Slika 17. Ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice masenom citometrijom.

a) Sažeti prikaz protokola ispitivanja ekspresije proteina masenom citometrijom. b) Popis proteina i njihove glavne uloge. HPV-ljudski papiloma virus, Ck-citokeratin, CD49f (ITGA6)-integrin $\alpha 6$, p16 INK4A- inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A, Ki-67-proliferacijski marker Kiel 67, MCM2-mini-kromosomski protein održavanja 2, MMP7-matriks metaloproteinaza 7, AGR2-anteriorni gradijentni homolog 2, c-Myc p67-cellular myelocytomatosis oncogene, LRIG1-Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1, CD29-integrin $\beta 1$, CD324-E-kadherin, CD63-klaster diferencijacije 63, CD71-transferin receptor 1, GLI1-GLI family zinc finger protein, KLF4-Krüppel-like factor 4, OCT3/4-Octamer-binding transcription factor $3/4$, SOX2-sex determining region Y-box 2.

3.9.1. Konjugacija antitijela s izotopom metala

Svako odabrano antitijelo je obilježeno određenim izotopom teškog metala korištenjem kompleta reagensa za konjugiranje antitijela izotopom teškog metala (Maxpar Antibody Labeling User Guide, Standard BioTools, SAD), osim ako željena obilježena antitijela nisu već bila komercijalno dostupna. Antitijela na antigene proteina AGR2, MCM2, MMP7, p16 INK4A, Cks 5, 7, 8, 10, 10/13, 14, 17, 18 i 19, SOX2, GLI1 i LRIG su konjugirani ovim protokolom, a antitijela proizvođača Standard BioTools (SAD) (Tablica 4) su već komercijalno obilježena jednim od izotopa metala.

Postupak protokola:

Prvi korak je bio konjugirati odgovarajući metal i polimer. Polimer za odgovarajući metal se otopio u 95 µl pufera L i promiješao pipetom. Dodalo se 5 µl odgovarajućeg metala (finalne koncentracije 2,5 mM) i promiješalo pipetom. Polimer s metalom se inkubirao 30-40 min na 37°C. U epruvetu koja sadrži 50 kDa filter s odgovarajućim antitijelom se dodalo 300 µL pufera R. Nakon toga se dodalo 100 µg antitijela u epruvetu s 50kDa filterom. Epruveta se centrifugirala na 12000 g 10 min na sobnoj temperaturi. Također, započelo se s idućim korakom dodavanja 200 µl pufera L u epruvetu koja sadrži filter veličine 3 kDa s odgovarajućim metalom. Nakon toga se dodalo 100 µl 4mM TCEP u epruvetu s 50kDa filter i promiješalo te je započela redukcija antitijela 30 minuta na 37°C. Suspenzija s polimerom se dalje dodala u epruvetu s 3kDa filterom i promiješala s puferom koji je unutra. Epruveta se centrifugirala 12000 g 25 min na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, redukcija antitijela je zaustavljena dodatkom 300 µl pufera C u epruvetu s 50kDa filter. Epruveta se centrifugirala 12000 g 10 min na sobnoj temperaturi te se ponovilo ispiranje još jednom sa 400 µl pufera C. U drugu epruvetu s 3 kDa filterom koja se centrifugirala, dodalo se također 300 µl pufera C te centrifugiralo 12000 g 30 min na sobnoj temperaturi. Obje filter epruvete, s priređenim antitijelom i metal-polimerom su trebale biti gotove/centrifugirane u isto vrijeme. To je vrlo važno jer je idući korak konjugacija antitijela sa metal-polimerom. Nakon toga se dodalo 60 µl pufera C u metal-polimer u epruvetu s filterom 3 kDa te se dobro isprao filter. Taj volumen (suspenzija pufera C i metal polimera) se onda dodala u epruvetu s 50kDa filterom i isprala filtere na kojima je tu vezano antitijelo. Takva epruveta sa inkubirala na 37°C 60 – 120 minuta. Nakon toga, u proces dalje ide samo jedna epruveta s 50 kDa filterom u kojoj su konjugirano antitijelo sa metal-polimerom. U tu epruvetu se dodalo 300 µl pufera W za ispiranje, centrifugiralo se 12000 g 10 min na sobnoj temperaturi. Ponovilo se ispiranje 3 puta sa 400 µl pufera W. Nakon toga, dodalo se 50 µL Antibody Stabilizator (Candor Bioscience

GmbH, Wangen, Njemačka) u epruvetu s 50kDa filterom. Epruveta se centrifugirala 1000 g 2 min na sobnoj temperaturi. Još jednom se ponovilo ispiranje antitijela sa filtera sa 50 µl Antibody Stabilizatora i centrifugiralo se 1000 g 2 min na sobnoj temperaturi. Dobiveni filtrat od 100 µl u kojem se nalazi antitijelo konjugirano s metal-polimerom, prebacio s u novu epruvetu, označio i pohranio na +4 °C.

3.9.2. Titracija antitijela

Za svaki protein o interesa odabrala se pozitivna i negativna stanična linija, provela titracija antitijela koja su konjugirana izotopom metala putem protokola za konjugiranje antitijela izotopom metala te titracija cijelog panela koji je uključivao sve konačno odabrane proteine čija ekspresija se ispitivala. Nakon titracije antitijela, odabrao se konačni volumen antitijela koji je pokazivao najbolju razliku pozitivne i negativne kontrole. U Tablici 5 su prikazani konačno odabrani volumeni antitijela nakon titracija, konjugirani izotop metala te pozitivna i negativna kontrola za sve antigene proteina u istraživanju.

Tijekom titracije antitijela korištene su metode obilježavanja pojedinačnih uzoraka paladijem (barkodiranje uzoraka) (vidi postupak protokola pod 3.9.3.) te površinsko i unutarstanično obilježavanje proteina masenom citometrijom (vidi postupak protokola pod 3.9.4.).

Tablica 5. Tablica volumena antitijela, konjugirani izotop metala, pozitivna i negativna kontrola za sve antigene proteina.

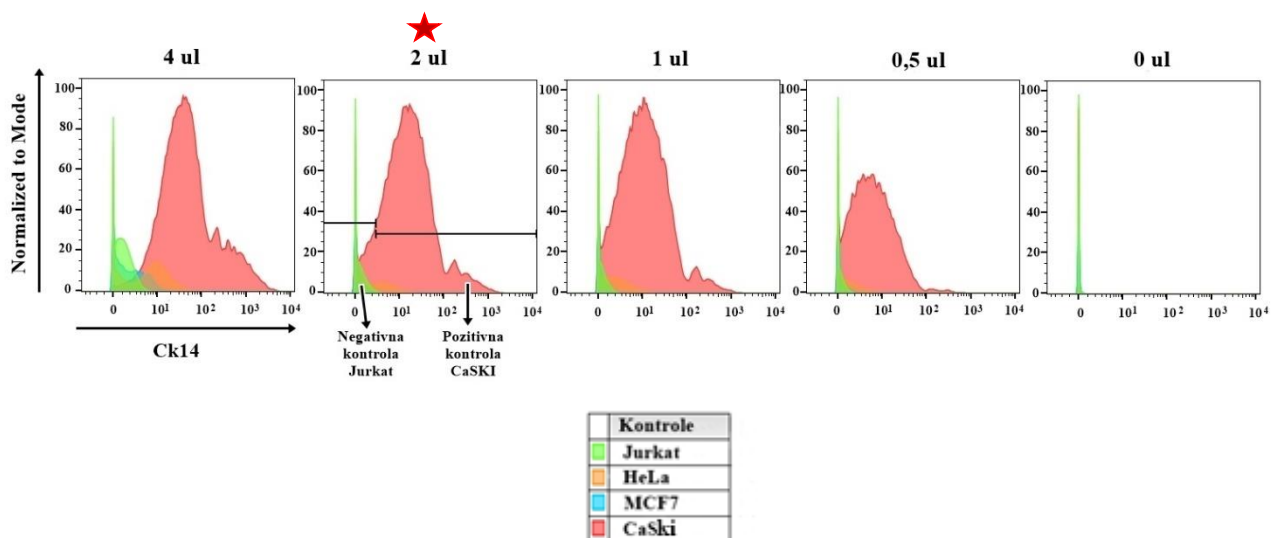
Antigen proteina	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola	Volumen antitijela (µl)	Izotop metala
CD29	MCF7/CaSki	Jurkat	1	Gd156
CD324	CaSki	Jurkat	2	Gd158
CD49f (ITGA6)	HeLa	Jurkat	6	Dy164
CD71	nema*	Jurkat	6	Lu175
AGR2	nema*	sve*	6	Dy163
Ck10	MCF7	Jurkat	2	Gd160
Ck10/13	bris vrata maternice*	Jurkat	1	Sm149
LRIG	MCF7	Jurkat	6	Nd144
MCM2	Jurkat	sve*	3	Sm152
MMP7	HeLa	Jurkat	6	Er167
p16 INK4A	MCF7	Jurkat	9	Nd145
Ck7	CaSki	Jurkat	1	Er168
Ck8	CaSki	Jurkat	1	Yb171
Ck17	CaSki	Jurkat	2	Pr141
Ck18	CaSki / MCF7	Jurkat	1	Nd146
Ck19	CaSki /MCF7	Jurkat	2	Tb159
p53	MCF7	Jurkat	2	Nd143
β-Catenin	MCF7	Jurkat	3	Sm147
CD63	MCF7	Jurkat	0,33	Nd150
KLF4	MCF7	Jurkat	3	Dy162
Oct-3/4	nema*	sve*	1	Ho165
Nanog	CaSki	Jurkat	3	Tm169
Ki-67	MCF7	Jurkat	1	Yb172
c-Myc p67	nema*	sve*	1	Yb176
Ck5	CaSki	Jurkat	1	Yb174
Ck14	CaSki	Jurkat	6	Gd155
SOX2	nema*	sve*	2	Eu153
GLI-1	MCF7	Jurkat	6	Eu151
p63-alpha	nema*	sve*	12	Sm154

*nema -za određeni broj proteina nije pronađena tumorska stanična linija koja predstavljala pozitivnu kontrolu, sve -sve tumorske stanične linije su bile negativne na određeni protein, bris vrata maternice -za protein Ck10/13 je bris vrata maternice predstavljao pozitivnu kontrolu. CD29-integrin β1, CD324-E-kadherin, CD49f (ITGA6)-integrin α6, CD71-transferin receptor 1, AGR2-anteriorni gradijentni homolog 2, Ck-citokeratin, LRIG1-*Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1*, MCM2-mini-kromosomski protein održavanja 2, MMP7-matriks metaloproteinaza 7, p16 INK4A- inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A, CD63-klaster diferencijacije 63, KLF4-*Krüppel-like factor 4*, OCT3/4-*Octamer-binding transcription factor 3/4*, Ki-67-proliferacijski marker Kiel 67, c-Myc p67-*cellular myelocytomatosis oncogene*, , SOX2-*sex determining region Y-box 2*, GLI1-*GLI family zinc finger protein 1*.

a) Titracija antitijela koja su konjugirana korištenjem protokola za konjugiranje antitijela izotopom teškog metala (Maxpar Antibody Labeling User Guide, Standard BioTools Inc., SAD)

Postupak:

Antitijela koja su konjugirana su se morala zasebno titrirati s pozitivnim i negativnim kontrolama u količinama 0 μ l, 0,5 μ l, 1 μ l, 2 μ l i 4 μ l antitijela na tri milijuna stanica u ukupnom volumenu od 100 μ l te se nakon toga odabrao volumen antitijela koji daje najbolju razliku pozitivne i negativne kontrole. U ovoj titraciji korištene su tumorske stanične linije MCF7, HeLa, CaSki i Jurkat. Primjer takve titracije za antitijelo antigena Ck14 je prikazano na Slici 18. Svaki signal izotopa metala predstavlja prisutnost određenog proteina u pojedinoj stanici, odnosno ovdje prisutnost Gd155 predstavlja prisutnost Ck14. Odabrana količina antitijela je bila 2 μ l jer daje najbolju razliku između pozitivne kontrole CaSki i negativne kontrole Jurkat. Odnosno, signal negativne kontrole na Ck14 je manji od 10^1 , a kod pozitivne kontrole ide do 10^3 . Također, količina 4 μ L antitijela je pokazala dobru razliku, ali nije nužna jer bi se previše antitijela potrošilo i druge kontrole imaju veći pozadinski signal (eng. *Background signal*).

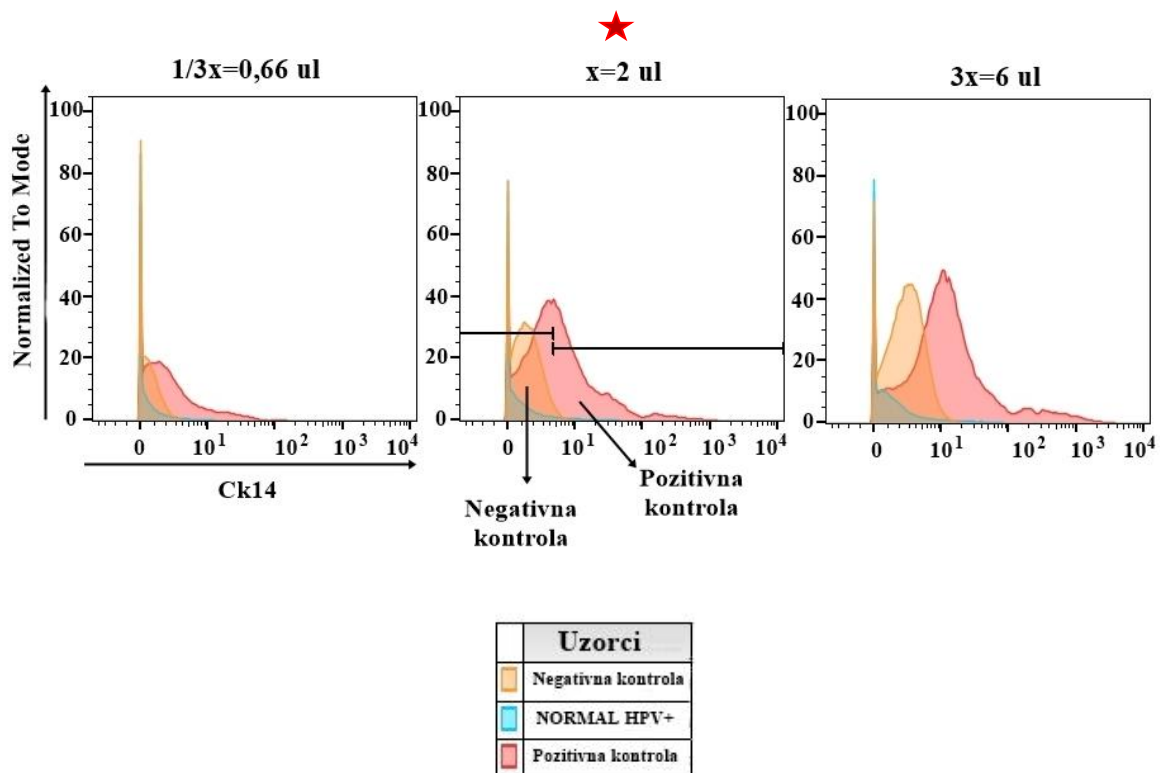


Slika 18. Primjer titracije za antitijelo antigena Ck14 u količinama 0 μ l, 0,5 μ l, 1 μ l, 2 μ l i 4 μ l na staničnim linijama MCF7, HeLa, CaSki i Jurkat. Na x osi prikazan je antigen Ck14 obilježen izotopom metala Gd155, dok je na y osi prikazana mjera *Normalized to Mode* (programska mjera za broj stanica (eng. *Counts*)). Svaki signal izotopa metala Gd155 kojim je obilježen Ck14 predstavlja prisutnost proteina Ck14 u pojedinoj stanici. Ck-Citokeratin.

b) Titracija svih antitijela na antigene proteina (cijelog panela antitijela) zajedno

Postupak:

Nakon što su titrirana antitijela koja su se morala zasebno konjugirati izotopom metala, napravljena je titracija svih antitijela na antigene proteina (cijelog panela). U ovoj titraciji korištene su sve kontrole (MCF7, HeLa, CaSki, Jurkat) i jedan klinički uzorak kategorije NORMAL HPV+ da se provjeri kako se antitijelo ponaša na kliničkom uzorku, odnosno koliki mu je pozadinski signal ovisno o količini antitijela. Određena antitijela na antigene proteina nisu imala pozitivne ili negativne kontrole. Za ostale proteine koji su imali kontrole, to su bile tumorske stanične linije MCF7, HeLa i CaSki kao pozitivne kontrole, a Jurkat kao negativna kontrola (Tablica 5). Zbog toga su ove pozitivne kontrole pomiješane i stavljene dalje u pokuse pod jednu pozitivnu kontrolu, a Jurkat kao negativna. Polazni volumen antitijela (x) je bio 1 μl za antitijela proizvođača Standard Biotools (SAD), a za zasebno konjugirana antitijela onaj koji se odabrao nakon titracije (0 μl , 0,5 μl , 1 μl , 2 μl ili 4 μl). Titracija se izvela za tri količine antitijela na tri milijuna stanica u ukupnom volumenu od 100 μl : količina x, 3 puta veća od x te 3 puta manja od x. Na primjer, ako je $x=1 \mu\text{l}$, onda je 3 puta veća količina 3 μl , a tri puta manja 0,33 μl . Primjer takve titracije za antitijelo na antigen Ck14 je prikazano na Slici 19. Svaki signal izotopa metala predstavlja prisutnost određenog proteina u pojedinoj stanici, odnosno ovdje prisutnost Gd155 predstavlja prisutnost Ck14. Odabrana količina antitijela je i dalje bila 2 μl jer je pokazala najbolju razliku između pozitivne kontrole i negativne kontrole. Odnosno, signal negativne kontrole na Ck14 je manji od 10^1 , a kod pozitivne kontrole ide do 10^3 .



Slika 19. Titracija za antitijelo antigena Ck14 u količinama $x=2 \mu\text{l}$, $3x=6 \mu\text{l}$ i $1/3x=0,66 \mu\text{l}$ na pozitivnoj (pomiješane stanične linije MCF7, HeLa, CaSki), negativnoj (Jurkat) kontroli i kliničkom uzorku (NORMAL HPV+). Na x osi prikazan je antigen Ck14 obilježen izotopom metala Gd155, dok je na y osi prikazana mjera *Normalized to Mode* (programska mjera za broj stanica (eng. *Counts*)). Svaki signal izotopa metala Gd155 kojim je obilježen Ck14 predstavlja prisutnost proteina Ck14 u pojedinoj stanici. Ck-Citokeratin.

3.9.3. Obilježavanje pojedinačnih uzoraka paladijem (barkodiranje uzoraka)

Masena citometrija je omogućila da se odjednom ispita veći broj uzoraka na puno različitih proteina, odnosno svaki uzorak se može obilježiti određenim „barkodom“ te se sve pomiješa zajedno u jednoj epruveti. U ovom istraživanju korišten je protokol za obilježavanje pojedinačnih uzoraka izotopima paladija (Pd), odnosno za barkodiranje uzoraka (117). Ovaj protokol sadrži šest različitih izotopa paladija (Pd102, 104, 105, 106, 108 i 110) koji su dizajnirani tako da čine 20 različitih „barkodova“. Svaki „barkod“ se sastoji od tri različita izotopa paladija te nema preklapanja među njima (Slika 20). Na primjer, „barkod“ 1 se sastoji od izotopa Pd102, 104 i 105.

Izotopi paladija						
	102	104	105	106	108	110
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						

Slika 20. 20 „barkodova“ obilježenim različitim kombinacijama izotopa paladija. Zelena boja predstavlja izotope paladija koji se nalaze u određenom „barkodu“. Preuzeto i prilagođeno iz Fludigm priručnika Cell-ID 20-Plex Pd Barcoding Kit, 2021 (117).

Postupak protokola za obilježavanje „barkodovima“:

Nakon što su stanice izbrojane (kontrolne ili kliničkog uzorka) i uzet odgovarajući broj stanica u epruvete (broj epruveta i uzoraka ovisi o pokusu), slijedilo je ispiranje LBC medija s 1 ml PBS-a pa sa 1 ml pufera Maxpar Cell Staining Buffer (MP CSB) te centrifugiranje na 800 g 5 min na sobnoj temperaturi. Idući korak je bio barkodiranje uzoraka. Prvo se malo promiješao ostatak taloga na miješalici te dodao 1 ml pufera 1x Fix I buffer i inkubiralo se 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga su se epruvete centrifugirale na 800 g, 5 min na sobnoj temperaturi. Na talog se stavilo 1 ml pufera 1x Barcode perm buffer te centrifugiralo na 800 g, 5 min na sobnoj temperaturi. Na talog stanica se dalje dodalo 800 µl pufera 1 x Barcode perm buffer. Odgovarajući „barkodovi“ (mješavina 3 različita izotopa Pd) su se nalazili u drugim epruветama pohranjenim na -20°C te su sada otopili u 100 µl pufera 1x Barcode perm buffera i dodali u određenu epruветu sa talogom stanica. Dobro se promiješalo tako da se sve barkodira ujednačeno. Odgovarajući „barkod“ i talog stanica su se inkubirali 30 minuta na

sobnoj temperaturi te se na svakih 15 min malo promiješalo. Kada je inkubacija bila gotova, epruvete su se dalje centrifugirale na 800 g 5 min na sobnoj temperaturi. Na talog stanica se dodalo 2 ml pufera MP CSB te centrifugiralo na 800 g, 5 min na sobnoj temperaturi. Dalje se napravio jedan skupni uzorak sa 1 ml MP CSB, odnosno stanice u prvoj epruveti su se promiješale s 1 ml MP CSB -a, aspirirale i premjestile u drugu epruvetu. Takav postupak se ponovio sve do posljednje epruvete. Isti korak ispiranja epruveta se ponovio sa novih 1 ml MPCSB-a. Sve stanice sada su trebale biti u jednoj epruveti koja se dalje centrifugirala na 800 g, 5 minuta na sobnoj temperaturu. Na kraju protokola se dobio talog stanica koji se sastojao od svih uzoraka koji su stavljeni u određeni pokus te su barkodirani s određenom kombinacijom izotopa paladija. Nakon toga slijedilo je ispitivanje ekspresije proteina metodom površinskog i unutarstaničnog obilježavanja na masenom citometru.

3.9.4. Površinsko i unutarstanično obilježavanje proteina te mjerenje na masenom citometru

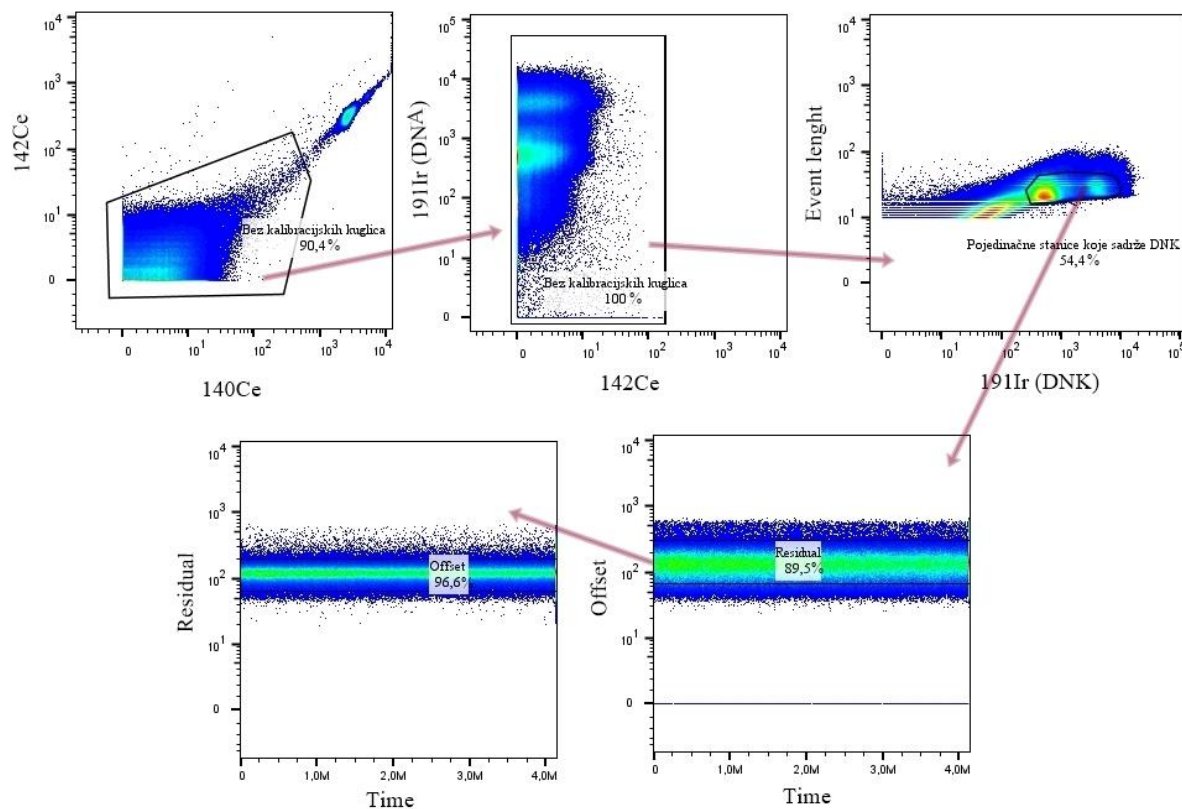
Postupak metode površinskog i unutarstaničnog obilježavanja proteina (Maxpar Nuclear Antigen Staining with Fresh Fix Protocolm, Standard BioTools, SAD):

Odgovarajući talog stanica jednog skupnog uzorka nakon barkodiranja (na primjer: 5 kliničkih uzoraka briseva vrata maternice i kontrole ili određene stanične linije korištene u titracijama) se nalazio u otprilike 100 μ l pufera MP CSB-a u epruveti. Idući korak je bio permeabilizirati i fiksirati stanice. Dodao se 1 ml pufera MaxPar Nuclear Antigen Staining Buffer u talog te se promiješao i ostavio da stoji 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga epruveta s talogom se centrifugirala na 800 g 5 min na sobnoj temperaturi i izlio se supernatant. U epruvetu se dalje dodalo 2 ml pufera Maxpar Nuclear Antigen Staining Perm za ispiranje i centrifugiralo se na 800 g 5 min na sobnoj temperaturi. Ovaj postupak se ponovio te nakon izlivanja supernatanta, ostao je talog stanica u 100 μ l pufera. Nakon toga su se dodala površinska i unutarstanična antitijela za antigene proteina u odgovarajućem volumenu 30 min na sobnoj temperaturi na termomikseru 300 rpm (eng. *revolutions per minute*). Nakon toga antitijela su isprana dva puta s 2 ml pufera MaxPar Cell staining buffer i centrifugirana na 1000 g, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Talog stanica koji je ostao u epruveti se dalje morao fiksirati sa 1 ml 1.6% formaldehida 10 min na sobnoj temperaturi te centrifugirati 1000 g, 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga se pažljivo uklonio supernatant u volumenu 800 μ l kako bi talog stanica ostao u volumenu u 200 μ l i premjestio u krioepruvetu. Krioepreveta se zamrzнула kutijici za postepeno smrzavanje na -80°C . Idući

