



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Медицински факултет

Д-р Вјоса Зејнулаху

**ПОВРЗАНОСТ НА ЕКСПРЕСИЈАТА НА ГЕНОТ ЗА
ТЕЛОМЕРАЗА СО ЦЕРВИКАЛНИОТ КАРЦИНОМ И
НЕГОВИТЕ ПРЕКУРЗОРНИ ЛЕЗИИ ПРИ ИНФЕКЦИЈА
СО ХУМАН ПАПИЛОМА ВИРУС**

Докторска дисертација

Скопје, 2018

Докторската дисертација ја посветувам на моите родители на кои сум им бескрајно благодарна за нивната огромна инспиративна интелектуална и емоционална поддршка, охрабрување и безрезервна љубов.

На мојот син Јон, мојот најголем дар и најголемо постигнување во животот.

Му се заблагодарувам на проф. Сашо Панов, мојот ментор и супервизор, за неговата континуирана поддршка во истражувањето, едукацијата, насоките, кооперативните погледи, конструктивните критики и ентузијастичкото охрабрување во текот на истражувањето.

Голема благодарност и до мојот коментор проф. д-р Мирвете Пачарада за нејзината професионална и практична поддршка во текот на изработката на тезата.

Посебна благодарност до моите колеги од Институтот за молекуларна биологија и генетика во Скопје за нивното пријателство, колегијалност и придонес во текот на истражувањето.

„Ова е твој пат, и само твој, другите може да одат со тебе по него, но никој не може да го изоди наместо тебе.“

Руми

Содржина

ABSTRACT/ИЗВАДОК	V
ЛИСТА НА АКРОНИМИ И КРАТЕНКИ	IX
1. ВОВЕД	
2. ИСТОРИЈАТ/ИСТОРИСКИ ПОДАТОЦИ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.1. ГРЛО НА МАТКА И СКВАМОЗНО-ЦИЛИНДРИЧЕН СПОЈ	3
2.2. ЦЕРВИКАЛНА БОЛЕСТ И НЕОПЛАЗМИ	4
2.3. ЦЕРВИКАЛНИ ПРЕКУРЗОРНИ ЛЕЗИИ	13
2.3.2. СКРИНИНГ	15
2.3.3. НРV ТЕСТИРАЊЕ КАКО ПРИМАРЕН СКРИНИНГ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.3.4. ПРОЦЕДУРИ НА ТРЕТМАН НА ЦЕРВИКАЛНИ ПРЕКУРЗОРНИ ЛЕЗИИ	22
2.3.5. СЛЕДЕЊЕ ПО ТРЕТМАН	23
2.4. ХУМАН ПАПИЛОМА ВИРУСИ (HPV)	23
2.4.2. НРV ГЕНОМСКА ОРГАНИЗАЦИЈА	25
2.4.3. РАНИ ГЕНИ E1, E2, E4-E7	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.4.4. ДОЦНИ ПРОТЕИНИ L1/L2	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.4.5. ЖИВОТЕН ЦИКЛУС НА НРV	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.4.6. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ИНФЕКЦИЈА СО НРV И НЕЈЗИНАТА УЛОГА ВО МАЛИГНА ТРАНСФОРМАЦИЈА	31
2.4.7. ИМУН ОДГОВОР НА ДОМАЌИНОТ И НРV ИНФЕКЦИЈА	32
2.5. МЕХАНИЗАМ НА ОДБЕГНУВАЊЕ НА НРV	33
2.5.1. НРV ВАКЦИНИ	36
2.6. СТРУКТУРА НА ТЕЛОМЕРАЗА	37
2.6.1. АКТИВНОСТ НА ТЕЛОМЕРАЗА И МАЛИГНА ТРАНСФОРМАЦИЈА	39
3. МОТИВ ЗА ИСТРАЖУВАЊЕТО	45
4. ХИПОТЕЗА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	45
5. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	45
5.1. СПЕЦИФИЧНИ ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	46
6. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ	47
6.1. ЕТИЧКИ ПРИНЦИПИ	47
6.1.1. КРИТЕРИУМИ ЗА ВКЛУЧУВАЊЕ И НЕВКЛУЧУВАЊЕ ВО СТУДИЈАТА	47
6.1.2. ПРЕДУСЛОВИ ЗА СКРИНИНГ	48
6.1.3. ПОПУЛАЦИЈА	48
6.1.4. КАРАКТЕРИСТИКИ НА КОНТРОЛНАТА ГРУПА	48
6.1.5. СОБИРАЊЕ НА ПОДАТОЦИТЕ	49
6.2. МОЛЕКУЛАРНИ АНАЛИЗИ	49

6.2.1. ИЗОЛАЦИЈА НА DNA И RNA	49
6.2.2. НРV ДЕТЕКЦИЈА И ГЕНОТИПИЗАЦИЈА	49
6.2.3. КВАНТИТАТИВНА РСР ВО РЕАЛНО ВРЕМЕ ЗА ЕКСПРЕСИЈА НА ГЕНОТ ТЕЛОМЕРАЗА	51
6.3. СТАТИСТИЧКИ АНАЛИЗИ	53
7. РЕЗУЛТАТИ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
8. ДИСКУСИЈА	
9. ЗАКЛУЧОЦИ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
10. РЕФЕРЕНЦИ	97

АПСТРАКТ

Кус вовед: Ракот на грлото на матката е заболување кое поради својата природа може да се спречи, но и понатаму останува една од водечките причини за смртност од карцином на глобално ниво со највисока стапка на инциденција и морталитет во нискоразвиените земји. Инфекцијата со хуманиот папилома вирус (HPV) е несомнено главна причина за појава на цервикален карцином и неговите прекурзорни лезии со различна преваленција на генотиповите во зависност од возраста на пациентот, етничката припадност, расата, сериозноста/тежината на прекурзорните цервикални лезии и географскиот регион. Раните/првите случувања/настани поврзани со прогресија на болеста и цервикален карцином ја вклучуваат зголемената регулација на *hTERT* на ниво на транскрипција, коешто е посредувано од високоризичните HPV Еб онкопротеини преку недефинирани механизми со истовремен бесмртен фенотип на клетки *in vitro* и зголемен репликациски потенцијал на клетките во преканцерозните лезии и цервикалниот карцином.

Цели: Целта на оваа студија беше да се оцени фреквенцијата на HPV инфекцијата и генотипот кај жени со нормални и абнормални цитолошки резултати и неговата поврзаност според сериозноста на лезиите, како и да се анализира поврзаноста помеѓу нивоата на експресија на генот *TERT* и цитолошките подгрупи и да се оцени поврзноста на инфекцијата со HPV и нивоата на експресија на генот *TERT* како дијагностички и прогностички маркер кај цервикалните прекурзорни лезии и цервикалниот карцином.

Материјали и методи: Оваа проспективна, опсервациска, студија на случаи и контроли беше спроведена на Клиниката за гинекологија и акушерство во Приштина и при Одделението/Катедрата за молекуларна биологија и генетика на Природно-математичкиот факултет во Скопје. Цервикалните примероци од 214 жени (средна возраст 45,28 години; опсег 20-65 години), кои дошле на преглед во амбулантата на Универзитетскиот клинички центар во Косово, беа тестирани за присуство на HPV-DNA и квантитативна експресија на генот *TERT* по направениот конвенционален Pap тест. Од вкупниот број жени, 100 беа со нормални цитолошки резултати (NC), 45 беа со ASC-US, 7 со ASC-H, 15 со HSIL и 10 пациентки беа со сквамозен цервикален карцином. Детекцијата и генотипизацијата на HPV се изведуваше со полимеразно-верижна реакција (PCR) користејќи MY 09/MY11 прајмери, со последовна генотипизација со анализа на должината на фрагментите по рестрикциска дигестија (RFLP) користејќи комбинација од 3 ендонуклеази. RNA изолатите беа користени за синтеза на комплементарна DNA (cDNA) со реверзна транскрипција. Амплификацијата

и релативната квантитативна PCR во реално време (qRT-PCR) се изведуваше со помош на *TERT*-специфични прајмерски парови и специфични флуоресцентни TaqMan-сонди. Квантитативната експресија на генот *TERT* се пресметуваше во однос на референтниот ген *G3PDH* и беше нормализирана во однос на нормалните цервикални клетки со помош на методот $\Delta\Delta C_t$. За статистичка анализа се користеше Mann-Whitney U-тест.

Резултати: Инфекција со HPV беше откриена кај 109 (50,3%) пациенти. Сто (46,73%) од 214 примероци беа со нормален цитолошки резултат (NC), а 114 покажаа некој вид абнормален цитолошки наод: 45 (21,03%) ASC-US; 37 (17,29%) LSIL; 7 (3,27%) ASC-H; 15 (7,01%) HSIL и 10 (4,67%) беа со цервикален карцином. Фреквенцијата на HPV позитивитетот зависеше од сериозноста на лезиите (62,22% за ASC-US; 85,71% за ASC-H; 86,49% за LSIL; 93,33% за HSIL и 100% за цервикалниот карцином). Мултипната HPV инфекција (инфекцијата со повеќе типови) немаше директна поврзаност со сериозноста на лезиите, бидејќи кај 44% од примероците со ASC-US, 72% со LSIL, 71% со ASC-H и 80% од примероците со HSIL/CC, беше детектиран само еден тип HPV. Мултипна HPV инфекција со повеќе од два генотипа беше најдена кај 18/109 примероци или кај 8.41%. Најчестиот застапен генотип беше HPV 53 (26,77%). Втор по застапеност беше HPV 16 (22,83%), а трет најчест беше типот 31 (14,96%). Експресијата на *hTERT* mRNA значајно корелираше со повисокиот степен на цервикална лезија. Беше најдена статистичка висока разлика помеѓу нивоата на нормална експресија на *hTERT* и оние на прекумерна експресија во сите цитолошки групи со абнормални наоди во споредба со нормалните кај контролната група ($p < 0,01$). Прекумерната експресија на генот *hTERT* беше поврзана со 6,31 и 9,20 пати повисок ризик за појава на ASC-US и LSIL во споредба со пациентите со нормална експресија и нормални цитолошки наоди. Освен тоа, постоеше силна корелација помеѓу нивоата на експресија на *hTERT* и HPV инфекцијата, и тоа најмногу кај лезиите од висок степен и кај цервикалниот карцином. Вредностите на релативната експресија на *hTERT* покажаа специфичност од 98% и сензитивност од 100% како индикатори за цервикални лезии, особено за ASC-H, HSIL и цервикален карцином.

Заклучоци: Оваа студија ја потенцира високата преваленција на HPV, којашто одговара на високата стапка на инциденција на цервикален карцином во Косово, со најчесто застапените типови HPV 53, HPV 16, и HPV 31. Врз основа на епидемиолошкиот профил на HPV генотиповите во овој регион, нашите резултати може да помогнат во воспоставување платформа за скрининг на цервикалниот карцином и за превентивни стратегии во иднина. Нашите податоци исто така сугерираат дека експресијата на *hTERT* се појавува рано кај прогресивната/напредната цервикална болест и е поврзана со сериозноста на болеста и со HPV инфекцијата. Според тоа, таа претставува корисен дијагностички и прогностички биомаркер за прогресија на болеста кај жените инфицирани со HPV.

Клучни зборови: хуман папилома вирус, *TERT* ген, цервикален карцином, теломеразна активност, полимеразно-верижна реакција

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is a preventable disease; however, despite its avoidable nature it remains one of the leading causes of cancer mortality globally, with the highest incidence and mortality rates in low-resource countries. Human papillomavirus infection is certainly an underlying cause of cervical cancer and its precursor lesions with different prevalence of the genotypes depending on the patient's age, ethnicity, race, severity of the precursor cervical lesions and geographical region. Early events associated with disease progression and cervical cancer include *hTERT* up-regulation at the transcriptional level mediated by high-risk HPV E6 oncoproteins via indefinite mechanisms with concomitant immortal phenotype of the cell *in vitro* and increased replicative potential of cells in precancerous cervical lesions and cervical cancer.

Aim: The aim of this study was to evaluate the frequency of HPV infection and genotypes among women with normal and abnormal cytological results and its correlation according to the severity of the lesions as well as to investigate the correlation between the *TERT* gene expression levels and the cytological sub-group and to evaluate the correlation between the HPV infection and *TERT* gene expression levels as a diagnostic and prognostic marker in cervical precursor lesions and cervical cancer.

Materials and methods: This study is a prospective observational case-control study conducted in Obstetrics and Gynaecology Clinic in Pristina and Molecular and Biology-Genetics Department in Skopje. Cervical samples from 214 women (median age 45.28 years; range 20-65) from the Outpatient Clinic in University Clinical Center in Kosovo were tested for HPV-DNA and quantitative *TERT* gene expression after performing conventional Pap smear. From them, 100 women had normal cytology (NC), 45 cases were ASC-US, 37 LSIL, 7 cases with ASC-H, 15 cases with HSIL and 10 cases with squamous cervical cancer. HPV detection and genotyping was performed by PCR using MY 09/MY11 primers with subsequent genotyping by restriction-fragment length polymorphism (RFLP) analyses using combination of 3 endonucleases. RNA isolates were used for complementary DNA (cDNA) synthesis by reverse transcription. Amplification and relative quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using *TERT*-specific primer pair and gene specific fluorescent TaqMan probes. Quantitative *TERT* gene expression was calculated

relative to the reference *G3PDH* gene and normalized to the normal cervical cell sample using $\Delta\Delta C_t$ method. Two-tailed Mann-Whitney U-test was used for statistical analysis.

Results: HPV infection was detected in 109 cases (50.93%). One hundred (46.73%) out of 214 samples were found to have normal cytology (NC) and 114 cases showed some type of cytological abnormalities: 45 (21.03%) ASC-US; 37 (17.29%) LSIL; 7 (3.27%) ASC-H; 15 (7.01%) HSIL, and 10 (4.67%) cervical cancer. The frequency of HPV positivity was dependent on the severity of the cervical lesions (62.22% for ASC-US; 85.71% for ASC-H; 86.49% for LSIL; 93.33% for HSIL and 100% for cervical cancer). Multiple HPV infection did not correlate directly with the severity of the cervical lesions because in 44%, 72%, 71% and 80% of samples with ASC-US, LSIL, ASC-H, and HSIL/CC respectively, only single HPV type was found. Multiple HPV infection with more than two genotypes was found in 18/109 patient samples or 8.41%. The most prevalent genotype found was HPV 53 (26.77%). HPV 16 was the second most prevalent type (22.83%) followed by the third most common type 31 (14.96%). The *hTERT* mRNA expression significantly correlated with the increased grade of the cervical lesion. A statistically high difference was found between the *hTERT* normal expression levels and *hTERT* over-expression in all cytological groups with abnormalities compared to normal control group ($p < 0.01$). *hTERT* gene overexpression was associated with 6.31 and 9.20 fold higher risk for developing ASC-US and LSIL compared to patients with normal expression and normal cytology, respectively. In addition, there was a strong correlation between the *hTERT* gene expression levels and HPV infection, notably in the high-grade lesions and cervical cancer. *hTERT* gene relative expression values showed 98% specificity and 100% sensitivity as an indicator of cervical lesions particularly for the ACS-H, HSIL and cervical cancer.

Conclusions: This study highlights the high HPV prevalence corresponding to the high incidence rate of cervical cancer in Kosovo with the most common types HPV 53 and HPV 16, followed by type 31. Based on epidemiological profile of HPV genotypes in this region, these results might prove auxiliary to establish a platform for cervical cancer screening and prevention strategies in the future. Data from this study also suggest that *hTERT* expression occurs early in progressive cervical disease and correlates with disease severity and HPV infection. Therefore, it is useful as a diagnostic and prognostic biomarker of the disease progression in HPV- infected subjects.

Keywords: human papillomavirus, *TERT* gene, cervical cancer, telomerase activity, polymerase chain reaction

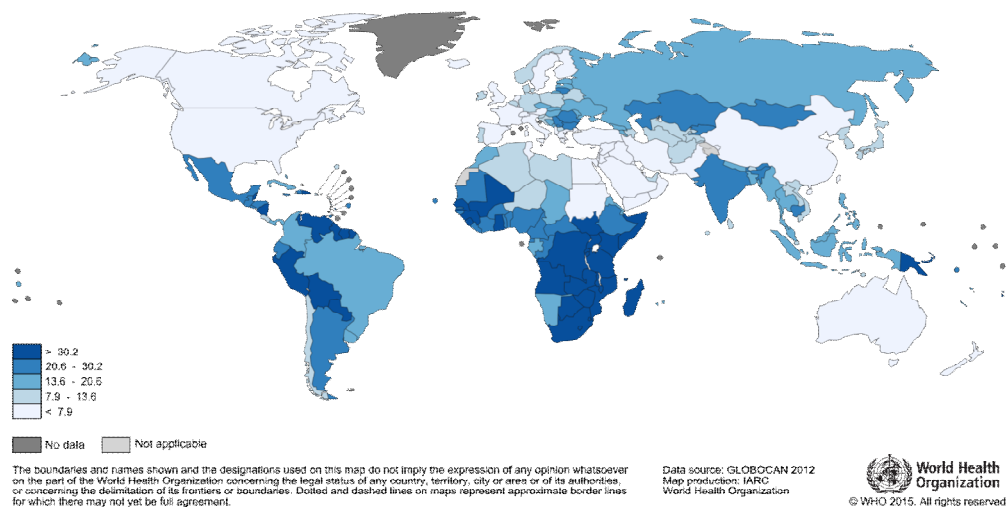
ЛИСТА НА АКРОНИМИ И КРАТЕНКИ

ASC	атипични сквамозни клетки
AGC	атипични жлездести клетки
ALT	алтернативна должина на теломерите
CIN	цервикална интраепителна неоплазија
CIS	карцином <i>in situ</i>
cDNA	комплементарна DNA
EGF	епидермален фактор на раст
HIV	хуман имунодефициентен вирус/хуман вирус на имунодефициенција
HSV	Herpes simplex вирус
HPV	хуман папилома вирус
HLA	хуман леукоцитен антиген
HR-HPV	висок ризик од HPV
HSIL	висок степен од сквамозна интраепителна лезија
LCR	долг контролиран регион
LR-HPV	низок ризик од HPV
LSIL	низок степен од сквамозна интраепителна лезија
MN	микронуклеуси
MHC	голем хистокомпатибилен комплекс
p53	протеин 53
PCR	полимеразно-верижна реакција
pRb	ретинобластома протеин
ORF	отворена рамка за исчитување
TERT	теломераза реверзна транскриптаза
RT	реверзна транскриптаза
VEGF	васкуларен ендотелијален фактор за раст
PPV	позитивна предиктивна вредност
PPROM	предвремена руптура на мембрана

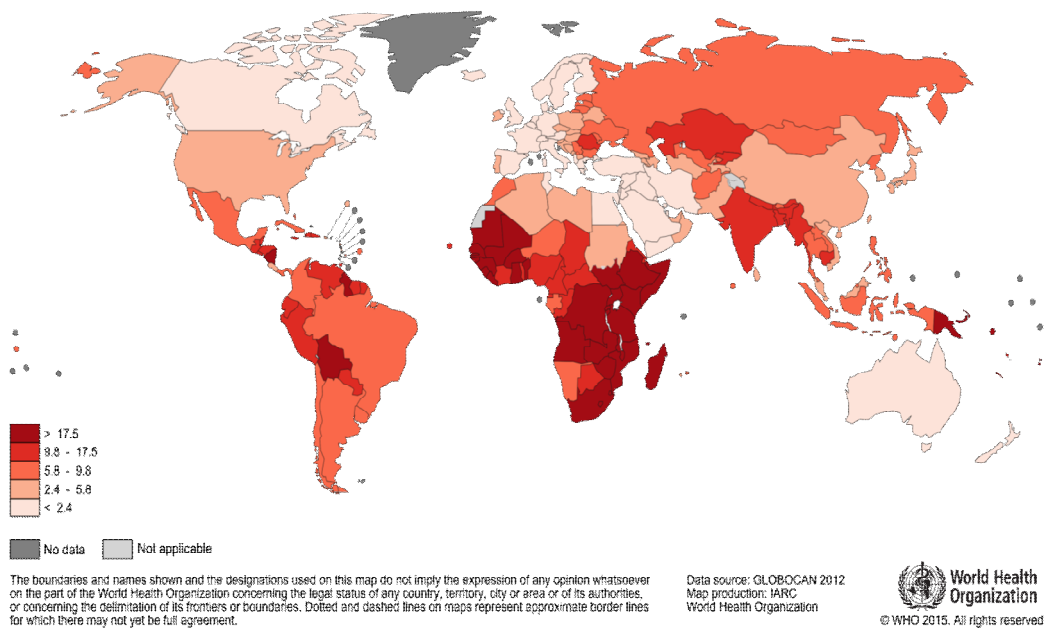
1. ВОВЕД

Карциномот на грлото на матката е заболување кое поради својата природа може да се спречи, но и понатаму останува една од водечките причини за смртност од карцином на глобално ниво со највисока стапка на инциденција и морталитет во нискоразвиените земји (слика 1,2) (1). Карциномот на грлото на матката е четврта најчеста причина за смрт кај жените во светот, со повеќе од 527.000 нови случаи дијагностицирани во 2012 год. [Ферли (Ferlay) и сор., 2012]. Оваа болест е еден од основните примери за нееднаквоста во давањето здравствени услуги, каде повеќе од 80% од жените кои се со дијагноза на цервикален карцином живеат во земјите во развој, а околу 95% од нив не направиле скрининг за канцер на грлото на матката (2). Во земјите со највисока стапка на инциденција и морталитет од оваа болест спаѓаат нискоразвиените земји, особено оние во Супсахарска Африка, Централна Америка, јужна Централна Азија и Меланезија (3, 4). Значајните разлики во стапката на инциденција и морталитет на болеста главно се должат на различната преваленција на факторите на ризик, ограничениот пристап до здравствените установи и услуги во земјите во развој со слабо организирани скрининг програми, со ниска покриеност на високоризичните групи пациенти, недостиг или несоодветен референтен систем и неефикасни интервенции кои вклучуваат скрининг, третман и следење на пациентите. Стапките на инциденција и морталитет се ниски во развиените земји како резултат на ефикасни, добро планирани и организирани скрининг програми.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Слика 1: Процентна инциденција од цервикален карцином во светот во 2012 (1)



Слика 2: Процент морталитет од цервикален карцином во светот во 2012 (1)

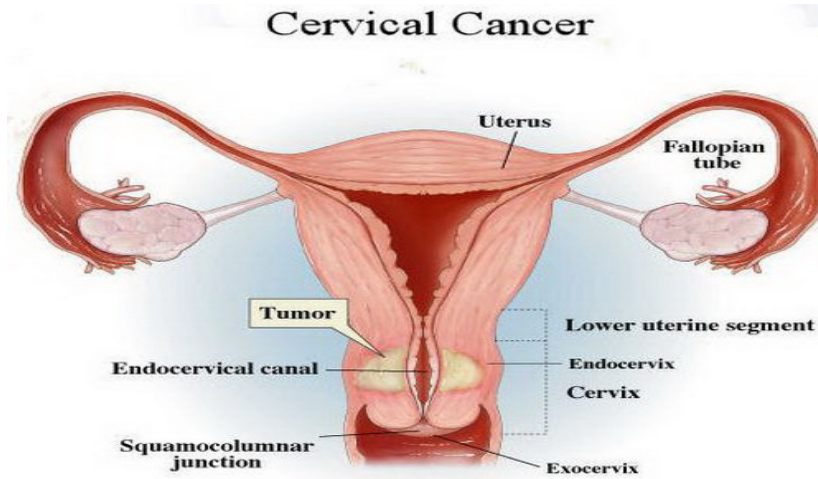
Според годишниот извештај за 2014 година на Националниот институт за јавно здравје на Косово, преваленцијата на малигните заболувања била 186,5 на 100.000 жители, а инциденцијата била 167,9 на 100.000 жители. Поконкретно, малигните тумори на гениталниот тракт биле застапени со 251 случај или 7,6%. Треба да се истакне фактот дека имало 67 (2,0%) нови случаи на карцином на грлото на матката дијагностицирани во 2014 год. Програмата за скрининг на цервикален карцином била воведена во Косово во 1983-1984 год., со цел рано откривање и лекување на цервикалните прекурзорни лезии коишто може да напредуваат до карцином на грлото на матката. На меѓународно ниво, карциномот на грлото на матката треба да се смета како болест со висока можност за превенција, бидејќи со нејзино рано откривање и третман таа се лекува со висок успех. На Косово, најголемиот предизвик е да се покрие групата жени кои се со највисок ризик, а тоа се жените на возраст од 35 до 45 години, во рамките на доброволниот скрининг и да се вклучат жени кои немаат редовни прегледи, особено од руралните области.

2. ОСНОВНИ ПОДАТОЦИ

2.1. ГРЛО НА МАТКА И СКВАМОЗНО-ЦИЛИНДРИЧЕН СПОЈ

Грлото на матката ја опфаќа долната третина на матката. Вагиналниот дел на грлото е покриен со стратифициран сквамозен епител (повеќеслоен) и наликува на вагиналниот епител. Ендоцервиксот или горните две третини лежи над вагината и е покриен со цилиндричен епител, еден слој од клетки поставени на базалната мембрана (2). Додека ектоцервиксот може да се види со спекулум, долниот дел од ендоцервикалниот канал се гледа со ендоцервикален спекулум. Цилиндричниот епител којшто го обвиткува/обложува цервикалниот канал се протега до променливиот дел на ектоцервиксот и овој премин се нарекува сквамозно-цилиндричен спој (SCJ), а неговата позиција зависи од хормонската стимулација. Цилиндричниот епител кога е изложен на вагиналното кисело милје, преку метаплазија ќе биде заменет со сквамозен епител што ќе доведе до појава на нов SCJ. Зоната помеѓу оригиналниот/стариот и нов SCJ се нарекува зона на трансформација, која од непознати причини е склона кон развој на преканцерозни и канцерозни лезии и повеќе подложна на инфекции (слика 3). Кај постменопаузните жени сквамозно-цилиндричниот спој (SCJ) повторно се врзува за

цервикалниот канал, додека пак во пубертетот, бременоста и при употреба на хормонска контрацепција се карактеризира со зголемена зона на трансформација во ектоцервиксот (2).



Слика 3. Грло на матка со зона на трансформација (преземено и адаптирано од: www.cancerresearchuk.org)

2.2. ЦЕРВИКАЛНА БОЛЕСТ И НЕОПЛАЗИЈА

2.2.1. Фактори на ризик за појава на цервикални прекурзорни лезии и карцином

Во 1976 година, професорот Харалд цур Хаусен (Harald zur Hausen) по неколку негови неуспешни обиди да ја идентификува HSV-2 DNA кај пациентки со цервикален карцином, ја посочил улогата на хуман папилома вирусот како главен инфективен агенс во појавата на гениталните карциноми, и истакнал: “Агенсите/предизвикувачите на кондиоми (генитални брадавици) до сега беа целосно занемарени во сите епидемиолошки и серолошки студии кои се однесуваа не само на карциномите на цервиксот и penisот, туку и на вулварните и перианалните карциноми. Ова е особено невообичаено во поглед на локализацијата на гениталните брадавици, нивниот начин на венерична трансмисија, бројот на трудови за малигна трансформација, и присуството на агенсии кои припаѓаат на добро карактеризирана група на онкогени DNA вируси” (5). На цур Хаусен му била доделена Нобеловата награда за медицина во 2008 год. за неговото откритие на различни HPV генотипови, вклучувајќи ги типовите 16 и 18,

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

најчесто забележани кај цервикалниот карцином, како и за укажувањето на интеграција на HPV DNA во геномот на домаќинот (6, 7, 8).

Валбумерс (Walboomers) и сор., откако го претставиле нивниот извештај, според кој 93% од случаите на цервикален карцином на глобално ниво се предизвикани од HPV инфекција, ги реанализирале HPV-негативните случаи од една претходна студија и потврдиле дека во светот преваленцијата на HPV кај случаите со карцином на цервиксот е 99,7% (9). Според Меѓународната агенција за истражување на канцерот, HPV типовите 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 се канцерогени за човекот, додека HPV типовите 6 и 11 „не се класифицирани како канцерогени за човекот“ (10). Иако денес причинската поврзаност помеѓу високоризичната HPV инфекција и цервикалниот карцином е добро етаблирана, сепак сите пациенти кои се инфицирани со HPV не се дијагностицирани со цервикален карцином, со што се упатува на фактот дека инфекцијата со HPV е задолжителен, но недоволен фактор за појава на цервикална карциногенеза.

Инфекцијата со HPV е најчестата сексуално пренослива болест во светот, но со различна преваленција во зависност од географската распределеност и проучуваната популација. Според де Санхоze (de Sanjose) и сор., кај жените со нормални цитолошки наоди, проценетата HPV преваленција на светско ниво е 10,0% што се однесува до старосно-специфичните групи, со највисока преваленција кај жените помлади од 34 години, а намалена преваленција кај жените на возраст од 35 до 44 години.

Зголемена преваленција е најдена кај старосните групи од 45 до 54 години (11). Сепак, треба да се смета и на другите фактори на ризик за цервикален карцином во сложениот процес на карциногенезата, бидејќи кај сите пациенти инфицирани со HPV не се дијагностицира карцином на цервиксот. Бројот на сексуалните партнери во животот и нов сексуален партнер се фактори на ризик за појава на HPV инфекција, бидејќи најчест начин на трансмисија е преку сексуален контакт со инфицирано лице, иако поголем број од претходно направените студии нашле убедлива поврзаност помеѓу непенетрирачкиот сексуален контакт и инфекцијата со HPV кај девици (12-13). Неколку студии покажале дека употребата на кондоми најверојатно немала заштитен ефект, бидејќи HPV се шири преку директен контакт на кожа со кожа (13-14). Докажано е дека постојат и други

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

фактори на ризик, кои се значајни за појава на HPV инфекција и цервикален карцином, а тоа се: раниот почеток со сексуални односи, помлада возраст на прва износена бременост, повеќекратните, над 5 износени бремености, оралната хормонска контрацепција користена во период подолг од пет години, претходна изложеност на други сексуално преносливи болести како *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex* вирусот -2 (HSV) и инфекцијата со вирусот на сидата (ХИВ). Во неколку епидемиолошки студии кои ја испитувале поврзаноста помеѓу цервикалниот карцином и коинфекцијата со *Herpes simplex* вирус-2 и *Chlamydia trachomatis* покажана е делумна или никаква поврзаност помеѓу HSV-2 серолошкиот одговор (антитела) и цервикалниот карцином. Финан (Finan) и сор. откриле дека коинфекцијата со HPV и *Chlamydia trachomatis* и коинфекцијата со HPV и HSV-1, но не и со HSV-2, претставуваат поголем ризик за карцином на грлото на матката (15).

Од друга страна, постојат силни докази за улогата на *Chlamydia trachomatis* во цервикалната карциногенеза, што е презентирано во неколку епидемиолошки студии (16-17). Серопозитивноста од претходна инфекција со *Chlamydia trachomatis* била поврзана со зголемен ризик за инвазивен цервикален карцином кај жени инфицирани со HPV, по приспособување според возраст, употреба на орални контрацептивни средства, антитела за *Herpes simplex* вирус-2 и бројот на навремени породувања (18). Неодамна е регистриран зголемен ризик за CIN 3 кај жени со повторени хламидиски инфекции и превалентна или перзистентна/постојана HPV инфекција (19). Молекуларните механизми со кои перзистентната хламидиска инфекција ја поттикнуваат или ја помагаат карциногенезата на цервиксот се главно нејасни. Антихламидиската активност во локалните мукозни ткива е модулирана преку продукцијата на азотен оксид индуцирана со гама-интерферон (20), додека, пак, преку специфичните антиапоптоични фактори овој интрацелуларен патоген ја инхибира апоптоичната активност во инфицираните клетки на домаќинот (21). Хроничната цервикална инфламација може да се смета за претходник на карциногенезата на цервиксот, што може да се види од неколку молекуларни механизми, како што се нарушување на одговорот на домаќинот на инфламација како и зголеменото ниво на проинфламаторните цитокини (22).

Во голем број студии се наведува поврзаноста помеѓу HIV инфекцијата и HPV преваленцијата, инциденцијата, постојаната инфекција со мултипли HPV типови и

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

диспластичните цервикални лезии. Преваленцијата на CIN е висока кај жените инфицирани со HIV, а зголемениот ризик за CIN позитивно корелира со бактериската вагиноза, но интересно е што нема поврзаност со бројот на износени бремености (23-24). Податоците исто така сугерираат дека жените инфицирани со HIV се изложени на поголем ризик за мултипна HPV инфекција во споредба со HIV- негативните жени (25). Нискиот број на CD4+ како и некористење на антиретровирусни лекови кај HIV- позитивните жени била причина за зголемен ризик од сквамозни интраепителни лезии (SIL) и HSIL, но сепак не била најдена поврзаност помеѓу високата оптовареност со HIV вирус и ризикот за SIL (26). Во студијата спроведена од Стуардо (Stuardo) и сор., 78,4% од HIV-1 позитивните жени имале мултипна HPV инфекција, па според тоа била најдена силна поврзаност помеѓу абнормалниот цитолошки наод, високиот ризик од HPV инфекција и малиот број CD4+ кај испитуваните лица (27). Жените инфицирани со тип HIV-1 или со HIV-2 се со поголем ризик од сериозни интраепителни лезии (CIN 2/3) како и од инвазивен цервикален карцином (28). Спротивно на умерената поврзаност на HIV инфекцијата и HPV перзистенцијата/опстојувањето, во една студија била прикажана конзистентна поврзаност помеѓу HPV инциденцијата и бројот на CD4+ и нивото на HIV RNA во плазма (29). Механизмот со кој HIV инфекцијата го модулира одговорот на домаќинот кај лицата инфицирани со HPV и вообичаениот тек на развој на болести поврзани со HPV, е главно нејасен, но имуносупресијата поврзана со HIV, CD4+ број $<200 \times 10^6/L$ го зголемува ризикот од цервикална дисплазија и постојаност/опстојување на HPV (30). Овие два инфективни агенса може исто така заедно директно да дејствуваат преку своите вирусни протеини, што ќе доведе до компромитиран целуларен и хуморален имунитет и нарушен клеточен циклус (31). Кај жените инфицирани со HIV, лекувани со високоактивна антиретровирусна терапија (HAART) се покажало намалување на прогресијата и стапката на инциденција на цервикалните прекурзорни лезии (32).

Доказите дека пушењето тутун/цигари, односно чадот од тутунот предизвикува белодробен карцином датираат уште од раните 1950-ти. Денес со сигурност се знае дека пушењето цигари е една од главните причини за смрт од канцер во светот и дека тоа игра одлучувачка/клучна улога во настанувањето на цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии. Со децении поврзаноста на цервикалните прекурзорни лезии и карциномот со пушењето е еден од најчесто испитуваните фактори во епидемиолошките

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

студии. Така, доказот дека пушењето предизвикува цервикален карцином се сметал за „доволен“ од страна на Интернационалната агенција за истражување на канцерот (International Agency for Research on Cancer) (33). Во споредба со непушачите, цервикалниот мукус кај пушачите се покажал со повисока мутагеност (34). Конзистентни наоди исто така биле наведени во претходни контролирани студии, каде се покажала поголема разлика во фреквенцијата на микронуклеусни цервикални епителни клетки кај пушачите и кај непушачите (34) и значајно повисока фреквенција на микронуклеуси (MN) пронајдени во CIN 2 и CIN 3 во споредба со CIN1 (35-36).

Во една студија на случаи и контроли во рамките на Нордскиот Биобенкс (Nordic Biobanks) авторите потврдиле дека пушењето тутун е независен фактор на ризик за појава на сквамозен цервикален карцином (SCC). Понатаму, тие откриле двојно поголем ризик од цервикален карцином кај жени со присутни антитела против HPV 16 и 18 (37). Европското проспективно истражување на канцерот и нутрицијата [European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)] открило двојно поголем ризик за појава на цервикален карцином кај пушачите во споредба со непушачите, по приспособување на изложеност на HPV (38). Дури и пасивното пушење се смета за независен и значаен фактор за цервикален карцином (39).