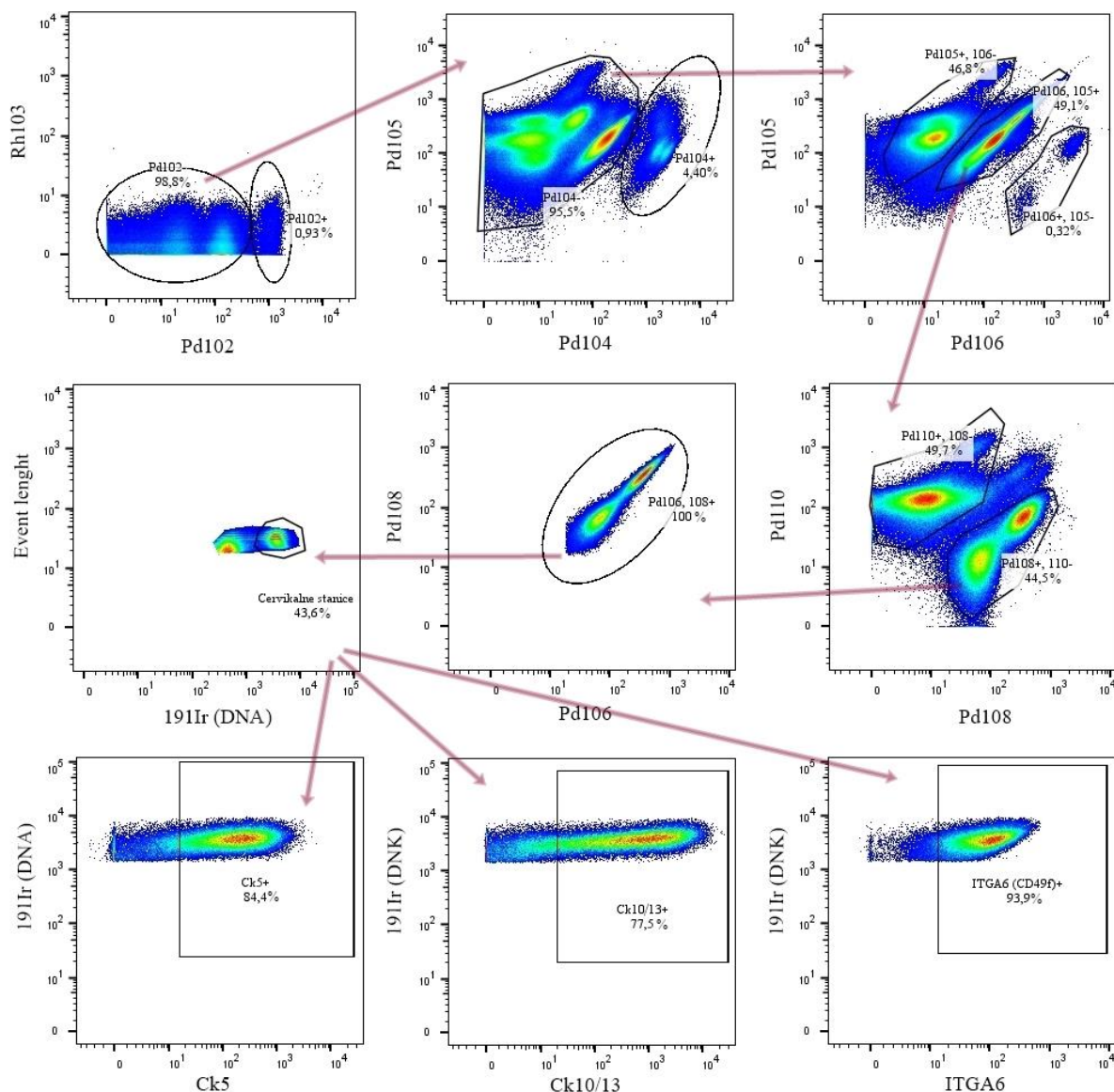
korak bio slanje krioepreveta na suhom ledu u CLIP laboratorijski centar u Pragu (Karlovo sveučilište i Sveučilišna bolnica Motol, Češka Republika) gdje se nalazio maseni citometar. Prije mjerenja, stanice su inkubirane s 1 ml otopine koja je sadržavala interkalirajuću boju za označavanje DNA Cell-ID Intercalator-Ir na sobnoj temperaturi 1 sat, isprane i pohranjene na 4°C dok nisu bile spremne za rad. Nakon toga, stanice su isprane dva puta s MP CSB puferom, jednom u vodi MiliQ H₂O, resuspendirane sa kalibracijskim kuglicama 20% EQ Four Element Calibration Beads u vodi MiliQ H₂O i filtrirane kroz filter od 70 µm. Analiza uzorka dobivena je na HeliosTM, CyTOF sustavu (Standard BioTools) sa svim otvorenim kanalima i podacima prikupljenim kao .fcs datoteke. Svaki signal izotopa metala predstavlja prisutnost određenog proteina ili barkoda u pojedinoj stanici.

3.9.5. Analiza podataka

Podaci dobiveni masenim citometrom su normalizirani u programu koji se nalazi standardno na uređaju CyTOF na temelju kalibracijskih kuglica i kompenzirani prema matrici za prelijevanje signala, odnosno kanala izotopa metala koja se nalazi u priručniku Guidelines for Mass Cytometry Panel Design (Standard biotools, SAD) u programu FlowJoTM. Normalizirane i kompenzirane datoteke.fcs su dalje obrađene pomoću softvera FlowJoTM v10. Stanice su analizirane korištenjem Gaussovih parametara i prisutnosti interkalirajuće boje za označavanje DNA da bi se pronašle pojedinačne stanice s prisutnom DNA u jezgri (Slika 21). Nakon toga najzahtjevniji dio obrade podataka je bio ručno „debarkodirati“ uzorke, odnosno pronaći svaki uzorak na temelju njegovog „barkoda“ (Slika 22). Svaki uzorak se trebao ispitati na svih šest kombinacija izotopa paladija specifičnih za svaki pokus tako da nema preklapanja. Kako bi se odredila populacija stanica od interesa, upotrijebili su se proteini koji su prisutni u cervikalnim stanicama, citokeratin 10/13, citokeratin 5 i integrin alpha 6 (ITGA6, CD49f) (131–133). Intenzitet ekspresije navedenih proteina za određivanje populacije stanica, ali i ostalih proteina se odredio na temelju intenziteta pozitivne, odnosno negativne kontrole. Reprezentativna strategija određivanja populacije od interesa i „debarkodiranja“ uzoraka prikazana je primjeru pokusa sa 5 NORMAL briseva vrata maternice i 2 kontrole (Slike 21 i 22). Nakon toga je učinjena normalizacija serije (eng. *batch*), odnosno normalizacija svih 11 pokusa u programu R s paketom CytoBatchNorm. Uzorak pozitivne kontrole svakog pokusa korišten je za normalizaciju nejednakosti intenziteta ekspresije proteina unutar pokusa. Ukupan broj dobivenih stanica u brisevima vrata maternice nakon obrade podataka kretao se od 57 do 64 026.



Slika 21. Reprezentativna strategija određivanja populacije stanica brisa vrata maternice. Nakon mjerenja na masenom citometru, dobiveni podaci su se analizirali u programu FlowJo. Prvi korak je bio isključiti prisutne kalibracijske kuglice koje su obilježene s izotopima ^{140}Ce i ^{142}Ce . Nakon toga su se usporedile mjere *Event length* (duljina putovanja mjenog događaja) i ^{191}Ir (interkalirajuća boja za DNA vezana za izotop metala ^{191}Ir) kako bi se odredile pojedinačne stanice koje sadrže DNA. Za još detaljnije određivanje pojedinačnih stanica su se usporedile mjere Gaussovih parametara *Residual* i *Offset* sa mjerom *Time* (vremenska točka događaja). DNA-deoksiribonukleinska kiselina.



Slika 22. Reprezentativna strategija „debarkodiranja“ uzoraka.

Nakon što su određene pojedinačne stanice koje sadrže DNA, idući korak je bio pronaći odgovarajući „barkod“, odnosno uzorak (bris vrata maternice ili kontrolu). U ovom primjeru „debarkodiranja“ prikazan je bris vrata maternice citološke kategorije NORMAL koji je obilježen „barkodom“ 17 (Pd105, 106 i 108). U zadnjem koraku se uzorak opet odredio usporedbom mjera *Event length* i 191Ir (interkalirajuća boja za DNA vezana za izotop metala 191Ir) te se odabrana populacija ispitala na proteine koji su se upotrijebili za određivanje stanica od interesa. Cervikalne stanice su pokazale visoku ekspresiju proteina Ck5, 10/13 i ITGA6 te su stoga ti proteini korišteni za potvrdu. DNA-deoksiribonukleinska kiselina, Ck-Citokeratin, CD49f (ITGA6)-integrin $\alpha 6$.

Svi dobiveni uzorci spojili su se za svaku citološku kategoriju (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL i HSIL) u programu FlowJo™. Rezultirajuće spojene datoteke .fcs korištene su za visokodimenzionalnu analizu podataka (eng. *High dimensional data analysis*) u programu Cytobank što je omogućilo identifikaciju fenotipski različitih populacija u obliku klastera i smanjenje dimenzionalnosti (eng. *Dimensionality reduction*). Za smanjenje dimenzionalnosti se koristi mapa tSNE (eng. *t-distributed stochastic neighbor embedding*) koja omogućuje prikaz složenih odnosa visokodimenzionalnih podataka u podatke s mnogo varijabli u dvodimenzionalnom ili trodimenzionalnom prostoru (152). To se postiže mjerenjem sličnosti između podatkovnih točaka u visokodimenzionalnom prostoru i predstavljanjem te sličnosti kao vjerojatnosti, odnosno omogućuje vizualno prepoznavanje grupa ili klastera koje imaju slične podatke (152).

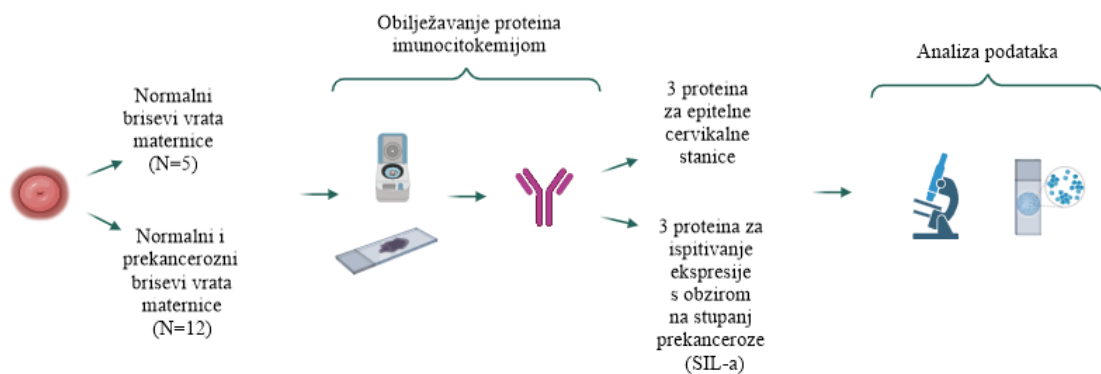
Smanjenje dimenzionalnosti, odnosno kreiranje mapa tSNE napravljeno je na temelju ekspresije 6 proteina: citokeratina 5, 7, 10/13, 14, 17 i CD49f. Korišteni su sljedeći parametri u programu: iteracija (eng. *Iteration*)=750, *perplexity*=30, *learning rate*=21978 i *early aggregation*=12 s normalnim skaliranjem podataka. Nakon toga, rezultirajuće .fcs datoteke su ekstrahirane i u programu FlowJo™ su napravljene dijagrami koji određuju gustoću stanica (eng. *tSNE density map*). Koristeći program R s paketom CYTUTILS uspoređene su razlike u gustoći stanica s obzirom na citološku kategoriju u svakom kliničkom uzorku sa statističkom metodom Jensen-Shannon divergencija koja procjenjuje sličnost u raspodjeli distribucija. Dobivene divergencije mogu biti između 0 i 1 u kojoj vrijednost bliže nuli označavaju da su dvije distribucije sličnije, a vrijednosti bliže jedinici označavaju da su dvije distribucije više različite.

Broj klastera izračunat je na temelju mape tSNE korištenjem dodatka za klasteriranje koji se naziva FlowSOM u Cytobanku sa sljedećim parametrima u programu: 5 proteina = citokeratini 7, 10/13, 14, 17 i CD49f, metoda klasteriranja=hijerarhijski konsenzus, iteracija=10, *seed*=automatski s normalnim skaliranjem podataka. Optimalan broj klastera je određen pomoću metode *Elbow* ispitivanjem stabilnosti klastera iz dijagrama delta područja izračunatih s paketom CATALYST u programu R. Prema *Elbow* metodi, optimalan broj klastera je do onog trenutka kada se krivulja počne ravnati, odnosno nakon te točke više nije značajno dodavati veći broj klastera. U ovom istraživanju, dobiveni optimalan broj klastera bio je između četiri i devet. Prvobitno stvorenih 9 klastera automatski su spojeni u pet metaklastera zbog sličnosti u ekspresiji proteina. Fenotip metaklastera, odnosno ekspresija proteina u svakom metaklasteru je određena pomoću postotka pozitivnih stanica na određeni

protein s obzirom na svaki metaklaster u obliku toplinske mape (eng. *heat map*) i pomaka u intenzitetu ekspresije pomoću grafa funkcije gustoće uzorka (eng. *density plot*). Postotak pozitivnih stanica je određen s obzirom na signal pozitivnosti citoloških uzoraka kategorije NORMAL. Promjene u proporciji metaklastera u svakom kliničkom uzorku s obzirom na citološku kategoriju statistički su procijenjene korištenjem Spearman-ovog koeficijenta korelacije u MedCalc v20.11. P vrijednosti $<0,05$ smatrane su značajnim.

3.10. Ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice imunocitokemijskom metodom

Idući korak nakon ispitivanja ekspresije proteina na brisevima vrata maternice masenom citometrijom i analiziranja dobivenih podataka, odabrani proteini su se ispitali i imunocitokemijskom metodom (Slika 23). Nakon ispitivanja briseva vrata maternice masenom citometrijom, celularnost određenih uzoraka je bila jako niska, a određeni uzorci su potrošeni tijekom analize masenom citometrijom koja zahtijeva veliki broj stanica po pokusu. Ukupan broj briseva vrata maternice koji se koristio za analizu imunocitokemijom iznosi 17.



Slika 23. Sažeti prikaz protokola ispitivanja ekspresije proteina na brisevima vrata maternice imunocitokemijskom metodom.

3.10.1. Obilježavanje proteina

U ovom istraživanju je za ispitivanje ekspresije proteina na brisevima vrata maternice imunocitokemijskom metodom korišten protokol EnVision FLEX Mini Kit, High pH (K8023) (Agilent DAKO, SAD).

Postupak:

Prvi dio pripreme stanica brisa vrata maternice na mikroskopsko stakalce i bojanje po Papanicolaou je odrađeno u citološkom laboratoriju Klinike za ženske bolesti i porode Zagreb. Stanice su bile pohranjene u LBC-u te je on uklonjen centrifugiranjem 10 minuta na 1500 rpm na centrifugi u Medifuge™ Small Benchtop Centrifuge. Nakon toga je odbačen supernatant ovisno o količini taloga stanica te je nekoliko kapi suspenzije brisa vrata maternice stavljeno u komoricu za citocentrifugu. Komorice su centrifugirane 3 minute na 2500 rpm u citocentrifugi. Od svakog brisa vrata maternice za obilježavanje s obzirom na stupanj SIL-a pripremljeno je šest mikroskopskih stakalaca. Jedno mikroskopsko stakalce je bojano po Papanicolaou te mu je citolog odredio dijagnozu. Drugo mikroskopsko stakalce je predstavljalo negativnu kontrolu (bez dodanog primarnog protutijela), a ostala tri su korištena za obilježivanje proteina (E-kadherin, MMP7, Ck18). Za obilježavanje proteina Ck5, 10/13 i ITGA6 su napravljena četiri mikroskopska stakalca brisa vrata maternice koja su predstavljala negativnu kontrolu (bez dodanog primarnog protutijela) i dodatak proteina Ck5, 10/13 i ITGA6. Stakalca sa stanicama su fiksirana otopinom apsolutnog etanola 10 minuta. Nakon toga su isprana s puferom EnVision FLEX Wash buffer 5 minuta. Endogena peroksidaza je blokirana reagensom EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent 10 minuta. Nakon ispiranja, dodalo se primarno antitijelo na 15 minuta ovisno o proteinu koji se detektira. Nakon ispiranja dodano je sekundarno antitijelo na mišje i zečje imunoglobuline EnVision FLEX/HRP 15 minuta te ispralo puferom. Idući korak je bio dodati otopinu EnVision FLEX Substrate Working solution 2-3 minute te isprati deioniziranom vodom 10 minuta. EnVision FLEX Substrate Working solution se pripremala u omjeru 1 ml EnVision FLEX Substrate Buffer i jedne kapi EnVision FLEX DAP+ Chromogen otopine. Za bojenje jezgri se dodao hematoksilin na jednu minutu, ispirao se 5 minuta destiliranom vodom pa 5 minuta deioniziranom vodom. Uzorci su uklopljeni u medij za uklapanje i pokriveni pokrovnicom. Vizualizirana su mikroskopom (Olympus BX51, Japan) i licenciranim softverom OLYMPUS stream Essentials 2.4. Negativna kontrola je predstavljala bris vrata maternice bez dodanog primarnog antitijela.

Kao primarna antitijela korištena su antitijela za proteine iz Tablice 4. Pripadajući volumeni antitijela za proteine Ck5, 10/13 i ITGA6 u Tablici 5 su korišteni i za imunocitokemiju bez obzira što imaju konjugirani izotop metala. Antitijela za proteine MMP7, E-kadherin i Citokeratin 18 nisu bila konjugirana s izotopom metala te je za njih korištena preporučena količina za imunocitokemiju. Antitijelo za Ck10/13 se razrijedio u omjeru 1 μ l na 100 μ l

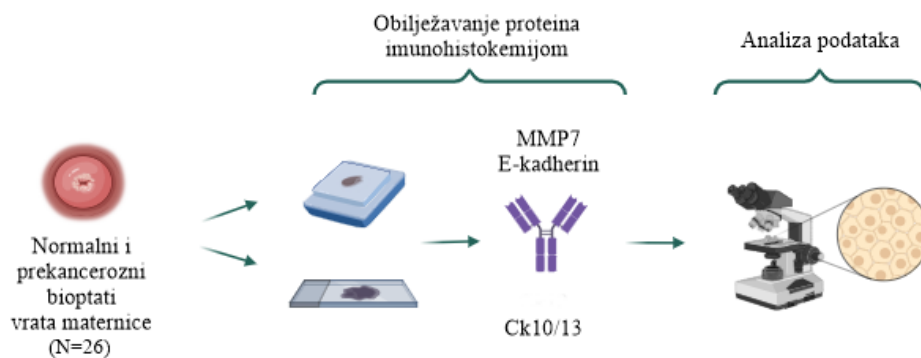
PBS-a, antitijelo za MMP7 u omjeru 1 μ l na 100 μ l PBS-a, antitijelo za E-kadherin u omjeru 1 μ l na 100 μ l PBS-a, a antitijelo za Citokeratin 18 1 μ l na 250 μ l PBS-a.

3.10.2. Analiza podataka

U ovom istraživanju, imunocitokemija je korištena kao validacijska metoda za određene za proteine ispitane masenom citometrijom na brisu vrata maternice. Negativna kontrolna je predstavljala odsutnost smeđeg obojenja na stanicama. Ekspresija proteina Ck5, 10/13 i ITGA6 je označena kao nema (-), nisko (+) i visoko (++) smeđe obojenje na temelju intenziteta u citoplazmi te se tu obratila pozornost da je većina stanica epitela pozitivna bez obzira iz kojeg sloja cervikalnog epitela dolaze. Za proteine MMP7, E-kadherin i citokeratin 18 se ekspresija označavala kao nema (-) i ima (+) smeđeg obojenja u citoplazmi diskariotičnih stanica, odnosno protein se ekspresira u diskariotičnim stanicama. Da bi se protein MMP7 smatrao pozitivnim, njegova ekspresija je morala biti prisutna samo u citoplazmi diskariotičnih stanica, a odsutna u ostalim epitelnim stanicama brisa vrata maternice. Za citokeratin 18 se ekspresija u citoplazmi diskariotičnih stanica smatrala pozitivnim, a negativnim ako je pronađen samo u bazalnim i cilindričnim stanicama. Za E-kadherin se ekspresija u citoplazmi diskariotičnih stanica smatrala pozitivnim, a negativnim ako je pronađen samo u membrani ostalih epitelnih stanica i citoplazmi bazalnih i cilindričnih stanica. Citolog je pregledao sve briseve vrata maternice i odredio ekspresiju proteina na normalnim (NORMAL) i prekanceroznom promijenim brisevima vrata maternice (LSIL, HSIL). Zbog malog broja analiziranih citoloških uzoraka imunocitokemijom, nije korištena statistička analiza podataka.

3.11. Ispitivanja ekspresije proteina na biopatima vrata maternice imunohistokemijskom metodom

Idući korak nakon imunocitokemije i analiziranja dobivenih podataka, određeni proteini su se ispitali i imunohistokemijskom metodom (Slika 24). Konačno odabrani bioptati vrata maternice uključivali su normalan vrat maternice (NORMAL, N=7) te prekancerozne cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN, N= 19) koji su se obilježili antitijelima na proteine Citokeratin 10/13, MMP7 i E-kadherin.



Slika 24. Sažeti prikaz protokola ispitivanja ekspresije proteina na biopstatima vrata maternice imunohistokemijskom metodom. Ck-Citokeratin. MMP7-matriks metaloproteinaza 7.

3.11.1. Obilježavanje proteina

U ovom istraživanju je za ispitivanje ekspresije proteina na biopstatima vrata maternice imunohistokemijskom metodom korišten protokol EnVision FLEX Mini Kit, High pH (K8023) (Agilent DAKO, SAD) koji se koristio i za imunocitokemijsku metodu uz dodatne početne korake deparafinizacije i čišćenja tkiva te rehidracije preparata. Zbog utjecaja formalina na proteine, uveden je i dodatan korak povrata epitopa proteina.

Postupak:

Priprema kliničkih uzoraka i bojanje po hematoksilin eozin metodi biopstata vrata maternice za patohistološku analizu u sklopu bolničke obrade je odrađen u patološkom laboratoriju Opće bolnice Zabok. Tkivo fiksirano u parafinskim kockama narezano je na debljinu od 5 μm mikrotomom. Po jedan rez fiksiranog tkiva u formalinu i uklopljenog u parafin za svaki ciljni protein (Citokeratin 10/13, MMP7, E-kadherin) ili negativnu kontrolu (bez dodanog protutijela) je stavljen na mikroskopsko stakalce. Provela se deparafinizacija i čišćenje tkiva u pećnici 60 minuta na 60°C i ispiranjem u ksilenu dva puta po 5 minuta. Nakon toga, provedena je rehidracija preparata u 100%, 95% i 70% otopini etanola dva puta po 5 minuta. Stakalca s preparatima stavila su se u 200 ml otopine citratnog pufera u plastičnoj posudici koja se zagrijala do vrenja u mikrovalnoj pećnici na 800 W, a nakon toga 10 minuta na 0 W. Preparati su se ohladili na sobnoj temperaturi oko 20 minuta te isprali puferom EnVision FLEX Wash buffer dva do tri puta po 5 minuta. Idući korak je bio blokirati endogenu peroksidazu s reagensom EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent 10 minuta te

ponovno isprati stakalca puferom. Nakon blokiranja, dodalo se primarno antitijelo na 10 minuta ovisno o proteinu koji se detektira te su stakalca isprana puferom. Dodalo se sekundarno antitijelo na mišje i zečje imunoglobuline EnVision FLEX/HRP 10 minuta te ispralo puferom. Idući korak je bio dodati kromogensku otopinu EnVision FLEX Substrate Working solution 2-3 minute te isprati deioniziranom vodom 10 minuta. Za bojenje jezgri se dodao hematoksilin na jednu minutu, ispirao se 5 minuta destiliranom vodom pa 5 minuta deioniziranom vodom. Stakalca su dalje uklopljena s medijem za uklapanje i pokrovnicom. Vizualizirana su mikroskopom (Olympus BX51, Japan) i licenciranim softverom OLYMPUS stream Essentials 2.4.

Kao primarna antitijela korištena su antitijela za proteine iz Tablice 4. Pripadajući volumen za antitijelo za protein Ck 10/13 u Tablici 5 korišten je i za imunohistokemiju bez obzira što ima konjugirani izotop metala. Antitijela za proteine MMP7 i E-kadherin nisu bila konjugirana na izotop metala te je za njih korištena preporučena količina za imunohistokemiju. Antitijelo za MMP7 se razrijedilo u omjeru 1 μ l na 100 μ l PBS-a, a za E-kadherin u omjeru 1 μ l na 100 μ l PBS-a.

3.11.2. Analiza podataka

U ovoj istraživanju, imunohistokemijska metoda je korištena kao validacijska metoda za određene proteine ispitane masenom citometrijom i imunocitokemijom. Negativna kontrola je predstavljala odsutnost smeđeg obojenja na bioptatu vrata maternice, a pozitivna kontrola Ck10/13 je predstavljanja smeđe obojenje jačeg intenziteta kroz cijeli epitel vrata maternice (superficialne, intermedijarne i parabazalne stanice) sa ili bez manjeg intenziteta u bazalnim stanicama vezanih na bazalnu membranu neovisno o težini CIN-a, odnosno patohistološkoj dijagnozi. Za proteine MMP7 i E-kadherin se ekspresija označavala kao nema (-), ima (+) i djelomično ima (+/-) smeđeg obojenja u citoplazmi stanica koje se nalaze u promijenjenom dijelu epitela označenom kao CIN. Odnosno, + označava prisutnost ekspresije proteina kroz cijelu neoplaziju, - označava odsutnost ekspresije kroz cijelu neoplaziju, a +/- označava da dio neoplazije nije imao ekspresiju ili je imao slabiju ekspresiju, a dio jaču ekspresiju. Da bi se protein MMP7 smatrao pozitivnim, njegova ekspresija je morala biti prisutna u CIN dijelu, a odsutna u normalnim epitelnim stanicama. Za E-kadherin se ekspresija u citoplazmi CIN dijela smatrala pozitivnim, a negativnim ako je pronađen samo u membrani normalnih epitelnih stanica ili citoplazmi u bazalnom dijelu epitela. Patolog je pregledao sve bioptate vrata maternice i odredio ekspresiju proteina na normalnim (NORMAL) i prekancerozno promijenjenim bioptatima vrata maternice (CIN). Hi kvadrat test je korišten da bi se utvrdila

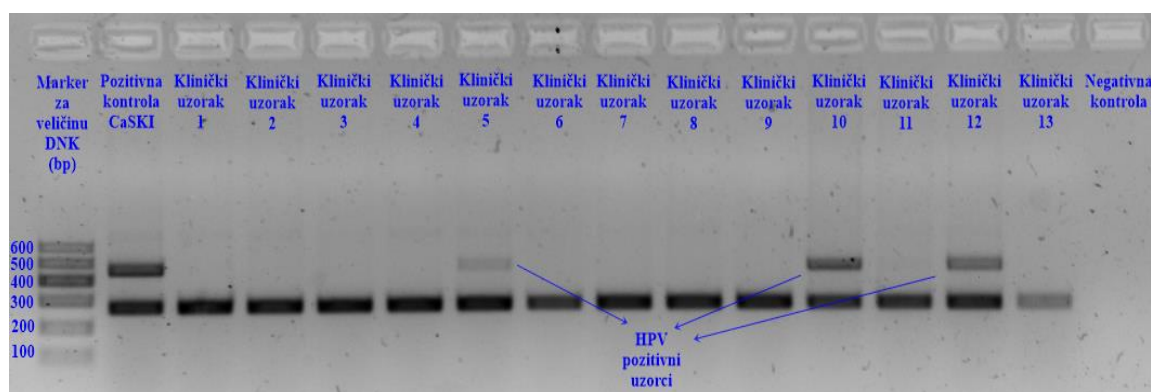
povezanost između kategoričkih varijabla (+, -, +/-) s obzirom na NORMAL, CIN1, CIN2 i CIN3 u MedCalc v20.11. P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. Korištenjem Spearman-ovog koeficijenta korelacije u MedCalc v20.11 procijenila se korelacija između ekspresije E-kadherina i MMP7 kroz bioptate, odnosno međusobna povezanost ekspresije ovih proteina u istom uzorku. P vrijednosti $<0,05$ smatrane su značajnim.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju prikupljen je ukupno 321 bris vrata maternice te 26 bioptata vrata maternice pacijentica koje su dolazile na ginekološke preglede u Specijalnu bolnicu Sveta Katarina i Opću bolnicu Zabok. Najveći udio pacijentica bio je prosječne dobi od 31 do 45 godina (50,2%), a u rasponu od 18 do 70 godina. Citološka kategorija NORMAL (63,2%) je imala najveći udio pacijentica, dok su ASC, LSIL i HSIL bili zastupljeni u manjem udjelu, 10,3%, 15% te 11,5%, slijedom. Klinička i demografska obilježja cijele populacije te status HPV-a svih pacijentica su opisani detaljnije u znanstvenom radu Pešut i suradnika (94). Prisutnost HPV-a je utvrđena na svim brisevima vrata maternice (N=321). Ispitivanje ekspresije proteina masenom citometrijom provelo se na odabranim brisevima vrata maternice koji su imali dostatan ukupni broj stanica (više od milijun) (N=53), dok je analiza proteina imunocitokemijskom metodom napravljena na brisevima vrata maternice koji su imali dovoljno stanica preostalih nakon masene citometrije, posebno onih diskariotičnih stanica (N=17). Ispitivanje ekspresije proteina imunohistokemijskom metodom je provedeno na svim dobivenim bioptatima vrata maternice (N=26).

4.1. Prisutnost HPV-a

Prije analize masenom citometrijom i imunocitokemijom, brisevi vrata maternice pacijentica su bili podvrgnuti genotipizaciji HPV-a. Genotipizacija s tri seta konsenzusnih početnica: PGMY, LC i GP5+/GP6+ je omogućila detekciju širokog spektra genotipova HPV-a, a tip specifične početnice su odredile prisutnoost devet tipova HPV-a: HPV16, HPV18, HPV33, HPV6/11, HPV31, HPV45, HPV52 i HPV58. Primjer umnoženih PGMY PCR produkata nakon elektroforeze na agaroznom gelu je prikazan na Slici 25. Detaljna prevalencija HPV-a cijele populacije pacijentica (N=321) je objavljena u znanstvenom radu Pešut i sur. te za potrebe ovog doktorskog rada su izdvojeni rezultati briseva vrata maternice koji su korišteni i analizirani masenom citometrijom i imunocitokemijom (94). Rezultati HPV detekcije i genotipizacije sumarno su prikazani tablično (Tablice 6, 7 i 8). Tablice 6 i 7 prikazuju status HPV-a citoloških uzoraka briseva vrata maternice koju su korišteni u ispitivanju ekspresije proteina masenom citometrijom i imunocitokemijskom metodom te njihov broj prema HPV tipu i ukupan broj ovisno o citološkoj kategoriji. Tablica 8 prikazuje status HPV-a pacijentica čiji su bioptati vrata maternice korišteni u istraživanju prema patohistološkoj dijagnozi, broj bioptata prema HPV tipu te ukupan broj prema patohistološkoj dijagnozi.



Slika 25. Primjer umnoženih produkata PCR-a s konsenzusnim početnim skupom PGMY nakon elektroforeze na agaroznom gelu.

Tablica 6. Status HPV-a, broj briseva vrata maternice prema HPV tipu i ukupan broj uzoraka ovisno o citološkoj kategoriji koji su korišteni u masenoj citometriji.

CITOLOŠKA KATEGORIJA	HPV status (negativan ili tip)*	Broj briseva vrata maternice prema HPV tipu	Ukupan broj uzoraka prema citološkoj kategoriji
NORMAL	HPV-	10	10
	HPV52	2	
HPV+	HPVX	8	10
	HPV-	1	
LSIL	HPV16	1	10
	HPV16/45	1	
	HPV45	1	
	HPV52	1	
	HPV6/11	1	
	HPVX	4	
	HPV-	1	
HSIL	HPV16	2	13
	HPV16/31	2	
	HPV6/11	1	
	HPV18/52	1	
	HPVX	6	
ASC	HPV-	8	10
	HPVX	2	
Ukupno:			53

*negativan (-), tip (6/11, 16, 18, 31, 45, 52) ili X (nepoznat), NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja, HPV-ljudski papiloma virus.

Tablica 7. Status HPV-a, broj briseva vrata maternice prema HPV tipu i ukupan broj uzoraka ovisno o citološkoj kategoriji koji su korišteni u imunocitokemijskoj metodi.

CITOLOŠKA KATEGORIJA	HPV status (negativan ili tip)*	Broj briseva vrata maternice prema HPV tipu	Ukupan broj uzoraka prema kategoriji
NORMAL (neovisno o HPV statusu)	HPV-	8	9
	HPVX	1	
LSIL	HPV-	1	4
	HPV52	1	
	HPV16/31	1	
	HPV6/11	1	
HSIL	HPV16/31	1	4
	HPV16	2	
	HPV33	1	
Ukupno:			17

*negativan (-), tip (6/11, 16, 18, 31, 45, 52 ili X (nepoznat), NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja, HPV-ljudski papiloma virus.

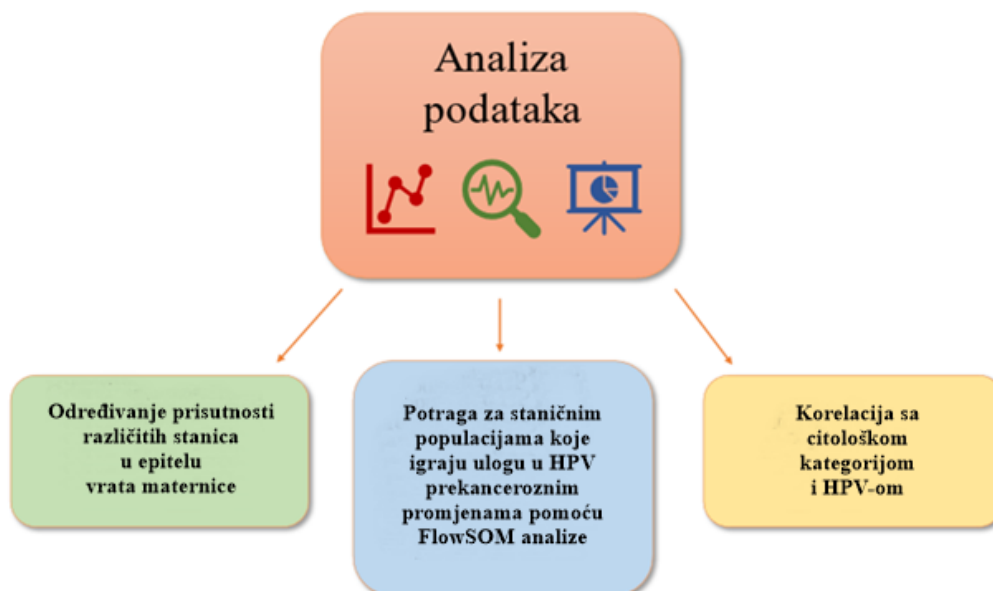
Tablica 8. Status HPV-a pacijentica čiji su biopsati vrata maternice korišteni prema patohistološkoj dijagnozi, broj biopsata prema HPV tipu te ukupan broj uzoraka.

PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOZA	HPV status (negativan ili tip)*	Broj CIN-a prema HPV tipu	Ukupan broj uzoraka prema patohistološkoj dijagnozi
NORMAL (neovisno o HPV statusu)	HPV16	2	7
	HPV18	1	
	HPV16/45	1	
	HPV-	1	
	HPVX	2	
CIN1	HPV16	1	5
	HPV18/52	1	
	HPVX	2	
CIN2	HPV-	1	7
	HPV16	4	
	HPV16/52	1	
	HPV16/45	1	
CIN3	HPV16	4	7
	HPV33	1	
	HPV16/45	1	
	HPV-	1	
Ukupno:			26

*negativan (-), tip (6/11, 16, 18, 31, 45, 52 ili X (nepoznat), NORMAL-normalan epitel, CIN-cervikalna intraepitelna neoplazija, HPV-ljudski papiloma virus.

4.2. Proteinski profil na brisevima vrata maternice masenom citometrijom

Kako bi se analizirao proteinski profil i ispitala primjenjivost masene citometrije na prekanceroznim lezijama vrata maternice, dizajniran je panel od 29 antitijela i primijenjen na 53 klinička uzorka briseva vrata maternice. Od 53 brisa vrata maternice koji su ispitani masenom citometrijom je ispitano: 10 uzoraka bez citoloških abnormalnosti i HPV-a (NORMAL), 10 uzoraka bez citoloških abnormalnosti, ali imaju prisutan HPV (NORMAL HPV+), 10 uzoraka atipičnih skvamoznih stanica (ASC), 10 uzoraka sa prekanceroznom lezijom niskog stupnja (LSIL) te 13 uzoraka s prekanceroznom lezijom visokog stupnja (HSIL). Analiza podataka dobivenih masenom citometrijom (Slika 26) omogućila je da se utvrdi prisutnost različitih stanica u cervikalnom epitelu te pronade korelacija citološke kategorije, HPV statusa i proteina prilikom potrage za staničnim populacijama koje igraju ulogu u HPV prekanceroznim promjenama pomoću analize FlowSOM. Razlika u ispoljenim proteinima među ispitnim grupama prekanceroznih lezija i s obzirom na HPV status se utvrdila pomoću pet izabranih citoloških kategorija (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL) jer su upravo one predstavljale grupe u kojima se može pratiti utjecaj HPV-a i prekanceroze.

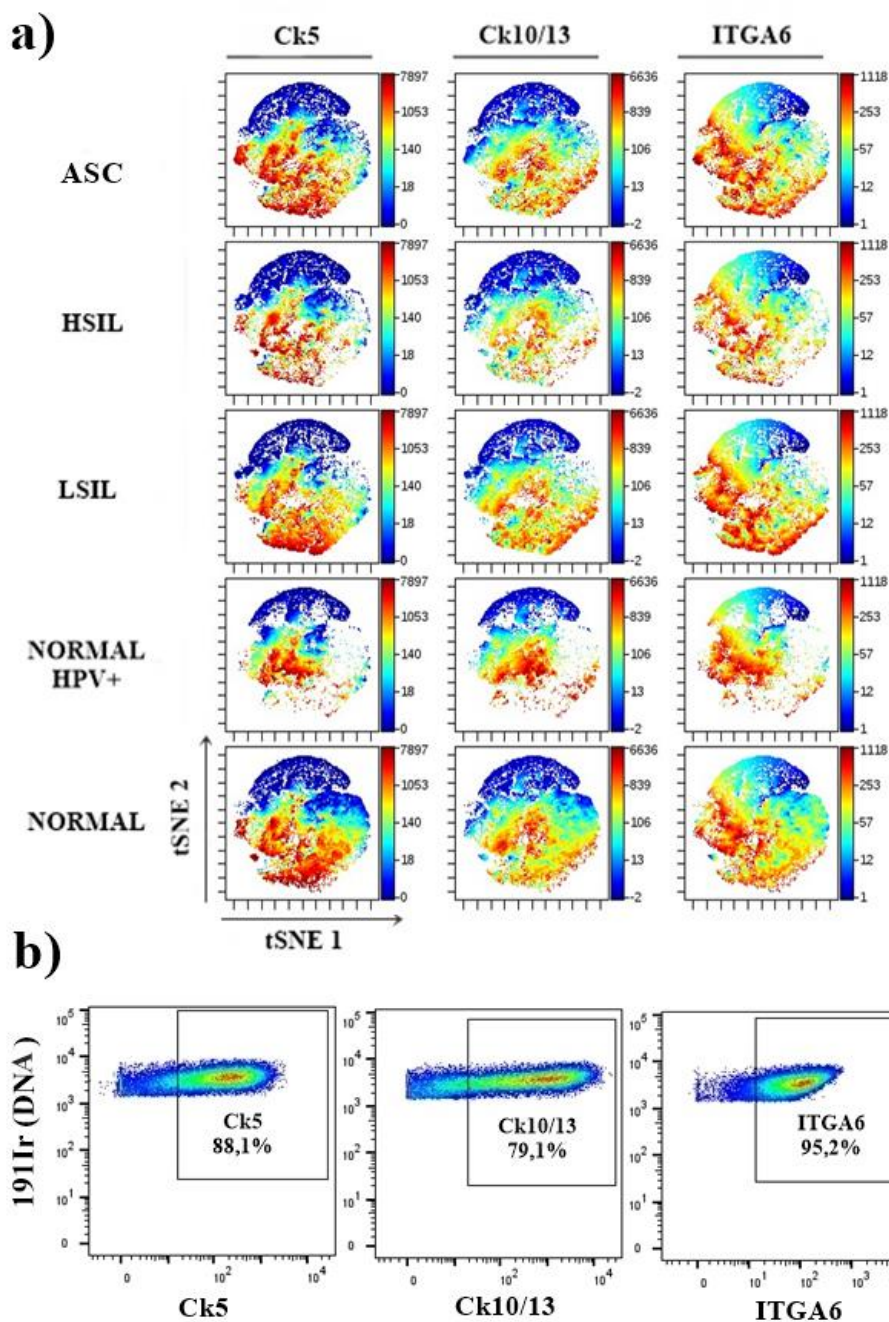


Slika 26. Podjela analize podataka dobivenih masenom citometrijom.

4.2.1. Određivanje prisutnosti različitih stanica u cervikalnom epitelu

S obzirom na veliku heterogenost različitih citoloških kategorija briseva vrata maternice kao i biološke razlike između pacijenata i stadija bolesti, pronađeni su proteini koji najbolje karakteriziraju različite stanice u cervikalnom epitelu.

Proteini korišteni za određivanje populacije od interesa bili su Ck10/13, Ck5 i ITGA6. Koristeći dvodimenzionalnu tSNE vizualizaciju, ti su proteini pokazali isti obrazac ekspresije na gotovo svim cervikalnim stanicama u različitim citološkim kategorijama (Slika 27A). Postotak pozitivnih stanica na markere Ck10/13, Ck5 i ITGA6 prikazan je na reprezentativnom uzorku kategorije NORMAL (Slika 27B). Srednja vrijednost pozitivnih stanica (%) i 95% interval pouzdanosti (CI, eng. *Confidence interval*) za proteine Ck10/13, Ck5 i ITGA6 na ukupnom broju uzoraka, neovisno o citološkoj kategoriji, prikazana je u Tablici 9. S obzirom na citološku kategoriju, Ck10/13 je bio prisutan u rasponu 12,7-85,7% u kategoriji NORMAL, 26,4-89,9% u NORMAL HPV+, 54,6-99,6% u ASC, 27,6-96,8% u LSIL i 36,0-75,8% u HSIL. Ck5 je bio prisutan u rasponu 20,1-88,3% u NORMAL kategoriji, 45,0-94,5% u NORMAL HPV+, 40,9-96,1% u ASC, 38,2-99,5% u LSIL i 19,4-80,2% u HSIL. ITGA6 je bio prisutan u rasponu 73,8-97,4% u NORMAL kategoriji, 83,4-99,0% u NORMAL HPV+, 77,6-98,3% u ASC, 73,6-99,2% u LSIL i 74,6-95,7% u HSIL.



Slika 27. Ekspresija Ck10/13, 5 i ITGA6 na cervikalnim stanicama. a) Dvodimenzionalna tSNE vizualizacija ekspresije Ck10/13, Ck5 i ITGA6 u kategorijama uzoraka (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL). Skala boja predstavlja intenzitet ekspresije svakog proteina: plava - nema ekspresije, crvena - visoka ekspresija. Na x osi je prikazana dimenzija tSNE 1, a na y osi druga dimenzija tSNE 2. b) Postotak pozitivnih stanica na proteine Ck10/13, Ck5 i ITGA6 prikazan je na reprezentivnom uzorku kategorije NORMAL.

Slika 27. -nastavak.

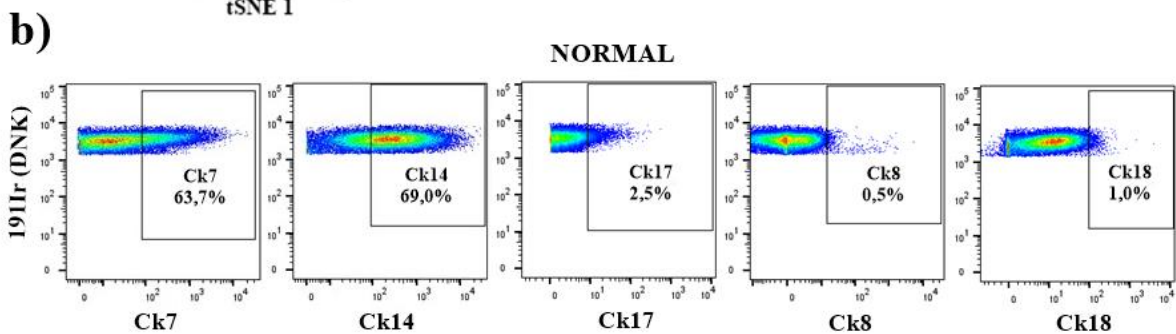
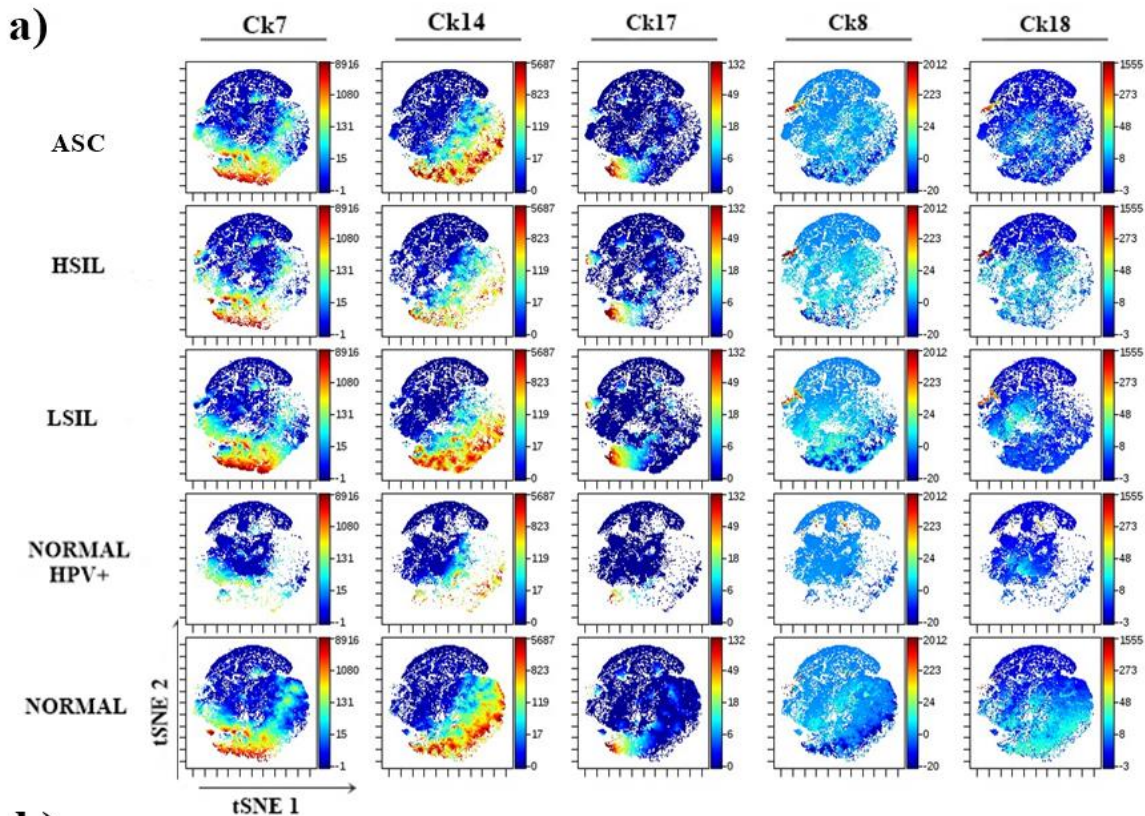
Na x osi su prikazane ekspresije proteina, a na y osi prisutnost DNA obilježene 191Ir. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja. Ck-Citokeratin, ITGA6 (CD49f)-integrin $\alpha 6$, DNA-Deoksiribonukleinska kiselina.

Tablica 9. Srednja vrijednost broja pozitivnih stanica (%) i 95% CI za proteine Ck10/13, Ck5 i ITGA6 neovisno o citološkoj kategoriji.

Protein	Srednja vrijednost broja pozitivnih stanica, %	95% CI
Ck10/13	65,7	57,8 – 73,6
Ck5	71,0	63,7 – 78,4
ITGA6	89,0	85,5 – 92,5

*95% CI-95% interval pouzdanosti, Ck-Citokeratin, ITGA6 (CD49f)-integrin $\alpha 6$.

Citokeratini 7, 14, 17, 8 i 18 su bili prisutni na dijelu stanične populacije ovisno o citološkoj kategoriji s različitim razinama intenziteta (Slika 28A). Postotak pozitivnih stanica na proteine Ck 7, 14, 17, 8 i 18 prikazan je na reprezentativnom uzorku kategorije NORMAL (Slika 28B). Prosječna vrijednost pozitivnih stanica (%) i 95% CI za proteine Ck 7, 14, 17, 8 i 18 na ukupnom broju uzoraka, bez obzira na citološku kategoriju, prikazana je u Tablici 10. S obzirom na citološku kategoriju, Ck7 je bio prisutan u rasponu 5,6-67,3% u NORMAL kategoriji, 1,7-49,5% u NORMAL HPV+, 4,4-77,9% u ASC, 10,9-97,4% u LSIL i 7,6-55,3% u HSIL. Ck14 je bio prisutan u rasponu 0,8-69,0% u NORMAL kategoriji, 1-19,6% u NORMAL HPV+, 1,9-42,6% u ASC, 0,3-94,1% u LSIL i 0,4-15,1% u HSIL. Ck17 je bio prisutan u rasponu 0,1-4,1% u NORMAL kategoriji, 0-4,8% u NORMAL HPV+, 0,03-11,5% u ASC, 0,02-26,1% u LSIL i 0,4-15,9% u HSIL. Ck8 je bio prisutan u rasponu 0,5-4,3% u NORMAL kategoriji, 0,2-3,1% u NORMAL HPV+, 0,1-8,7% u ASC, 0,9-8,4% u LSIL i 0,5-23,6% u HSIL. Ck18 je prisutan u rasponu 0,3-8,1% u NORMAL kategoriji, 0,1-1,5% u NORMAL HPV+, 0,1-5,9% u ASC, 0,02-3,7% u LSIL i 0,2-19,1% u HSIL.



Slika 28. Ekspresija Citokeratina 7, 14, 17, 8 i 18 na cervikalnim stanicama.

a) Dvodimenzionalna tSNE vizualizacija ekspresije Ck7, 14, 17, 8 i 18 u kategorijama uzoraka (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL). Skala boja predstavlja intenzitet ekspresije svakog proteina: plava - nema ekspresije, crvena - visoka ekspresija. Na x osi je prikazana dimenzija tSNE 1, a na y osi druga dimenzija tSNE 2.

b) Postotak pozitivnih stanica na proteinima Ck 7, 14, 17, 8 i 18 prikazan je na reprezentativnom uzorku kategorije NORMAL. Na x osi su prikazane ekspresije proteina, a na y osi prisutnost DNA obilježene 191Ir. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja. Ck-Citokeratin, DNA-Deoksiribonukleinska kiselina.

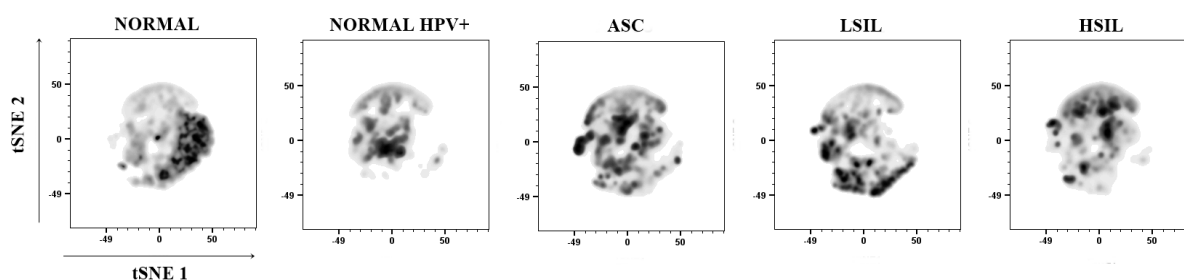
Tablica 10. Srednja vrijednost broja pozitivnih stanica (%) i 95% CI za proteine Ck 7, 17, 14, 8 i 18 neovisno o citološkoj kategoriji.

Protein	Srednja vrijednost broja pozitivnih stanica (%)	95% CI
Ck7	38,0	29,3-46,8
Ck17	4,0	1,8-6,3
Ck14	14,5	7,0-22,1
Ck8	3,9	1,9-5,9
Ck18	1,9	0,7-3,0

*95% CI-95% interval pouzdanosti, Ck-Citokeratin

4.2.2. Korelacija citoloških kategorija, HPV-a i proteina prilikom potrage za staničnim populacijama koje igraju ulogu u HPV prekanceroznim promjenama pomoću analize FlowSOM

Osim ispitivanja uspješnosti primjene masene citometrije na kliničkim uzorcima briseva vrata maternice, cilj je bio pronaći proteine koji pokazuju razlike između citoloških kategorija i statusa HPV. Prikaz ekspresije 29 proteina kod staničnih linija (HeLa, CaSki, MCF7, Jurkat) i kliničkom uzorku brisa vrata maternice citološke kategorije NORMAL koristeći točkasti dijagram (eng. *Dot plot*) se nalazi Prilogu B. Da bi se uočile razlike u gustoći stanica u svakom brisu vrata maternice s obzirom na citološku kategoriju, korišteni su dijagrami gustoće stanice (eng. *tSNE density map*) (Slika 29). Razlike u dijagramima gustoće su kvantificirane, a prosječne Jensen-Shannonove vrijednosti divergencije između uzoraka različitih citoloških kategorija prikazane su u Tablici 11. Analizirajući dobivene divergencije koje su bliže nuli, rezultati su pokazali da su brisevi vrata maternice bili međusobno sličniji nego različiti bez obzira raspodjelu i gustoću stanica u svakoj citološkoj kategoriji.



Slika 29. Dijagrami gustoće (*tSNE density*) stanica brisa vrata maternice za svaku citološku kategoriju (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL).

Slika 29. -nastavak.

Na x osi je prikazana dimenzija tSNE 1, a na y osi druga dimenzija tSNE 2. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja.

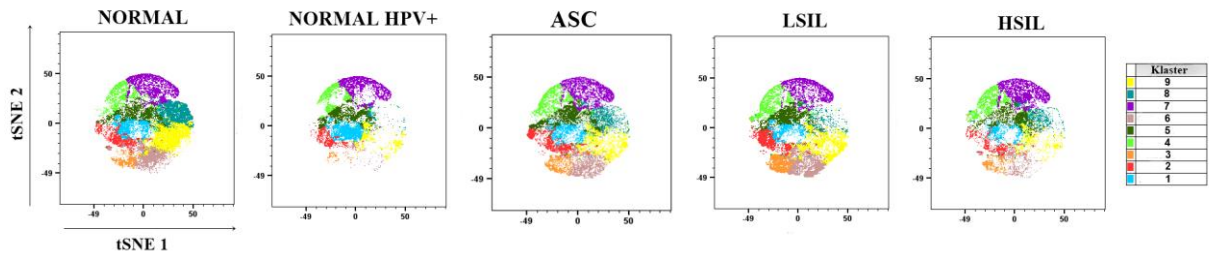
Tablica 11. Prosječne srednje Jensen-Shannonove vrijednosti divergencije brisa vrata maternice s obzirom na citološku kategoriju temeljene na dijagramu gustoće stanica.