Комбинираната хормонска контрацепција била достапна за употреба од доцните 1950-ти, но по 1960-тите години кога нејзината употреба земала пошироки размери, нејзината поврзаност со појавата на цервикалниот карцином била ставена под знак прашалник и обработувана во многу епидемиолошки студии. Долготрајната употреба на оралната хормонска контрацепција во период од 10 или повеќе години е поврзана со четирикратно зголемен ризик од карцином на цервиксот кај HPV-позитивни жени (40). За ваквата поврзаност постојано се пишува во големи контролирани студии. Долготрајната употреба на оралната хормонска контрацепција во период од 10 или повеќе години е поврзана со зголемен ризик од цервикален карцином (RR=2,5; 95% CI; 1,6-3,9) кај инфицирани жени со HPV (41). Здружената анализа на 24 епидемиолошки студии открила дека релативниот ризик од инвазивен цервикален карцином се зголемува со долготрајната употреба на орални контрацептивни пилули и се проценува дека кумулативната инциденција од инвазивен цервикален карцином се зголемила од 7,3 на 8,3 на 1000 во развиените земји кај оние кои користеле орална контрацепција 10 години

(42). Сепак, постојат некои конфликтни резултати по ова прашање, бидејќи во неколку студии се покажало дека оралната контрацепција не е независен фактор на ризик за појава на прекурзорни цервикални лезии ниту се пронајдени доследни докази за зголемување на ризикот од цервикален карцином или карцином *in situ* со користење на орална контрацепција. Шапиро (Shapiro) и сор. не пронашле поврзаност помеѓу употребата само на прогестин или комбинирана хормонска контрацепција и зголемување на ризикот од цервикален карцином (43). Сирјанен (Syrtjanen) и сор. истакнуваат дека, бидејќи сексуалното однесување се разликува помеѓу корисниците на орална контрацепција, односно кај оние кои не користат орална контрацепција и оние кои не користат било каква контрацепција, овие фактори го детерминираат исходот од инфекција со високоризичен тип на HPV инфекција и цервикална болест (44). По евалуацијата на ефектите на естрогенот и прогестеронот врз нивоата на експресија на E6 и E7 онкогени кај CaSki и SiHa HPV-16 позитивни клеточни линии, не бил пронајден значаен ефект во транскрипциските нивоа на овие онкогени. Така, заклучокот кој може да се изведе е дека овие хормони можат да ја поттикнат клеточната пролиферација и да ги направат клетките поподложни на мутации, но не и преку E6 и E7 посредуваниот пат. Од тој аспект, растот на клетките инфицирани со HPV е резултат на анти-апоптотичниот ефект на естрогенот (45). Нагорниот регулаторен регион (URR) на HPV 16 вирусниот геном содржи енхансери/засилувачи, кои се активираат од страна на стероидните хормони и се јавува последовна зголемена експресија на HPV 16 онкогените. HPV генските производи доведуваат до деградација на p53 протеинот и прекин/нарушен на клеточниот циклус (46).

Спротивставени резултати се забележани во врска со големиот број износени бремености/мултипаритет како независен ко-фактор за цервикален карцином. Во неколку контролирани студии е пронајдена силна поврзаност помеѓу овој фактор и цервикалниот карцином, додека во други студии не е забележана никаква поврзаност помеѓу бројот на износени бремености/мултипаритет и CIN 3. Во мултицентричната контролирана студија спроведена под покровителство на Интернационалната агенција за истражување на канцерот (IARC) било покажано дека високиот број на износени бремености, седум или повеќе износени бремености, е поврзан со зголемување на ризикот од цервикален карцином кај HPV-позитивни жени во споредба со жените кои не родиле (OR=3,8, 95% CI;2,7-5,5) (47). Хилдешајм (Hildesheim) и сор. прикажале значајна

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

поврзаност помеѓу оралната контрацепција и лезиите од висок степен/цервикален карцином кај жените со повеќе од три бремености (48). Иако ризикот од појава на цервикален аденокарцином е повисок кај жените инфицирани со HPV со осум или повеќе бремености, доказите сугерираат дека бројот на износени бремености/мултипаритетот е значаен ко-фактор за појава на сквамозен цервикален карцином и, во помал процент, за цервикален аденокарцином (49). Повеќе бремености/мултипаритет и пушењето кај HPV-позитивните жени се главни дополнителни фактори на ризик за појава на CIN3 во споредба со CIN2, како што е веќе претходно објавено (50). Во таа смисла, постои и зголемен ризик за CIN2+ кај жени со повеќе износени бремености, инфицирани со онкоген типови на HPV (51).

Наодите од Јенсен (Jensen) и сор. покажале зголемен ризик за CIN 3, особено кај жени со постојана/перзистентна HPV инфекција од високоризичен тип (52). Потенцијалните фактори коишто можат да ја објаснат врската помеѓу големиот број износени бремености и зголемениот ризик за цервикална болест, вклучуваат не само зголемување на нивото на стероидните хормони, кои влијаат преку зголемена експресија на HPV онкогените, туку исто така и преку интеграција на HPV-DNA во хроматинот на клетката-домаќин преку клеточниот оксидативен стрес. Нарушениот имунолошки одговор и зголемената зона на трансформација во егзоцервиксот кај жените повеќеротки, што ја потпомага изложеноста на HPV, исто така се сметаат за фактори на ризик (53-54). Во спротивност со наодите од други студии, Касл (Castle) и сор. не нашле поврзаност помеѓу бројот на износени бремености и зголемениот ризик за CIN 2 и CIN 3 (55).

Социоекономски статус и ниво на образование - Нивото на образование и социјалната состојба на домаќинството можат да бидат значајни предиктори за стапката на скрининг за карцином на цервиксот. Најчесто, жените со повисок степен на образование и повисоки приходи во домаќинството имаат подобра стапка на скрининг за цервикален карцином во споредба со оние со ниски приходи и ниско ниво на образование (56-57).

Антиоксиданси и цервикален карцином – Во неколку студии се презентирани убедливи резултати во однос на анти-карциногената активност на полифенолите, како што се епигалокатехин-3-галат [epigallocatechin-3-gallate (EGCG)] од зелениот чај, куркумин (curcumin) од куркума (turmeric) и резвератрол (resveratrol) од грозјето. EGCG,

којшто е главна состојка на зелениот чај, е најмногу испитуван антиоксиданс. Ахн (Ahn) и сор. го испитувале ефектот на EGCG врз HPV-16 CaSki-клеточните линии на цервикалниот карцином и објавиле дека оваа состојка покажала антипролиферативен ефект во текот на индуцираната апоптоза, застој на клеточниот циклус и во текот на промената на генската експресија *in vitro* (58). Студијата на Сидикви (Siddiqui) и сор. го потврдила апоптотичниот ефект на EGCG врз клетките на цервикалниот карцином (59), додека податоците презентирани од Ногучи (Noguchi) и сор. покажале дека, освен апоптотичниот ефект и нарушениот клеточен циклус, оваа состојка исто така ја инхибира и активноста на теломеразата (60). Резвератролот има значајна улога во апоптозата, инхибицијата на MMPs во CaSki-клеточните линии на цервикалниот карцином, а исто така може да ја потисне и ангиогенската активност *in vitro* (61). Иако нивниот антиканцероген ефект е јасно покажан, потребни се натамошни студии пред тие да почнат рутински да се применуваат во терапевтски цели. Мјунг (Myung) и сор., во една мета-анализа на 22 контролирани студии откриле дека витаминот B12, витаминот C, витаминот E, бета-каротенот, фолатите и ликопенот имаат предупредувачки ефект за цервикален карцином, додека ваков ефект не бил откриен за селениумот и витаминот A (62). Сривастава (Srivastava) и сор., во една проспективна контролирана студија презентирале ниски нивоа на витамините A и E, а повисоки нивоа на липидната пероксидаза (LPO) кај цервикалниот карцином во споредба со нивоата кај контролната група (63).

Фактор – машки род - Епидемиолошките студии покажале дека обрежувањето на мажите е поврзано со намален ризик за HPV инфекција и со намален ризик за цервикален карцином кај жените чии партнери имале повеќе сексуални партнери, намалена преваленција на HPV инфекција и импликации при трансмисија на HPV. Поради тоа, улогата на обрежувањето како ко-фактор во инфекцијата со HPV и неговата патогенеза е силно поддржана (64-66).

Генетски промени и цервикален карцином - И покрај добро познатата онкогена улога на HPV инфекцијата кај цервикалниот карцином, нејзината интерференција со генетските абнормалности кај домаќинот е генерално нејасна. Постои забележан латентен период од HPV инфекцијата до клинички манифестирана цервикална болест и не сите HPV-инфицирани лица ќе бидат дијагностицирани со цервикален карцином, што

значи дека делумно објаснување може да биде нивната генетска подложност за инфекција. Кога Магнусон (Magnusson) и сор. ја споредиле инциденцијата на цервикалната болест кај роднините на заболените жени со оние од контролната група, покажале два пати поголем ризик за заболување кај оние кои биле во роднинска врска во споредба со оние кои не биле во роднинска врска (67). Неколку студии го фокусирале своето внимание на големиот хистокомпатибилен комплекс (МНС) регион, особено во однос на човековиот леукоцитен антиген (HLA) класа II, и како што е соопштено од страна на Кохар (Kohaar) и сор., HLA DR-DQ полиморфизмите се поврзани со генетската подложност кон HPV инфекција (68), додека веројатноста HLA полиморфизмот да го модулира имуниот одговор на вирусот била исто така забележана (69). Гените за поправка на DNA претходно биле предложени како важен фактор за постојаноста на HPV инфекцијата, како и во прогресијата на болеста во CIN3 и карцином на цервиксот (70).

Доста е проучуван p53 полиморфизмот, особено полиморфичното место на кодонот 72 од егзонот 4, а во врска со зголемениот ризик за појава на цервикален карцином. Иако резултатите поврзани со p53 алелскиот полиморфизам генерално се уште недефинирани, Гудлевициен (Gudleviciene) и сор. откриле двојно поголем ризик за појава на цервикален карцином кај p53 arg/arg алелот (OR = 2,10, 95% CI 1,10–4,19) кај жените од Литванија, додека исти резултати добиле и Андерсон (Andersson) и сор. за зголемен ризик од аденокарцином кај хомозиготни жени за arg/arg во кодонот 72 од овој ген на туморската супресија (71-72).

Прогресијата од сериозни интраепителни лезии кон цервикален карцином секако е поврзано со хромозомски нумерички абнормалности и геномска нестабилност. Најчести хромозомски абнормалности, коишто ја карактеризираат прогресијата од сериозна интраепителна лезија кон цервикален карцином е дупликацијата на 3q хромозом (73), додека, пак, кај CIN често забележани алтерации, кои се претходно опишани, се губење на хетерозиготноста (LOH) кај краците 3p,6p и 11q како и LOH на краците 6q,17p и 18q кај инвазивниот цервикален карцином (74).

2.3. ЦЕРВИКАЛНИ ПРЕКУРЗОРНИ ЛЕЗИИ

2.3.1. Дефиниција и патофизиологија на CIN

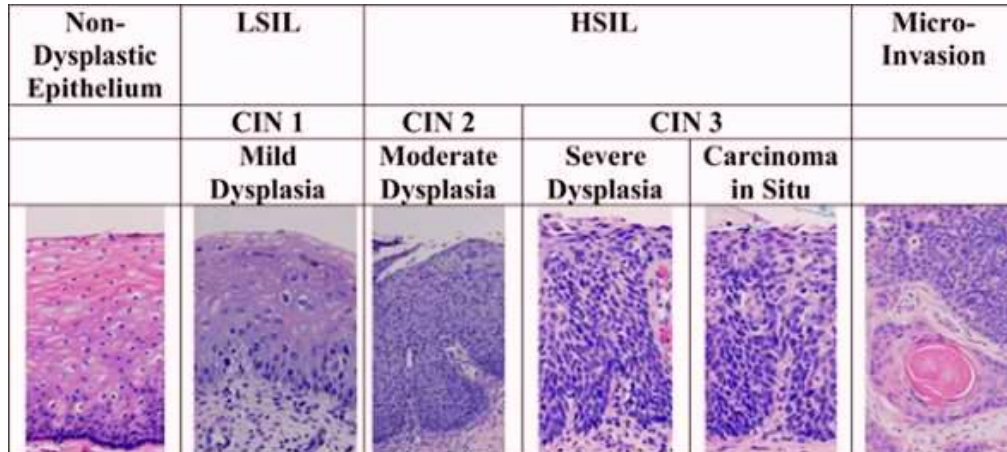
Терминологијата „цервикална интраепителна неоплазија“ (CIN) била воведена во 1973 година од страна на Рихарт (Richart). Овој концепт го истакнува фактот дека дисплазијата и *carcinoma in situ* се различни фази од прогресијата на болеста, но секако претставуваат ист биолошки процес. Според овој систем премалигните абнормалности се движат од блага дисплазија (CIN1), преку умерена дисплазија (CIN2), до тешка дисплазија/*carcinoma in situ* (CIN3/CIS) (75). Подоцна, терминологијата позната како Бетезда (Bethesda) систем ја потенцирала потребата од единствено објаснување на цитолошките наоди. Бетезда системот, за објаснување на цитолошките наоди на грлото на матката, бил воведен во 1988 година и истиот бил ревидиран и изменет во 1991 година, а последната измена е направена во 2001 година со цел редифинирање на системот за опис на брисеви на грлото на матката, а со тоа и униформирање на разните дијагностички пристапи. Резултатите се толкуваат како **(1)** ASC (атипични сквамозни клетки), кои понатаму се поделени на ASC „од неодредено значење“ (ASC-US) и „неможност за исклучување на високостепена сквамозна интраепителна лезија (HSIL)“ или (ASC-H), **(2)** LSIL (низок степен од сквамозна интраепителна лезија), **(3)** HSIL (висок степен од сквамозна интраепителна лезија), и **(4)** карцином на сквамозни клетки. Категоријата AGUS се заменува со AGC и отсуството или присуството на ендометријални клетки би требало да биде евидентирано кај жените на 40-годишна возраст и кај постари жени. Гландуларните абнормалности се класифицирани како атипични glandуларни клетки (AGC), ендцервикален аденокарцином *in situ* (AIS) и аденокарцином (76-78). Оваа класификација е исто така препорачана од СЗО (слика 4).

CIN се карактеризира со пролиферација на атипични сквамозни клетки, со променета големина, форма, поларност, како и со зголемен митотски индекс и со хиперхроматски јадра. Додека долната третина на епителот е инволвирана кај CIN 1, две третини од епителот се вклучени во CIN 2, а пак целокупната дебелина на епителот е вклучена кај CIN3/CIS (79) (слика 5).

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Classification System	Cytology Classification						
The Bethesda System	Infection Reactive Repair	ASCUS	Squamous Intraepithelial Lesion (SIL)				
			Low Grade (LSIL)		High Grade (HSIL)		
Richart		Condyloma	Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)				
			Grade I	Grade II	Grade III		
Reagan (WHO)	Normal	Atypia	Mild Dysplasia	Moderate Dysplasia	Severe Dysplasia	In situ Carcinoma	Invasive Carcinoma
Papanicolaou	I	II	III		IV	V	

Слика 4. Споредба на системот за цитолошка класификација на грлото на матката (преземено од Nanda *et al*, 2000)



Слика 5. Хистолошки наод на цервикална интраепителна неоплазија (преземено од: Danforth's Obstetrics and Gynecology, 2008, Wolters Kluwer, Philadelphia, PA)

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Заклучоците од прегледот на Остор (Ostor), кои се компилација од објавени податоци во периодот од 1950 до 1990, а кои се однесуваат на природата на CIN се претставени во табелата 1 (80).

Табела 1. Природа на CIN (преземено од: Ostor, 1993).

	Регресија	Постојаност	Прогресија во CIN3	Инвазија
CIN1	57%	32%	11%	1%
CIN 2	43%	35%	22%	5%
CIN 3	32%	<56%	..	>12%

2.3.2. СКРИНИНГ

2.3.2.1 Конвенционален Pap тест и течна цитологија (LBC)

Примената на ексфолијативната цитологија за рано откривање на инвазивниот цервикален карцином е воведена уште во дамнешните 1920-ти години од страна на Бабес (Babes) и Папаниколау (Papanicolaou). Подоцна се покажало дека оваа ексфолијативна техника може да се користи и за откривање на цервикалните прекурзорни лезии (81). Pap тестот може да се изведува повремено и како организиран систематски скрининг. Организираните скрининг програми со кои се опфаќа висок процент на претходно дефинирана популација може да ја намалат инциденцијата на болеста и да го подобрат преживувањето преку рана детекција на цервикалниот карцином бидејќи, доколку

дијагнозата се постави во рана фаза, се подобрува стапката на преживување (82). Повремениот скрининг којшто се прави на барање од гинеколог или од самите жени е помалку ефикасен поради ниската сензитивност на еден Pap тест. Иако до сега е постигнато значајно намалување на инциденцијата на цервикалниот карцином, главно во развиените земји, постои широк распон на начинот како тој се изведува во однос на сензитивноста и специфичноста со многу големи разлики добиени за сензитивноста на овој тест. Конвенционалниот PAP тест има ниска сензитивност, проценета на 53% (48-57%) во една мета-анализа, додека пак, во систематскиот преглед на литературата спроведен од Нанда (Nanda) и сор. сензитивноста на PAP тестот била проценета на 51% (опсег 30-87%) (84), со што примената на Pap тестот за земање брис е предложена како задолжителна со цел да се избегнат грешки од лажно негативни резултати во клиничката практика. Во зависност од хистолошките критериуми (CIN 1+ или CIN 2+) пријавена е специфичност на конвенционалниот PAP тест до 98% (85-86). Неколку ревијални трудови кои ја анализирале сензитивноста и специфичноста на конвенционалната цитологија за откривање на CIN2 и CIN3 прикажале резултати кои се движеле од 47-62% и од 60-95% (87).

Течната цитологија е друг метод на избор, воведен во средината на 1990-тите; овде клетките од грлото на матката се суспендираат во раствор за чување по што следи подготовката на препарати. ThinPrep® и SurePath™ се одобрени од страна на американската Агенција за храна и лекови - Food and Drug Administration (FDA) во 1996 година.

Во Косово конвенционалниот PAP тест е метод на избор. Што се однесува до сензитивноста и специфичноста на двете техники, публикуваните резултати се значајно противречни.

Во еден квантитативен преглед на литературата спроведен од Абдулафија (Abulafia) и сор., кој вклучувал податоци од 10 студии, било покажано дека LBC е посензитивна и посспецифична за откривање на SIL и HSIL (88). Жу (Zhu) и сор., по направената споредба за начинот на изведување на двете методи и совпаѓањето со хистолошката дијагноза, пријавиле повисока сензитивност на LBC во откривање на CIN 2 и 3 во споредба со конвенционалниот PAP тест (66% наспроти 47%), како и понизок

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

процент на ASCUS резултати добиени со LBC во споредба со конвенционалниот PAP тест (4,3% наспроти 8%) (89).

Во една проспективна студија спроведена од Сајкс (Sykes) и сор., била откриена сензитивност од 81% на двата метода за детекција на која и да било епителна абнормалност, додека пак за откривање на лезии од висок степен севкупната сензитивност била 92% (90).

Исто така, повисока сензитивност на течната цитологија наспроти конвенционалната цитологија во откривањето на цитолошките абнормалности потврдени и со хистолошка дијагноза била презентирана во студијата на Бирмен (Beerman) и сор. (96,2% наспроти 92,0%) (91).

Спротивно на оваа студија, пак, проспективното рандомизирано истражување спроведено од Обвегесер (Obwegeser) и сор. не покажало значајна разлика на двете техники во однос на сензитивноста и специфичноста (92). Неодамна, во студијата спроведена од Зарчи (Zarchi) и сор., во која биле споредувани трите методи (конвенционален PAP тест, течна цитологија и колпоскопија) со цервикална биопсија, не биле пронајдени значајни разлики во сензитивноста и специфичноста на LBC наспроти конвенционалниот PAP тест (55,3% наспроти 51% и 77,7% наспроти 66,6%) (93).

Превентивната работна група на САД - United States Preventive Task Force (USPSTF) и Американското здружение за борба со канцерот - American Cancer Society (ACS) не препорачуваат рутински скрининг секоја година. Нивните препораки се насочени кон тестирање секои три години за жени на возраст од 21-65 години, а не се препорачува рутински скрининг за цервикален карцином за жени помлади од 21 и постари од 65 години. Американското здружение за борба со канцерот - American Cancer Society (ACS), Американското здружение за колпоскопија и цервикална патологија - American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), Американското здружение за клиничка патологија - American Society for Clinical Pathology (ASCP) и Превентивната работна група на САД - United States Preventive Task Force (USPSTF) препорачуваат истовремено тестирање за скрининг на жени на возраст од 30 до 65 години секои 5 години или само PAP тест секои 3 години (94).

2.3.3. HPV ТЕСТИРАЊЕ КАКО ПРИМАРЕН СКРИНИНГ

Овие методи се засновани на детекцијата на HPV-DNA и генотипизација на вагинални и цервикални брисеви/размази.

Во Европа, неколку рандомизирани контролирани студии покажале дека скринингот заснован на HPV е посензитивен во откривањето на CIN 2 и CIN3 при првиот скрининг, со што овој пристап се покажал како корисна алатка во примарниот скрининг. Ријкарт (Rijkaart) и сор., во популационо-базирана кохортна студија која опфатила 25.871 жени на возраст од 29 до 61 години, (VUSA-Screen study), прикажале повисока сензитивност на hr-HPV тестирањето наспроти цитолошкиот тест (91,9% наспроти 64,6%) во откривањето на CIN3+. Така, hr-HPV тестот покажал 3,1% пониска специфичност во откривањето на CIN 3 во споредба со конвенционалната цитологија, а 27,3% повисока сензитивност. Сепак, лажно позитивните резултати поради ниската специфичност на HPV тестот може да се менаџираат со цитолошка тријажа и со упатување на колпоскопија само на оние жени кои се HPV позитивни со абнормален PAP наод. Во истава студија, ризикот за CIN 3+ кај жените со негативен hr-HPV бил многу низок (0,06%; 95% CI: 0,02-0,46%) во споредба со оној кај жените со нормален цитолошки наод (0,26%, 95% CI: 0,20-0,65%). Исто така, ризикот за CIN3+ бил многу низок (5,22%) кај жените со позитивен hr-HPV со нормален наод на Pap тестот во споредба со жените со позитивен hr-HPV со абнормален Pap наод (42,2%). Со ова, авторите го поткрепиле заклучокот дека hr-HPV тестот во комбинација со цитолошка тријажа кај жените со позитивен HPV на возраст од 30 и над 30 години, е ефикасен во идентификување на жените со ризик за CIN3+ (95).

Во една голема популационо-базирана рандомизирана контролирана студија (POBASCAM) со петгодишно следење на пациентите, конечните резултати покажале дека на вториот скрининг, каде сите жени биле прегледани со комбинирано тестирање, биле откриени помалку CIN 3 лезии во експерименталниот крак (ко-тестирање во основа) во споредба со контролната група (цитологија во основа) (RR 0,73, 95% CI 0,55–0,96; p=0,023), како и помалку цервикален карцином во контролниот крак (RR 0,29, 0,10–0,87; p=0,031). Оваа студија исто така истакнува дека HPV-DNA тестирањето може да почне на 30-годишна возраст, бидејќи на двата скрининг прегледа не била забележана

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

никаква разлика помеѓу контролниот и експерименталниот крак за откривање на стапката за CIN 2 и CIN 3 кај жените на возраст од 29-33 години и од 34-56 години (за CIN3 0,97 наспроти 0,95 и за CIN2 1,01 наспроти 1,11) (96).

Науклер (Nausler) и сор. извеле пресечна студија на случаи и контроли во рамките на популационо-базираното рандомизирано контролирано истражување (Swedescreen) во кое вклучиле 6.257 жени на возраст од 32-38 години во експерименталниот крак. Сензитивноста на тестирањето заснована на HPV за откривање CIN3+ била 96,0% (95% CI = 86,3% до 99,5%) и само 74,0% за цитолошкото тестирање (95% CI = 59,7% до 85,4%).

Исто така, комбинираното тестирање со цитологија и HPV-DNA тестирање во споредба со тестирањето само со цитологија покажало зголемена сензитивност за откривање на CIN2+ до 40% и до 35% зголемена сензитивност за откривање CIN3+, додека пак, PPV не бил значајно намален (релативен PPV = 0,76; 95% CI = 0,52 до 1,10) (97).

Во студијата која следела по четирите рандомизирани контролирани истражувања (NTCC, ARTISTIC, Swedescreen и POBASCAM) предводена од Ронко (Ronco) и сор., иако во првите 2,5 години не биле забележани значајни разлики во стапката на откривање на цервикалниот карцином помеѓу експерименталниот крак (HPV-базирано) и контролниот крак (базирано на цитологија), по подолг период на следење (средно времетраење од 6,5 години) инциденцијата на цервикалниот карцином била значајно пониска во експерименталниот крак (RR, 0,45; 95% CI, 0,25- 0,81) (98).

Во 2011 година, Американското здружение за борба со канцерот - American Cancer Society (ACS), Американското здружение за колпоскопија и цервикална патологија - American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), Американското здружение за клиничка патологија - American Society for Clinical Pathology (ASCP) препорачале цитологија и ко-тестирање како примарни скрининг алтернативи, но само hr-HPV тестирањето како примарен тест не било тогаш препорачано.

Во 2014 година, за прв пат US FDA го одобриле HPV тестирањето како прв избор за скрининг на цервикален карцином кај жени на возраст од или над 25 години, по што следела дебата и критика меѓу експертите во врска со тоа дали има доволно докази да се поддржат промени во стратегиите за скрининг програмите.

Во 2015 година, Хју (Huh) и сор. понудиле клинички водич за hr-HPV во примарниот скрининг, откако направиле преглед на податоците од неколку големи клинички истражувања и препорачале дека hr-HPV тестирањето може да се смета како опција на цитолошки-базираниот скрининг и ко-тестирање, бидејќи жените со негативен hr-HPV се со помал ризик за CIN 3 (пониска стапка на детекција за CIN 3) во споредба со оние со нормален Pap тест (99). Овие препораки главно се засновале на резултатите од неколку рандомизирани клинички студии спроведени во Европа, како и на оние од истражувањето ATHENA. Според ATHENA – голема американска проспективна студија која вклучила 47.208 лица и во која се оценувало изведувањето на примарното HPV тестирање за CIN и цервикален карцином, HPV примарното тестирање кај жени ≥ 25 години било посензитивно за откривање CIN3+ во споредба со Pap тестирањето и ко-тестирањето (100).

Во меѓувреме, соодветната возраст кога треба да се почне со hr-HPV скрининг е сè уште контроверзно прашање, иако постои усогласеност помеѓу експертите дека HPV-базираниот скрининг не е полезен за младите жени, бидејќи HPV инфекциите се високо превалентни и најчесто од минлива природа кај оваа возрасна популација. Посериозни лезии биле откриени кај жените на возраст од 25-29 години отколку кај жените на возраст ≥ 40 години (35,8% за CIN 2+ и 34,3% за CIN 3+ биле најдени кај оваа возрасна група 25-29) (100).

И покрај зголемената детекција на болеста кај оваа возрасна група, зголемениот број на колпоскопии, загриженоста кај пациентите и прекумерниот третман на регресивните лезии, овој пристап го прави доста неразумен. Сегашните препораки вклучуваат ко-тестирање на возраст од 30 години, додека пак жените негативни за hr-HPV треба да се подложат на повторен скрининг секои 3 години. Жените негативни за HPV со ASCUS резултати треба да се следат со ко-тестирање до 3 години пред да се вратат на рутински скрининг, и како што е неодамна докажано, со вакви резултати

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

жените не можат да прекинат со скрининг на 65-годишна возраст. Жените позитивни за HPV со ASC-US резултати треба да бидат упатени на колпоскопија (94).

Што се однесува до клиничките процедури на третман на HPV-позитивните жени, во моментот се изведуваат неколку студии, но сегашната препорака заснована на податоците од ATHENA истражувањето го поддржува алгоритмот според кој колпоскопијата се изведува кај HPV 16/18 позитивни жени, а рефлексната цитологија кај жени кои се покажале позитивни за 12 други hr-HPV типови со последовна колпоскопија доколку резултатот од PAP тестот е \geq ASC-US (100).

Неодамна, во една голема ретроспективна студија направена од Жоу Х (Zhou H) и сор., сензитивноста на цитологијата за детекција на лезии од висок степен изнесувала 90,9% (95% CI, 86,7%-94,1%) и само 91,3% (95% CI, 87,1%-94,5%) за hr-HPV тестирањето, па така ко-тестирањето се покажало како подобар пристап за откривање на сериозни цервикални лезии (101).

Понатаму, во ретроспективната пресечна студија на Блат (Blatt) и сор., биле прегледани/анализирани 256.648 резултати (возрасна група од 30 до 65 години). Било заклучено дека ко-тестирањето е посензитивно за CIN 3 и за откривање на цервикалниот карцином (98,8%) во споредба со тестирање само со позитивна цитологија (91,3%) и само со позитивно HPV тестирање (94%) (102).

Засновано на овие најнови податоци, може да се каже дека ко-тестирањето е поверодостојна/посигурна алтернатива за откривање CIN3+ и цервикален карцином отколку цитологијата или примарното hr-HPV тестирање.

Некои други методи на скрининг за визуелен преглед на цервикална неоплазија вклучуваат: визуелен преглед со примена на оцетна киселина (VIA), визуелна инспекција со Луголов јоден раствор (VILI), непотпомогната визуелна инспекција (VI) и колпоскопија.

Сепак, на оваа клиника се поддржува политиката на испитување со колпоскопија по единечен ASCUS резултат кај жените со низок социоекономски статус.

2.3.4. ПРОЦЕДУРИ НА ТРЕТМАН НА ЦЕРВИКАЛНИ ПРЕКУРЗОРНИ ЛЕЗИИ

Главната цел во процедурите за третман на CIN лезиите е секако да се спречи прогресијата на болеста, а да се избегне третирањето на лезиите од низок степен кои може да се повлечат. Опциите за третман вклучуваат аблативен третман (криотерапија, ласерска вапоризација) и ексцизионен третман (конизација со студено сечиво, LEEP и ласерска конизација). Двете постапки се со мала стапка на морбидитет, но што се однесува до дијагностичкиот примерок, ексцизионите методи подобро се изведуваат бидејќи тие не се поврзани со термални артефаки со што се обезбедуваат посоодветни примероци за хистолошко испитување. За жените со CIN 1 и претходни PAP резултати како LSIL или ASC-US и оние позитивни за HPV 16/18, се препорачува ко-тестирање на една година. Доколку резултатот од претходниот Pap тест е HSIL или ASC-H, тогаш може да се примени ексцизиона постапка или опсервација со ко-тестирање на 12 и 24 месеци. Жените со двегодишен перзистентен/постојан CIN 1 треба да се подложат на третман со Loop-електрохируршка ексцизиона процедура (LEEP) (103). Предложени третмани за жени со CIN 2/3 се LEEP или конизација со студено сечиво, доколку колпоскопијата е задоволителна и за жени со CIN 2/3 и незадоволителна колпоскопија, рекурентен CIN 2/3 или ендоцервикален примерок со CIN 2/3, препорачан третман е ексцизија и неаблативни методи (104). Аблативните методи не нудат информации кои се однесуваат на присуство или отсуство на болеста во маргините на третираната зона. Во мета-анализа на 29 рандомизирани контролирани истражувања, коишто споредувале различни хируршки алтернативни третмани во однос на морбидитетот и неуспехот од лекувањето, авторите заклучиле дека ниту една од хируршките техники не е супериорна во однос на другите земајќи ги предвид наведените критериуми (105). Сепак, во однос на идните репродуктивни ризици, ексцизионите методи се придружени со повисока стапка на цервикална стеноза, зголемен ризик од губење на фетусот во вториот триместар, зголемен ризик од PPRом, зголемен ризик од предвремено породување и перинатален морталитет (106-108).

Кај жените со CIN 2/3, кои се породиле и имаат резидуална болест по конизација, препорачан метод на лекување е хистеректомија (104).

Други методи на третман како што се: фотодинамска терапија, топични агенци и циклооксигеназа-2-инхибитори, сè уште се истражуваат (109-111).

2.3.5 СЛЕДЕЊЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ ПО ЛЕКУВАЊЕТО/ТРЕТМАНОТ

Препораките засновани на Упатства на ажурираниот консензус за менаџмент/справување со абнормалните резултати од скрининг тестови за цервикален карцином и прекурзорни лезии од 2012 година вклучуваат ко-тестирање на 12 и 24 месеци кај жени лекувани/третирани за CIN 2, CIN 3 и CIN 2/3. По негативното ко-тестирање, се препорачува повторно тестирање за три години. Исто така, се препорачува колпоскопија со ендоцервикален примерок ако резултатите од некој од овие тестови не се во ред. Инаку, за жените со негативни резултати од тестовите, рутинскиот скрининг продолжува и во наредните 20 години. Како што е нагласено во овие упатства, хистеректомијата или повторуваните третмани се неприфатливи доколку се базирани само на HPV позитивните тестови. Сепак, кај жени со рекурентни или перзистентни/постојани CIN 2, CIN 3 или CIN2/3, прифатливи се повторлива дијагностичка ексцизија или хистеректомија (104).

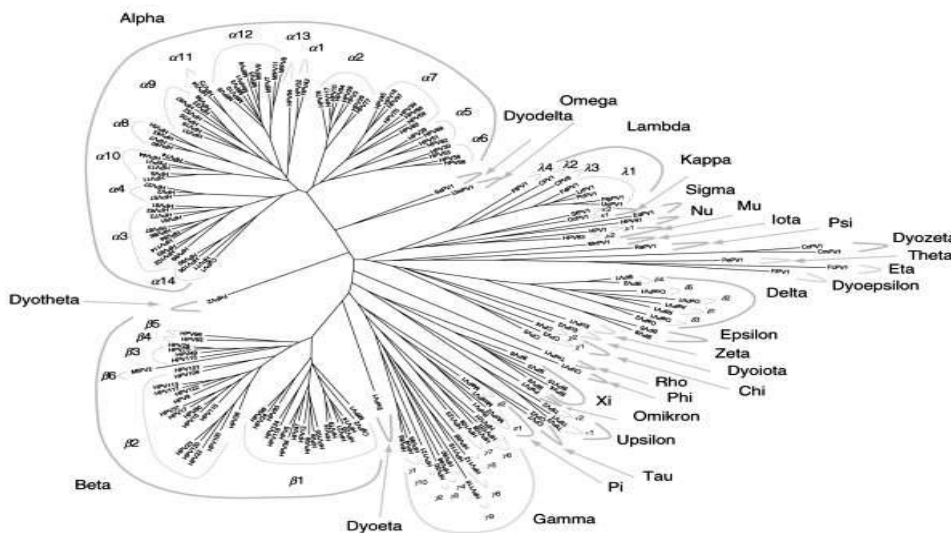
2.4. ХУМАН ПАПИЛОМА ВИРУСИ (HPVs)

2.4.1 Таксономија, класификација и организација на геномите

Папилома вирусите (PVs) кои припаѓаат на фамилијата *Papillomaviridae*, предложено од де Вилиерс (de Villiers) и сор. во 2004 год. засновано на нивната нуклеотидна секвенца, односно еднаквост, филогенетски и патолошки својства, се мали вируси без обвивка со геноми од кружна верижна DNA (112). PVs се голема и различна група вируси кои предизвикуваат инфекција и се откриени кај птици, цицачи и влекачи. Од филогенетски аспект, овие вируси еволуирале заедно со луѓето; имаат својство за тропизам/населување во/ специеси и геномска стабилност којашто е делумна, поради отсутен тип на интра- и интер-рекомбинација (113). Таксономијата на оваа фамилија се заснова на генот L1, којшто е силно заштитен и затоа новоидентификуван HPV тип е одреден доколку L1 генската секвенца е барем 10% различна од кој и да е тип што досега е познат (112). Според Бернард (Bernard) и сор., *Papillomaviridae* фамилијата содржи 29 родови кои се создадени од 189 папилома вируси со 120 типови кај луѓето, 64 типови кај други цицачи, 3 типови кај птици и 2 кај влекачи (114). До денес, откриени се 198 различни хуман папилома вируси, по повлекувањето на 4 HPV типови (HPV типовите 46, 55, 64 и 79) (115). Околу 40 типови ги инфицираат аналната и гениталната регија кај

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

двата пола (116). Хуман папилома вирусите припаѓаат на пет родови – алфа (Alpha), бета (Beta), гама (Gamma), му (Mu) и ну (Nu) (слика 6). Сепак, најзначајните родови се смета дека се алфа 9 и алфа 7 засновани на карциногенскиот потенцијал на типовите вклучени во овие специеси/видови (α -9 со HPVс 16, 35, 31, 52, 67, 33, 58 и α -7 со HPVс 18, 68, 39, 70, 85, 59, 45, 97) (117).



Слика 6. Филогенетско дрво на Бајезиан (Bayesian) засновано на L1 нуклеотидните секвенци на 189 папилома вируси (адаптирано од Bernard *et al*, 2010)

HPVs понатаму може да се поделат на мукозни и кутани/кожни типови врз основа на нивниот ткивен тропизам. Така, алфа папилома вирусите се поделени на мукозни и кожни типови. Нискоризичните кожни типови ги инфицираат базалните епителни клетки и предизвикуваат *verruca vulgaris* или брадавици (типови 1, 2, 4, 27, 57) и *verruca plana* или рамни брадавици (типови 3, 10), додека, пак, високо- и нискоризичните мукозни типови ја инфицираат устата, грлото и анално-гениталниот епител. Што се однесува до онкогенетскиот потенцијал, тие се класифицирани во 14 високоризични типови (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68), засновани врз нивната епидемиолошка поврзаност со цервикалниот карцином, претпоставените hr-типови 26, 53, 67, 70, 73, 82 и нискоризичните типови 6, 11, 40, 42, 43, 44, 71 (118). Нискоризичните типови (alpha 10 видови) се поврзани со појава на генитални кондилони и ларингеална папиломатоза, при што типот 6 е најчест кај гениталните кондилони, а типот 11 кај ларингеалната папилома

(114). Во светски рамки HPV 16 и 18 се присутни со повеќе од 70% во цервикалниот карцином, приближно 25% до 35% во цервикалните лезии од низок степен и повеќе од 50% во цервикалните лезии од висок степен (119). Типовите од филогенетската гранка алфа-7, особено типот 18, честопати се наоѓаат во аденокарциномите (120).

Comment [U1]: од филогенетската гранка алфа-7

2.4.2. ОРГАНИЗАЦИЈА НА HPV ГЕНОМОТ

Малиот вирусен геном содржи околу 8.000 базни парови (bp) и енкодира осум или девет отворени рамки за читање (ORF). Идентификувани се три региони, и тоа: долг контролиран регион (LCR) или нагорен регулаторен регион (URR), ран транскрипциски регион којшто ги опфаќа E1, E2, E4, E5, E6 и E7 отворени рамки за читање (ORF) и доцен транскрипциски регион којшто ги кодира L1 и L2 капсидни протеини (слика 7). Иако нема отворени рамки за читање, тој содржи места за врзување со протеините E1 и E2, како и засилувачки и стивнувачки секвенци. За разлика од промотерот p97 за рани гени којшто е лоциран во контролниот регион, доцниот промотер p670 е лоциран во E7 регионот (121).

2.4.3. РАНИ ГЕНИ E1, E2, E4-E7

E1 и E2 имаат исклучително важна улога при репликација на геномот на HPV, со клучна улога во првата фаза од амплификацијата на геномот. Кај сите папилома вируси, репликациските гени (E1/E2) и гените кои ги кодираат протеините на обвивката (L1/L2) се високо конзервирани.

Comment [U2]: гените кои ги кодираат протеините на обвивката

E1 е специфична вирусна DNK хеликаза која, спротивно од клеточната хеликаза, има способност да учествува во процесот на топење и одмотување на DNK-хеликсот како и да стапува во интеракција со други репликациски фактори (122). Оваа вирусна хеликаза ефикасно се врзува за специфично врзувачко место или мотив на т.н. ORI-место на репликација со учество на E2 (123). Според тоа, репликацијата почнува откако E2 ќе се врзе за долгиот контролиран регион (LCR), го регрутира E1-репликацискиот фактор којшто понатаму се врзува за одреден мотив во ORI местото за репликација (123).

E2 има различни функции во текот на животниот циклус на вирусот. Во базалните клетки, E2 ја иницира вирусната репликација и е одговорен за зачувување на вирусниот геном (121). E2 има способност за модулирање на вирусната генска експресија преку

врзување за бројни врзувачки места во LCR, при што зголемени нивоа на E2 предизвикуваат ефикасна супресија на експресијата на E6/E7-гените (121). E2 исто така учествува во вирусната транскрипција и обезбедува поделба на геномот преку врзување на епизомите или екстрахромозомскиот вирусен геном со митотскиот хромозом, иако врзувачкото целно место за α -PVs не е сосема јасно. Синтетизиран во целосна должина, E2 генскиот продукт е полипептид наречен E2-трансактиватор или E2-TA. Тој е важен бидејќи, врзувајќи се за специфичните E2 енхансерни/засилувачки секвенци во LCR, ја контролира активноста на вирусниот промотор (122). Интеграцијата на вирусниот геном на места по случаен избор или на најчестите фрагилни/кревки места во хромозомот на домаќинот ќе доведе до губење или нарушување на функцијата на гените E1, E2 и E4 и последовна неконтролирана експресија на E6 и E7 (123). E2 исто така има про-апоптотичка активност и може да предизвика апоптоза преку p53-независен и p53-зависен пат во нормални и клетки инфицирани со HPV (124-125). Не е идентификувана E3-отворена рамка за читање (ORF) во хуманите папилома вируси.

E4 и E5 ја олеснуваат амплификацијата на вирусниот геном и експресијата на L1/L2. E4 има посебно значење за време на продуктивната фаза од животниот циклус на вирусот. Експресијата на E4 генскиот продукт E1⁺E4 е во диференцирачките кератиноцити во горните слоеви, при што инфективноста се обезбедува преку негово врзување за цитоскелетните компоненти со последовно нарушување на кератинската структура при формирањето на вирионот и негово ослободување (121).

E5 е краток трансмембрански протеин (126) вклучен во одржување на соодветна средина (милје) за репликација во епителните клетки на горните слоеви подобрувајќи го процесот на EGF-посредувано рецепторско сигнализирање (127) и е вклучен во формирање на коилоцити (127-128). Во тек на раната фаза од вирусната инфекција, тој ја поддржува репликацијата и пролиферацијата во базалните клетки преку зголемување на митогената активност на факторот на раст - ендотелин 1 (129). Тој делува како модулатор на доцните вирусни функции, преку промовирање на пролиферација во зрелите клетки и според тоа е со висока експресија во горните површински слоеви (130). Има клучна улога во имуно-евазијата бидејќи интерферира со антигената презентација и намалена експресија на гените од МНС класа I (131). Исто така, може да ја ослаби контролата на клеточниот циклус преку супресија на тумор-супресорниот ген p21 (132). Анти-апоптотичката

активност на E5 е постигната преку стимулирање на убиквитин и протеазом-посредувана деградација на про-апоптотичкиот протеин Вах (133).

E6 и E7 се рани HPV-онкопротеини кои имаат многу важна улога во прогресијата на HPV-асоцирана болест преку неколку молекуларни механизми.

E6 онкопротеинот го инактивира генскиот продукт на p53 преку E6/E6-асоцираниот протеински комплекс (E6AP), кој ја катализира убиквитинацијата на p53 и неговата понатамошна деградација во протеазомот. p53 тумор супресорскиот генски продукт е важен регулатор на транскрипцијата, кој се активира при оштетување на DNK или стрес, ги иницира патиштата на поправка на DNK, индуцира застој во растот и апоптоза. Важно е дека повеќе од 50% од карциномите кај луѓе носат мутација на овој ген, така што без правилна функција на p53, клетката е предодредена за неконтролирана пролиферација и појава на карцином. Сите високоризични хуман папилома вируси содржат C-терминален PDZ врзувачки домен, кој е важен бидејќи е вклучен во деградација на клеточните цели кои содржат PDZ мотиви и активно го регулираат растот на клетките, поврзувањето и клеточната поларност (134). Но, механизмот со кој E6 ја активира каталитичката субединица на теломеразата (hTERT) не е познат. E6 придонесува до „бесмртен“ фенотип на клетките преку засилена експресија на теломеразата, односно нејзино активирање (135).

Високоризичните E6/E7 онкопротеини ја намалуваат транскрипцијата на генот за т.н. “toll-like” рецептор 9 (TLR9) и последователно го инхибираат TLR9 сигналниот пат, така што ефикасно го избегнуваат вродениот/природниот имунолошки одговор на домаќинот (136). Имунолошкиот одговор на домаќинот е исто така модулиран и преку намалена E6-посредувана експресија на гените за интерферон, IFN- α и β , како и намалена експресија на јадрениот STAT-1 протеин, според Нис (Nees) и сор. (137).

E6 интерферира со надворешниот (преку врзување со лиганд за соодветен рецептор за смрт и активација на каспазата) и внатрешниот (преку митохондријалните про-апоптотички протеини) апоптотички пат на p53-независна апоптоза преку неколку апоптоза-асоцирани протеини како што се Вах, Мус и каспаза 8. Исто така, може да учествува во засилена регулација на сурвивин промоторот (138-139). Понатаму, постојат индикации дека E6*, кој е сплајсинг-изоформа може да има про-апоптотичка функција (139).

E7 онкопротеинот има бројни функции, но главно се врзува и го инактивира ретинобластома протеинот (*Rb*) (140) заедно со други поврзани протеини како што се p107, p130 и p105. Овие протеини, кои се врзуваат за E2F, го регулираат преминот од G1 во S фаза и според тоа нарушената асоцијација помеѓу pRb и E2F транскрипциски фактори води недвојбено до неконтролирана прогресија на S-фазата и клеточна пролиферација. Инактивација на *Rb* протеинот и активацијата на E2F транскрипцискиот фактор ги трансактивира клеточните протеини како циклин A и E кои се неопходни за вирусна репликација. По E7-посредувана зголемена експресија на циклин и циклин-зависните кинази (CDKs) следи зголемување на циклин-зависните киназа инхибитори (CDICs), особено p16^{Ink4a} којшто има улога во циклусот на клеточна прогресија преку инхибиција на S-фазата. p16^{Ink4a} превенира ослободување на E2F и фосфорилација на *Rb* протеините (141). Друг механизам со кој E7 протеинот предизвикува прекин/нарушување на клеточниот циклус е преку инхибиција на активноста на циклин-киназа инхибиторите (CKIs) p21 и p27 (142-143).

E6 и E7 индуцираат хромозомска нестабилност како резултат на амплификација на центрозомот во пролиферативните клетки, анафазни мостови, хромозомски застој, полиплоидија и анеуплоидија (144-145).

Во однос на влијанието на E7 во апоптозата, покажано е дека овој протеин се однесува како про-апоптотски и анти-апоптотски фактор во зависност од типот на клетката и типот на вирусот (139).

E7 ги инхибира TGF- β и тумор некротизирачкиот фактор α (TNF- α) и интерферира со IFN -сигнализирање преку инхибиција на IFN- α (146).

Конечно, тој има улога во епигенетското програмирање преку поврзување со хистонските деацетилази класа I [hystone deacetylases class I (HDACs)] (146).

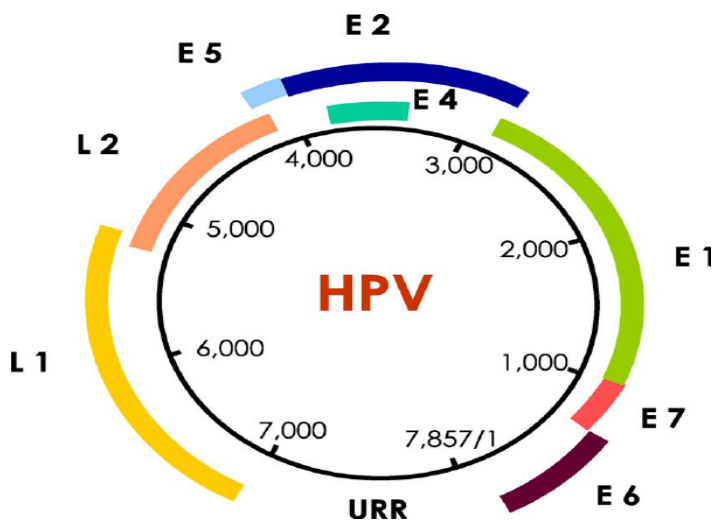
2.4.4. ДОЦНИ ПРОТЕИНИ L1/L2

L1, кој е главен протеин на капсидот (55kD), е експримиран во горните епителни слоеви во зрелите диференцирачки кератиноцити во тек на доцната фаза од животниот циклус на вирусите. L1 е способен за самоформирање во т.н. “virus-like” - честички слични на вирус (VLPs). VLPs се високо имуногени; имајќи ги предвид овие особини, развиени се VLP-базирани вакцини кои покажуваат висока заштитна моќ (147). Знајачно е дека L1 е

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

одговорен за влез на вирусот кој е посредуван од неговата интеракција со хепарин-сулфатните протеоглици на базалната мембрана, што претставува предуслов за *in vivo* инфекција (148). По L2-откинување со фурин-протеази следи врзување на вирионот за секундарен рецептор на кератиноцитите со последовна ендоцитоза и пренос до јадрото (149-150).

L2 е мал протеин кој е дел од вирусниот капсид. Тој значајно не се експримира во инфицираните базални клетки, но учествува во геномската енкапсидација при вирионското формирање со што придонесува во вирусната инфективност и ефикасно пакување на вирус. По отсекување со фурин, L2 учествува во транспорт на вирусниот геном во јадрото и во раната генска експресија при започнување на инфекцијата (151).



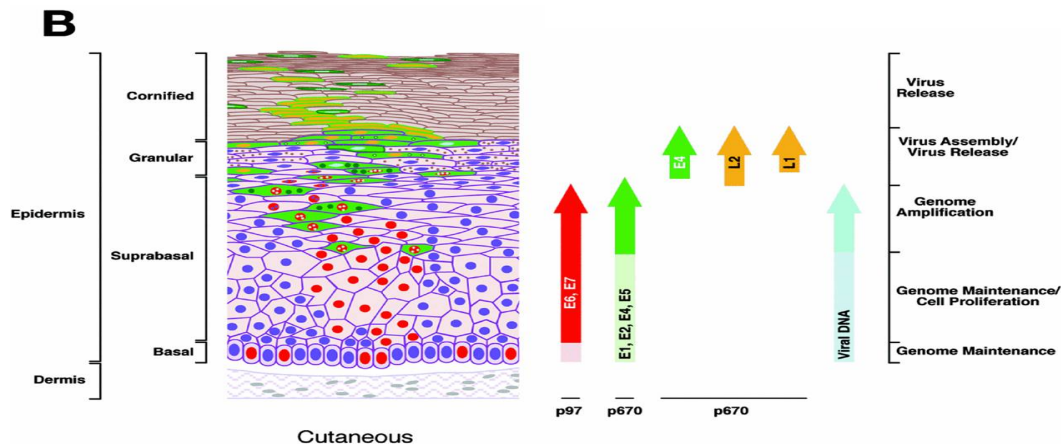
Слика 7. HPV геном со рани гени (E), доцни гени (L) и нагорен регулаторен регион (URR) (адаптирано од Munoz *et al*, 2006)

2.4.5. ЖИВОТЕН ЦИКЛУС НА HPV

HPV ги инфицираат базалните епителни клетки преку микроабрази на епителот. Присутни се два вида базални клетки во цервикалниот базален слој: **стем клетки** и **транзитни амплифицирачки клетки**. Најверојатно, HPV ги инфицира ТА клетките кои се во профаза од митотската делба со цел да иницира транскрипција на HPV гените (152). И покрај контроверзите околу вториот рецептор, вирионите стапуваат во интеракција со

хепарин сулфат протеогликаните на базалната мембрана и иако не е целосно дефинирано, алфа 6 бета 4 интегрин (153) и анексин А2 се можни втори рецептори есенцијални за ефикасна инфекција (154). TZ е фрагилно/кревко место за формирање на цервикален карцином, бидејќи на овие места, hr-HPV има нарушена генска експресија во тек на продуктивната инфекција (121). Оттука, подолго време, сквамозните клетки во зоната на трансформација дури и сквамозните цилиндрични или резервни клетки се дефинирани како целни клетки за HPV, но неодамна Херфс (Herfs) и сор. објавиле дека кубоидните клетки локализирани на сквамозно-цилиндричниот спој кои имаат уникатни морфолошки карактеристики и профил на генска експресија, не се регенерираат по ексцизија и се повеќе подложни на канцерозна прогресија по инфекција (155). Животниот циклус на вирусот е исклучиво зависен од диференцијацијата на епителните клетки на домаќинот. Животниот циклус на HPV се состои од воспоставување, одржување и амплификација или продуктивна фаза. Во првата фаза, по инфекцијата, генската експресија на E1/E2 е задолжителна за да се одржи мал број копии на епизомот, вообичаено до 200 копии по клетка во оваа фаза на иницијална геномска амплификација во базалните клетки (123). За разлика од неодредената улога на E6/E7 онкопротеините во базалните клетки, високоризичните E6/E7 имаат клучна улога во клеточната пролиферација и вирионска продуктивност во базалните и супрабазалните слоеви (121,123). E6/E7 се неопходни за повторен влез на инфицираните клетки во S-фаза, иако дури и E4/E5 придонесуваат во геномската амплификација. E5 може да ги модулира/менува доцните вирусни функции преку промовирање/зголемување на пролиферација во зрелите клетки во горните епителни слоеви (123). Според тоа, продуктивната фаза се карактеризира со геномска амплификација на/до висок број на диференцирачки кератиноцити и конечно, експресијата на големите и малите протеини на капсидот е задолжителна за напуштање на клеточниот циклус, пакување на вирусниот геном и ослободување на вирусот во горните епителни слоеви, а со тоа и ширење на инфекцијата кај нов домаќин (128).

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Слика 8. Животен циклус на HPV (адаптирано од Doorbar *et al*, 2006)

2.4.6. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ИНФЕКЦИЈА СО HPV И НЕЈЗИНАТА УЛОГА ВО МАЛИГНА ТРАНСФОРМАЦИЈА

Инфекцијата со HPV е една од најчестите сексуално преносливи болести во светот со различна инциденција и преваленција во зависност од географската област и популација. Повеќето инфекции со HPV се од минлива природа и се појавуваат по отпочнување со сексуалниот живот/сексуални односи, со значајно највисока преваленција во возрасната група од 25-35 години (156). Дан (Dunne) и сор. откриле дека, додека севкупната преваленција од инфекција со HPV, вклучувајќи ги и нискоризичните и високоризичните типови, кај 1921 жени-пациентки од САД на возраст од 14 до 59 години е 26,8%, преваленцијата на високоризичните (HR) инфекции со HPV е само 15,2% (157). Најголем број од HPV инфекциите имаат тенденција да се отстранат или повлечат спонтано по неколку месеци или две години (158-160). Доколку HPV инфекцијата не може да се открие со сензитивните методи на тестирање, тогаш се претпоставува дека инфекцијата е отстранета, иако за нејзината латентна состојба малку се знае. Жените инфицирани со високоризични генотипови и перзистентна инфекција се подложни на висок ризик да развијат сериозни/тешка форма на цервикални лезии и цервикален карцином (161). Постојат податоци дека HPV-16 опстојува/перзистира подолго од другите типови (162).

Генерално, цервикалната карциногенеза вклучува неколку чекори, почнувајќи од перзистентна хронична инфекција со еден или повеќе онкогени HPV типови, клонска прогресија на инфицираните клетки и инвазија. Вирусниот тип, високото оптоварување со вирус и инфекција со неколку онкогенски типови игра значајна/клучијална улога во перзистирањето на вирусот, повеќе отколку отстранувањето и прогресијата на болеста. Ризикот од прогресија од прекурзорни лезии во цервикален карцином директно е поврзан со HPV генотипот (163-164). E6/E7 онкопротеините преку прекин/нарушување на клеточниот циклус, геномската нестабилност и последовниот „мутаторен“ фенотип на клетката, имаат силна способност да ја доведат клетката до малигна трансформација (165). По инфекцијата преку метилација, вирусната експресија може да се супримира со епизомско одржување во базалните слоеви. Кај CIN 1 лезиите, HPV животниот циклус е комплетен (123). Кај CIN 2 и CIN 3 лезиите постои дерегулација на вирусната експресија, што доведува до вирусна геномска интеграција во хромозомот на домаќинот со консеквентна прекумерна експресија на E6/E7 и појава на цервикален карцином. Интересно е што 70% од случаите со цервикален карцином предизвикан од HPV16 имаат интегрирани секвенци и 30% содржат само епизоми (123,166). Бидејќи главната цел на скрининг програмите е идентификување на жени со зголемен ризик од цервикална болест, може да се анализираат неколку молекуларни маркери, каде спаѓаат E6/E7 mRNA, HPV секвенционирање, интеграција на вирусниот геном во хромозомот на домаќинот и вирусно оптоварување.

2.4.7. ИМУН ОДГОВОР НА ДОМАЌИНОТ И HPV ИНФЕКЦИЈА

2.4.7.1 Вроден/природен имун одговор

Отстранувањето на HPV и ерадикација на HPV-инфицираните клетки и малигно трансформираниите клетки зависи од вродените и адаптивните ефектори на имуниот систем на домаќинот. Имуниот одговор ги опфаќа вродените и адаптивните фази. Вродениот имун систем којшто е првата линија на одбрана ги опфаќа: комплементот, лизозимот, природните клетки убијци (NK), макрофагите и дендритичните клетки (DCs) како клеточни и неклеточни ефектори, додека, пак, адаптивниот имун систем ја извршува својата функција преку антителата произведени од В клетките, цитокините и цитолитичните молекули продуцирани од В клетките, цитокините и цитолитичните

молекули продуцирани од Т клетките (167). DCs, кои се наоѓаат на мукозата и епителот по созревањето во антиген-презентирачки клетки (APCs) и изразувајќи високоантигенски/МНС комплекси, ги активираат наивните Т клетки и преку стимулаторни сигнали го промовираат Т клеточно-посредуваниот одговор и исто така ги активираат В лимфоцитите. Ова е причината зошто вродениот и адаптивниот имун систем се премостуваат со дејството на APCs. Хуманите α -дефенсини се вродени/природни пептиди со антибактериско и антивирусно дејство кои се наоѓаат во цервиковагиналниот секрет. Една студија спроведена од Бак (Buck) и сор., го покажала блокирачкиот ефект на хуманите α -дефенсини 1-3 и хуманиот α -дефенсин 5 врз HPVс, додека хуманите β -дефенсини и 2 не покажале никакво дејство врз HPVс (168).

Вродениот/природниот имун систем ги детектира локално патогените преку трансмембранските “*toll-like*” рецептори (TLRs), па затоа зголемената експресија на TLR 2, 3, 7, 8 и 9 се поврзува со HPV 16 вирусното отстранување наспроти вирусното перзистирање/опстојување (169). Во оваа смисла, Imiquimod или Aldara, којшто е TLR7 агонист, се покажал ефикасен во лекувањето на гениталните брадавици, како и во третманот на вулварните и вагиналните интраепителни неоплазми (170). DCs, макрофагите и Т клетките произведуваат мали протеини, коишто се нарекуваат цитокини. Овие вклучуваат интерлеукини, интерферони и фактори на раст и се класифицирани како проинфламаторни или антиинфламаторни, што зависи од нивната улога во текот на имуниот одговор (167). Високи нивоа на проинфламаторните цитокини какви што се IL-1 α , IL-1 β и IL-8, и ниски нивоа на антиинфламаторните медијатори биле најдени кај жени со CIN 1 и CIN 3 лезии, со што се покажало дека изменетиот мукозен имунитет кај инфицирани лица со Hg-HPV го поддржува вирусното перзистирање (171).

2.4.7.2 Адаптивен имун одговор

Адаптивниот имунитет, којшто претставува втора линија на одбрана против патогените се поттикнува од изложувањето на специфичен антиген, дејствува преку антиген-специфични ефектори и се карактеризира со имунолошка меморија (167). CD4+ Т клетките или *Т клетките помошнички* (Th) иницијално се активираат во текот на адаптивниот имун одговор и дејствуваат преку цитокинска продукција додека им

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

помагаат на други имуни клетки за време на имунолошкиот одговор. Понатаму, CD4+ Т клетките се олеснувачи, а CD8+ Т клетките се адаптивни ефектори во текот на адаптивниот имунолошки одговор. CD8+ Т клетките се способни да ја инхибираат вирусната репликација и да го ограничат ширењето на патогените преку цитотоксичните молекули. Познати се бројни потсетови на Т клетки помошнички, како што е подолу опишано (167).

Th1 клетките произведуваат интерферон-гама (IFN γ), којшто е значаен во отстранување на патогените бидејќи игра улога во ширење и преживување на патогените. Th1 исто така ги произведува TNF α (167).

Th2 клетките ги произведуваат интерлеукините IL-4, IL-5, IL-13, додека IL-21 којшто е вклучен во продукција/создавање на антитела од В клетките, се произведува од *фоликуларните Т клетки помошнички (Tfh)* (167).

Во суштина, hr-HPV го одбегнува имуниот одговор на домаќинот преку модулирање на активноста на Т клетките. Во студијата на Пегини (Peghini) и сор., биле пронајдени повисоки вредности на Th1 цитокините кај лезиите од низок степен и повисоки нивоа на Th2 кај тешките форми на лезии, додека инвазивниот канцер бил асоциран со експресија на Treg клетките (172).

Регулаторните Т клетки (T reg cells), коишто припаѓаат на поткатегијата CD4+ Т-клетки имаат централна улога во супресија/сузбивање/намалување на имуниот одговор и во имунолошката толеранција (167). Интеракциите PD-1 и PD-L1 го инхибираат Т-клеточниот посредуван имунитет, па според тоа ја регулираат периферната имунолошка толеранција (173). Рецепторот за програмирана клеточна смрт (PD-1) или CD 279 и PD-L1 (програмирана смрт на лигандот-1) или CD 274 припаѓаат на B7 фамилијата на ко-стимулирачки протеини и, веќе споменатата, зголемена регулација на PD1/PD-L1 патот може да доведе до вирусно перзистирање и да придонесе за прогресија на лезиите поврзани со hr-HPV (173). Јанг (Yang) и сор. откриле зголемена експресија на PD-1 врз Т клетките и зголемена експресија на PD-L1 врз DCs кај жените позитивни за hr-HPV со различни CIN лезии (174).

Активирањето и диференцијацијата на В клетките зависи од CD4+ клетките, кои се диференцираат во Tfh клетките со цел да им помогнат на В клетките да ја извршуваат нивната задача во секреција на антителата. Иако постои активна секреција на IgA

изотипот во цервикалниот мукус (175), во неколку студии се пронајдени повисоки нивоа на IgG во споредба со IgA во цервикалните секрети. Не е јасно дефиниран точниот извор на цервикални имуноглобулини, но најверојатни механизми се локалната продукција, пасивниот трансфер и трансудација од крвта на вакцинирани лица од HPV. Сафаејан (Safaian) и сор. не нашле корелација меѓу вкупниот серум и цервикалните IgG и IgAs, ниту пак ефекти/дејство на хормоните или менструалниот циклус врз серумските нивоа на IgG и IgAs (176).

Што се однесува до хуморалниот имунитет којшто се спроведува преку неутрализирачките антитела по HPV инфекција, Мбулава (Mbulawa) и сор. пронашле корелација помеѓу HPV-16 инфекција и серумските HPV-16 неутрализирачки антитела, додека не нашле значајна корелација помеѓу HPV-16 инфекцијата и цервикалните антитела, а исто така, не пронашле корелација помеѓу цервикалните неутрализирачки антитела и тежината на болеста (177). Студијата на Пасмор (Passmore) и сор., во којашто се оценувала корелацијата помеѓу одговорот на оралните, цервикалните и серумските HPV-16 антитела пронашле значајно зголемување во магнитудата на HPV16 специфични IgAs кај жените со CIN 2/3 во споредба со жените со CIN

1. Треба да се истакне дека студијата покажала дека нема имуногена поврзаност меѓу мукозните компартмани како и помеѓу мукозните (цервикалните и оралните) и серумските или системските компартмани (178).

2.5. МЕХАНИЗАМ НА ОДБЕГНУВАЊЕ/ЕВАЗИЈА

Хуманите папилома вируси имаат неколку механизми на избегнување на имуниот надзор на софистицираните природни/вродени и адаптивни ефектори на имунолошка машинерија на домаќинот за да си обезбедат преживување, репликација, дисеминација и опстојување. Инфекцијата и ниската вирусна експресија се ограничени на базалните кератиноцити. Т-клеточниот посредуван имун одговор е од клучно значење за отстранување на HPV. Тој е ефикасно инхибиран од E7 и E5 бидејќи тие ја намалуваат експресијата/регулацијата на МНС класа I/II комплексот, со што се инхибира презентацијата на вирусните пептиди на имуниот систем (179-180). Хуман папилома вирусите се нелизирачки вируси со интраепителен животен циклус. Тие не иницираат

инфламаторен одговор и тоа е причината зошто во раните фази по инфекцијата не е постигната активна миграција на дендритичните клетки (DC) за да обезбедат проинфламаторно повољно микроопкружување (181). Благодарение на активноста на Е6 во Е-кадхерин-посредувана адхезија на местото на инфекција, бројот на антиген-презентиращките клетки или Лангерхансовите клетки е значајно намален со понатамошно онеспособување на Т-клеточната цитотоксична активност (182). Нема крвна фаза и нема виремија, што дополнително го ограничува откривањето на вирусните антигени од страна на имуниот систем на домаќинот и се нарушува серолошкиот одговор (183). Високоризичните типови на HPV интерферираат со IFN патот преку намалена експресија на IFN- α и IFN- β и на овој начин се прекинува антивирусната, антипролиферативната и антиангиогенската функција на интерфероните (137). Други механизми на одбегнување вклучуваат инхибиција на цитокините и хемо-атрактантите, модулација на интрацелуларното сигнализирање и инхибиција на апоптозата (181). Е5 го користи надворешниот пат за да превенира апоптоза преку опструкција на Fas-лиганд и TRAIL-поттикната апоптоза, исто така и со внатрешниот (митохондријален) апоптотички пат преку деградација на Вах-протеинот (133,184), додека Е6 анти-апоптотичката активност се реализира преку p53-зависна (преку убиквитин-протеазомска деградација на p53) и p53-независен пат (протеазомска деградација на Вах-апоптотичкиот протеин) (185-186).

2.5.1. HPV ВАКЦИНИ

2.5.1.1 Профилактички, терапевтски и RNA-базирани вакцини

Развојот на вакцините е тесно поврзан со истражувањето предводено од Кирнбауер (Kirnbauer) и сор., кои покажале дека L1 капсидниот протеин е способен да се соедини/организира во структури кои се високоимуногени и овие партикли/честички може да предизвикаат серолошки одговор сличен како кај природната инфекција (187) и на тој начин да се овозможи развој на вакцините против HPV инфекција.

Врз основа на податоците од Харо (Harro) и сор., три интрамускулни дози на HPV 16 L1 VLP вакцина е докажано дека не само што се безбедни по здравјето кај здрави

доброволци туку и дека предизвикуваат значаен серолошки одговор (188). По завршување на фаза 2 и 3 во клиничките студии, актуелни се/во примена се две комерцијално достапни вакцини, бивалентната HPV 16/18 L1VLP вакцина или Cervarix и Gardasil која е четворовалентна HPV6/11/16/18 L1 VLP вакцина. Иако заштитните механизми не се целосно разјаснети, зголемениот клеточен одговор и одговорот на цитокини како и високиот титар на имуноглобулини IgG во серум и цервикс претставуваат задоволителна заштита против HPV инфекцијата (189). Спротивно на HPV вакцините кои нудат заштита од инфекција, во развојот на вакцини за терапевтска примена примарна цел е третман на лица кои се веќе инфицирани со HPV-поврзани болести и имаат цервикален карцином. Главно, овие вакцини се насочени против E6/E7 онкопротеините и помагаат да се индуцира клеточно-посредуван одговор преку презентирање на E6/E7 антигените на антиген-презентирачки клетки (APCs) со последовна активација на CD8⁺ цитотоксичните Т-клетки и CD4⁺ помошни Т-клетки (189). Има различни видови на терапевтски вакцини: вакцини базирани на бактерии и вирусни вектори, протеинско-пептидни, нуклеинско киселински (DNA и RNA) вакцини и вакцини базирани на дендритички клетки (190). Што се однесува до RNA-базирана терапија, студијата на Џијанг (Jiang) и Милнер (Milner) за првпат покажала „стивнување“ на E6/E7 генот со примена на siRNA во цервикални клетки позитивни за HPV (191). Бидејќи овие онкогени се препишуваат како бицистрон, стивнувањето на бицистрон E6/E7 со синтетски siRNA во SiHa клетките со последовна експресија на p53 и pRb протеинот е веќе претходно објавено (192). Сепак, RNA-базирана терапија е генска терапија која ветува; дизајнот на siRNA секвенците, клонирачките вектори и транспорт до специфични места претставуваат важен проблем пред да започне нивната широка примена во клиничката пракса.

2.6. СТРУКТУРА НА ТЕЛОМЕРИТЕ

Теломерите се хексануклеотидни (TTAGGG) повторувачки структури, поврзани со неколку протеини наречени шелтерини и се лоцирани на краевите на секој хромозом (193). Овој комплекс на заштитни протеини наречен шелтерин комплекс се состои од теломер повторувачки фактор 1 и 2 [Telomere Repeat Factor 1 and 2 (TRF1 и TRF2)],

репресор и активатор протеин [Repressor and Activator protein 1(RAP1)], заштитникот на теломер 1 [Protection of telomere 1 (POT1)], трипептидил пептидаза 1- [Tripeptidyl peptidase 1 (TPP1)] и TRF1 и интерактивниот јадрен протеин (TIN2) (193). Тие имаат фундаментално значење во зачувувањето на хромозомскиот интегритет и функционираат како молекуларен часовник на клетката.

Теломерите за првпат се откриени во 1930 год. од страна на Милер (Muller) и МекКлинтон (McClintock) кои во испитувањата на *Zea Mays* и *Drosophilamelanogaster* користеле цитогенетската техника. Заклучиле дека теломерите го зачувуваат хромозомскиот интегритет и ги штитат хромозомите од слепување на еден крај со друг крај на хромозомот /слепување на хромозомите на нивните краеви (194-195).

Подоцна, во 1978 год., студиите врз *Tetrahymena thermophila* покажале дека теломерната DNA секвенца се состои од TTGGGG повторувања, која е слична со TTAGGG/AATCCC секвенцата на теломерите кај луѓето (196).

Теломерите служат како капи на краевите на хромозомите, заштитувајќи ги нив од меѓусебно слепување по принцип крај со крај; тие го компензираат скратувањето на хромозомот благодарение на т.н. “end-replication” проблем/проблем на репликација на краевите на хромозомите/ и се вклучени во неколку биолошки функции како што се генската експресија, хромозомска репликација и хомологна рекомбинација и што е важно служат како молекуларен часовник кој го ограничува животниот век на нормалните клетки и нивното стареење (197). Прогресивното скратување на теломерите во клетката е поврзано со стареењето. Во 1960-те Хејфлик (Hayflick) забележал дека клетките се делат сè додека не достигнат една граница и овој ограничен капацитет за делба е наречен репликативна старост или фаза на смртност 1 (M1) што зависи од критичното скратување на теломерите (198). Во услови кога генските продукти p53 и Rbp се инактивирани од страна на E6/E7 онкопротеините, клетките може да ја избегнат контролата на клеточниот циклус и потоа да продолжат со репликација, при што влегуваат во фазата на смртност 2 (M2) која се карактеризира со масивна смрт на клетките и многу кратки теломери (199). Не толку честата фракција на клетките може да се стабилизира преку одржување на должината на теломерите со активација на ензимот теломераза (199), иако алтернативното продолжување на теломерите (ALT) е друг механизам на одржување на теломерите (200).

2.6.1. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМОТ ТЕЛОМЕРАЗА И МАЛИГНА ТРАНСФОРМАЦИЈА

Теломеразата е рибонуклеопротеински ензимски комплекс кој се состои од теломеразна-реверзно транскриптазна компонента (hTERT), клучна компонента за активација на теломеразата, RNA урнек компонента (TR) и субединиците на теломеразата, дискерин (DKC), рептин и понтин (201-205) Nop10; NHP2 и мали рибонуклеопротеини (206-208).

Теломераза-поврзаните протеини ја модулираат активноста на теломеразата и овозможуваат пристап на теломеразите до теломерите (197).

Генот TERT во човечкиот кариотип е лоциран на 5p 5.33 (204), а генот TERC се наоѓа на локација 3q26.3. RNA субединицата е експримирана во сите човечки соматски клетки, па само *hTERT* е од клучно значење за продолжување на теломерите и активација на теломеразата користејќи ја RNA урнек компонентата (193).

Кај луѓето, експресијата на генот TERT, којашто е есенцијална за активноста на теломеразата во тек на туморогенезата, од друга страна, може да предизвика апластична анемија, *dyskeratosis congenita* и други болести наречени теломеропатии поврзани со нивната нарушена функција и скратување на теломерите (209)

Покрај фактот што е најважен фактор за активноста на теломеразата во тек на карциногенезата, човечкиот TERT игра улога во прогресија на карциномот независно од активноста на теломеразата.