	NORMAL	NORMAL HPV+	ASC	LSIL	HSIL
NORMAL	0,366	0,353	0,340	0,407	0,350
NORMAL HPV+	0,353	0,331	0,357	0,408	0,348
ASC	0,340	0,357	0,322	0,390	0,327
LSIL	0,407	0,408	0,390	0,457	0,377
HSIL	0,350	0,348	0,327	0,377	0,291

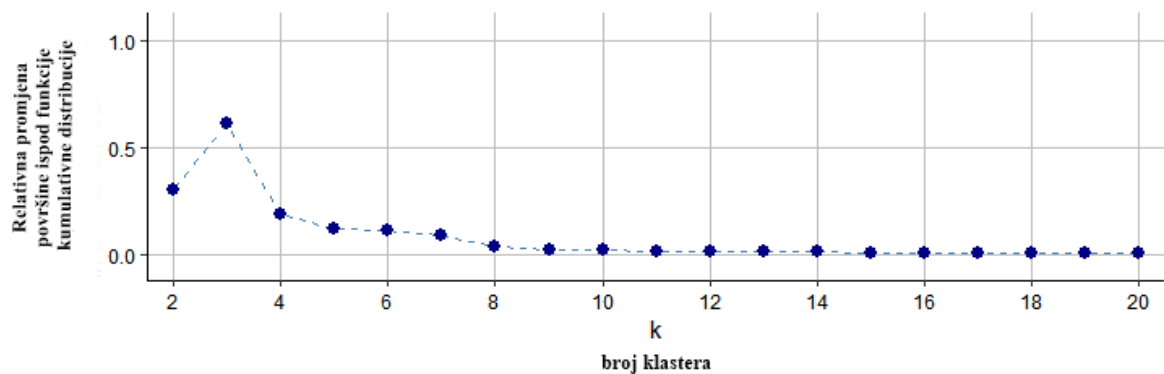
*NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja.

Analiza FlowSOM pružila je istovremeni pregled obrazaca ekspresije proteina na svim stanicama i otkrila određene podskupove koji bi inače mogli biti zanemareni. Tijekom analize FlowSOM stvoreno je devet klastera prema ekspresiji proteina te se nakon toga potvrdio optimalan broj klastera između 4 i 10 *Elbow* metodom (Slika 30a i 30b). Zbog sličnosti u ekspresiji proteina, klasteri su se spojili u pet metaklastera primarno određenih proteinima Ck7, 10/13, 14, 17 i ITGA6 (Slika 30c).

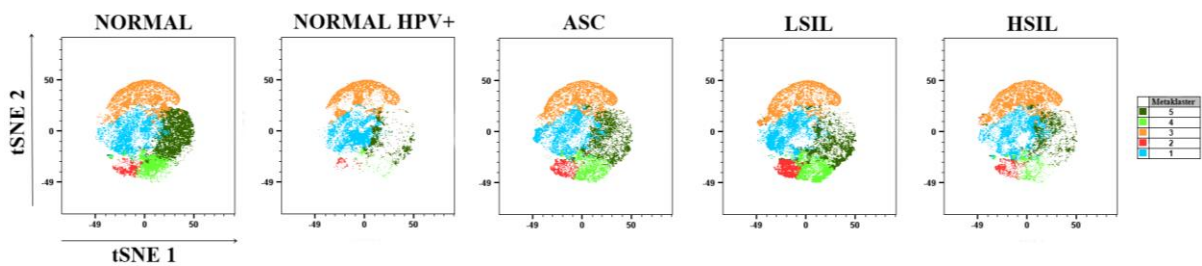
a)



b)



c)



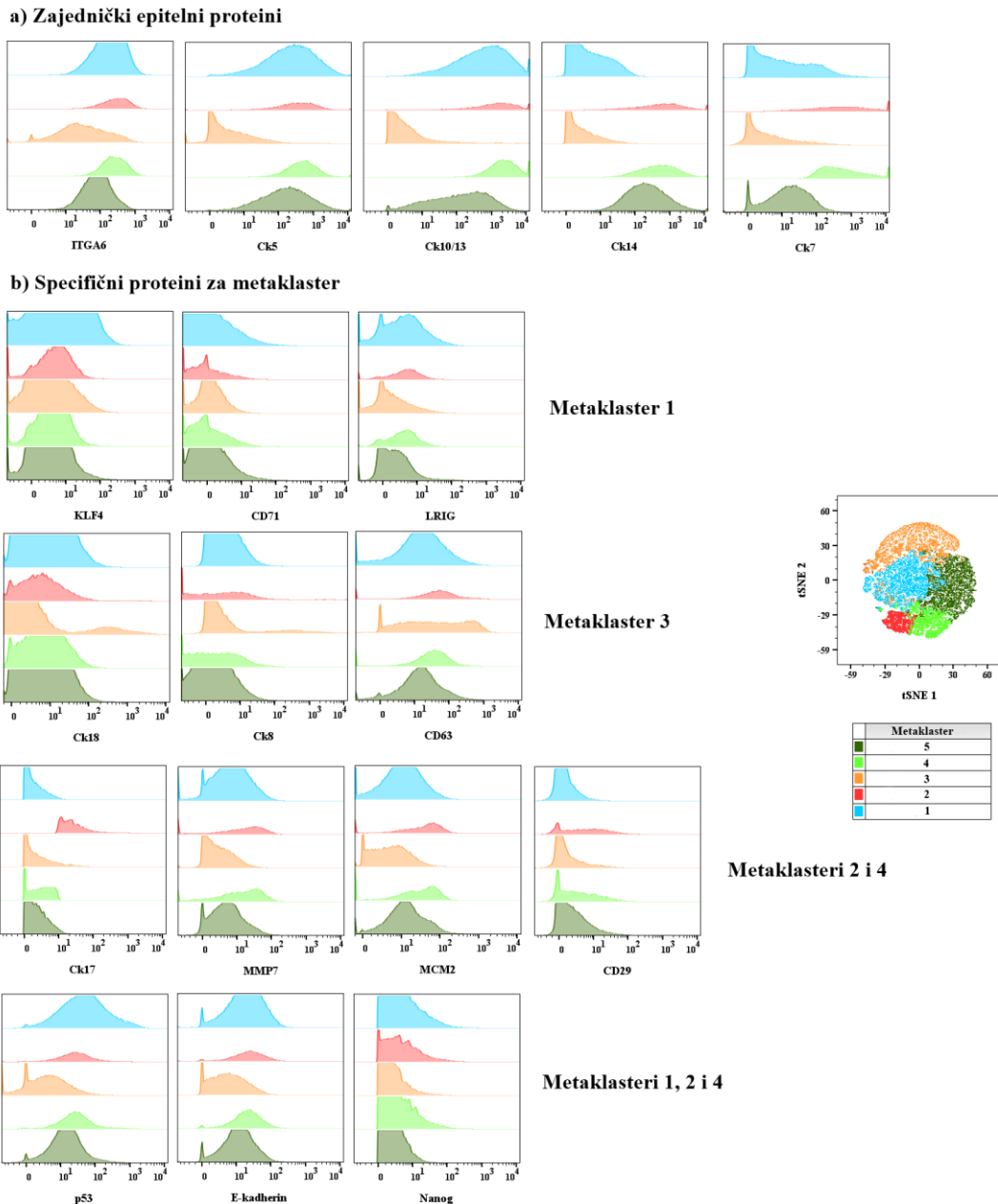
Slika 30. Prikaz stvaranja klastera pomoću FlowSOM analize. a) Prikaz devet klastera kroz pet različitih citoloških kategorija (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL) na tSNE mapi. Legenda prikazuje određeni broj i boju klastera. Na x osi je prikazana dimenzija tSNE 1, a na y osi druga dimenzija tSNE 2. b) Prikaz krivulje *Elbow* metode koja određuje optimalan broj klastera. X os predstavlja broj klastera, a y os relativnu primjenu površine ispod funkcije kumulativne distribucije. Optimalan broj koji se preporučuje prema krivulji za briseve vrata maternice je bio između četiri i deset. c) Prikaz pet metaklastera kroz pet različitih citoloških kategorija (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL) na tSNE mapi. Legenda prikazuje određeni broj i boju metaklastera. Na x osi je prikazana dimenzija tSNE 1, a na y osi druga dimenzija tSNE 2. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja.

Nakon određivanja broja metaklastera, odredio se fenotip proteina u svakom metaklasteru. Odnosno ekspresija proteina u svakom metaklasteru je određena pomoću postotka pozitivnih stanica na određeni protein s obzirom na svaki metaklaster u obliku toplinske mape i pomaka u intenzitetu ekspresije pomoću grafa funkcije gustoće uzorka. Postotak pozitivnih stanica je određen s obzirom na signal pozitivnosti citoloških uzoraka kategorije NORMAL. Postotak pozitivnih stanica za svaki protein u određenom metaklasteru je prikazan u Tablici 12. Fenotip proteina koji su pokazali najznačajnije promjene u ekspresiji između metaklastera je prikazan na Slici 31. Za metaklaster 1 je osim uobičajenih gore navedenih proteina za određivanje različitih epitelnih stanica (ITGA6 pozitivan (+), Ck5+, Ck10/13+, Ck7+, niska ekspresija Ck14), pronađena najveća ekspresija proteina CD71, KLF4, LRIG, E-kadherina, Nanog-a i p53. U metaklasteru 3 (ITGA6+, niža ekspresija Ck5, Ck10/13, Ck7, Ck14 negativan (-)), najveću ekspresiju imali su proteini Ck8, Ck18 i CD63. Metaklasteri 2 i 4 (oba s ITGA6+, Ck5+, Ck10/13+, Ck14+, Ck7+) pokazali su veću ekspresiju proteina MCM2, MMP7, E-kadherina, p53 i Nanog-a, dok je veća ekspresija Ck17 i CD29 pronađena u metaklasteru 2. Metaklaster 5 nije pokazao značajnu promjenu u ekspresiji proteina, ali je imao uobičajene proteine za određivanje različitih epitelnih stanica (ITGA6+, Ck5+, Ck10/13+, Ck14+, Ck7-). Određeni proteini nisu imali evidentne promjene u ekspresiji između metaklastera te dalje nisu promatrani (Tablica 12, Slika 32). Odnosno postotak pozitivnih stanica u toplinskoj mapi i intenzitet ekspresije na grafu funkcije gustoće uzorka se nije razlikovao između metaklastera, odnosno nije bilo pomaka u intenzitetu ekspresije na stanicama.

Tablica 12. Postotak pozitivnih stanica za svaki protein u određenom metaklasteru. Skala boja predstavlja intenzitet ekspresije svakog proteina: plava - nema ekspresije, crvena - visoka ekspresija.

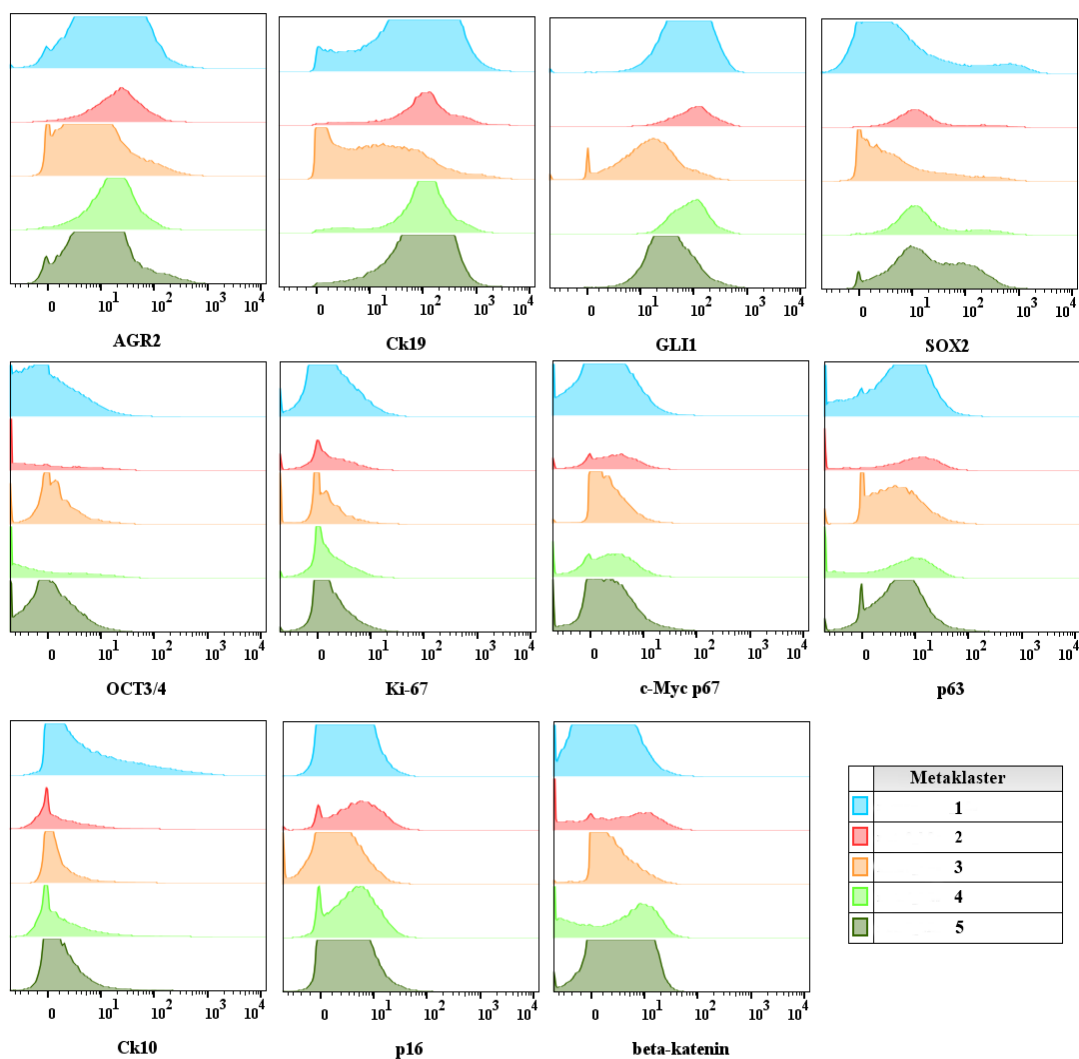
	Metaklaster 1 (%)	Metaklaster 2 (%)	Metaklaster 3 (%)	Metaklaster 4 (%)	Metaklaster 5 (%)
ITGA6+	99,2	99,6	72,5	99,8	97,7
Ck5+	94,8	96,2	21,6	99,2	94,6
Ck10/13+	95,0	92,9	11,3	97,0	81,3
Ck14+	0,5	79,7	0,3	88,5	72,2
Ck7+	36,9	91,4	15	97,8	58,2
KLF4+	15,9	3,0	4,8	2,4	2,3
CD71+	3,9	2,8	0,4	3,0	2,9
LRIG+	14,7	11,4	6,1	9,6	5,0
Ck18+	1,2	2,8	7,2	0,8	0,7
Ck8+	1,8	9,5	8,4	4,4	1,8
CD63+	2,9	8,0	21,6	2,5	1,5
Ck17+	0,1	75,7	3,0	0,0	0,4
MMP7+	9,3	31,8	1,2	28,6	5,4
MCM2+	2,8	21,3	0,5	14,1	4,8
CD29+	0,0	6,9	0,4	3,12	1,0
p53	38,1	16,3	2,1	16,2	5,8
E-kadherin+	10,4	12,0	0,8	8,5	3,2
Nanog+	3,6	8,9	1,0	7,3	0,3
AGR2+	3,8	4,2	4,2	2,3	4,0
p16+	1,6	8,7	0,8	5,7	2,9
SOX2+	16,3	18,8	12,7	21,5	33,7
β -katenin+	0,3	1,8	0,1	0,9	0,2
c-Myc+	0,8	0,7	0,2	0,4	1,4
Ck10+	18,1	6,3	1,8	7,1	2,8
Ck19+	3,3	5,4	2,4	2,7	1,6
GLI1+	44,1	57,6	6,8	49,8	16,5
Ki-67+	5,1	5,0	1,8	3,6	2,6
OCT3/4+	2,7	5,2	1,7	4,3	1,5
p63+	2,4	4,9	2,3	2,1	3,1

*CD49f (ITGA6)-integrin $\alpha 6$, Ck-citokeratin, KLF4-*Krüppel-like factor 4*, CD71-transferin receptor 1, LRIG1-*Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1*, CD63-klaster diferencijacije 63, MCM2-mini-kromosomski protein održavanja 2, MMP7-matriks metaloproteinaza 7, CD29-integrin $\beta 1$, CD324-E-kadherin, AGR2-anteriorni gradijentni homolog 2, p16 INK4A- inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A, SOX2-*sex determining region Y-box 2*, c-Myc p67-*cellular myelocytomatosis oncogene*, GLI1-*GLI family zinc finger protein 1*, Ki-67-proliferacijski marker Kiel 67, OCT3/4-*Octamer-binding transcription factor 3/4*.



Slika 31. Grafovi funkcije gustoće uzorka ekspresije proteina koju su se razlikovali između metaklastera 1-5. Na x osi je prikazana ekspresija određenog proteina, a na y osi je mjera broja stanica (eng. *Counts*). Legenda prikazuje određeni broj i boju metaklastera te poziciju metklastera na tSNE mapi koja uključuje sve metaklastere neovisno o citološkoj kategoriji. a)

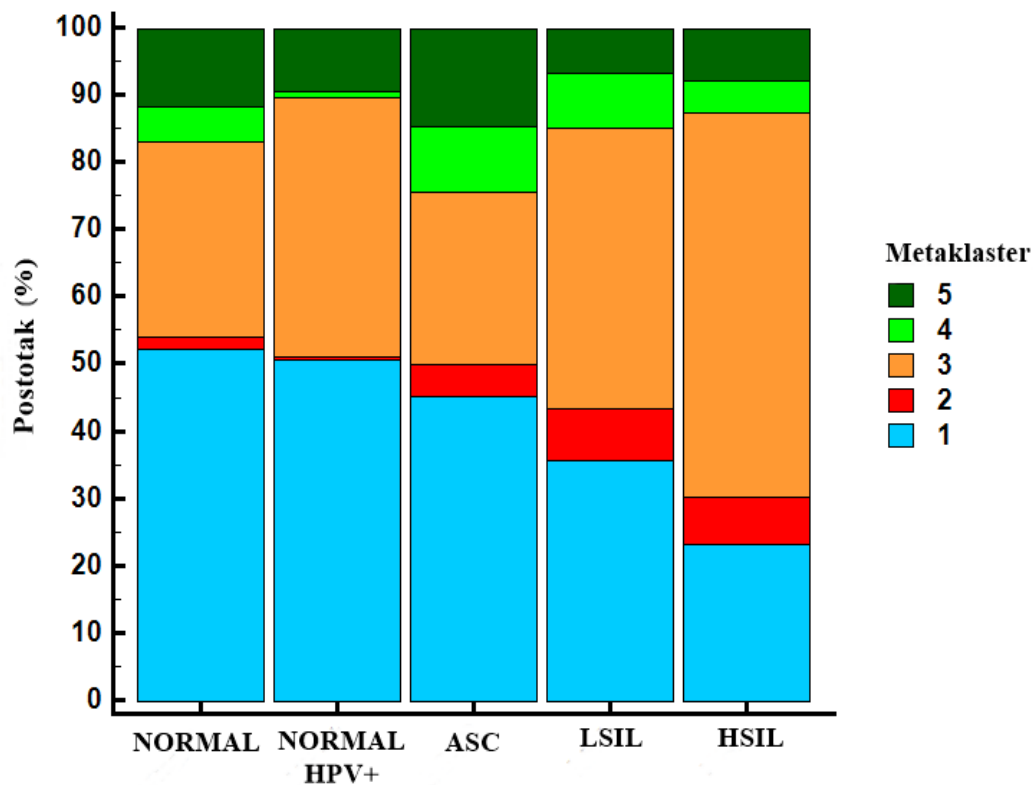
Ekspresija zajedničkih epitelnih proteina korištenih za stvaranje klastera. b) Ekspresija proteina specifičnih za metaklaster. CD49f (ITGA6)-integrin $\alpha 6$, Ck-citokeratin, KLF4-*Krüppel-like factor 4*, CD71-transferin receptor 1, LRIG1-*Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1*, CD63-klaster diferencijacije 63, MMP7-matriks metaloproteinaza 7, MCM2-mini-kromosomski protein održavanja 2, CD29-integrin $\beta 1$, CD324-E-kadherin.



Slika 32. Grafovi funkcije gustoće uzorka ekspresije proteina koju se nisu znatno razlikovali između metaklastera 1-5. Legenda prikazuje određeni broj i boju metaklastera. Na x osi je prikazana ekspresija određenog proteina, a na y osi je mjera broja stanica (eng. *Counts*). AGR2-anteriorni gradijentni homolog 2, Ck-citokeratin, GLI1-*GLI family zinc finger protein 1*, SOX2-*sex determining region Y-box 2*, OCT3/4-*Octamer-binding transcription factor 3/4*. Ki-67-proliferacijski marker Kiel 67, c-Myc p67-*cellular myelocytomatosis oncogene*, p16 INK4A- inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A.

Prosječna zastupljenost stanica svakog metaklastera u određenim citološkim kategorijama prikazana je na Slici 33, dok su raspon, medijan i interkvartilni raspon (IQR, eng. *Interquartile range*) prikazani u Tablici 13. Postojala je statistički značajna korelacija između metaklastera 1 (CD71, KLF4, LRIG1, E-kadherin, Nanog, p53) i citoloških kategorija (Spearmanova korelacija ranga $\rho = -0,401$, $p = 0,0029$) (Slika 34). Učestalost stanica u metaklasteru 1 opadala je s povećanjem težine prekancerozne lezije. Najveća učestalost

stanica bila je u NORMAL, a dalje se smanjivala prema brisevima vrata maternice HSIL. Slično, metaklaster 3 (Ck8, Ck18, CD63) bio je značajno povezan s težinom prekanceroznih lezija (Spearmanova korelacija ranga rho 0,304, p=0,0271) (Slika 34). Učestalost stanica u metaklasteru 3 povećala se s obzirom na težinu prekancerozne lezije i status HPV. Najmanja zastupljenost stanica bila je u NORMAL i ASC, a najveća u NORMAL HPV+ te je rasla prema LSIL i HSIL. S druge strane, metaklasteri 2 i 4 (Ck17, CD29, MMP7, MCM2, E-kadherin, Nanog, p53) nisu pokazali statistički značajnu korelaciju s citološkim kategorijama (p=0,0904, odnosno p=0,8168), ali je metaklaster 2 pokazao blago povećanje zastupljenosti stanica unutar lezija težih citoloških kategorija LSIL i HSIL (Slika 34). Naposljetku, metaklaster 5 (nije imao specifičnih proteina osim epitelnih) također nije pokazao značajne razlike u razlici u zastupljenosti stanica između citoloških kategorija (p=0,5247) (Slika 34).



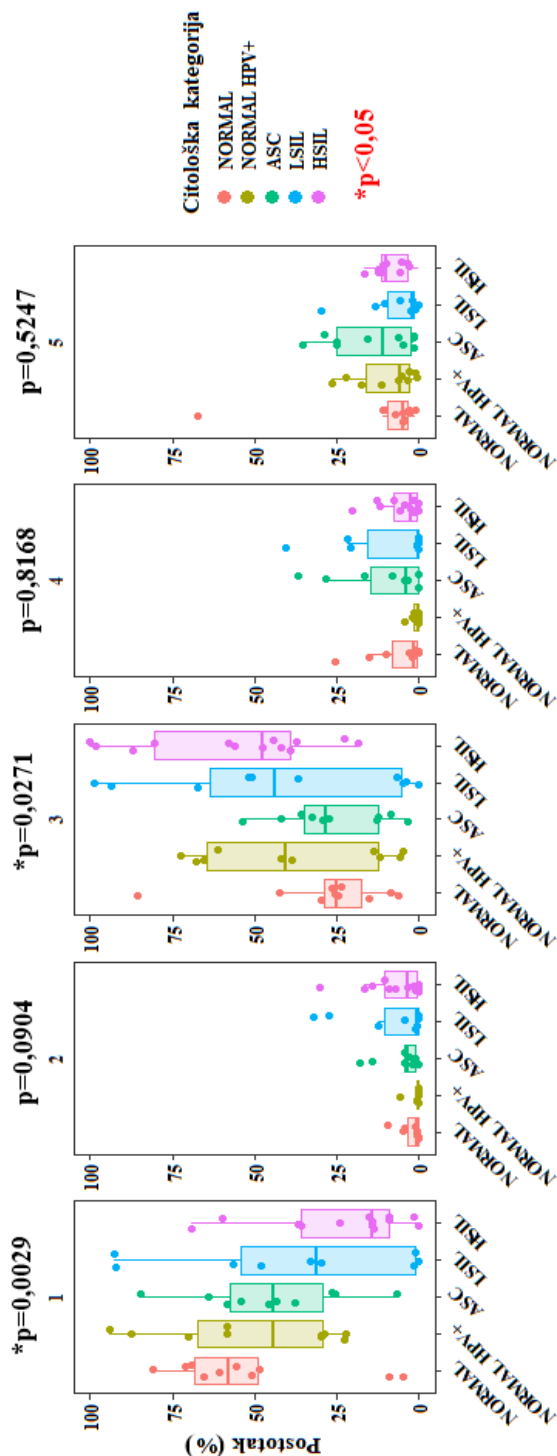
Slika 33. Prosječna zastupljenost stanica svakog metaklastera u određenim citološkim kategorijama. Na x osi je prikazana citološka kategorija, a na y osi postotak (%) zastupljenosti svakog metaklastera. Legenda prikazuje određeni broj i boju metaklastera. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja.

Tablica 13. Sažetak statističke tablice koja prikazuje prosječnu zastupljenost stanica svakog metaklastera (postotak, %) u određenim citološkim kategorijama (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL). Prikazan je medijan, minimum (min), maksimum (max) i interkvartilni raspon (IQR) postotka broja stanica svakog metaklastera.