Забележително, алтернативни т.н. “сплајсинг” варијанти може да предизвикаат антиапоптоза и клеточна пролиферација (210-211).

Исто така, за одбележување е што TERT поседува и нетеломерни функции, главно поврзани со негова транслокација во митохондриите во тек на клеточниот оксидативен стрес (212).

Теломеразата компензира за ”end-replication problem” - проблемот на репликација на краевите на хромозомот преку додавање на хексамерна TTAGGG секвенца на краевите на хромозомите со што ја штити клетката да навлезе во фаза на смртност и обезбедува бесмртен фенотип на клетките со последовна неконтролирана пролиферација (213).

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Теломеразна активност е забележана кај 80-90% од карциномите кај луѓето, вклучувајќи и цитолошки примероци, како кај карциномот на: дојки, бели дробови, желудник, мочен меур, цервикс и колоректален карцином, како и кај преканцерозните лезии (214), но нормалните соматски клетки не покажуваат детектибилна или покажуваат ниска теломеразна активност како резултат на репресија на транскрипцијата на генот *hTERT* (215-216).

Од друга страна, теломеразната активност е забележана во неколку студии на нормална мукоза на колон и тенките црева (217-219).

hTERT со помош на имунохистохемски методи првенствено е детектиран во супрабазалните слоеви на нормалниот цервикс (220). Исто така, ендометријалните клетки покажуваат висока теломеразна активност во зависност од фазата на менструалниот циклус (221-225).

Оттука, во физиолошки услови, теломеразата е активна во високопролиферативни нормални клетки како што се Т и В-лимфоцитите, герминативните и стем клетките, епителните базални клетки и инфламаторните клетки, клетките со акантоза и метаплазија се теломераза-позитивни клетки. Детектибилна теломеразна функција е забележана во плацентарно ткиво и бенигни хидатидиформни моли како и во хориокарциноми (226).

Во основа, клеточната бесмртност се постигнува со избегнување на стареењето и клеточен неограничен пролиферациски потенцијал кој следи потоа, а тоа се постигнува преку два механизма кои овозможуваат одржување на должината на теломерите: специфично со алтернативно продолжување на теломерите (ALT) и активација на теломеразата (214).

Главен механизам на регулација на теломеразната активност е преку регулација на транскрипцијата. Има неколку молекуларни патишта на *hTERT* транскрипциска регулација како и неколку негативни регулатори и репресори на теломеразната активност во човечкиот хромозом (197).

Имено, еден од најважните механизми со кои hr-HPV учествува во малигна трансформација на инфицираната клетка, независно од прекумерна експресија на с-тус или деградација на p53, е транскрипциска зголемена регулација на генот *hTERT* преку високоризичните E6/E7 онкопротеини со последовна клеточна бесмртност и

неконтролиран потенцијал за репликација на клетките (227-228). HPV-16 E6 онкопротеинот се покажало дека ја активира теломеразата во човечките кератиноцити и клетките на цицачите независно од p53 (229). Oх (Oh) и сор. покажале дека E6 индуцира експресија на генот *hTERT* преку интеракција со *hTERT* промоторот проксимално од иницијациониот кодон (230). Иако е покажано дека E6, но не и E7, ја зголемуваат транскрипцијата на генот *TERT* со последовна индукција на активноста на теломеразата, механизмот со кој E6 ја активира транскрипцијата на генот *TERT* е енигма (228).

Студијата на Спраг (Sprague) и сор. покажала дека нема зголемување на експресијата на E6 проследено со зголемување на теломеразната активност во почетните преодни клетки (231), додека, пак, де Вајлд (de Wilde) и сор. идентификувале 32 гени експримирани кај HPV-трансформирани клетки со зголемена регулација на генот *TERT* (232). Но, се покажало дека *TERT* експресијата не е предиктор за постојаност на HR-HPV инфекцијата, неговата зголемена експресија е поврзана со лезии од висок степен (233). Податоците од Ванг (Wang) и сор. покажале зголемена експресија на генот *TERT* кај лезиите од висок степен и ниска експресија кај нормални примероци (234). Слични се и резултатите на Дјук (Duke) и неговите соработници кои ја докажале високата корелација помеѓу степенот на лезијата и теломеразната активност (235).

Според тоа, кај лезии од висок степен и цервикален карцином нарушена експресија на E6/E7 со последовна нестабилност на хромозомот, со или без интеграција на вирусниот геном во хромозомот на домаќинот е задолжителна за прекумерна експресија на *hTERT* и активност на теломеразата (123,166). Неодамна беше покажано дека HPV-индуцирана зголемена регулација на *TERT* со истовремена теломеразна активност ја поттикнува експресијата на VEGF кај HPV-инфицираните HeLa клетки (236).

Понатаму, високоризичните хуман папилома вируси преку инактивација на p53 генскиот продукт преку E6/E6AP комплекс со последовна протеазомска деградација и E7-посредувана инактивација на Rb протеинот значајно интерферира со нарушување на клеточниот циклус (166).

Амплификацијата на *TERT*, посебно во појавата на DMs е веќе објавена (237) поддржувајќи ја можноста дека еден од механизмите за зголемена регулација на *hTERT* е преку амплификација на генот *hTERT* (197).

Имајќи го ова предвид, веќе е забележано дека кај различни тумори кај луѓето постои амплификацијата на гените кои ги кодираат компонентите на теломеразата (238). Амплификација на генот *TERT* кај човечките тумори и зголемената експресија на генот *TERT* кај цервикални лезии од висок степен е објавено во повеќе студии (239-241).

Транскрипциската активација на експресијата на генот *hTERT* со с-тус онкогенот е добро проучена откако беше покажано дека индуцира експресија на *hTERT* во култура на фибробласти и човечки епителни клетки (242). *hTERT* промоторот кој е активен во бесмртните клетки, но неактивен во нормалните и смртни клетки (197), се активира доколку постои прекумерна експресија на с-тус со последовен с-тус-зависен бесмртен фенотип на клетките.

Како што е објавено од страна на Фербер (Ferber) и сор., HPV 16 и 18 се интегрираат различно во регионите на геномската нестабилност, а интересно е тоа што HPV 18 особено се интегрира во близина на сMYC прото-онкогенот (243), што оди во прилог на податоците на Биеше (Bieche) и сор., кои демонстрирале врска меѓу прекумерната експресија на MYC и експресија на генот *TERT* кај карциномот на дојка (244).

Активноста на теломеразата е исто така регулирана од страна на стероидните хормони, естроген, прогестерон и андрогените хормони. Додека естрогенот директно ја активира транскрипцијата на генот *TERT*, ефектот на прогестеронот врз активноста на *hTERT* не е директен и зависи од времетраењето на експонираноста/изложеноста (245). Дополнително, механизмите со кои андрогените ја активираат теломеразата не се идентификувани, иако тие може да делуваат директно или преку нивна конверзија во естрогени (197).

Во поглед на епигенетските промени, изменетиот статус на метилација, резултира со зголемена регулација на прото-онкогените и со супресија на тумор-супресорните гени, па оттука произлегува дека метилацијата на *hTERT* промоторот, дури и делумно, може да е вклучена во *hTERT* транскрипцијата.

Иако специфичен образец на метилација на *hTERT* промоторот не е дефиниран ниту пак е покажано дека *TERT* промоторот примарно ја регулира *TERT* експресијата и транскрипцијата, метилацијата на специфични места има важна улога во експресијата на *hTERT* (197).

И покрај големиот број студии кои ја анализираат биолошката важност на вирусната DNA метилација во појавата на цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии, значењето на вакви појави на метилација во доцните вирусни региони како и метилациски-посредувана зголемена или намалена регулација на microRNA останува нејасна (246-247).

E6/E7 онкопротеините може да интерферираат со метилацијата на DNA преку зголемена регулација на DNA метилтрансфераза DNMT1 или преку индукција на деметилазите KDM6A и KDM6B.

Освен тоа, обете може да предизвикаат промени во експресијата на некодирачките гени или microRNA (248).

Помеѓу посттранслациските модификации, најважен фактор вклучен во активноста на теломеразата е фосфорилација на *hTERT*, дури и независно од регулацијата на транскрипцијата (197).

На овој начин, преку фосфатидилинозитол 3-киназа сигналниот пат, Акт киназата може да ја активира теломеразата преку фосфорилација на *hTERT*; од друга страна, фосфорилацијата на *hTERT* посредувана од c-Abl тирозин киназа покажува инхибиторен ефект врз теломеразната активност (197,249).

Неколку студии го поддржуваат мислењето/ставот дека нормални клетки **еспримираат** различни репресори на транскрипција и дека овие репресори на теломеразата се наоѓаат на краткиот крак на хромозомот 3 кај луѓето (250).

Од друга страна, активноста на теломеразата е инхибирана од прекумерна експресија на p53, p16, p21, pRB, тумор супресор протеинот на Wilms-ов тумор 1 (WT1) и E2F (251).

Други фактори кои директно влијаат на транскрипцијата на *hTERT* се IFN- α и TGF- β (252-253).

Честопати, зголемената регулација/прекумерна експресија на *hTERT* е поврзана со прогресија на карциномот и лоша прогноза кај напреднати болести и претставува независен предиктивен фактор во клиничкиот исход на болеста, со потенцијална улога како ран биомаркер на болеста. Според тоа, *hTERT* предизвикува интерес за негова примена како ран дијагностички и прогностички маркер и како цел за терапија/третман

Comment [U3]: еспримираат терминот е етаблиран во универзитетски учебник со консултација со професор од Филолошки факултет
Потребно е да се провери и евентуално да се замени во целиот текст

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

на карциномите во иднина (254); сите овие претпоставки се врз основа на податоците дека *hTERT* често е со зголемена експресија во бесмртните клеточни линии и туморските ткива во споредба со нормалните ткива.

И покрај интензивните истражувања кои се фокусирани на теломеразната активност и нејзината поврзаност со HPV инфекцијата, нејзината најзначајна улога како ран дијагностички маркер и нејзината прогностичка вредност, главно во премалигните цервикални лезии сè уште останува мистерија (255). Оваа теза е со желба да се најдат клинички корисни молекуларни маркери, кои може да ни обезбедат повеќе дијагностички и предиктивни информации во врска со HPV-поврзана цервикална болест, користејќи молекуларно-базиран пристап преку мерење на нивото на *hTERT* mRNA и детекција на HPV.

3. МОТИВ ЗА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Ова е прво истражување спроведено на Косово, а кое се однесува на преваленцијата и инциденцијата на инфекциите со хуман папилома вирус (HPV) и HPV генотиповите. Онкогените типови презентирани во оваа студија можат да дадат насоки во имплементација на превентивните стратегии за цервикален карцином во Косово во блиска иднина. Понатаму, често дискутирано прашање е прекумерниот или недоволниот третман на пациентите со диспластични лезии. Според тоа, раните биомаркери како што се HPV генотипизацијата и нивоата на експресија на генот *TERT*, особено кај пациенти со висок ризик може да бидат корисна алатка за тријажа, оптимизиран алгоритам за скрининг и индивидуализиран менаџмент/справување во клинички услови. Нивната примена би се рефлектирала во зголемената дијагностичка точност, намалување на несигурноста кај нашите пациенти, минимизирање на непотребните дијагностички и терапевтски процедури, подобрување на идентификацијата на жени со ризик за цервикален карцином и намалување на трошоците во земјите во развој, каква што е Косово.

4. ХИПОТЕЗИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Нивоата на експресија на генот *TERT* може да помогнат во разграничувањето на високоризичните HPV инфицирани пациенти со абнормални брисови и да ја предвидат прогресијата кон поодминати/понапреднати неопластични лезии или инвазивен канцер од мноштвото пациенти чишто абнормалности спонтано ќе се повлечат.

5. ЦЕЛИ НА СТУДИЈАТА

Главни цели на студијата беа:

1. Да се процени поврзаноста на нивоата на експресија на генот *TERT* со цервикалните примероци дијагностицирани со различни цитолошки групи, по потврдена инфекција со HPV, и да се идентификуваат раните молекуларни маркери со клиничка апликација.
2. Да се покаже значењето на комбинираната употреба на нивоата на експресија на генот *TERT* и високоризичната HPV генотипизација во дијагнозата и краткорочната прогноза на преканцерозните лезии и цервикалниот карцином.

5.1. СПЕЦИФИЧНИ ЦЕЛИ НА СТУДИЈАТА

1. да се оцени дијагностичката и веројатната прогностичка улога на нивоата на експресија на генот *TERT* во цервикалната карциногенеза;
2. да се оцени корелацијата меѓу нивоата на експресија на генот *TERT* и цитолошките подгрупи;
3. да се оцени корелацијата/поврзаноста меѓу HPV инфекцијата и нивоата на експресија на генот *TERT*;
4. да се определи сензитивноста и специфичноста на овие биомаркери во детекцијата на прекурзорни лезии и цервикалниот карцином во текот на скринингот;
5. да се споредат нивоата на експресија на генот *TERT* кај пациентки со нормални цервикални наоди, LSIL, HSIL, ASCUS и цервикален карцином.

1. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

6.1. ЕТИЧКИ ПРОТОКОЛ

Протоколот за студијата беше одобрен од Етичката комисија на Универзитетскиот клинички центар во Косово со референтен број 1/1292/ 2016, и истражувањето беше спроведено почитувајќи ја приватноста и доверливоста на податоците добиени во истражувањето. Сите пациенти дадоа согласност за учество во студијата. Нивното учество беше исклучиво на доброволна основа и сите пополнија прашалник пред да почне постапката на собирање примероци (врз доброволна основа). На учесниците во истражувањето внимателно и детално им беше објаснето за: целта на истражувањето, типот на истражувачките постапки, нелагодноста/непријатноста/ при испитувањето, придобивките и довербата. Оваа проспективна контролирана студија се изведуваше во Универзитетскиот клинички центар во Приштина, на Клиниката за акушерство и гинекологија кај пациенти кои беа/биле подложени на скрининг за цервикален карцином, а се одвиваше во периодот од септември 2015 до септември 2016. Молекуларно-генетските анализи се изведуваа на Катедрата за молекуларна биологија и генетика на Факултетот за природни и математички науки, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Македонија. Селекцијата на учесниците во студијата беше направена според претходно дефинираните критериуми за вклучување и исклучување од студијата.

6.1.1. КРИТЕРИУМИ ЗА ВКЛУЧУВАЊЕ ВО И ИСКЛУЧУВАЊЕ ОД СТУДИЈАТА

- Жени на возраст од 20 до 65 години
- Пациентки со нормални и абнормални цитолошки наоди според упатствата од Бетезда од 2001 година
- (нормален, LSIL, HSIL, ASCUS и цервикален карцином)
- Сексуално активни жени и оние кои претходно биле сексуално активни

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

- HPV статус: негативен или позитивен со одреден генотип вклучувајќи мешани инфекции.

Критериуми за невклучување/исклучување во/од студијата

- Бременост
- Постпартален период
- Жени кои биле подложени на хистеректомија, конизација со студено сечиво или loop електрохируршка ексцизиона процедура (LEEP) во последните 12 месеци пред вклучување во студијата
- Податок за друг вид малигнитет
- Неодреден статус на HPV инфекција
- Неодредена PAP цитологија.

6.1.2. ПРЕДУСЛОВИ ЗА СКРИНИНГ

- Некористење орални или антимикробни лекови претходните 15 дена
- Немање сексуален однос 48 часа пред тестот
- Немање вагинално тушење пред PAP тестот.

6.1.3. ПОПУЛАЦИЈА

Во истражувањето беа вклучени 214 жени кои ги исполнија критериумите за вклучување во студијата (n=214).

6.1.4. КАРАКТЕРИСТИКИ НА КОНТРОЛНАТА ГРУПА

Контролната група ја сочинуваа 100 жени со нормален брис од PAP тестот, неземајќи го предвид статусот со HPV инфекција, коишто се јавија на преглед поради други причини, а не поради патолошки промени на грлото на матката, односно поради ставање или отстранување на интраутерино средство/апарат (IUD), цисторектоцела,

уродинамско тестирање, или минорни хируршки интервенции кои не беа поврзани со цервикална патологија.

6.1.5. СОБИРАЊЕ НА ПОДАТОЦИТЕ

Од сите учесници во студијата беше добиена информирана согласност. Пред да започне испитувањето, за секоја пациентка се пополнуваше специјално дизајниран анонимен прашалник за демографските и клиничко-патолошките параметри, и тоа: возраст, број на бремености, абортуси, податок за пушење, употреба на хормонски контрацептивни средства, други коморбидитети. Сите учеснички во студијата беа подложени на PAP тестирање и молекуларна дијагноза според дадениот протокол за истражување. Кај сите учеснички Pap тестот беше изведен на конвенционален начин според дадениот протокол за истражување и интерпретиран според упатствата од Бетезда од 2001 година. Сите случаи со нормални и абнормални цитолошки наоди беа предмет на молекуларна анализа за HPV DNA детекција, генотипизација и одредување на нивото на експресија на генот *TERT*. Кај секоја жена од контролната група, и кај пациентките со абнормален цитолошки наод (LSIL, HSIL, ASCUS и CC) беа земени два цервикални примерока од ендо- и од егзоцервикс. Првиот цервикален брис се земаше со четкичка за цитолошко испитување, а вториот беше подложен на молекуларна анализа за детекција на HPV DNA, и генотипизација и одредување на нивото на експресија на *TERT*, а беше земен со брис и се чуваше на -20°C за понатамошна обработка.

6.2. МОЛЕКУЛАРНА АНАЛИЗА

6.2.1. ИЗОЛИРАЊЕ НА DNA И RNA

Нуклеинските киселини (геномска DNA и вкупна целуларна/клеточна RNA) беа изолирани од сите 214 примероци со помош на Trizol-реагнесот. Концентрацијата на RNA се одредуваше кај секој изолат квантитативно со Qubit флуориметар и RNA реагенс со широк опсег на концентрации (Life Technology).

6.2.2. ДЕТЕКЦИЈА НА HPV И ГЕНОТИПИЗАЦИЈА

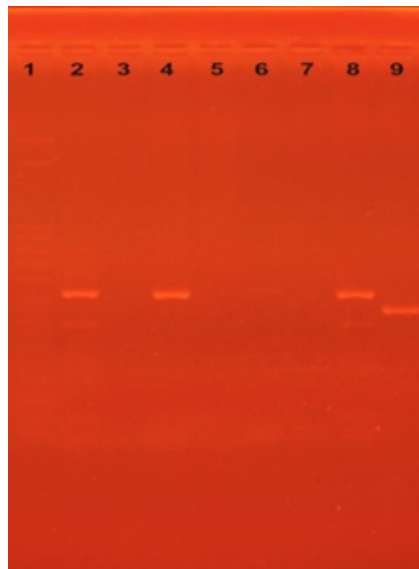
Присуството или отсуството на секвенца на L1 регионот на HPV геномската DNA се изведуваше со полимеразно-верижна реакција (PCR) на PCR 9700 машина, Applied

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

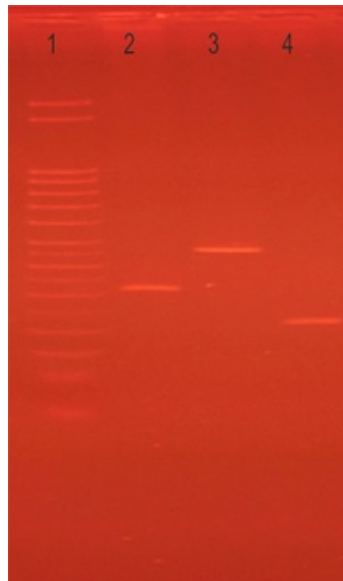
Biosystems, користејќи MY09/MY11 прајмери и последовна генотипизација со анализа на должината на фрагментите по рестрикциска дигестија (RFLP) користејќи комбинација од 3 ендонуклеази.

Илустративни примери на електрофоретограми добиени со дигитално фотографирање на трансилуминатор со UV-светлина ($\lambda_{\max}=280$ nm) се прикажани на **сликите 9 и 10**.

Сликата 9 е пример за квалитативна анализа на определувањето на присуството на DNA-секвенци од HPV, додека сликата 10 е пример за типизациска анализа за детекција на вирусниот генотип со PCR-RFLP анализата која рутински се користи за таа цел.



Слика 9. Електрофореграм на PCR-продукти од четири примероци амплифицирани со прајмерскиот пар MY09/11 (449-458 bp) за детекција на присуство на HPV. На првата позиција е аплициран маркер со позната молекулска маса (50 bp-DNA ruler, Sigma, Aldrich). На позициите 2, 4, 6 и 8 амплифицирана е само контролниот β -глобински ген (449-458 bp) за евалуација на квалитетот на геномската DNA. На деветтата позиција е амплифицирана HPV секвенцата, додека примероците на позициите 3, 5, 7 се негативни за присуство на HPV.



Слика 10. Електрофореграм на еден DNA-примерок од пациентка кој е амплифициран со прајмерскиот пар MY09/11 и последователно е дигестиран со трите рестрикциски ендонуклеази: *RsaI*, *HaeIII* и *PstI*, аплицирани на позициите 2, 3 и 4, соодветно. На првата позиција е аплициран маркер со позната молекулска маса (50 bp-DNA ruler, Sigma, Aldrich). Во овој пример, дигестијата на амплифицираната вирусна DNA индицира електрофоретски ленти кои одговараат на присуство на HPV тип 16.

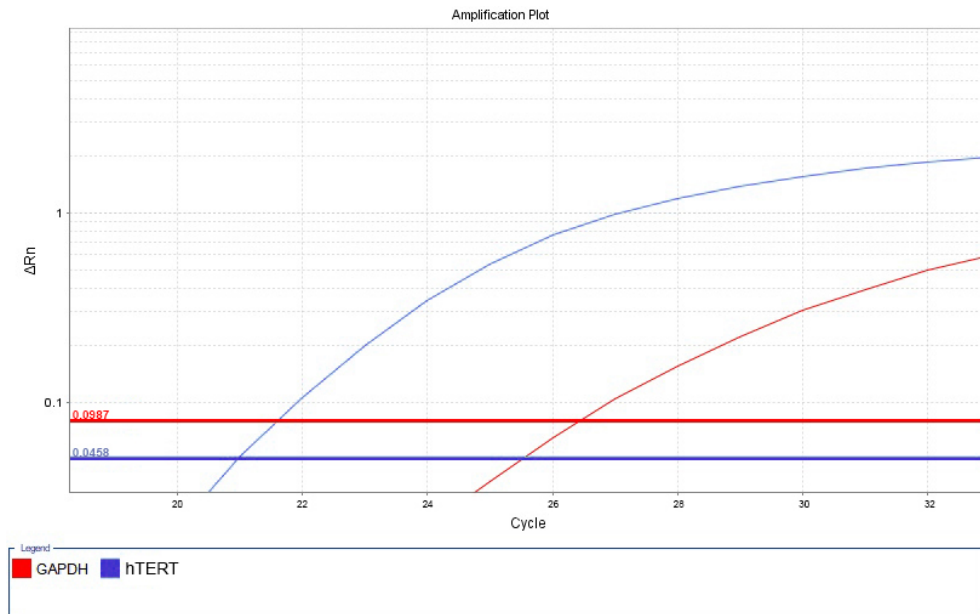
6.2.3. КВАНТИТАТИВНА ПОЛИМЕРАЗНО-ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА ЗА ЕКСПРЕСИЈА НА ГЕНОТ ЗА ТЕЛОМЕРАЗА

Квантитативната експресија на генот *hTERT* ја одредувавме со двостепена реверзна транскрипција на RNA примероци и амплификација на PCR во реално време (qRT-PCR) користејќи флуоресцентни TaqMan сонди на OneStep Real-Time PCR систем (Applied Biosystems). Вкупната RNA беше изолирана од собраните цервикални клетки од брисот користејќи TRI-реагенс, а cDNA беше синтетизирана со реверзна транскрипција користејќи High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo-Fisher) според упатствата на производителот.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Се користеа следните олигонуклеотидни прајмери и TaqMan сонди: *hTERT* ген, прајмер 5'-GCA TTG GAA TCA GAC AGC AC-3', прајмер 5'-CCA CGA CGT AGT CCA TGT TC-3', сонда 5'-FAM-CGC CCT GCT GAC GTC CAG AC-NFQ-3'; референтен ген *GAPDH*, прајмер 5'-ATG GGT GTG AAC CAT GAG AA-3', прајмер 5'-GTG CTA AGC AGT TGG TGG TG-3', сонда 5'-FAM-CCT CAA GAT CAT CAG CAA TGC CTC C-NFQ-3'. Се користеше следниот амплификациски протокол: активирање на DNA полимераза во текот на 10 мин., по што следеа 40 циклуси, од кои секој се состоеше од: денатурација на 95°C 15 сек. и комбинирана денатурација и елонгација на 70°C во текот на 1 мин. Исто така, за секој master mix се користеше и негативна контрола (ddH₂O).

Заради илустрација, приказ на екранот од пример на амплификациската крива добиена при qRT-PCR анализата на испитуваниот ген *hTERT* и референтниот ген *GAPDH*, е прикажан на **сликата 11**.



Слика 11. Амплификациска крива регистрирана при qRT-PCR анализата на транскриптите од генот *hTERT* и референтниот ген *GAPDH*. Вредноста Ct се добива според бројот на циклусот при кој соодветната крива ја пресекува базната линија определена од софтверот. Колку оваа вредност е пониска, толку е поголем бројот на mRNA-молекули кои се транскрипбирани во cDNAи потоа амплифицирани.

Нивоата на експресија на *hTERT* беа пресметувани според методот на Ливак (Livak), во однос на експресијата на домаќинскиот ген *GAPDH*. Релативните квантитативни вредности (RQ) беа претставени како $2^{-\Delta Ct}$. ΔCt вредноста се пресметуваше со одземање на Ct параметарот (threshold cycle) за генот *GAPDH* од Ct вредноста на целниот ген *hTERT* во истиот RNA примерок. Во пресметките беа вклучени три мерања за секој примерок. Диференцијалната експресија на генот *hTERT* во примерокот беше изразена како релативно ниво во смисол на тоа колку пати е пониска/повисока неговата експресија во споредба со експресијата на референтниот ген. Во оваа студија ги претставуваме конечните вредности на експресија на генот *hTERT* за секој пациент како логаритам на RQ со база 10, односно како: $\log_{10}(RQ)$.

6.3. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичката анализа на податоците во оваа студија беше изведена со методите на дескриптивна и аналитичка статистика (параметарски и непараметарски тестови). Нормалната дистрибуција на податоците за секоја серија беше оценуван со Shapiro-Wilk тест. Chi-square тест, Fisher-овиот егзактен тест и мултиваријатна анализа на варијансата (MANOVA) беа употребени да се евалуира статистичката значајност меѓу степенот на лезијата (N/B, ASC-US, LSIL, HSIL, и CC) и статусот на инфекцијата со HPV во оваа студија. Непараметарскиот двонасочен Mann Whitney-U тест и ANOVA беа употребени за да се спореди експресијата на *hTERT* меѓу цитолошките групи. Корелацијата меѓу присуството на HPV инфекција и експресијата на генот *hTERT* беше оценувана со логистичка регресиона анализа.

Прагот на статистичка значајност беше поставен на $p < 0,05$. Статистичките анализи беа направени со употреба на XL Stat 2016 статистичка програма инсталирана на Microsoft Excel 2016.

2. РЕЗУЛТАТИ

Во оваа опсервациска, контролирана студија ги анализиравме податоците и примероците од грло на матка од 214 пациентки. Од нив, 100 (46,73%) пациентки имаа нормални цитолошки резултати и ја претставуваа контролната група, додека преостанатите 114 (53,27%) пациентки имаа некаков тип на цитолошки абнормалности и затоа беа понатаму поделени, односно класифицирани врз основа на Бетезда цитолошката група. Примероците со цитолошки абнормалности вклучуваа: 45 (21,03%) пациентки со ASC-US, 37 (17,29%) со LSIL, 7 (3,27%) со ASC-H, 15 (7,01%) со HSIL и 10 пациентки (4,67%) со цервикален карцином (табела 1 и 2, графикон 1).

Табела 1. Структура на испитаниците: контролна група и група со абнормален цитолошки наод

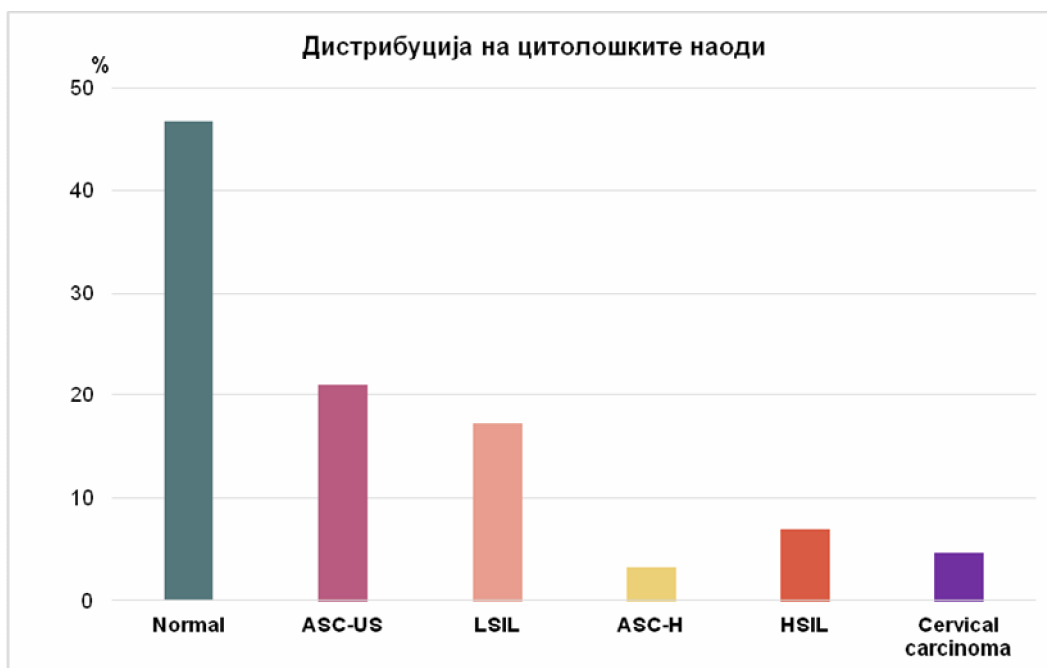
Група	Вкупно	
	п	%
Нормален наод	100	46,73
Абнормален цитолошки наод	114	53,27
Вкупно	214	100,00

Табела 2. Дистрибуција на цитолошките групи примероци според Бетезда класификацијата

Група	Вкупно	
	п	%
Нормален наод	100	46,73
ASC-US	45	21,03
LSIL	37	17,29
ASC-H	7	3,27
HSIL	15	7,01
Цервикален карцином	10	4,67

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Сите пациенти	214	100,00
---------------	-----	--------



Графикон 1: Дистрибуција на цитолошките групи примероци според Бетезда класификацијата: нормален цитолошки наод, атипични сквамозни клетки од неодредено значење (ASC-US), низок степен од сквамозна интраепителна лезија (LSIL), атипични сквамозни клетки – не може да ги исклучат HSIL (ASC-H), висок степен од сквамозна интраепителна лезија (HSIL), сквамозен клеточен цервикален карцином (цервикален карцином).

Дистрибуција според возраст

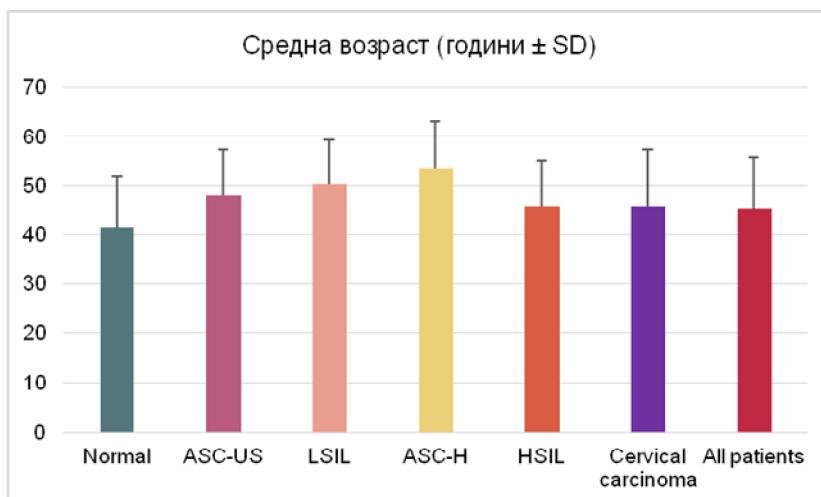
Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Дистрибуцијата на пациентите според нивната возраст во периодот кога беа вклучени во оваа студија како и главните статистички параметри поврзани со возраста се претставени во **табела 3** и на **графикон 2**.

Табела 3. Главни параметри поврзани со возраста и цитолошката група

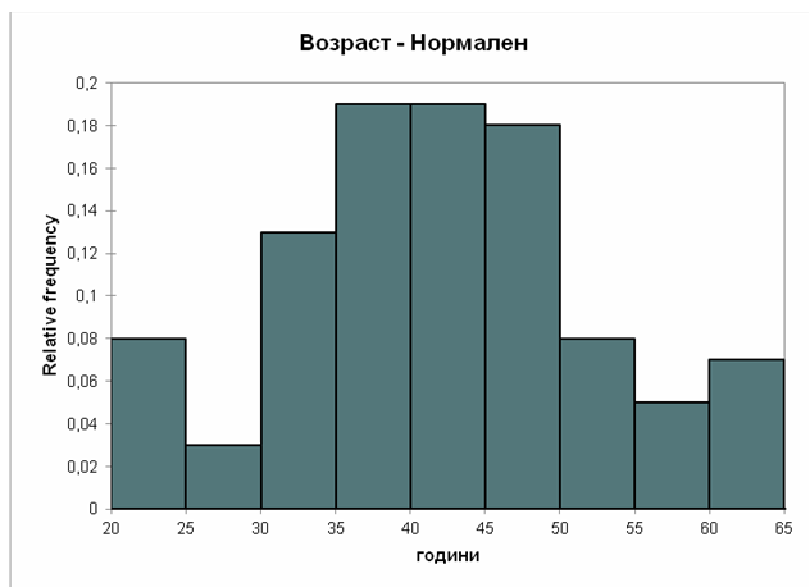
Група	n	%	Средна возраст	Мин. возраст	Макс. возраст	SD
Нормален	100	46,73	41,40	21	63	10,44
ASC-US	45	21,03	48,18	20	65	9,14
LSIL	37	17,29	50,35	33	65	8,93
ASC-H	7	3,27	53,57	39	64	9,48
HSIL	15	7,01	45,73	32	63	9,33
Цервикален карцином	10	4,67	45,80	27	65	11,42
Сите пациенти	214	100,00	45,28	20	65	10,53

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

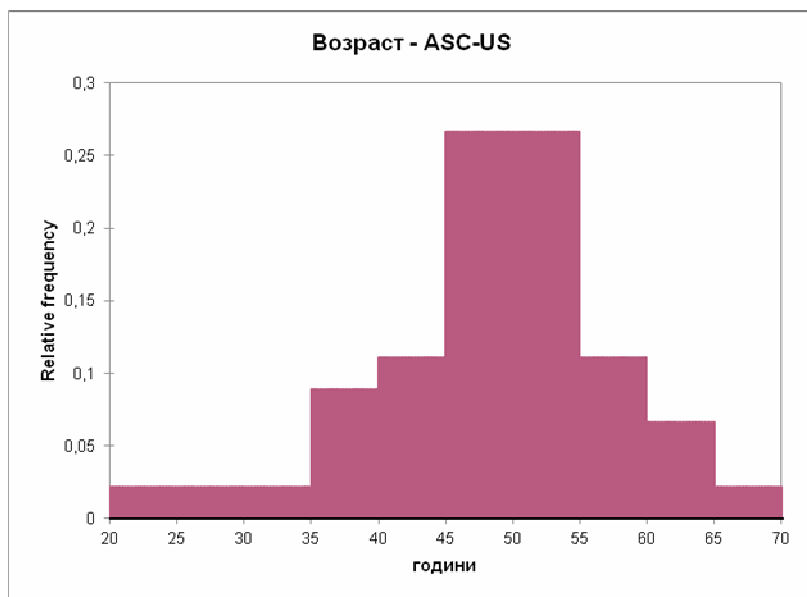


Графикон 2: Дистрибуција според возраст во групите цитолошки примероци

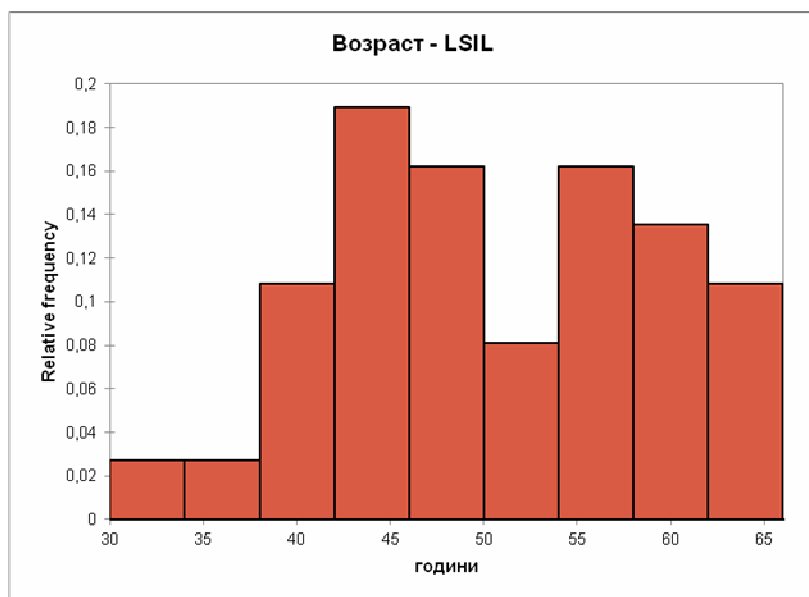
Дистрибуцијата на возраста на пациентите според цитолошките групи како и на сите пациенти вклучени во студијата се претставени на **графиконите 3-9**.



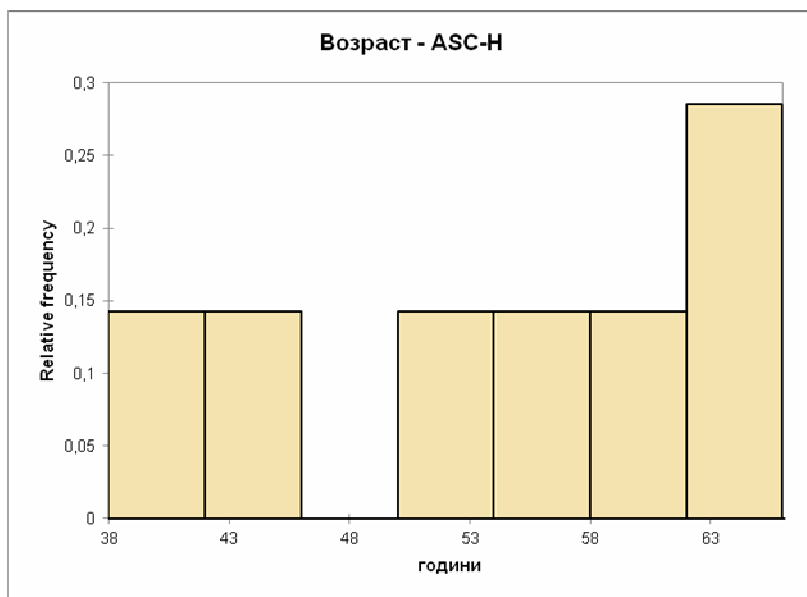
Графикон 3. Дистрибуција според возраст кај нормалните цитолошки примероци



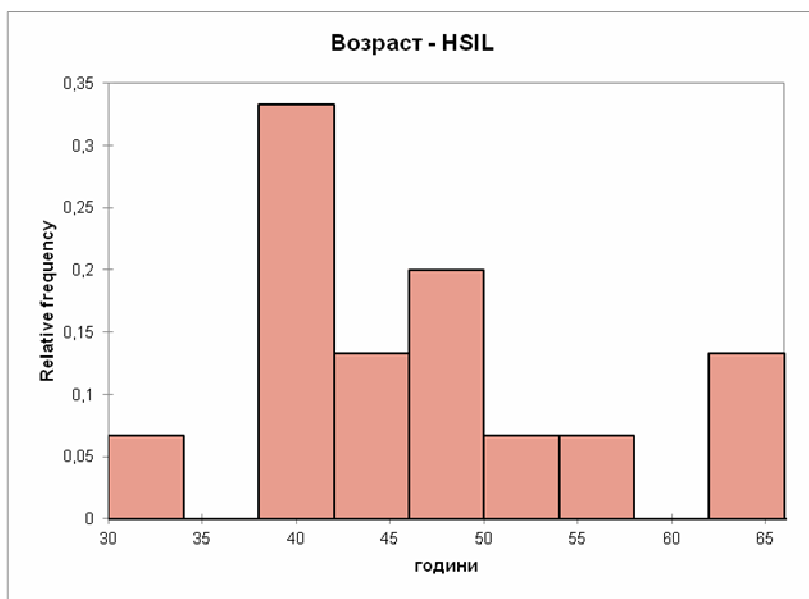
Графикон 4. Дистрибуција според возраст кај примероците ASC-US



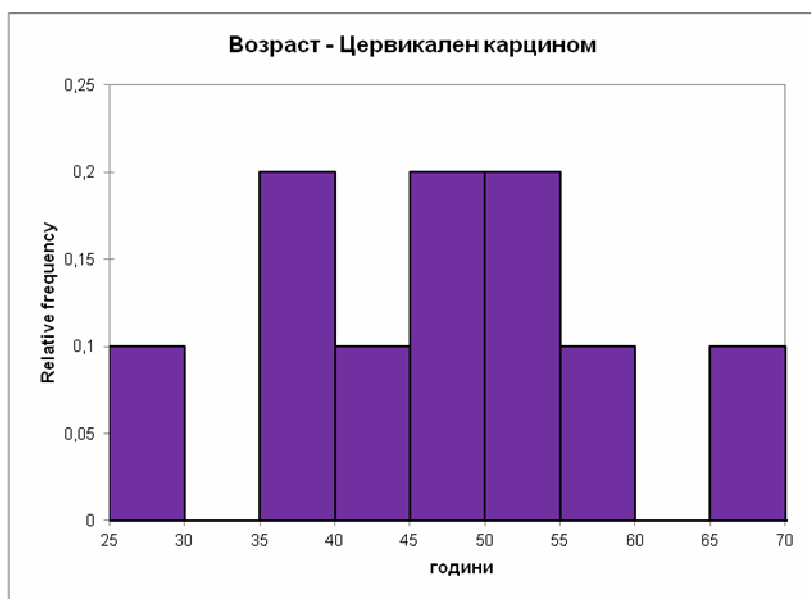
Графикон 5. Дистрибуција според возраст кај примероците LSIL



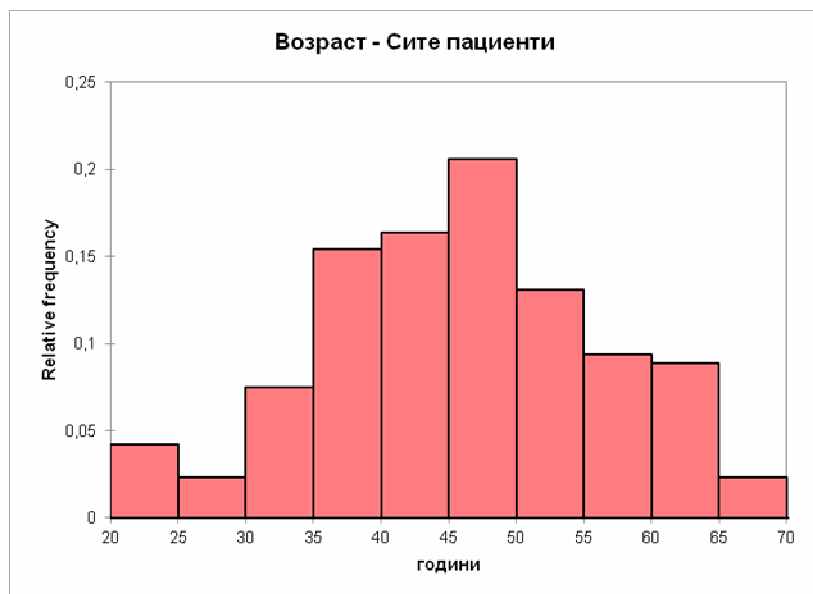
Графикон 6. Дистрибуција според возраст кај примероците ASC-H



Графикон 7. Дистрибуција според возраст кај примероците HSIL



Графикон 8. Дистрибуција според возраст кај примероците од цервикален карцином



Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Графикон 9. Дистрибуција според возраст кај сите пациенти – цитолошки групи

Вредноста на возраста (во години) на вкупниот број пациенти беше анализирана со двонасочен Shapiro-Wilk-ов тест и покажа дека не ја следи статистички нормалната дистрибуција ($W=0,984$; $p=0,014$). Овој податок беше значаен заради избирање на статистички методи кои ќе ја вклучат возраста како параметар во идните пресметки.

Степен на образование на пациентите

Разликите во степенот на образование на пациентите и неговото значење се претставени во табелата 4 и на графиконите 10 и 11.

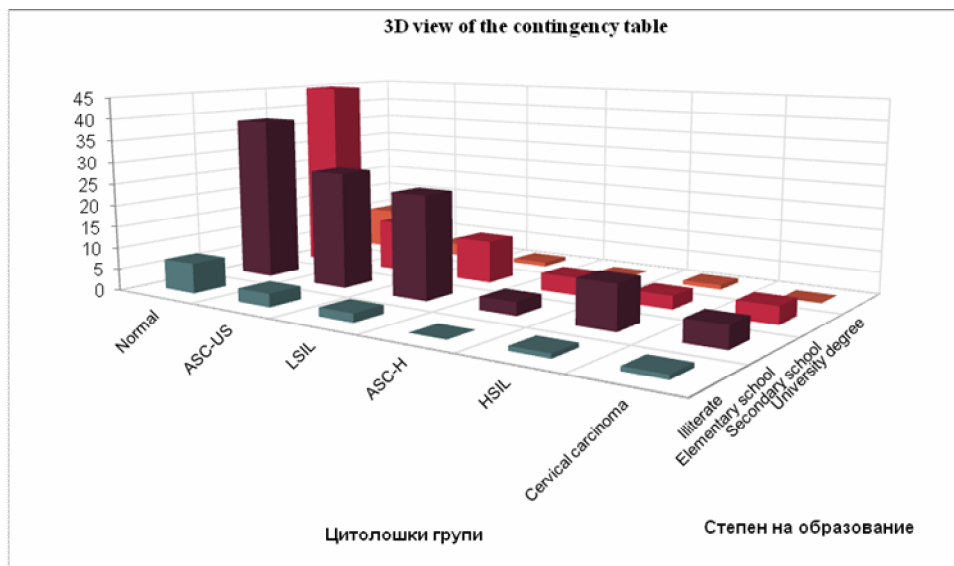
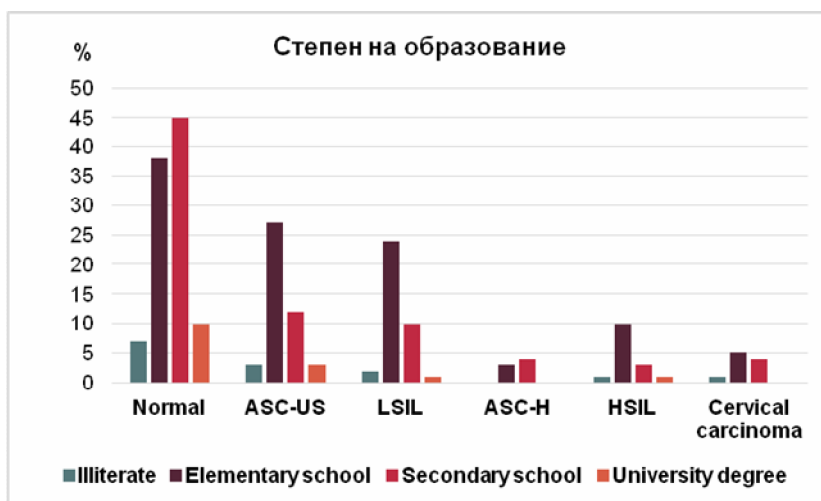
Табела 4. Разлики во степенот на образование на пациентите и цитолошките абнормалности во споредба со контролната група

Група	Неписмени		Основно училиште		Средно образование		Високо образование		Fisher-ов егзактен тест
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
Нормален	7	7,00	38	38,00	45	45,00	10	10,00	ref.
ASC-US	3	6,67	27	60,00	12	26,67	3	6,67	0,097
LSIL	2	5,41	24	64,86	10	27,03	1	2,70	0,044
ASC-H	0	0,00	3	42,86	4	57,14	0	0,00	1,000
HSIL	1	6,67	10	66,67	3	20,00	1	6,67	0,187
Цервикален карцином	1	10,00	5	50,00	4	40,00	0	0,00	0,669
Сите пациенти	14	6,54	107	50,00	78	36,45	15	7,01	1,000

Разликата помеѓу степенот на образование (неписмени, основно образование, средно образование, високо образование) на пациентите во групата со ASC-H во споредба со референтната нормална цитолошка група (ref.) беше статистички значајна ($p<0,05$), но таа не беше значајна меѓу која и да е друга група со цитолошки

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

абнормалности во однос на референтната група, како и меѓу сите 6 цитолошки групи. Овие пресметки беа направени со помош на Fisher-овиот егзактен тест.



Графикон 10. Разлика помеѓу степенот на образование и сите цитолошки групи

Графикон 11. Разлика помеѓу степенот на образование и цитолошката дијагноза

Податоци за навики на пушење

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

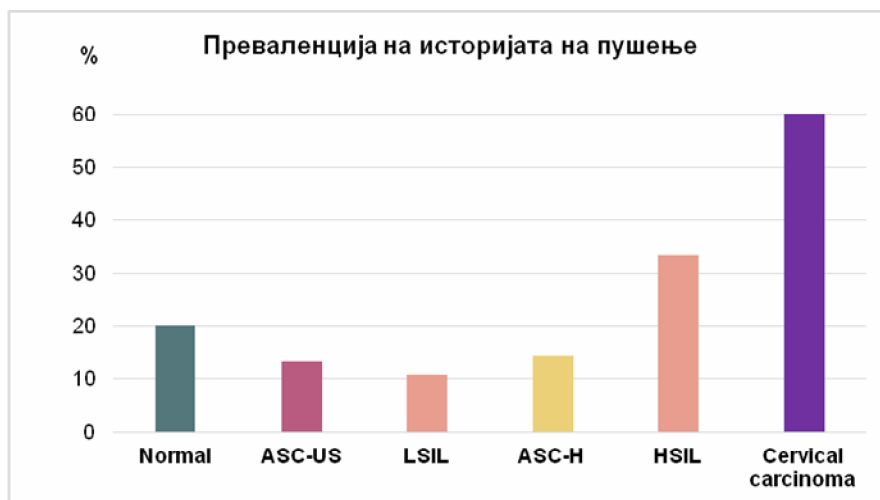
Разликите помеѓу статусот на пушење цигари меѓу пациентите (оние кои постојано/непрекинато пушеле-пушачи) и непушачите, и статистичката значајност се прикажани во **табелата 5** и на **графиконите 12 и 13**.

Табела 5. Разликите помеѓу непушачите и сегашните пушачи во сите цитолошки групи во споредба со контролната група

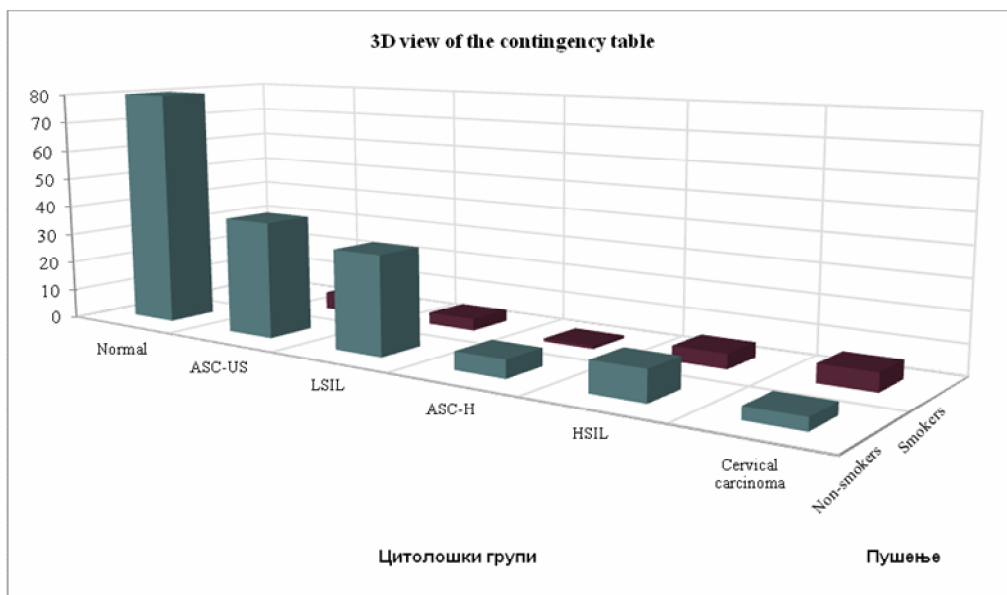
Група	Вкупно		Непушачи		Пушачи		Fisher-ов егзактен тест
	n	%	n	%	n	%	p
Нормален	100	46,73	80	80,00	20	20,00	ref.
ASC-US	45	21,03	39	86,67	6	13,33	0,483
LSIL	37	17,29	33	89,19	4	10,81	0,311
ASC-H	7	3,27	6	85,71	1	14,29	1,000
HSIL	15	7,01	10	66,67	5	33,33	0,312
Цервикален карцином	10	4,67	4	40,00	6	60,00	0,011
Сите пациенти	214	100,00	172	80,37	42	19,63	0,021

Како што е прикажано во табелата, разликите помеѓу пушачите и непушачите се значајни само помеѓу групата пациенти со цервикален карцином и референтната група (*ref.*) со нормален цитолошки наод ($p < 0,05$), како и помеѓу сите 6 цитолошки групи користејќи го Fisher-овиот егзактен тест. Не беше најдена разлика во преостанатите цитолошки групи.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 12. Преваленција на историјата на пушење во сите цитолошки групи



Графикон 13. Преваленција на историјата на пушење во сите цитолошки групи

Употреба на орални контрацептивни пилули

Разликите во употребата на орални контрацептивни пилули (ОСР) од страна на пациентките (во период подолг од една година) и оние пациентки кои никогаш не

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

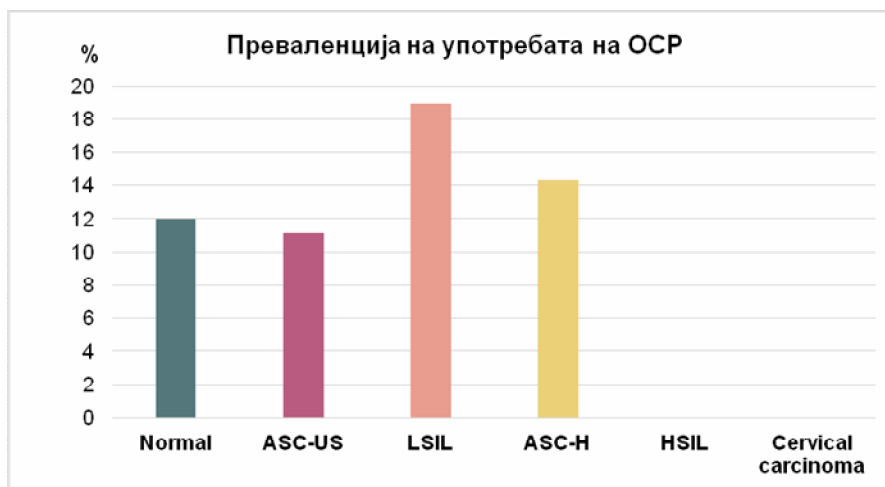
користеле контрацептивни средства, како и статистичката значајност се претставени во табелата 6 и на графиконот 14.

Табела 6. Главни статистички параметри во сите цитолошки групи помеѓу оние кои користеле и оние кои не користеле ОСП

Група	Вкупно		Не користеле ОСП		ОСП		Fisher-ов егзактен тест
	n	%	n	%	n	%	p
Нормален	100	46,73	88	88,00	12	12,00	ref.
ASC-US	45	21,03	40	88,89	5	11,11	1,000
LSIL	37	17,29	30	81,08	7	18,92	0,403
ASC-H	7	3,27	6	85,71	1	14,29	1,000
HSIL	15	7,01	15	100,00	0	0,00	0,361
Цервикален карцином	10	4,67	10	100,00	0	0,00	0,597
Сите пациенти	214	100,00	189	88,32	25	11,68	0,418

ОСП – орални контрацептивни пилули

Не беа најдени значајни разлики помеѓу честотата на користење и некористење орални контрацептивни пилули помеѓу цитолошките групи ($p > 0,05$).



Графикон 14. Преваленција на употребата на ОСП во сите цитолошки групи

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Преваленција на инфекција со HPV

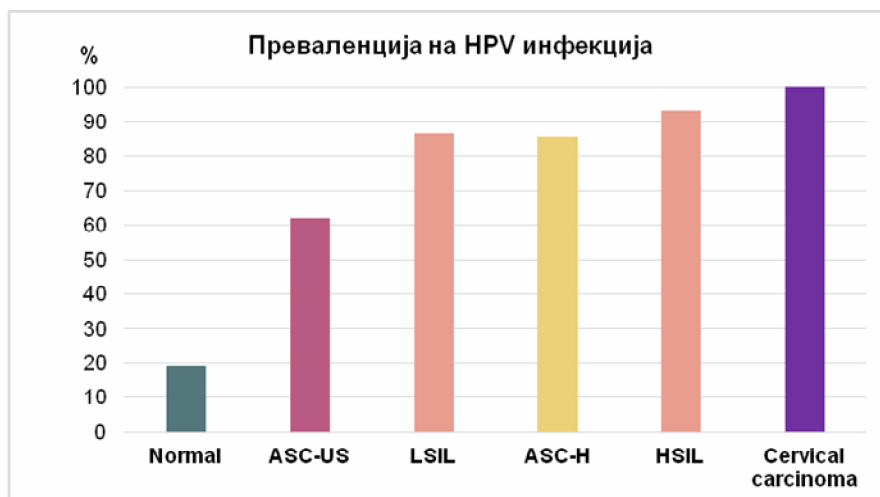
Дистрибуцијата на пациентките според преваленцијата на HPV инфекција во моментот на вклучување во студијата е претставена во **табелата 7** и на **графиконот 15**.

Табела 7. Разлики во HPV статусот и цитолошките абнормалности наспроти контролната група

Група	HPV-негативен		HPV-позитивен		Вкупно		Fisher-ов егзактен тест
	n	%	n	%	n	%	<i>p</i>
Нормален	81	81,00	19	19,00	100	46,73	<i>ref.</i>
ASC-US	17	37,78	28	62,22	45	21,03	< 0,0001
LSIL	5	13,51	32	86,49	37	17,29	< 0,0001
ASC-H	1	14,29	6	85,71	7	3,27	0,001
HSIL	1	6,67	14	93,33	15	7,01	< 0,0001
Цервикален карцином	0	0,00	10	100,00	10	4,67	< 0,0001
Сите пациенти	105	49,07	109	50,93	214	100,00	< 0,0001

Разликата помеѓу присутна или отсутна/постоење или непостоење на/ HPV инфекција во секоја од петте групи со цервикални абнормалности и референтната нормална група (*ref.*) беше високо значајна ($p < 0,01$), како и помеѓу сите 6 цитолошки групи. Овие пресметки беа направени со Fisher-ов егзактен тест.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 15. Преваленција на HPV инфекција во сите цитолошки групи

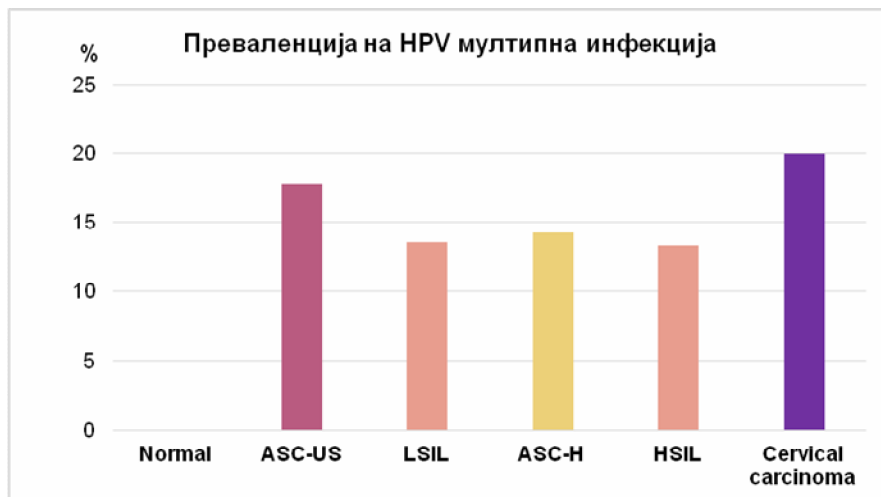
Дистрибуцијата на пациентите според присуството на мултипли/повеќе HPV генотипови во моментот на вклучување во студијата е претставена во **табелата 8** и на **графиконите 16** и **17**.

Табела 8. Разлики помеѓу инфекција со еден тип HPV наспроти мултипла HPV инфекција кај групата со абнормален цитолошки наод во споредба со контролната група

Група	Една HPV		HPV мултипла инфекција		Вкупно HPV позитивни		Fisher-в егзактен тест
	n	%	n	%	n	%	p
Нормален	19	19,00	0	0,00	19	19,00	ref,
ASC-US	20	44,44	8	17,78	28	62,22	0,015
LSIL	27	72,97	5	13,51	32	86,49	0,143
ASC-H	5	71,43	1	14,29	6	85,71	0,240
HSIL	12	80,00	2	13,33	14	93,33	0,172
Цервикален карцином	8	80,00	2	20,00	10	100,00	0,111
Сите пациенти	91	42,52	18	8,41	109	50,93	0,146

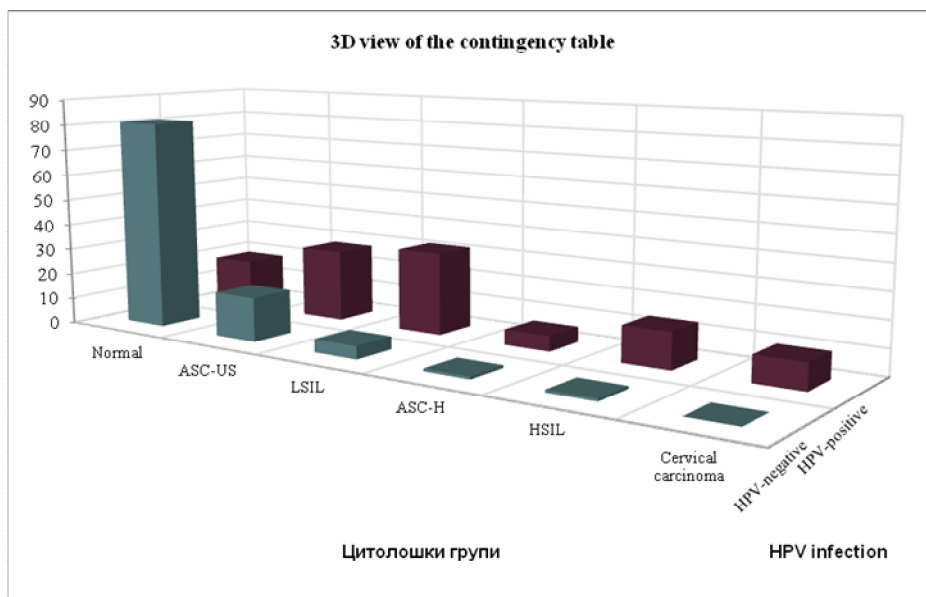
Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Како што се гледа од табелата, разликите помеѓу присуството на инфекција со еден тип HPV и мултипна HPV инфекција се значајни само помеѓу пациентите од групата со ASC-US и референтната група (*ref.*) со нормален цитолошки наод ($p < 0,05$). Немаше разлики помеѓу преостанатите цитолошки групи.



Графикон 16. Преваленција на мултипна HPV инфекција во цитолошките групи

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 17. Преваленција на мултипна HPV инфекција во сите цитолошки групи

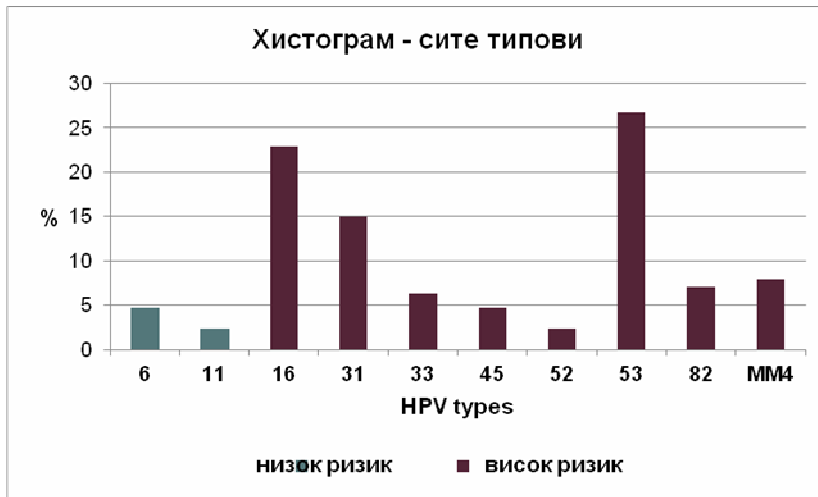
Дистрибуцијата на HPV типови и HPV позитивни пациенти е претставена во табелата 9 и на графиконот 18.

Табела 9. Дистрибуција на HPV типови во HPV-позитивните примероци

HPV тип	n	%
6	6	4,72
11	3	2,36
16	29	22,83
31	19	14,96
33	8	6,30
45	6	4,72
52	3	2,36
53	34	26,77
82	9	7,09
MM4	10	7,87
Вкупно	127 *	100,00

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Треба да се нагласи дека вкупниот број на HPV типови беше поголем од вкупниот број пациенти позитивни за HPV инфекција бидејќи сите пациенти имаа мултипна HPV инфекција.



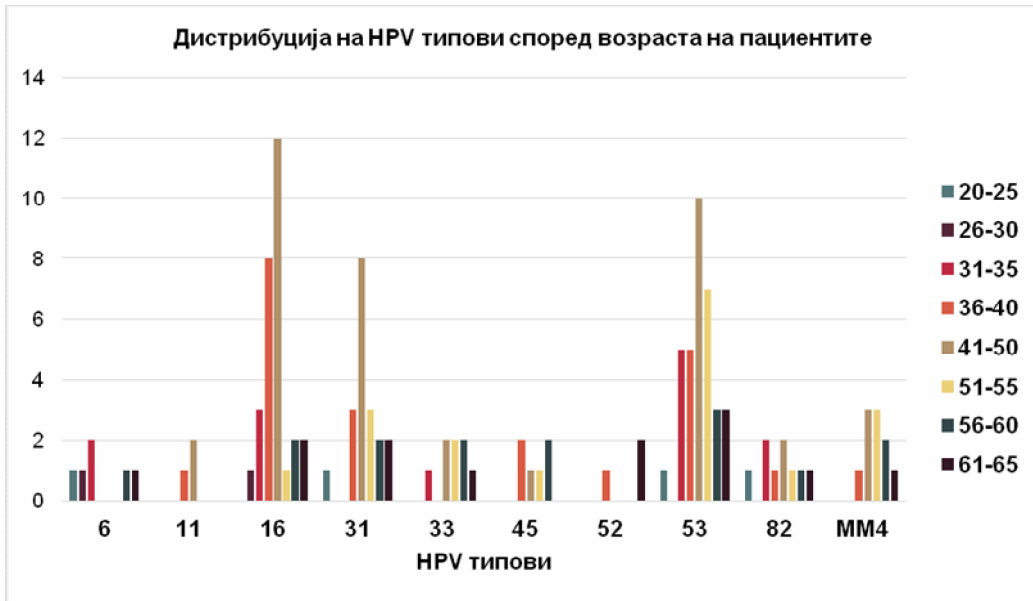
Графикон 18. Ниско- и високоризични типови кај HPV-позитивни примероци

Дистрибуцијата на пациентите инфицирани со еден тип HPV или повеќе HPV генотипови во однос на возраста на групата во моментот на вклучување во студијата е прикажана на **графиконите 19-21**.

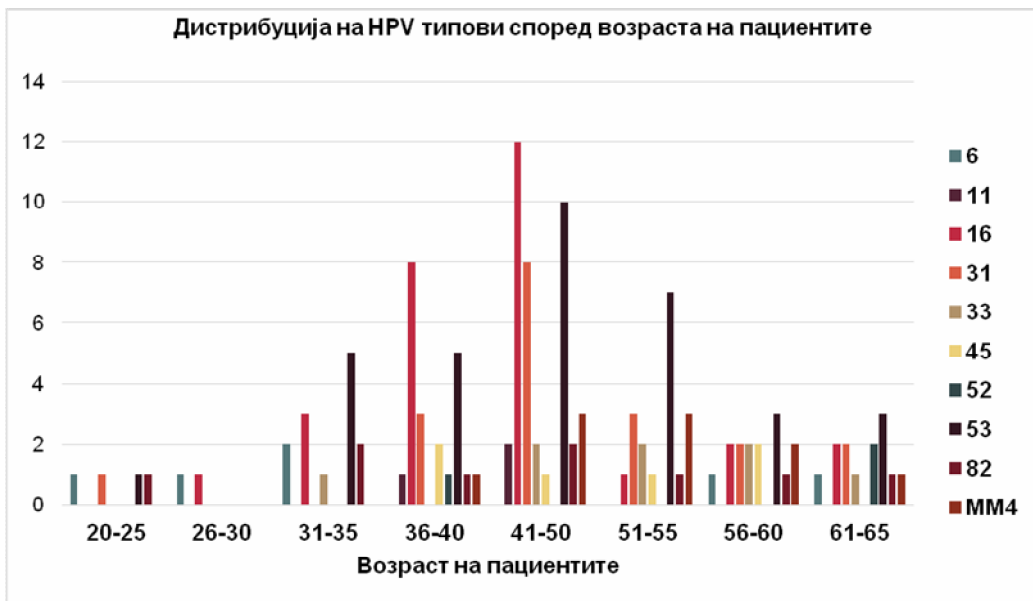
Разликите помеѓу дистрибуцијата на HPV генотипови и возраста на пациентите во групите не беа значајни според Fisher-овиот егзактен тест ($p > 0,05$).

Вкупниот број HPV типови беше поголем од вкупниот број пациенти кои беа позитивни за HPV инфекција бидејќи некои пациенти имаа инфекција со повеќе типови HPV.