	NORMAL (N=10)				NORMAL HPV+ (N=10)			
Postotak (%)	Medijan	Min	IQR	Max	Medijan	Min	IQR	Max
Metaklaster 1	57,9	4,9	48,5-69,1	80,9	44,2	22,1	28,9-70,1	94,2
Metaklaster 2	0,6	0,1	0,2-4,1	9,4	0,2	0,0	0,1-0,4	5,8
Metaklaster 3	25,1	6,1	15,4-29,6	85,5	40,4	4,6	11,9-65,6	72,4
Metaklaster 4	1,6	0,2	0,4-9,7	25,4	0,2	0,0	0,0-1,5	4,4
Metaklaster 5	4,8	1,2	3,2-10,5	67,2	5,9	0,6	2,8-17,7	26,3
	ASC (N=10)				LSIL (N=10)			
Postotak (%)	Medijan	Min	IQR	Max	Medijan	Min	IQR	Max
Metaklaster 1	44.6	6.6	26.3-58.4	84.8	31.2	0.0	1.0-56.4	92.8
Metaklaster 2	3.2	0.0	1.0-4.4	18.2	0.8	0.0	0.1-12.4	32.2
Metaklaster 3	28.2	3.3	12.3-35.6	53.8	43.7	0.3	5.0-67.2	98.8
Metaklaster 4	3.8	0.1	0.1-16.7	36.6	0.3	0.0	0.1-20.7	40.7
Metaklaster 5	11.0	1.5	1.7-25.3	35.3	2.2	0.3	1.2-10.5	29.9
	HSIL (N=13)							
Postotak (%)	Medijan	Min	IQR	Max				
Metaklaster 1	14.5	0.0	8.9-36.2	69.1				
Metaklaster 2	3.4	0.0	0.6-11.6	30.2				
Metaklaster 3	47.6	18.4	38.7-82.1	100				
Metaklaster 4	2.3	0.0	0.3-8.7	20.3				
Metaklaster 5	10.0	0.0	3.3-11.8	16.6				

*NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja

Metaklasteri



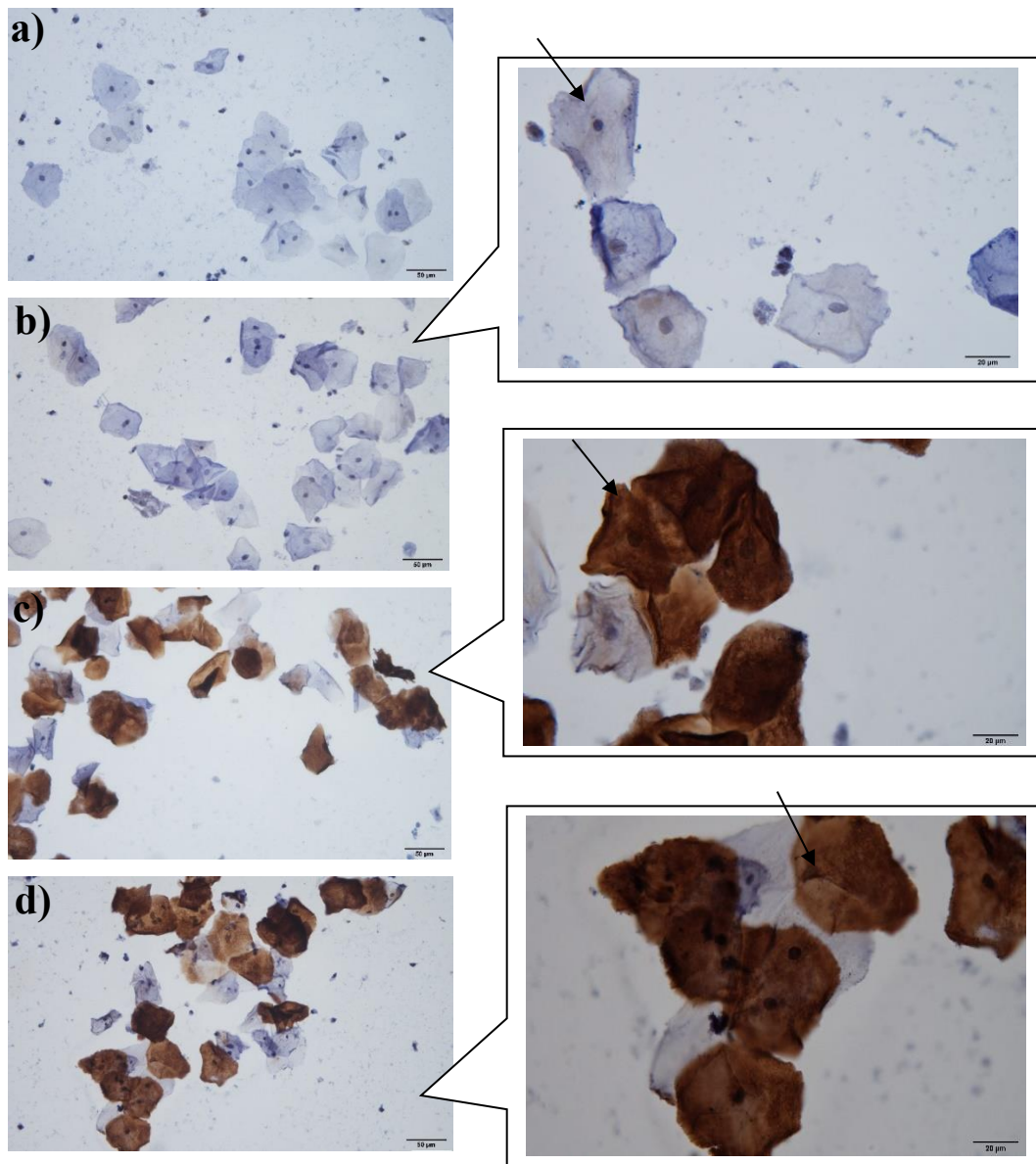
Slika 34. Box-plot u kojem su prikazani postotci (%) svake citološke kategorije (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL) ovisno o metaklasteru 1-5. Legenda prikazuje određenu citološku kategoriju u određenoj boji. Na horizontalnoj liniji je prikazan medijan, a na box-plotu interkvartilni raspon. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije, NORMAL HPV+ - epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije prisutnošću HPV-a, ASC-atipične skvamozne stanice, LSIL-skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja, HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja.

4.3. Ekspresija proteina na brisevima vrata maternice imunocitokemijom

Od proteina koji su pokazali da imaju statističke značajne razlike u ekspresiji s obzirom na citološke kategorije briseva vrata maternice, odabrana su tri proteina (MMP7, E-kadherin i Ck18) koja su se ispitala i imunocitokemijskom metodom s obzirom na stupanj SIL-a te tri proteina (ITGA6, Ck10/13 i Ck5) čija se ekspresija ispitivala kako bi se potvrdila odabrana stanična populacija brisa vrata maternice za analizu masenom citometrijom. Ukupan broj briseva vrata maternice koji se koristio za analizu imunocitokemijom iznosi 17. Brisevi vrata maternice kategorije NORMAL (N=5) su se obilježili proteinima Ck5, 10/13 i ITGA6, a brisevi vrata maternice kategorija NORMAL (N=4), LSIL (N=4) i HSIL (N=4) su se obilježili proteinima MMP7, E-kadherin i Citokeratin 18.

4.3.1. Ekspresija Ck10/13, 5 i ITGA6 na NORMAL citološkoj kategoriji brisa vrata maternice

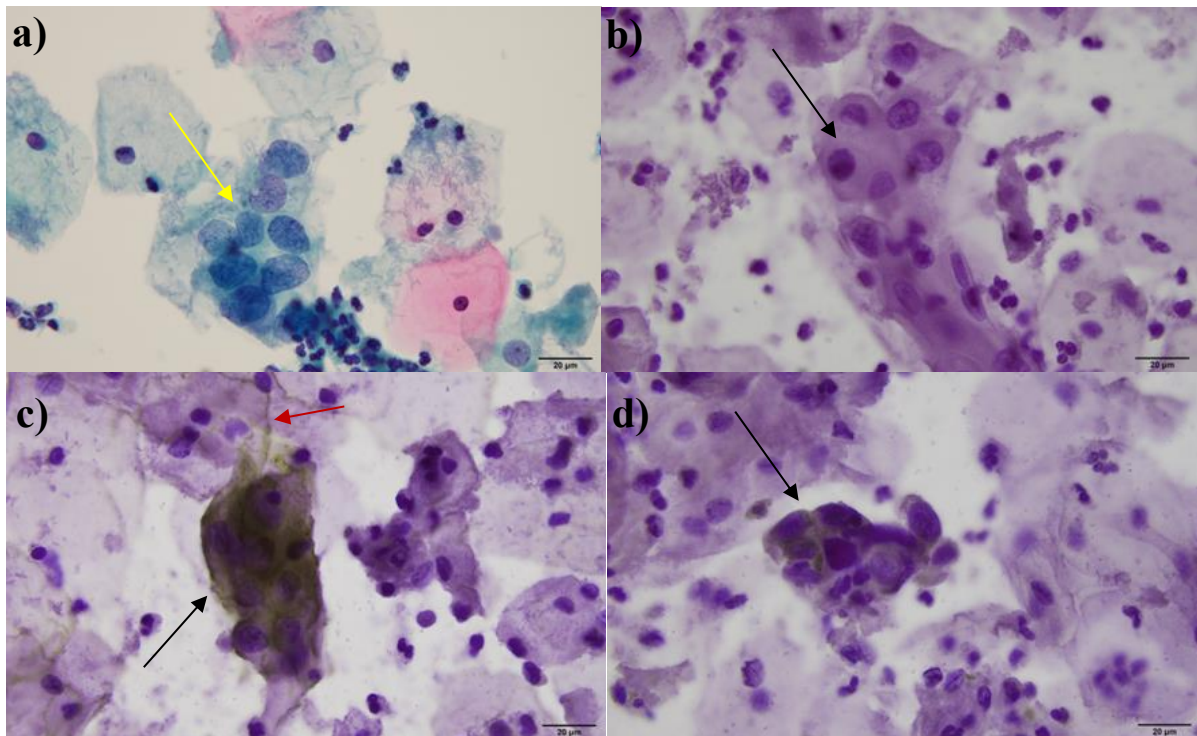
U svih pet uzoraka brisa vrata maternice citološke kategorije NORMAL na koje su dodana primarna antitijela Ck10/13 i Ck5 je pronađena visoka ekspresija proteina, odnosno jače smeđe obojenje (++) na većini cervikalnih epitelnih stanica (5/5, 100%), dok ekspresija proteina ITGA6 je niža, odnosno pronađeno je slabije smeđe obojenje (+) (5/5, 100%) na manjem broju cervikalnih epitelnih stanica. U svih pet uzoraka brisa vrata maternice citološke kategorije NORMAL na koje nisu dodana primarna antitijela i predstavljaju negativnu kontrolu nije pronađena prisutnost smeđeg obojenja (-) (5/5, 100%). Primjer imunocitokemijskog bojenja negativne kontrole i ekspresije proteina ITGA6, Ck5 i Ck10/13 na jednom uzorku NORMAL citološke kategorije je prikazan na Slici 35.



Slika 35. Primjer imunocitokemijskog bojenja negativne kontrole i ekspresije proteina ITGA6, Ck5 i Ck10/13 na jednom uzorku citološke kategorije NORMAL pod povećanjima 400x (lijevo) i 1000x (desno). Pod a) je prikazana negativna kontrola, a pod b) ITGA6, c) Ck5 i d) Ck10/13. Crne strelice pokazuju smeđe obojenje u citoplazmi cervikalnih epitelnih stanica. Ck-Citokeratin, ITGA6 (CD49f)-intergrin α 6. NORMAL-epitelne stanice negativne na prekancerozne intraepitelne lezije.

4.3.2. Ekspresija MMP7, E-kadherina i citokeratina 18 s obzirom na stupanj SIL-a

U sva 4 uzorka citološke kategorije NORMAL (4/4, 100%) pronađena je ekspresija E-kadherina u membrani epitelnih stanica. MMP7 se nije ekspimirao na uzorcima citološke kategorije NORMAL (4/4, 100%). Ekspresija citokeratina 18 bila je sporadično prisutna na svim uzorcima sa i bez cervikalnih lezija (12/12, 100%) te je bio ekspimiran na stanicama različitih dijelova epitela (ektocerviks, endocerviks). U tri uzorka citološke kategorije HSIL (3/4, 75%), pronađene su diskariotične stanice s povišenom ekspresijom proteina E-kadherina, odnosno imale su smeđe obojenje u citoplazmi, dok se kod normalnih cervikalnih epitelnih stanica E-kadherin ispoljavao samo u membrani (Slika 36). U jednom uzorku kategorije HSIL obojenim s E-kadherinom nije bilo moguće naći diskariotične stanice. U citološkoj kategoriji LSIL, pronađen je samo jedan uzorak (1/4, 25%) koji je sadržavao diskariotične stanice koje su bile pozitivne na E-kadherin. U ostalim uzorcima LSIL kategorije nisu pronađene diskariotične stanice. Ekspresija MMP7 u citoplazmi diskariotičnih stanica je pronađena na samo jednom uzorku citološke kategorije HSIL (1/4, 25%) (Slika 36). Dva uzorka HSIL nisu pokazala prisutnost MMP7 na diskariotičnim stanicama (2/4, 50%), a jedan uzorak nije sadržavao diskariotične stanice. U svih 12 uzoraka brisa vrata maternice citoloških kategorija NORMAL, LSIL i HSIL na koje nisu dodana primarna antitijela i predstavljaju negativnu kontrolu nije pronađena prisutnost smeđeg obojenja (-) (12/12, 100%). Primjer obojenja diskariotičnih stanica po Papanicolau i imunocitokemijski u negativnoj kontroli te dodatkom proteina E-kadherina i MMP7 na jednom uzorku HSIL citološke kategorije je prikazan na Slici 36.



Slika 36. Primjer obojenja diskariotičnih stanica po Papanicolau i imunocitokemijski u negativnoj kontroli te dodatkom proteina E-kadherina i MMP7 na jednom uzorku HSIL citološke kategorije pod povećanjem 1000x. Pod a) je prikazano bojenje po Papanicolau, pod b) negativna kontrola, a c) E-kadherin i d) MMP7. Crne strelice pokazuju prisutnost ili odsutnost smeđeg obojenja u citoplazmi diskariotičnih stanica. Žuta strelica prikazuje diskariotične stanice bojenjem po Papanicolau, a crvena strelica prikazuje smeđe obojenje E-kadherina u membrani normalno promijenjenih cervikalnih epitelnih stanica. +, - i +/- predstavljaju stupnjeve ekspresije. MMP7-matriks metaloproteinaza 7. HSIL-skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja.

4.4. Ekspresija proteina MMP7 i E-kadherina na biopatima vrata maternice imunohistokemijskom metodom

Nakon imunocitokemije, proteini MMP7 i E-kadherin su se ispitali imunohistokemijskom metodom na biopatima vrata maternice. Zbog malog broja ispitanih citoloških uzoraka imunocitokemijskom metodom (N=12) te otegotnih okolnosti poput niske osjetljivosti (55, 4%) (153) i različitih isključnih parametara (pre mali broj stanica, prisutnost velikog broja eritrocita, neadekvatno uzorkovanje) kod briseva vrata maternice u dijagnozi SIL-a, odabrani proteini nakon imunocitokemije su se dodatno ispitali i na biopatima vrata maternice radi

bolje validacije proteina. Od 19 uzoraka CIN-a, 5 je bilo CIN1, 7 CIN2 i 7 CIN3. Citokeratin 10/13 je predstavljao pozitivnu kontrolu, a proteini MMP7 i E-kadherin su ispitani s obzirom na stupanj CIN-a. Ukupna ekspresija proteina E-kadherina i MMP7 s obzirom na patohistološku dijagnozu na svim biopstatima vrata maternice brojčano je prikazana u Tablici 14. Ekspresija proteina E-kadherina i MMP7 s obzirom na svaki pojedinačni biopstat vrata maternice je prikazana u Tablici 15.

Citokeratin 10/13 koji je predstavljao pozitivnu kontrolu je pokazao prisutnost smeđeg obojenja (+) kroz cijeli cervikalni epitel sa ili bez manjeg intenziteta u bazalnim stanicama u svim uzorcima biopstata vrata maternice bez obzira na kategorije NORMAL i CIN (26/26, 100%). U svih 26 biopstata vrata maternice (NORMAL, CIN1, CIN2 i CIN3) na koje nisu dodana primarna antitijela i predstavljaju negativnu kontrolu nije pronađena prisutnost smeđeg obojenja (-) (26/26, 100%). Proteini MMP7 i E-kadherin su nisu bili eksprimirani u svim NORMAL uzorcima (7/7, 100%, 7/7, 100%), odnosno MMP7 se nije eksprimirao na normalnom epitelu, a E-kadherin u membrani svih slojeva epitelnih stanica i citoplazmi bazalnog sloja. Protein MMP7 se eksprimirao s visokim intenzitetom (+) u dva biopstata CIN1, pet CIN2 i dva CIN3. Djelomično se eksprimirao (+/-) u dva CIN1 biopstata, dva CIN3, a ni jedan CIN2. U dva biopstata CIN2 i dva biopstata CIN3 se nije eksprimirao. MMP7 nije pokazao statistički značajno povećanje od NORMAL do CIN3 ($p=0,0518$) iako mu je p vrijednost granična Hi kvadrat testom (Tablica 14). Protein E-kadherin se eksprimirao s visokim intenzitetom (+) u tri CIN1 biopstata, dva CIN2 i tri CIN3. Djelomično se eksprimirao (+/-) u tri CIN1 biopstata, tri CIN3, a ni jedan CIN1. U dva biopstata CIN1, dva biopstata CIN2 i jedan biopstat CIN3 se nije eksprimirao. Pronađeno je statistički značajno povećanje ekspresije E-kadherina od NORMAL do CIN3 Hi kvadrat testom ($p=0,016$) (Tablica 14). Međusobna ekspresija proteina MMP7 i E-kadherina s obzirom na isti biopstat vrata maternice je pokazala korelaciju (Spearmanova korelacija ranga ρ 0,675, $p=0,0002$) (Slika 36, Tablica 15). Primjer imunohistokemijskog obojenja biopstata vrata maternice u negativnoj kontroli te dodatkom proteina Ck10/13 (pozitivna kontrola), E-kadherina i MMP7 na uzorcima normalnog epitela (NORMAL) pod povećanjem 400x je prikazan na Slici 37. Primjer imunohistokemijskog obojenja biopstata vrata maternice u negativnoj kontroli te dodatkom proteina Ck10/13 (pozitivna kontrola), E-kadherina i MMP7 na uzorku CIN3 pod povećanjem 400x je prikazan na Slici 38.

Tablica 14. Imunohistokemijska ekspresija proteina E-kadherina i MMP7 s obzirom na patohistološku dijagnozu na svim bioptatima vrata maternice.

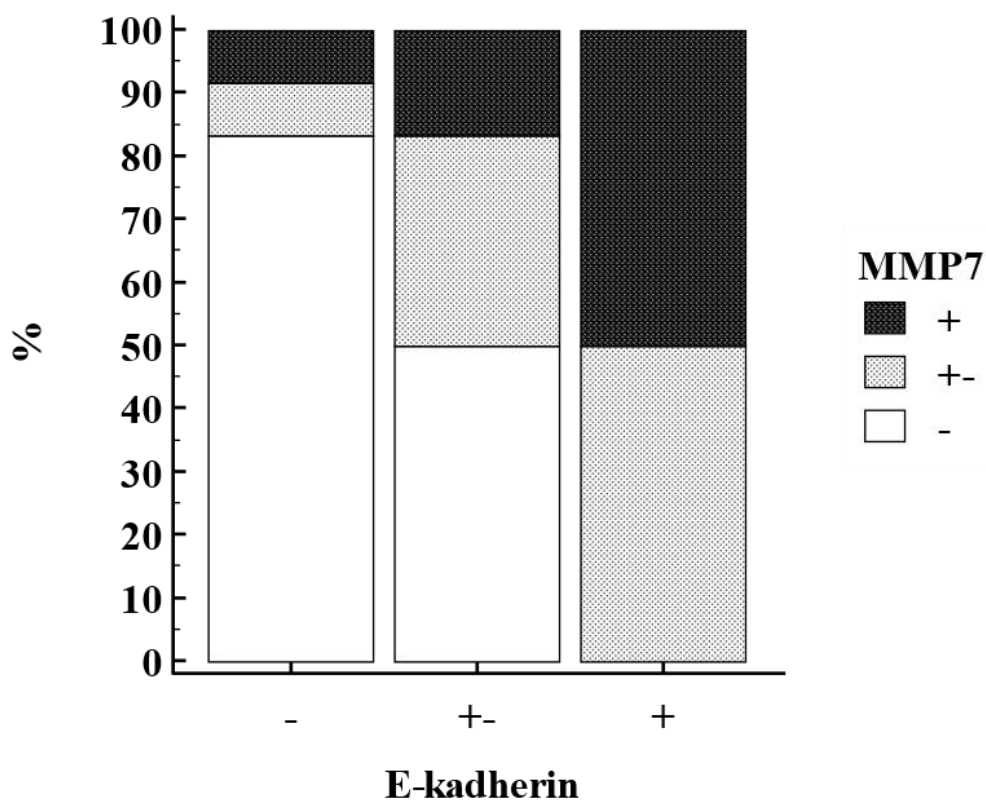
	E-kadherin (N, %)			MMP7 (N, %)			Ukupan broj uzoraka
	+	+/-	-	+	+/-	-	
NORMAL	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	7
CIN1	3 (60%)	0 (0%)	2 (40%)	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	5
CIN2	2 (28,5%)	3 (43%)	2 (28,5%)	2 (28,5%)	2 (28,5%)	3 (43%)	7
CIN3	3 (43%)	3 (43%)	1 (14%)	2 (28,5%)	2 (28,5%)	3 (43%)	7
Ukupno:							26

*+, - i +/- predstavljaju stupnjeve ekspresije. N je broj bioptata u kojima je pronađen određeni stupanj ekspresije, a izražen je i u postotku (%). MMP7-matriks metaloproteinaza 7, CIN-cervikalna intraepitelna neoplazija.

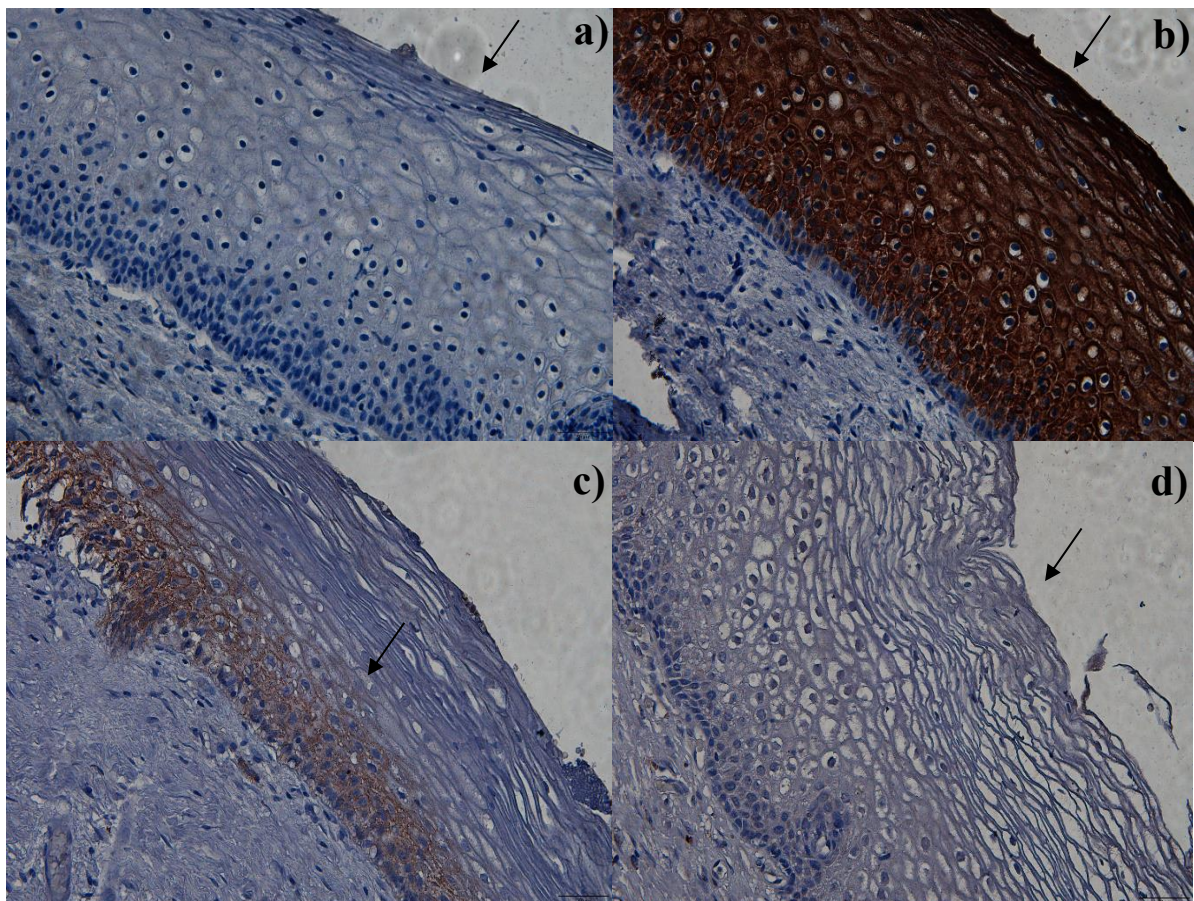
Tablica 15. Imunohistokemijska ekspresija proteina E-kadherina i MMP7 s obzirom na svaki pojedinačni bioptat vrata maternice i patohistološku dijagnozu.

	E-kadherin	MMP7
CIN1	+	+
	+	+/-
	+	+/-
	-	+
	-	+/-
CIN2	+/-	+
	+/-	-
	-	-
	-	-
	+	+/-
CIN3	+/-	+/-
	+	+
	+	+
	+/-	-
	+	+
	+/-	-
	+	+/-

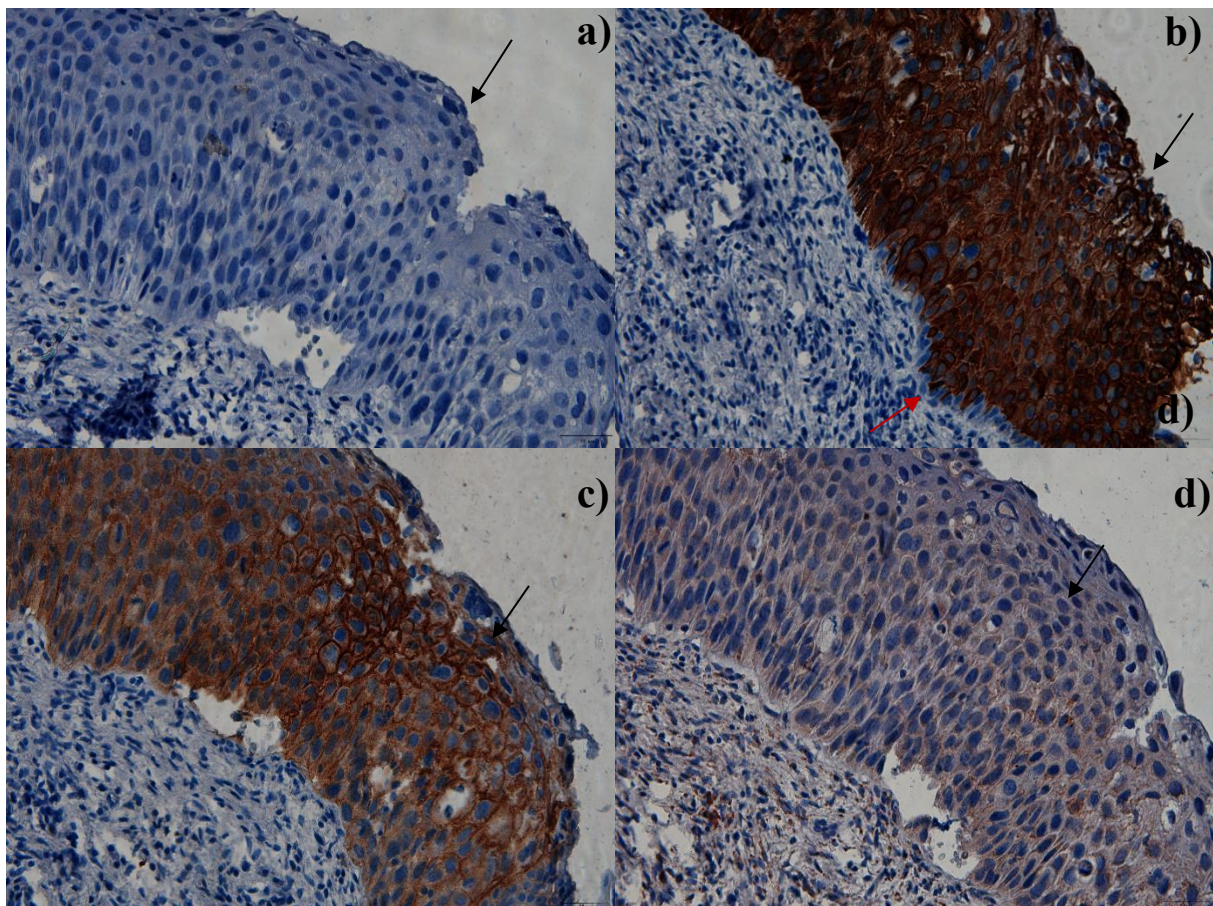
*+, - i +/- predstavljaju stupnjeve ekspresije. MMP7-matriks metaloproteinaza 7, CIN-cervikalna intraepitelna neoplazija.