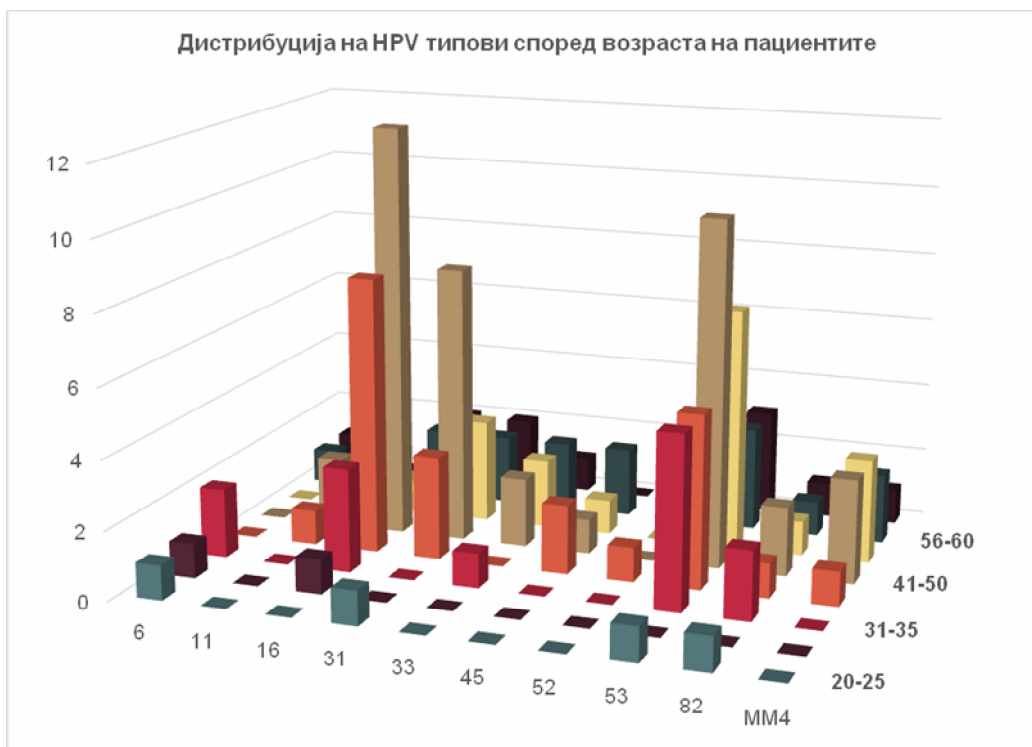
Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 19. Дистрибуција на HPV типови според возраста на пациентите



Графикон 20. Дистрибуција на HPV типови според возраста на пациентите



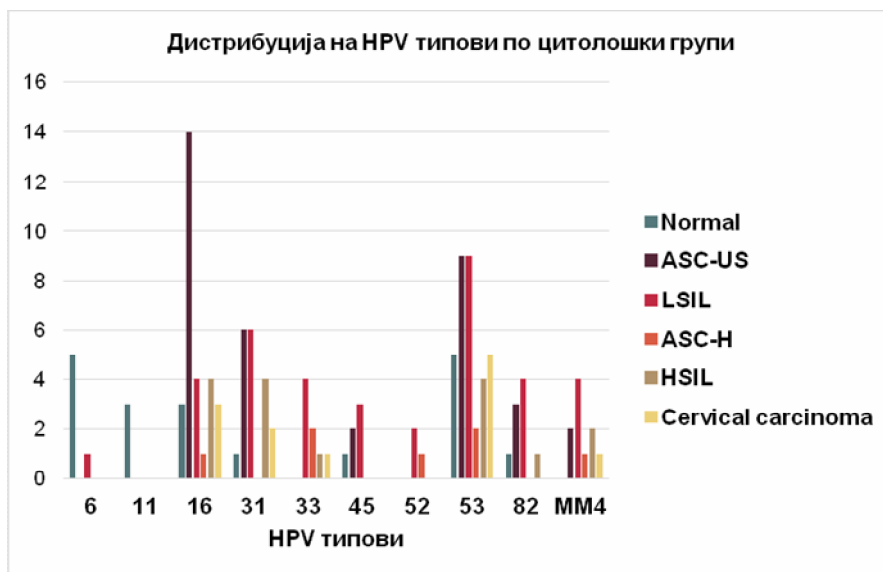
Графикон 21. Дистрибуција на HPV типови според возраста на пациентите

Дистрибуцијата на пациентите инфицирани со еден тип HPV или повеќе HPV типови во цитолошката група е претставена на **графиконите 22-24**.

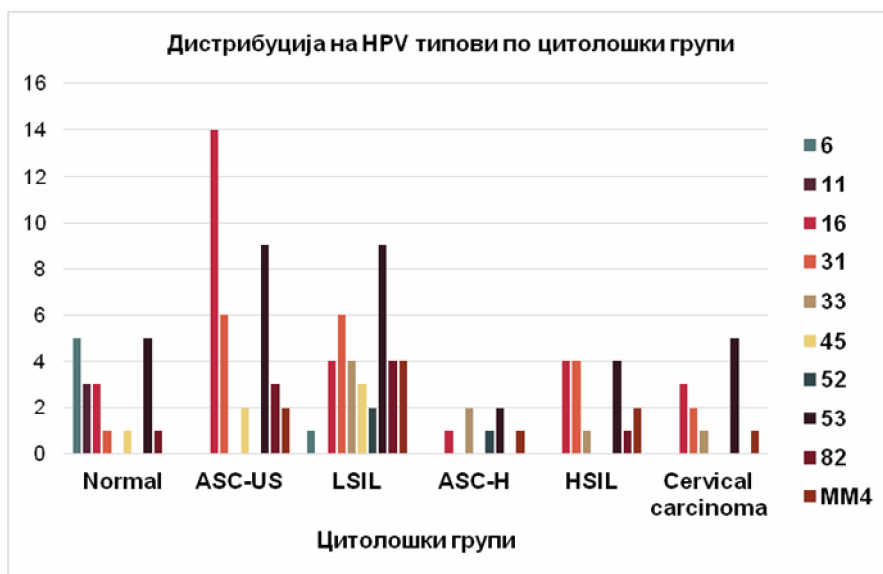
Немаше значајни разлики помеѓу дистрибуцијата на HPV генотипови во испитуваните цитолошки групи анализирани со Fisher-овиот егзактен тест ($p > 0,05$).

Вкупниот број HPV типови беше поголем од вкупниот број пациенти позитивни за HPV инфекција бидејќи некои пациентки беа со инфекција од повеќе HPV типови.

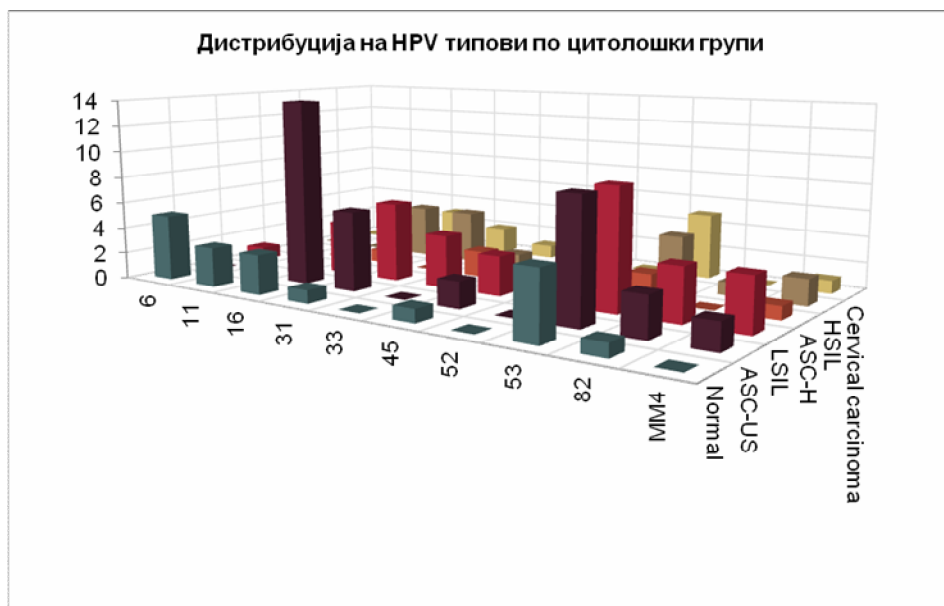
Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 22. Дистрибуција на HPV типови по цитолошки групи



Графикон 23. Дистрибуција на HPV типови по цитолошки групи



Графикон 24. Дистрибуција на HPV типови по цитолошки групи

Експресија на генот за теломераза

Нивото на експресија на каталитичката единица на хуманиот ген за теломераза (*hTERT*) беше одредувано со квантитативна PCR во реално време по реверзна транскрипциска синтеза на cDNA од вкупната целуларна/клеточна RNA изолирана од цервикалните цитолошки примероци (добиени со четкичка за цитолошко испитување). Вредностите на нивото на експресија беа споредени со експресијата на генот чувар GAPDH, пресметани според методот на Ливак (Livak), 2001.

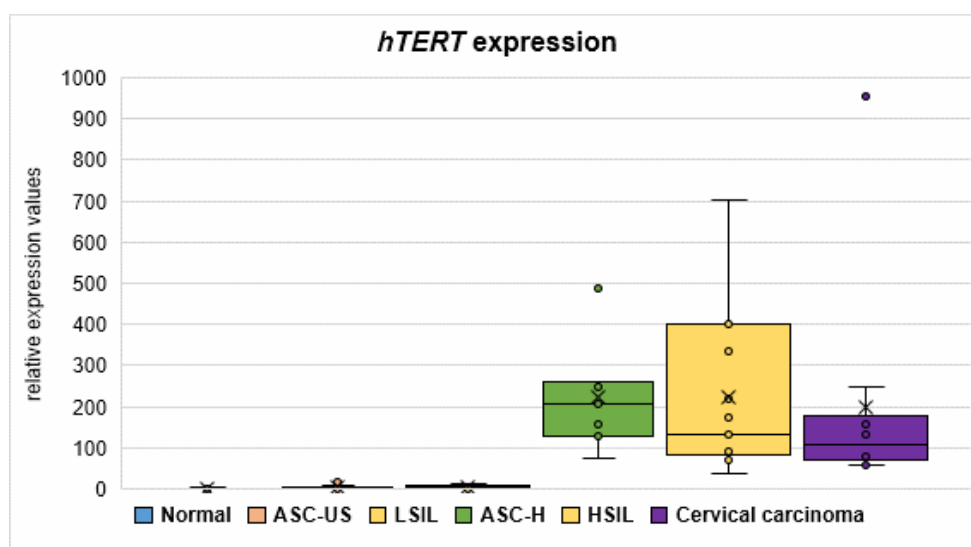
Главните статистички параметри што се однесува до нивоата на релативна експресија на генот *hTERT* во примероците од шесте цитолошки групи, како и кај сите пациенти, се претставени во табелата 10 и на графиконите 25-28.

Табела 10. Основни статистички параметри на вредностите на експресија на *hTERT* кај пациентите од различните цитолошки групи

Параметар	Нормал.	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	Цервикал. карцином	Сите пациенти
n	100	45	37	7	15	10	214
%	46,73	21,03	17,29	3,27	7,01	4,67	100,00

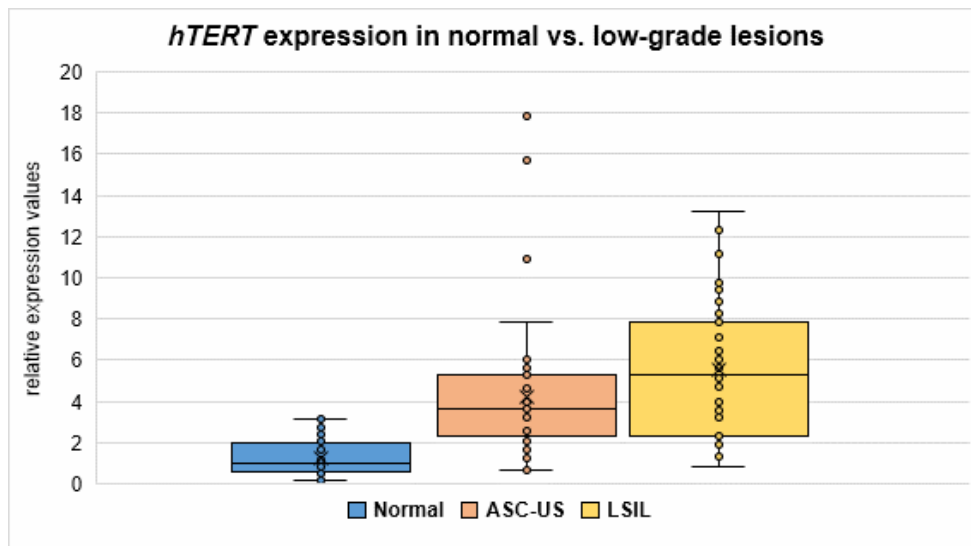
Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Минимум	0,15	0,64	0,80	74,28	38,20	56,62	0,15
Максимум	3,17	17,86	13,25	489,28	704,46	952,88	952,88
1 квартал	0,56	2,34	2,31	142,47	83,49	74,62	1,00
Медијана	1,01	3,61	5,32	206,41	131,50	107,36	2,31
3 квартал	1,98	5,25	7,86	253,24	368,55	157,19	5,80
Средна вредност	1,27	4,19	5,56	223,06	221,34	199,67	34,58
Варијанса (n-1)	0,65	11,58	11,97	18108,58	36453,93	73548,38	11783,89
Стандардна девијација (n-1)	0,81	3,40	3,46	134,57	190,93	271,20	108,55

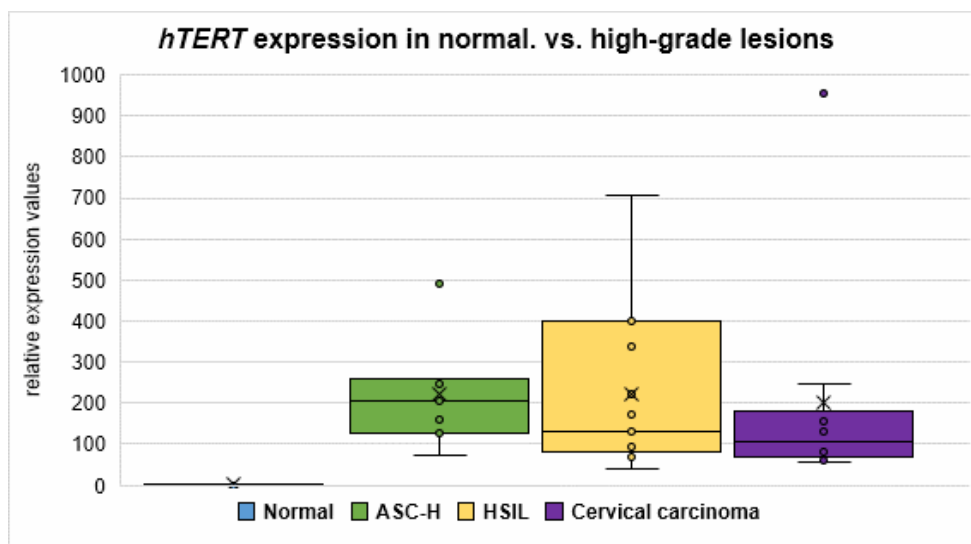


Графикон 25. Вредности на експресија на *hTERT* кај пациентите од различните цитолошки групи

Имајќи ги предвид прекумерните варијации во нивоата на експресија на генот *hTERT*, за подобро визуелно претставување, нивоата во цитолошките групи од низок степен (нормален, ASC-US и LSIL) се претставени на посебен графикон, како и вредностите во групите од висок степен (ASH-H, HSIL и цервикален карцином). Исто така, нивоата на експресија на генот *hTERT* се претставени на трет графикон за сите испитувани пациенти.

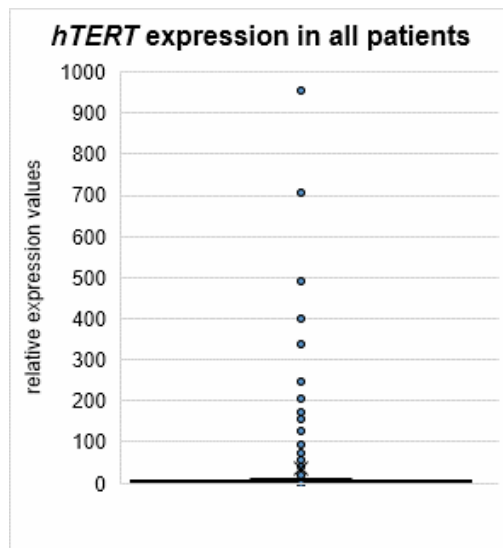


Графикон 26. Вредности на експресија на *hTERT* кај пациентите со цитолошка лезија од низок степен



Графикон 27. Вредности на експресија на *hTERT* кај пациентите со цитолошка лезија од висок степен

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 28. Вредности на експресија на *hTERT* во сите цитолошки подгрупи пациенти

Проценето со двонасочен Shapiro-Wilk тест, податоците за нивоата на експресија на генот *hTERT* не ја следат нормалната статистичка дистрибуција ($W=0,348$; $p<0,0001$), што беше земено предвид при избор на идните статистички методи.

Главните статистички параметри изведени од податоците за нивоата на експресија на генот *hTERT* се претставени во **табелата 11**.

Табела 11. Главни статистички параметри за нивоата на експресија на *hTERT* кај пациентите со различни цитолошки групи

Група	Средна вредност	Медијана	Мин.	Макс.	Стандардна девијација	Mann-Whitney тест p	Kruskal-Wallis тест p
Нормален	1,27	1,01	0,15	3,17	0,81	ref,	
ASC-US	4,19	3,61	0,64	17,86	3,40	< 0,0001	
LSIL	5,56	5,32	0,80	13,25	3,46	< 0,0001	
ASC-H	223,06	206,41	74,28	489,28	134,57	< 0,0001	
HSIL	221,34	131,50	38,20	704,46	190,93	< 0,0001	
Цервикален карцином	199,67	107,36	56,62	952,88	271,20	< 0,0001	
Сите пациенти	34,58	2,31	0,15	952,88	108,55		< 0,0001

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Постои очигледно зголемување во средната вредност на нивоата на експресија на генот *hTERT* од групата со нормални цитолошки наоди наспроти групата со цервикален карцином. Варијациите од средната вредност, како што е евидентно од вредностите на стандардната девијација, исто така постепено се зголемуваа и достигнаа максимални вредности во цитолошката група со HSIL.

Статистичката анализа со употреба на довнасочен Mann-Whitney тест покажа дека нивоата на експресија на генот *hTERT* покажаа високосигнификантна разлика за секоја од петте групи со цитолошки абнормални наоди наспроти вредностите од референтната нормална група (*ref.*) ($p < 0,01$), како и меѓу сите 6 цитолошки групи, анализирано со Kruskal-Wallis тест.

Понатаму, со цел да ја споредиме експресијата на генот *hTERT* со релевантните параметри на пациентите, cut-off беше произволно поставена за прекумерна експресија на *hTERT* = средна вредност во нормални клетки + 2 SD.

Дистрибуцијата на пациентите со прекумерна експресија на генот *hTERT* пресметана со cut-off е претставена во **табелата 12** и на **графиконот 29**.

Табела 12. Разлики во нивоата на експресија на *hTERT* помеѓу цитолошките групи

Група	Нормални <i>hTERT</i> нивоа		<i>hTERT</i> прекумерна експресија		Fisher-ов егзактен тест		Релативен ризик	
	n	%	n	%	p		RR	CI (95%)
Нормален	98	98,00	2	2,00	ref,		ref,	ref,
ASC-US	17	37,78	28	62,22	<0,0001		6,31	4,03 - 9,89
LSIL	11	29,73	26	70,27	<0,0001		9,20	5,21 - 16,27
ASC-H	0	0,00	7	100,00	<0,0001		#	#
HSIL	0	0,00	15	100,00	<0,0001		#	#
Цервикален карцином	0	0,00	10	100,00	<0,0001		#	#
Сите пациенти	126	58,88	88	41,12		<0,0001		

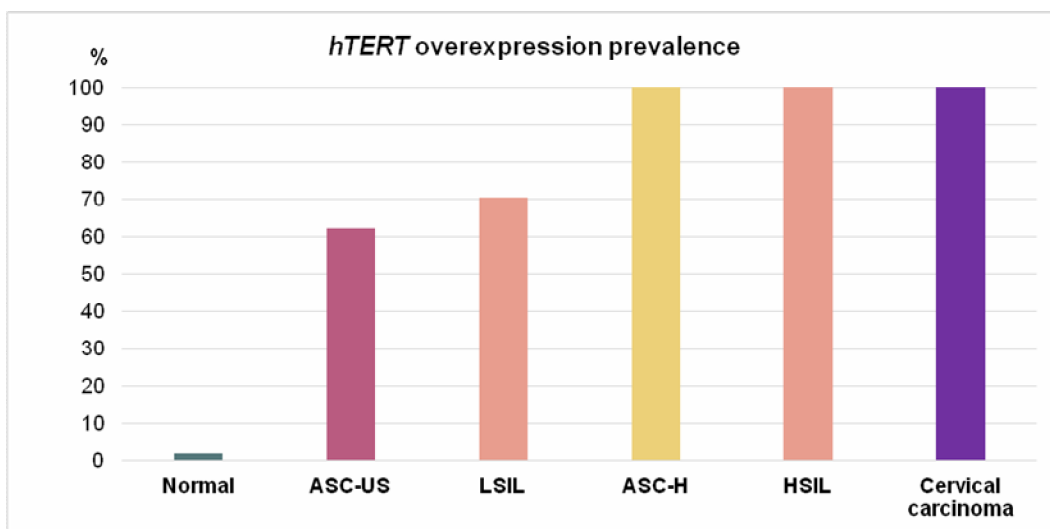
#не можеше да се пресмета поради присуство на 0 вредности во споредуваните групи

CI (95%) интервал на доверба на 95%

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Разликата помеѓу нивоата на нормалната експресија на генот *hTERT* и експресијата во секоја од петте групи пациенти со цитолошки абнормални резултати и референтната нормална група (*ref.*) беше високосигнификантна ($p < 0,01$), како и онаа помеѓу сите 6 цитолошки групи, пресметано со Fisher-овиот егзактен тест.

Понатаму, пресметките покажаа дека кај пациентите со прекумерна експресија на генот *hTERT* постоеше 6,31 пати поголем ризик од појава на ASC-US лезија, односно 9,20 пати поголем ризик од појава на LSIL лезија отколку кај пациентите со нормална експресија, што се однесува до нормалната цитологија.



Графикон 29. Преваленција на прекумерна експресија на *hTERT* кај различните цитолошки групи

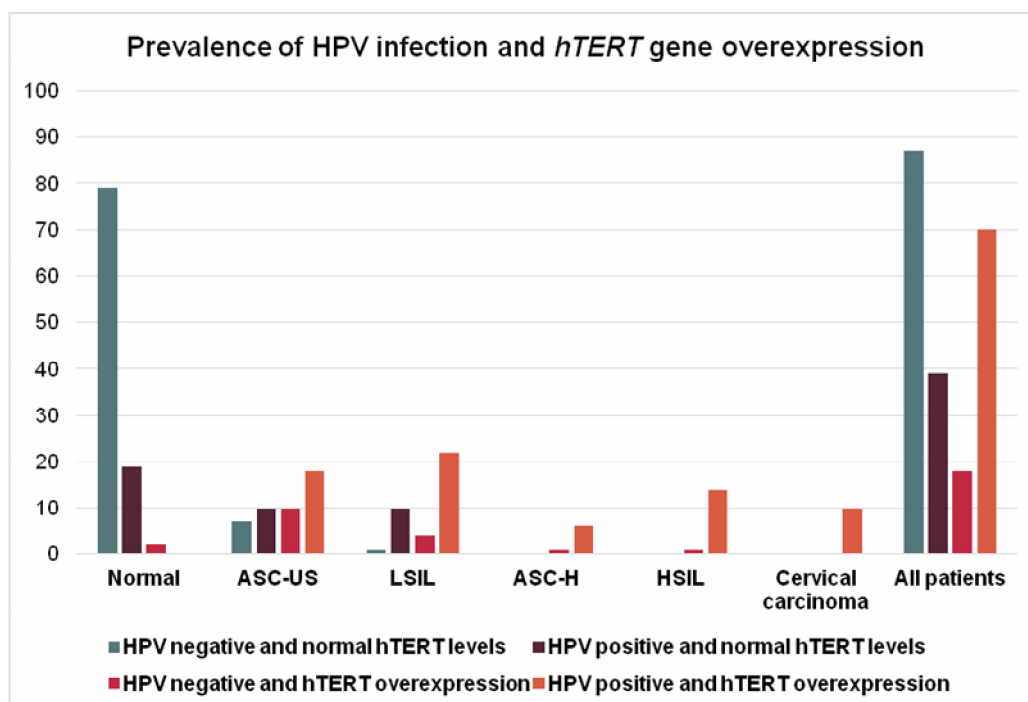
Овие резултати за зависноста на експресијата на теломеразата со цитолошките групи беа потврдени со користење на генерален/општ MANOVA (мултиваријатна анализа на варијанса) со Рао-ова апроксимација на Wilks-овиот тест ($< 0,0001$).

Поврзаноста на инфекцијата со HPV и прекумерната експресија во цитолошките групи беше одредена со споредба на дистрибуцијата на пациентите, што е прикажано во табелата 13 и на графиконот 30.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Табела 13. Дистрибуција на HPV инфекција и *hTERT* прекумерна експресија во цитолошките групи

Група	HPV негат. и нормални <i>hTERT</i> нивоа		HPV позитив. и нормални <i>hTERT</i> нивоа		HPV негат. и <i>hTERT</i> прекумерна експресија		HPV позитив. и <i>hTERT</i> прекумерна експресија		Fisher-ов егзактен тест	
	n	%	n	%	n	%	n	%	p	p
Нормален	79	79,00	19	19,00	2	2,00	0	0,00	ref,	
ASC-US	7	15,56	10	22,22	10	22,22	18	40,00	<0,0001	
LSIL	1	2,70	10	27,03	4	10,81	22	59,46	<0,0001	
ASC-H	0	0,00	0	0,00	1	14,29	6	85,71	1,000	
HSIL	0	0,00	0	0,00	1	6,67	14	93,33	<0,0001	
Цервикален карцином	0	0,00	0	0,00	0	0,00	10	100,00	0,008	
Сите пациенти	87	40,65	39	18,22	18	8,41	70	32,71		<0,0001



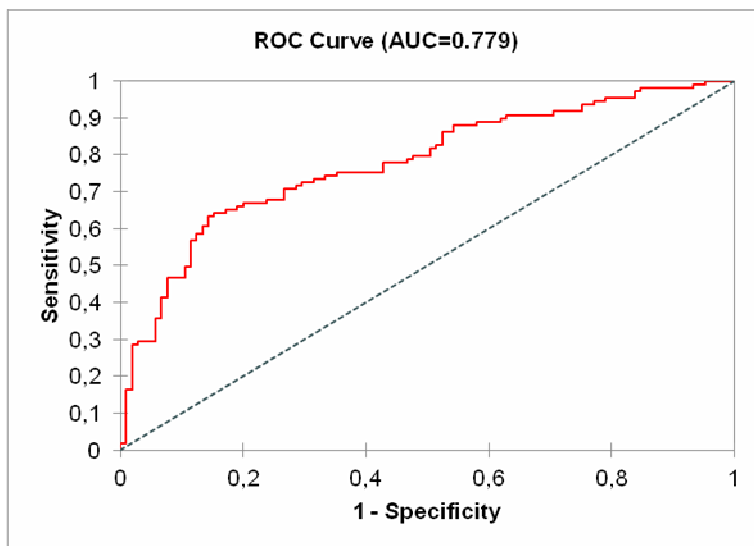
Графикон 30. Преваленција на HPV инфекција и прекумерна експресија на *hTERT* во различните цитолошки групи

Интеракцијата помеѓу нивоата на експресија на генот *hTERT* и HPV инфекцијата во шесте цитолошки групи беше одредена со логистичка регресиона анализа. За овој статистички тест беше употребена бинарна (дихотомна) варијабла на отсуство или присуство на HPV инфекција наспроти квантитативни варијабли за релативни нивоа на експресија на генот *hTERT*.

Поврзаноста беше високостатистички значајна, проценета со Wald-овиот тест (Chi-square=8,483; $p=0,004$) и односот на веројатност (-2 Log тест) (Chi-square=21,460; $<0,0001$).

Comment [U4]: односот на веројатност

ROC-кривата е претставена на **графиконот 31**. Пресметаната ROC површина под кривата е 0,779, покажувајќи добра точност.



Графикон 31. ROC крива, која ја претставува интеракцијата помеѓу нивоата на експресија на генот *hTERT* и HPV инфекција

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

Сензитивност и специфичност

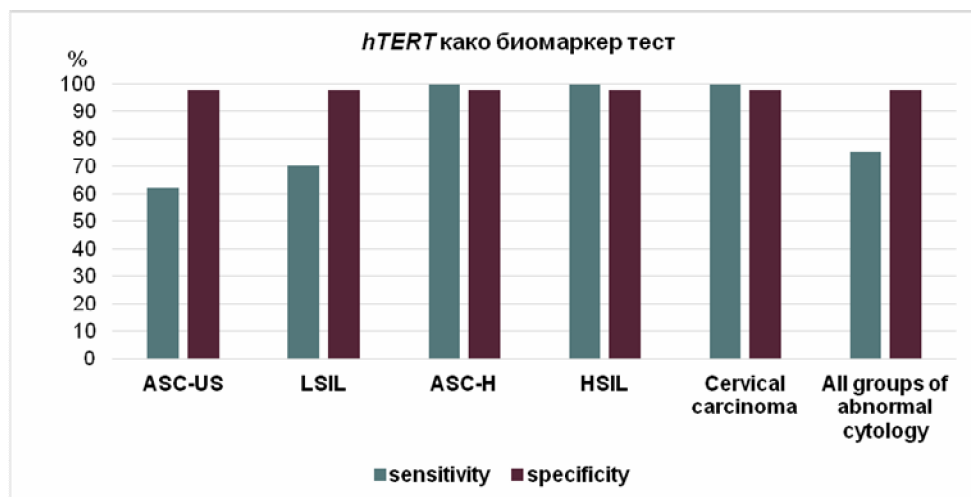
Сензитивноста и специфичноста на вредностите на релативна експресија на генот *hTERT* како биомаркер за цервикален карцином и неговите прекурзорни лезии се претставени во табелата 14 и на графиконот 32.

Табела 14. Сензитивност и специфичност на вредностите на релативна експресија на генот *hTERT* како биомаркер за цервикален карцином и неговите прекурзорни лезии

Група	Нормални нивоа на <i>hTERT</i>	<i>hTERT</i> прекумерна експресија	Сензитивнос т	Специфичнос т
Нормален	98	2	ref.	ref.
ASC-US	17	28	62,22	98,00
LSIL	11	26	70,27	98,00
ASC-H	0	7	100,00	98,00
HSIL	0	15	100,00	98,00
Цервикален карцином	0	10	100,00	98,00
Сите групи со абнормален цитолошки наод	28	86	75,44	98,00

Како што се гледа и од табелата и од графиконот, вредностите за сензитивност и специфичност за *hTERT* како биомаркер тест се најсоодветни за цитолошките цервикални лезии од висок степен: ASC-H, HSIL и цервикален карцином.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус



Графикон 32. Сензитивност и специфичност на вредностите на релативна експресија на генот *hTERT* како биомаркер за цервикален карцином и неговите прекурзорни лезии

3. ДИСКУСИЈА

Нашите податоци покажаа висока преваленција на HPV, што одговара на високата стапка на инциденција на цервикален карцином во Косово. Исто така, резултатите покажаа дека одредувањето на експресијата на *hTERT* во цервикалните примероци со истовремена HPV детекција и генотипизација се корисни како дијагностички и прогностички маркер во болести поврзани со HPV.

Во оваа студија покажавме средно висока преваленција на цитолошки абнормалности во цервикалните примероци земени од испитуваната популација. Средната возраст на жените дијагностицирани со цервикален карцином беше 45,80 (распон 27-65 години), и овој податок е сличен со оној објавен од Балаха (Balaha) и сор., во чијашто студија средната возраст на пациентите со сквамозен цервикален карцином во источниот регион на Саудиска Арабија била 35,8 години (256). Стратификацијата на пациентите во групи според возраста покажа дека ASC-US и LSIL беа најмногу застапени во возрастната група од 20 до 65 години (средна возраст 48,18 години), односно во групата од 33 до 65 години (средна возраст 50,35 години). Средната возраст кај HSIL и ASC-H беше 45,73, односно 53,57 години. За жените кои може да се подложат на скрининг само еднаш во текот на својот живот, СЗО препорачува дека најсоодветна возраст за скрининг е помеѓу 35 и 45 години (2), што ги поткрепува и нашите наоди бидејќи средната возраст на жените дијагностицирани со цервикален карцином во оваа студија беше 45 години.

Сепак, во иднина е потребно да се направат поголеми кохортни студии со цел да се добие приближна стапка на преваленција на цервикални цитолошки абнормални резултати во популацијата од овој регион.

Што се однесува до степенот на образование на нашите пациенти, резултатите покажаа статистички значајна разлика меѓу степенот на образование само кај групата со LSIL во споредба со нормалната контролна група ($p < 0,05$) и кај ниту една цитолошка подгрупа.

Во студијата на Шиф (Schiff) и сор. прикажан е повисок ризик од појава на цервикална интраепителна неоплазија кај жени со низок степен на образование во споредба со жените со висок степен на образование и висок приход (257), додека, пак, Тао (Тао) и сор. забележале протективен ефект на повисокиот степен на образование од HSIL (258). За разлика од податоците во врска со овој ко-фактор во овие студии, во оваа студија не беше најдена поврзаност помеѓу степенот на образование и цитолошките абнормални резултати во споредба со наодите во контролната група како и оние кај цитолошките подгрупи, освен во групата со LSIL.

Улогата на пушење тутун/цигари во цервикалната карциногенеза е мултифакторска и е поврзана со хемиските карциногени, особено со никотинот и котининот и други метаболички соединенија, а со тоа ја промовира прогресијата во цервикален карцином и во регресијата на цервикалните лезии (259). Исто така, нарушената секреција на про- и антиинфламаторните цитокини, модулираниот Т-имунолошки одговор, абнормалната DNA метилација, генетската осетливост/пречувствителност како и диететските и социјални фактори се вклучени во цервикалната карциногенеза поврзана со пушењето. Во оваа студија откривме значајни разлики помеѓу непушачите и сегашните пушачи само помеѓу групата со цервикален карцином и нормалната контролна група ($p < 0,05$).

Во согласност со нашите резултати, во прегледот на податоците од 23 епидемиолошки студии спроведен од Интернационалната соработка за епидемиолошки студии за цервикален карцином (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer) било сугерирано дека кај сегашните пушачи постои поголем ризик да се развије сквамозен клеточен цервикален карцином во споредба со непушачите (260).

Што се однесува до употребата на орални контрацептивни пилули, не се најдени значајни разлики помеѓу оние кои користеле и оние кои не користеле вакви пилули во сите цитолошки групи ($p > 0,05$). За споредба, Сирјанен (Syvänen) и сор. во нивната студија покажале дека оралната контрацепција не е независен фактор на ризик за појава на HSIL кај HPV-позитивни или негативни лица (44). Во суштина, долготрајната употреба на оралната контрацепција е поврзана со зголемен ризик од цервикален карцином, меѓутоа во систематскиот преглед спроведен од Смит (Smith) и сор.

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

презентиран е намален релативен ризик кај жените по престанување со употребата на орални контрацептивни пилули (41). Со ваквите податоци се согласуваат и Морено (Moreno) и сор., кои во нивната студија не пронашле зголемен ризик од цервикален карцином при употреба на орални контрацептивни пилули помалку од 5 години (40).

Во 109 (50,3%) случаи од 214 цервикални примероци анализирани во ова истражување, беше детектиран HPV-DNA, додека преваленцијата на инфекција со еден тип HPV беше 42,52% (91/109). Најчесто застапен тип беше 53, по којшто следуваа 16 и 31.

HPV тестирањето е предложено како примарно скрининг средство за цервикален карцином како опција на цитолошки-заснован скрининг и ко-тестирање, бидејќи жените негативни за hr-HPV се со помал ризик за CIN 3 (пониска стапка на детекција за CIN 3) во споредба со оние со нормален Pap тест (99).

Во Косово, високата стапка на цервикален карцином (68 нови случаи цервикален карцином на 100.000 годишно) е поврзана со висока преваленција на HPV, проценета на 50,93% во нашиот материјал.

Во оваа студија прикажавме висока HPV преваленција од 50,93%, а овие податоци се совпаѓаат со наодите на Мелони (Meloni) и сор. (261), кои откриле севкупна HPV преваленција од 52,6% во кохорта од 650 Италијанки со цитолошки абнормални резултати.

Нашите податоци се слични со оние презентирани од Хванг (Hwang) и сор., кои пронашле HPV преваленција од 44,8% во кохорта од 2.470 пациенти (262), како и со податоците на Ресенде (Resende) и сор., кои откриле HPV позитивитет во 87% од испитуваните примероци (263).

Севкупно, нашите резултати се конзистентни со претходно публикуваните податоци, а кои се однесуваат на HPV преваленцијата и на дистрибуцијата на вирусните генотипови во македонската популација на пациентки без и со цервикални абнормалности(264-266).

Спротивно на овие податоци, Ал Обаид (Al Obaid) и сор. пријавиле 9,8% севкупна HPV преваленција во Ријад (Riyadh), Саудиска Арабија, што може главно да се должи на културните разлики, различната преваленција на ризик-факторите и изложеноста на HPV како и на едно покonzервативно општество (267).

Иако нашиот број примероци е мал, сепак тој е репрезентативен за HPV преваленцијата во Косово, бидејќи сите пациентки и контролни лица беа генерирани од сите градови во Косово, а Универзитетскиот клинички центар во Приштина е единствениот референтен центар за скрининг на цервикален карцином.

Во оваа студија, HPV-DNA кај жените со нормални цитолошки наоди беше најдена кај 19% од случаите, што е во согласност со претходните студии, каде пријавената HPV преваленција во нормалните цитолошки резултати се движела од 20% во Турција (268), 14,4 во Азија (269) и 14,3% во Јужна Америка (270). Податоците од Приста (Pista) и сор. покажале HPV преваленција од 16,5% во нормалните цитолошки примероци (271). Мета-анализата на повеќе од еден милион жени од 5 континенти покажала севкупна светска HPV преваленција од 11,7%, при што биле анализирани и вклучени само нормални цитолошки наоди (272).