Slika 36. Stupčasti dijagram koji prikazuje međusobnu povezanost ekspresije proteina MMP7 i E-kadherina s obzirom na isti bioptat vrata maternice koristeći Spearmanovu korelaciju (Spearmanova korelacija ranga ρ 0,675, $p=0,0002$). Na x osi je prikazana ekspresija (-, +, +/-) E-kadherina, a legenda prikazuje ekspresiju MMP7 kroz iste uzorke. Na y osi je prikazan postotak bioptata s obzirom na ekspresiju (-,+, +/-). +, - i +/- predstavljaju stupnjeve ekspresije. MMP7-matriks metaloproteinaza 7.



Slika 37. Primjer imunohistokemijskog obojenja bioptata vrata maternice u negativnoj kontroli te dodatkom antitijela na proteine Ck10/13 (pozitivna kontrola), E-kadherina i MMP7 na uzorcima normalnog epitela (NORMAL) pod povećanjem 400x. Pod a) negativna kontrola pod b) Ck10/13 (pozitivna kontrola), a c) E-kadherin i d) MMP7. Crne strelice pokazuju prisutnost ili odsutnost smeđeg obojenja u normalnom epitelu. MMP7-matriks metaloproteinaza 7. Ck-Citokeratin.



Slika 38. Primjer imunohistokemijskog obojenja bioptata vrata maternice u negativnoj kontroli te dodatkom antitijela na proteine Ck10/13 (pozitivna kontrola), E-kadherina i MMP7 na uzorku CIN3 pod povećanjem 400x. Pod a) negativna kontrola pod b) Ck10/13 (pozitivna kontrola), a c) E-kadherin i d) MMP7. Crne strelice pokazuju prisutnost ili odsutnost smeđeg obojenja u cervikalnoj intraepitelnoj leziji. Crvena strelica pokazuje odsutnost smeđeg obojenja u bazalnim stanicama vezanim za bazalnu membranu. MMP7-matriks metaloproteinaza 7, CIN-cervikalna intraepitelna neoplazija. Ck-Citokeratin.

5. RASPRAVA

Rak vrata maternice je (RVM) četvrti najučestaliji rak u svijetu kod žena uzrokovan u više od 95% slučajeva perzistentnom infekcijom HPV-om (4). Posljednjih godina razvili su se razni testovi probira te cjeviva protiv HPV-a, ali i dalje postoje različiti izazovi u prevenciji RVM (154). Najveći izazovi su niska osjetljivost i nedostatak novih laboratorijskih metoda za široko i istovremeno testiranje biomarkera koji bi pomogli u dijagnozi, probiru i predviđanju progresije prekanceroznih lezija (8).

U sklopu ovog istraživanja se prvobitno ispitala učestalost devet najčešćih tipova HPV-a u RVM u svijetu, a koji su zastupljeni u cjevivu koje se trenutno koristi u RH (155). Rezultati učestalosti HPV-a u kliničkim uzorcima korištenim u ovom istraživanju su pokazali podjednaku učestalost i distribuciju istraživanih tipova HPV-a (6/11, 16, 18, 33, 31, 45, 52), od kojih je najčešći HPV16, kao u dosadašnjim studijama u RH (94,156–160). S obzirom da je HPV i dalje uvelike prisutan u populaciji bez obzira što je u RH cjevivo dostupno već 17 godina (od 2007. godine), cilj ovog istraživanja je bio doprinijeti poboljšanju trenutnog probira RVM-e ispitujući primjenjivost masene citometrije na stanicama epitela vrata maternice i pronalaskom novih proteina (94,155).

Prvotni cilj je bio pronaći proteine koji će odrediti prisutnost stanica epitela vrata maternice, ali i različitih subpopulacija u samim slojevima epitela masenom citometrijom. Stoga, prvi takav protein je bio integrin $\alpha 6$ (ITGA6), poznati receptor za laminin u epitelnim stanicama koji igra ključnu strukturnu ulogu u hemidezmosomu i staničnoj adheziji te pripada obitelji transmembranskih glikoproteina tipa I, odnosno integrina koji su sveprisutni u stanicama (133,161). ITGA6 je poznat i po ulogama u staničnoj proliferaciji, migraciji, preživljavanju i diferencijaciji, dok je prisutnost u epitelnim stanicama važna za arhitekturu tkiva zbog očuvanja integriteta stanične membrane (161). U ovom istraživanju je ekspresija ITGA6 pronađena kroz cijeli epitel vrata maternice masenom citometrijom. U prethodnim studijama ekspresija ITGA6 je bila osrednje visoka, ali ponekad i vrlo niska u membrani i citoplazmi na tkivu vrata maternice imunokemijskim metodama te se može zaključiti da visoka ekspresija ovog proteina ukazuje na prisutnost epitelnih stanica brisa vrata maternice te da je njegova ekspresija viša kada se detektira masenom citometrijom (133). Zbog različitog intenziteta ekspresije ovisno o primjenjenim metodama, kombiniranje ITGA6 s proteinima Ck5 i Ck10/13 za potvrdu prisutnosti stanica brisa vrata maternice se pokazala boljom opcijom u ovom istraživanju (133). U tumorskim stanicama, ekspresija i aktivnost ITGA6 može utjecati na signalne putove koji upravljaju karcinogenezom, invazijom, angiogenezom, metastazama,

izbjegavanjem imunološkog sustava, matičnošću i otpornošću (161). Na primjer, poznato je da ITGA6 pojačava aktivaciju dva ključna signalna puta, PI3K/PKB i MAPK/Erk uključena u razvoj tumora (161). Dodatna važna uloga ovog proteina je da je identificiran u populacijama matičnih stanica raznih vrsta karcinoma te je eksprimiran i kod matičnih stanica raka vrata maternice (162–164). Osim toga, pronađeno je i da postoji interakcija HPV16 prilikom ulaska u bazalni sloj epitela s ITGA6 (165). Iako istraživanja upućuju na moguću povezanost RVM, HPV-a i integrina $\alpha 6$, u ovom istraživanju nije bilo povezanosti između njegove ekspresije i prekanceroznih lezija uzrokovanih HPV-om. Međutim, moguće je da ima ulogu u proliferaciji kod invazivnog karcinoma što bi se trebalo dalje istražiti.

Ck5 i Ck10/13 pripadaju obitelji citokeratina s najmanje 20 intermedijarnih filamentnih proteina koji su poznati po specifičnoj raspodjeli u epitelu (166). U ovom istraživanju su Ck5 i Ck10/13 imali visoku ekspresiju na većini epitelnih stanica vrata maternice detektiranu metodama masene citometrije i imunocitokemije. Dodatno, Ck10/13 je pokazao isti obrazac ekspresije kroz sve slojeve epitela vrata maternice (superficijalne, intermedijarne, parabazalne, cilindrične i dio bazalnih stanica) i imunohistokemijskom metodom. Uzimajući u obzir da je prema literaturi Ck5 prisutan na cijelom epitelu vrata maternice, a Ck10/13 na parabazalnim, intermedijarnim i superficijalnim stanicama epitela, rezultati ovog istraživanja ukazuju da su, unatoč tome što je ovdje korišten drugi bris vrata maternice, prisutne stanice svih slojeva epitela (131,132). Osim toga, isti obrazac ekspresije se mogao uočiti na svim brisevima vrata maternice različitih citoloških kategorija (NORMAL, NORMAL HPV+, ASC, LSIL, HSIL) što ukazuje na to da bi Ck5 i Ck10/13 mogli biti dobri pokazatelji za definiranje prisutnosti epitelnih stanica vrata maternice. Osim navedenih citokeratina, na brisevima vrata maternice je bio prisutan i Ck14 na dijelu populacije stanica što ukazuje na prisutnost bazalnih, parabazalnih i rezervnih stanica (132). Dio epitelnih stanica vrata maternice je eksprimirao i druge citokeratine kao na primjer Ck8 i Ck18 što upućuje na to da su u manjem broju prisutne bazalne, cilindrične stanice ili rezervne stanice endocervikalnog epitela (132,138,139). Detektirana je i ekspresija proteina Ck7 i Ck17 koja upućuje na prisutnost stanica skvamokolumarne granice vrata maternice koja je vrlo važna u dijagnostici prekanceroznih lezija i RVM (134–137).

Nadalje, na temelju obrazaca raspodjele ovih proteina čija ekspresija međusobno nije isključiva i koji su odredili prisutnost, odnosno podrijetlo stanica iz različitih slojeva epitela vrata maternice, kreirali su se metaklasteri. Uzimajući u obzir i dijagrame gustoće ovih stanica, pronađena je veća međusobna sličnost između briseva bez obzira na citološku

kategoriju, odnosno prisutnost prekancerozne lezije, što je još jedan dobar pokazatelj zastupljenosti svih tipova stanica vrata maternice u svim uzorcima. Drugim riječima, u brisevima vrata maternice su detektirani proteini specifični za epitelne stanice što ukazuje na to da su brisevi sličniji po podrijetlu i tipu stanica, a da su različiti po učestalosti fenotipa, odnosno ekspresiji drugih proteina. Time je potvrđeno i da je moguće pronaći proteine koji možda koreliraju s citološkom kategorijom i prisutnosti HPV-a, što je bio idući cilj ovog istraživanja.

Navedeni citokeratini, osim što određuju sloj epitela, prema prethodnim su istraživanjima pokazali da promjene u ekspresiji mogu biti u korelaciji s prekanceroznim lezijama i stadijem raka, HPV infekcijom ili prognozom (134,136,138,166). U ovom istraživanju je pronađeno značajno povećanje zastupljenosti stanica pozitivnih na Ck8 i Ck18 u normalnom epitelu zaraženom HPV-om te se broj takvih stanica povećavao s težinom prekanceroznih lezija (LSIL, HSIL). Budući da su Ck8 i Ck18 inače prisutni u nediferenciranim bazalnim i rezervnim stanicama, njihova povećana ekspresija može ukazivati na povećanje broja nediferenciranih stanica, odnosno proliferativnih stanica koje je uzrokovao HPV te može biti povezano s progresijom bolesti (7,132,138,139). Međutim, ekspresija Ck18 detektirana imunocitokemijskom metodom bila je prisutna u različitim slojevima epitela (stanice suprabazalnog sloja i endocerviksa). Iako mu je većinom ekspresija ograničena na nediferencirane stanice, moguće objašnjenje može biti i studija koja je utvrdila da se Ck18 u određenim uzorcima normalnog epitela vrata maternice eksprimira i u višim suprabazalnim slojevima epitela, kao i ovdje (138). Osim toga, razlike u ovim rezultatima bi se mogle protumačiti nedosljednošću metoda, ali i analizi podataka. Na primjer, imunocitokemijskom metodom se detektiraju specifični proteini samo u diskariotičnim stanicama dok se u masenoj citometriji uz pomoć drugih proteina (poput Ck8 i CD63) koji su isto prema literaturi pokazali obilježja nediferenciranosti stanica u istom metaklasteru uviđa ova razlika i moguće je potvrditi dodatnim proteinima nediferencirane stanice i isključiti one normalne (132,139,147,167). Ekspresija Ck17, s obzirom na težinu prekanceroznih lezija, nije bila statistički značajna, ali pokazuje trend povećanja ekspresije u LSIL i HSIL te nekim slučajevima ASC-a što ukazuje na širenje prijelazne zone epitela gdje se lezije i tumori najčešće pojavljuju (135–137). Dodatno, povećana ekspresija u prekanceroznim lezijama, a smanjena u normalnom epitelu zaraženom HPV-om može ukazivati da se ekspresija Ck17 povećava kod stanica kod kojih dolazi do fenotipskih promjena i diskarioze povezanim s djelovanjem HPV.

CD63 pripada obitelji proteina nazvanih tetraspaninima te mu je glavna uloga pokretanje signalnih puteva poput PKB, FAK/PTK2 (eng. *Focal adhesion kinase/Protein tyrosine kinase* 2) i MAPK čime utječe na stanične procese poput proliferacije i diferencijacije te može regulirati intracelularni transport, adheziju leukocita i sudjelovati u degranulaciji mastocita (133,168). Pokazalo se da ekspresija CD63 djeluje i kao tumorski promotor, ali i supresor (169,170). Na primjer, povećana ekspresija CD63 u stanicama melanoma u ranom stadiju ima tumor supresorku ulogu jer smanjuje invaziju tumora i metastaziranje inhibicijom stanične pokretljivosti i sposobnosti razgradnje matriksa (169,170). Takve promjene opisane su i u tumorima jajnika, pluća, dojke i debelog crijeva (169,170). Međutim, pokazano je da i promiče metastaziranje kao receptor tkivnog inhibitora matriks metaloproteinaza koji je u interakciji s β 1 integrinima te mu ekspresija korelira s progresijom tumora i nižim preživljenjem (169,170). Protein CD63 pronađen je i u matičnim stanicama raka čime igra ulogu u metastaziranju i progresiji raka (167,169). Unatoč tome što se može povezati s matičnim stanicama u skvamokolumnarnoj zoni RVM, istraživanja ovog proteina u sklopu RVM su rijetka (147). Iako u ovom istraživanju nije isključivo pronađen u tom području, razina ekspresije ipak ukazuje na povećanje s porastom težine prekancerozne lezije, te da bi u RVM mogao imati ulogu tumorskog promotora.

U stanicama normalnog epitela i normalnog epitela s HPV-om nađena je ekspresija proteina CD71, KLF4 i LRIG1. Njihova se ekspresija smanjivala s porastom težine prekancerozne lezije. CD71 je transferinski receptor, homodimerni transmembranski glikoprotein koji veže transferin, nosač željeza, te služi kao posrednik u unosu željeza u stanicu endocitozom. (171). Poznato je da je transferin neophodan za stanični rast i metaboličke procese ovisne o željezu uključujući sintezu DNA, transport elektrona, signalne putove, proliferaciju i preživljavanje stanica te zbog toga brzo rastuće stanice zahtijevaju više željeza za svoj rast nego stanice u mirovanju (172). Posljedično tome, CD71 je poznat da se izražava u većim količinama na stanicama s visokom stopom proliferacije (172). Stoga, povećana mu je ekspresija u određenim vrstama solidnih tumora, uključujući rak dojke, karcinom bubrežnih stanica, kolangiokarcinom, karcinom skvamoznih stanica jednjaka, rak gušterače i glioblastom te može biti pokazatelj lošije prognoze (171–173). U studijama istraživanja invazivnih oblika RVM nađena je povezanost između CD71 i HPV-a u primarnim tumorima vrata maternice i tumorskim staničnim linijama (171). U ovom istraživanju rezultati bi mogli ukazivati da je ekspresija CD71 regulirana i virusnim ciklusom i da se mijenja pri prijelazu iz produktivne u abortivnu infekciju (72,148,171). Osim toga, budući da je povezan i s prognozom bolesti, u

ovom istraživanju ukazuje da snižena ekspresija možda može biti u određenim stanicama pacijentica kod kojih možda neće doći do progresije bolesti što bi se trebalo dalje istražiti (171–173). Protein LRIG je integralni membranski glikoprotein koji djeluje kao negativni regulator signalizacije receptorskih tirozin kinaza, pospješujući ubikvitinaciju receptora i ubrzanu intracelularnu razgradnju (133). Njegova ekspresija je visoka u pojedinim normalnim tkivima i organima (146,174). U nekim malignim bolestima je pokazao tumor supresorsku ulogu, dok je kod nekih tipova tumora povećane ekspresije (146,174). Kod vrata maternice njegova povišena razina korelirala je s pojavom prekanceroznih lezija dok je njegova smanjena ekspresija u uznapredovalom stadiju RVM značila bolje preživljavanje (146,174). U ovom istraživanju ekspresija LRIG se smanjivala s porastom težine prekancerozne lezije te bi se njegova uloga u procesu tumorigeneze uzrokovane HPV-om trebala još istražiti.

KLF4 je transkripcijski faktor koji može djelovati i kao aktivator i represor (133). Regulira ekspresiju ključnih transkripcijskih čimbenika tijekom embrionalnog razvoja, igra važnu ulogu u održavanju embrionalnih matičnih stanica i njihovom sprječavanju diferencijacije te je uključen i u diferencijaciju epitelnih stanica (133). Ekspresija KLF4 često se gubi kod raznih tipova tumora kod ljudi te je pokazano da ima tumor supresorsku ulogu u kolorektalnom karcinomu, karcinomu skvamoznih stanica jednjaka te raka želuca, crijeva, prostate i mokraćnog mjehura (175). Kod RVM niža ekspresija je bila usko povezana s lošom prognozom (176). Istraživanje autora Yang i Zheng koje je u skladu s dobivenim rezultatima ovog istraživanja pokazalo je da ekspresija proteina KLF4 ima obrazac postupnog smanjenja od normalnog epitela do invazivnog RVM, ukazujući na tumor supresorsku ulogu KLF4 (177).

Prema prethodnim studijama, povećana ekspresija s povećanjem stupnja težinom prekanceroznih lezija očekuje se za proteine stanične proliferacije MCM2 i MMP7 te transmembranski proteinski receptor CD29 (178–181), što se djelomično slaže s ovim istraživanjem koje je pokazalo da postoji obrazac povećane ekspresije s povećanjem težine prekancerozne lezije. MMP7 pripada obitelji cinkovih proteaza koje imaju ključnu ulogu u regulaciji niza staničnih procesa, kao što su remodeliranje matriksa i epitelno-mezenhimalni prijelaz, a u tumorima potiču invaziju i metastaziranje (179). Ekspresija MMP7 je povećana kod raka jajnika, adenokarcinoma želuca, kolorektalnog karcinoma, ali i u kod RVM gdje djeluje kao onkogen i sudjeluje u proliferaciji, migraciji i invaziji malignih stanica (179). U ovom istraživanju, MMP7 je pokazao povećanje ekspresije i imunohistokemijskom metodom, ali ipak sa statistički graničnim vrijednostima. Međutim, iako razlika u ekspresiji nije

statistički značajna, detektiran je u stanicama moguće skvamokolumarne granice, što bi moglo ukazivati na njegovu ulogu u tumorigenezi. MCM2 ima ulogu u inicijaciji replikacije DNA tijekom faze S staničnog ciklusa, povezan je s proliferacijom stanica te detektiran samo u bazalnom sloju epitela vrata maternice (182,183). Povećana ekspresija kod RVM povezana je s proliferacijom, adhezijom stanica i napredovanjem staničnog ciklusa (182,183). Integrin $\beta 1$ (CD29), još je jedan protein obitelji integrina, koji u normalnom epitelu vrata maternice nije jako eksprimiran (181). Ima ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima, regulira rast i diferencijaciju stanica, potiče migraciju stanica, proliferaciju kao i kancerogenezu (181). MMP7, MCM2 i CD29, ako se eksprimiraju u istoj staničnoj populaciji, mogu ukazivati na proliferaciju i invaziju, a to su svojstva tumorskih stanica. Moguće je ta svojstva povezati i sa staničnom populacijom u kojoj se nalaze proteini Ck8, 18 i CD63. Autori Justo i Jasiulionis su otkrili interakciju CD63 receptora s tkivnim inhibitorom matriks metaloproteinaza i $\beta 1$ integrinima što se slaže s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem, odnosno da ovdje nije pronađena istovremena ekspresija MMP7 i CD63 na istim stanicama (168). To bi moglo ukazivati da postoje različite stanice sa sličnim proliferativnim obilježjima koje ili eksprimiraju CD63 ili MMP7 (169,170).

E-kadherin (CD324) je poznati epitelni protein uključen u nastanak adhezijskih veza između stanica, ovisan o kalciju, koji regulira pokretljivost i proliferaciju epitelnih stanica te ima tumor supresorsku ulogu (133). Smanjenje membranske ekspresije ili gubitak molekula stanične adhezije poput E-kadherina je jedno od obilježja epitelno-mezenhimalnog prijelaza koji ima ulogu u invaziji tumora i metastaziranju. tako što oslabljuje adheziju i povećava sposobnost migracije u tumorskim stanicama (184). Gubitak ekspresije E-kadherina povezan je s agresivnijim i manje diferenciranim malignim stanicama, iako se još uvijek ne zna da li je taj gubitak pokretač ili posljedica kod epitelno-mezenhimalnog prijelaza (184). Kod nekih tumora poput raka prostate i glioblastomoma pronađena je visoka ekspresija E-kadherina, ali u obliku topljivog E-kadherina, izvanstaničnog proteolitičkog fragmenta koji se oslobađa kada se membranski vezani E-kadherin cijepa, što ometa adhezijske spojeve i potiče migraciju i proliferaciju tumorskih stanica (185). Međutim, kod tumorskih stanica raka jajnika, povišena ekspresija E-kadherina potiče aktivaciju signalnih puteva poput PKB i MAPK koji su povezani s proliferacijom i preživljavanjem stanica (186). U normalnom epitelu vrata maternice, E-kadherin je eksprimiran na staničnoj membrani bazalnih i parabazalnih stanica, a gubitak membranske lokalizacije i nakupljanje u citoplazmi je pronađeno samo u nekim bazalnim stanicama (187). U CIN-u je utvrđeno da je gubitak funkcionalnog E-kadherina te

posljedično nakupljanje u citoplazmi značajno povezani sa stupnjem lezije CIN-a, s pogoršanjem diferencijacije karcinoma te s metastazama (187). Dodatno, kod raka vrata maternice gubitak ekspresije E-kadherina u membrani, a povećavanje u citoplazmi bilo je povezano s kraćim preživljavanjem pacijentica (184,187,188). U ovom istraživanju je razina ekspresije E-kadherina u citoplazmi korelirala s težinom prekanceroznih promjena kod imunohistokemijskih analiza, iako određeni uzorci CIN-a nisu bili pozitivni. U analizi staničnih populacija masenom citometrijom detektirane su dvije populacije: kod jedne se ekspresija E-kadherina smanjivala s porastom težine lezije, a kod druge je došlo do porasta razmjerno težini lezije, u uzorcima LSIL i HSIL. Ovakvi rezultati upućuju da bi E-kadherin u različitim staničnim populacijama mogao imati i onkogenu i tumor supresorsku ulogu, ali i da bi trebalo ispitati njegovu ulogu u progresiji bolesti, odnosno prognozi pacijentica.

Nanog je ključni transkripcijski faktor uključen u proliferaciju i samoobnavljanje embrionalnih matičnih stanica (133). Smanjenjem njegove ekspresije stanice uključuju programe diferencijacije, a kada je prekomjerno izražen, potiče stanice da uđu u S fazu i proliferaciju (133). p53 djeluje kao tumor supresor u mnogim vrstama tumora i izaziva zaustavljanje rasta ili apoptozu ovisno o fiziološkim okolnostima i tipu stanica (133). Protein HPV E6 sa staničnim proteinima olakšava razgradnju p53 putem proteolitičkog sustava ovisnog o ubikvitinu te poznato je da samo proteini E6 onkogenih tipova HPV-a mogu ciljati ovu razgradnju (142). p53 i Nanog su u ovom istraživanju pokazali sličan obrazac ekspresije kao E-kadherin prilikom detektiranja masenom citometrijom. Studije o proteinima p53 i Nanog su bile prilično kontroverzne ukazujući na ulogu u prognozi bolesti, korelaciju s procesima tumorigeneze i utjecaja HPV, te se može zaključiti da ovi proteini pokazuju različite obrasce ekspresije koji mogu ovisiti o interpretaciji rezultata, metodi, drugih proteinima ili prognostičkim karakteristikama (189–196). Na primjer, studije pokazuju da inaktivacija funkcije p53 tijekom infekcije HPV-om prethodi razvoju tumora s malignim i invazivnim fenotipom i igra važnu ulogu u nastanku RVM. Međutim, to se ne dešava u svakom stupnju CIN lezije, a niti kod svake pacijentice što je slučaj i kod Nanog proteina čime se potvrđuju dobiveni rezultati koji ukazuju da postoje dvije populacije stanica s različitim karakteristikama. Kao i kod E-kadherina, ovakvi rezultati upućuju da ovi proteini možda imaju ulogu u prognozi pacijentica ili progresiji bolesti, odnosno da se uloga u samoj tumorigenezi treba dodatno istražiti (195,197). Međutim, u ovom istraživanju, nažalost, nije bilo moguće longitudinalno pratiti pacijentice te se ne može zaključivati o prognostičkim

ulogama proteina, samo o potencijalnom usmjerenju za daljnja istraživanja, smatrajući ove proteine važnim za daljnja istraživanja u probiru RVM.

Uzimajući u obzir dosadašnje studije i ovo istraživanje s različitim metodama na proteinima koji su većinom ispitivani svaki zasebno te da se rezultati ponekad slažu, a ponekad su kontradiktorni, kao i u ovom istraživanju, moguće objašnjenje može biti i da fenotip, odnosno prisutnost različitih proteina na istim stanicama možda međusobno utječu na ekspresiju i ukazuju bolje na stupanj prekancerozne lezije. To bi moglo ovisiti o interakcijama stanične signalizacije što se vidi i iz primjera ekspresije proteina E-kadherina, p53 i Nanog. Na primjer, E-kadherin se u mogućoj skvamokolumnarj granici zajedno s MMP7 (Ck17+) povisio s težinom prekancerozne lezije, a kada se ekspimirao na stanicama koje imaju nisku ekspresiju MMP7, a visoku ekspresiju KLF4, CD71, LRIG smanjivao se s težinom lezije. Sličan obrazac ekspresije pronađen je i na primjeru detekcije proteina MMP7 i E-kadherina imunohistokemijskom metodom, čija ekspresija međusobno korelira te s težinom prekanceroze što upućuje da se gubitak membranskog E-kadherina te nakupljanje u citoplazmi češće možda događa kada je povišena ekspresija MMP7 ili obrnuto. Ranije je pokazano da postoji povezanost MMP i E-kadherina, odnosno da akumulacija topljivog E-kadherina ometa adherentne spojeve, povećava proliferaciju i migraciju stanica raka, te preživljavanje promicanjem aktivnosti dezintegrina i metaloproteaze (ADAM, eng. *a disintegrin and metalloproteinase*) i matriksnih metaloproteinaza (MMP) što ukazuje da bi možda trebalo istražiti da li postoji povezanost između gubitka membranske funkcije E-kadherina i povišene ekspresije MMP7 kod prekanceroznih lezija RVM (185).

Osvrćući se na usporedbu rezultata imunohistokemijske metode i masene citometrije u kojima se koristi velika količina materijala kliničkog uzorka s imunocitokemijskom metodom u kojoj se obično upotrebljava manji broj stanica, nemogućnost analize velikog broja uzoraka, odnosno nedostatak diskariotičnih stanica u malom ukupnom broju stanica prilikom imunocitokemijske metode u ovom istraživanju nije kontradiktorna (198). Dodatno, navodi literature se slažu s rezultatom ovog istraživanja koji je pokazao da je osjetljivost brisa vrata maternice za pronalazak diskariotičnih stanica jako niska što ukazuju i prethodna istraživanja (55,4%) te ovisi i o količini uzetog staničnog materijala koji je u ovom slučaju podijeljen na više mikroskopskih stakalaca (bojenje po Papanicolau, negativna kontrola, MMP7, E-kadherin, Ck18) i dvije dodatne metode (HPV testiranje i masena citometrija) (153). Stoga, prikazani rezultati više ukazuju na nedosljednost metode i sugeriraju potrebu za pronalaskom novih biomarkera koji su specifičniji za lezije RVM te možda fokusirajući se na utjecaj HPV-

a i prekanceroze na cijeli zaraženi epitel, a ne samo na diskariotične stanice, kao i metoda kojima se može ispitati više proteina odjednom, slično ovom istraživanju (153).