Во оваа студија имавме два модела што се однесува до HPV специфичната дистрибуција поврзана со возраста. Како што е покажано во неколку епидемиолошки студии, HPV е најмногу присутен во популацијата на возраст од <25 години што кореспондира/одговара на отпочнувањето со сексуалниот живот, помалата употреба на методи за заштита, полибералните погледи на сексот на таа возраст, итн. Во ова истражување, HPV беше почест наод кај возрасната група од 41-50 години, што е во согласност со претходните извештаи, каде вториот пик на HPV преваленција бил кај возрасната група од 40-55 години (272). Оваа разлика во специфичната HPV преваленција поврзана со возраст повеќе се должи на перзистирање на инфекцијата отколку на новодобиена инфекција, или на мешање/интерферирање на домаќинот со вирусот, карактеристиките на типот на вирусот, промените во сексуалното однесување, хормонските промени поврзани со периодот на менопауза (159, 272-273).

Специфичната преваленција поврзана со возраста за високоризичните типови кај младите возрасни групи (20-30 години) во нашето истражување веројатно ја рефлектира

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

минливата природа на инфекцијата и отстранување на вирусите посредувано од имунолошките клетки, но постоеше зголемена преваленција кај возрасната група од 41 до 50 години.

Генерално, високата HPV преваленција во нашиот анализиран материјал може делумно да се објасни со големиот број абнормални цитолошки резултати (114 од 214), сензитивните методи за детекција на HPV или големината на примерокот, но главно/најмногу оваа висока преваленција се припишува на високиот ризик од сексуалното однесување, промените во погледите на сексот, зголемената стапка на разводи, и свекупните значајни промени во нашето општество – од поконзервативно општество до поотворено по војната во Косово. Сепак, започнувањето со сексуални односи кај испитаниците од оваа студија се совпаѓа со возраста кога тие се мажат/стапуваат во брак, и повеќе од 95% од жените се изјаснија дека имале само еден сексуален партнер цел живот (податоците не се прикажани), додека повисоката преваленција на HPV инфекција главно ја објаснија со сексуалното однесување на нивните сопрузи, а е поврзана со миграцијата заради вработување во странство пред и по војната во Косово. Значаен дел од резултатите може да се припишат и на присуството на странски мисии во Косово со широка национална разноликост.

Во однос на цитолошките резултати и преваленцијата на HPV во нашето истражување, HPV позитивната стапка беше во корелација со сериозноста на болеста и се движеше од 62,22% за ASC-US до 86,9%, 85,71%, 93,33% и 100% за LSIL, ASC-H, HSIL, и цервикалниот карцином, соодветно. Нашите резултати се во согласност со претходно презентирани податоци за севкупната преваленција на HPV кај инвазивниот цервикален карцином, каде преваленцијата на HPV се движеше од 86% до 94% (274-275) и 100% кај свамозниот цервикален карцином (276). Преваленцијата на HPV се зголеми кај прогресивните лезии, со што ги поткрепи фактите дека перзистентните инфекции претставуваат повисок ризик за континуирана прогресија на болеста. Нашите резултати се совпаѓаат со оние на Лиу (Liu) и сор., каде HPV позитивноста била од 91,2% за LSIL до 94,4% за HSIL (277).

Преваленцијата на мултипните инфекции беше ниска во нашиот испитуван материјал; од вкупно 109 HPV-позитивни примероци само 8,41% резултираа со

мултипли HPV инфекции, додека 42,52% се покажаа позитивни за еден тип инфекција. Сепак, прекурзорните цервикални лезии и цервикалниот карцином беа поврзани со повисока преваленција на мултипли инфекции во споредба со нормалните цитолошки резултати, каде не беа најдени мултипли инфекции. Имајќи го превид малиот број примероци во оваа студија, не можевме да најдеме разлика помеѓу присуството на една наспроти повеќе инфекции и цитолошка група, освен за групата со ASC-US и за нормалната/контролна група ($p < 0,05$). Но, Балби (Balbi) и сор. заклучиле дека мултиплините инфекции се со поголем ризик за развој на цервикален карцином и CIN од повисок степен во споредба со инфекција со еден тип HPV (278). Речиси исти податоци се прикажани во студијата спроведена од Писта (Pista) и сор., каде била најдена значајна корелација помеѓу сериозните форми на лезии и мултиплините инфекции (277). Спротивно на овие наоди, во други студии не е најдена поврзаност помеѓу мултиплините инфекции и сериозноста на лезиите (279-280).

Географската дистрибуција на HPV генотипот покажува значајни разлики во светски рамки и е клучна детерминанта во воспоставувањето/воведувањето на програмите за вакцинација и во мерењето на ефикасноста на вакцините против HPV. Затоа, дистрибуцијата на специфичните генотипови е камен-темелник/основа во превенцијата од болестите поврзани со HPV.

Во нашето истражување, HPV 53 беше најчесто застапениот тип и беше откриен во 26,77% од сите позитивни примероци, особено во оние од групите со ASC-US и LSIL, со забележителна дистрибуција според возраста во возрасната група од 41 до 50 години. Овие три типа беа најчест наод во групите со LSIL, ASC-US, HSIL и во групата со цервикален карцином. Слична преваленција на HPV-53 е прикажана во неколку студии направени во Италија и Шпанија, во кои HPV-53 бил вториот најчесто застапен генотип (261, 265, 281- 282).

Потребни се натамошни студии заради дополнително расветлување на причините за високата преваленција на HPV-53 во нашиот испитуван материјал и неговата улога во нормалните и прекурзорните цервикални лезии.

Како што е опишано во една мета-анализа која опфатила повеќе од 1 милион жени од Европа и Јужна Америка кај кои типот 31 бил најчесто присутен (272), така и во оваа

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

студија се покажа слична генотипска специфична дистрибуција на HPV 31. Во ова истражување таа беше третиот најчесто застапен тип (14,96%), главно во групите со ASC-US, LSIL, HSIL, како и во групата со цервикален карцином.

Најчестите типови кај SCC во нашите примероци беа: HPV 53 (5 случаи), HPV 16 (3 случаи) и HPV 31 (2 случаи). Мета-анализата направена од Клифорд (Clifford) и сор. открила дека најчест застапен тип кај инвазивниот цервикален карцином е HPV-16, со 51,0%, по кој следувале другите карциногенски типови - 45, 31, 33, 58 и 52 (289). Важно е да се напомене дека овие типови во нашите примероци беа различно застапени: типот 31, присутен кај ASC-US, LSIL, HSIL и CC, типот 33 честопати присутен кај LSIL, ASC-H, HSIL и цервикалниот карцином, додека типот 45 беше најден само кај групите со ASC-US и LSIL. Типот 52 беше најден само кај групите со LSIL и ASC-H. Општо земено, оваа распределба може да е условена од недоволната детекција на другите типови или локалната дистрибуција во нашиот регион.

Comment [U5]: инвазивниот цервикален карцином

Добиените наоди во оваа студија не се конзистентни со други публикувани податоци, каде HPV 16 е најчестиот тип на глобално ниво, со некои исклучоци, во зависност од испитуваната област (284). HPV 16 беше најчест наод, во 22,83% од примероците, најмногу во возрасната група од 41 до 50 години и главно кај групите со ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL и кај групата со цервикален карцином, но беше втор најчесто застапен тип. Овие податоци треба да бидат потврдени во идни студии кои би вклучиле поголема кохорта пациенти.

Варијабилноста во нашите резултати кои се однесуваат на откриените HPV специфични типови може делумно да се припише на сензитивноста на PCR прајмерските сетови и не многу високата аналитичка сензитивност на PG MY09/11 (284-286). Ова може да биде значаен извор на променливи резултати помеѓу другите ко-фактори во оваа географска област.

Нашите податоци покажаа прогресивно зголемување на експресијата на mRNA *hTERT* во цитолошките примероци, што одговараа на степенот на лезијата, а со тоа ја поткрепија силната корелација помеѓу сериозноста на болеста и експресијата на mRNA *hTERT* ($p < 0,01$). Нивото на експресија на *hTERT* mRNA беше значајно зголемено кај ASC-H, HSIL и цервикалниот карцином во споредба со она кај нормалните контролни

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

примероци ($p < 0,01$). Исто така, во оваа студија експресијата на *hTERT* mRNA покажа значајно зголемување кај лезиите од висок степен во споредба со лезиите од низок степен ($p < 0,0001$).

Оттука, истовременото одредување на експресијата на *hTERT* mRNA заедно со цитологијата може да ја намали стапката на лажно негативни Pap брисови.

Средните нивоа на експресија на *hTERT* mRNA во нормалните цитолошки примероци беше 1,27 во споредба со средните нивоа на експресија од 4,19 и 5,56 кај ASC-US и LSIL, соодветно. Кога ги споредивме вредностите на *hTERT* mRNA кај нормалните примероци со лезиите од висок степен, забележавме преминација на експресијата на *hTERT* mRNA кај ASC-H, HSIL и цервикалниот карцином со следниве вредности: 223,06, 221,34 и 199,67, соодветно. Значајно покачени нивоа на *hTERT* mRNA во лезиите од висок степен и оние од низок степен во споредба со нормалните примероци покажаа дека *hTERT* mRNA е ран дијагностички и прогностички показател како и основна одговорна компонента на теломеразната активност. Нашите резултати може да се споредат со претходни студии во кои експресијата на *hTERT* mRNA и активноста на теломеразата се поврзани со сериозноста на болеста (233-234,287-288).

Иако Саретски (Saretzki) и сор. (289) не откриле корелација помеѓу теломеразната активност и сериозноста на лезијата, а Ресинк-Петерс (Reesink-Peters) и сор. (290) прикажале ниска експресија на компонентата *hTERT* без разлики помеѓу CIN 0/I и CIN II/III, најголемиот број публикувани трудови откриваат дека експресијата на *hTERT* mRNA и активноста на теломеразата изнесуваат 91,3% (291), 96,5% (235) и 100% кај цервикалниот карцином (240), како и 55,0% кај CIN II и 82,1% кај CIN III (292).

Во една студија од Дјук (Duque) и сор., добиени се слични резултати кои се однесуваат на активноста на теломеразата одредена со TRAP есејот, каде позитивноста на теломеразната активност се движела од 75,4% кај LSIL и 100% кај HSIL, ASC-H и цервикалниот карцином (235).

Ние забележавме многу силна корелација помеѓу нормалната експресија на *hTERT* и прекумерната експресија на *hTERT* во сите групи во споредба со нормалните резултати, како и помеѓу групите со цитолошки абнормални наоди ($p < 0,01$). Процентот на

прекумерната експресија на *hTERT* пресметан со cut-off вредноста (средно ниво во нормални клетки + 2SD) во цитолошките примероци беше: 62,22%, 70,27%, 100%, 100%, 100% кај ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL и кај цервикалниот карцином, соодветно. Според тоа, прекумерната експресија на *hTERT* е високопредиктивно и дијагностичко комплементарно средство/алатка за откривање на лезиите од висок степен и цервикален карцином, а претставува и помошен/адјувантен пристап за лезиите од низок степен бидејќи тој пројави прекумерна експресија само во 2% од нормалните примероци во оваа студија. Слични резултати кои се однесуваат на теломеразната активност и експресијата на mRNA *hTERT* кај нормални примероци се објавени и претходно (291-293).

Во оваа студија најдена е силна поврзаност помеѓу експресијата на mRNA *hTERT* и HPV инфекцијата. Во претходни студии презентирани се контрадикторни резултати во однос на поврзаноста на HPV позитивитетот и експресијата на *hTERT* во цитолошки примероци. Аулт (Ault) и сор. не покажале значајна поврзаност помеѓу детекцијата на HPV 16/18 и нивоата на теломеразата (294), додека, пак, во истражувањата на Бранка (Branca) и сор., и Ванг (Wang) и сор., била најдена силна поврзаност помеѓу зголемената регулација на hr-HPV и *hTERT* и зголемената експресија (287,233). Слични резултати се изнесени и од Каилаш (Kailash) и сор., со кои е покажана силна поврзаност помеѓу високоризичниот HPV позитивитет и теломеразната активност (295). Во оваа студија прекумерната експресија на *hTERT* кај HPV-негативните клетки беше најдена во 22,22%, 10,81%, 14,29% и 6,67% од ASC-US, LSIL, ASC-H и HSIL соодветно, што може да се објасни со една фракција на теломеразни позитивни клетки и неприсуството на диспластични клетки во примероците (255), односно во тие примероци алтернативни механизми, а не HPV-онкопротеини ја поттикнале транскрипциската регулација на генот *hTERT* (197,238).

Во нашето истражување прекумерна експресија на *hTERT* кај HPV-позитивните клетки беше откриена во 85,71%, 93,33% и 100% од ASC-H, HSIL и цервикален карцином, соодветно. Значи, беше најдена високосигнификантна поврзаност помеѓу прекумерната експресија на *hTERT* и HPV инфекцијата, особено кај лезиите од висок степен и кај цервикалниот карцином. Еден од најзначајните механизми со кои *hTERT* има зголемена регулација, но е сосема независен од прекумерната експресија на с-тус или деградација/распаѓање на p53 е транскрипциската зголемена регулација од страна на

E6/E7 онкопротеини на hr-HPVs. Показано е дека HPV-16 E6 онкопротеинот ја активира теломеразата кај човечки кератиноцити и клетки кај цицачи, независно од p53 (229), иако високоризичните HPVs се мешаат со фазите на клеточниот циклус преку деактивирање на значајниот транскрипциски регулатор, p53 тумор супресорски ген, како и со деактивирање на ретинобластома протеиниот (*Rb*) заедно со другите придружни протеини, како што се: p107, p130 и p105 (302). Исто така, Oх (Oh) и сор. покажале дека E6 ја поттикнува експресијата на *hTERT* преку интеракција со промоторот *hTERT* проксимално до кодонот за иницијација (230).

Во врска со ова, нашите резултати се совпаѓаат со наодите дека кај лезиите од висок градус и кај цервикалниот карцином се нарушува експресијата на E6/E7 со последовна хромозомска нестабилност со или без вирусна геномска интеграција во хромозомот – домаќин и се задолжителни за прекумерната експресија на *hTERT* и активноста на теломеразата (166,123).

Што се однесува до детекцијата на активноста на теломеразата во цитолошките примероци во споредба со цервикалните биопсии, Горхам (Gorham) и сор. (224) покажале дека ексфолијативните клетки не се сигурен/доверлив индикатор за активноста на теломеразата, додека, пак, Ванг (Wang) и сор. во својата студија покажале дека детекцијата на теломеразната активност во цитолошките примероци и цервикалните биопсии е слична (297).

Со ова истражување откривме дека ексфолијативната цитологија е корисна во одредувањето на експресијата на *hTERT*, па според тоа и на теломеразната активност. Така, RT-qPCR одредувањето на експресијата на mRNA *hTERT* во цитолошките примероци може да биде корисно во детекцијата на лезии од висок степен и на прогресија на болеста од лезии од низок степен. Зголемената стапка на откривање на лезии од висок степен и цервикален карцином во оваа студија во споредба со други студии кои користеле TRAP есеј може да се објасни со повисоката сензитивност на методот на *hTERT* RT-PCR, покажано во студијата од Снијдерс (Snijders) и сор. (298).

Конечно, во оваа студија покажавме дека вредностите на релативна експресија на генот *hTERT* како биомаркер за ASC-H, HSIL и цервикален карцином се високоспецифични и сензитивни (98%, односно 100%). За споредба, Бранка (Branca) и

Поврзаност на експресијата на генот за теломераза со цервикалниот карцином и неговите прекурзорни лезии при инфекција со хуман папилома вирус

сор. пријавиле 90,0% специфичност на експресија на *hTERT* mRNA во детекцијата на цервикалните лезии, но пониска сензитивност (57,5%) во споредба со нашите резултати (233). Според тоа, одредувањето на нивото на експресија на *hTERT* mRNA може да придонесе во цитолошката дијагноза, коешто има ниска сензитивност и висока стапка на лажно негативни резултати, а може да компензира за ниската специфичност на HPV тестирањето.

Резултатите од оваа студија, иако даваат значајни податоци за преваленцијата на HPV, за генотиповите и експресијата на *hTERT* mRNA во нормалните и абнормалните наоди од PAP брисовите, сепак не ја претставуваат преваленцијата на HPV во целата популација на Косово, главно заради малиот број вклучени примероци, па ваквите наоди не може целосно да бидат генерализирани. Ова е главното ограничување на оваа студија. Тоа значи дека е потребна поголема кохортна студија која понатаму би се занимавала со оваа проблематика.

4. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на опсежната анализа на резултатите кои ги добивме и споредбата што ја направивме со литературните податоци, дојдовме до следните заклучоци:

1. Нашето истражување ја потенцира високата преваленција на HPV којашто одговара на високата стапка на цервикален карцином во испитуваната популација пациентки од Косово. Најчестите типови коишто ги идентификувавме се: HPV 53, HPV 16 и 31.
2. Оваа студија за прв пат дава увид во HPV преваленцијата и генотиповите во Косово, и врз основа на епидемиолошкиот профил на HPV генотиповите во овој регион добиените резултати може да дадат поддршка за основање платформа за скрининг на цервикалниот карцином и за развивање превентивни стратегии во иднина.
3. Високата стапка на инциденција на цервикалниот карцином е соодветен индикатор дека организираната скрининг програма за цервикален карцином задолжително треба да почне да се имплементира на национално ниво наместо повремениот скрининг во Косово, бидејќи повремениот скрининг е помалку ефикасен поради ниската сензитивност на Pap тестот. Дури и само 4552 изведени Pap тестови во 2015 год., 67 нови случаи на цервикален карцином во 2014 и 68 нови случаи во 2015 год. се доволни индикатори за ниската покриеност на скрининг за цервикален карцином во Косово.
4. Резултатите од оваа студија имаат значајни научни и јавноздравствени импликации. Програмите за вакцинација во Косово задолжително треба да се имплементираат во иднина, иако и со добра програма за вакцинација, вакцините не заштитуваат од сите онкогени HPV-инфекции. Токму затоа, познавањето кои HPV инфекции се подоминантни во Косово може да има улога во превентивните стратегии со идни вакцини засновани на нова генерација профилактични, терапевтски вакцини и вакцини засновани на RNA.

5. Како и во другите земји во развој, цената е значаен и одлучувачки фактор, па затоа анализата на најдобрите скрининг и превентивни стратегии со ниска цена е од круцијално значење. Сметаме дека врз основа на податоците добиени во оваа студија детекцијата и генотипизацијата на HPV се корисни во справувањето со пациентите со абнормални Pap брисови, особено за возрасната популација од 41-50 години.
6. Вториот дел од студијата ги потврдува претходните резултати во однос на улогата на зголемената регулација на *hTERT* во цервикалните прекурзорни лезии и цервикалниот карцином. Покажавме дека постои силна корелација помеѓу сериозноста на болеста и експресијата на mRNA *hTERT* како и помеѓу експресијата на mRNA *hTERT* и инфекцијата со HPV.
7. Недоволниот и прекумерниот третман на пациентите, што често се случува во клинички услови, а е главно предизвикан од ниската сензитивност на единечниот Pap тест, како и ниската специфичност на HPV-DNA тестирањето, може да се надминат со одредување на нивото на експресија на *hTERT* mRNA што ќе ја надополни цитолошката дијагноза и ќе компензира за ниската специфичност на HPV тестирањето. Понатаму, сето ова би придонело и во поиндивидуализиран третман и следење во клинички услови, како и во намалување на несаканите инвазивни процедури кај жените.
8. Одредувањето на експресијата на *hTERT* mRNA во цервикалните примероци може да помогне во идентификација на жените кои се со повисок ризик од прогресија на болеста и може да послужи како прогностички маркер за клиничкиот исход. Пациентите со повисок ризик избрани според зголемената теломеразна активност се секако кандидати за поагресивен третман и според тоа за поиндивидуализирано следење. Одредувањето на нивоата на експресија на генот *hTERT* може да послужи како ефикасен скрининг, тријажа и предиктивна алатка, особено за пациентите со висок ризик со потврдена HPV инфекција. *hTERT* како биомаркер тест е најсоодветен за цитолошките цервикални лезии од висок степен: ASC-H, HSIL и цервикален карцином.

5. REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from <http://globocan.iarc.fr> accessed on 23/01/2015.
2. World Health Organization. Reproductive Health, World Health Organization. Chronic Diseases, Health Promotion. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. World Health Organization; 2006.
3. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Kenya. Summary Report. 2010. Accessed on 23/01/2016. Available at www.who.int/hpvcentre.
4. Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*. 2011 Dec; 22(12):2675-86. DOI: 10.1093/annonc/mdr015.
5. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*. 1976 Feb; 36(2 pt 2):794.
6. Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*. 1977 Feb; 76(2):569.
7. Tsunokawa Y, Takebe N, Nozawa S, Kasamatsu T, Gissmann L, Hausen HZ, et al. Presence of human papillomavirus type 16 and type 18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from japanese patients. *Int J Cancer*. 1986 Apr; 37(4):499-503.
8. Schneider-Gädicke A, Schwarz E. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *The EMBO J*. 1986 Sep; 5(9):2285-2292. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04496.x

9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9. DOI:[10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)
10. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2007; 90:1-636.
11. De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul; 7(7):453-9. DOI:[10.1016/S1473-3099\(07\)70158-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70158-5)
12. Rylander E, Ruusuvaara L, Almströmer MW, Evander M, Wadell G. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in women who have not experienced sexual intercourse. *Obstet Gynecol.* 1994 May; 83(5):735-7.
13. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003 Feb; 157(3):218-26.
14. Watson RA. Human papillomavirus: confronting the epidemic—a urologist's perspective. *Rev Urol.* 2005; 7(3):135.
15. Finan RR, Musharrafieh U, Almawi WY. Detection of Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative women. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Sep; 12(9):927-30. DOI:[10.1111/j.1469-0691.2006.01479.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01479.x)
16. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Ångström T, Anttila T, Bergman F, et al. A population-based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2002 Oct; 101(4):371-4. DOI:[10.1002/ijc.10639](https://doi.org/10.1002/ijc.10639)

17. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikkäheimo I, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001 Jan; 285(1):47-51.

18. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004 Sep; 111(3):431-9. DOI:[10.1002/ijc.20257](https://doi.org/10.1002/ijc.20257)

19. Jensen KE, Thomsen LT, Schmiedel S, Frederiksen K, Norrild B, van den Brule A, et al. *Chlamydia trachomatis* and risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in women with persistent human papillomavirus infection: a cohort study. *Sex Transm Infect*. 2014 Nov; 90(7):550-5 doi: [10.1136/sextrans-2013-051431](https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051431).
20. Mayer J, Woods ML, Vavrin Z, Hibbs JB. Gamma interferon-induced nitric oxide production reduces *Chlamydia trachomatis* infectivity in McCoy cells. *Infect Immun*. 1993 Feb; 61(2):491-497.
21. Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med*. 1998 Feb; 187(4):487-496.
22. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec; 420(6917):860-867. doi:[10.1038/nature01322](https://doi.org/10.1038/nature01322)
23. Lehtovirta P, Paavonen J, Heikinheimo O. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Int J STD AIDS*. 2008 Jan; 19(1):37-41. doi: [10.1258/ijsa.2007.005672](https://doi.org/10.1258/ijsa.2007.005672).

24. Pantanowitz L, Michelow P. Review of human immunodeficiency virus (HIV) and squamous lesions of the uterine cervix. *Diagn Cytopathol.* 2011 Jan; 39(1):65-72. DOI:10.1002/dc.21364
25. Peedicayil A, Thiagarajan K, Gnanamony M, Pulimood SA, Jeyaseelan V, Kannangai R, et al. Prevalence and risk factors for human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia among HIV-positive women at a tertiary level hospital in India. *J Low Genit Tract Dis.* 2009 Jul; 13(3):159-64. doi: 10.1097/LGT.0b013e31818fb40d.
26. Ezechi OC, Pettersson KO, Okolo CA, Ujah IA, Ostergren PO. The association between HIV infection, antiretroviral therapy and cervical squamous intraepithelial lesions in South Western Nigerian women. *PLoS One.* 2014 May; 9(5):e97150. doi: [10.1371/journal.pone.0097150](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097150)
27. Stuardo V, Agustí C, Godinez JM, Montoliu A, Torné A, Tarrats A, et al. Human papillomavirus infection in HIV-1 infected women in Catalonia (Spain): implications for prevention of cervical cancer. *PLoS One.* 2012 Oct; 7(10):e47755. doi: [10.1371/journal.pone.0047755](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047755)
28. Holmes RS, Hawes SE, Touré P, Dem A, Feng Q, Weiss NS, et al. HIV infection as a risk factor for cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia in Senegal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Sep; 18(9):2442-6. DOI:[10.1158/1055-9965.EPI-08-0956](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0956)
29. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Apr; 97(8):577-86. DOI:[10.1093/jnci/dji073](https://doi.org/10.1093/jnci/dji073)
30. Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A, et al. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis.* 2001 Sep; 184(6):682-90. DOI:10.1086/323081
31. Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol.* 2002 Feb; 55(1):19-24.

32. Fimhaber C, Westreich D, Schulze D, Williams S, Siminya M, Michelow P, et al. Highly active antiretroviral therapy and cervical dysplasia in HIV-positive women in South Africa. *J Int AIDS Soc.* 2012; 15(2):17382. doi: [10.7448/IAS.15.2.17382](https://doi.org/10.7448/IAS.15.2.17382)
33. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012; 100(Pt B): 1–441.
34. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res.* 2004 Nov; 567(2):447-74. DOI:[10.1016/j.mrrev.2004.02.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.02.001)
35. Bueno CT, Silva CM, Barcellos RB, Silva JD, Santos CR, Menezes JE, et al. Association between cervical lesion grade and micronucleus frequency in the Papanicolaou test. *Genet Mol Biol.* 2014 Sep; 37(3):496-499.
36. Campos LM, Dias FD, Antunes LM, Murta EF. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. *Sao Paulo Med J.* 2008 Nov; 126(6):323-8.
37. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, et al. Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *Am J Epidemiol.* 2009 Feb; 169(4):480-8. doi:[10.1093/aje/kwn354](https://doi.org/10.1093/aje/kwn354).
38. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *Int J Cancer.* 2014 Jul; 135(2):453-66. doi:[10.1002/ijc.28666](https://doi.org/10.1002/ijc.28666).
39. Zeng XT, Xiong PA, Wang F, Li CY, Yao J, Guo Y. Passive smoking and cervical cancer risk: a meta-analysis based on 3,230 cases and 2,982 controls. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(6):2687-93.

40. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002 Mar; 359(9312):1085-92. DOI:[10.1016/S0140-6736\(02\)08150-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08150-3)
41. Smith JS, Green J, Berrington DG, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*. 2003 Apr; 361(9364):1159-67. [doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12949-2)
42. Appleby P, Beral V, Berrington DG, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*. 2007 Nov;370(9599):1609-21. DOI:[10.1016/S0140-6736\(07\)61684-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61684-5)
43. Shapiro S, Rosenberg L, Hoffman M, Kelly JP, Cooper DD, Carrara H, et al. Risk of invasive cancer of the cervix in relation to the use of injectable progestogen contraceptives and combined estrogen/progestogen oral contraceptives (South Africa). *Cancer Causes Control*. 2003 Jun; 14(5):485-95.
44. Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, et al. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. *Anticancer Res*. 2006;26(6C):4729-40.
45. Ruutu M, Wahlroos N, Syrjanen K, Johansson B, Syrjanen S. Effects of 17beta-estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16 E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1261-8 DOI:[10.1111/j.1525-1438.2006.00563.x](https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00563.x)
46. Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Mar;13(2):103-10.

47. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*.2002; 359:1093–1101. DOI:[10.1016/S0140-6736\(02\)08151-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08151-5)
48. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001; 84:1219–1226. doi:[10.1054/bjoc.2001.1779](https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1779)
49. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:303–315 doi.org/10.1093/jnci/djj067
50. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA, et al. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.2009; 18:113–120. doi:[10.1158/1055-9965.EPI-08-0591](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0591)
51. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21:1654–1663.
52. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer*. 2013 Jan; 108(1):234-239. doi: [10.1038/bjc.2012.513](https://doi.org/10.1038/bjc.2012.513)
53. Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegnee AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri ; *Br J Cancer* 1996;74:488-490.
54. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*. 2011 Jan;6(1):45-57. doi:[10.2217/fvl.10.73](https://doi.org/10.2217/fvl.10.73)
55. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among

- oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*. 2005; 117:1007–1012. DOI:[10.1002/ijc.21279](https://doi.org/10.1002/ijc.21279)
56. Nene B, Jayant K, Arrossi S, Shastri S, Budukh A, Hingmire S, et al. Determinants of women's participation in cervical cancer screening trial, Maharashtra, India. *Bull World Health Organ*. 2007 Apr;85(4):264-272. doi:[10.2471/BLT.06.031195](https://doi.org/10.2471/BLT.06.031195)
57. Paskett ED, McLaughlin JM, Reiter PL, Lehman AM, Rhoda DA, Katz ML, et al. Psychosocial predictors of adherence to risk-appropriate cervical cancer screening guidelines: a cross sectional study of women in Ohio Appalachia participating in the Community Awareness Resources and Education (CARE) project. *Prev Med*. 2010 Feb; 50(1):74-80. doi:[10.1016/j.ypmed.2009.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2009.09.001)
58. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, Lee IP, Lee JM, Namkoong SE, et al. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G1 arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol*. 2003 Mar; 22(3):217-24. DOI:[10.1089/104454903321655846](https://doi.org/10.1089/104454903321655846)
59. Asif SF, Naim M, Islam N. Apoptotic effect of green tea polyphenol (EGCG) on cervical carcinoma cells. *Diagn Cytopathol*. 2011 Jul;39(7):500-4. DOI:[10.1002/dc.21434](https://doi.org/10.1002/dc.21434)
60. Noguchi M, Yokoyama M, Watanabe S, Uchiyama M, Nakao Y, Hara K, et al. Inhibitory effect of the tea polyphenol,(-)-epigallocatechin gallate, on growth of cervical adenocarcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 2006 Mar; 234(2):135-42. DOI:[10.1016/j.canlet.2005.03.053](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.053)
61. Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May; 1822(5):737-47. doi: [10.1016/j.bbadis.2011.10.005](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.005).

62. Myung SK, Ju W, Kim SC, Kim HS. Vitamin or antioxidant intake (or serum level) and risk of cervical neoplasm: a meta-analysis. *BJOG*. 2011 Oct; 118(11):1285-91. doi: 10.1111/j.1471-0528.2011.03032.x.
63. Srivastava S, Natu SM, Gupta A, Pal KA, Singh U, Agarwal GG, et al. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: prognostic significance. *Indian J Cancer*. 2009 Oct ;46(4):297-302. doi: 10.4103/0019-509X.55549.
64. Castellsagué X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, De Sanjosé S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med*. 2002 Apr; 346(15):1105-12. DOI:[10.1056/NEJMoa011688](https://doi.org/10.1056/NEJMoa011688)
65. Tobian AA, Serwadda D, Quinn TC, Kigozi G, Gravitt PE, Laeyendecker O, et al. Male circumcision for the prevention of HSV-2 and HPV infections and syphilis. *N Engl J Med*. 2009 Mar; 360(13):1298-1309. doi:[10.1056/NEJMoa0802556](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802556)
66. Wawer MJ, Tobian AA, Kigozi G, Kong X, Gravitt PE, Serwadda D, et al. Effect of circumcision of HIV-negative men on transmission of human papillomavirus to HIV-negative women: a randomised trial in Rakai, Uganda. *Lancet*. 2011 Jan; 377(9761):209-18. doi:[10.1016/S0140-6736\(10\)61967-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61967-8).
67. Magnusson PK, Sparén P, Gyllensten UB. Genetic link to cervical tumours. *Nature*. 1999 Jul; 400(6739):29-30. DOI:[10.1038/21801](https://doi.org/10.1038/21801)
68. Kohaar I, Hussain S, Thakur N, Tiwari P, Nasare V, Batra S, et al. Association between human leukocyte antigen class II alleles and human papillomavirus-mediated cervical cancer in Indian women. *Hum Immunol*. 2009 Apr; 70(4):222-9. doi: 10.1016/j.humimm.2009.01.003
69. de Araujo Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB, Petzl-Erler ML, Franco EL, Villa LL. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16

- variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:246 doi:[10.1186/1471-2407-8-246](https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-246).
70. Wang SS, Gonzalez P, Yu K, Porras C, Li Q, Safaeian M, et al. Common genetic variants and risk for HPV persistence and progression to cervical cancer. *PLoS One*. 2010 Jan; 5(1): e8667. doi:[10.1371/journal.pone.0008667](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008667)
71. Gudleviciene Z, Didziapetriene J, Ramael M, Uleckiene S, Valuckas KP. Human papillomavirus and p53 polymorphism in Lithuanian cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*. 2006 Sep; 102(3):530-3. DOI:[10.1016/j.ygyno.2006.01.019](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.01.019)
72. Andersson S, Rylander E, Strand A, Sällström J, Wilander E. The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 2001 Oct; 85(8):1153-6. DOI:[10.1054/bjoc.2001.2085](https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2085)
73. Heselmeyer K, Schröck E, Du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Jan; 93(1):479-484.
74. Kersemaekers AM, van de Vijver MJ, Kenter GG, Fleuren GJ. Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Dec; 26(4):346-54.
75. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology annual*; 1973; 8:301.
76. Lundberg GD. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA*. 1989; 262(7):931-4.
77. Broder S. Rapid communication—the Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses—report of the 1991 Bethesda workshop. *JAMA*. 1992 Apr ;267(14):1892
78. Apgar BS, Zoschnick L, Wright Jr TC. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician*. 2003 Nov;68(10):1992.
79. Burghardt E, Pickel H, Girardi F. *Colposcopy, cervical pathology: textbook and atlas*. Thieme; 1998.

80. Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993 Apr; 12(2):186-92.
81. Papanicolaou GN. Cytological evaluation of smears prepared by the tampon method for the detection of carcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1954 Nov; 7(6):1185-90.
82. Andrae B, Andersson TM, Lambert PC, Kemetli L, Silfverdal L, Strander B, et al. Screening and cervical cancer cure: population based cohort study. *BMJ.* 2012; 344:e900. doi: [10.1136/bmj.e900](https://doi.org/10.1136/bmj.e900)
83. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 2006 Sep ;119(5):1095-101. DOI:[10.1002/ijc.21955](https://doi.org/10.1002/ijc.21955)
84. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000 May;132(10):810-9. DOI: [10.7326/0003-4819-132-10-200005160-00009](https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-10-200005160-00009)
85. Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomes H, Holz B, et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer.* 2003 May; 88(10):1570-7. DOI:[10.1038/sj.bjc.6600918](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600918)
86. Salmerón J, Lazcano-Ponce E, Lorincz A, Hernández M, Hernández P, Leyva A, et al. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control.* 2003 Aug; 14(6):505-12. DOI: [10.1023/A:1024806707399](https://doi.org/10.1023/A:1024806707399)
87. Sankaranarayanan R, Gaffikin L, Jacob M, Sellors J, Robles S. A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005 May; 89:S4-12. DOI:[10.1016/j.ijgo.2005.01.009](https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2005.01.009)
88. Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol.* 2003 Jul ;90(1):137-44.

89. Zhu J, Norman I, Elfgren K, Gaberi V, Hagmar B, Hjerpe A, et al. A comparison of liquid-based cytology and Pap smear as a screening method for cervical cancer. *Oncol Rep.* 2007 Jul ;18(1):157-60. doi.org/10.3892/or.18.1.157
90. Sykes PH, Harker DY, Miller A, Whitehead M, Neal H, Wells JE, et al. A randomised comparison of SurePath liquid-based cytology and conventional smear cytology in a colposcopy clinic setting. *BJOG.* 2008 Oct; 115(11):1375-81. doi:10.1111/j.1471-0528.2008.01865.x.
91. Beerman H, Van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol Oncol.* 2009 Mar;112(3):572-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.12.012.
92. Obwegeser JH, Brack S. Does liquid-based technology really improve detection of cervical neoplasia?. *Acta Cytol.* 2001 Jul; 45(5):709-14.
93. Karimi-Zarchi M, Peighambari F, Karimi N, Rohi M, Chiti Z. A comparison of 3 ways of conventional pap smear, liquid-based cytology and colposcopy vs cervical biopsy for early diagnosis of premalignant lesions or cervical cancer in women with abnormal conventional pap test. *Int J Biomed Sci.* 2013 Dec; 9(4):205-210.
94. Moyer VA, US Preventive Services Task Force. Screening for cervical cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2012 Jun 19; 156(12):880. doi: 10.7326/0003-4819-156-12-201206190-00424
95. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Rozendaal L, Heideman DA, et al. HPV DNA testing in population-based cervical screening (VUSA-Screen study): results and implications. *Br J Cancer.* 2012 Feb; 106(5):975-981. doi: [10.1038/bjc.2011.581](https://doi.org/10.1038/bjc.2011.581)

96. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jan; 13(1):78-88. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70296-0.
97. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, et al. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jan; 101(2):88-99. doi: 10.1093/jnci/djn444
98. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *The Lancet.* 2014 Feb; 383(9916):524-32. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62218-7.
99. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FA, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *J Lower Genit Tract Dis.* 2015 Apr; 19(2):91-6
doi:10.1097/LGT.000000000000103.
100. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol.* 2015 Feb; 136(2):189-97. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.11.07
101. Zhou H, Mody RR, Luna E, Armylagos D, Xu J, Schwartz MR, et al. Clinical performance of the Food and Drug Administration–Approved high-risk HPV test for the

- detection of high-grade cervicovaginal lesions. *Cancer Cytopathol.* 2016 May; 124(5):317-23. doi: [10.1002/cncy.21687](https://doi.org/10.1002/cncy.21687)
102. Blatt AJ, Kennedy R, Luff RD, Austin RM, Rabin DS. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices. *Cancer Cytopathol.* 2015 May; 123(5):282-228. doi: [10.1002/cncy.21544](https://doi.org/10.1002/cncy.21544)
103. Bansal N, Wright JD, Cohen CJ, Herzog TJ. Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions. *Anticancer Res.* 2008 May; 28(3B):1763-6.
104. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol.* 2013 Apr; 121(4):829-46. doi: [10.1097/AOG.0b013e3182883a34](https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3182883a34)
105. Martin-Hirsch PL, Paraskevaidis E, Kitchener H. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2000(2):CD001318. DOI:[10.1002/14651858.CD001318](https://doi.org/10.1002/14651858.CD001318)
106. Castanon A, Brocklehurst P, Evans H, Peebles D, Singh N, Walker P, et al. Risk of preterm birth after treatment for cervical intraepithelial neoplasia among women attending colposcopy in England: retrospective-prospective cohort study. *BMJ.* 2012; 345:e5174. doi: [10.1136/bmj.e5174](https://doi.org/10.1136/bmj.e5174)
107. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2006 Feb; 367(9509):489-98. DOI:[10.1016/S0140-6736\(06\)68181-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68181-6)
108. Kyrgiou M, Mitra A, Arbyn M, Stasinou SM, Martin-Hirsch P, Bennett P, et al. Fertility and early pregnancy outcomes after treatment for cervical intraepithelial

- neoplasia: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2014 Oct; 349: g6192. doi: [10.1136/bmj.g6192](https://doi.org/10.1136/bmj.g6192)
109. Yamaguchi S, Tsuda H, Takemori M, Nakata S, Nishimura S, Kawamura N, et al. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology*. 2005 Sep; 69(2):110-6. DOI:[10.1159/000087812](https://doi.org/10.1159/000087812)
110. Garcia FA, Cornelison T, Nuño T, Greenspan DL, Byron JW, Hsu CH, et al. Results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Polyphenon E in women with persistent high-risk HPV infection and low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2014 Feb; 132(2):377-82. doi: [10.1016/j.ygyno.2013.12.034](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.12.034).
111. Kim HS, Kim T, Kim MK, Suh DH, Chung HH, Song YS. Cyclooxygenase-1 and-2: molecular targets for cervical neoplasia. *J Cancer Prev*. 2013 Jun; 18(2):123-134. doi: [10.15430/JCP.2013.18.2.123](https://doi.org/10.15430/JCP.2013.18.2.123)
112. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun; 324(1):17-27. DOI: [10.1016/j.virol.2004.03.033](https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033)
113. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006 Mar; 118(5):1071-6. DOI:[10.1002/ijc.21655](https://doi.org/10.1002/ijc.21655)
114. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May; 401(1):70-79. doi: [10.1016/j.virol.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002)
115. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015 Feb; 476:341-4. doi: [10.1016/j.virol.2014.12.028](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028).

116. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, et al. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jun; 14(6):888-894. doi:[10.3201/eid1406.070616.2](https://doi.org/10.3201/eid1406.070616.2)
117. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013 Oct; 445(1):2-10. doi: [10.1016/j.virol.2013.04.023](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.023)
118. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*. 2009 Jun; 4(1):8. doi: [10.1186/1750-9378-4-8](https://doi.org/10.1186/1750-9378-4-8)
119. Galani E, Christodoulou C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Nov; 15(11):977-81. doi:[10.1111/j.1469-0691.2009.03032.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03032.x).
120. Clifford G, Franceschi S. Members of the human papillomavirus type 18 family (alpha-7 species) share a common association with adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer*. 2008 Apr; 122(7):1684-5. DOI:[10.1002/ijc.23282](https://doi.org/10.1002/ijc.23282)
121. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006 May; 110(5):525-41. DOI:[10.1042/CS20050369](https://doi.org/10.1042/CS20050369)
122. McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*. 2008 Dec; 72:155-205. doi: [10.1016/S0065-3527\(08\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00404-1)
123. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20; 30 Suppl 5:F55-70. Doi: [10.1016/j.vaccine.2012.06.083](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083).

124. Demeret C, Garcia-Carranca A, Thierry F. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene*. 2003 Jan; 22(2):168-75. DOI: [10.1038/sj.onc.1206108](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206108)
125. Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2000 Jan; 275(1):87-94. DOI: [10.1074/jbc.275.1.87](https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.87)
126. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013 Oct; 445(0):99-114. doi: [10.1016/j.virol.2013.05.006](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.006)
127. Crusius K, Rodriguez I, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes*. 2000 Feb; 20(1):65-9. doi:[10.1023/A:1008112207824](https://doi.org/10.1023/A:1008112207824)
128. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015 Mar; 25(S1):2-3. doi: [10.1002/rmv.1822](https://doi.org/10.1002/rmv.1822)
129. Venuti A, Salani D, Poggiali F, Manni V, Bagnato A. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 enhances endothelin-1-induced keratinocyte growth. *Virology*. 1998 Aug; 248(1):1-5. DOI:[10.1006/viro.1998.9227](https://doi.org/10.1006/viro.1998.9227)
130. Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol*. 2003 Mar; 77(5):2819-2831. doi:[10.1128/JVI.77.5.2819-2831.2003](https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.2819-2831.2003)
131. O'Brien PM, Campo MS. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res*. 2002 Sep; 88(1):103-17. [doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00123-5)
132. Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*. 2003 Aug; 148(8):1445-53. DOI:[10.1007/s00705-003-0111-z](https://doi.org/10.1007/s00705-003-0111-z)

133. Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhn YS. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin–proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis*. 2010 Mar 1;31(3). doi: [10.1093/carcin/bgp318](https://doi.org/10.1093/carcin/bgp318).
134. Zeitler J, Hsu CP, Dionne H, Bilder D. Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol*. 2004 Dec; 167(6):1137-1146. doi: [10.1083/jcb.200407158](https://doi.org/10.1083/jcb.200407158)
135. Galloway DA, Gewin LC, Myers H, Luo W, Grandori C, Katzenellenbogen RA, et al. Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:209-15 DOI:[10.1101/sqb.2005.70.041](https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.041)
136. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007 Mar; 178(5):3186-97. doi.org/[10.4049/jimmunol.178.5.3186](https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.3186)
137. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol*. 2001 May; 75(9):4283-4296. doi:[10.1128/JVI.75.9.4283-4296.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4283-4296.2001)
138. Borbely AA, Murvai M, Kónya J, Beck Z, Gergely L, Li F, et al. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol*. 2006 Feb; 87(2):287-94. DOI:[10.1099/vir.0.81067-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.81067-0)
139. Yuan CH, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*. 2012 Dec; 4(12):3831-3850. doi:[10.3390/v4123831](https://doi.org/10.3390/v4123831)
140. Huang PS, Patrick DR, Edwards G, Goodhart PJ, Huber HE, Miles L, et al. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb; 13(2):953-960. doi:[10.1128/MCB.13.2.953](https://doi.org/10.1128/MCB.13.2.953)

141. Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology*. 2008 Jun; 40(4):335-44. doi: 10.1080/00313020802035907.
142. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997 Aug; 11(16):2090-2100. doi:10.1101/gad.11.16.2090
143. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996 Dec; 13(11):2323-30.
144. Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004 Mar; 109(2):157-62. DOI:[10.1002/ijc.11691](https://doi.org/10.1002/ijc.11691)
145. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*. 2011 Jan; 6(1):45-57. doi:[10.2217/fvl.10.73](https://doi.org/10.2217/fvl.10.73)
146. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009 Feb; 384(2):335-344. doi:[10.1016/j.virol.2008.10.006](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006)
147. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013 Oct; 445(0):169-174. doi:[10.1016/j.virol.2013.05.038](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038)
148. Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*. 2009 Mar; 83(5):2067-2074. doi:[10.1128/JVI.02190-08](https://doi.org/10.1128/JVI.02190-08)
149. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan; 103(5):1522-1527. doi:[10.1073/pnas.0508815103](https://doi.org/10.1073/pnas.0508815103)
150. Day PM, Schiller JT. The role of furin in papillomavirus infection. *Future Microbiol*. 2009 Dec; 4(10):1255-1262. doi:[10.2217/fmb.09.86](https://doi.org/10.2217/fmb.09.86)

151. Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013 Oct; 445(0):175-186. doi:[10.1016/j.virol.2013.04.017](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.017)
152. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009 Feb; 5(2):e1000318. doi:[10.1371/journal.ppat.1000318](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000318)
153. Abban CY, Meneses PI. Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection. *Virology*. 2010 Jul; 403(1):1-6. doi:[10.1016/j.virol.2010.04.007](https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.04.007)
154. Woodham AW, Da Silva DM, Skeate JG, Raff AB, Ambroso MR, Brand HE, et al. The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2012 Aug; 7(8):e43519. doi: [10.1371/journal.pone.0043519](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043519)
155. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jun; 109(26):10516-21 doi: [10.1073/pnas.1202684109](https://doi.org/10.1073/pnas.1202684109).
156. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*. 2006 Dec; 119(11):2677-84. DOI:[10.1002/ijc.22241](https://doi.org/10.1002/ijc.22241)
157. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007 Feb; 297(8):813-9. DOI:[10.1001/jama.297.8.813](https://doi.org/10.1001/jama.297.8.813)
158. Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and-uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis*. 2004 Jul; 190(1):37-45. DOI:[10.1086/421467](https://doi.org/10.1086/421467)

159. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005 Jun; 191(11):1808-16. DOI:[10.1086/428779](https://doi.org/10.1086/428779)
160. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* 2006 Aug; 24:S42-51. DOI:[10.1016/j.vaccine.2006.06.018](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.018)
161. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA.* 2001 Dec; 286(24):3106-14. DOI: [10.1001/jama.286.24.3106](https://doi.org/10.1001/jama.286.24.3106)
162. Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005 Jun; 337(1):76-84. DOI:[10.1016/j.virol.2005.04.002](https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.002)
163. Lorincz AT, Reid R, Jensen AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix; Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 1992 Mar; 79(3):328-37. DOI: [10.1097/00006250-199203000-00002](https://doi.org/10.1097/00006250-199203000-00002)
164. Zuna RE, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. Comparison of human papillomavirus distribution in cytologic subgroups of low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer.* 2006 Oct; 108(5):288-97. DOI:[10.1002/ncr.22168](https://doi.org/10.1002/ncr.22168)
165. Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*; 5th Edition, Garland Science, 2008.
166. Cullen AP, Reid RI, Champion MI, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *Journal of virology.* 1991 Feb 1;65(2):606-12.
167. Garcon N, Stern PL, Cunningham AL, Stanberry LR. *Understanding Modern Vaccines. Perspectives in Vaccinology.* 2011;1(1):1-200.

168. Buck CB, Day PM, Thompson CD, Lubkowski J, Lu W, Lowy DR, et al. Human α -defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan; 103(5):1516-21. DOI:[10.1073/pnas.0508033103](https://doi.org/10.1073/pnas.0508033103)
169. Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer*. 2011 Feb; 128(4):879-886. doi:[10.1002/ijc.25400](https://doi.org/10.1002/ijc.25400)
170. Iavazzo C, Pitsouni E, Athanasiou S, Falagas ME. Imiquimod for treatment of vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008 Apr; 101(1):3-10. doi: [10.1016/j.ijgo.2007.10.023](https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.10.023).
171. Mhatre M, McAndrew T, Carpenter C, Burk RD, Einstein MH, Herold BC. Cervical intraepithelial neoplasia is associated with genital tract mucosal inflammation. *Sex Transm Dis*. 2012 Aug;39(8):591-7. doi: [10.1097/OLQ.0b013e318255aeef](https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318255aeef).
172. Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos AC, Teodoro LD, Murta EF, Michelin MA. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Hum Immunol*. 2012 Sep; 73(9):920-6. doi: [10.1016/j.humimm.2012.06.003](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.06.003).
173. Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010 Mar; 134(1):33-8. doi: [10.1016/j.vetimm.2009.10.006](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.006).
174. Yang W, Song Y, Lu YL, Sun JZ, Wang HW. Increased expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in

high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology*.

2013 Aug; 139(4):513-522. doi:[10.1111/imm.12101](https://doi.org/10.1111/imm.12101)

175. Kutteh WH, Moldoveanu Z, Mestecky J. Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 Apr; 14 Suppl 1:S51-5.
176. Safaeian M, Kemp T, Falk RT, Rodriguez AC, Hildesheim A, Williams M, et al. Determinants and correlation of systemic and cervical concentrations of total IgA and IgG. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Oct; 18(10):2672-6. doi: [10.1158/1055-9965.EPI-09-0348](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0348).
177. Mbulawa ZZ, Williamson AL, Stewart D, Passmore JA, Denny L, Allan B, et al. Association of serum and mucosal neutralizing antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) with HPV-16 infection and cervical disease. *J Gen Virol*. 2008 Apr; 89(4):910-4. doi: [10.1099/vir.0.83458-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.83458-0).
178. Passmore JA, Marais DJ, Sampson C, Allan B, Parker N, Milner M, et al. Cervicovaginal, oral, and serum IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol*. 2007 Sep; 79(9):1375-80. DOI:[10.1002/jmv.20901](https://doi.org/10.1002/jmv.20901)
179. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005 Jan; 113(2):276-83. DOI:[10.1002/ijc.20558](https://doi.org/10.1002/ijc.20558)
180. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmī Z, Dunn KW, Blum JS, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . *Virology*. 2003 May; 310(1):100-8. doi.org/[10.1016/S0042-6822\(03\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00103-X)

181. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Feb; 7(1):79-89. doi.org/10.2174/156800907780006869
182. Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol*. 2003 Aug; 77(15):8378-85. DOI: [10.1128/JVI.77.15.8378-8385.2003](https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8378-8385.2003)
183. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar 30; 24 Suppl 1:S16-22. DOI:[10.1016/j.vaccine.2005.09.002](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.002)
184. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*. 2002 Dec; 76(23):12162-72. doi: [10.1128/JVI.76.23.12162-12172.2002](https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12162-12172.2002)
185. 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 Dec; 63(6):1129-36. [doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8)
186. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*. 1999 Jun; 80(6):1513-7. DOI:[10.1099/0022-1317-80-6-1513](https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1513)
187. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Dec; 89(24):12180-12184. DOI: [10.1073/pnas.89.24.12180](https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12180)
188. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb;93(4):284-92.
189. Pinto LA, Viscidi R, Harro CD, Kemp TJ, García-Piñeres AJ, Trivett M, et al. Cellular immune responses to HPV-18,-31, and-53 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *Virology*. 2006 Sep; 353(2):451-62. DOI:[10.1016/j.virol.2006.06.021](https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.021)

190. Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung CF. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci.* 2016 Nov; 23(1):75. DOI:[10.1186/s12929-016-0293-9](https://doi.org/10.1186/s12929-016-0293-9)
191. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene.* 2002 Sep; 21(39):6041-8. DOI:[10.1038/sj.onc.1205878](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205878)
192. Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, et al. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther.* 2003 Nov;8(5):762-8. doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.08.004
193. Ozturk MB, Li Y, Tergaonkar V. Current Insights to Regulation and Role of Telomerase in Human Diseases. *Antioxidants.* 2017 Feb 28;6(1):17. doi:10.3390/antiox6010017.
194. Müller, H.J. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net*,1938;13:181-195
195. McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics.* 1941 Mar; 26(2):234-82.
196. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol.*1978 Mar; 120(1):33-53. DOI: [10.1016/0022-2836\(78\)90294-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90294-2)
197. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Sep ;66(3):407-25. doi:[10.1128/MMBR.66.3.407-425.2002](https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.407-425.2002)
198. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965 Mar;37(3):614-36. [doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
199. Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, Van der Haegen BA. E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene.*1993 Jun; **8(6)**:1407–13.
200. Neumann AA, Watson CM, Noble JR, Pickett HA, Tam PP, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells. *Genes Dev.* 2013 Jan;27(1):18-23. doi:10.1101/gad.205062.112.

201. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995 Sep; 269(5228):1236-41. DOI: [10.1126/science.7544491](https://doi.org/10.1126/science.7544491)
202. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, et al. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol. Genet.* 1997 Nov;6(12):2011-9.
203. Gardano L, Holland L, Oulton R, Le Bihan T, Harrington L. Native gel electrophoresis of human telomerase distinguishes active complexes with or without dyskerin. *Nucleic Acids Res.* 2012 Mar ;40(5):e36. doi:[10.1093/nar/gkr1243](https://doi.org/10.1093/nar/gkr1243)
204. Collins K. Structure and function of telomerase. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Jun; 8(3):374-80. doi.org/[10.1016/S0955-0674\(96\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80013-5)
205. Huber O, Ménard L, Haurie V, Nicou A, Taras D, Rosenbaum J. Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res.* 2008 Sep; 68(17):6873-6. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-08-0547](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0547)
206. Sauerwald A, Sandin S, Cristofari G, Scheres SH, Lingner J, Rhodes D. Structure of active dimeric human telomerase. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Apr; 20(4):454-60. doi: [10.1038/nsmb.2530](https://doi.org/10.1038/nsmb.2530).
207. Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Marrone A, Digweed M, Walne A, et al. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenital. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Jun; 105(23):8073-8. doi: [10.1073/pnas.0800042105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800042105).
208. Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci.* 2013 Sep ;38(9):426-34. doi: [10.1016/j.tibs.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.07.001).
209. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 May; 104(18):7552-7. DOI:[10.1073/pnas.0701009104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701009104)
210. Listerman I, Sun J, Gazzaniga FS, Lukas JL, Blackburn EH. The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits

- telomerase activity but protects from apoptosis. *Cancer Res.* 2013 May; 73(9):2817-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3082.
211. Hrdličková R, Nehyba J, Bose HR. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Mol Cell Biol.* 2012 Nov; 32(21):4283-4296. doi:[10.1128/MCB.00550-12](https://doi.org/10.1128/MCB.00550-12)
212. Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci.* 2008 Apr; 121(7):1046-53. doi:10.1242/jcs.019372.
213. Hiyama E, Tatsumoto N, Kodama T, Hiyama K, Shay J, Yokoyama T. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol.* 1996 Sep; 9(3):453-8. doi.org/10.3892/ijo.9.3.453
214. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc.* 2011 May ;110(5):275-89. DOI:[10.1016/S0929-6646\(11\)60043-0](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(11)60043-0)
215. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994 Dec; 266(5193):2011–5.
216. Zhang F, Cheng D, Wang S, Zhu J. Human Specific Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene. *Genes.* 2016 Jun;7(7):30. DOI:[10.3390/genes7070030](https://doi.org/10.3390/genes7070030)
217. Yoshida K, Sugino T, Goodison S, Warren BF, Nolan D, Wadsworth S, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br J Cancer,* 1997;75(4):548-553. doi:[10.1038/bjc.1997.96](https://doi.org/10.1038/bjc.1997.96)
218. Myung SJ, Yang SK, Chang HS, Byeon JS, Kim KJ, Hong SS, et al. Clinical usefulness of telomerase for the detection of colon cancer in ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol Hepatol,* 2005 Oct; 20(10):1578-83. DOI:[10.1111/j.1440-1746.2005.03877.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03877.x)
219. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor

- cells and during immortalization. *Cell*.1997 Aug;90(4):785-95. DOI: [10.1016/S0092-8674\(00\)80538-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80538-3)
220. Frost M, Bobak JB, Gianani R, Kim N, Weinrich S, Spalding DC, et al. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Pathol*.2000 Nov;114(5):726-34. DOI:[10.1309/XWFE-ARMN-HG2D-AJYV](https://doi.org/10.1309/XWFE-ARMN-HG2D-AJYV)
221. [Yokoyama Y](#), [Takahashi Y](#), [Shinohara A](#), [Lian Z](#), [Tamaya T](#). Telomerase activity in the female reproductive tract and neoplasms. *Gynecol Oncol*. 1998 Feb;68(2):145-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/gyno.1997.4921>
222. [Kyo S](#), [Takakura M](#), [Kohama T](#), [Inoue M](#).Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res*. 1997 Feb;57(4):610-4 DOI: Published February 1997
223. [Yokoyama Y](#), [Takahashi Y](#), [Morishita S](#), [Hashimoto M](#), [Niwa K](#), [Tamaya T](#). Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*.1998 Feb; 4(2):173-7. doi.org/10.1093/molehr/4.2.173
224. Gorham H, Yoshida K, Sugino T, Marsh G, Manek S, Charnock M,et al. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin Pathol*. 1997 Jun; 50(6):501-504. [dx.doi.org/10.1136/jcp.50.6.501](https://doi.org/10.1136/jcp.50.6.501)
225. [Brien TP](#), [Kallakury BV](#), [Lowry CV](#), [Ambros RA](#), [Muraca PJ](#), [Malfetano JH](#), et al. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma *Cancer Res*. 1997 Jul ;57(13):2760-4. DOI: Published July 1997
226. Cheung AN, Zhang DK, Liu Y, Ngan HY, Shen DH, Tsao SW. Telomerase activity in gestational trophoblastic disease. *J Clin Pathol*. 1999 Aug;52(8):588-92.
227. Gewin L, Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J. Virol*. 2001 Aug; 75(15):7198–7201. doi:[10.1128/JVI.75.15.7198-7201.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.7198-7201.2001)
228. [Veldman T](#), [Horikawa I](#), [Barrett JC](#), [Schlegel R](#). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol*. 2001 May; 75(9):4467–72. DOI:[10.1128/JVI.75.9.4467-4472.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4467-4472.2001)

229. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996 Mar; 380(6569):79-82. DOI:[10.1038/380079a0](https://doi.org/10.1038/380079a0)
230. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Spl binding sites. *J. Virol.* 2001 Jun; 75(12):5559–66. DOI:[10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001)
231. Sprague DL, Phillips SL, Mitchell CJ, Berger KL, Lacey M, Turek LP, et al. Telomerase activation in cervical keratinocytes containing stably replicating human papillomavirus type 16 episomes. *Virology*. 2002 Sep; 301(2):247-54.
232. de Wilde J, Wilting SM, Meijer CJ, van de Wiel MA, Ylstra B, Snijders PJ, et al. Gene expression profiling to identify markers associated with deregulated hTERT in HPV transformed keratinocytes and cervical cancer. *Int J Cancer*. 2008 Feb; 122(4):877-88. DOI:[10.1002/ijc.23210](https://doi.org/10.1002/ijc.23210)
233. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol*. 2006 Nov; 34(11):739-48. DOI:[10.1002/dc.20554](https://doi.org/10.1002/dc.20554)
234. Wang HY, Park S, Kim S, Lee D, Kim G, Kim Y, et al. Use of hTERT and HPV E6/E7 mRNA RT-qPCR TaqMan assays in combination for diagnosing high-grade cervical lesions and malignant tumors. *Am J Clin Pathol*. 2015 Mar; 143(3):344-51. doi: [10.1309/AJCPF2XGZ2XIYQX](https://doi.org/10.1309/AJCPF2XGZ2XIYQX).
235. Castro-Duque AF, Loango-Chamorro N, Ruiz-Hoyos BM, Landázuri P. Telomerase activity associated with progression of cervical lesions in a group of Colombian patients. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015 Dec; 37(12):559-64. doi:[10.1590/SO100-720320150005462](https://doi.org/10.1590/SO100-720320150005462).
236. Li F, Cui J. Human telomerase reverse transcriptase regulates vascular endothelial growth factor expression via human papillomavirus oncogene E7 in HPV-18-positive

- cervical cancer cells. *Med Oncol.* 2015 Jul; 32(7):199. doi:10.1007/s12032-015-0649-0.
237. Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, et al. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* 2000 Nov; 60(22):6230-5.
238. Cao Y, Bryan TM, Reddel RR. Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Sci.* 2008 Jun;99(6):1092-9. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00815.x.
239. Xi L, Zhu T, Wu P, Xu Q, Huang L, Li KZ, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase in cervix cancer and its significance. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2005 Jun;40(6):407-10.
240. Saha B, Chaiwun B, Tsao-Wei DD, Groshen SL, Naritoku W Y, Atkinson RD, et al. Telomerase and markers of cellular proliferation are associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions. *Int J.Gynecol Pathol.* 2007 Jul;26(3):214-22. DOI:[10.1097/01.pgp.0000250146.44592.d2](https://doi.org/10.1097/01.pgp.0000250146.44592.d2)
241. Nagai N, Oshita T, Murakami J, Ohama K . Semiquantitative analysis of telomerase activity in cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol Rep.* 1999 Mar-Apr; 6(2):325-8. *Oncol Rep.* 1999; 6(2):325-8. doi.org/10.3892/or.6.2.325
242. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 1998 Jun;12(12):1769-74
243. Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene.* 2003 Oct ;22(46):7233-42. DOI:[10.1038/sj.onc.1207006](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207006)
244. Bièche I, Noguès C, Paradis V, Olivi M, Bedossa P, Lidereau R, et al. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res.* 2000 Feb; 6(2):452-9.
245. Wang, Z., S. Kyo, M. Takakura, M. Tanaka, N. Yatabe, Y. Maida, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 2000 Oct; 60(19):5376-81.

246. Johannsen E, Lambert PF. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):205-12. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.016.
247. Kaczkowski B, Morevati M, Rossing M, Cilius F, Norrild B. Suppl 2: A Decade of Global mRNA and miRNA Profiling of HPV-Positive Cell Lines and Clinical Specimens. *Open Virol J*. 2012; 6:216-231. doi:[10.2174/1874357901206010216](https://doi.org/10.2174/1874357901206010216)
248. Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Clinical implications of (epi) genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jun;14(6):395-405. doi:10.1038/nrc3728
249. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt. *J Cell Sci*. 2001 Aug; 114(16):2903-10.
250. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Marriott A, et al. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst*. 1999 Jan; 91(1):37-45.
251. Henderson YC, Breau RL, Liu TJ, Clayman GL. Telomerase activity in head and neck tumors after introduction of wild-type p53, p21, p16, and E2F-1 genes by means of recombinant adenovirus. *Head Neck*. 2000 Jul; 22(4):347-54.
252. Xu D, Erickson S, Szeps M, Gruber A, Sangfelt O, Einhorn S, et al. Interferon α down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood*. 2000 Dec;96(13):4313-8.
253. **Yang, H, S. Kyo, M. Takatura, L. Sun.** Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ*.2001 Feb; 12(2):119-27.
254. De Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci US A*. 1994;91(8):2882-2885.
255. Bravaccini S, Sanchini MA, Amadori A, Medri L, Saragoni L, Calistri D, et al. Potential of telomerase expression and activity in cervical specimens as a diagnostic tool. *J Clin Pathol*. 2005 Sep;58(9):911-914. doi:[10.1136/jcp.2004.024158](https://doi.org/10.1136/jcp.2004.024158)
256. Balaha MH, Al Moghannum MS, Al Ghwinem N, Al Omran S. Cytological pattern of cervical Papanicolaou smear in eastern region of Saudi Arabia. *J Cytol*. 2011 Oct;28(4):173-177. doi:[10.4103/0970-9371.86343](https://doi.org/10.4103/0970-9371.86343)

257. Schiff M, Becker TM, Masuk M, Asselt-King LV, Wheeler CM, Altobelli KK, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in southwestern American Indian women. *Am J Epidemiol.* 2000 Oct; 152(8):716-26.
258. Tao L, Han L, Li X, Gao Q, Pan L, Wu L, Luo Y, Wang W, Zheng Z, Guo X. Prevalence and risk factors for cervical neoplasia: a cervical cancer screening program in Beijing. *BMC Public Health.* 2014 Nov;14(1):1185. doi:[10.1186/1471-2458-14-1185](https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1185)
259. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011;2011: 847684. doi:[10.5402/2011/847684](https://doi.org/10.5402/2011/847684)
260. González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, Green J, Peto J, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int. J. Cancer.* 2006 Mar; 118(6):1481-95. DOI:[10.1002/ijc.21493](https://doi.org/10.1002/ijc.21493)
261. Meloni A, Pilia R, Campagna M, Usai A, Masia G, Caredda V, et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. *J Public Health Res.* 2014 Mar; 3(1):157. doi: [10.4081/jphr.2014.157](https://doi.org/10.4081/jphr.2014.157)
262. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smear of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Dec ;13(12):2153-6 DOI: Published December 2004
263. de Araújo Resende LS, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Alves RR, Ribeiro AA, Zeferino LC, et al. A portrait of single and multiple HPV type infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. *BMC Infect Dis.* 2014 Apr; 14(1):214. doi: [10.1186/1471-2334-14-214](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-214)
264. Dimitrov G, Dzikova E, Dimitrov G, Panov S, Aleksioska I, Babusku G. The role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Journal of Health Sciences, [S.l.].* 2013; 3(2): 117-22. doi: <https://doi.org/10.17532/jhsci.2013.75>.

265. Aleksioska-Papestiev, Chibisheva V, Micevska M, Dimitrov G. Prevalence of Specific Types of Human Papiloma Virus in Cervical Intraepithelial Lesions and Cervical Cancer in Macedonian Women. *Med Arch.* 2018; 72(1):26-30. doi: 10.5455/medarh.2018.72.26-30.
266. Dimitrov G, Sotiroska V, Dimitrov G, Sterjovska A, Panov S. Human papillomavirus infection in cervical precancerous lesions. *Wulfenia.* 2015; 22(7): 21-31.
267. AlObaid A, Al-Badawi IA, Al-Kadri H, Gopala K, Kandeil W, Quint W, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution among women attending routine gynecological examinations in Saudi Arabia. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1):643. doi:[10.1186/s12879-014-0643-8](https://doi.org/10.1186/s12879-014-0643-8)
268. Dursun P, Senger SS, Arslan H, Kuşçu E, Ayhan A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis.* 2009 Nov;9(1):191. doi:[10.1186/1471-2334-9-191](https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-191)
269. Bao YP, Li N, Smith JS, Qiao YL. Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2008 Jan; 18(1):71-9. DOI:[10.1111/j.1525-1438.2007.00959.x](https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.00959.x)
270. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005 Sep;366(9490):991-998. [doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67069-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67069-9)
271. Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O, CLEOPATRE Portugal Study Group. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal: the CLEOPATRE Portugal study. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 Aug; 21(6):1150-8. doi: 10.1097/IGC.0b013e31821dd3b2.
272. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec ;202(12):1789-99. doi:10.1086/657321

273. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health*. 2008;43(4):S5-25, S25.e1-41. doi: 10.1016/j.jadohealth.2008.07.009.
274. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007 Aug;121(3):621-32. DOI:[10.1002/ijc.22527](https://doi.org/10.1002/ijc.22527)
275. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010 Nov; 11(11):1048-56. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70230-8
276. Harano T, Okada S. Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection among women with normal and abnormal cervical cytology in Myanmar. *Acta Med Okayama*. 2014;68(2):79-87. DOI:[10.18926/AMO/52404](https://doi.org/10.18926/AMO/52404)
277. Liu XX, Fan XL, Yu YP, Ji L, Yan J, Sun AH. Human papillomavirus prevalence and type-distribution among women in Zhejiang Province, Southeast China: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2014 Dec;14(1):708. doi: [10.1186/s12879-014-0708-8](https://doi.org/10.1186/s12879-014-0708-8)
278. Balbi G, Napolitano A, Giordano F, Capuano S, Manganaro MA, Di Martino L, et al. Role of the association of high-risk HPV identified by real-time PCR in cervical preneoplastic lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012; 33(5):467-71.
279. Wang L, Wang P, Ren Y, Du J, Jiang J, Jia X, et al. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus (HR-HPV) Genotypes and Multiple Infections in Cervical Abnormalities from Northern Xinjiang, China. *PLoS One*. 2016 Aug; 11(8):e0160698. doi: 10.1371/journal.pone.0160698.
280. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*. 2004 Jan; 57(1):68-72.
281. Ammatuna P, Giovannelli L, Matranga D, Ciriminna S, Perino A. Prevalence of genital human papilloma virus infection and genotypes among young women in Sicily,

- South Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Aug ;17(8):2002-6. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0180
282. Gomez Roman JJ, Echevarria C, Salas S, Gonzalez Moran MA, Perez Mies BE, Garcia Higuera IS, et al. A type specific study of human papillomavirus prevalence in cervicovaginal samples in three different Spanish regions. *APMIS.* 2009 Jan; 117(1):22-7. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008. 00009.x
283. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jul; 89(1):101-5. Doi:10.1038./sj.bjc6601024
284. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jan; 88(1):63-73. Doi:10 .1038/sj.bjc.6600688
285. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol.* 2003 Sep; 201(1):1-6. Doi:10.1002/path.1433
286. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol.* 1997 Jun; 35(6):1304-10.
287. Wang PH, Chen GD, Chang H, Yang SF, Han CP, Lin LY, et al. High expression of human telomerase reverse transcriptase in high-grade intraepithelial neoplasia and carcinoma of uterine cervix and its correlation with human papillomavirus infection. *Reprod Sci.* 2007 May;14(4):338-348. doi.org/10.1177/1933719107303986
288. Hsu CG, Wang PH, Ko JL, Chen GD, Chang H, Yang SF, et al. Concurrent high expression of human telomerase reverse transcriptase and human nonmetastatic clone 23 in high-grade squamous intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Mar ;17(4):851-7. DOI:10.1111/j.1525-1438.2007. 00894.x

289. Saretzki G, Fischer H, Kaufmann IG, Schewe C, Nadjari B, Blohmer J, et al. Telomerase activity in cervical smears. *Anal Cell Pathol.* 2001;23(1):39-43. doi:[10.1155/2001/630972](https://doi.org/10.1155/2001/630972)
290. Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, Knol AJ, Koopmans S, Boezen HM, et al. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol.* 2003 Jan ;56(1):31-5. dx.doi.org/10.1136/jcp.56.1.31
291. Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase: A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer.* 2001 Mar; 11(2):100-6. DOI: 10.1046/j.1525-1438.2001.00095.x
292. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Kanaya T, Inoue M. Telomerase activity in cervical cancer is quantitatively distinct from that in its precursor lesions. *Int J Cancer.* 1998 Feb; 79(1):66-70.
293. Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(7):1558-61. DOI: Published April 1998
294. Ault KA, Allen HK, Phillips SL, Zimmerman MB, Klingelutz AJ. Telomerase activity as a potential diagnostic marker for triage of abnormal Pap smears. *J Low Genit Tract Dis.* 2005 Apr; 9(2):93-99. DOI:[10.1097/00128360-200504000-00005](https://doi.org/10.1097/00128360-200504000-00005)
295. Kailash U, Soundararajan CC, Lakshmy R, Arora R, Vivekanandhan S, Das BC. Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in cervical cancer. *Br J Cancer.* 2006 Nov;95(9):1250. DOI:[10.1038/sj.bjc.6603375](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603375)
296. Huang PS, Patrick DR, Edwards G, Goodhart PJ, Huber HE, Miles L, et al. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol.* 1993 Feb; 13(2):953-60. DOI: [10.1128/MCB.13.2.953](https://doi.org/10.1128/MCB.13.2.953)
297. Wang SZ, Sun JH, Zhang W, Jin SQ, Wang HP, Jin YS, et al. Telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Chin Med Journal.* 2004 Feb; 117(2):202-6.

298. Snijders PJ, van Duin M, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res.* 1998 Sep; 58(17):3812-8. DOI: Published September 1998