Budući da je i ovim istraživanjem potvrđeno još jednom koliko su studije o proteinima za probir RVM zahtjevne (8,141), može se reći da se odredio fenotip staničnih populacija (povećana ekspresija Ck18, Ck8 i CD63 i smanjena ekspresija CD71, KLF4, LRIG1, E-kadherina, Nanoga i p53) koji obilježava prekancerozne lezije (LSIL, HSIL) i HPV prisutnost u citološkim uzorcima. Odnosno, obrasci ekspresije Citokeratina 8, 17 i 18 te proteina CD63, MCM2, MMP7, CD29, KLF4, CD71, LRIG, E-kadherina, p53 i Nanoga upućuju na promjene u diferenciranosti i diskariozi stanica te na utjecaj HPV-a na prekancerozne lezije epitela vrata maternice. Ovi podaci bi mogli pomoći u razvoju daljnjih dijagnostičkih i prognostičkih metoda u probiru RVM.

Zaključno, osim analize utjecaja proteinskog profila na prekancerozne lezije koje je pokazalo nove spoznaje o proteinima, ovo istraživanje ukazuje na mogućnosti analize seta proteina koji bi mogli biti važni u prognostici i dijagnostici cervikalnih intraepitelnih neoplazija te otvoriti put novim tehnikama i procjenama biomarkera u trijaži prekanceroza RVM. Danas su već u i primjeni biomarkeri koji koriste detekciju seta proteina, npr. p16/Ki-67 i MCM2/TOP2A, korisnih za određivanje lezija manjeg rizika i produživanje praćenja pacijentica na tri godine, čineći ujedno ove rezultate koji su pokazali razlike u ekspresiji proteina u samoj težini prekanceroznim lezija iznimno važnim (108,110). Potvrđujući da se obrasci ekspresije proteina MMP7 i E-kadherina detektirani masenom citometrijom i imunohistokemijskom metodom slažu čine primjenu masene citometrije vrlo kvalitetnom u istraživanjima probira RVM. Stoga, bilo bi potrebno dalje razvijati masenu citometriju na većem broju većem broju uzoraka i na uzorcima invazivnog raka vrata maternice.

Nažalost, u ovom istraživanju treba ukazati i na određene nedostatke. Naime, zbog metodoloških posebnosti masene citometrije, brojne stanice se gube tijekom eksperimentalnog dijela i analize unutar samog citometra (115). Nadalje, teškoće prospektivnog sakupljanja uzoraka te mali broj kliničkih uzoraka koji se pokazao se zadovoljavajućim s obzirom na isključne kriterije u nekim citološkim kategorijama je donekle ograničilo istraživanje. Drugi nedostatak je bilo samo prikupljanje drugog brisa vrata maternice. Naime, ugrožavanje zdravlja i dobrobiti pacijenata te njihove kliničke dijagnoze i liječenja uzimanjem prvog brisa u istraživačke svrhe bilo bi neprikladno, stoga je etička nužnost bila korištenje drugog brisa za istraživanje. Dodatno ograničenje je bilo i dugoročna stabilnost citoloških uzoraka, odnosno moguća degradacija stanica opisana u prijašnjim

istraživanjima na uzorcima tekućinske citologije tijekom nekoliko godina (199). Međutim, rezultati ipak ukazuju na prisutnost višestrukih subpopulacija stanica vrata maternice zadržavajući vjerodostojnost istraživanja. Dodatno, jedno od metodoloških ograničenja je to što ova metoda ne dopušta ispitivanje morfologije stanica, što se obično koristi u analizi takvih uzoraka. Ipak, masena citometrija pokazala se dobrom metodom izbora za istraživanje ekspresije proteina na staničnim populacijama brisa vrata maternice. Naposljetku, nije bilo moguće sustavno dobiti podatke o praćenju za većinu pacijentica, što je onemogućilo primjerenu procjenu longitudinalnog praćenja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata dolazi se do sljedećih zaključaka:

- masena citometrija se pokazala prikladnom metodom za uspješnu analizu proteinskog profila na brisevima vrata maternice pohranjenim u LBC mediju
- ekspresija proteina Citokeratina 5, 7, 8, 10/13, 14, 17, 18 i integrina $\alpha 6$ je omogućila određivanje različitih staničnih slojeva i subpopulacija u epitelu vrata maternice masenom citometrijom
- analiza FlowSOM u sklopu masene citometrije je omogućila fenotipizaciju subpopulacija stanica vrata maternice i pronalazak novih proteina koji bi mogli biti važni u probiru RVM, uzimajući u obzir sve ispitane kliničke uzorke i stanice istovremeno u analizi podataka
- stanice s povećanom ekspresijom Citokeratina 18, Citokeratina 8 i CD63 i smanjenom ekspresijom CD71, KLF4, LRIG1, E-kadherin, Nanog i p53 su bile statistički značajno učestalije kod prekanceroznih lezija (LSIL, HSIL) i normalnog epitela zaraženog HPV-om (NORMAL HPV+) u citološkim uzorcima prilikom analize masenom citometrijom
- proteini Citokeratin 17, MCM2, MMP7 i CD29, detektirani u potencijalnoj skvamokolumnarnoj zoni, su pokazali trend povećanja ekspresije u prekanceroznim lezijama bez statističke značajnosti prilikom analize masenom citometrijom
- sličan obrazac ekspresije proteina MMP7 i E-kadherina dobiven prilikom ispitivanja ekspresije masenom citometrijom detektiran je i imunokemijskim metodama
- obrasci ekspresije proteina dobivenih u ovom istraživanju upućuju na promjene u diferenciranosti i diskariozi stanica te na utjecaj HPV-a na prekancerozne lezije epitela vrata maternice te upućuju na daljnja istraživanja raka vrata maternice.

7. POPIS LITERATURE

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, i ostali. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Izvješće sa simpozija o prevenciji raka vrata maternice. [citirano 26. travanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/izvjescje-sa-simpozija-o-prevenciji-raka-vrata-maternice/>
3. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology-definitions, Criteria and Explanatory Notes. 3. izdanje. Švicarska: Springer International Publishing; 2015.
4. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260–5.
5. Soslow RA, Park KJ, Stolnicu S. Atlas of Diagnostic Pathology of the Cervix: A Case-Based Approach. Švicarska: Springer International Publishing; 2021.
6. Naib, Zuher M. Cytopathology. SAD: Little, Brown and Company; 1996.
7. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, i ostali. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30:F55–70.
8. Pešut E, Đukić A, Lulić L, Skelin J, Šimić I, Milutin Gašperov N, i ostali. Human Papillomaviruses-Associated Cancers: An Update of Current Knowledge. *Viruses.* 2021;13(11):2234.
9. Shambayati B. Cytopathology. Oxford: Oxford University Press; 2011.
10. Prendiville W, Sankaranarayanan R. Colposcopy and treatment of cervical precancer. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
11. Ljubojević N. Dobročudne promjene vrata maternice. U: Ciglar S, Suchanek E (urednici). *Ginekologija.* Zagreb: Naklada Ljevak; 2001.
12. International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer Today- Globocan 2022. [citirano 01. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://gco.iarc.who.int/today/>
13. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Nacionalni dan borbe protiv raka vrata maternice – epidemiološki podaci. [citirano 26. travanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/nacionalni-dan-borbe-protiv-raka-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/>
14. Akram N, Imran M, Noreen M, Ahmed F, Atif M, Fatima Z, i ostali. Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans. *Viral Immunology.* 2017;30(1):20–7.

15. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, i ostali. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health*. 20. 2021;8:552028.
16. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The Estimated Lifetime Probability of Acquiring Human Papillomavirus in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*. 2014;41(11):660–4.
17. Cervical cancer elimination initiative. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Švicarska: World Health Organization; 2020. [citirano 14. veljača 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>
18. Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*. 2013;66(3):207–17.
19. Bosch F, Munoz N, Sanjosé SD. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1997;51(6–7):268–75.
20. Grubišić G, Harni V, Babić D. *Koploskopski atlas*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
21. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4. izdanje. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
22. Stanojević A, Paradžik Pašalić V, Katić K, Haller H, Matković V, Vujić G i ostali. Kliničke smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka vrata maternice. *Liječnički vjesnik*. 2021;143 (11-12), 395-403.
23. Olawaiye AB, Baker TP, Washington MK, Mutch DG. The new (Version 9) American Joint Committee on Cancer tumor, node, metastasis staging for cervical cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(4):287–98.
24. Bhatla N, Berek JS, Cuello Fredes M, Denny LA, Grenman S, Karunaratne K, i ostali. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2019;145(1):129–35.
25. Merz J, Bossart M, Bamberg F, Eisenblaetter M. Revised FIGO Staging for Cervical Cancer - A New Role for MRI. *Rofo*. 2020;192(10):937–44.
26. La D. Cervical intraepithelial neoplasia, *Southern African Journal of Gynaecological Oncology*. 2009; 1:1, 5-8
27. International Gynecologic Cancer Society. Lynette Denny. [citirano 26. travanj 2024.]. Dostupno na: <https://igcs.org/awards/lynette-denny/>

28. Boon SS, Luk HY, Xiao C, Chen Z, Chan PKS. Review of the Standard and Advanced Screening, Staging Systems and Treatment Modalities for Cervical Cancer. *Cancers*. 13. 2022;14(12):2913.
29. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA*. 1989;262(7):931–4.
30. Swailes AL, Hossler CE, Kesterson JP. Pathway to the Papanicolaou smear: The development of cervical cytology in twentieth-century America and implications in the present day. *Gynecologic Oncology*. 2019;154(1):3–7.
31. Tan SY, Tatsumura Y. George Papanicolaou (1883–1962): Discoverer of the Pap smear. *Singapore Med J*. 2015;56(10):586–7.
32. Unim B, Meggiolaro A, Semyonov L, Maffongelli E, La Torre G. Role of pap-test in cervical cancer prevention: a systematic review and meta-analysis: Brigid Unim. *European Journal of Public Health*. 2014;24(suppl_2):cku165-115.
33. Sathawane P, Kamal MM, Deotale PR, Mankar H. Nuances of the Papanicolaou stain. *Cytojournal*. 2022;19:43.
34. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, Khan MYA, Shidham VB. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal*. 2021;18:16.
35. Bulkman NWJ, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MCG, van Kemenade FJ, Rozendaal L, i ostali. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer*. 07. svibanj 2007;96(9):1419–24.
36. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, i ostali. Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *JAMA*. 2001;286(24):3106–14.
37. Van Doorslaer, K. Chen, Z. Bernard, H.U. Chan, P.K.S. DeSalle, R. Dillner, J. Forslund, O. Haga, T. McBride, A.A. Villa, L.L. i sur. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J. Gen. Virol*. 2018;99, 989–990.
38. Papillomaviruses, Peter M.Howley, John T. Schiller, Douglas R.Lowy u knjizi *Fields Virology*, 6. izdanje. David M. Knipe and Peter M. Howley (urednici). Philadelphia, SAD: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
39. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341–4.
40. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27.

41. Yu L, Majerciak V, Zheng ZM. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *IJMS*. 2022;23(9):4943.
42. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, i ostali. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Engl J Med*. 2003;348(6):518–28.
43. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1–17.
44. Sanjose S de, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, i ostali. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*. 2010;11(11):1048–56.
45. Li N, Lam WH, Zhai Y, Cheng J, Cheng E, Zhao Y, i ostali. Structure of the origin recognition complex bound to DNA replication origin. *Nature*. 2018;559(7713):217–22.
46. McBride AA. Chapter 4 Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. U: *Advances in Virus Research*. Amsterdam: Elsevier; 2008. str. 155–205.
47. McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG. Partitioning Viral Genomes in Mitosis: Same Idea, Different Targets. *Cell Cycle*. 2006;5(14):1499–502.
48. Coper PF, Bradley S, Luo Q, Kimple RJ. Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Seminars in Radiation Oncology*. listopad 2021.;31(4):265–73.
49. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbio*. 2012;3
50. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*. 2017;131(17):2201–21.
51. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, i ostali. The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: a Review of Binding and Entry. *J Virol*. 2013;87(11):6062–72.
52. Cerqueira C, Samperio Ventayol P, Vogeley C, Schelhaas M. Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells. *J Virol*. 2015;89(14):7038–52.
53. Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, i ostali. Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002657.

54. DiGiuseppe S, Bienkowska-Haba M, Guion LG, Sapp M. Cruising the cellular highways: How human papillomavirus travels from the surface to the nucleus. *Virus Research*. 2017;231:1–9.
55. Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL, Sapp M. Cyclophilins Facilitate Dissociation of the Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 from the L2/DNA Complex following Virus Entry. *J Virol*. 2012;86(18):9875–87.
56. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017;772:3–12.
57. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *Journal of General Virology*. 2021;102(3).
58. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550–60.
59. McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013;445(1–2):57–79.
60. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013;445(1–2):35–56.
61. Reinson T, Henno L, Toots M, Ustav M, Ustav M. The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0131675.
62. Evande R, Rana A, Biswas-Fiss EE, Biswas SB. Protein–DNA Interactions Regulate Human Papillomavirus DNA Replication, Transcription, and Oncogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):8493.
63. Peh WL, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, i ostali. Life Cycle Heterogeneity in Animal Models of Human Papillomavirus-Associated Disease. *J Virol*. 2002;76(20):10401–16.
64. Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. Human Papillomavirus Type 16 E7 Binds to E2F1 and Activates E2F1-driven Transcription in a Retinoblastoma Protein-independent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(4):2923–30.
65. He W, Staples D, Smith C, Fisher C. Direct Activation of Cyclin-Dependent Kinase 2 by Human Papillomavirus E7. *J Virol*. 2003;77(19):10566–74.
66. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129–36.
67. Tomaić V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers*. 2016;8(10):95.

68. Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM. Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. *J Virol.* 2011;85(16):8080–92.
69. Yajid AI, Zakariah MA, Mat Zin AA, Othman NH. Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review. *APJCP.* 2017;18(2).
70. Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1 ^ E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Associates with Mitochondria. *J Virol.* 2004;78(13):7199–207.
71. Knight GL, Grainger JR, Gallimore PH, Roberts S. Cooperation between Different Forms of the Human Papillomavirus Type 1 E4 Protein To Block Cell Cycle Progression and Cellular DNA Synthesis. *J Virol.* 2004;78(24):13920–33.
72. Anton G, Plesa A, Bleotu C, Botezatu A, Anton M, Irina L, i ostali. Human Papillomaviruses Oncoproteins. U: Siregar Y, urednik. *Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic.* London: InTechOpen; 2013.
73. Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene.* 1997;15(12):1437–44.
74. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology.* 2013;445(1–2):99–114.
75. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain *via* its first hydrophobic domain: HPV-16 E5 and MHC Class I. *Int J Cancer.* 2006;119(9):2105–12.
76. Shen-Gunther J, Cai H, Wang Y. HPV Integration Site Mapping: A Rapid Method of Viral Integration Site (VIS) Analysis and Visualization Using Automated Workflows in CLC Microbial Genomics. *IJMS.* 2022;23(15):8132.
77. Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infect Agents Cancer.* 2016;11(1):59.
78. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Science.* 2007;98(10):1505–11.
79. Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S ichi, Fujita M, Kiyono T. Regulation of Notch1 Gene Expression by p53 in Epithelial Cells. *Molecular and Cellular Biology.* 2007.;27(10):3732–42.
80. Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF. The Human Papillomavirus E6 Oncogene Dysregulates the Cell Cycle and Contributes to Cervical Carcinogenesis through Two Independent Activities. *Cancer Research.* 2007;67(4):1626–35.

81. Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM, Münger K. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(32):11492–7.
82. Gammoh N, Grm HS, Massimi P, Banks L. Regulation of Human Papillomavirus Type 16 E7 Activity through Direct Protein Interaction with the E2 Transcriptional Activator. *J Virol*. 2006;80(4):1787–97.
83. Lin M, Ye M, Zhou J, Wang ZP, Zhu X. Recent Advances on the Molecular Mechanism of Cervical Carcinogenesis Based on Systems Biology Technologies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2019;17:241–50.
84. Amador-Molina A, Hernández-Valencia J, Lamoyi E, Contreras-Paredes A, Lizano M. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses*. 2013;5(11):2624–42.
85. Smola S, Trimble C, Stern PL. Human papillomavirus-driven immune deviation: challenge and novel opportunity for immunotherapy. *Ther Adv Vaccines*. 2017;5(3):69–82.
86. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):515–25.
87. Stanley MA. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):215–22.
88. Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol*. 2019;9:682.
89. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, i ostali. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . *Virology*. 2003;310(1):100–8.
90. Castro-Muñoz LJ, Rocha-Zavaleta L, Lizano M, Ramírez-Alcántara KM, Madrid-Marina V, Manzo-Merino J. Alteration of the IFN-Pathway by Human Papillomavirus Proteins: Antiviral Immune Response Evasion Mechanism. *Biomedicines*. 2022;10(11):2965.
91. Markowitz LE, Schiller JT. Human Papillomavirus Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*. 2021;224(Supplement_4):S367–78.
92. Cheng L, Wang Y, Du J. Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review. *Vaccines*. 2020;8(3):391.
93. Kamolratanakul S, Pitisuttithum P. Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer. *Vaccines*. 2021;9(12):1413.
94. Pešut E, Šimić I, Fureš R, Milutin Gašperov N, Lež C, Feratović F, i ostali. Monitoring HPV Prevalence and Risk Cofactors for Abnormal Cytology in the Post-Vaccination Period among Croatian Women. *Viruses*. 2024;16(4):642.

95. Nguyen-Huu NH, Thilly N, Derrough T, Sdona E, Claudot F, Pulcini C, i ostali. Human papillomavirus vaccination coverage, policies, and practical implementation across Europe. *Vaccine*. 2020;38(6):1315–31.
96. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, i ostali. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health*. 2016;4(7):e453-463.
97. Torres-Poveda K, Piña-Sánchez P, Vallejo-Ruiz V, Lizano M, Cruz-Valdez A, Juárez-Sánchez P, i ostali. Molecular Markers for the Diagnosis of High-Risk Human Papillomavirus Infection and Triage of Human Papillomavirus-Positive Women. *RIC*. 2020;72(4):4102.
98. Cooper DB, Dunton CJ. Colposcopy. 2022 Jul 16. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 33232095.
99. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(5):368–83.
100. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJLM, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. *Vaccine*. 2006;24:S78–89.
101. Grce M. Primary and secondary prevention of cervical cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2009;9(8):851–7.
102. Giorgi Rossi P, Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, Ciccocioppo L, Frega A, i ostali. Prognostic Value of HPV E6/E7 mRNA Assay in Women with Negative Colposcopy or CIN1 Histology Result: A Follow-Up Study. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57600.
103. Macedo ACL, Gonçalves JCN, Bavaresco DV, Grande AJ, Chiaramonte Silva N, Rosa MI. Accuracy of mRNA HPV Tests for Triage of Precursor Lesions and Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Oncology*. 2019;2019:1–14.
104. Luhn P, Wentzensen N. HPV-based Tests for Cervical Cancer Screening and Management of Cervical Disease. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2013;2(2):76–85.
105. Ferreira AR, Ramalho AC, Marques M, Ribeiro D. The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections. *Cancers*. 2020;12(3):646.
106. Poljak M, Valenčak AO, Domjanič GG, Xu L, Arbyn M. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(9):1144–50.

107. Das S, Dey MK, Devireddy R, Gartia MR. Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Sensors (Basel)*. 2023;24(1):37.
108. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of Protein Biomarkers in the Detection of High-Grade Disease in Cervical Cancer Screening Programs. *Journal of Oncology*. 2012;2012:1–11.
109. de Freitas AC, Coimbra EC, Leitão M da CG. Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2014;1845(2):91–103.
110. Wentzensen N, Clarke MA, Bremer R, Poitras N, Tokugawa D, Goldhoff PE, et al. Clinical Evaluation of Human Papillomavirus Screening With p16/Ki-67 Dual Stain Triage in a Large Organized Cervical Cancer Screening Program. *JAMA Intern Med*. 2019;179(7):881.
111. Sahasrabudde VV, Luhn P, Wentzensen N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiology*. 2011;6(9):1083–98.
112. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol*. 2011;12(7):663–72.
113. van Leeuwen RW, Oštrbenk A, Poljak M, van der Zee AGJ, Schuurin E, Wisman GBA. DNA methylation markers as a triage test for identification of cervical lesions in a high risk human papillomavirus positive screening cohort. *Int J Cancer*. 2019;144(4):746–54.
114. Spitzer MH, Nolan GP. Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell*. 2016;165(4):780–91.
115. Matos TR, Liu H, Ritz J. Research Techniques Made Simple: Experimental Methodology for Single-Cell Mass Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(4):e31–8.
116. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, et al. Mass Cytometry: Technique for Real Time Single Cell Multitarget Immunoassay Based on Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81(16):6813–22.
117. Fluidigm Corporation. Cell-ID 20-Plex Pd Barcoding Kit (priručnik). Markham (ON): Fluidigm Canada Inc.;2021.
118. Bjornson ZB, Nolan GP, Fantl WJ. Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):484–94.

119. Zunder ER, Finck R, Behbehani GK, Amir E ad D, Krishnaswamy S, Gonzalez VD, i ostali. Palladium-based Mass-Tag Cell Barcoding with a Doublet-Filtering Scheme and Single Cell Deconvolution Algorithm. *Nat Protoc.* 2015;10(2):316–33.
120. Fluidigm Corporation. Helios, a CyTOF System User Guide (priručnik). 7. izdanje. Markham (ON): Fluidigm Canada Inc.;2018.
121. Le Rochais M, Hemon P, Pers JO, Uguen A. Application of High-Throughput Imaging Mass Cytometry Hyperion in Cancer Research. *Front Immunol.* 2022;13:859414.
122. Vossler JL, Forbes BA, Adelson MD. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus from urine. *J Med Virol.* 1995;45(3):354–60.
123. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, i ostali. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357–61.
124. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82(5):524–31.
125. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol.* 1990;71 (Pt 1):173–81.
126. Soler C, Allibert P, Chardonnet Y, Cros P, Mandrand B, Thivolet J. Detection of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 1991;35(2):143–57.
127. van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990;28(12):2739–43.
128. van den Brule AJ, Snijders PJ, Gordijn RL, Bleker OP, Meijer CJ, Walboomers JM. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer.* 1990;45(4):644–9.
129. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, i ostali. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3176–84.
130. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, i ostali. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12–9.

131. Völkel C, De Wispelaere N, Weidemann S, Gorbokon N, Lennartz M, Luebke AM, i ostali. Cytokeratin 5 and cytokeratin 6 expressions are unconnected in normal and cancerous tissues and have separate diagnostic implications. *Virchows Arch.* 2022;480(2):433–47.
132. Ivanyi D, Groeneveld E, Doornewaard GV, Mooi WJ, Hageman PC. Keratin Subtypes in Carcinomas of the Uterine Cervix: Implications for Histogenesis and Differential Diagnosis. *Cancer Res.* 1990;50(16):5143-52
133. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, i ostali. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
134. Lee H, Lee H, Cho YK. Cytokeratin7 and cytokeratin19 expression in high grade cervical intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma and their possible association in cervical carcinogenesis. *Diagn Pathol.* 2017;12(1):18.
135. Herfs M, Parra-Herran C, Howitt BE, Laury AR, Nucci MR, Feldman S, i ostali. Cervical Squamocolumnar Junction–specific Markers Define Distinct, Clinically Relevant Subsets of Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions. *American Journal of Surgical Pathology.* 2013;37(9):1311–8.
136. Escobar-Hoyos LF, Yang J, Zhu J, Cavallo JA, Zhai H, Burke S, i ostali. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Modern Pathology.* 2014;27(4):621–30.
137. Mockler D, Escobar-Hoyos LF, Akalin A, Romeiser J, Shroyer AL, Shroyer KR. Keratin 17 Is a Prognostic Biomarker in Endocervical Glandular Neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology.* 2017;148(3):264–73.
138. Nair SA, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK, Pillai MR. Increased expression of cytokeratins 14, 18 and 19 correlates with tumor progression in the uterine cervix. *Pathobiology.* 1997;65(2):100–7.
139. Smedts F, Ramaekers F, Lane B, Leigh I, Schijf C, Vooijs P. Keratin Expression in Cervical Cancer. 1992;141(2).
140. Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S. Patterns of Keratin 19 Expression in Normal, Metaplastic, Condylomatous, Atrophic, Dysplastic, and Malignant Cervical Squamous Epithelium. *American Journal of Clinical Pathology.* 1992;98(4):419–23.
141. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in Cervical Cancer Screening. *Disease Markers.* 2007;23(4):315–30.
142. Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(15):8501–6.

143. Kaur G, Balasubramaniam SD, Lee YJ, Balakrishnan V, Oon CE. Minichromosome Maintenance Complex (MCM) Genes Profiling and MCM2 Protein Expression in Cervical Cancer Development. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(10):3043–9.
144. Liu R, Qian M, Zhou T, Cui P. TP53 mediated miR-3647-5p prevents progression of cervical carcinoma by targeting AGR2. *Cancer Med.* 2019;8(13):6095–105.
145. Wang B, Li X, Liu L, Wang M. β -Catenin: oncogenic role and therapeutic target in cervical cancer. *Biol Res.* 2020;53(1):33.
146. Lindström AK, Ekman K, Stendahl U, Tot T, Henriksson R, Hedman H, i ostali. LRIG1 and squamous epithelial uterine cervical cancer: correlation to prognosis, other tumor markers, sex steroid hormones, and smoking. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(2):312–7.
147. Mendoza-Alman, Ortíz-Sánchez E, Rocha-Zavaleta L, Rivas-Santiago C, Esparza-Ibarra E, Olmos J. Cervical cancer stem cells and other leading factors associated with cervical cancer development. *Oncol Lett.* 2019;18(4):3423-3432.
148. Tyagi A, Vishnoi K, Mahata S, Verma G, Srivastava Y, Masaldan S, i ostali. Cervical Cancer Stem Cells Selectively Overexpress HPV Oncoprotein E6 that Controls Stemness and Self-Renewal through Upregulation of HES1. *Clinical Cancer Research.* 2016;22(16):4170–84.
149. Martens JE, Arends J. Cytokeratin 17 and p63 are Markers of the HPV Target Cell, the Cervical Stem Cell. *Anticancer Res.* 2004;24(2B):771-5.
150. Sharma A, Kaur H, De R, Srinivasan R, Pal A, Bhattacharyya S. Knockdown of E-cadherin induces cancer stem-cell-like phenotype and drug resistance in cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol.* 2021;99(5):587-595.
151. Liu C, Wang R. The Roles of Hedgehog Signaling Pathway in Radioresistance of Cervical Cancer. *Dose-Response.* 2019;17(4):155932581988529.
152. Zhou H, Wang F, Tao P. t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) Method with the Least Information Loss for Macromolecular Simulations. *J Chem Theory Comput.* 2018;14(11):5499–510.
153. Mayrand MH, Hanley J, Franco EL. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;18;357(16):1579-88.
154. Guo L, Hua K. Cervical Cancer: Emerging Immune Landscape and Treatment. *OTT.* 2020;13:8037–47.
155. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Cijepljenje protiv humanog papiloma virusa (HPV). [citirano 26. travanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/cijepljenje-protiv-humanog-papiloma-virusa-hpv/#h7>

156. Sabol I, Milutin Gašperov N, Matovina M, Božinović K, Grubišić G, Fistončić I, i ostali. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0180480.
157. Grce M, Husnjak K, Božikov J, Magdic L, Zlacki M, Lukac J, i ostali. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res*. 2001;21(1B):579–84.
158. Milutin-Gašperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. *Collegium Antropol*. 2007;31:89–96.
159. Kaliterna V, Kaliterna M, Pejković L, Drmić Hofman I, Anđelinović Š. Prevalence and Genotyping of the Human Papillomavirus in the Cervical Specimens among Women of Southern Croatia (Dalmatia County). *Cent Eur J Public Health*. 2013;21(1):26–9.
160. Kaliterna V, Kaliterna P, Pejkovic L, Vulic R, Zanchi L, Cerskov K. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) among Females in the General Population of the Split and Dalmatia County and Its Association with Genital Microbiota and Infections: A Prospective Study. *Viruses*. 2023;15(2):443.
161. Khademi R, Malekzadeh H, Bahrami S, Saki N, Khademi R, Villa-Diaz LG. Regulation and Functions of α 6-Integrin (CD49f) in Cancer Biology. *Cancers (Basel)*. 2023;15(13):3466.
162. Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin α 6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells Dev*. 2017;26(15):1090–9.
163. Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñiz-Hernández S, i ostali. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*. 2016;7(22):31943–54.
164. López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*. 2012;12:48.
165. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. α 6(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(3):668–73.
166. Bundela DA, Bundela DA, Vahikar DSU, Srivastava DK, Goyal DAK. Comparative study of expression of keratins 8, 10, 13 and 17 in CIN III and invasive carcinoma of cervix. *Trop J Pathol Microbiol*. 2019;5(5):309–16.

167. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, *et al.*
Regeneration of cervical reserve cell-like cells from human induced pluripotent stem cells (iPSCs): A new approach to finding targets for cervical cancer stem cell treatment. *Oncotarget*. 2017;8(25):40935–45.
168. Justo BL, Jasiulionis MG. Characteristics of TIMP1, CD63, and β 1-Integrin and the Functional Impact of Their Interaction in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(17):9319.
169. Dey S, Basu S, Ranjan A. Revisiting the Role of CD63 as Pro-Tumorigenic or Anti-Tumorigenic Tetraspanin in Cancers and its Theragnostic Implications. *Adv Biol (Weinh)*. 2023;7(7):e2300078.
170. Koh HM, Jang BG, Kim DC. Prognostic Value of CD63 Expression in Solid Tumors: A Meta-analysis of the Literature. *In Vivo*. 2020;34(5):2209–15.
171. Leung THY, Tang HWM, Siu MKY, Chan DW, Chan KKL, Cheung ANY, *et al.*
CD71+ Population Enriched by HPV-E6 Protein Promotes Cancer Aggressiveness and Radioresistance in Cervical Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*. 2019;17(9):1867–80.
172. Habashy HO, Powe DG, Staka CM, Rakha EA, Ball G, Green AR, *et al.* Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(2):283–93.
173. Hagag AA, Badraia IM, Abdelmageed MM, Hablas NM, Hazzaa SME, Nosair NA.
Prognostic Value of Transferrin Receptor-1 (CD71) Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(6):610–7.
174. Lindström AK, Asplund A, Hellberg D. Correlation between LRIG1 and LRIG2 expressions and expression of 11 tumor markers, with special reference to tumor suppressors, in CIN and normal cervical epithelium. *Gynecol Oncol*. 2011;122(2):372–6.
175. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*. 2017;611:27–37.
176. Dai F, Chen G, Wang Y, Zhang L, Long Y, Yuan M, *et al.* Identification of candidate biomarkers correlated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer via integrated bioinformatics analysis. *OTT*. 2019;Volume 12:4517–32.
177. Yang WT, Zheng PS. Krüppel-like factor 4 functions as a tumor suppressor in cervical carcinoma. *Cancer*. 2012;118(15):3691–702.
178. Conesa-Zamora P. Role of Cell Cycle Biomarkers in Human Papillomavirus Related Uterine Lesions. *Curr Pharm Des*. 2013;19(8):1412-24.

179. Zhu L, Zheng X, Du Y, Xing Y, Xu K, Cui L. Matrix metalloproteinase-7 may serve as a novel biomarker for cervical cancer. *OTT*. 2018;Volume 11:4207–20.
180. Schettino MT, Preti EP, Vietri V, Agrillo N, Iavazzo N, Fasulo DD, i ostali. The Role of β 1 Integrin/CD29 as a Potential Prognostic Factor for the Risk of Progression to Cervical Carcinoma in HPV-Associated Lesions. *Medicina (Kaunas)*. 2024;60(3):364.
181. Zhan P, Liu L, Liu B, Mao XG. Expression of integrin β 1 and its significance in squamous cell carcinoma of the cervix. *Molecular Medicine Reports*. 2014;9(6):2473–8.
182. Del Moral-Hernández O, Hernández-Sotelo D, Alarcón-Romero L del C, Mendoza-Catalán MA, Flores-Alfaro E, Castro-Coronel Y, i ostali. TOP2A/MCM2, p16INK4a, and cyclin E1 expression in liquid-based cytology: a biomarkers panel for progression risk of cervical premalignant lesions. *BMC Cancer*. 2021;21(1):39.
183. Lu X, Song X, Hao X, Liu X, Zhang X, Yuan N, i ostali. MicroRNA-186-3p attenuates tumorigenesis of cervical cancer by targeting MCM2. *Oncology Letters*. 2021;22(1):1–12.
184. Jiang J, Li X, Yin X, Zhang J, Shi B. Association of low expression of E-cadherin and β -catenin with the progression of early stage human squamous cervical cancer. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5729-5739
185. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, i ostali. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019;8(10):1118.
186. Reddy P, Liu L, Ren C, Lindgren P, Boman K, Shen Y, i ostali. Formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion activates AKT and mitogen activated protein kinase via phosphatidylinositol 3 kinase and ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2005;19(10):2564–78.
187. Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, i ostali. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1995;176(2):151–9.
188. Zacapala-Gómez AE, Navarro-Tito N, Alarcón-Romero L del C, Ortuño-Pineda C, Illades-Aguilar B, Castañeda-Saucedo E, i ostali. Ezrin and E-cadherin expression profile in cervical cytology: a prognostic marker for tumor progression in cervical cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):349.
189. Freier CP, Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, i ostali. Immunohistochemical Evaluation of the Role of p53 Mutation in Cervical Cancer: Ser-20 p53-Mutant Correlates with Better Prognosis. *Anticancer Res*. 2016;36(6):3131–7.

190. Bremer GL, Tieboschb ATMG, van der Putten HWHM, de Haan J, Arends JW. p53 tumor suppressor gene protein expression in cervical cancer: relationship to prognosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1995;63(1):55–9.
191. Zhou R, Wei C, Liu J, Luo Y, Tang W. The prognostic value of p53 expression for patients with cervical cancer: a meta analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2015;195:210–3.
192. Hanprasertpong J, Tungsinmunkong K, Chichareon S, Wootipoom V, Geater A, Buhachat R, i ostali. Correlation of p53 and Ki-67 (MIB-1) expressions with clinicopathological features and prognosis of early stage cervical squamous cell carcinomas: p53 and Ki-67 in cervical squamous cell cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2010;36(3):572–80.
193. Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J. p53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol*. 1996;49(12):971–4.
194. Gu TT, Liu SY, Zheng PS. Cytoplasmic NANOG-Positive Stromal Cells Promote Human Cervical Cancer Progression. *The American Journal of Pathology*. 2012;181(2):652–61.
195. Kim B, Conway C, Kris Y, Hewitt S, Cho H, Kim J. Influence of Nanog expression on prognosis of cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2012;125:S62.
196. Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Ocadiz-Delgado R, García-Villa E, Bonilla-Delgado J, Lagunas-Martínez A, i ostali. The HPV16 E7 oncoprotein increases the expression of Oct3/4 and stemness-related genes and augments cell self-renewal. *Virology*. 2016;499:230–42.
197. Akasofu M, Oda Y. Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Vichows Archiv A Pathol Anat*. 1995;425(6):593–602.
198. Pangarkar MA. The Bethesda System for reporting cervical cytology. *Cytojournal*. 2022;19:28.
199. Castle PE, Solomon D, Hildesheim A, Herrero R, Concepcion Bratti M, Sherman ME, i ostali. Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer Cytopathology*. 2003;99(2):89–96.

8. ŽIVOTOPIS

Ena Pešut, mag.med.lab.diagn., rođena je u Slavonskom Brodu 25.5.1996. godine. Pohađala je Gimnaziju Matija Mesić u Slavonskom Brodu te nakon toga završila preddiplomski i diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Tijekom studija je pohađala razne studentske kongrese i radionice te je izradila završni i diplomski rad u suradnji s mentoricom doc.dr.sc. Katarina Mišković Špoljarić u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju. Dobitnica je stipendije za darovite studente Brodsko-posavske županije. Svoje slobodno vrijeme posvetila je studentskoj udruzi AIESEC te je sudjelovala mjesec dana u AIESEC Global Volunteer projektu u Rumunjskoj (Bukurešt i Braşov) - Discover Camps te pri tome volontirala u Inaction - English in action summer camp i sirotištima. Nakon toga se zaposlila kao znanstveni novak u Laboratoriju za molekularnu virologiju i bakteriologiju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, zaposlena na projektu „Razvoja karijera mladih istraživača-izobrazba novih doktora znanosti“, odnosno projektu „*Multifactor analysis of HPV infected cells in cervical cancer development*“ Hrvatske zaklade za znanost; voditelj projekta i mentor dr.sc. Ivan Sabol. Pohađa Poslijediplomski doktorski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Znanstveno se usavršavala u CLIP laboratoriju za citometriju Zavoda za dječju hematologiju i onkologiju Drugog Medicinskog fakulteta u Pragu u Češkoj. Doktorski studij joj je ujedno i omogućio pohađanje raznih tečajeva, radionica, kongresa te objavljivanje znanstvenih publikacija i sudjelovanje u organizaciji novih simpozija. Ujedno je i članica Hrvatskog društva za istraživanje raka, Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Češkog društva za analitičku citometriju, Hrvatske udruge laboratorijske medicine te Društva magistara medicinsko-laboratorijske dijagnostike.

Kao autor ili koautor objavila je četiri originalna znanstvena rada i jedan pregledni rad:

1. Lulić L, Šimić I, Božinović K, **Pešut E**, Manojlović L, Grce M, Dediol E, Sabol I, Tomaić V. Moderate SCRB Expression Levels Correlate with Worse Prognosis in OPSCC Patients Regardless of HPV Status. *Cells*. 2024; 13(12):1002.
<https://doi.org/10.3390/cells13121002>
2. **Pešut E**, Šimić I, Fureš R, Milutin Gašperov N, Lež C, Feratović F, Kukina Žvigać T, Grce M, Erceg Ivkošić I, Sabol I. Monitoring HPV Prevalence and Risk Cofactors for

- Abnormal Cytology in the Post-Vaccination Period among Croatian Women. *Viruses* 2024, 16, 642. <https://doi.org/10.3390/v16040642>
3. Šimić I, Božinović K, Milutin Gašperov N, Kordić M, **Pešut E**, Manojlović L, Grce M, Dediol E, Sabol I (2023) Head and Neck Cancer Patients' Survival According to HPV Status, miRNA Profiling, and Tumour Features—A Cohort Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(4):3344. <https://doi.org/10.3390/ijms24043344>
 4. Mišković Špoljarić K, Šelo G, **Pešut E**, Martinović J, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A (2023) Antioxidant and antiproliferative potentials of phenolic-rich extracts from biotransformed grape pomace in colorectal Cancer. *BMC Complement Med Ther*. 23(29) <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03852-w>
 5. **Pešut E**, Đukić A, Lulić L, Skelin J, Šimić I, Milutin Gašperov N, Tomaić V, Sabol I, Grce M B (2021) Human Papillomaviruses-Associated Cancers: An Update of Current Knowledge. *Viruses*. 13(11):2234. <https://doi.org/10.3390/v13112234>

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Šimić I, **Pešut E**, Milutin Gašperov N, Erceg Ivkošić I, Fureš R, Sabol I, Malinac S, Gredičak M, Pezić M, Jakopović MM, i sur. HPV distribution among Croatian women in the post-vaccination period // Book of abstracts: 2nd Conference on COMPREHENSIVE WOMEN'S HEALTH & WELL-BEING / Pula: 2023. str. 26-27 (sažetak izlaganja sa skupa)
2. **Pešut E**, Šimić I, Fureš R, Erceg Ivkošić I, Milutin Gašperov N, Sabol I. Primjena masene citometrije u detekciji biomarkera u prekanceroznim lezijama vrata maternice // Knjiga sažetaka: 5. Kongres Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost Hrvatske komore zdravstvenih radnika / Zagreb: Hrvatska Komora Zdravstvenih Radnika, 2023 (sažetak izlaganja sa skupa)
3. **Pešut E**, Šimić I, Erceg Ivkošić I, Fureš R, Sabol I (2022) Analysis of HPV infected cells using different biomarkers by mass cytometry // Book of abstracts: 1st Biomedicine and Health PhD Students Congress with International Participation Science and Us / Šutić Udovičić, I ; Knežević, M ; Viduka, I. (ur.). Rijeka: Faculty of Medicine, University of Rijeka, str. 64-64.
4. Šimić I, **Pešut E**, Milutin Gašperov N, Fureš R, Erceg Ivkošić I, Malinac Malojčić S, Gredičak M, Pezić M, Jakopović MM, Feratović F, Grce M, Sabol I (2022) Mass cytometry in gynecological oncology research // Book of Abstracts of

Multidisciplinary Conference on Comprehensive Women's Health and Well-Being. Poreč, Hrvatska, str. 10-11.

5. **Pešut E**, Šimić I, Ivkošić Erceg I, Fureš R, Sabol I (2022) Razvoj nove metode masene citometrije u prekanceroznom cervikalnom probiru // 6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium : book of abstracts / Schneider, Petra (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu / Faculty of Science, University of Zagreb, Croatia, str. 220-221.
6. Milutin Gašperov N, Fureš R, Erceg Ivkošić I, Malinac Malojčić S, **Pešut E**, Šimić I, Gredičak M, Jakopović MM, Feratović F, Sabol I, Grce M (2021) Human Papillomaviruses in Cervical Cancer: Biomarkers in Clinical Practice and Research // III. Kongres Hrvatskog društva za pelviperineologiju s međunarodnim sudjelovanjem i II. Poslijediplomski tečaj zdjelične medicine : knjiga sažetaka / Hrvatsko društvo za pelviperineologiju (ur.). Poreč, Hrvatska, str. 26-26.
7. **Pešut E**, Šimić I, Ivkošić Erceg I, Fureš R, Sabol I (2021) Flow and mass cytometry assessment of cervical precancerous lesions: preliminary study // Book of abstracts of the 11th International Conference Analytical Cytometry / AMCA, spol. s r.o. (ur.). Ostrava, Češka Republika, str. 28-28
8. **Pešut E**, Ivkošić Erceg I, Fureš R, Sabol I (2021) U potrazi za novim biomarkerima rada vrata maternice // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = PhD student symposium 2021 : book of abstracts / Barišić, Dajana (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 231-232
9. **Pešut Ena**, Mišković Špoljarić K (2019) Effect of a grape polyphenols on a cell cycle of a tumor cell lines in vitro // Abstract book: 1st International translation medicine congress of students and young physicians / Pušeljić, Nora (ur.). Osijek: Student Council Faculty of Medicine Osijek, str. 74-74
10. Mišković Špoljarić K, **Pešut E**, Šelo G, Bucić-Kojić A (2018) Biološka aktivnost ekstrakata tropa grožđa in vitro // Book of abstracts : 17th Ružička days "Today science - tomorrow industry / Tomas Srećko, Ačkar Đurđica (ur.). Osijek, str. 97-97.

Završeni tečajevi i radionice:

1. Festival znanosti. Virus i cjepiva. (Tehnički muzej Nikola Tesla, 24.-29.4.2023).

2. 1st Vienna ISAC Cytometry Workshop. (Medical University of Vienna, 2.9.2022.-4.9.2022.). Radionica protočne i masene citometrije, analiza podataka raznih programima.
3. Upravljanje karijerom (mladih) znanstvenika. (Zagreb, 2022.).
4. Upoznavanje sa sintaksom jezika R i njegova primjena u osnovnoj statističkoj i grafičkoj analizi podataka (S721) (Zagreb, 21.02.2022.-01.03.2022.). Tečaj Sveučilišta u Zagrebu, Sveučilišni računski centar.
5. PowerPointiranje ili kako izraditi moćne prezentacije (R301) (17.11.2021). Tečaj Sveučilišta u Zagrebu, Sveučilišni računski centar.
6. Winter School Innovation Leaders in BioMed & Health 2021. (Zagreb, 15.11.2021.-23.11.2021.). Radionica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Centra za istraživanje, razvoj i transfer tehnologije.
7. Creating a Publication-Ready Manuscript. (Zagreb, 2021.). Radionica pisanja znanstvene publikacije.
8. Upravljanje stresom, Mobbing. (Zagreb, 2021.).
9. Education Workshop Better Skills For Better Jobs: Excellent Lab Book For An Excellent Career (composed of the theoretical and practical part) (Zagreb, 17.12.2020.-18.12.2020.). Radionica Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju HDBMB.
10. Step by step Guide on How to prepare a successful paper-Croatia. (Zagreb, 2020.). Radionica pisanja znanstvenog rada

PRILOG A

Popis kratica

ACIP -eng. *Advisory Committee on Immunization Practices*, Savjetodavni odbor za praksu cijepljenja

ADAM, eng. *a disintegrin and metalloproteinase*, dezintegrin i metaloproteaze

AGR2 -eng. *Anterior gradient homolog 2*, anteriorni gradijentni homolog 2

APC -eng. *Antigen-presenting cells*, stanice koje prezentiraju antigen

ASC -eng. *Atypical Squamous Cells*, atipične skvamozne stanice

ASC-H -eng. *Atypical Squamous Cells-HSIL cannot be excluded*, atipične skvamozne stanice-
HSIL se ne može isključiti

ASC-US, eng. *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*, atipične skvamozne stanice neodređenog značaja

ATP -adenozin trifosfat

Bcl2 -eng. *B-cell lymphoma 2*

bp -eng. *base pairs*, parova baza

CD29 -eng. *Cluster of differentiation 29*, klaster diferencijacije, integrin $\beta 1$)

CD324 -eng. *Cluster of differentiation 324*, klaster diferencijacije, E-kadherin

CD49f -eng. *Cluster of differentiation 49f*, klaster diferencijacije, ITGA6, integrin $\alpha 6$)

CD71 eng. *Cluster of differentiation 71*, klaster diferencijacije

CD63 -eng. *Cluster of differentiation 63*, klaster diferencijacije

CDK2 -eng. *Cyclin-dependent kinase 2*, kinaza ovisnih o ciklinu 2

CI -eng. *Confidence interval*, interval pouzdanosti

CIN -cervikalna intraepitelna neoplazija

CIS - eng. *Carcinoma in situ*, karcinom in situ

Ck -citokeratin

CLIP -eng. *Childhood Leukaemia Investigation Prague*

CSCs -eng. *Cancer Stem Cells*, matične stanice raka

CytoF -eng. *Cytometry by Time-Of-Flight*

c-Myc p67 -eng. *Cellular myelocytomatosis oncogene*

DNA -eng. *deoxyribonucleic acid*, dvolančana deoksiribonukleinska kiselina

E -eng. *Early*, rane

EGFR- eng. *Epidermal growth factor receptor*, receptor za epidermalni faktor rasta

EPB41L3 -eng. *Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3*

ERK 1/2 -eng. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*, kinaza regulirana izvanstaničnim signalom 1/2

E6AP -eng. *E6-associated protein*, protein povezan s E6

FAK/PTK2 -eng. *Focal adhesion kinase/Protein tyrosine kinase 2*

FIGO -eng. *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique*, Međunarodna organizacija za ginekologiju i porodništvo

FCS -eng. *Flow Cytometry Standard*

GLI1 -eng. *GLI family zinc finger protein 1*

HIV -eng. *Human immunodeficiency virus*, virus ljudske imunodeficijencije

HPV -eng. *Human papillomavirus*, ljudski papiloma virus

HR -eng. *High-risk*, visokorizični

HSIL -eng. *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*, skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja

HSV -eng. *Herpes simplex virus*, Herpes simpleks virus

IARC -eng. *International Agency for Research on Cancer*, Međunarodna agencija za istraživanje raka

ICP - eng. *Inductively Coupled Plasma*, induktivno spregnuta plazme

IFN- α -eng. *Interferon alpha*, interferon- α

IMC -eng. *Imaging Mass Cytometry*

IQR -eng. *Interquartile range*, interkvartilni raspon

JAM3 -eng. *Junctional adhesion molecule 3*

Ki-67 -eng. *Marker of proliferation Kiel 67*, proliferacijski marker Kiel 67

KRAS -eng. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, Kirsten rat homolog virusnog onkogeno sarkoma

KLF4 -eng. *Krüppel-like factor 4*

L -eng. *Late*, kasne, kapsidne

LBC -eng. *Liquid based cytology*, medij za tekućinsku citologiju

LCR -eng. *Long control region*, duga kontrolna regija

LRIG1 -eng. *Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1*

LSIL -eng. *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*, skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja

MAPK -eng. *Mitogen-activated protein kinase*, mitogenom aktivirana protein kinaza

MCM7 -eng. *Mini-chromosome maintenance proteins 7*, mini-kromosoms ki protein održavanja 7

MHC -eng. *Major histocompatibility complex*, glavni kompleks histokompatibilnosti

MMP7 -eng. *Matrix metalloproteinase 7*, matriks metaloproteinaza 7

mRNA -eng. *Messenger ribonucleic acid*, glasnička ribonukleinska kiselina

miRNA -eng. *microRNA*, mikro RNA

ND10 -eng. *Nuclear domain 10*, jezgrina domena

NF- κ B -eng. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, nuklearni faktor κ B

NK cells, eng. *Natural killer cells*, prirodne stanice ubojice

Notch1 -eng. *Neurogenic locus notch homolog protein 1*

OCT3/4 -eng. *Octamer-binding transcription factor 3/4*

Ori - eng. *Origin of replication*, mjesto početka replikacije

ORF -eng. *Open reading frame*, otvoreni okvir čitanja

PBS -eng. *Phosphat buffer saline*, puferirana otopina fosfatnih soli

PCR -eng. *Polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PI -propidijum jodid

PIK3CA -eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, fosfatidilinozitol 3-kinaza

PI3K -eng. *Phosphoinositide 3-kinases*, fosfatidilinozitol 3-kinaza katalitičkoj podjedinici α fosfatidilinozitol 3-kinaze

PKB -eng. *Protein kinase b*, protein kinaza b

p -protein, na primjer p53, protein 53

pRb - retinoblastoma protein

p16INK4-eng. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, protein poznat po nazivu CDKN2A, inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A

RH -Republika Hrvatska

rpm -eng. *Revolutions per minute*

RVM -rak vrata maternice

SAD -Sjedinjene Američke Države

SIL -skvamozna intraepitelna lezija

SRY-box2 -SOX2, eng. *Sex determining region Y-box 2*

SSC -eng. *Side scatter*, mjera zrnatosti stanica

SZO -Svjetska Zdravstvena Organizacija, WHO -eng. *World Health Organization*

TCEP -eng. *Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride*, tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorid

TLR -eng. *Toll-like receptor*

TOP2 -topoizomeraza 2

TOF -eng. *Time Of Flight*, analizator mase

TNFR1 -eng. *Tumor necrosis factor receptor 1*, receptor čimbenika tumorske nekroze 1

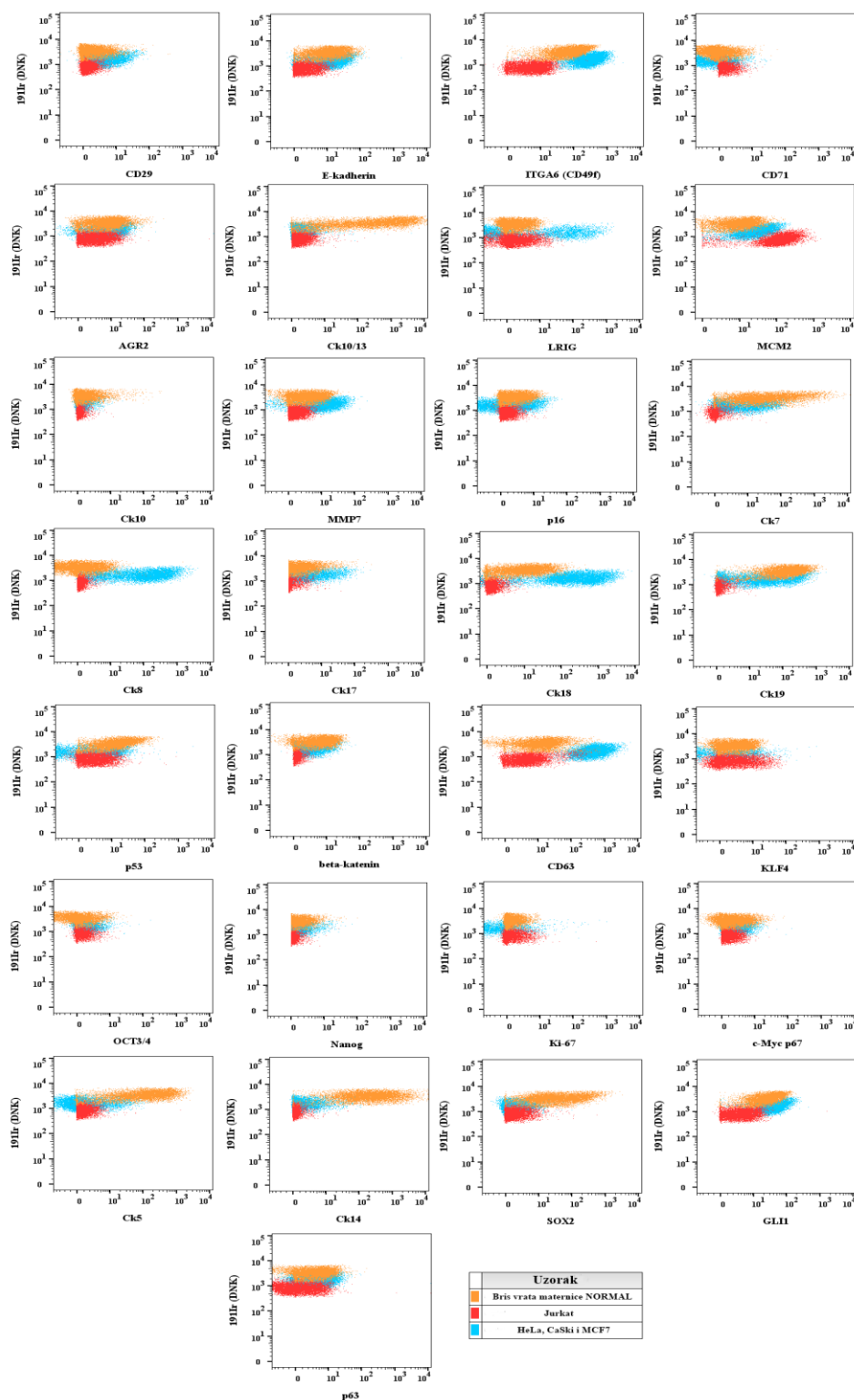
tSNE -eng. t-distributed stochastic neighbor embedding

URR -eng. *Upstream regulatory region*, uzvodno regulatorno područje

UV -eng. *Ultraviolet*, ultraljubičasto zračenje

VLP -eng. *Virus-like particle*, čestice slične virusu

PRILOG B



Prikaz ekspresije 29 proteina u svakoj staničnoj liniji (HeLa, CaSki, MCF7, Jurkat) i kliničkom uzorku brisa vrata maternice citološke kategorije NORMAL koristeći točkasti dijagram (eng. *Dot plot*).